

NOTE

NOTE SUR LA PRÉPARATION DES OTOLITHES,
PLUS PARTICULIÈREMENT DE CEUX DE L'ANGUILLE

V. BENECH (1)

Station d'Hydrobiologie I. N. R. A.,
64200 Biarritz

RÉSUMÉ

Après une description succincte des différentes méthodes utilisées pour la préparation des otolithes de poisson, l'auteur présente celle qu'il a adoptée pour l'étude des otolithes de l'Anguille ; elle fait appel à l'inclusion suivie de l'usure et de la coloration de l'otolithe.

I. — INTRODUCTION

Les otolithes apparaissent plus fiables que les écailles pour la détermination de l'âge des poissons, des vieux notamment. Chez *Salvelinus namaycush* ces structures continueraient à enregistrer les annuli alors que les écailles ont cessé de croître (DUBOIS et LAGUEUX, 1968). Van UTRICHT et SCHENKKAN (1972) jugent l'emploi des structures osseuses plus sûr que celui des écailles seules chez *Leuciscus indus*. Cette découverte faite depuis longtemps chez l'Anguille (MARCUS, 1919 ; BERTIN, 1956) se généralise à d'autres espèces.

Les otolithes, plus fiables, sont malheureusement souvent petits, difficilement manipulables et les annuli non aisément identifiables. C'est le cas chez de nombreux poissons, aussi différentes méthodes de préparation ont-elles été décrites. Nous avons travaillé sur les otolithes d'anguille et après plusieurs tâtonnements et essais de différents procédés, nous avons choisi un mode de préparation qui a facilité notre travail d'observation. Nous le décrirons dans cette note après avoir rappelé les différents procédés qui sont en usage. Cette révision pourra aider ceux qui rechercheraient une méthode mieux adaptée à l'espèce qu'ils étudient.

(1) Adresse actuelle : Centre O.R.S.T.O.M., B. P. 65, N'Djamena (Tchad).

2. — RAPPEL, DES DIFFÉRENTES MÉTHODES DE PRÉPARATION

2. 1. — *Éclaircissement et usure*

La plupart des auteurs ayant travaillé sur l'Anguille ont adopté cette méthode.

FROST (1945) procède d'abord à un éclaircissement de l'otolithe par un bain de 24 h dans la créosote. Après un autre bain d'une seconde dans l'alcool absolu, la face convexe de l'otolithe est usée progressivement jusqu'à ce que les différents anneaux apparaissent bien. Cet auteur signale qu'une immersion brève dans l'acide chlorhydrique très dilué fait apparaître les anneaux plus clairement. L'observation est effectuée dans la créosote sur fond noir en lumière réfléchie. Des couches blanchâtres et opaques alternent avec des couches translucides. IRIE (1955, 1957, 1960) a montré sur les poissons marins que l'aspect différent de ces zones était dû à leur texture et à leur composition différente. La densité des microcristaux de CaCO_3 dans les couches opaques est moindre que dans les couches translucides et une sorte de substance organique opaque aux rayons visibles y est contenue plus abondamment. Une croissance rapide provoque la formation des larges zones translucides, une croissance lente celle des zones opaques.

PENAZ et TESCH (1970) ont procédé de la même façon que SINHA et JONES (1967) ; ils utilisent une méthode semblable à celle de FROST, toutefois sans bain dans la créosote et l'alcool absolu préalablement à l'usure, un simple lavage dans l'eau distillée la précède. Ces auteurs précisent que la structure de l'otolithe devient plus évidente lorsque l'on use les deux faces. La fin de l'usure est suivie d'une attaque par HCl à 4 p. 100 ; l'otolithe est en fin lavé, séché et mis dans la créosote pour l'observation.

GRAY et ANDREWS (1970) baignent simplement l'otolithe une minute dans l'eau distillée avant de l'user sur un papier abrasif fin et humide. L'observation est faite dans l'alcool à 50 p. 100.

2. 2. — *Flambage et clivage*

CHRISTENSEN (1964) a mis au point ce procédé pour la Sole dans le but de rendre possible une interprétation identique des otolithes de ce poisson par les différents chercheurs.

L'otolithe est tenu dans une flamme pendant quelques secondes et sa coloration passe du blanc au gris cendre. Par une légère pression sur sa face convexe on provoque une fracture passant par le noyau. Des anneaux blancs et noirs faciles à compter alternent sur la tranche de clivage. Les anneaux noirs correspondent à la combustion du matériel organique contenu dans les couches opaques.

CHRISTENSEN a obtenu des résultats semblables sur les otolithes d'autres espèces notamment l'Anguille. C'est un procédé intéressant car très rapide mais la fragilité des otolithes après leur flambage rend leur manipulation délicate et leur conservation difficile ; l'observation des plans de clivage est également difficile pour les petits otolithes.

2. 3. — *Usure et observation de la structure de surface*

WIEDEMANN SMITH (1968) emploie la microscopie de surface utilisée en métallographie. Cette observation nécessite une usure et un polissage effectués avec une précision satisfaisante, c'est pourquoi l'inclusion dans une matière plastique facilite l'opération. L'observation est effectuée avec un microscope adéquat ou à défaut à l'aide d'une loupe binoculaire dont l'un des tubes est utilisé pour l'éclairage. L'examen de la surface polie révèle des lamelles concentriques de différentes épaisseurs. Les groupes de fines lamelles forment des anneaux qui correspondent aux

anneaux noirs des otolithes brûlés. WIEDEMANN SMITH a obtenu des résultats intéressants pour des otolithes d'anguille jusque-là impossibles à lire. L'auteur précise que des mesures sont effectuées facilement, directement ou sur des photos.

2. 4. — *Coloration*

Elle a été utilisée par ALBRECHTSEN (1968). On effectue d'abord une usure jusqu'au noyau de façon à faire apparaître toutes les couches concentriques sur le plan de coupe. Seule l'une des deux sortes de couches qui composent l'otolithe prend le colorant, l'autre reste incolore. Comme pour le flamage, leur teneur différente en matière organique en est sans doute responsable.



FIG. 1.

Haut : otolithe d'anguille observé dans l'alcool, sur fond noir, après une simple usure.
Bas : le même otolithe après coloration.

ALBRECHTSEN a montré que les anneaux colorés correspondaient à ceux mis en évidence par la méthode de WIEDEMANN SMITH (cf. § 2. 3). Avec le bleu de Toluidine, les couches opaques forment de minces anneaux violets (fig. 1) ; cette coloration peut virer au bleu-vert par la suite.

La figure 1 montre les photos d'un même otolithe observé dans l'alcool sur fond noir après une simple usure, puis après coloration. Malgré la mauvaise qualité des prises de vue, on peut apprécier l'amélioration apportée par la coloration. La différence de largeur entre couches opaques et anneaux violets provient du fait que seule la section des couches opaques se colore.

3. — LA MÉTHODE QUE NOUS AVONS ADOPTÉE

Elle s'inspire de l'usure après inclusion de l'otolithe dans un support (cf. § 2. 3) suivie de coloration (cf. § 2. 4).

3. 1. — Inclusion et usure

Pour ces deux opérations, nous avons utilisé le nécessaire commercialisé par la firme Soloplast⁽¹⁾ pour l'inclusion de petits objets. Il s'agit d'une résine synthétique très transparente qu'il est possible d'user et de polir très finement après son durcissement.

Le moule adopté est constitué par des barres de Leuckart utilisées en histologie ; on dispose ces barres sur un carreau de pailleasse par exemple, de façon à obtenir un rectangle de $2 \times 1,5$ cm. Après avoir coulé 0,8 cm de résine dans ce moule, on dispose l'otolithe sur le fond en fonction du plan d'usure que l'on veut réaliser. On peut disposer l'otolithe avant la coulée en la fixant dans la position choisie avec un peu de colle, comme cela a été fait par WIEDEMANN SMITH (1968). Il est utile, avant le durcissement de la résine, de planter dans le bloc une étiquette mentionnant les caractéristiques de l'otolithe inclus.

Lorsque la résine est bien prise (au bout de quelques heures), on procède au démoulage. Il existe un produit à enduire sur le moule pour éviter l'adhérence de la résine sur celui-ci ; son emploi n'est pas obligatoire.

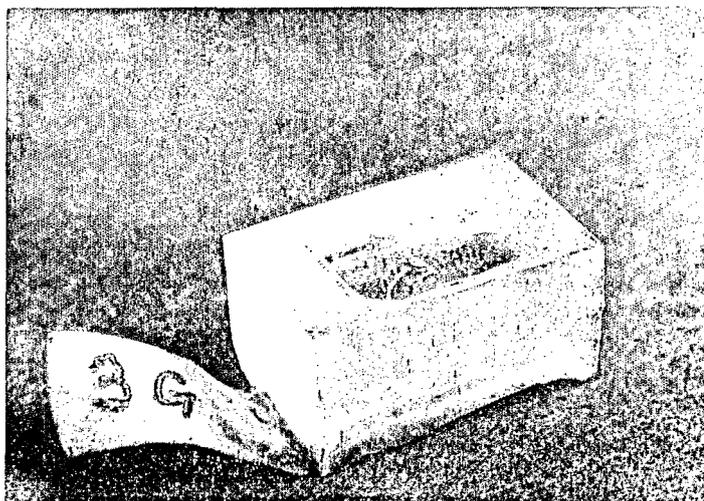


FIG. 2. — Bloc de résine ayant servi de support pour la préparation d'un otolithe

On distingue l'otolithe sur la face supérieure au centre de la plage claire qui correspond à l'étalement d'une goutte de baume du Canada par une lamelle de verre

(1) Soloplast : Avenue de la Monta, 38 Saint-Egreve (France).

Le plan d'usure est la face du bloc sur laquelle l'otolithe repose. L'abrasion est effectuée avec des papiers abrasifs humidifiés de grain de plus en plus fin jusqu'à ce que le centre de l'otolithe soit atteint. Il convient de laver souvent la surface d'usure et de bien la nettoyer quand on change de grain afin d'éviter les rayures.

3. 2. — Coloration

Elle doit être précédée de l'attaque de la surface usée par *HCl* à 1 p. 100. Il suffit de déposer une goutte d'acide sur l'otolithe et de laver au bout d'une quinzaine de secondes.

On procède de la même façon avec du *Bleu de Toluidine* à 1 p. 100. On rince à l'eau après quelques secondes. Les anneaux se colorent en violet. Si leur coloration est trop pâle, il convient d'augmenter le temps ; si elle est trop intense, on peut effectuer une régression à l'aide de *HCl* à 1 p. 100 jusqu'à une parfaite netteté des anneaux. On arrête le processus par un rinçage à l'eau.

Après séchage à l'air, l'otolithe coloré est recouvert d'une goutte de baume du Canada sur laquelle on dépose un quart de lamelle de verre pour préparations microscopiques. Le montage ainsi réalisé (fig. 2) protège la coloration, augmente la netteté des anneaux et assure une conservation facile et durable.

4. — CONCLUSION

Toutes les méthodes présentées permettent avec plus ou moins de facilité ou de temps l'interprétation des anneaux des otolithes de l'Anguille pour la détermination de l'âge. Si l'on veut utiliser l'otolithe pour effectuer des rétro-mesures, ce qui paraît faisable d'après PENAZ et TESCU (1970), les limites des différentes couches devront être précises et l'axe de mesure choisi bien défini pour assurer des mesures comparables d'un otolithe à l'autre.

La méthode de coloration que nous avons choisie donne des anneaux très bien définis. Malgré sa longueur, l'inclusion de l'otolithe permet d'effectuer un plan de coupe avec beaucoup de précision et elle facilite en plus la manipulation, la conservation et le rangement de ces otolithes de petite taille.

Reçu pour publication en juin 1975.

SUMMARY

NOTE ON THE PREPARATION OF OTOLITHS, PARTICULARLY THOSE OF CIEL

After a brief description of the various methods used for preparing fish otoliths, the author presents his own technique for the study of eel otoliths ; it is based on the inclusion process, then grinding and coloration of the otolith.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALBRECHTSEN K., 1968. A dyeing technique for otolith age reading. *J. Cons. perm. int. Explor. Mer.*, 32 (2), 278-280.
BERTIN L., 1951. *Les Anguilles* p., 191. Payot, Paris.
CHRISTENSEN J. M., 1964. Burning of otoliths, a technique for age determination of soles and other fish. *J. Cons. perm. int. Explor. Mer.*, 29 (1), 73-81.

- DUBOIS A., LAGUEUX R., 1968. Étude comparée de l'âge scalaire et de l'âge otolithique de la Touladi (*Salvelinus namaycush*), Lac Mistassini, Québec. *Naturaliste can.*, **95**, 907-928.
- FROST W. E., 1945. The age and growth of eels (*Anguilla anguilla*) from the Windermere catchment area. *J. An. Ecol.*, **14** (1), 26-36.
- GRAY R. W., ANDREWS C. W., 1971. Age and growth of the American eel (*Anguilla rostrata* (Le Sueur)) in Newfoundland waters. *Can. J. Zool.*, **49**, 121-128.
- IRIE T., 1955. The crystal texture of the otolith of a marine teleost *Pseudoscianca*. *J. Fac. Fish. Anim. Husb. Hiroshima Univ.*, **1** (1), 1-8.
- IRIE T., 1957. On the forming season of animal rings (opaque and translucent zones) in the otoliths of several marine teleosts. *J. Fac. Fish. Anim. Husb. Hiroshima Univ.*, **1** (3), 311-317.
- IRIE T., 1960. The growth of the fish otolith. *J. Fac. Fish. Anim. Husb. Hiroshima Univ.*, **3** (1), 203-229.
- MARCUS K., 1919. Über Alter und Wachstum des Aales. *Mitt. Zool. Mus.*, **36**, Hamburg.
- PENAZ M., TESCH F. W., 1970. Geschlechtsverhältnis und Wachstum beim Aal (*Anguilla anguilla*) an verschiedenen Lokalitäten von Nordsee und Elbe. *Berr. Dt. Wiss. Komm. Meeresforsch.*, **21** (1-4), 290-310.
- SINHA V. R. P., JONES J. W., 1967. On the age and growth of the freshwater eel (*Anguilla anguilla*), *J. Zool. Lond.*, **153**, 99-117.
- VAN UTRECHT W. L., SCHENKMAN E. J., 1972. On the analysis of the periodicity in the growth of scales, vertebrae and other hard structures in a teleost. *Aquaculture*, **1** (3), 293-316.
- WIEDEMAN SMITH W. S., 1968. Otolith age reading by means of surface structure examination. *J. Cons. perm. int. Explor. Mer*, **32** (2), 270-277.
-

NOTE

NOTE SUR LA PRÉPARATION DES OTOLITHES,
PLUS PARTICULIÈREMENT DE CEUX DE L'ANGUILLE

V. BENECH

*Station d'Hydrobiologie I. N. R. A.,
64200 Biarritz*

Annales d'Hydrobiologie

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle, 75007 Paris

1 - MARS 1995

O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire

N° 41084

Cote B Ex 1