

**MARQUAGE VITAL EN MASSE
CHEZ L'ANGUILLE (*ANGUILLA ANGUILLA*)
A L'AIDE D'UNE TECHNIQUE
DE BALNEATION RAPIDE**

Marina ALCOBENDAS¹, Frédérique LECOMTE¹,
Hélène FRANCILLON-VIEILLOT¹, Jacques CASTANET¹,
François J. MEUNIER¹, Philippe MAIRE²

RESUME

L'immersion de civelles (*Anguilla anguilla* L.), pendant 3'30, dans une solution hyperosmotique (5 % de chlorure de sodium) contenant 1 % de chlorhydrate de tétracycline (CHTC) ou 2 % de fluorescéine (DCAF) entraîne une accélération de la vitesse d'entrée de ces deux marqueurs vitaux dans l'organisme des poissons et assure un bon marquage des vertèbres et des otolithes. La mise au point d'une méthode de balnéation rapide dans la tétracycline par choc osmotique, sur de très grosses quantités de civelles, a permis de réaliser des alevinages expérimentaux de 500 kg de poissons dans le Rhin et 16 kg dans un étang de la Somme. Un an après cet alevinage de civelles, dix anguillettes (réparties pour moitié dans chaque milieu) présentant des otolithes marqués par la tétracycline ont été recapturées.

VITAL MASS LABELLING OF GLASS-EELS (*ANGUILLA ANGUILLA* L.) WITH FAST BALNEATION

ABSTRACT

Immersion of glass-eels (Anguilla anguilla), for about three and half minutes, in an hyperosmotic solution (5 % sodium chloride) and containing 1 % of tetracycline chlorhydrate (CHTC) or 2 % of calcein (DCAF), resulted in a fast uptake of these two vital fluorochroms into the fish and a good labelling of vertebrae and otoliths occurred.

¹ UA CNRS N°1137, Equipe de Recherche "Formations squelettiques", Laboratoire d'Anatomie Comparée, Université Paris 7, 2, Place Jussieu, 75251 PARIS Cedex 05

² Conseil Supérieur de la Pêche, Délégation régionale N°3, 18 rue de Nomeny, 57158 MONTIGNY-LES-METZ

Development of a method of fast mass vital labelling with tetracycline by balneation-shock osmotic of high quantity of elvers, allowed experimental fry release (500 kg in the river Rhine and 16 kg in a pond of the river Somme). One year after, ten young eels (equally distributed in the two rivers) with labelled otoliths have been recaptured.

INTRODUCTION

D'une manière générale l'étude de la biologie ou de l'écologie des poissons nécessite la mise au point de méthodes de reconnaissance des animaux dans le milieu naturel.

Les plus classiques, en liaison avec les techniques de marquage-recapture, sont les marques externes, les tatouages ou les marques chimiques par injection sous-cutanée (Jakobson, 1970 ; Laird et Stott, 1978 ; Herbinger *et al.*, 1990). Cependant ces techniques sont surtout adaptées aux sub-adultes ou adultes et restent relativement

MATERIEL ET METHODES

Afin de réduire le temps d'action des fluoromarqueurs sans altérer leur efficacité, nous avons utilisé la technique du choc osmotique déjà employée pour la vaccination en masse des truites (Amend et Fender, 1976). Couplé à la balnéation ce choc osmotique entraîne une accélération des processus d'absorption des substances actives et, de ce fait, raccourcit considérablement la durée du marquage (Alcobendas *et al.*, 1991). Après la présentation du principe de la technique nous décrivons une première application effectuée à l'occasion d'un alevinage de civelles destiné à l'étude de la croissance de l'anguille dans un milieu ouvert (le Rhin) et un milieu semi-ouvert (un étang de la Somme) ainsi qu'à l'étude de l'impact des alevinages sur les populations naturelles d'anguilles.

MATERIEL

Les expériences ont été faites sur des civelles capturées dans le cours inférieur de la Loire, au début de leur migration anadrome (fin de l'hiver-début du printemps). Les animaux, d'une taille moyenne de 7 cm, sont au stade VB-VIAO selon la classification de Elie *et al.*, (1982). Chaque lot est constitué de 50 civelles. Après traitement par balnéation, les lots sont maintenus dans un aquarium d'eau courante, dans un volume d'environ 20 litres, à une température de 12 +/- 2°C. Les animaux ne sont pas nourris pendant les 15 jours d'observation post-expérimentale.

METHODE DE MARQUAGE

Le but de la méthode de marquage est de faire pénétrer rapidement une quantité



- témoins dans du bicarbonate à 2 %.

Au bout des 15 jours d'observation, 15 à 20 spécimens sont fixés dans l'alcool à 70°. Les vertèbres caudales et les otolithes sont prélevés et montés entre lame et lamelle après déshydratation pour une observation en microscopie à fluorescence.

RESULTATS

MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE DE BALNEATION RAPIDE

Nous résumerons ici brièvement les résultats obtenus avec la tétracycline et la fluorescéine, travaux exposés en détail ailleurs (Alcobendas *et al.*, 1991). Nous commenterons plus longuement ceux acquis avec l'orangé de xylénol et l'alizarine.

Tétracycline, Fluorescéine

Il n'y a pas de différences dans le taux de mortalité entre lots témoins et lots traités. Les animaux supportent parfaitement la balnéation rapide qu'elle soit en un ou deux temps.

Il n'y a pas non plus de différences significatives dans la qualité du marquage entre les deux procédés de balnéation rapide tant pour les vertèbres que pour les otolithes. Le procédé en un temps (balnéation-choc osmotique simultanés) qui ne dure que 3 mn 1/2 avec une seule manipulation des poissons a été préféré. Des tests complémentaires ont montré que cette durée de balnéation pouvait être portée jusqu'à 8 à 10 mn sans entraîner d'effets notables sur la survie des civelles. Par ailleurs, le tissu osseux est en général plus facilement marqué que les otolithes pour les deux marqueurs (tableau 1). Le CHTC donne cependant les meilleurs résultats (marquage plus intense).

Tableau 1. Qualité du marquage des otolithes et des vertèbres avec la tétracycline (CHTC) et la fluorescéine (DCAF) ; N = pourcentage de spécimens marqués ; Q = proportion de spécimens présentant un marquage bon ou très bon (d'après Alcobendas *et al.*, 1991).

Marqueur cible			Choc puis balnéation	Choc + balnéation
CHTC	otolithe	N	90 %	100 %
		Q		3 / 5
	Vertèbre	N	50 %	100 %
		Q		4 / 5
DCAF	otolithe	N	60 %	75 %
		Q	2 / 5	2 / 3
	Vertèbre	N	45 %	100 %
		Q	1 / 6	4 / 5

Orangé de xylénol, Alizarine

Ces deux marqueurs, comme les deux précédents, ne provoquent aucun effet nocif sur la survie des civelles. Cependant avec l'orangé de xylénol la proportion d'individus marqués est nettement inférieure à celle obtenue par la tétracycline ou la

fluorescéine (tableau 2). Les espoirs que nous avons mis dans ce marqueur ne se sont donc pas concrétisés. En effet, l'otolithe s'avère une cible médiocre pour ce fluorochrome et des bons résultats ne peuvent être obtenus pour l'os (vertèbres) qu'avec de fortes concentrations et des durées d'action relativement longues : 7 minutes.

Pour l'alizarine, seule la forme "*alizarine-complexon*" utilisée par Tsukamoto et Umezawa (1988) a donné des résultats positifs. Avec cette substance, bien que le marquage se réalise chez tous les individus, la marque fluorescente des otolithes n'est pas suffisamment intense pour constituer un marqueur intéressant dans le cadre d'expérimentations à grande échelle. En revanche, le marquage des vertèbres est de bonne qualité.

Pour ces deux fluorochromes, tout se passe comme si l'accessibilité de l'otolithe au marqueur était plus difficile que celle du tissu osseux. Ce résultat rappelle, en plus aigu, celui acquis avec la fluorescéine. Nous n'avons aucune explication à ce phénomène, en l'état actuel de nos connaissances. La configuration cristalline du minéral de l'otolithe (carbonate) et ses relations avec la trame organique (non collagénique) pourraient en être partiellement responsables.

En conclusion, l'emploi de la tétracycline et la fluorescéine est à recommander pour des opérations de marquage vital en masse, l'orangé de xylénol et l'alizarine donnant de moins bons résultats. En revanche, pour des travaux expérimentaux à petite échelle au laboratoire ou dans un milieu fermé de faible volume, ces fluoromarqueurs peuvent compléter utilement la panoplie des substances utilisables, surtout dans le cas de marquages multiples.

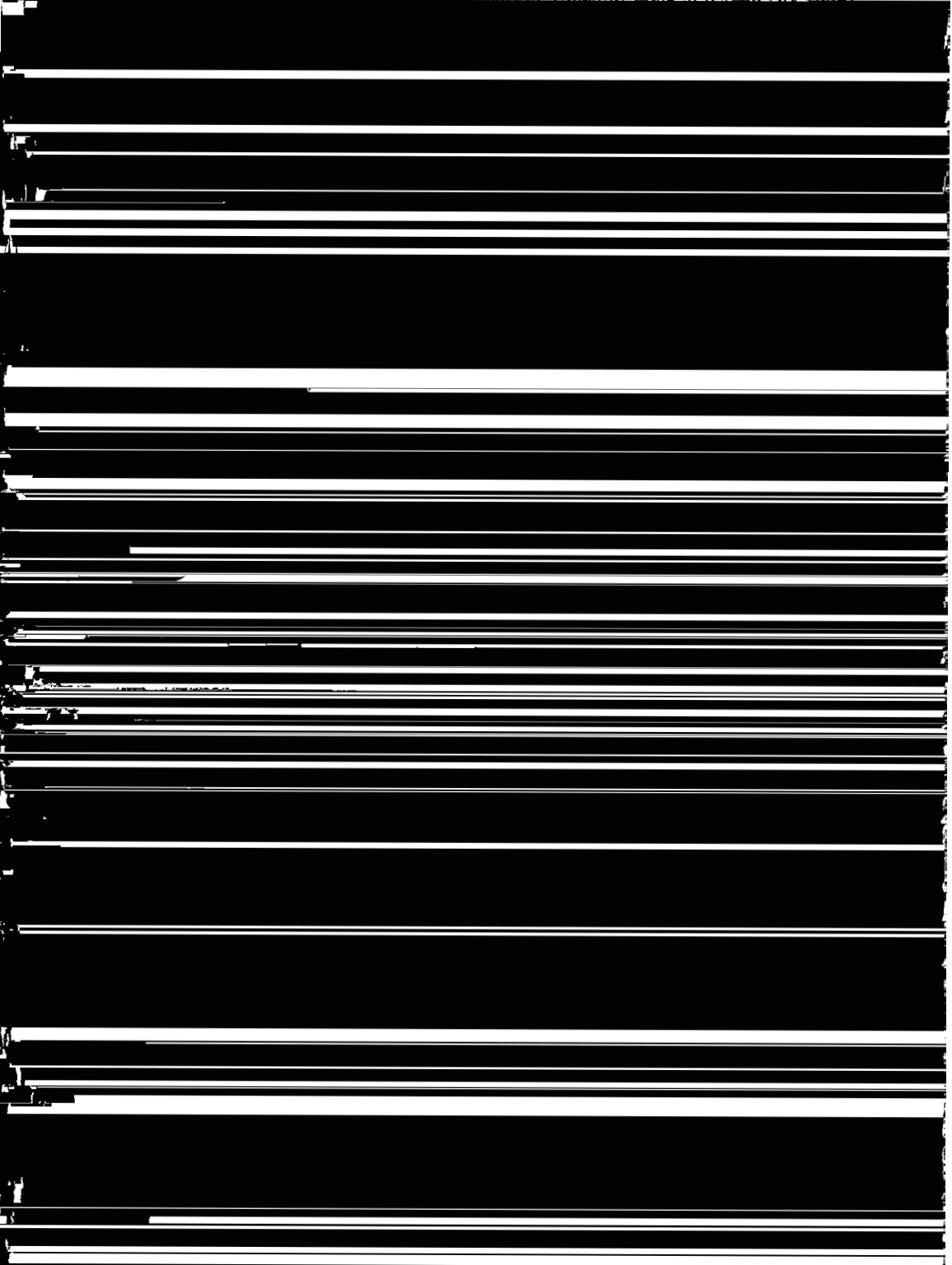
Tableau 2. Proportion (%) d'otolithes et de vertèbres marquées et qualité du marquage à l'orangé de xylénol en fonction de la concentration (Conc) et de la durée de la baignation ; F = faible ; B = bon ; TB = très bon.

Conc	Durée	Otolithes	Vertèbres
2 %	3'30	0 %	10 % (F)
	7'	10 % (B)	50 % (1/2 F, 1/2 B)
3 %	3'30	0 %	40 % (3/4 F, 1/4 B)
	7'	30 % (1/3 F, 2/3 B)	70 % (1/4 F, 3/4 B)
4 %	3'30	20 % (1/2 F, 1/2 B)	60 % (2/3 F, 1/3 TB)
	7'	20 % (B)	100 % (1/5 F, 4/5 B à TB)

Marquage rapide de civelles à grande échelle

Des différents résultats obtenus au laboratoire, il ressort que c'est la tétracycline en baignation rapide (procédé en un temps) qui offre les meilleures garanties pour le

Les civelles ont été balnéées par lots de 5 Kg (soit environ 20 000 individus) ;
chaque opération (préparation du lot, balnéation, transfert dans le bac de stockage)



d'un grand nombre d'alevins en un minimum de temps avec une main d'oeuvre réduite. Cette méthode est a priori applicable à toutes les espèces de poissons pouvant supporter un choc osmotique. Elle doit pouvoir être transposée à différents stades de développement (plutôt les stades jeunes) : larves, alevins ou même oeufs embryonnés. En réduisant le temps d'action des fluorochromes, notre méthode permet de procéder au marquage rapide d'un grand nombre d'animaux, par kilogramme ou dizaines de kilogrammes, avec des manipulations réduites. Elle devrait ainsi voir son champ d'application se développer, notamment dans les travaux d'écologie et les études expérimentales de la croissance du squelette intégrant les premiers stades de développement. Pour ces dernières, il est même possible d'envisager des marquages multiples par des séries successives de baignades rapides.

REMERCIEMENTS

Nous exprimons notre gratitude à M. Mabit, Directeur des Etablissements BEAUR (44400 Rezé) pour les facilités qu'il a mises à notre disposition dans la réalisation du marquage vital en masse. Nous remercions M. Decroix, maire de Frise (Somme), qui a accepté de mettre un étang à notre disposition pour notre travail expérimental en milieu semi-ouvert. Nous remercions les établissements SANDOZ qui ont fourni gracieusement le chlorhydrate de tétracycline.

Cette étude a bénéficié d'une aide du Conseil Supérieur de la Pêche : contrat du 30 Juin 1988.

REFERENCES

- ALCOBENDAS M., LECOMTE F., FRANCILLON-VIEILLOT H., CASTANET J., MEUNIER F.J., MAIRE P., 1991. Marquage vital en masse chez l'anguille *Anguilla anguilla* à l'aide d'une technique de baignade rapide. *Bull. Fr. Pêche Pisc.*, 321 (sous presse).
- AMEND D.F., FENDER D.C., 1976. Uptake of bovine serum albumin by rainbow trout from hyperosmotic solutions : a model for vaccinating fish. *Science*, 192 : 793-794.
- BEAMISH R.J., MCFARLANE G.A., 1983. The forgotten requirement for age validation in fisheries biology. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 112 : 735-743.
- BEAMISH R.J., MCFARLANE G.A., DHILTON D.E., 1984. Use of oxytetracycline and other methods to validate a method of age determination for sablefish. In : *Proc. Intern. Sablefish Sympos.*, Alaska Sea Grant Report, 83-3 : 95-116.
- BOIVIN G., MEUNIER F.J., 1978. Bone formation and fluorescent labelling in teleost fishes. In : *Symp. "Tissus calcifiés des Poissons"*, Brest, 12-13 Mai 1978 : 5 p.
- BOUJARD T., MEUNIER F.J., 1991. Croissance de l'épine nœudale histologie osseuse

- CHAMPIGNEULLE A., ESCOMEL J., LAURENT P., 1987. Marquage d'ombles chevalier (*Salvelinus alpinus*) de petite taille par injection de micromarques magnétisées. *Bull. Fr. Pêche Pisc.*, 304 : 22-31.
- DABROWSKI K., TSUKAMOTO K., 1986. Tetracycline tagging in coregonid embryos and larvae. *J. Fish Biol.*, 29 : 691-698.
- DEKKER W. 1986. Age reading of european eels using tetracycline labelled otoliths. *Inter. Coun. Explor. Sea*, 16 : 1-14.
- ELIE P., LECOMTE-FINIGER R., CANTRELLE I., CHARLON N., 1982. Définition des limites des différents stades pigmentaires durant la phase civelle d'*Anguilla anguilla* L. (Poisson téléostéen anguilliforme). *Vie Milieu*, 32 : 149-157.
- HERBINGER C.M., NEWKIRK G.F., LANES S.T., 1990. Individual marking of atlantic salmon : evaluation of cold branding and jet injection of alcian blue in several fin locations. *J. Fish Biol.*, 36 : 99-101.
- HETTLER W.F., 1984. Marking otoliths by immersion of marine fish larvae in tetracycline. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 113 : 370-373.
- JAKOBSON J., 1970. On fish and tagging. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 8 : 457-499.
- KOBAYASHI S., YUKI R., FURI T., KOSUGIYAMA T., 1964. Calcification in fish and shellfish. I - Tetracycline labeling patterns of scale, centrum and otolith in young goldfish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 30 : 6-13.
- LAIRD L.M., STOTT B., 1978. Marking and tagging. In : "*Methods for assessment of fish production in fresh waters*", T. Bagenal Ed., IBP Handbook NO 3, Oxford : 84-100.
- MCFARLANE G.A., BEAMISH R.J., 1987. Selection of dosages of oxytetracycline for age validation studies. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 44 : 905-909.
- MEUNIER F., 1972. Marquages simples et marquages multiples du tissu osseux de quelques Téléostéens par des substances fluorescentes. *C. R. Acad. Sci.*, 275 : 1685-1688.
- MEUNIER F., 1974. La technique de marquage vital des tissus squelettiques des poissons. *Bull. Fr. Pisc.*, 255 : 51-57.
- MEUNIER F., BOIVIN G., 1974. Divers aspects de la fixation du chlorhydrate de tétracycline sur les tissus squelettiques de quelques Téléostéens. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 99 : 495-504.
- MEUNIER F.J., BOIVIN G., 1978. Action de la fluorescéine, de l'alizarine, du bleu de calcéine et de diverses doses de tétracycline sur la croissance de la truite et de la carpe. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 18 : 1293-1308.
- MILCH R.A., RALL D.P., TOBIE J.E., 1957. Bone localization of the tetracyclines. *J. Nat. Cancer Inst.*, 19 : 87-91.
- MOSEGAARD H., STEFFNER N.G., RAGNARSSON B., 1987. Manipulation of otolith microstructures as a mean of mass-marking salmonid yolk sac fry. In : *Proc. V Congr. Europ. Ichthyol.*, Stockholm 1985 : 213-220.

- NAGIEC M., DABROWSKI K., NAGIEC C., MURAWSKA E., 1988. Mass-marking of coregonid larvae and fry by tetracycline tagging of otoliths. *Aqua. Fish. Manag.*, 19 : 171-178.
- NAGIEC M., NAGIEC C., 1983. Marking of juvenile whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) by tetracycline antibiotics. *Rocznik Nauk Rolniczych*, 100 : 107-114.
- NAGIEC M., NAGIEC C., DABROWSKI K., MURAWSKA E., 1985. Marking of juvenile whitefish *Coregonus lavaretus* (L.) with tetracycline antibiotics. *Acta Ichthyol. Piscat.*, 13 : 47-57.
- NEILSON J.D., GEEN G.H., 1982. Daily growth increments in otoliths of starry flounder (*Platichthys stellatus*) and the influence of some environmental variables in their production. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39 : 937-942.