

ANALYSE CHIMIQUE DES ZONES DE CROISSANCE DES OTOLITHES DE POISSONS

Jacques PANFILI¹

RESUME

Une nouvelle méthode est proposée pour donner une image chimique des otolithes de poissons. La Rétrodiffusion en Microscopie Electronique à Balayage (analyse semi-quantitative des ions lourds) montre directement les zones de forte et de faible calcification. Lorsqu'elle est couplée à l'analyse d'images, la visualisation des niveaux de calcification est obtenue par extraction d'un profil sur un axe de l'otolithe. Les comparaisons avec d'autres techniques ou entre des espèces différentes sont alors envisagées.

CHEMICAL ANALYSIS OF FISH OTOLITH ZONES

ABSTRACT

A new method is proposed to give a chemical image of fish otoliths. X-ray energy dispersion shows calcium as the main otolith constituent. Back-scattering analysis in Scanning Electron Microscope (semi-quantitative analysis of heavy ions) directly shows high and low calcification zonations. This method associated with image analysis gives a calcification profile, along a selected otolith axis, which leads to quantification of calcium deposit rates. Comparing this resulting profile with other technics (staining or classical scanning electron microscope) allows deeper interpretations on high and low calcification zones. Such chemical approach is applied to several species coming from different environments. Moreover, the resulting images may allow age determination.

¹ CEMAGREF-ORSTOM, B.P. 5095, 34033 MONTPELLIER Cedex.

Les otolithes de poissons sont formés de cristaux de carbonate de calcium (aragonite) enrobés dans une matrice protéique. Les zones de croissance résultent d'une modification des dépôts au cours du temps, avec des rythmes marqués (journaliers, saisonniers...). Contrairement à la structure et à l'arrangement des cristaux sur l'otolithe, la quantification des niveaux de calcification a été peu étudiée : Casselman (1982) a pu utiliser la spectrométrie de rayons X ("electron microprobe X-ray analysis" en anglais), et Mugiya *et al.* (1985), l'analyse en microradiographie.

L'analyse chimique de l'otolithe par spectre de diffraction aux rayons X montre que le calcium est le principal élément lourd (figure 1). Le but est donc de doser quantitativement les ions calcium, susceptibles de refléter les variations de la calcification pendant la croissance. Cette analyse permettrait d'expliquer l'aspect des zones observées en terme de variation quantitative des dépôts, dont le rythme au cours des cycles annuels ou nyctéméraux peut être utilisé pour déterminer l'âge.

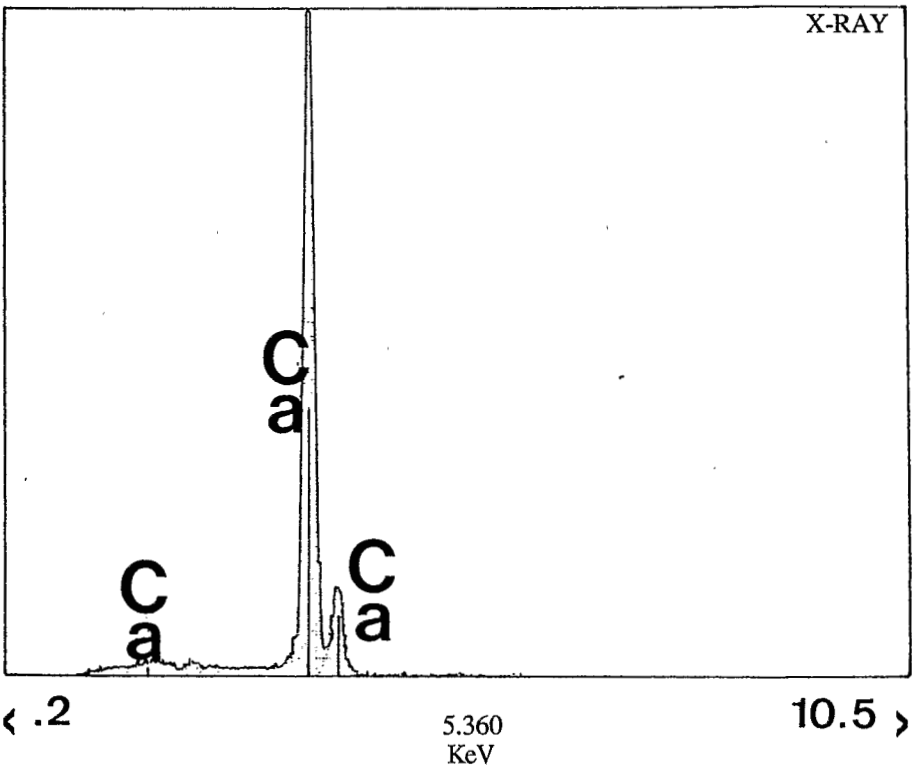


Figure 1. Spectre de diffraction aux rayons X d'un otolithe de poisson (*Collossoma macropomum*). Le seul élément lourd visible est le calcium dont les trois pics caractéristiques apparaissent.

En M.E.B. (Microscopie Electronique à Balayage), le résultat du faisceau incident d'électrons peut être analysé selon deux modes (Maurice *et al.*, 1978) : en image secondaire ou en image rétrodiffusée.

- Quand les électrons secondaires, qui sont éjectés des couches périphériques des atomes par bombardement du faisceau incident, sont analysés, on obtient une image du relief de l'échantillon ; c'est l'image classique en M.E.B, l'*image secondaire*.

- Les électrons du faisceau incident sont aussi déviés par les noyaux des ions lourds qu'ils rencontrent ; le contraste de l'image va alors dépendre du numéro atomique moyen des atomes du point d'impact sur l'échantillon ; plus ce numéro est élevé, et plus l'image est claire, c'est l'*image rétrodiffusée*.

Dans le cas des otolithes, la rétrodiffusion sera engendrée essentiellement par le calcium, élément prépondérant dans la constitution chimique (figure 1). L'image rétrodiffusée, alors "image chimique" ou "image de la calcification", met en évidence les différences dans la teneur en calcium entre les zones et permet une quantification relative :

- l'image claire est celle des zones à éléments lourds, dans le cas présent à forte teneur en calcium ;
- l'image foncée est celle des zones à éléments légers, dans le cas présent à faible teneur en calcium.

Pour l'observation, l'otolithe est soit coupé, soit poncé, puis poli de façon à obtenir une surface parfaitement lisse et plane, et enfin carboné avant passage au microscope électronique à balayage. L'image secondaire (figure 2 a) ne montre alors qu'une surface de l'otolithe uniforme sans relief, alors que l'image rétrodiffusée du même otolithe (figure 2 b) laisse apparaître une nette zonation, avec alternance de zones sombres et claires, signe d'une calcification différentielle.

Plusieurs applications sont envisagées : les comparaisons entre les méthodes classiques de préparation des otolithes et la rétrodiffusion permettent de vérifier les techniques entre elles, et d'établir la relation entre les niveaux de calcification des zones et leur apparence suivant la technique utilisée ; les comparaisons des images chimiques des otolithes d'espèces variées, éloignées évolutivement ou inféodées à des milieux très différents, pourront déboucher sur des interprétations sur les modes de vie ou sur l'influence des facteurs environnementaux, en observant directement les niveaux de calcification sur les otolithes.

La comparaison des méthodes entre elles est la suivante :

- l'image chimique, couplée à l'analyse d'images, donne une quantification relative de la calcification, sous forme d'un profil, le profil de calcification (figure 3) ;
- après coloration de l'otolithe (par le bleu de toluidine), le profil en analyse d'images de l'otolithe coloré est comparable à celui du dépôt calcaïque, tracé à partir de l'image chimique ;
- les images classiques en M.E.B. donnent un aspect qualitatif (structural) qui est comparé avec l'aspect semi-quantitatif de l'intensité du dépôt, donné par les images chimiques.

La rétrodiffusion en M.E.B., appliquée aux otolithes des poissons, constitue donc une nouvelle méthode qui permet de visualiser directement l'intensité de la calcification. De plus, l'analyse chronologique possible de cette dernière (par les méthodes de validation d'estimation de l'âge en squelettochronologie) fait de la rétrodiffusion une méthode potentielle pour la détermination de l'âge.

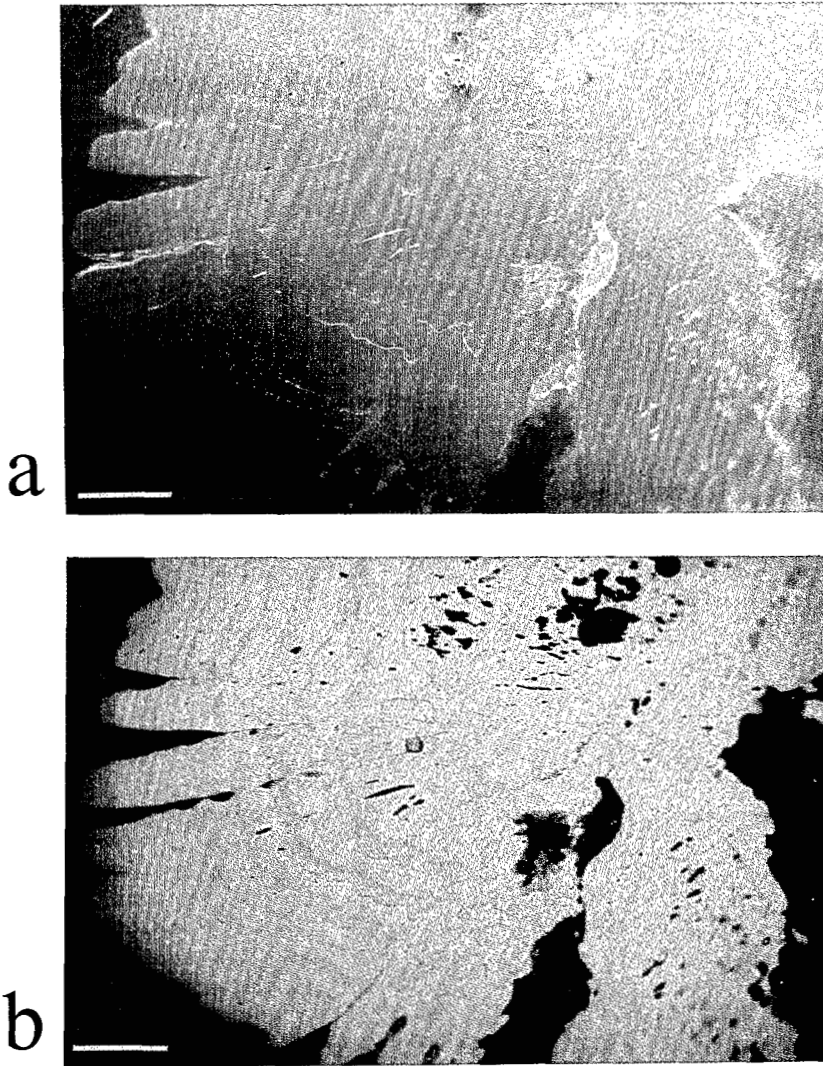


Figure 2. Images du même otolithe poli en Microscopie Electronique à Balayage. Otolithe de *Collossoma macropomum*, Serrasalmidae sud-américain. Les observations ont été effectuées sur le Microscope Electronique à Balayage (STEREOSCAN 360, LEICA) du Laboratoire de Microscopie Electronique de l'U.S.T.L. (Université des Sciences et Techniques du Languedoc). Barre = 1 mm.

a. Image secondaire (filament I=3,13A ; probe I=600pA).

b. Image rétrodiffusée = "image chimique" = image de la calcification (filament I=3,13A ; probe I=10nA).

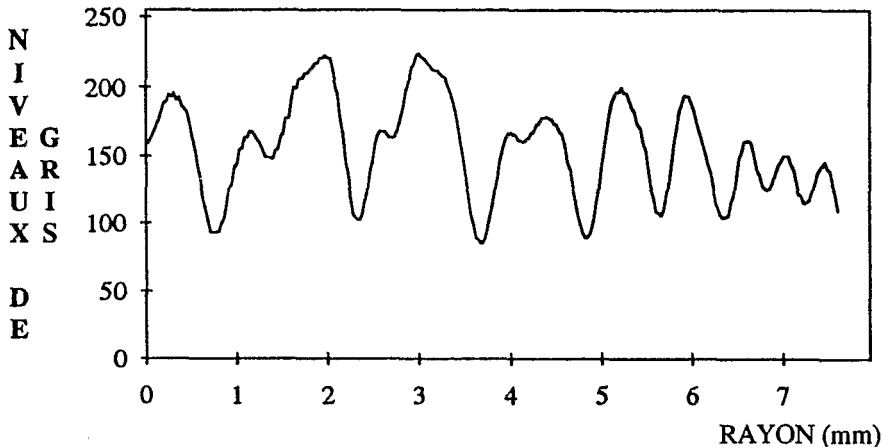


Figure 3. Profil de calcification sur un axe de l'otolithe de *Colossoma macropomum*, obtenu par analyse de son image rétrodiffusée (figure 2 b). Les niveaux de calcification sont directement visualisés sous forme de niveaux de gris : plus la valeur est élevée et plus la concentration en calcium est importante (les maxima correspondent aux zones claires riches en calcium ; les minima sont les zones sombres à faible teneur en calcium). On obtient ainsi une quantification relative.

REFERENCES

- CASSELMAN J.M., 1982. Chemical analysis of the optically different zones in eel otoliths. *In Proceedings of the North American Eel Conference, 1980*, K.H. Loftus (Ed.), Ontario Fish. Techn. rep., Ser.4 : 74-82.
- MAURICE F., MENY L, TIXIER R., 1978. Microanalyse et microscopie électronique à balayage. Ecole d'été de Saint Martin d'Hères, 11-16 Sept., Les Editions de Physique, Orsay, France, 534 : 8 p.
- MUGIYA Y., HIRABAYASHI S., OHSAWA T., 1985. Microradiography of otoliths and vertebral centra in the flatfish *Limanda Herzensteini* : hypermineralization in the hyaline zone. *Bull. Soc. Sci. Fish.*, 51(2) : 219-225.