

Manuel de sclérochronologie des poissons

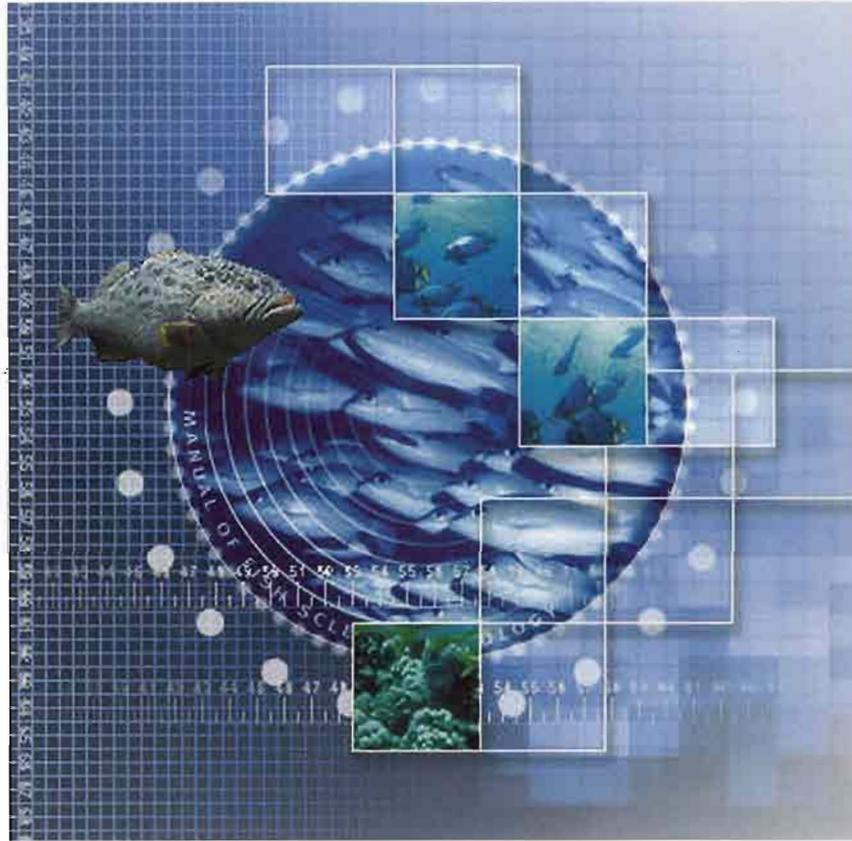
Éditeurs

Jacques Panfili

Hélène de Pontual

Hervé Troadec

Peter J. Wright



Manuel de sclérochronologie des poissons

Éditeurs

J. Panfili, H. de Pontual, H. Troadec†,
P.J. Wright

En hommage à Hervé Troadec,
chercheur au LASAA, disparu tragiquement
dans un accident d'avion le 29 août 2001.



Remerciements

Les éditeurs et les auteurs voudraient particulièrement remercier : Éric Dabas (IRD, Brest, France), Louis Marec (IRD, Brest, France), André Ogor (Ifremer, Brest, France) et Bernard Stéquert (IRD, Brest, France) pour leur assistance technique, Olivier Dugornay (Ifremer, Brest, France) pour son appui technique dans la réalisation des images et des vidéos, Richard Millner (Cefas, Lowestoft, UK), Andrew Newton (FRS, Aberdeen, UK) et Andrew Payne (Cefas, Lowestoft, UK) pour leur aide dans le chapitre III.A.3, Dolores Montaner Matas (MMS, Dakar, Sénégal) pour son aide concernant les références bibliographiques, Nathalie Journiac (Université Paris 6, Paris, France) pour son aide technique dans la réalisation de la vidéo sur la microradiographie, Javier Tomás (Cemagref, Bordeaux, France) et Jean-Louis Reyss (CNRS-CEA, Gif-sur-Yvette, France) pour leurs commentaires constructifs sur le chapitre VII, et Daniel Latrouite (Ifremer, Brest, France), Loïc Antoine (Ifremer, Nantes, France) et Patrice Cayré (IRD, Paris, France) pour leur soutien constant et leurs encouragements. Enfin, nous voudrions remercier le forum constitué par tous les membres de l'EFAN qui a sans conteste été bénéfique pour la portée finale de ce livre.

Signalement bibliographique

Monographie :

Panfili, J., Pontual H. (de), Troadec H., Wright P.J. (éd.), 2002. Manuel de sclérochronologie des poissons. Coédition Ifremer-IRD, 464 p.

Article :

Troadec H., Benzinou A., 2002. Estimation de l'âge assistée par ordinateur. *In*: Manuel de sclérochronologie des poissons. Panfili J., Pontual H. (de), Troadec H., Wright P.J. (éd.). Coédition Ifremer-IRD, 201-242.

Le code de la propriété intellectuelle (loi du 1^{er} juillet 1992) n'autorisant, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article L. 122-5, d'une part, que les « copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective » et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, « toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause, est illicite » (alinéa 1^{er} de l'article L. 122-4).

Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon passible des peines prévues au titre III de la loi précitée.

© IRD Éditions, 2002
ISBN 2-7099-1486-7

© Éditions Ifremer, 2002
ISBN 2-84433-066-5

Sommaire

Préface	11
Avant-propos	14
Chapitre I - Introduction	
<hr/>	
A. Introduction générale	19
P.J. Wright, J. Panfili, P.J. Wright, H. Troadec	
B. Historique	23
F.J. Meunier, J. Panfili	
1. Ostéichthyens	24
1.1. Scalimétrie	24
1.2. Otolithométrie	25
1.3. Squelettechronologie	26
2. Chondrichthyens	27
Chapitre II - Différents types de pièce calcifiée	
<hr/>	
A. Otolithes	31
P.J. Wright, J. Panfili, B. Morales-Nin, A.J. Geffen	
1. Description et fonction	31
1.1. Description	32
1.2. Fonction	35
2. Accroissements périodiques	36
2.1. Accroissements primaires	36
2.1.1. <i>Primordium</i>	38
2.1.2. Premier anneau	39
2.2. Centres de croissance accessoires	42
2.3. Accroissements saisonniers et annuels	44
2.4. Structures liées à des cycles lunaires	45
2.5. Discontinuités structurales	46
2.6. Zones de croissance secondaires	47
3. Régulation du dépôt des accroissements	48
3.1. Influences exogènes sur les accroissements périodiques primaires	48
3.2. Régulation exogène de la périodicité annuelle des accroissements	51
3.3. Influences sur le taux d'accrétion	52
3.4. Régulation physiologique de la formation de l'otolithe dans le saccule	53
3.5. Régulation hormonale de la formation de l'otolithe	57
B. Écailles	58
F.J. Meunier	
1. Description, diversité et fonction	58
2. Croissance des écailles et marques de croissance	62
3. Régulation des marques de croissance	64
C. Squelette	65
F.J. Meunier	
1. Morphologie et organisation structurale des os	65

1.1. Constituants des tissus osseux	66
1.1.1. Cellules	66
1.1.2. Matrice organique	68
1.1.3. Matrice minérale	70
1.2. Organisation spatiale des tissus osseux	71
1.2.1. Lignes cimentantes	71
1.2.2. Vascularisation des tissus osseux	73
1.3. Signification histophysiologique des tissus osseux	75
1.3.1. Croissance osseuse	76
1.3.2. Remaniement osseux	76
2. Accroissements périodiques ou « le squelette comme une boîte noire »	78
2.1. Marques de croissance	80
2.2. Déterminisme de la structure et de l'organisation spatiale des marques de croissance	82
2.3. Quelques exemples concrets	83
3. Régulation de la croissance appositionnelle	85
3.1. Formation des marques de croissance et saisonnalité	85
3.2. Métabolisme du calcium	86
3.3. Alimentation	86
3.4. Reproduction	87
4. Conclusion	87

Chapitre III - Bases de la sclérochronologie

A. Estimation de l'âge	91
B. Morales-Nin, J. Panfili	
1. Critères de choix des pièces calcifiées	92
2. Sélection des marques de croissance	93
3. Processus d'estimation de l'âge	95
3.1. Estimation de l'âge individuel	96
3.2. Définition des groupes et des classes d'âge	96
B. Événements marquants de l'histoire individuelle	99
A.J. Geffen, H. de Pontual, P.J. Wright, H. Mosegaard	
1. Âge de la maturité sexuelle	99
2. Durée de vie (longévité)	100
3. Métamorphose et colonisation	101
4. Migration	104
C. Influence de la forme et de la structure des pièces calcifiées sur l'interprétation des marques de croissance	105
J. Panfili, B. Morales-Nin	

Chapitre IV - Méthodes de validation et de vérification

A. Validation directe	114
P.J. Wright, J. Panfili, A. Folkvord, H. Mosegaard, F.J. Meunier	
1. Marquage	114
1.1. Marquage des poissons	114
1.2. Marquages des pièces calcifiées	116

1.2.1. Marqueurs fluorescents	117
1.2.1.1. Injection	118
1.2.1.2. Balnéation	120
1.2.1.3. Incorporation dans la nourriture	121
1.2.1.4. Marqueurs fluorescents	122
1.2.2. Marques induites par la température sur les otolithes	123
1.2.3. Marques induites par un cycle lumineux sur les otolithes	123
1.2.4. Marquage chimique des otolithes (⁸⁵ Sr, Sr et lanthanides)	125
2. Élevage et aquaculture	125
3. Traitement des données	127
B. Validation semi-directe	129
J. Panfili, B. Morales-Nin	
1. Données qualitatives et/ou quantitatives?	129
1.1. Données qualitatives	129
1.2. Données quantitatives	131
1.3. Exemples d'études de validation semi-directe	132
2. Problèmes d'interprétation du bord des otolithes	133
C. Validation indirecte	135
B. Morales-Nin, J. Panfili	
1. Comparaison avec les distributions de tailles	135
2. Méthodes utilisant d'autres informations sur l'âge	136
D. Vérification	138
B. Morales-Nin, J. Panfili	
1. Différentes lectures réalisées par un ou plusieurs lecteurs : biais d'uniformité	138
2. Différentes lectures réalisées à partir de plusieurs pièces calcifiées	140
3. Tendance dans les patrons de croissance	140
4. Exactitude et précision	141
Chapitre V - Quelques exemples d'utilisation des données d'âge individuel	
<hr/>	
A. Croissance et analyse de la croissance	146
A. Folkvord, H. Mosegaard	
1. Modèles de croissance	146
1.1. Mesures de la croissance	146
1.2. Allométrie et modèles de croissance indépendants de l'âge	149
1.3. Modèles de croissance basés sur l'âge	153
2. Rétrocalcul	154
2.1. Éléments de base et hypothèses	154
2.2. Méthodes par régression versus méthodes proportionnelles	155
2.3. Points de départ des méthodes proportionnelles : détermination statistique versus points de référence biologique	157
2.4. Méthodes proportionnelles : HTEP versus HTCP	160
2.5. Formules de rétrocalcul (FRC) non linéaires	162
2.6. Problèmes relatifs au rétrocalcul	163
3. Recommandations	164

B. Applications écologiques	167
H. Mosegaard, A. Folkvord, P.J. Wright	
1. Études du recrutement	167
1.1. Information sur la mortalité sélective	167
1.2. Mieux vaut être plus grand	171
1.2.1. Corrélations entre les tailles à différents âges et hiérarchies	171
2. Chronologie de l'histoire de la vie	174
2.1. Distribution des dates de naissance	174
2.1.1. Différentes approches pour tester l'hypothèse d'une mortalité dépendante de la taille et pour l'étude des dates d'éclosion	175
2.2. Transitions ontogéniques	177
2.3. Changement d'environnement	177
2.4. Reproduction	178
3. Sélectivité de l'échantillonnage	178
C. Structures démographiques dans les modèles d'évaluation de stocks	180
B. Mesnil	
1. Modèles structurés en âge pour les évaluations de stocks et les avis sur la gestion des pêches	181
1.1. Espèce unique, pêcherie homogène	181
1.2. Espèce unique, flottilles multiples	184
1.3. Plusieurs espèces, interactions techniques	185
1.4. Plusieurs espèces, interactions biologiques	187
1.5. Modèles spatiaux	189
2. De l'estimation des âges à l'application des modèles	190
2.1. Estimation de la composition en âge des captures	190
2.2. Étude de cas : la clé taille-âge en pratique	191
3. Résumé et critique	196
Chapitre VI - Estimation de l'âge assistée par ordinateur	
<hr/>	
H. Troadec, A. Benzinou	
A. Qu'est-ce qu'un système d'estimation de l'âge et de la croissance assistée par ordinateur (EACAO)?	202
1. Traitement de l'information visuelle	202
1.1. Unité d'acquisition	202
1.1.1. Formation de l'image numérique : échantillonnage 2D	202
1.1.2. Acquisition d'images de PC	206
1.1.2.1. Microscopie en polarisation	206
1.1.2.2. Moyennage d'images	208
1.1.2.3. Mosaïque d'images	208
1.2. Traitement d'images numériques	209
1.2.1. Rehaussement du contraste avec des opérations point à point	210
1.2.2. Réduction du bruit avec des opérations de voisinage	211
1.2.2.1. Profil d'image de PC : un signal multi-composante	213
1.2.2.2. Convolution spatiale : de la moyenne mobile au filtrage gaussien	214

1.2.2.3. Filtrage spectral : la transformée de Fourier	216
1.2.2.4. Filtrage linéaire des images de PC	217
1.2.3. Détection de contours par opérations dérivatives	218
1.2.4. Détection d'information structurelle par opérations morphologiques	220
1.2.5. Patron de croissance : la limite des filtres classiques	222
1.3. Analyse quantitative des PC : du 1D au 3D	224
1.3.1. Dénombrement de structures : du profil d'image 1D au profil synthétique (1,5D)	224
1.3.2. Formes 2D et 3D des PC	227
2. Traitement de l'information cognitive : vous lisez ou vous interprétez?	230
3. Un peu de théorie : perception visuelle et estimation d'âge	232
B. En quoi et comment l'ordinateur peut-il aider à l'analyse d'une pièce calcifiée?	235
1. Que peut-on attendre d'un système d'EACAO?	235
1.1. Aide à la quantification	235
1.2. Objectivité ou standardisation?	237
1.3. Justesse et précision	237
1.4. Productivité	239
1.5. Mémorisation	240
2. Pour quel type d'étude?	241
2.1. Études « ponctuelles »	241
2.2. Analyses en routine	241

Chapitre VII - Microchimie de l'otolithe

H. de Pontual, A.J. Geffen

A. Introduction	245
B. Quelques définitions et principes chimiques de base	246
1. Fractionnement de masse des isotopes stables	247
2. Désintégration radioactive	248
C. De quoi les otolithes sont-ils composés?	251
D. Incorporation des éléments dans l'otolithe : comment et où?	255
1. Du milieu extérieur (eau et nourriture) au plasma sanguin	255
2. Du plasma sanguin à l'endolymphe	256
3. De l'endolymphe à l'otolithe	257
4. Éléments susceptibles de varier en fonction de leur disponibilité dans l'environnement	258
E. Applications de la microchimie de l'otolithe	260
1. Schémas migratoires et histoire environnementale	260
1.1. Salinité	260
1.1.1. Comportement migratoire révélé par le rapport Sr/Ca	260
1.1.2. Composition isotopique du Sr	261
1.1.3. Isotopes stables	261
1.2. Température	263
1.2.1. Les rapports Sr/Ca peuvent-ils servir d'indicateurs de l'histoire thermique individuelle?	263

1.2.2. Isotopes stables	264
2. Métabolisme et événements ontogéniques	267
2.1. Métamorphose	269
2.2. Reproduction	270
3. Estimation de l'âge	271
3.1. Utilisation des rapports $^{210}\text{Pb}/^{226}\text{Ra}$ et $^{228}\text{Th}/^{228}\text{Ra}$	271
3.2. Utilisation du radiocarbone de la bombe atomique comme chronomètre	274
3.3. Autres chronomètres potentiels	277
4. Discrimination de stocks et populations	277
5. Autres applications	280
5.1. Caractérisation de l'habitat par les empreintes élémentaires	280
5.2. Marquage en masse	280
5.3. Analyse de carbonates biogéniques fossiles en paléoclimatologie et paléoécologie	281
5.4. Historique de la pollution et influences anthropogéniques	282
F. À propos des autres pièces calcifiées	284
G. Microchimie : exigences méthodologiques et problèmes rencontrés	286
1. Techniques analytiques	286
1.1. Composition élémentaire	286
1.1.1. Analyses de surface	289
1.1.2. Analyses globales	290
1.2. Mesure des isotopes stables	290
1.3. Radionucléides	292
2. Qualité des données	293
2.1. Sources potentielles d'incertitude	293
2.1.1. Échantillonnage	294
2.1.2. Conservation des poissons	294
2.1.3. Extraction de l'otolithe	296
2.1.4. Préparation de l'otolithe	296
2.1.5. Analyse de la composition	297
2.1.6. Analyse des données	299
2.2. Justesse et précision des outils analytiques	302

Chapitre VIII - Techniques de préparation et d'observation

A. Arbres d'aide à la décision	308
H. Troadec, H. de Pontual	
B. Extraction et conservation des pièces calcifiées	317
J. Panfili	
1. Conservation et préservation des poissons entiers	317
2. Écailles	318
3. Otolithes	319
3.1. Extraction chez les poissons de grande taille	320
3.1.1. Section frontale de la tête	320
3.1.2. Section transversale de la tête	322
3.1.3. Section sagittale de la tête	323

3.1.4. Section ventrale de la tête à travers les branchies	323
3.2. Extraction chez les poissons de petite taille	325
3.3. Nettoyage et conservation des otolithes	327
3.3.1. Nettoyage et manipulation	327
3.3.2. Stockage et conservation	328
4. Pièces du squelette	328
4.1. Extraction	328
4.2. Nettoyage et conservation	329
C. Préparation des pièces calcifiées	331
W.J. McCurdy, J. Panfili, F.J. Meunier, A.J. Geffen, H. de Pontual	
1. Écailles	331
1.1. Observation directe	331
1.2. Montage sur lame	331
1.3. Impression sur acétate de cellulose	332
2. Autres pièces	332
2.1. Préparations simples	332
2.1.1. Pièce calcifiée entière	333
2.1.2. Cassure des otolithes	333
2.1.3. Préparations simples pour les autres pièces	333
2.2. Enrobage et imprégnation	333
2.2.1. Produits d'enrobage	333
2.2.2. Enrobage individuel de pièces pour section ultérieure	336
2.2.3. Enrobage pour observation avec une lumière incidente	337
2.2.4. Enrobage multiple d'otolithes pour section ultérieure	338
2.2.5. Imprégnation des tissus osseux	342
2.3. Section	343
2.3.1. Section de pièces individuelles	343
2.3.2. Section multiple	344
2.3.3. Section au cryotome	346
2.4. Montage	347
2.4.1. Montage des sections préalable aux étapes suivantes des préparations	347
2.4.2. Montage des otolithes de petits poissons	347
2.4.3. Montage sur lame de plusieurs coupes d'otolithes	348
2.5. Ponçage progressif et polissage	349
2.6. Attaque acide, décalcification	351
2.6.1. Attaque acide de l'otolithe	351
2.6.2. Décalcification des tissus osseux	351
2.7. Chauffage et brûlage	352
2.8. Coloration	353
2.8.1. Coloration des otolithes	353
2.8.2. Coloration des tissus osseux	354
2.9. Quelques considérations particulières pour les études de microchimie	355
D. Observation	358
B. Morales-Nin, J. Panfili	
1. Microscopie photonique	358

1.1. Faible grossissement (loupe binoculaire)	358
1.1.1. Pièce entière	358
1.1.2. Milieu éclaircissant	359
1.1.3. Produits de montage	359
1.1.4. Éclairage	360
1.1.4.1. Lumière transmise	360
1.1.4.2. Lumière réfléchie	360
1.1.4.3. Projecteur de profil	362
1.2. Fort grossissement (microscope photonique)	362
1.2.1. Résolution	362
1.2.2. Objectifs à immersion vs objectifs à sec	363
1.2.3. Éclairage	363
1.2.3.1. Filtres	364
1.2.3.2. Microscopie confocale	364
1.2.3.3. Lumière transmise vs lumière réfléchie	364
1.3. Lumière polarisée	365
1.4. Lumière ultraviolette	365
2. Microscopie électronique	366
2.1. MEB	366
2.1.1. Caractéristiques du MEB	366
2.1.2. Préparation des échantillons	367
3. Microradiographie	368
F.J. Meunier	
E. Conservation des préparations	370
W.J. McCurdy	
1. Conservation des préparations de pièces calcifiées	370
2. Écailles	370
2.1. Écailles non montées	370
2.2. Écailles montées et impressions d'écailles	371
3. Otolithes	371
3.1. Collections d'otolithes	371
3.2. Otolithes entiers et cassés	371
3.3. Otolithes enrobés et en lames minces	372
4. Autres éléments du squelette	372
Glossaire	373
J. Panfili, F.J. Meunier, H. Mosegaard, H. Troadec, P.J. Wright, A.J. Geffen	
Références bibliographiques	385
Acronymes et symboles chimiques	449
Adresses des auteurs	452
Index	454
Noms d'espèces, taxa et noms communs	461

Préface

La connaissance de l'âge des individus constituant une population animale est nécessaire pour l'analyse des variations temporelles en structure et en abondance. La structure en âge d'une population peut être décrite et les taux des principales variables comme la croissance, le recrutement et la mortalité peuvent être quantifiés. Ceci est particulièrement important lorsque l'on s'intéresse à la dynamique de populations exploitées et à la gestion des ressources dans les pêcheries. Il est impératif de déterminer non seulement l'augmentation globale du taux de mortalité dû à la pêche mais aussi la manière dont il se distribue parmi les groupes d'âge de la population considérée. Les analyses des populations structurées en âge sont par conséquent incorporées dans les modèles classiques de gestion des stocks, i.e. dans les outils mathématiques qui, sur un plan mondial, constituent la base préférentielle des recommandations scientifiques relatives à la gestion des pêcheries.

Au fil des ans, l'importance reconnue des études d'estimation de l'âge a généré une évolution de plus en plus active de ce domaine de recherche en halieutique. Depuis la première réunion de scientifiques et techniciens étudiant l'âge et la croissance à Smolenice, en Tchécoslovaquie, en 1968, suivie cinq ans plus tard par le premier symposium international sur l'âge et la croissance chez les poissons (First International Symposium on Age and Growth of Fish) à Reading, en Angleterre, les communications et le transfert scientifique ont été une composante importante de ce domaine de recherche. Pendant les trois dernières décennies, des conférences internationales et des groupes de travail se sont tenus régulièrement, des manuels spécialisés ont été rédigés et des synthèses générales publiées dont certaines présentent d'excellentes vues d'ensemble sur l'histoire, le développement et l'état actuel des diverses techniques d'investigation.

En dépit d'importants efforts de recherche focalisés sur l'interprétation de l'âge, réalisés depuis de nombreuses années, l'estimation de l'âge chez les poissons, mais également chez d'autres organismes, est loin d'être facile. Au sein de comités consultatifs internationaux, notamment au CIEM, le besoin de réviser et de mettre à l'épreuve les protocoles mis au point pour estimer l'âge chez de nombreuses espèces est souvent exprimé et reconnu. Le maintien d'une cohérence interne et externe au niveau des personnes et des laboratoires en charge de l'interprétation est un processus permanent et sans fin. Pour de nombreuses espèces, des controverses très regrettables sur les méthodes d'estimation de l'âge ont pu apparaître et perdurer pendant plusieurs années, souvent parce que différentes techniques utilisées pour la même espèce ont donné différents résultats sans qu'aucune n'ait été

validée. Ainsi, pour de nombreuses espèces, aucune technique valable d'interprétation de l'âge n'a été développée. Malheureusement, certains considèrent que pour certaines espèces « l'estimation de l'âge reste un art plus qu'une science ». L'obtention de méthodes exactes et précises, mais également pratiques, c'est-à-dire pouvant être utilisées en routine pour traiter des échantillons suffisamment grands, devrait être le but ultime de tous les travaux sur l'interprétation de l'âge.

En Europe, l'Union européenne a financé l'action concertée EFAN (European Fish Ageing Network) entre 1996 et 2000. Pendant ces quatre années, 99 scientifiques ont participé à ce projet, représentant 35 universités et instituts de recherche différents, et venant de 16 pays européens. L'EFAN avait pour but de développer, de conduire et de coordonner des recherches en collaboration, de faciliter la formation et les échanges, et de s'assurer ainsi que l'estimation de l'âge devienne un élément fiable des estimations sous-jacentes à la gestion scientifique des pêcheries et des ressources de l'environnement. L'EFAN s'est articulé autour de cinq « cellules » incluant plusieurs thèmes : méthodes et procédures, traitement de l'information, formation et échange d'information, validation des estimations d'âge, recherche et applications.

En dépit de tous les efforts antérieurs et d'un intérêt accru dans ce domaine de recherche, il n'existait pas jusqu'à présent d'ouvrage de synthèse traitant de toutes les disciplines développées et des différentes pièces calcifiées pouvant être utilisées : écailles, éléments du squelette et otolithes. Les éditeurs et les auteurs, qui furent des membres actifs de l'EFAN, ont conçu ici un manuel didactique qui devient aujourd'hui l'une des revues les plus détaillées sur le sujet. Ces auteurs sont des experts reconnus dans ce domaine de recherche, ayant largement publié sur le sujet et ayant accumulé une expérience pratique très importante sur les aspects scientifiques et techniques de l'estimation de l'âge et de la croissance chez les poissons. L'étendue et la minutie du manuel apparaissent au premier coup d'œil, notamment parce qu'il combine les aspects théoriques et pratiques de cette discipline.

Le manuel présente un large éventail de sujets, incluant l'interprétation des différents types de pièce calcifiée, et détaille les techniques de validation des interprétations par l'utilisation de procédures directes, semi-directes ou indirectes. Il inclut également une revue approfondie de l'utilisation des données, particulièrement pour l'analyse de la croissance et les applications en écologie et en démographie. Un chapitre novateur décrit la technologie de lecture assistée par ordinateur ; tout étudiant qui s'est un jour penché sur cette technologie a nécessairement souhaité qu'elle aboutisse à une automatisation complète. La synthèse dans le domaine de l'analyse microchimique, un champ d'investigation puissant et en pleine expansion, sera particulièrement utile à la fois sur un plan général et sur des aspects plus particuliers. Les techniques de préparation et d'observation sont décrites d'un point de vue pratique. Des arbres de décision utiles sont donnés ainsi que des

descriptions courtes et simples des techniques, depuis le prélèvement des pièces, jusqu'à leur stockage et leur archivage de façon à réduire la manipulation et la contamination des préparations. Pour la première fois, un glossaire général est présenté, incluant une terminologie pour tous les types de pièce calcifiée. La bibliographie est très importante bien que nécessairement non exhaustive du fait de l'importance considérable de la littérature publiée dans ce domaine.

L'ampleur et la minutie de cette contribution marquante en feront un manuel de référence important pour les années à venir. L'information scientifique, technique et pratique, très approfondie, assemblée ici lui assure de devenir un manuel de référence facile d'accès et complet, présent sur les paillasses des laboratoires et les bureaux des professionnels de la recherche, des utilisateurs en routine, ou des personnes simplement intéressées par cette science fondamentale et incontournable de l'halieutique.

John M. Casselman
Glenora Fisheries Station
41 Fish Hatchery Lane
R.R. 4, Picton
Ontario K0K 2T0, Canada

Erlend Moksness
Institute of Marine Research
Flødevigen Marine
Research Station
N-4817 His, Norway

Avant-propos

La sclérochronologie, discipline qui étudie les pièces calcifiées dans le but de reconstruire l'histoire vécue par les organismes vivants, est essentielle pour la connaissance de la biologie des poissons et pour la gestion des pêches. De très nombreux articles, actes de colloque et synthèses, ont été publiés dans ce domaine avec cependant une portée limitée. Ce manuel présente une synthèse actualisée sur les aspects théoriques et pratiques des études de sclérochronologie. Son opportunité tient au fait que, durant les dernières décennies, les recherches et développements technologiques ont été particulièrement importants dans ce domaine. En donnant des informations sur la nature des pièces calcifiées, sur leur utilisation dans les recherches en ichthyologie et sur les méthodes de préparation et d'observation, ce manuel vise à constituer un guide détaillé pour les chercheurs, les techniciens et les étudiants novices ainsi que pour les personnes désirant étendre leurs domaines d'expertise.

À l'origine, ce projet de manuel a été conçu par le LASAA (laboratoire de sclérochronologie des animaux aquatiques), un laboratoire mixte créé par deux instituts français de recherche, l'Ifremer (Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer) et l'IRD (Institut de recherche pour le développement). Il a d'abord été présenté à Gand (Belgique) en 1996, pendant la réunion préparatoire du réseau européen EFAN (European Fish Ageing Network). L'EFAN, une action concertée du programme FAIR financée par la Communauté européenne, a été conçu pour faciliter les échanges, les recherches en collaboration et la formation dans les études de sclérochronologie. À travers ce réseau, il a été possible d'identifier de nouveaux auteurs et d'élargir ainsi les objectifs et la portée du manuel. L'élargissement et le déroulement du projet ont été en outre facilités par le projet ManAgeFish, mesure d'accompagnement (FAIR) à l'EFAN, qui a permis le développement de la version multimédia et l'organisation de réunions entre les auteurs. La rédaction a débuté en 1999 et l'ouvrage a été révisé au cours de deux réunions de concertation entre les auteurs en 2000 à l'université des Baléares (Palma de Mallorca, Espagne) et en 2001 au Muséum national d'histoire naturelle (Paris, France).

Le manuel est présenté sur deux supports, un livre et une version multimédia sur DVD. Chaque chapitre est écrit par un groupe de chercheurs reconnus dans leur domaine. Même si les auteurs travaillent tous pour des instituts européens, leur expérience couvre à la fois les milieux tempérés et les milieux tropicaux, ainsi que les environnements marins ou dulçaquicoles. En conséquence, le manuel est largement illustré d'exemples provenant du monde entier et les techniques décrites devraient être appropriées à l'étude des poissons de toutes les

régions et être ainsi utilisées par des chercheurs travaillant sur n'importe quelle zone ou écosystème.

La version multimédia est dérivée du livre mais elle bénéficie largement de l'addition de séquences vidéo et de l'interactivité permise par un support numérique. La version DVD est ainsi enrichie par (1) une série de 42 vidéos qui illustrent les principales techniques employées, (2) des images interactives et animées et (3) un mode de navigation basé sur les buts et les contraintes (arbres de décision) offrant une alternative à une lecture séquentielle classique.

Le nombre de références bibliographiques dans le domaine de la sclérochronologie est énorme et, en conséquence, ce manuel ne prétend pas présenter une bibliographie exhaustive. Il contient cependant une liste de très nombreuses références incluant synthèses antérieures, articles de revues scientifiques et littérature grise, dans le but d'aider le lecteur. Une liste d'acronymes, un index et un glossaire sont, en outre, disponibles à la fin du volume : ils seront plus particulièrement utiles à ceux qui sont peu familiers avec ce domaine de recherche.

Le travail des éditeurs a été facilité par une révision technique de la cohérence du livre et de l'anglais par Hugh Allen (AMC, Cordoba, Espagne) au début de l'année 2001. Le contenu scientifique du manuel a été révisé par les professeurs John Casselman du Canadian Ontario Ministry of Natural Resources et Erlend Moksness du Norwegian Institute of Marine Research au printemps 2001. Après une accréditation par les éditeurs, la version anglaise a été traduite en français par les auteurs français du manuel : A. Benzinou (chapitre VI), B. Mesnil (chapitre VC), F. Meunier (chapitres IB, II, VIIIC-E), J. Panfili (avant-propos, préface, chapitres IIIA,C, IV, VB, VIIIB-E et IX), H. de Pontual (avant-propos, préface, chapitres IA, IIIB, VII, VIIIA) et P. Prieur, Orcades Traduction (chapitre VA). J. Castanet, F. Lagardère, P. Lorance, B. Mesnil, F. Meunier, J. Panfili et H. de Pontual ont participé à une relecture croisée des textes.

Les éditeurs

Chapitre I

Introduction

A. Introduction générale

H. de Pontual, J. Panfili, P.J. Wright, H. Troadec

Étymologiquement, le terme « sclérochronologie » est dérivé des racines grecques sklêros « dur », khronos « temps » et logos « étude ». Littéralement, cette science vise à reconstruire l'histoire vécue par les organismes vivants à partir de l'étude de leurs pièces calcifiées (PC). Elle couvre ainsi non seulement les problèmes d'estimation de l'âge mais aussi ceux de l'estimation de la période et de la durée d'événements marquants de l'histoire individuelle. Ses méthodes sont basées sur l'étude de divers types de signaux qui fournissent des références temporelles, qu'elles soient structurelles, chimiques et/ou optiques.

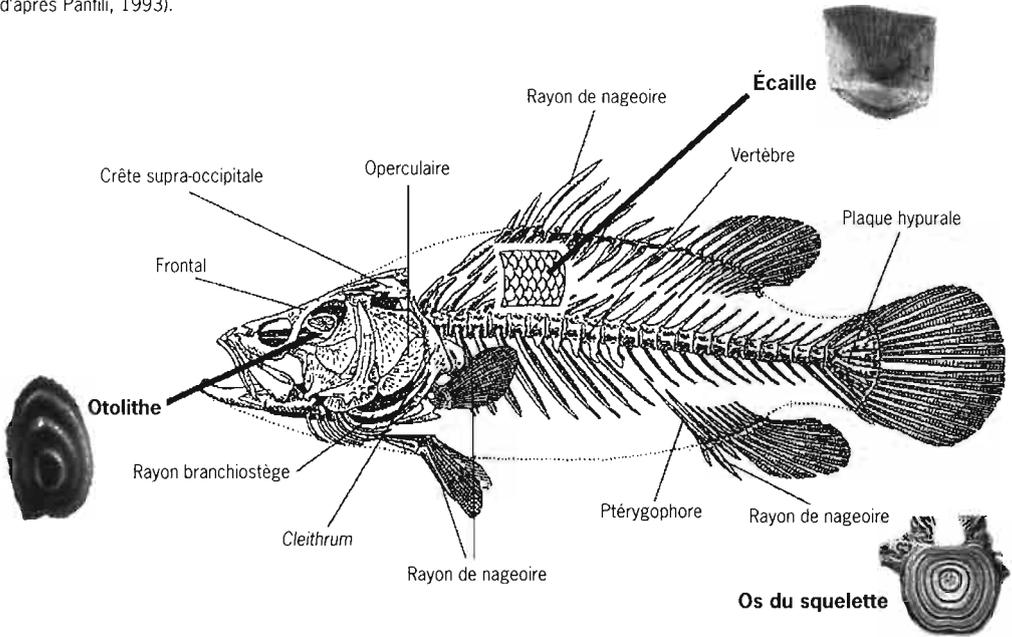
Les données sur l'âge et la croissance des poissons sont essentielles à la compréhension des traits d'histoire de vie des espèces et des populations (e.g. longévité, âge au recrutement, âge de la maturité sexuelle, périodes de reproduction, migrations, mortalité) et à l'étude de la structure démographique des populations et de leur dynamique (par exemple dans les modèles d'estimation basés sur une structuration en âge). Les applications en écologie et en paléoécologie incluent l'étude des réponses adaptatives des populations aux pressions environnementales, d'origine naturelle (variations climatiques) ou anthropique (e.g. pêche, pollution, aménagement de la bande côtière). Étant donné l'état d'appauvrissement actuel de nombreuses ressources aquatiques, la demande de données sclérochronologiques fiables s'accroît pour aider à la prise de décision en matière de gestion des pêcheries et d'exploitation durable des ressources aquatiques.

On a depuis longtemps observé que les PC des poissons montrent, comme celles de certains Invertébrés (e.g. céphalopodes, mollusques ou coraux hermatypiques), des patrons de structures périodiques (fig. I.A) qui sont liées aux variations du taux de croissance induites par des facteurs environnementaux (biotiques ou abiotiques) et des facteurs endogènes tels que des événements ontogéniques (voir Bagenal, 1974; Summerfelt & Hall, 1987). La sclérochronologie se rapproche, à de nombreux égards, de la dendrochronologie, science qui développe des méthodes de datation à partir de l'observation des cernes des arbres. Cette dernière a développé, dans un environnement plus propice (environnement terrestre et situation sédentaire), une méthodologie avancée d'analyse de la croissance des cernes en relation avec la climatologie.

Les pièces calcifiées peuvent potentiellement grandir pendant toute la vie du poisson et se comportent comme des enregistreurs permanents dont la définition varie d'une pièce à l'autre en fonction de son processus spécifique de biominéralisation et de son rôle fonctionnel propre. Trois principaux types de pièce se sont avérés porteurs d'information, ce qui a abouti à la division de la sclérochronologie en trois sous-disciplines (fig. I.A) : la scalimétrie, qui traite des écailles, l'otolithométrie, des otolithes et la squelettochronologie, des os.

L'estimation de l'âge et de la croissance individuels par l'analyse des PC s'est rapidement avérée être beaucoup plus informative et précise que les méthodes statistiques employées au niveau des populations (e.g. analyse des données de fréquence de taille) ou les méthodes individuelles alternatives telles que celle basée sur l'étude de l'accumulation de pigments métaboliques. En conséquence, la sclérochronologie a émergé comme une discipline capable de fournir des informations d'une valeur inestimable à différents domaines de recherche et particulièrement à l'halieutique et à l'écologie marine. Pour atteindre ce statut, elle a dû (et doit encore) répondre à un certain nombre de questions de base, dont beaucoup étaient (ou sont encore) loin d'être triviales.

Figure 1.A
Différentes pièces calcifiées pouvant être utilisées dans les études de sclérochronologie et trois principaux types de structure (otolithe, écaille, squelette) (modifié d'après Panfili, 1993).



Quelle est l'information enregistrée par chacune des PC ?

En tant qu'enregistreurs permanents, les PC constituent des archives biologiques potentielles plus ou moins précises qui doivent être décodées pour en extraire l'information utile et appropriée. Les signaux optiques présentent divers types de périodicité qui dépendent de la PC et de l'échelle d'observation. Par exemple, alors que l'on peut observer des marques de croissance saisonnières sur chacun des types de PC, les accroissements journaliers ne sont observables, à fort grossissement, que sur les otolithes. Les os et les écailles se comportent, à différents degrés, comme des réservoirs de sels de calcium et de phosphore et subissent ainsi des processus de résorption et de remaniement. De telles propriétés doivent être prises en considération lors de l'interpré-

tation de l'information obtenue par l'étude de ces pièces. Des ruptures dans les patrons de croissance sont fréquemment observées et correspondent à des événements vitaux dont l'identification est parfois loin d'être évidente. Par ailleurs, l'acquisition de l'information et son interprétation sont souvent compliquées par la grande plasticité des PC, observable à différentes échelles (individu, population, espèce). Cependant, au niveau individuel, l'interprétation des marques dans les PC peut conduire à une véritable reconstitution chronologique de la croissance et des événements de l'histoire de la vie du poisson.

Quelle sont les méthodes utilisées pour révéler l'information requise ?

Les données fournies par l'analyse des PC proviennent d'un processus d'acquisition dans lequel la méthodologie joue un rôle primordial. De nombreuses méthodes d'extraction, de préparation et d'observation ont été développées au cours du XX^e siècle; leur choix dépend fondamentalement de la PC à étudier ainsi que de l'information requise (type d'information et précision temporelle).

Les données acquises sont-elles justes et précises ?

La qualité des données est une question clé dans toutes les études de sclérochronologie. Des estimations d'âge qui ne seraient ni justes (i.e. proches de la valeur réelle, qui n'est, par essence, pas connue au moins pour les poissons sauvages) ni précises (i.e. présentant une forte variabilité des mesures répétées) seraient d'un faible intérêt pour une utilisation ultérieure.

Les études de validation qui visent à vérifier la périodicité présumée d'un signal donné constituent une base essentielle pour les études de sclérochronologie. Elles sont la seule manière de tester les techniques employées et la justesse des estimations de l'âge qui en résulte. Il est également essentiel d'évaluer la précision des données (i.e. la variabilité entre les interprétations (lectures) répétées (intra- ou inter-lecteurs) d'une PC donnée) pour dégager les schémas les plus appropriés en termes de lecture et d'interprétation. Le recours aux techniques d'imagerie numérique aide le lecteur à divers niveaux du traitement des PC. De telles techniques augmentent la précision de lecture, offrent des possibilités inégalées pour l'acquisition de mesures et permettent la conservation de l'interprétation des données.

Les patrons chimiques sont-ils informatifs et que reflètent-ils ?

L'idée que les PC possèdent des marques ou « empreintes » chimiques a été admise dans les années soixante, ouvrant un autre champ d'investigation qui progresse rapidement grâce au développement d'outils analytiques toujours plus sophistiqués et sensibles. L'étendue de ses applications potentielles est particulièrement vaste, ce qui explique

l'effort de recherche récemment consenti à cette discipline (plus de 400 articles ont été publiés sur le sujet pendant la précédente décennie). Cette discipline doit également faire face à des questions de qualité des données, particulièrement difficile à évaluer, ainsi qu'à des problèmes d'interprétation de signaux chimiques complexes dont le contrôle est à la fois environnemental et physiologique.

Comment ça marche?

En dépit d'une histoire et d'un développement relativement longs, la sclérochronologie est loin d'être une science exacte et, dans un certain nombre de cas, les schémas d'interprétation des informations structurales et chimiques demeurent incomplets et discutables, sur certaines espèces en particulier. Les travaux expérimentaux en cours, en laboratoire et en mésocosme, constituent des supports essentiels à la validation des hypothèses tirées de données acquises dans le milieu naturel. Enfin, une meilleure compréhension des processus de biominéralisation et des mécanismes de régulation associés est indispensable à l'interprétation exhaustive des signaux présents dans les PC.

La littérature sur les PC des poissons est énorme : par exemple, la base de données ASFA (Aquatic Sciences and Fisheries Abstracts) contient plus de 2300 références sur les otolithes de 1978 à 2000. Bien que des ouvrages de synthèse ou des actes de colloques aient traité de quelques thèmes spécifiques (e.g. Bagenal, 1974; Prince & Pulos, 1983; Casselman, 1987; Summerfelt & Hall, 1987; Baglinière *et al.*, 1992; Smith, 1992; Stevenson & Campana, 1992; Secor *et al.*, 1995a; Fossum *et al.*, 2000), aucun n'offre une vision d'ensemble de l'état actuel des méthodes, des pratiques et des applications de la sclérochronologie à l'intention d'utilisateurs désireux de s'initier ou d'accroître leurs connaissances dans le domaine. Cet ouvrage vise à combler cette lacune.

La première partie de l'ouvrage porte sur les fondements des études de sclérochronologie en fournissant des descriptions des PC, de leurs accroissements et de la régulation des processus de dépôt. La justification des études sclérochronologiques et les utilisations des PC sont précisées afin de guider le lecteur pour de futures analyses. Une description détaillée des méthodes de validation est fournie, étant donné l'importance de cette étape pour la sclérochronologie. Quelques exemples d'utilisation des données sont ensuite proposés afin de décrire les applications majeures pour la recherche et la gestion des stocks. Comme la plupart des laboratoires impliqués dans la sclérochronologie sont maintenant équipés de systèmes d'analyse d'image, avec des possibilités s'étendant d'une complète interactivité à la numérisation automatique de données, les principes de base du traitement d'images de PC sont également décrits. La microchimie de l'otolithe, un domaine d'investigation qui se développe rapidement, est ensuite passée en revue. Enfin, des descriptions détaillées des multiples techniques utilisées pour la préparation et l'observation des PC

B. Historique

F.J. Meunier, J. Panfili

L'estimation de l'âge individuel des êtres vivants est souvent une nécessité pour de nombreux types d'étude. Les méthodes mises au point pour accéder à ce type d'information peuvent être très anciennes comme dans le cas de la dendrochronologie (estimation de l'âge d'un arbre à partir de ses anneaux de croissance annuels). En effet, un savoir-faire dans ce domaine existe depuis plusieurs siècles puisqu'il est déjà mentionné par Léonard de Vinci mais aussi par Montaigne (1580-1581) dans sa narration de voyage en Italie : « L'artiste... m'apprit que tous les arbres ont intérieurement autant de cercles et de tours qu'ils ont d'années. Il me le fit voir à toutes les espèces de bois... La partie du bois tournée vers le septentrion ou le nord est plus étroite, a les cercles plus serrés et plus épais que l'autre ; ainsi quelque bois qu'on lui porte, il se vante de pouvoir juger quel âge avait l'arbre et dans quelle situation il était ». Pour ce qui concerne les animaux, et plus particulièrement les Vertébrés, c'est Hederström (1759), un moine suédois, qui le premier propose l'utilisation des cernes des vertèbres comme méthode d'estimation de l'âge des poissons. Cependant, il faut attendre la fin du XIX^e siècle pour voir se développer les premières tentatives sérieuses d'estimation de l'âge. D'une façon générale, l'estimation de l'âge des animaux se fait à partir de l'étude de marques répétitives d'un organe sclérifié ou d'un tissu dur. C'est pourquoi ces différentes méthodes relèvent du qualificatif général de « sclérochronologie ». Nous verrons plus loin qu'avec telle ou telle approche spécialisée, on utilise d'autres mots plus précis pour caractériser les méthodes mises au point : squelettochronologie, scalimétrie ou otolithométrie.

Les travaux faisant appel à l'étude des processus cycliques enregistrés par les pièces calcifiées chez les Poissons se chiffrent par centaines et il n'est pas question ici de les citer tous. Toutefois, un certain nombre de références, concernant les aspects théoriques dans ce domaine de recherche, sont nécessaires d'autant plus qu'elles mettent en relief notre compréhension des processus de croissance des tissus durs et leur aptitude à enregistrer le temps (Bagenal, 1974 ; Bagenal & Tesch, 1978 ; Summerfelt & Hall, 1987 ; Baglinière *et al.*, 1992). Ces études se sont surtout développées après le milieu du XX^e siècle mais les idées et le support de cette science sont quelque peu plus anciens.

Nous aborderons donc d'abord les travaux qui ont contribué à la mise au point des méthodologies utilisées couramment aujourd'hui chez les poissons osseux (Ostéichthyens). Ensuite, nous envisagerons l'histoire des recherches récentes qui ont permis la mise au point d'approches similaires chez les poissons cartilagineux (Chondrichthyens).

1. Ostéichthyens

1.1. Scalimétrie

Leeuwenhoeck (1696), puis Réaumur (1716) avaient émis l'hypothèse que les crêtes concentriques (ou *circuli*) de la surface des écailles correspondaient aux différentes étapes de la croissance. Kuntzman (1824) a, par la suite, contesté la validité des *circuli* comme témoins de la croissance annuelle. Les auteurs suivants se sont plus préoccupés des rapports entre les crêtes et les lamelles sous-jacentes (Agassiz, 1833-1844; Peters, 1841). En fait, c'est Steenstrup (1861) puis Baudelot (1873) qui ont montré que, tout au long de la croissance, il y avait bien adjonction de nouvelles crêtes à la périphérie de l'écaille. Hoffbauer (1898, 1900) a observé, chez la carpe, que la croissance de l'écaille est plus importante en période d'abondance de nourriture et que, quand celle-ci se faisait plus rare, les *circuli* de l'écaille se resserraient. Il propose alors d'utiliser ces pièces comme moyen d'estimer l'âge des Poissons et présente une application pratique sur la carpe.

Malgré quelques réticences (Brown, 1903; Tims, 1906), les ichtyologistes développent alors au début du XX^e siècle une méthode d'estimation de l'âge individuel des poissons à partir des variations de la disposition des crêtes circulaires et autres ornements de la surface des écailles élasmoïdes (Walter, 1901; Thomson, 1904; Hoffbauer, 1905; Dahl, 1907; Esdaile, 1912, *inter alia*).

Johnston (1905, 1907, 1908, 1910) a découvert et décrit les marques de reproduction (« spawning marks » en anglais) sur les écailles du saumon et a jeté les bases de la technique du rétrocalcul pour suivre la croissance annuelle du poisson. Dahl (1911) a analysé les causes des « fausses marques » et, avec Lea (1911), ils donnent les premières applications pratiques de la scalimétrie (calcul des tailles annuelles successives pour chaque individu).

Conscient que l'utilisation de l'écaille dans l'estimation de l'âge individuel reposait surtout sur des présomptions plutôt que sur des faits bien établis, Masterman (1913) publie une étude critique sur le saumon où il montre la nécessité, pour prouver le bien-fondé de cette méthode, de combiner les observations morphologiques, expérimentales et statistiques. En fait, il attire l'attention sur l'importante question de la validation des hypothèses interprétatives. Dans le domaine expérimental, c'est Winge (1915), sur les Gadidés, qui développe l'utilisation d'animaux marqués puis recapturés, bien que Johnston (1907) eut déjà l'occasion de pratiquer cette technique sur le saumon. Grâce aux travaux de ces pionniers, de nombreuses études pratiques basées sur les écailles seront publiées par la suite dans les revues spécialisées d'ichtyologie et de pêche.

La croissance de la surface de l'écaille est indéfinie et étroitement liée, dans certaines régions et pendant les saisons bien marquées, aux variations du milieu extérieur. Il est maintenant admis que, pendant la mauvaise saison, l'intervalle séparant les *circuli* se resserre et/ou les

nouveaux *circuli* qui se mettent en place sont discordants par rapport aux précédents (Ombredane & Baglinière, 1992); ce resserrement et/ou cette discordance sont très nets à l'observation en lumière transmise et sont appelés *annuli*. De l'observation de ces *annuli* est née la scalimétrie : estimation de l'âge des poissons et évaluation de la croissance individuelle (Dahl, 1907 ; 1911 ; Graham, 1929 ; Vibert & Lagler, 1961 ; Daget & Le Guen, 1975, *inter alia*).

Bien qu'empirique au départ, au début du XX^e siècle, la scalimétrie a pu donner des résultats très satisfaisants en maintes occasions, en particulier pour les espèces intéressant la grande pêche. Toutefois, Walter (1901), Brown (1903), Dahl (1911) et d'autres ont montré que des causes d'erreurs sérieuses pouvaient apparaître avec la présence de « fausses marques » ou « faux *annuli* », car les écailles enregistrent souvent dans leur structure divers événements biologiques importants et stress (blessures, chocs physiologiques, mauvaises conditions estivales), périodiques ou non. De plus, chez certaines espèces, les *annuli* sont difficiles à observer, rendant l'estimation de l'âge délicate ou impossible. Chez d'autres espèces, la peau est dépourvue d'écailles. Les ichtyologistes se sont alors tournés vers les otolithes et/ou les os qui, eux aussi, enregistrent dans leur structure des événements affectant la croissance.

1.2. Otolithométrie

L'otolithométrie est une autre méthode d'estimation de l'âge très utilisée chez les Téléostéens (Stevenson & Campana, 1992). Cette science s'est aussi développée à la fin du XIX^e siècle à partir des travaux de Reibisch (1899). L'otolithe, concrétion calcaire de l'oreille interne à croissance théorique infinie, n'est pas à proprement parler un élément du squelette, mais sa nature minéralisée lui confère des propriétés similaires dans le domaine de la sclérochronologie. À l'origine, comme pour les écailles, les otolithes ont été utilisés pour étudier les cycles saisonniers et annuels de croissance et il existe maintenant une littérature abondante sur le sujet. Leur observation, en entier ou après une préparation, permet de donner une estimation de l'âge avec une bonne précision (Vibert & Lagler, 1961, *inter alia*). Mais, c'est la découverte par Pannella (1971) d'accroissements journaliers dans les otolithes qui a ouvert de nouveaux champs d'investigation. Les spécialistes ont alors été capables de reconstruire les étapes spécifiques de l'histoire de la vie des individus, du stade larvaire et/ou juvénile au stade adulte. L'otolithe est donc un enregistreur très sensible qui recouvre une large gamme de temps, mais les techniques utilisées pour atteindre cette précision d'échelle peuvent être onéreuses et consommatrices de temps. Plus récemment, au début des années quatre-vingt, il a été découvert que les otolithes incorporent également des éléments chimiques de leur environnement (d'origines biotique et abiotique) par l'intermédiaire de processus physiologiques complexes. L'analyse chimique des constituants de l'otolithe a offert ainsi de nouveaux moyens

de recherche et centres d'intérêt, particulièrement en écologie et notamment pour la reconstruction des traits de vie. Là aussi, les techniques sont coûteuses et toujours en cours de développement. Le nombre de travaux sur l'otolithométrie est déjà très important et des colloques spécialisés dévolus uniquement à la recherche sur les otolithes et ses applications ont déjà eu lieu au cours de la dernière décennie (Secor *et al.*, 1995a; Fossum *et al.*, 2000). Jusqu'à récemment, les otolithes ont été de plus en plus utilisés pour les études d'estimation de l'âge et de la croissance des poissons, et ils sont également très utiles dans d'autres domaines scientifiques (Fossum *et al.*, 2000).

1.3. Squelettochronologie

Si le développement de la squelettochronologie des poissons commence quelques années après les premiers pas de la scalimétrie, la première application remonte, en fait, au milieu du XVIII^e siècle, avec le travail de Hederström (1759). Cet auteur, généralement méconnu, était choqué par les longévités fabuleuses couramment attribuées, à son époque, à des poissons communs comme le brochet (plus de 200 ans, voir aussi Casselman, 1974). Ayant observé que les vertèbres de plusieurs espèces présentaient des cernes, il a émis l'hypothèse que ces derniers pouvaient être un indice de l'âge. Le dénombrement de ces cernes sur les vertèbres de plusieurs espèces communes (brochet, morue, perche, anguille, brème) lui a donné, pour l'âge de ces animaux, des valeurs du même ordre que celles qui sont admises de nos jours. S'appuyant sur ses résultats, Hederström, dans le même article, a jeté les bases d'une véritable gestion des stocks, certes maladroite, mais probablement la première dans le domaine de la pisciculture. Publié en suédois, ce travail est resté de nombreuses années dans l'oubli et il a fallu attendre 1904 pour retrouver des études basées sur l'observation des os, en liaison d'ailleurs avec les écailles et les otolithes (Heincke, 1904, 1908; Cunningham, 1905). Une mention spéciale doit être faite sur le travail de Clerc (1927), premier auteur moderne à développer la squelettochronologie. Cet auteur a fait une étude comparative de la « périodicité de croissance des os » chez les Ostéichthyens, les Amphibiens et les Mammifères. Il a beaucoup insisté sur le fait que la croissance est un phénomène complexe sous le contrôle de facteurs externes (tels que l'influence du milieu et du climat) mais aussi de facteurs internes. Il a reconnu que les structures cycliques apparaissent dans l'os périostique et montré que certains os, par l'abondance de leurs formations périostiques, sont plus favorables que d'autres pour l'analyse de la croissance cyclique, d'une part, et que des processus de reconstruction entraînent la destruction de ces structures, d'autre part. Très rapidement, l'éventail des outils de squelettochronologie s'enrichit sur la base d'organes variés : rayons épineux et rayons « mous » des nageoires, pièces endosquelettiques des nageoires pectorales, *cleithra*, crête supra-occipitale, operculaires, vertèbres. Menon (1950) en dresse une liste exhaustive espèce par espèce. Le plus souvent, les auteurs uti-

lisent soit des pièces entières, soit des tranches, en exploitant les différences de transparence des couches osseuses déposées au cours des saisons : opacité des « zones » pendant la croissance active à la « belle saison », transparence des *annuli* pendant la croissance ralentie à la « mauvaise saison ». Quand l'*annulus* se réduit à une étroite ligne d'arrêt de croissance (LAC) annuelle, une méthode histologique simple, mise au point chez les Tétrapodes (Klevezal & Kleinenberg, 1967 ; Smirina, 1974 ; Pascal & Castanet, 1978, *inter alia*) et basée sur une coloration à l'hématoxyline, facilite la mise en évidence des LAC très chromophiles (Meunier *et al.*, 1979 ; Boët, 1981 ; Meunier & Pascal, 1981). L'utilisation des os pour l'estimation de l'âge individuel est cependant peu fréquente chez les Ostéichthyens car elle est, en général, limitée aux espèces où scalimétrie et otolithométrie donnent des résultats douteux. L'accès au squelette est souvent plus difficile que le simple prélèvement des écailles, voire des otolithes.

2. Chondrichthyens

Les premiers travaux de sclérochronologie chez les Chondrichthyens sont beaucoup plus récents (d'au moins un demi-siècle) que ceux relatifs aux Ostéichthyens. En effet, requins et raies étant dépourvus à la fois de squelette osseux et d'otolithes (réduits à de fins granules), il a fallu faire appel à d'autres structures comme support de marques de croissance squelettiques. En général, les spécialistes utilisent les corps vertébraux dont la structure cartilagineuse est assez bien connue (Ridewood, 1921 ; Moss, 1977 ; Hoening & Walsh, 1982) ou les épines des nageoires dorsales, quand elles existent (chez certains Squaliformes et les Hétérodon-tiformes), dont la morphogenèse a également été étudiée en plusieurs occasions (Markert, 1896 ; Goodrich, 1907 ; Peyer, 1957 ; Holden & Meadows, 1962 ; Maisey, 1979). Des marques de croissance ont également été signalées sur les dents (Tanaka, 1990) mais n'ont pas donné lieu à des applications squelettochronologiques.

Depuis les travaux de Ridewood (1921), on sait que, chez de nombreux Chondrichthyens, les corps vertébraux présentent des anneaux concentriques de cartilage calcifié séparés par des anneaux de cartilage peu ou pas calcifié donnant aux vertèbres différentes propriétés de transparence à la lumière. Ces anneaux sont plus ou moins visibles à la surface des cônes vertébraux. Cette alternance régulière de secteurs calcifiés et moins calcifiés correspond à des phénomènes cycliques plus ou moins réguliers. Haskell (1949) fut le premier à formuler clairement l'hypothèse d'une relation étroite entre ces anneaux vertébraux et la croissance annuelle des animaux et il proposa d'utiliser des coupes de vertèbres pour estimer l'âge. La première utilisation pratique effective pour l'estimation de l'âge individuel chez une raie a été publiée par Ishiyama (1951) et chez les requins par Parker & Stott (1965). Ces premières études ont été suivies par de nouvelles applications, surtout dans les deux dernières décennies.

Une deuxième approche pour l'estimation de l'âge individuel chez les Chondrichthyens repose sur l'étude des épines des nageoires dorsales. Toutefois, elle ne concerne que les taxons qui possèdent ces épines, c'est-à-dire les Hétérodontiformes et certains Squaliformes. Les épines des nageoires dorsales ont une structure semblable à celle des dents et des denticules cutanés. Elles sont constituées de dentine organisée autour d'une longue cavité pulpaire et recouvertes d'émail ou d'émailloïde (Markert, 1896; Maisey, 1979). Contrairement aux dents buccales et aux denticules cutanés soumis au remplacement, ces épines ont une croissance infinie et présentent des discontinuités rythmiques. Si celles-ci sont synchronisées avec un rythme saisonnier, elles peuvent être utilisées comme critère d'estimation de l'âge individuel (Kaganovskaia, 1933; Bonham *et al.*, 1949; Holden & Meadows, 1962). Avec le développement des études squelettochronologiques chez les Chondrichthyens, s'est posé le même problème d'automatisation des techniques de lecture que chez les Ostéichthyens. Quelques recherches ont été faites dans ce sens sur les corps vertébraux. Les analyses densitométriques des variations quantitatives du minéral, soit directes par spectrométrie de rayons X, soit indirectes à partir de radiographies, sont les méthodes les plus prometteuses. Mais, cela implique que des critères objectifs de reconnaissance des structures squelettiques de croissance soient bien établis pour servir de support à l'automatisation (Cailliet & Tanaka, 1990).

Chapitre II

Différents types de pièce calcifiée

Les pièces calcifiées ont des origines ontogéniques et des propriétés différentes. C'est pourquoi, dans le but d'évaluer les utilisations potentielles des otolithes, des écailles et des tissus squelettiques pour les études de sclérochronologie, il est important de bien comprendre la nature et la formation des accroissements dans ces différentes structures. Dans ce chapitre, nous décrirons la fonction, la morphologie et la structure des différentes pièces calcifiées. Puis, nous ferons une revue des conceptions actuelles des processus d'accrétion et montrerons comment ils sont influencés par les facteurs internes et externes.

A. Otolithes

P.J. Wright, J. Panfili, B. Morales-Nin, A.J. Geffen

1. Description et fonction

L'oreille interne, qui existe chez tous les Vertébrés Gnathostomes, fonctionne à la fois comme un système auditif qui détecte les ondes sonores et comme un système vestibulaire qui détecte les accélérations linéaires et angulaires, permettant aux organismes de maintenir leur équilibre. Chez les poissons, l'oreille interne est une structure paire noyée dans le crâne, de chaque côté de la tête, près de l'encéphale moyen. Chaque oreille est un ensemble complexe de canaux et de sacs remplis d'endolymphe, un liquide aux propriétés de viscosité spéciales (fig. II.A.1). L'anatomie de ces labyrinthes et la structure des mécanorécepteurs labyrinthiques sont connues chez de nombreuses espèces de poissons (Lowenstein, 1971). Les Téléostéens ont trois canaux semi-circulaires en position orthogonale les uns par rapport aux autres, ce qui permet la détection des accélérations angulaires. Les canaux s'ouvrent dans une série de grandes chambres d'interconnexion ou sacs otiques qui contiennent un tissu sensoriel, la *macula*, qui détecte les accélérations linéaires et les sons.

Chez les Ostéichthyens, il y a trois sacs otiques par oreille, chacun contenant une structure calcaire, l'otolithe, qui agit comme un mécanorécepteur stimulant les kinocils de la *macula*. Les trois sacs otiques sont le *sacculus* (saccule), l'*utricle* (utricule) et la *lagena*, qui contiennent respectivement la *sagitta*, le *lapillus* et l'*asteriscus* (fig. II.A.1). Chaque otolithe est fixé au-dessus de la *macula* par une membrane otolithique, dans laquelle se projettent les cils sensoriels. D'après Dunkelberger *et al.* (1980), la membrane otolithique est divisée en deux zones : a) une zone à structure gélatineuse qui couvre la région sensorielle de la *macula* et qui présente habituellement une architecture réticulée (en nid d'abeille), b) une zone sous-cupulaire qui est un réseau très lâche de fibres couvrant des régions sensorielles et non sensorielles de la *macula*. La zone gélatineuse s'étend de la surface de l'otolithe à l'extrémité des

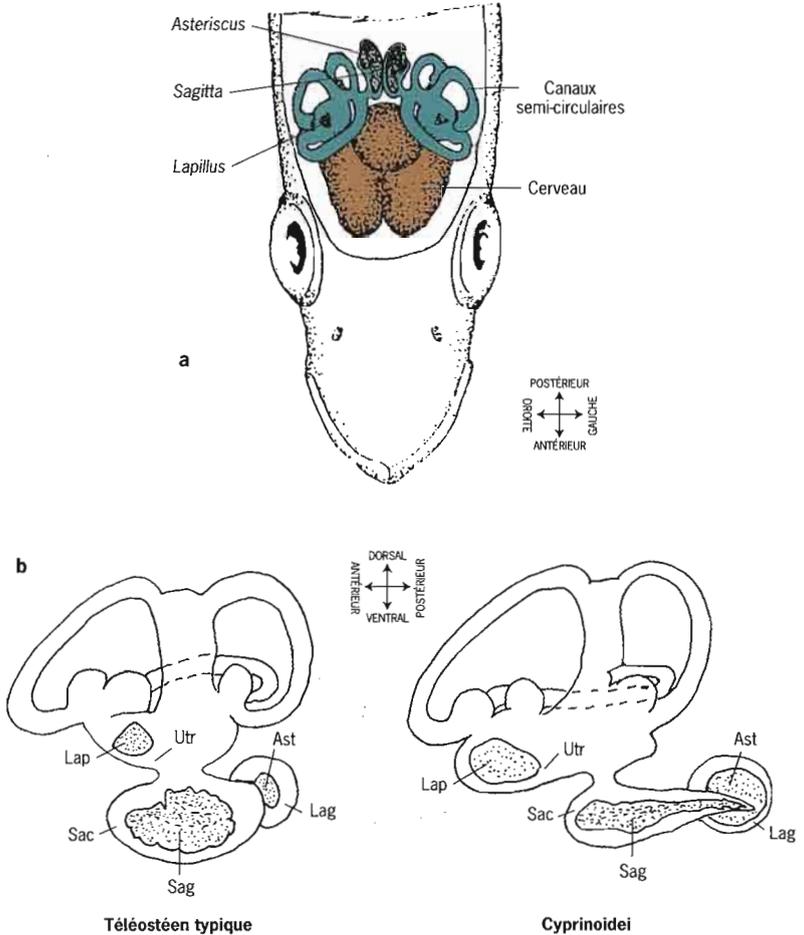
cils sensoriels et sa fonction première est probablement la mécanoréception. La lumière du système entier est remplie d'endolymphe. Chez les Ostariophyses, la vessie natatoire intervient dans la stimulation auditive de l'oreille interne (Popper & Fay, 1993).

Figure II.A.1
Position des otolithes à l'intérieur de l'oreille interne des poissons Téléostéens (modifié d'après Secor *et al.*, 1992).

a) Vue dorsale de l'appareil vestibulaire chez une espèce de Téléostéen typique. La partie supérieure du crâne a été enlevée (en section frontale).

b) Otolithes à l'intérieur du système du labyrinthe chez un poisson Téléostéen typique et chez un Ostariophyse.

Ast = asteriscus;
Lag = lagena (vestibule);
Lap = lapillus;
Sac = sacculus (vestibule);
Sag = sagitta;
Utr = utriculus (vestibule).



1.1: Description

Les otolithes des trois paires de sacs otiques diffèrent en taille et en forme (fig. II.A.2). Les différences morphologiques des otolithes tendent à refléter leur phylogénie et leur développement, bien qu'il y ait une variation considérable inter- et intra-spécifique (fig. II.A.3). Des différences inter-spécifiques de la forme apparaissent être dues à des influences génétiques et environnementales (Lombarte & Leonart, 1993; Nolf, 1995; Torres *et al.*, 2000). À cause de leur variation morphologique inter-spécifique, les otolithes se sont avérés utiles en taxonomie (Hecht, 1979), permettant, par exemple, l'étude de la ration alimentaire à partir de contenus stomacaux partiellement digérés (Suter & Morel, 1996; Olsson & North, 1997; Watanabe & Saito, 1998; Alonso *et al.*, 1999, *inter alia*). De même, les otolithes issus de

sites archéologiques et paléontologiques permettent-ils de reconstruire les paléo-environnements et les paléofaunes (Nolf, 1995). La morphométrie des otolithes a aussi été utilisée pour l'identification et l'étude des variations géographiques des populations et des stocks de poissons (Messieh *et al.*, 1989; Castonguay *et al.*, 1991; Campana & Casselman, 1993; Friedland & Reddin, 1994).

Figure II.A.2

Les trois paires d'otolithes de *Vinciguerria nimbaria* (Photichthyidae). S, *sagitta*; L, *lapillus*; A, *asteriscus*. Échelle = 300 µm (d'après Tomás & Panfili, 2000).

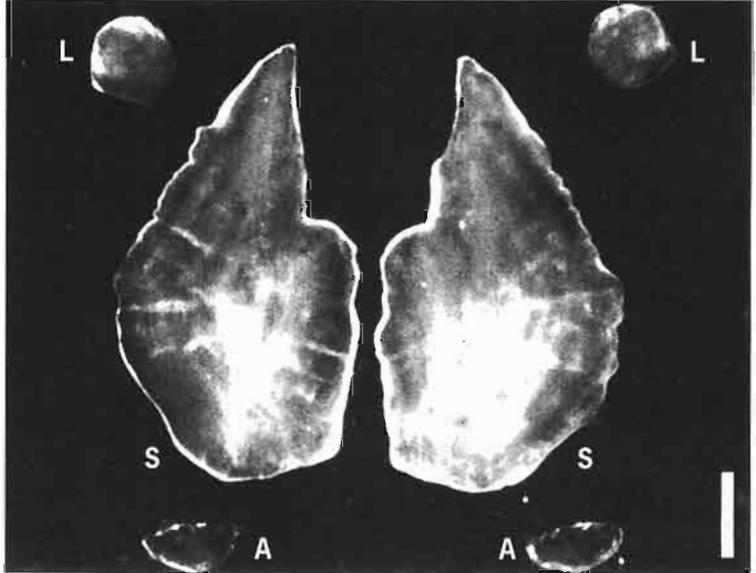
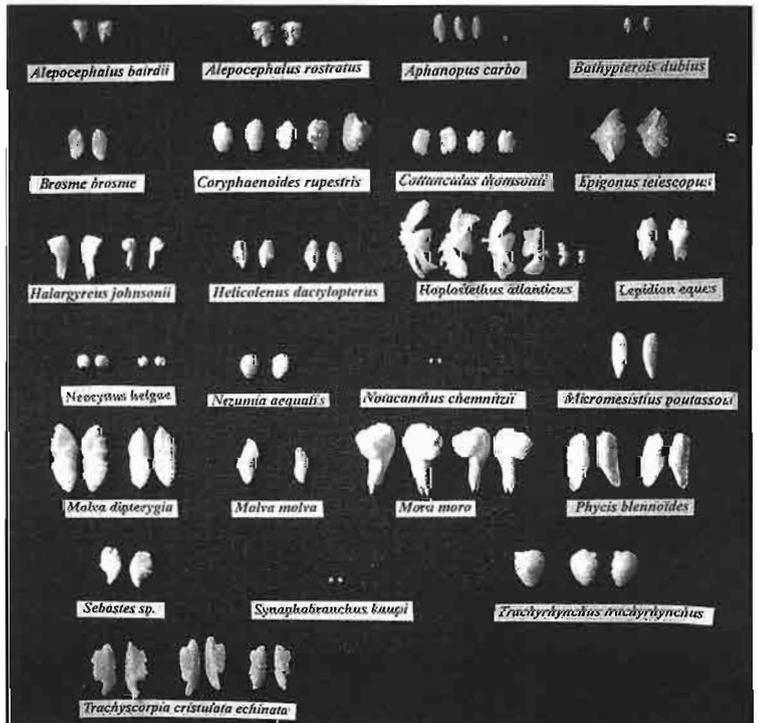


Figure II.A.3

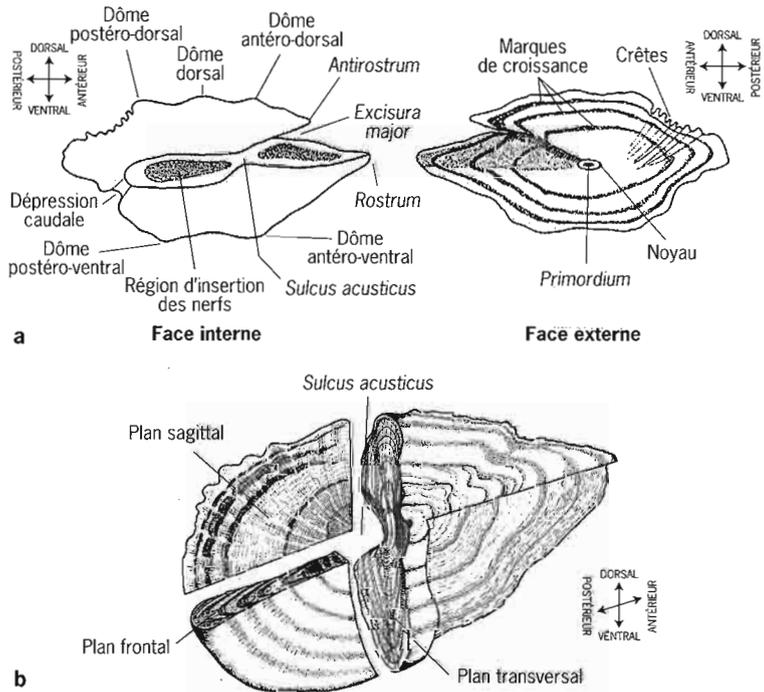
Exemples de formes variées parmi les otolithes d'espèces de poissons profonds (photo V. Allain). Échelle = 10 mm.



Chez la plupart des espèces, la *sagitta* est le plus grand des otolithes et c'est donc le plus utilisé dans les études d'estimation de l'âge. Cependant, chez les Ostariophyses, c'est l'*asteriscus* qui est l'otolithe le plus grand (Adams, 1940). La majeure partie des études sur la formation des otolithes s'est focalisée sur la *sagitta* et le *sacculus*. Dans la littérature, le terme « otolithe » est souvent utilisé pour décrire une seule des trois paires, généralement la paire de *sagittae*, d'où la nécessité de le définir dans toute étude.

Les otolithes, généralement comprimés latéralement, sont symétriques (droite-gauche), excepté chez les poissons plats (Pleuronectiformes) et les poissons-chats. Des détails de la terminologie utilisée dans la description morphologique des otolithes sont donnés dans la figure II.A.4a. Un otolithe a trois plans d'orientation, les mêmes que ceux du poisson : sagittal, frontal et transversal (fig. II.A.4b). Cette orientation doit être définie soigneusement en décrivant toute préparation d'otolithe et les références doivent toujours être faites à la terminologie standard (exemple : section transversale, sagittale ou frontale). La face proximale de la *sagitta* possède une gouttière, le *sulcus acusticus* (fig. II.A.4a, b), qui est en contact avec l'épithélium sensoriel (*macula*) du *sacculus* (Dunkelberger *et al.*, 1980; Fay, 1980; Platt & Popper, 1981). Une *sagitta* typique a une forme elliptique sur son plan sagittal; elle est comprimée selon son axe interne-externe, avec une face convexe proximale et une face distale concave et son axe principal de croissance est orienté dans une direction antéro-postérieure (fig. II.A.4). Cependant, chez plusieurs espèces épipélagiques et pélagiques

Figure II.A.4
Section à travers une *sagitta* typique montrant les différentes parties de cet otolithe (modifié d'après Pannella, 1980).
a) Faces interne et externe d'une *sagitta* typique.
b) Les trois plans d'orientation d'une *sagitta* typique.



comme les thons, les espadons, les coryphènes, les Cyprinidae et les espèces de profondeur, les faces dorsale et ventrale des otolithes sont asymétriques, leur donnant une forme de papillon.

Les otolithes, formations extracellulaires, sont constitués d'aragonite, une forme cristallisée de carbonate de calcium, fixée sur une matrice organique composée largement d'une protéine proche de la kératine, l'otoline, qui est riche en résidus aspartate et glutamate (Degens *et al.*, 1969; Watabe *et al.*, 1982; Morales-Nin, 1987a). L'otolithe s'accroît par l'addition de couches concentriques de protéines et de carbonate de calcium, donnant une structure quelque peu comparable à celle d'un bulbe d'oignon (chap. III.C).

1.2. Fonction

Le labyrinthe des poissons est impliqué dans le maintien de l'équilibre et il possède des cellules nerveuses qui sont sensibles à la pression, à la gravité, aux mouvements angulaires et aux vibrations sonores (Grassé, 1958; Lowenstein, 1971; Blacker, 1974). La *pars superior* du labyrinthe (canaux semi-circulaires et *utricle*) est concernée par les informations posturales alors que la *pars inferior* (*sacculus* et *lagena*) est le récepteur sonore (fig. II.A.1). Les otolithes des Téléostéens sont similaires, mais en beaucoup plus grand, aux otoconies des autres Vertébrés. Les otolithes sont impliqués dans la mécano-réception, agissant comme transducteurs de sons électromécaniques et de déplacements, convertissant les forces de cisaillement en impulsions électriques par déformation des kinocils de l'organe nerveux terminal ou *macula* dans l'oreille interne du poisson (Popper & Hoxter, 1981). Les mouvements relatifs entre l'épithélium sensoriel et l'otolithe tordent les paquets de cils et stimulent le nerf crânien VIII. Les otolithes ajoutent leur inertie de masse à la couche gélatineuse des trois sacs otiques, augmentant leur sensibilité aux forces de gravitation et d'accélération linéaire (Ross & Pote, 1984). Le *sulcus acusticus* de l'otolithe a une relation directe avec la *macula* de l'épithélium vestibulaire qui est directement connectée avec le nerf auditif (Grassé, 1958). Les systèmes récepteurs sont assez différents chez les Ostariophyses, chez qui l'oreille interne est en contact avec la vessie natatoire par l'intermédiaire d'un complexe d'os connu comme l'organe de Weber (Grassé, 1958).

Il a été supposé que les sons atteignent l'oreille interne des poissons par deux moyens différents. Puisque la densité du corps des poissons est approximativement la même que celle de l'eau, il se meut dans celle-ci en réponse à une variation de champ sonore. L'otolithe, cependant, est plus dense que le reste du corps et il bouge avec une amplitude et une période différentes de celles de la *macula* sensorielle et du corps. Ainsi, la source sonore stimule directement l'oreille interne. De plus, les parois de la vessie natatoire vibrent car elle contient du gaz moins dense que le corps. Ceci produit une stimulation indirecte par suite d'un ample déplacement de l'otolithe (Popper & Lu, 2000).

2. Accroissements périodiques

Les otolithes montrent une série de structures d'accroissement qui se forment régulièrement sur une échelle de temps s'étalant d'un rythme journalier à un rythme annuel. Contrairement au calcium squelettique qui peut être mobilisé pour l'homéostasie (Simkiss, 1974), les otolithes ne semblent pas sujets à des résorptions minérales, excepté en cas de stress extrême (Mugiya & Uchimura, 1989). En conséquence, les otolithes apparaissent hautement appropriés pour l'estimation de l'âge.

L'estimation de l'âge des poissons dépend des changements visibles de la croissance de l'otolithe. Les patrons de croissance les plus intéressants se situent à quatre niveaux de résolution :

- accroissements primaires, permettant une résolution des jours ;
- zones saisonnières, permettant une résolution de plusieurs mois ou d'une saison de croissance ;
- accroissements annuels, permettant une résolution des années ;
- discontinuités (ultra) structurales dans l'otolithe, correspondant à des stress variés qui ne sont pas nécessairement réguliers durant la vie des individus.

Les mécanismes qui produisent ces patrons reconnaissables sont légèrement différents, bien qu'au niveau opérationnel ils soient le résultat de variations de la quantité relative de calcium et de protéines sur les accroissements ou les zones (Dannevig, 1956 ; Morales-Nin, 1987a).

2.1. Accroissements primaires

Les accroissements primaires sont formés par dépôts successifs de couches riches en minéral et de couches riches en matrice protéique autour du noyau de l'otolithe (Watabe *et al.*, 1982 ; Morales-Nin, 1987a ; Mugiya, 1987 ; Zhang & Runham, 1992a). Des noms variés ont été donnés aux deux types de couche qui forment ces accroissements primaires. Une revue de la terminologie présentée lors du premier symposium international sur les otolithes a proposé les termes de « zone-L » et « zone-D » (Kalish *et al.*, 1995), respectivement pour les couches riches en minéral et les couches riches en matrice organique. Ces termes se réfèrent à la dualité d'aspect des accroissements, les zones-L et les zones-D apparaissant respectivement claires et sombres quand on les observe en lumière naturelle transmise (fig. II.A.5a, b).

La différence de composition chimique des deux types de zone conduit également à leur apparence différente au microscope électronique à balayage après une attaque acide superficielle. La zone-L est riche en carbonate de calcium et apparaît en relief au MEB tandis que la zone-D, plus riche en protéines et plus pauvre en calcium, apparaît comme une dépression au MEB (fig. II.A.5c, d, e). C'est cette terminologie qui sera utilisée dans la suite de cet ouvrage.

Pannella (1971, 1974) a été le premier à décrire les accroissements primaires dans les otolithes et il a suggéré qu'ils sont déposés quotidiennement. L'abondante littérature sur les accroissements journaliers a

conduit de nombreux chercheurs à affirmer que les accroissements primaires sont bien des structures journalières. Cependant, une telle affirmation n'est pas toujours valide pour de nombreuses raisons. Le dépôt des accroissements des otolithes n'est pas toujours journalier ou n'est pas toujours discernable chez toutes les espèces (Geffen, 1982; McGurk, 1984; Al-Hossaini & Pitcher, 1988; Morales-Nin, 1992). Des comparaisons entre différents observateurs ont montré que les structures des otolithes sont souvent interprétées différemment par chaque lecteur (Campana & Moksness, 1991). Par ailleurs, les accroissements primaires peuvent ne pas être quotidiens jusqu'à un certain temps après l'éclosion (Geffen, 1987).

Des dépôts sub-journaliers et des discontinuités dans l'enregistrement des accroissements peuvent se produire (Campana & Neilson, 1985). Le dépôt journalier des accroissements semble généralement s'arrêter chez l'adulte et/ou au cours des stades juvéniles tardifs chez les poissons longévifs (Pannella, 1971, 1980). Dans certains cas, cet arrêt apparent de la périodicité journalière peut être relié à la formation d'accroissements très étroits en dessous de la limite de détection du microscope photonique (Morales-Nin, 1988; Morales-Nin & Ralston, 1990).

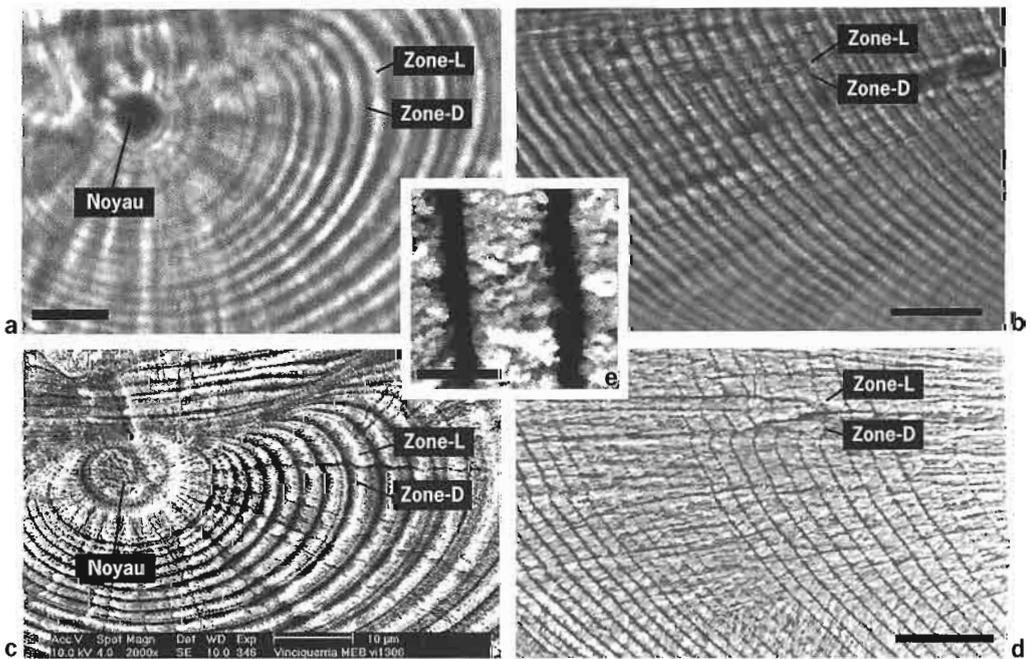


Figure II.A.5 - Coupe fine transversale d'un otolithe de *Vinciguerria nimbaria* (Photichthyidae). Les marques de croissance primaires, composées de zones-D et -L, sont clairement visibles.

a) Détail de la région du noyau sous une lumière transmise en microscopie photonique. Échelle = 10 μ m (photo J. Panfili).

b) Détail de la zone de croissance adulte sous une lumière transmise en microscopie photonique. Échelle = 10 μ m (photo J. Tomás).

c) Détail de la région du noyau sous le MEB après une attaque acide. Échelle = 10 μ m (photo L. Marec & E. Dabas).

d) Détail de la zone de croissance adulte sous le MEB après une attaque acide. Échelle = 10 μ m (photo J. Tomás).

e) Détail des marques de croissance primaires après une attaque acide sous le MEB. La zone-L est riche en cristaux d'aragonite alors que la zone-D correspond à une profonde dépression. Un accroissement primaire est égal à la somme de 1 zone-L + 1 zone-D. La figure montre une zone-L complète et 2 zones-D complètes. Échelle = 1 μ m (photo L. Marec & E. Dabas).

Cependant, des investigations ultrastructurales ont aussi démontré que les accroissements primaires ne sont pas déposés quotidiennement chez certaines espèces (Volk *et al.*, 1995). Il est clair alors que l'interprétation des patrons de croissance de microstructures chez les espèces sauvages requiert une compréhension des processus physiologiques et de régulation de la croissance des otolithes et des facteurs qui les influencent (Campana & Neilson, 1985). Pour que les accroissements primaires des otolithes soient utilisables dans l'estimation de l'âge, les processus impliqués dans leur régulation doivent soit être synchronisés à des événements environnementaux cycliques, soit posséder un rythme circadien endogène, relié à un cycle extérieur journalier (Geffen, 1987). De plus, la formation des accroissements doit être indépendante de la croissance somatique. Des expériences ont montré que les otolithes continuent leur accréation même quand la croissance somatique cesse naturellement (Brothers, 1981 ; Wright *et al.*, 1990 ; Mugiya & Tanaka, 1992) ou quand elle a été artificiellement réduite (Mosegaard *et al.*, 1988). Cette continuité peut être reliée à des différences entre la croissance des systèmes sensoriels tels que l'oreille interne et celle d'autres parties de l'organisme.

Les accroissements primaires sont seulement visibles aux forts grossissements (microscopie photonique ou électronique). Ils varient en épaisseur de moins de 1 μm à 12 μm (Pannella, 1974). La largeur d'une zone-D est toujours inférieure à 1 μm (environ 200 à 500 nm) tandis que celle d'une zone-L est plus variable (de 0,4 μm à 10 μm environ). Cependant, comme les otolithes ne grandissent pas uniformément, la largeur des accroissements dépendra aussi de l'axe le long duquel sont faites les mesures et du plan de section de l'otolithe (chap. III.C). Les accroissements sub-journaliers peuvent être déposés particulièrement pendant les périodes de croissance rapide. Ces structures peuvent généralement être différenciées des accroissements journaliers car elles sont moins bien définies et distinctes que ces derniers (Campana, 1992).

2.1.1. *Primordium*

Les otolithes se développent à partir d'un ou plusieurs élément(s) granulaire(s) partiellement calcifié(s), expulsé(s) (exocytose) par les cellules épithéliales de l'oreille interne (Mann *et al.*, 1983). Ces noyaux ont été appelés granules primordiaux et ils sont les composants primaires du *primordium*. Dans les *sagittae*, les granules peuvent être composés de vaterite, tandis que le reste du *primordium* est typiquement de l'aragonite. Des exemples de ces différents types de *primordium* sont montrés dans la figure II.A.6. Le *primordium* peut être sphérique, allongé ou multiple, selon les espèces. Dans le cas de *primordia* multiples, les unités constitutives fusionnent pour former le noyau de l'otolithe (fig. II.A.6). Le terme *nucleus* a aussi été utilisé pour décrire la région du noyau de l'otolithe, bien que ce terme soit déconseillé puisqu'il a été aussi utilisé pour décrire un secteur central nettement plus large (voir glossaire).

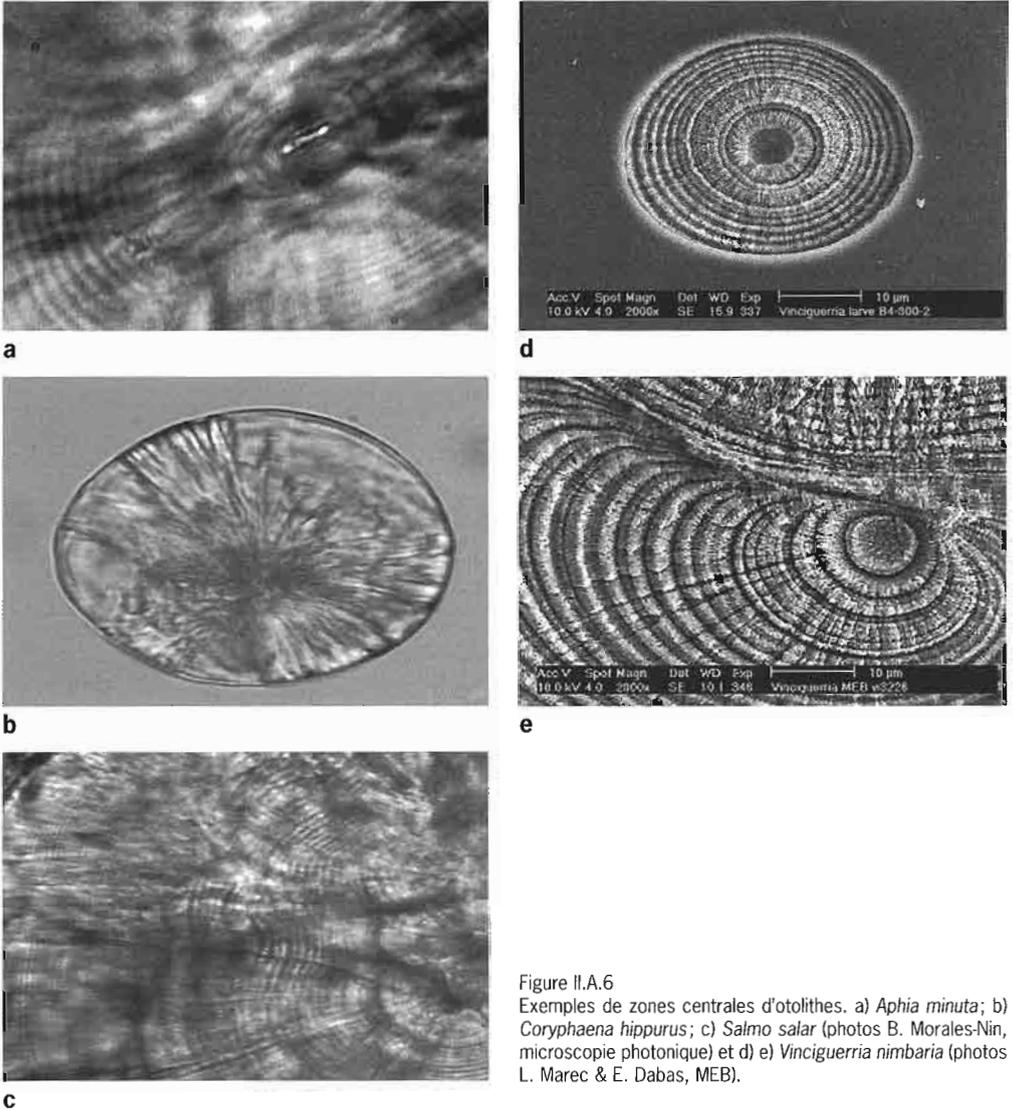


Figure II.A.6
Exemples de zones centrales d'otolithes. a) *Aphia minuta*; b) *Coryphaena hippurus*; c) *Salmo salar* (photos B. Morales-Nin, microscopie photonique) et d) e) *Vinciguerria nimbaria* (photos L. Marec & E. Dabas, MEB).

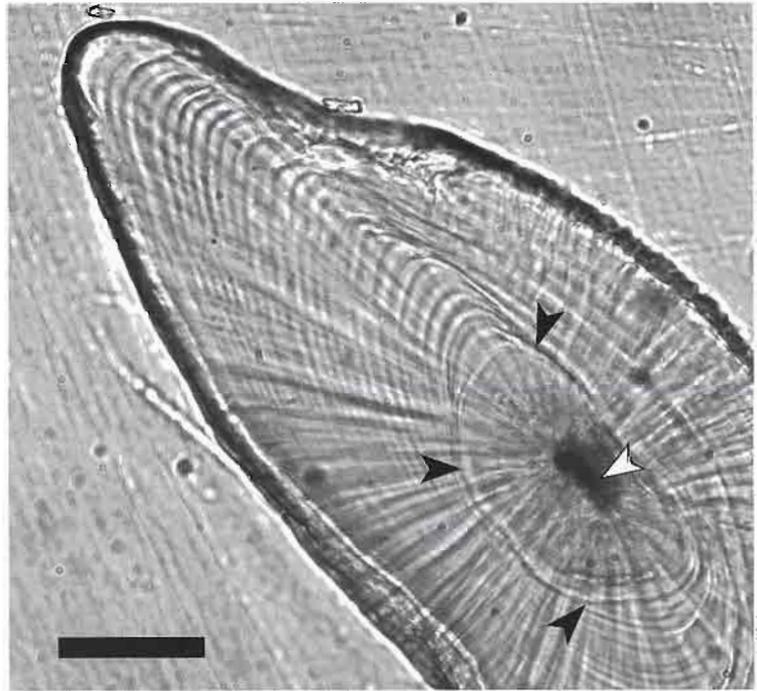
2.1.2. Premier anneau

Les otolithes se développent lors de la dernière partie du stade œuf du poisson. Quelque temps après leur formation, les otolithes grandissent continuellement et, la plupart du temps, sans marques d'accrétion caractéristiques. Le moment où le dépôt de ces marques commence à se différencier varie d'une espèce à l'autre. Ce point temporel est souvent marqué par une structure distincte, habituellement une forte discontinuité (fig. II.A.6d, e). Il y a une confusion considérable à propos de la terminologie utilisée pour nommer cette structure comme pour ce qui concerne sa réelle signification biologique et temporelle. Ce premier accroissement peut ne pas avoir la même base physiologique

chez toutes les espèces. Cependant, il y a des avantages pratiques dans une standardisation des procédés de comptage utilisant cette marque comme point de référence (Neilson & Geen, 1982).

Chez plusieurs espèces, les accroissements ont été signalés comme s'étant assurément formés avant l'éclosion (fig. II.A.7). Il n'a pas été démontré de façon définitive si ces accroissements sont de véritables structures ou simplement des artefacts optiques. L'opacité des accroissements d'avant éclosion est assez différente de celle des accroissements primaires post-éclosion (fig. II.A.7). Ces structures sont plus apparentes chez de jeunes larves à petits otolithes. L'éclosion n'est pas réellement un stade de développement chez la larve de poisson, puisqu'une même ponte peut éclore à différents stades de développement morphologique. Chez de nombreuses espèces, le premier accroissement ou la première discontinuité de l'otolithe peut se former le jour de l'éclosion et on peut alors parler de marque d'éclosion.

Figure II.A.7
Exemple de marque d'éclosion sur l'otolithe de *Megalechis thoracata*. Les flèches noires indiquent la marque d'éclosion et la flèche blanche le noyau avec ses multiples *primordia*. La discontinuité due à l'éclosion a été localisée après une expérience de validation. Quelques micro-accroissements sont aussi visibles à l'intérieur de cette discontinuité et correspondent donc à des événements précédant la naissance. Échelle = 50 µm. (photo D. Ponton).



Cependant, chez d'autres espèces, le premier accroissement peut être formé en association avec un stade de développement particulier, que l'embryon soit éclos ou non. Par exemple, chez *Solea solea*, l'accroissement qui se forme quand la bouche s'ouvre est plus proéminent qu'aucun des accroissements précédents, et cet accroissement est utilisé comme base de référence pour le comptage (Lagardère, 1989). Chez *Clupea harengus*, le premier accroissement en relief est formé bien après l'éclosion et vers la fin du stade de résorption du sac vitellin (Geffen, 1982). Dans les deux espèces, le rythme du dépôt de ces accroissements varie et dépend de la vitesse du développement. Dans les otolithes de

Siluriformes juvéniles comme *Hoplosternum littorale* et *Megalechis thorcata*, la discontinuité d'éclosion est bien différenciée (Ponton *et al.*, 2001) (fig. II.A.7). Chez ces espèces, les larves sont bien développées à l'éclosion et les otolithes exhibent quelques accroissements avant la discontinuité d'éclosion (fig. II.A.7). Chez un bon nombre d'autres espèces, la transition alimentaire (prise de nourriture exogène) est représentée par un accroissement en relief. Des exemples de premiers accroissements cités dans la littérature sont présentés dans le tableau II.A.

Tableau II.A - Références bibliographiques à propos des marques de croissance des otolithes associées à des événements du cycle de vie chez différentes espèces. Ces marques correspondent aux *sagittae*, sauf pour celles qui sont suivies d'un astérisque et qui concernent les *lapilli* (d'après Wright *et al.*, 1998).

Espèce	Terme utilisé par l'auteur	Terminologie alternative	Évènement du cycle de vie concerné (temps)	Référence
<i>Ammodytes marinus</i>	Yolk-sac absorption check		Résorption du sac vitellin	(Wright, 1993)
	Secondary growth centre	Accessory <i>primordia</i>	Métamorphose et installation	(Wright, 1993)
<i>Anguilla anguilla</i>	First ring	First check	Fin de la phase vitelline	(Lecomte-Finiger, 1992)
	Deep groove Transition ring	Transition ring	Première ingestion Fin de métamorphose	(Lecomte-Finiger, 1992) (Lecomte-Finiger, 1992)
<i>Chromis atripectoralis</i> *	Check	Settlement check	Moment d'installation	(Thorrold & Milicich, 1990)
<i>Clupea harengus</i>	First heavy ring	First check	Fin de la phase vitelline	(Geffen, 1982)
	Hatch check	First check	Fin de la phase vitelline	(Moksness, 1992)
	Hatch check	First check	Entre l'éclosion et la résorption du sac vitellin	(Hoei, 1997)
<i>Engraulis encrasicolus</i>	Check ring	First check	Fin de la phase vitelline	(Palomera <i>et al.</i> , 1988)
<i>Gadus morhua</i>	Nuclear check	First check	Éclosion	(Bolz & Lough, 1983)
	Yolk-sac check		Fin de la phase vitelline	(Bolz & Lough, 1983)
	Hatch check	First check	Éclosion	(Campana, 1989)
	Check	First check	Éclosion	(Geffen & Nash, 1995)
<i>Halichoeres tenuispinis</i>	Hatch check	First check	Éclosion	(Kishiro & Nakazono, 1991)
<i>Hoplosternum littorale</i> *	Hatch check	First check	Éclosion	(Ponton <i>et al.</i> , 2001)
<i>Melanogrammus aeglefinus</i> *	Nuclear check	First check	Éclosion	(Bolz & Lough, 1983)
	Yolk-sac check		Fin de la phase vitelline	(Bolz & Lough, 1983)
	Hatch check (two)		Éclosion	(Campana, 1989)
<i>Merluccius merluccius</i>	Accessory <i>primordia</i>	Accessory <i>primordia</i>	Métamorphose et installation	(Morales-Nin & Aldebert, 1997)
<i>Microstomus pacificus</i>	Accessory <i>primordia</i>	Accessory <i>primordia</i>	Métamorphose (migration de l'œil jusqu'à l'installation)	(Toole <i>et al.</i> , 1993)
Myctophidae (55 espèces)	Accessory <i>primordia</i>	Accessory <i>primordia</i>	Transformation larvaire	(Linkowski, 1991)
<i>Oncorhynchus keta</i>	Hatching check	First check	Éclosion	(Volk <i>et al.</i> , 1984)
	Seawater transfer ring	Transition ring	Passage à l'eau de mer	(Volk <i>et al.</i> , 1984)
<i>Oncorhynchus gorbuschae</i>	Transition zone	Transition zone	Passage à l'eau de mer	(Volk <i>et al.</i> , 1995)
	Emergence check	Emergence check	Émergence du fond	(Mortensen & Carls, 1995)
<i>Oncorhynchus nerka</i>	Hatch ring	First check	Éclosion	(Marshall & Parker, 1982)
	First feeding check		Période critique	(Marshall & Parker, 1982)

<i>Oreochromis niloticus</i>	Hatching check	First check	1 jour après l'éclosion	(Zhang & Runham, 1992a)
<i>Pleuronectes americanus</i>	Accessory growth centres	Accessory <i>primordia</i>	Durant et pendant la métamorphose	(Jearld <i>et al.</i> , 1993)
	Secondary growth centre	Accessory <i>primordia</i>	Changement d'habitat Métamorphose	(Sogard, 1991)
<i>Pleuronectes platessa</i>	Accessory <i>primordia</i>	Accessory <i>primordia</i>	Métamorphose	(Al-Hossaini <i>et al.</i> , 1989)
	Accessory <i>primordia</i>	Accessory <i>primordia</i>	Installation	(Karakiri & Westernhagen, 1989)
<i>Pollachius virens</i>	Hatch check	First check	Éclosion	(Campana, 1989)
<i>Pomacentrus coelestis</i> *	Check	Settlement check	Installation	(Thorrold & Milicich, 1990)
<i>Scophthalmus maximus</i>	First heavy ring	First check	Fin de la phase vitelline	(Geffen, 1982)
<i>Sebastes jordani</i>	Extrusion check	First check	Parturition	(Ralston <i>et al.</i> , 1996)
<i>Solea solea</i>	Hatching check	First check	Après l'éclosion	(Lagardère, 1989)
	Mouth opening check		Première prise de nourriture	(Lagardère, 1989)
	Yolk-sac exhaustion check		Jeûne larvaire	(Lagardère, 1989)
<i>Theragra chalcogramma</i>	Check	Check	Changements physiologiques	(Nishimura, 1993)
<i>Trachyrhynchus trachyrhynchus</i>	Accessory <i>primordia</i>	Accessory <i>primordia</i>	Migration	(Massuti <i>et al.</i> , 1995)
<i>Vinciguerria nimbaria</i>	Hatching check	First check	Éclosion	(Tomás & Panfili, 2000)

Comme la terminologie est issue de la littérature anglophone, les termes en anglais sont laissés dans le tableau, et une traduction est donnée ci-après : Accessory growth centres = centres de croissance accessoires ; Accessory *primordia* = *primordia* accessoires ; Deep groove = profonde dépression ; Emergence check = discontinuité d'émergence ; First check = première discontinuité ; First feeding check = discontinuité de première prise de nourriture ; First heavy ring = premier anneau marqué ; First ring = premier anneau ; Hatch check = discontinuité d'éclosion ; Mouth opening check = discontinuité d'ouverture de la bouche ; Nuclear check = discontinuité nucléaire ; Secondary growth centre = centre de croissance secondaire ; Settlement check = discontinuité d'installation ; Transition ring (zone) = anneau de transition ; Yolk-sac (absorption) check = discontinuité de résorption du sac vitellin.

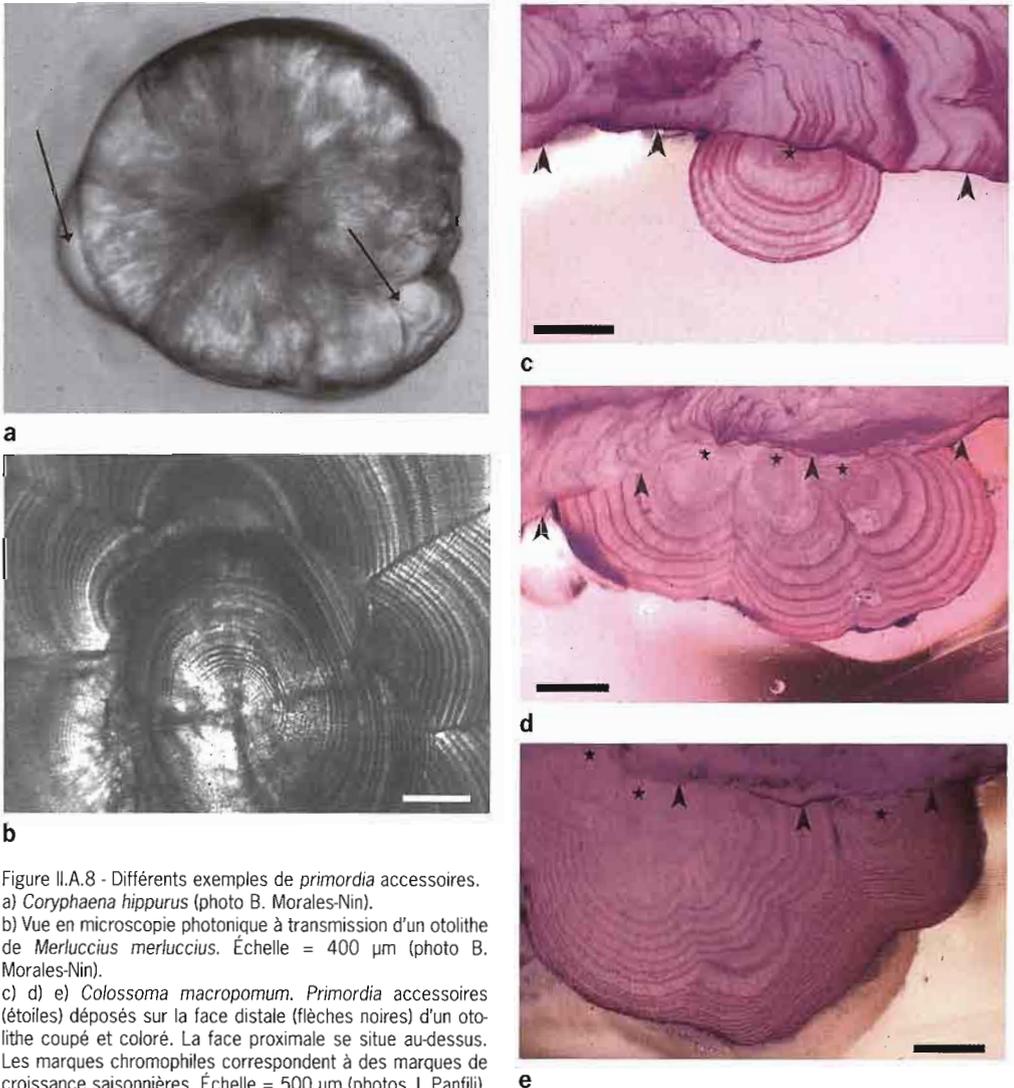
Les otolithes de Salmonidae montrent un certain nombre d'accroissements proéminents, chacun d'entre eux étant relié à un évènement différent du développement. Les premiers accroissements qui entourent l'ensemble des *primordia* coïncident avec la vascularisation du sac vitellin et la différenciation des globules rouges (érythrocytes). Il existe un accroissement proéminent qui marque l'éclosion et un autre qui marque l'émergence du substratum. Lors d'éclosions en élevage, des discontinuités correspondant à la première prise alimentaire ont aussi été observées. Pour les études écologiques, les estimations d'âge sont basées sur des comptages à partir de la marque d'émergence.

2.2. Centres de croissance accessoires

Durant la phase larvaire, la plupart des otolithes continuent de s'accroître autour du *primordium*. Cependant, pour les otolithes de nombreuses espèces, des centres d'accrétion additionnels se forment à des stades de développement plus tardifs et donnent naissance à de nouvelles séries d'accroissements. Ces nouveaux plans de croissance résultent du développement de centres de croissance accessoires. Ces der-

niers sont particulièrement communs dans le plus gros otolithe (*sagitta*) de la plupart des espèces et dans le *lapillus* des Cyprinidae ou l'*asteriscus* des Ostariophyses. Les centres de croissance accessoires sont souvent référencés comme des *primordia* accessoires. Cependant, le terme « centre de croissance accessoire » est préférable dans le but d'éviter la confusion avec les *primordia* qui contiennent les granules primordiaux multiples. La figure II.A.8a, b montre des exemples de *primordia* accessoires chez deux espèces marines.

Puisque la forme de l'otolithe influence la sensibilité aux fréquences sonores (Popper & Hoxter, 1981), la formation de centres de croissance accessoires peut être liée à une transition de la physiologie, de l'habitat ou du comportement. Ces structures sont trouvées chez de nombreuses espèces qui ont entrepris un net changement d'habitat au moment de

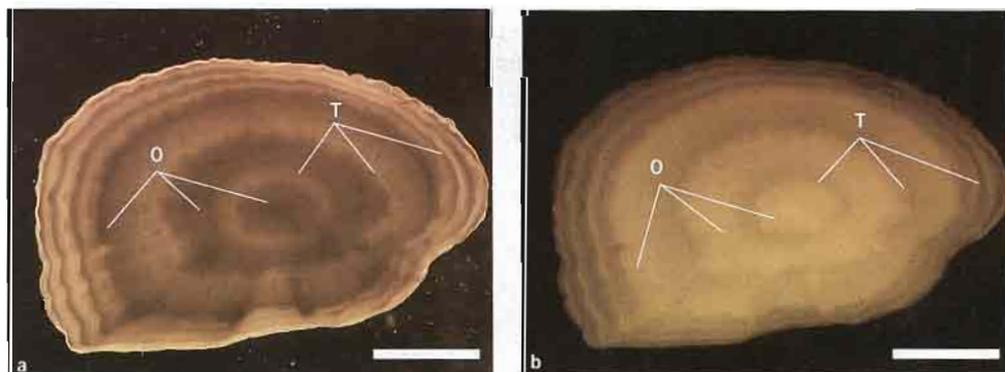


la transition du stade larvaire au stade juvénile. Des exemples de ces structures chez des poissons juvéniles sont montrés dans le tableau II.A. Des *primordia* accessoires peuvent aussi être trouvés sur les otolithes des adultes. Par exemple, ils sont très communs sur la face distale de l'*asteriscus* de *Colossoma macropomum*, où ils apparaissent comme des structures autonomes qui grandissent en même temps que l'otolithe, montrant aussi des accroissements saisonniers (fig. II.A.8c, d, e).

2.3. Accroissements saisonniers et annuels

Des accroissements saisonniers, aussi appelés zones, marques, anneaux ou *annuli* saisonniers, sont souvent distinguables sur les otolithes. Ils sont souvent visibles chez les espèces tropicales comme chez les espèces tempérées. Ces zones sont parfois distinguables sur des otolithes entiers (sans traitement préalable) et/ou après une préparation adaptée (chap. VIII). Les deux principaux types de marque saisonnière ont des opacités différentes. En lumière transmise, les zones opaques sont sombres et les zones translucides sont lumineuses et, en lumière réfléchie, les zones opaques sont lumineuses et les zones translucides sombres (fig. II.A.9). En plus de leur apparence macroscopique, les deux types de zone saisonnière diffèrent par la largeur des accroissements primaires qui les constituent, l'épaisseur et la taille des cristallites d'aragonite (Moraes-Nin, 1987a), la fréquence des discontinuités de croissance et des couches organiques (Mugiya *et al.*, 1985), le rapport carbonate de calcium-matrice protéique (Casselman, 1974, 1982, 1987; Mugiya, 1984) et les quantités d'éléments traces (Casselman, 1982, 1983; Kalish, 1989, 1991a). C'est la combinaison de tous ces facteurs qui contribue aux différences de densités optiques de ces deux types de zone. Les zones saisonnières peuvent atteindre quelques centaines de microns de largeur et sont parfois visibles à l'œil nu ou avec de faibles grossissements (10x - 40x). La différence du taux de matrice organique dans les deux zones peut être soulignée soit par une opération de brûlage qui transforme la matrice organique en une marque opaque brune, soit après coloration avec des colorants spécifiques (fig. II.A.10 et chap. VIII).

Figure II.A.9
Otolithe entier de plie commune, *Pleuronectes platessa* (47 cm LT), montrant les zones opaques (O) et translucides (T) observées sous une lumière transmise (a) et sous une lumière réfléchie sur un fond noir (b). Les zones opaques sont sombres sous une lumière transmise et lumineuses sous une lumière réfléchie, et c'est l'inverse pour les zones translucides. Échelle = 2 mm (photos J. Panfili).



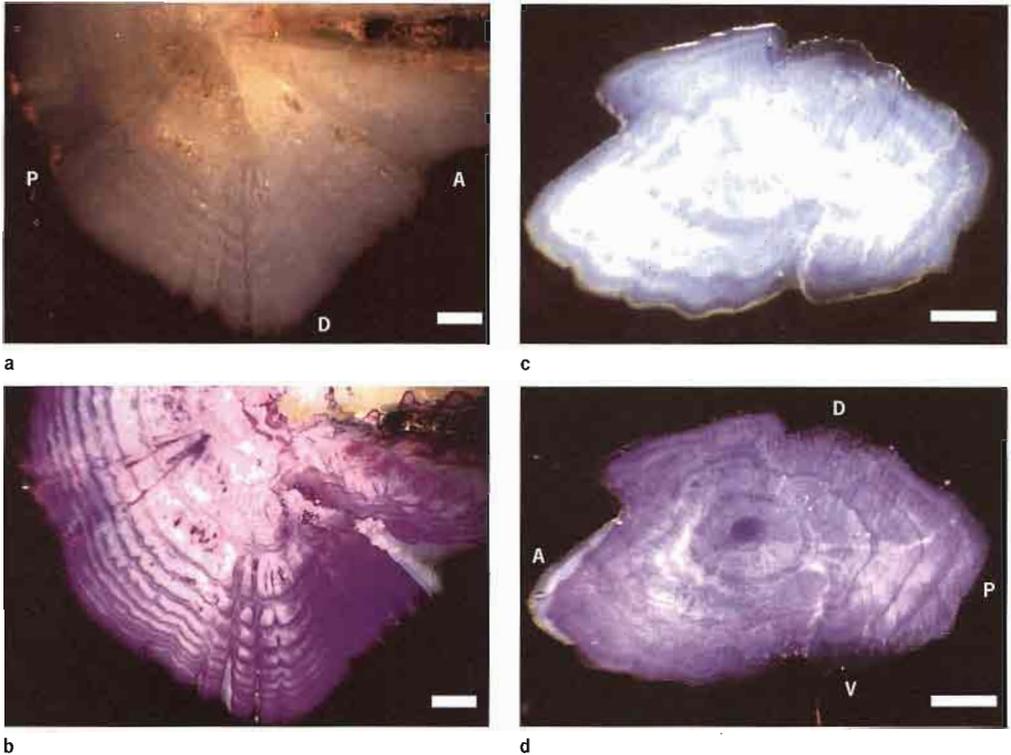


Figure II.A.10 - Amélioration de la visualisation des zones de croissance de l'otolithe après coloration. A, antérieur; D, dorsal; P, postérieur; V, ventral (photos J. Panfili).

a) Section sagittale d'un otolithe (*asteriscus*) de *Colossoma macropomum* (Serrasalmidae, 63 cm SL). Régions centrale et dorsale observées en lumière réfléchie sur un fond noir. Échelle = 1 mm.

b) Section sagittale de l'otolithe (a) de *Colossoma macropomum* après attaque acide et coloration avec du bleu de toluidine. Régions centrale et dorsale observées en lumière réfléchie sur un fond noir. Les zones de croissance sont nettement plus contrastées. Échelle = 1 mm.

c) Section sagittale d'un otolithe de *Anguilla anguilla* (Anguillidae, 55 cm TL) observée en lumière réfléchie sur fond noir. Échelle = 500 μ m.

d) Section sagittale de l'otolithe (c) de *Anguilla anguilla* observée en lumière réfléchie sur fond noir, après une attaque acide et une coloration avec du bleu de toluidine. Échelle = 500 μ m.

Des accroissements annuels, aussi appelés marques ou anneaux annuels ou *annuli*, sont souvent interprétés lorsque l'on prend en compte la succession de plusieurs accroissements saisonniers. De nombreux poissons de régions tempérées et tropicales montrent des accroissements annuels comprenant, normalement, des zones opaques et translucides. Cependant, chez quelques espèces tropicales, des accroissements bisannuels ont été signalés, probablement reliés à des changements multi-annuels des facteurs environnementaux et hydrologiques (Yosef & Casselman, 1995).

2.4. Structures liées à des cycles lunaires

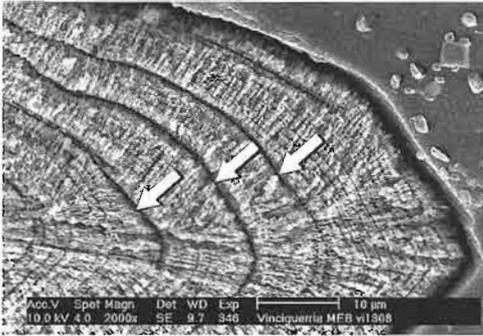
Les otolithes de poissons juvéniles et adultes présentent souvent un patron d'accroissements épais séparés par de nombreux accroissements moins proéminents. Ce patron peut se répéter régulièrement et a été supposé refléter des cycles lunaires. Les meilleurs exemples de marques

de type lunaire ont été observés sur des otolithes de poissons plats juvéniles, sur une assez large gamme d'espèces. Des patrons de structures présumés d'origine lunaire ont aussi été décrits sur des otolithes de poissons bathypélagiques, mettant en question la cause réelle de ces marques et le processus cyclique (physiologique ou comportemental) qu'ils peuvent refléter.

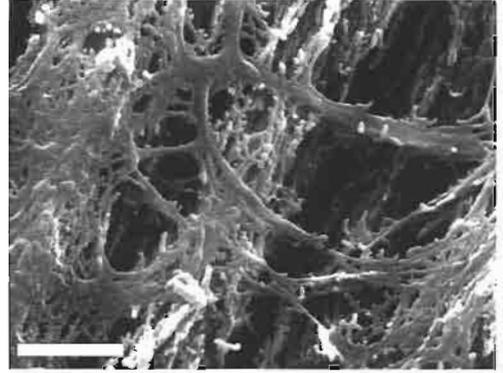
La terminologie utilisée en référence à des patrons de croissance supposés de type lunaire est variable (Pannella, 1980). Les motifs « lunaires » se réfèrent généralement à des séries ou séquences d'accroissements, chacun commençant par un accroissement proéminent, très contrasté, plus souvent appelé « discontinuité » (voir § 2.5) sans égard à la cause de sa formation. La discontinuité est suivie d'un ensemble d'accroissements à faible contraste. Les largeurs des zones-L de cette discontinuité et des accroissements suivants sont usuellement uniformes. Plusieurs auteurs ont utilisé ces patrons répétitifs pour des estimations de l'âge, sur la base de l'affirmation que chaque séquence représente un cycle lunaire de 14 jours. Peu parmi eux ont essayé de découvrir la source du signal environnemental qui imprime ce patron distinctif. Campana (1987) a décrit des organisations alternées d'accroissements à fort et faible contraste, chacune contenant approximativement soit sept soit quatorze accroissements. La formation de ces patrons correspond bien aux variations de cycles tidal et lunaire. Geffen & Nash (1995) ont montré que le patron de croissance chez la plie, *Pleuronectes platessa*, est formé de sept accroissements et que la discontinuité qui sépare les accroissements normaux coïncide avec les dates à mi-chemin entre les marées de vives-eaux et les marées de mortes-eaux. Linkowski (1996) a aussi décrit un cycle lunaire dans les accroissements primaires de quatre espèces du genre *Hygophum* dans l'Atlantique Nord.

2.5. Discontinuités structurales

Des discontinuités structurales, aussi appelées simplement « discontinuités » (“check” en anglais), interrompent l'arrangement régulier des accroissements primaires (Pannella, 1980; Campana & Neilson, 1985; Gauldie, 1987; Morales-Nin, 1987a; Gauldie & Nelson, 1988). Elles peuvent interrompre la succession des accroissements saisonniers ou journaliers d'une façon cyclique ou acyclique. Elles peuvent être distinguées avec de forts ou parfois de faibles grandissements, mais en général après une préparation préalable. Une discontinuité affecte le patron de croissance ou la direction de croissance. Elles sont bien visibles, généralement après une attaque acide superficielle, comme de profondes dépressions à la surface de l'otolithe et, au microscope, elles apparaissent comme de larges zone-D (fig. II.A.11a). La matrice organique est généralement abondante dans ces discontinuités (fig. II.A.11b) (Morales-Nin, 1986b), ce qui explique pourquoi elles sont par ailleurs souvent colorables après une attaque acide de surface par certains colorants histologiques (Pannella, 1980). Une discontinuité précédée par des accroissements de largeur décroissante peut correspondre à un anneau saisonnier (fig. II.A.11c).



a

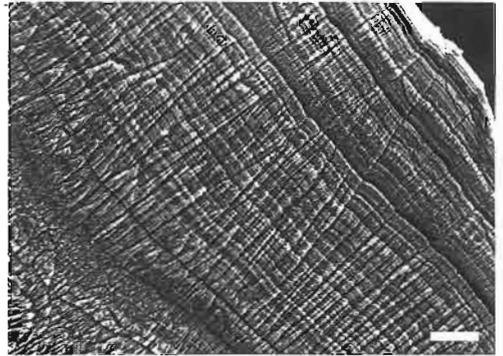


b

Figure II.A.11 - Discontinuités présentes dans les otolithes.
a) Discontinuités (flèches) dans l'arrangement régulier des micro-accroissements primaires des otolithes de *Vinciguerria nimbaria* (Photichthyidae) (photo J. Panfili).

b) Image en microscopie électronique à balayage d'un otolithe déminéralisé de *Dicentrarchus labrax* montrant la matrice organique et des groupes de fibres transversales correspondant à des discontinuités. Échelle = 1 µm (photo B. Morales-Nin).

c) Image en microscopie électronique à balayage d'un otolithe déminéralisé de *Dicentrarchus labrax* montrant une diminution de la largeur des micro-accroissements et la discontinuité structurale correspondant à une marque de croissance saisonnière. Échelle = 10 µm (photo B. Morales-Nin).



c

Les discontinuités sont rencontrées chez toutes les espèces et sont probablement induites par des troubles ou des stress affectant les individus dans leur biotope. Pannella (1980) a proposé une classification des discontinuités selon leurs structures et causes présumées, bien que sans véritable justification. Cependant, des recherches ont démontré que certaines discontinuités étaient liées à des événements ontogéniques, tels qu'un changement de vie pélagique vers une vie démersale ou le recrutement chez les espèces coralliennes. Par exemple, le patron du rythme de croissance et les discontinuités chez *Merluccius capensis*, *M. paradoxus* et *Genypterus capensis* sont liés à des comportements d'activité et différentes stratégies de vie (Morales-Nin, 1987b). Comme une discontinuité représente une interruption de la croissance d'une durée indéterminée, son interprétation peut être ambiguë et peut poser des problèmes pour l'estimation de l'âge en jours (Campana & Neilson, 1985). Quand la durée de formation d'une discontinuité est connue, par exemple lors d'un stress hivernal, de telles structures peuvent être utiles pour estimer l'âge en années.

2.6. Zones de croissance secondaires

Chez de nombreuses espèces, l'estimation des accroissements annuels est rendue difficile par la présence de zones « secondaires » apériodiques. Ce terme s'applique à un éventail de zones non saisonnières

caractérisées par différentes opacités et épaisseurs. Les deux principaux types de zones secondaires sont les faux anneaux et les anneaux dédoublés. Les faux anneaux apparaissent comme des zones translucides à l'intérieur d'une zone opaque. Ils sont particulièrement communs au cours de la première année de croissance de l'otolithe et, dans de nombreux cas, ils se confondent aisément avec le premier accroissement annuel (fig. II.A.12). Par exemple, en fonction de la période de reproduction chez *Trachurus mediterraneus*, le groupe d'âge 0 présente quatre types d'otolithe qui diffèrent par la présence, le nombre ou l'apparence des faux anneaux (Karlou Riga, 2000). Les anneaux dédoublés apparaissent comme des structures doubles, presque comme s'ils étaient composés de deux fines bandes translucides séparées par une très fine bande opaque. Chez certaines espèces, l'accroissement annuel est composé d'anneaux multiples, avec une zone étroite translucide bien définie suivie par du matériel très opaque (fig. II.A.13).

Les difficultés pour distinguer une zone secondaire d'une véritable zone saisonnière sont une des causes majeures d'erreurs dans la lecture d'âge. Il n'y a actuellement pas de critère objectif pour identifier les structures secondaires, en dépit des revues extensives sur cette question. Peu de choses sont connues sur les causes de ces structures secondaires, bien que de nombreux facteurs incluant la température, la prise de nourriture et les transitions ontogéniques aient été impliqués dans leur formation.

Des structures de croissance secondaires sont aussi présentes à l'échelle des accroissements primaires chez les espèces à traits de vie particuliers, comme les Myctophidae et les espèces voisines qui commencent leur vie dans les niveaux superficiels de la colonne d'eau et qui, plus tard, effectuent des migrations verticales journalières entre les eaux profondes le jour et les eaux superficielles la nuit. Des microstructures journalières secondaires ont été décrites chez trois espèces de Myctophidae tropicaux (Gartner, 1991) et chez *Vinciguerria nimbaria* (Tomás & Panfili, 2000). Ces accroissements secondaires apparaissent être des marques sub-journalières. Il est donc important de décrire soigneusement toutes les structures observées en utilisant la terminologie standard (voir glossaire) à cause de la possible variation des marques de croissance discutée auparavant.

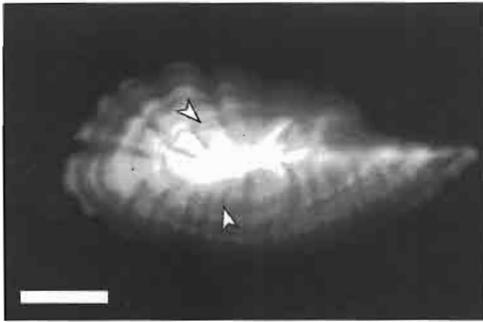
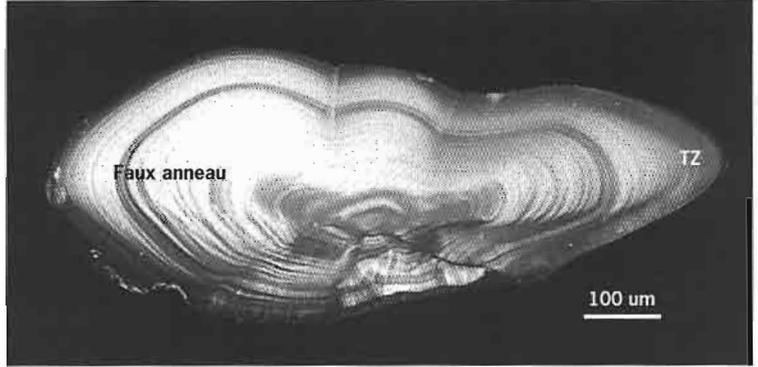
3. Régulation du dépôt des accroissements

3.1. Influences exogènes sur les accroissements périodiques primaires

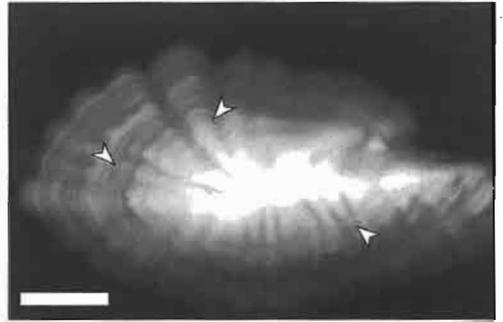
Plusieurs études ont examiné les relations entre la formation des accroissements et des facteurs environnementaux spécifiques : un certain nombre de facteurs de synchronisation possibles ont donc été proposés. Pannella (1980) a suggéré que la périodicité des accroissements pouvait être liée au nombre de pics de l'activité alimentaire. La fréquence de l'alimentation a été rapportée comme influençant la périodicité des accroissements chez quelques espèces, par exemple *Oncorhynchus tshawytscha* (Neilson & Geen, 1982) et *Pleuronectes platessa*

Figure II.A.12

Faux anneau (« false ring ») dans la sagitta d'un merlan, *Merlangius merlangus*, âgé d'une année. La zone translucide (TZ) d'un *annulus* est également montrée à titre de comparaison. Échelle = 0,1 mm (photo P.J. Wright).



a



b

Figure II.A.13

Faux anneaux. Échelle = 1 mm (photos B. Morales-Nin).

a) Sagitta de *Trachurus trachurus capensis* montrant des zones multiples (flèches) dans la région du noyau.

b) Zones multiples de croissance (flèches) dans un otolithe de *Trachurus trachurus capensis*.

(Al-Hossaini & Pitcher, 1988), mais pas chez d'autres comme *Lepomis macrochir* (Taubert & Coble, 1977), *Oncorhynchus nerka* (Marshall & Parker, 1982), *Platichthys stellatus* (Campana, 1983) et *Salmo salar* (Wright *et al.*, 1992). De plus, chez des poissons maintenus à jeun, des accroissements journaliers continuent à se former (Taubert & Coble, 1977 ; Marshall & Parker, 1982 ; Campana, 1983 ; Wright *et al.*, 1990). Tout ceci paraît assez faible pour supporter l'hypothèse de Pannella d'une relation étroite entre périodicité des accroissements journaliers et pics d'activité alimentaire.

La croissance de l'otolithe est sensible à la température chez nombre d'espèces (Brothers, 1981 ; Mosegaard *et al.*, 1988) ; Brothers a d'ailleurs suggéré que les fluctuations de température ont une influence majeure sur la formation des accroissements chez les poissons des cours d'eau tempérés. Des marquages d'otolithes induits par un choc thermique ont démontré comment une forte et soudaine variation de température (choc thermique) peut perturber la croissance de l'otolithe (Volk *et al.*, 1994). Gauldie & Nelson (1990a) ont proposé un système de régulation de l'anhydrase carbonique pour la formation de l'otolithe. Un tel système chimique aurait la température comme principal facteur externe de contrôle. Cependant, le rôle de la matrice organique dans la formation de l'otolithe n'est pas encore bien compris et ce rôle pourrait aussi être étroitement lié à des causes externes variées (chap. II.A.3.4).

Les cycles jour-nuit apparaissent nécessaires pour la formation des accroissements quotidiens chez les larves de *Lepomis macrochir* (Taubert & Coble, 1977) et de *Fundulus heteroclitus* (Radtke & Dean, 1982). Campana & Neilson (1985) ont suggéré qu'une telle dépendance des transitions jour-nuit peut être médiée par l'âge, de la même façon que les cycles jour-nuit apparaissent être essentiels pour le dépôt des accroissements journaliers chez les larves mais pas pour les stades juvéniles de *Porichthys notatus* (Campana, 1984). De nombreux poissons marins de profondeur montrent des accroissements microscopiques avec des rythmes groupés, une structure et une épaisseur similaires à celles trouvées chez des poissons d'eaux peu profondes et ceci en dépit de l'absence de lumière et de rythme alimentaire circadien (Gauldie, 1987, 1990; Lombarte & Morales-Nin, 1989; Morales-Nin *et al.*, 1996a). Chez ces espèces, de petites variations des courants de marée le long du talus continental ou des migrations verticales des proies planctonophages peuvent agir comme un synchroniseur journalier.

Dans une revue des expériences impliquant le contrôle des conditions environnementales, Campana & Neilson (1985) ont suggéré que les rythmes circadiens endogènes contrôlant l'accrétion des otolithes étaient entraînés par la photopériode, mais qu'ils pouvaient être masqués par des cycles de température infra-circadiens ou les phases d'alimentation. Si la périodicité des accroissements est contrôlée par un rythme circadien endogène, alors le dépôt des accroissements pourrait être supposé continuer en l'absence de stimulus « moteur », bien que l'absence d'un tel stimulus devrait éventuellement conduire à une divergence de la vitesse de dépôt journalier. Plusieurs études ont montré un taux de dépôt d'accroissements journaliers continu en l'absence d'un stimulus potentiel de synchronisation tel que la transition jour-nuit. Des taux journaliers constants ont été notés chez des poissons juvéniles élevés sous condition de lumière constante (Campana, 1984), dans l'obscurité (Radtke & Dean, 1982) ou en l'absence de variations cycliques de lumière, de température ou de fréquence d'alimentation (Wright *et al.*, 1991). Cependant, les expériences de manipulation des paramètres environnementaux ne fournissent pas des évidences expérimentales non ambiguës de cycles endogènes de régulation de la formation des marques, puisque les poissons peuvent avoir un rythme endogène de la prise de nourriture. De plus, aucune étude n'a démontré une divergence d'un simple accroissement par jour, comme cela aurait pu être prédit quand il n'y a pas de stimulus d'entraînement, bien que cela puisse refléter la courte durée (< 30 jours) de ces expériences.

Un fait à l'appui d'une transition jour-nuit comme signal synchroniseur provient d'expériences de traceurs radioactifs à l'échelle ultrastructurale. Tanaka *et al.* (1981) ont démontré que, chez *Tilapia nilotica*, l'ordre de formation des zones-L et -D dépendait de la photopériode car une inversion du cycle jour-nuit induit un renversement de l'ordre des deux couches. En utilisant du radio-calcium (^{45}Ca) pour étudier *in vivo* la calcification de l'otolithe chez *Carassius auratus*, Mugiya *et al.* (1981) ont

trouvé un cycle journalier apparent de la calcification qui était associé à la photopériode. Cependant, ces expériences étaient imparfaites car aucune considération n'a été envisagée sur le possible effet de l'équilibre isotopique sur l'incorporation du ^{45}Ca dans l'otolithe. Plus tard, sur des expériences *in vivo* impliquant des juvéniles de *Salmo salar* soumis à une période d'équilibre isotopique, on a démontré que la calcification de l'otolithe était synchronisée par la transition jour-nuit (Wright *et al.*, 1992). Les expériences de radio-marquage isotopique ont aussi démontré des cycles journaliers à la fois de la calcification et de la formation de la matrice organique associés avec la photopériode, à l'intérieur des saccules isolés (Mugiya, 1987).

3.2. Régulation exogène de la périodicité annuelle des accroissements

À l'heure actuelle, la régulation de la formation des accroissements annuels dans les otolithes n'est pas bien comprise, bien que l'on affirme communément que les marques saisonnières soient liées à la saisonnalité de la croissance corporelle et aux facteurs de l'environnement. Une première façon de voir consiste à admettre que les variations saisonnières dans la formation de l'otolithe sont reliées à des changements physiologiques cycliques pour le poisson tels que le démarrage de l'activité de reproduction ou de l'accélération de la croissance somatique au printemps (Johnson, 1983 ; Fowler, 1990). Une proposition alternative est que la physiologie de la formation de l'otolithe est indépendante des autres processus somatiques et reproductifs qui ont lieu chez le poisson et qu'elle est une réponse physiologique aux variations environnementales (Loubens, 1978 ; Fowler & Doherty, 1992). Des évidences pour ou contre ces hypothèses prennent généralement la forme de corrélations dans la chronologie des différents processus, mais les corrélations sont usuellement trop faibles et insuffisantes pour permettre à l'une ou l'autre des hypothèses d'être rejetée. La formation de zones en relation avec l'activité de reproduction est controversée étant donné que, chez plusieurs espèces, la zone opaque coïncide avec le moment de l'année où les poissons sont en pleine reproduction alors que, chez d'autres, la formation de zones translucides régulières a été reliée à la maturation et au frai. Cependant, la formation de zones est fréquemment observée chez les stades juvéniles de nombreuses espèces de poissons (Johnson, 1983 ; Fowler, 1990). De plus, il est difficile d'envisager comment l'activité de reproduction peut directement affecter la composition de l'otolithe puisque, bien que l'activité de reproduction des femelles induise une élévation de la concentration du calcium plasmatique, ceci prend la forme d'une liaison avec une protéine qui n'affecte pas la quantité de calcium ionique de l'endolymphe (Kalish, 1991a). À ce jour, aucune étude expérimentale n'a été tentée pour faire la distinction entre le calcium, les composants organiques plasmatiques et la formation de l'otolithe.

La saison de formation des zones opaque et translucide peut changer durant le développement et en relation avec la distribution géographique. Chez *Gadus morhua* de la mer du Nord, par exemple, la zone

opaque se forme plus tôt au sud de l'ère de répartition de cette espèce et devient progressivement plus tardive en remontant vers le nord. Dans chaque stock, les poissons les plus jeunes commencent le dépôt de la zone opaque jusqu'à 4 mois avant les individus âgés. Le frai se produit quand la zone translucide est bien en cours de formation. Le délai temporel pour la formation d'une zone opaque augmente avec l'âge (Williams & Bedford, 1974). Vianet *et al.* (1989) ont proposé d'autres exemples de différences géographiques chez quatre Pleuronectiformes européens, chez lesquels les zones translucides sont formées durant l'été en Méditerranée mais en hiver dans les eaux du nord de l'Europe. L'époque de formation des zones translucides chez *Sebastes entomelas* des côtes pacifiques nord-américaines varie avec le sexe, le secteur géographique et l'année (Pearson, 1996). Chez cette espèce, un lien entre la température et la formation de la zone translucide est apparent bien que d'autres facteurs liés à la température, comme la disponibilité de la nourriture ou le contenu nutritif des proies, puissent aussi être importants. D'autres évidences d'une liaison de la formation des zones avec la température ont été trouvées chez plusieurs espèces d'Acanthuridae de l'Australie orientale (Choat & Axe, 1996). La recapture de poissons préalablement marqués à la tétracycline a montré que la formation des zones opaques correspond à l'élévation de la température en été.

3.3. Influences sur le taux d'accrétion

La température peut augmenter l'accrétion de l'otolithe au-delà du moment auquel la croissance somatique est freinée (Mosegaard *et al.*, 1988), bien que les fortes températures puissent aussi avoir un effet négatif sur la largeur des accroissements (Gutiérrez & Morales-Nin, 1986; May & Jenkins, 1992; Ralston & Howard, 1995). Des expériences ont montré que les otolithes continuent leur accrétion même quand la croissance somatique s'est arrêtée naturellement (Wright, 1990; Mugiya & Tanaka, 1992) ou qu'elle a été artificiellement réduite (Mosegaard *et al.*, 1988). Cette continuité conduit à des individus à croissance lente avec des otolithes relativement larges. Pour expliquer ce phénomène, Secor & Dean (1989) ont suggéré que l'accrétion de l'otolithe peut être déterminée par l'interaction de deux composantes : la périodicité journalière de la formation des accroissements, qui continue même pendant les périodes sans croissance somatique, et une composante amplitudinale qui varie avec la croissance somatique. Cependant, un certain nombre d'études expérimentales ont montré que l'augmentation du taux d'accrétion de l'otolithe avec la température est plus proche de la tendance à l'augmentation de l'activité métabolique que de l'optimum de la courbe de la vitesse de croissance somatique (Mosegaard *et al.*, 1987, 1988; Hoff & Fuiman, 1993). De plus, les études de Wright (1991a) et Yamamoto *et al.* (1998) ont montré que des différences individuelles de la largeur des accroissements étaient plutôt corrélées avec le métabolisme de repos qu'avec la croissance somatique. Mosegaard *et al.* (1988) ont suggéré

une relation d'isométrie entre le taux métabolique au repos et la croissance de l'otolithe, basée sur les relations entre les changements de poids d'otolithes de groupes de poissons et la température à laquelle ils ont été élevés, et extrapolée d'une relation générale entre la température et ce taux métabolique au repos. Cependant, des mesures récentes des changements individuels de consommation en oxygène et de la taille des accroissements indiquent que l'accrétion de l'otolithe répond de façon plus conservatrice à des changements de température qu'à un taux métabolique de repos (Wright *et al.*, 2001). Le potentiel d'action dynamique spécifique et la réponse métabolique associée avec la prise de nourriture paraissent aussi avoir une influence sur le taux d'accrétion de l'otolithe (Fallon-Cousins, 1999). Le processus qui gouverne le taux d'accrétion apparaît alors lié aux composantes de l'activité métabolique. Étant donnée l'influence de ces composantes dans la vitesse d'accrétion de l'otolithe, les périodes de jeûne sont seulement supposées conduire à un déclin graduel de la largeur des accroissements. Une évidence pour une telle réponse a été trouvée dans un bon nombre de travaux expérimentaux (Neilson & Geen, 1985 ; Eckmann & Rey, 1987 ; Molony & Choat, 1990 ; Umezawa & Tsukamoto, 1991 ; Bradford & Geen, 1992 ; Zhang & Runham, 1992a ; Molony, 1996).

3.4. Régulation physiologique de la formation de l'otolithe dans le saccule

Wilbur (1980) a suggéré que les systèmes de biominéralisation ont trois propriétés communes :

- tous les systèmes impliquent un transport d'ions et produisent des concentrations d'ions sursaturées (c'est-à-dire qui excèdent le taux normal de solubilité) au niveau de la surface de minéralisation. Ceci déclenche la formation d'un noyau de cristallisation et la croissance des cristaux ;
- un pH alcalin suffisant doit être maintenu de façon à ce que, une fois enclenchée, la cristallisation puisse se poursuivre ;
- la formation du cristal est souvent intimement associée au matériel organique.

L'observation selon laquelle les accroissements des otolithes sont composés de zones riches en minéral et d'autres déficientes en minéral (respectivement zones-L et zones-D) suggère qu'une ou plusieurs des propriétés ci-dessus doivent varier. Le dépôt périodique de zones riches en minéral peut par conséquent (i) être lié à une limitation physico-chimique diurne de la cristallisation (impliquant soit une diminution de la concentration des ions calcium et carbonate à la surface de l'otolithe, soit un déclin du pH de l'endolymphe), ou (ii) impliquer la matrice organique. Une analogie avec la minéralisation de la coquille des mollusques suggère que soit la matrice organique insoluble déposée dans la couche déficiente en minéral (zone D) agit comme une barrière à la cristallisation, soit des composés inhibiteurs de la croissance des cristaux dans la matrice organique soluble sont sécrétés dans la couche

déficiente en minéral (Wheeler *et al.*, 1981 ; Wilbur & Saleuddin, 1983). Ces formes possibles de régulation ont été considérées pour les otolithes durant les trois décades passées.

L'otolithe est précipité à partir du liquide du sac endolymphatique de l'oreille interne. Le carbonate de calcium de l'otolithe est sous la forme de cristaux jumelés d'aragonite, bien que des otolithes cristallisés anormaux soient composés de calcite (Morales-Nin, 1985) ou de vaterite (Gauldie, 1986). Le calcium atteint primitivement l'endolymphe à partir du plasma sanguin (Kalish, 1989, 1990, 1991a ; Wright *et al.*, 1992). La calcification de l'otolithe est limitée dans sa vitesse par le nombre de sites de nucléation produits par la matrice insoluble (Crenshaw, 1982 ; Mann *et al.*, 1983) aussi bien que par les conditions physico-chimiques à la surface de l'otolithe. Le taux de production de matrice insoluble sera alors le déterminant ultime de la vitesse de calcification de l'otolithe (Saitoh & Yamada, 1989 ; Wright, 1990). Cette matrice est aussi un facteur significatif contrôlant la forme de l'otolithe (Degens *et al.*, 1969 ; Dunkelberger *et al.*, 1980 ; Mugiya, 1987 ; Gauldie, 1991, 1993 ; Zhang & Runham, 1992b ; Payan *et al.*, 1999). Comme dans la coquille des mollusques, les otolithes possèdent une matrice protéinacée soluble qui est capable de réguler le taux de dépôt du minéral (Wright *et al.*, 1991). Des variations dans le taux de production de cette protéine peuvent alors réguler le taux de minéralisation. La matrice de l'otolithe la moins soluble est composée d'une protéine de type collagénique (Degens *et al.*, 1969). La matrice est plus dense lors de la phase de développement précoce et sa composition en acides aminés change avec l'âge (Morales-Nin, 1986a,b).

Des investigations sur des saccules isolés ont indiqué qu'un transport actif et régulé d'ions existe à travers l'épithélium (fig. II.A.14a). La concentration en calcium ionique de l'endolymphe est influencée par un transport actif intracellulaire qui est sensible à la concentration de calcium plasmatique. De même, la sécrétion de protons dans le saccule est dirigée par un mécanisme énergie-dépendant (Na-ATPase) qui est sensible au pH plasmatique (Payan *et al.*, 1999). Des changements de la concentration ionique du plasma pourraient alors être supposés avoir un effet direct sur celle de l'endolymphe. Cependant, le mécanisme précis par lequel le calcium et le pH plasmatiques induisent des changements des conditions physico-chimiques à la surface de l'otolithe n'est pas clair. En effet, les kinocils sensoriels baignés par l'endolymphe sont sensibles aux changements de concentration des ions Ca^{2+} bien en dessous des concentrations de solubilité nécessaires pour la calcification (Mugiya, 1987 ; Wright *et al.*, 1992). La variation saisonnière des ions Ca^{2+} libres dans l'endolymphe de la truite arc-en-ciel est comprise entre 65,4 % du niveau total de calcium pendant la croissance rapide et 79,1 % durant la croissance lente (Mugiya, 1966), ce qui représente probablement la limite au-dessus de laquelle le Ca^{2+} peut varier sans causer de dysfonctionnement physiologique des mécanismes nerveux de la *macula* (Gauldie, 1990). Il est donc nécessaire d'expliquer comment les niveaux

d'ions sont augmentés à la surface de l'otolithe, au-dessus des concentrations de base trouvées dans l'endolymphe. Des gradients proximo-distaux de la concentration d'ions ont été détectés dans l'endolymphe, une condition qui devrait favoriser les processus de biominéralisation (fig. II.A.14b) (Payan *et al.*, 1999). Les sphérules calcaires ont été observées en étroite association avec la surface de l'otolithe chez un certain nombre d'espèces et celles-ci peuvent être impliquées dans l'élévation de la concentration ionique à la surface de l'otolithe (Dale, 1976; Wright, 1990). Ces sphérules sont formées et sécrétées par la membrane otolithique, puis transportées à la surface de l'otolithe au travers du réseau fibrillaire sub-cupulaire (Dale, 1976; Wright, 1990). Une rythmicité diurne de la calcification de l'otolithe peut être contrôlée par une variation journalière de la chimie du plasma, comme cela a été suggéré par Mugiya (1984) et Wright *et al.* (1992) qui ont trouvé un

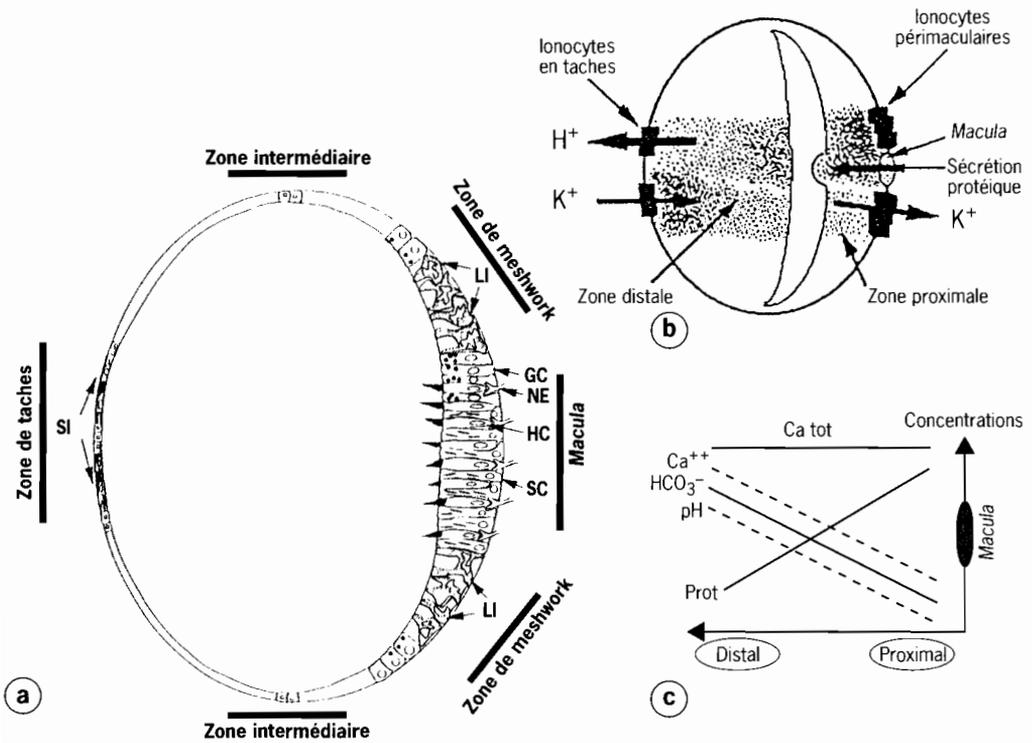


Figure II.A.14 - Représentation schématique de l'épithélium sacculaire (coupe transversale du sacculus) de l'oreille interne d'un poisson Téléostéen et modèle hypothétique du transport des éléments à travers l'épithélium (modifié d'après Pisam *et al.*, 1998; Payan *et al.*, 1999).

a) Cartographie de la distribution des cellules dans l'épithélium sacculaire. La *macula* est constituée de cellules ciliées (HC), qui sont en contact avec les terminaisons nerveuses (NE), de cellules de soutien (SC) et, à sa périphérie, de cellules granuleuses (GC). Elle est entourée par une zone de « meshwork » contenant de larges ionocytes (LI). La zone de taches contient de petits ionocytes (SI).

b) Modèle hypothétique pour le transport des éléments à travers l'épithélium sacculaire. Noter le mouvement d'ensemble des ions H^+ qui conduit globalement à leur excrétion.

c) Représentation schématique des concentrations chimiques dans les régions proximale et distale. L'axe des Y montre des concentrations tandis que l'axe des X représente l'axe proximo-distal de l'otolithe. Les protéines (Prot), le calcium total (Ca tot) et la concentration en HCO_3^- ont été directement mesurés tandis que la concentration en ions Ca^{2+} et le pH ont été estimés.

déclin journalier parallèle de la calcification de l'otolithe et de la concentration plasmatique en calcium libre et total. Mugiya (1984) a aussi observé une réversion saisonnière du rythme de calcification de l'otolithe associée à une réversion du cycle du calcium plasmatique diurne. Cependant, des cycles similaires de la composition du plasma et de l'endolymphe chez *Pleuronectes platessa* (Edeyer *et al.*, 2000) ne sont pas associés avec des changements des gradients ioniques dans l'endolymphe (Payan *et al.*, 1999). Néanmoins, Wright *et al.* (1992) ont trouvé qu'une chute induite du calcium plasmatique conduit à une perte nette de calcium de l'accroissement en cours de minéralisation, ce qui indique que la concentration de calcium ionique à la surface de l'otolithe est sensible à la concentration calcique du plasma.

Alors qu'il peut exister une limitation ionique périodique de la calcification de l'otolithe, celle-ci ne peut cependant expliquer seule l'observation d'une variation journalière de la sécrétion de matrice (Mugiya, 1987; Wright *et al.*, 1990) ou de la formation de couches riches en matrice (Watabe *et al.*, 1982; Morales-Nin, 1987a; Mugiya, 1987). La distribution de la matrice et du minéral dans l'otolithe semble se produire en deux phases. La première est associée avec le double plan du cristal d'aragonite de base (Gauldie & Xhie, 1995). Ce jumelage cristallin est un processus complexe (Bloss, 1971) qui stabilise le polymorphisme du cristal et augmente sa vitesse de croissance (Smith, 1974; Davey *et al.*, 1993). La seconde phase de l'association matrice-minéral apparaît sous la forme d'une bande dense de fibres qui correspondent, en taille et pour leur orientation, aux zones-D des accroissements primaires (Dunkelberger *et al.*, 1980; Morales-Nin, 1987a). Cette observation est cohérente avec la variation journalière de la protéine insoluble de la matrice révélée par des expériences de marquage par radio-éléments (Mugiya, 1987). Les deux phases de la matrice protéique peuvent jouer différents rôles, le premier étant de produire un gabarit pour la croissance des cristaux et le second étant de stabiliser le cristal d'aragonite thermodynamiquement instable (Mann *et al.*, 1983; Gauldie & Xhie, 1995) et, par ailleurs, soluble (Wright *et al.*, 1992). Il est cependant nécessaire de considérer la régulation à la fois des concentrations en ions et de la production de matrice dans le dépôt périodique des zones-L et des zones-D. Étant donnée la corrélation entre la calcification de l'otolithe et la concentration ionique du plasma, la concentration de certains ions dans le plasma peut avoir un effet direct sur les sécrétions cellulaires de matrice ou peut co-varier avec d'autres facteurs distincts. De plus, l'activité neurosécrétoire de calcification dans la *macula* a un cycle journalier qui est lié au dépôt des accroissements journaliers (Gauldie & Nelson, 1990b; Edeyer *et al.*, 2000). Des études récentes ont permis d'identifier la fonction des différentes régions de l'épithélium sacculaire et l'importance de ces régions pour la croissance de l'otolithe (Payan *et al.*, 1997, 1999; Pisam *et al.*, 1998) (fig. II.A.14). Les cellules sécrétrices sont principalement localisées dans la région macu-

laire. Dans l'endolymphe, les protéines sont plus concentrées dans la région proximale alors que le CO_2 total est plus élevé dans la région distale (fig. II.A.14c).

En résumé, l'évidence indique actuellement que la formation d'une zone-L riche en carbonate de calcium est influencée par un transport actif intracellulaire d'ions calcium (Mugiya, 1986) et de protons à travers le saccule (Payan *et al.*, 1997, 1999) qui, en retour, est sensible à la concentration de calcium plasmatique et au pH (Wright *et al.*, 1992; Payan *et al.*, 1997). La sécrétion de la matrice protéinée varie quotidiennement, avec un pic pendant la formation de la zone-D (Mugiya, 1987; Edeyer *et al.*, 2000). La production du substratum de la matrice protéique et de la protéine soluble inhibitrice doit aussi avoir un rôle dans la limitation du taux d'accrétion du minéral durant la formation de la zone-L.

3.5. Régulation hormonale de la formation de l'otolithe

Les mécanismes qui déterminent la minéralisation périodique sont probablement sous contrôle endocrine (Campana & Neilson, 1985; Mugiya, 1987), soit directement, soit indirectement via des influences métaboliques (Geffen, 1983; Mosegaard *et al.*, 1988). L'hormone de croissance (STH) peut aussi être impliquée, puisqu'une hypophysectomie produit une réduction de la croissance de l'otolithe (Mugiya, 1990) et sa déminéralisation (Simkiss, 1974), et que la minéralisation de l'otolithe chez les poissons hypophysectomisés peut être restaurée par l'injection d'extraits hypophysaires (Simkiss, 1974). Une telle régulation hormonale peut influencer à la fois le transport ionique et la production de matrice dans le saccule. Wright *et al.* (1992) ont suggéré que, comme la concentration de calcium plasmatique est régulée par des hormones hyper- et hypo-calcémiantes, des changements journaliers des concentrations plasmatiques de ces hormones peuvent être indirectement responsables du déclin périodique de la calcification de l'otolithe. De plus, la cristallisation du carbonate chez les mollusques implique un contrôle nerveux (Zylstra *et al.*, 1978). Un contrôle nerveux de la concentration de calcium dans le saccule fournit une explication physiologique pour un suivi direct par l'endolymphe, saisonnier et circadien, du niveau de calcium total dans le plasma sanguin (Mugiya & Yoshida, 1995).

L'adaptation à des cycles jour-nuit suggère l'implication d'un complexe pinéal-hypophysaire. La sécrétion endocrine procure une périodicité circadienne chez de nombreux animaux et, au travers de l'activité métabolique, contrôle finalement la plupart des processus physiologiques (Simpson, 1978). Des études endocrinologiques ont démontré des variations diurnes du taux plasmatique de plusieurs hormones chez les Téléostéens (Matty, 1985). Ces dernières incluent la thyroxine (T4) (Eales *et al.*, 1981), une hormone connue pour influencer la croissance squelettique et la calcification chez la truite arc-en-ciel (La Roche *et al.*, 1966).

B. Écailles

F. J. Meunier

1. Description, diversité et fonction

Les écailles des poissons présentent un haut degré de polymorphisme (Goodrich, 1907 ; Van Oosten, 1957 ; Bertin, 1958 ; Whitear, 1986). Se formant dans la partie superficielle du derme (fig. II.B.1a), ce sont des éléments minéralisés qui appartiennent au squelette superficiel. Ce livre étant essentiellement consacré aux Téléostéens, nous aborderons essentiellement les écailles de ce taxon. Les écailles des Téléostéens sont de type élasmoïde comme celles des Amiidae, des Coelacanthidae et des Dipneustes (Goodrich, 1907 ; Kerr, 1952, 1955 ; Castanet *et al.*, 1975 ; Meunier, 1980, 1984a ; Meunier & Zylberberg, 1998). Quelques autres taxons d'Ostéichthyens primitifs, tels les lépisostées et les polyptères, ont des écailles ganoïdes dont la structure diffère de celle des écailles élasmoïdes (Goodrich, 1907 ; Kerr, 1952 ; Francillon-Vieillot *et al.*, 1990 ; Zylberberg *et al.*, 1992). Ce sont des écailles juxtaposées et épaisses dont la surface est couverte d'une substance stratifiée hyperminéralisée, la ganoïne, d'origine épidermique (Meunier *et al.*, 1987 ; Sire *et al.*, 1987), très proche de l'émail. La plaque basale osseuse de ces écailles ganoïdes montre des marques de croissance, probablement annuelles, mais elles n'ont jamais été utilisées pour des études squelettochronologiques sauf, dans un travail de paléo-ichtyologie (Thomson & McCune, 1984). Les écailles élasmoïdes sont classiquement reconnues d'origine dermique (Zylberberg *et al.*, 1992) tandis que les écailles ganoïdes ont une origine épidermo-dermique (Sire *et al.*, 1987).

Deux formes d'écailles élasmoïdes ont été décrites (fig. II.B.2) : cténoïdes et cycloïdes selon qu'elles possèdent ou non de petites épines sur leur marge postérieure (Goodrich, 1907 ; Bertin, 1958). La structure générale de ces écailles, qu'elles soient cycloïdes ou cténoïdes, est la même. Les épines des écailles cténoïdes montrent des morphologies variées (Roberts, 1993) mais ceci n'a pas de conséquences pour les marques de croissance cycliques. Quel que soit le type d'écaille élasmoïde (cycloïde ou cténoïde), la couche superficielle chez la plupart des espèces présente des crêtes concentriques ou *circuli* qui sont fréquemment traversées par des gouttières radiaires, les *radii*.

Une écaille élasmoïde peut être divisée en deux régions principales (fig. II.B.1b) : une région antérieure (ou champ recouvert) et une région postérieure (ou champ recouvrant). Elle est profondément enchâssée dans le derme et enfermée dans un sac ou « sac de l'écaille » (Sire, 1988). Le sac de l'écaille, qui est associé uniquement aux écailles élasmoïdes, est un espace dermique qui abrite l'écaille. Il est clairement délimité du *stratum compactum* sous-jacent par un feuillet de deux strates de fibroblastes (Whitear *et al.*, 1980). Les écailles élasmoïdes

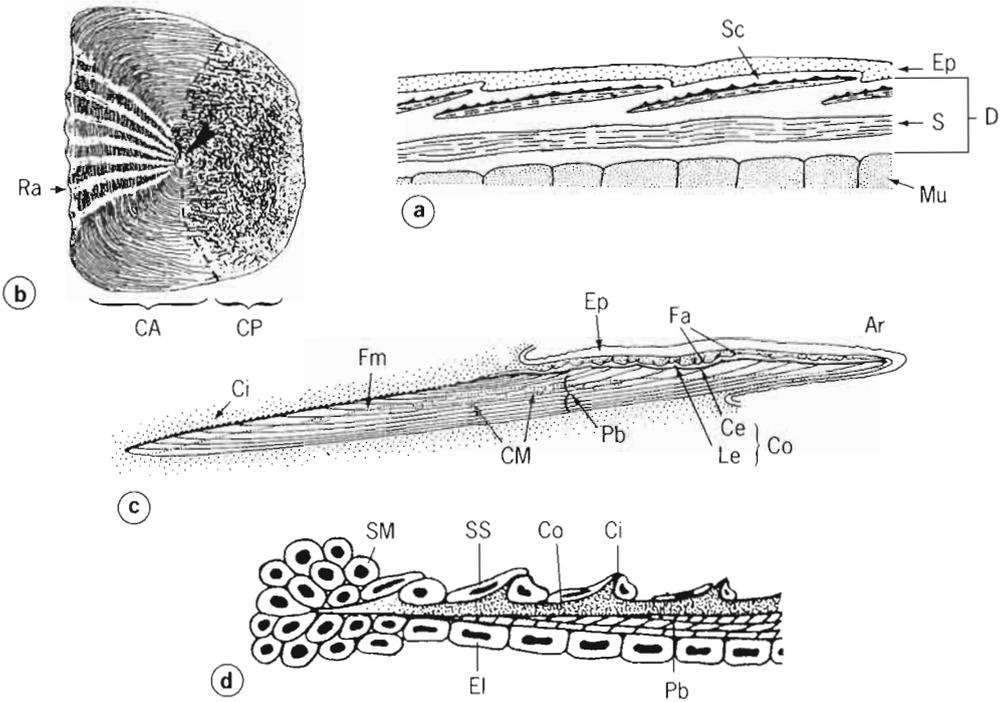


Figure II.B.1 - Écailles. a) Coupe antéro-postérieure du tégument d'un poisson Téléostéen montrant les écailles imbriquées obliquement dans le derme. Ep = épiderme; D = derme; Mu = muscles; S = *stratum compactum*; Sc = Écaille. b) Vue superficielle d'une écaille élasmoïde typique (Cichlidae). CA = champ antérieur; CP = champ postérieur; Ra = *radius*. c) Coupe longitudinale d'une écaille élasmoïde (d'après Sire, 1985). Ar = arrière; Ce = couche externe; Ci = *circulus*; Co = couche osseuse; CM = corpuscules de Mandl; Ep = épiderme; Fa = fibres d'attache; Fm = front de minéralisation; Le = limitante externe; Pb = plaque basale. d) Coupe transversale dans le bord d'une écaille élasmoïde montrant les scléroblastes de l'épisquame (au-dessus), de l'hyposquame (en dessous) et de la marge (à gauche); Ci = *circulus*; Co = couche osseuse; EI = élasmoblaste; Pb = plaque basale; SM = scléroblaste marginal; SS = scléroblaste superficiel (photos F.J. Meunier).

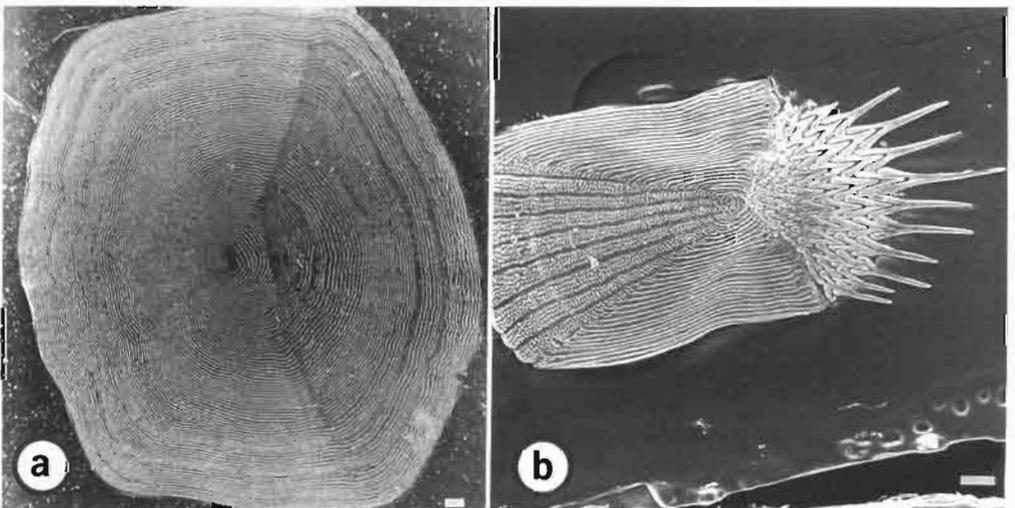


Figure II.B.2 - Face superficielle d'écailles élasmoïdes (MEB). a) Écaille cycloïde de *Coregonus lavaretus* (Salmonidae, Salmoniformes). Échelle = 500 µm. b) Écaille cténoïde de *Microchirus azevia* (Soleidae, Pleuronectiformes). (la région antérieure de l'écaille est à gauche). Échelle = 250 µm (photos F.J. Meunier).

sont de fines plaques lamelleuses imbriquées (Bertin, 1944) qui sont constituées de deux couches principales (Bertin, 1958; Zylberberg *et al.*, 1992) (fig. II.B.1c) : une fine couche superficielle, la « couche externe » qui recouvre une épaisse plaque basale lamellaire, partiellement minéralisée, constituée d'une structure caractéristique en contre-plaqué appelée isopédine et qui est interprétée comme un tissu osseux dérivé (Meunier, 1987-1988). Dans la région postérieure de l'écaille qui est recouverte par l'épiderme, une couche limitante borde la couche externe (Schönbörner *et al.*, 1979). Dans certains cas, des fibrilles de collagène s'insèrent dans la couche externe du champ postérieur, traversent la limitante externe et fixent l'écaille à la membrane basale de l'épiderme (fig. II.B.1c); elles sont appelées fibres d'ancrage et elles sont considérées comme un moyen de renforcer la cohésion entre l'écaille et l'épiderme sous-jacent pendant la nage (Zylberberg & Meunier, 1981; Sire, 1985). Selon les espèces, l'organisation spatiale des fibres de collagène de la plaque basale répond à deux modèles principaux : soit un contre-plaqué double torsadé (fig. II.B.3a), usuellement dans les taxons des Téléostéens inférieurs, soit un contre-plaqué orthogonal (fig. II.B.3b) qui caractérise plutôt les groupes dérivés (Meunier & Castanet, 1982; Meunier, 1987-1988). Généralement, le diamètre de ces fibres, qui sont parallèles entre elles dans une strate donnée, est plus grand (50 nm à 150 nm) que celui des fibrilles de collagène de l'os (20-40 nm) (Meunier, 1987-1988). Un autre type de fibres de collagène, les fibres TC qui sont orthogonales aux strates de la plaque basale, a été décrit chez plusieurs taxons, spécialement chez des Cyprinidae et des Characiformes (Zylberberg & Nicolas, 1982; Zylberberg & Meunier, 1996; Meunier, 1997).

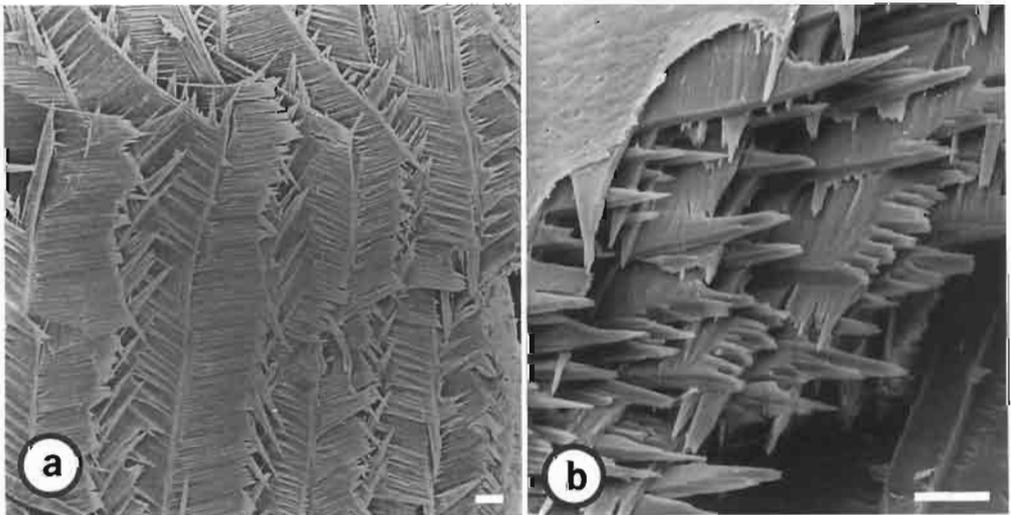


Figure II.B.3 - Écailles fracturées dans l'azote liquide (MEB); (a) *Leporinus friderici* (Anostomidae, Characiformes). Échelle = 100 μ m. (b) *Macrourus berglax* (Macrouridae, Gadiformes). Échelle = 25 μ m (photos F.J. Meunier).

Dans les écailles élasmoïdes, la couche externe et la limitante externe sont normalement minéralisées alors que la minéralisation de la plaque basale est incomplète (Meunier, 1984a,b; Zylberberg *et al.*, 1992). À l'emplacement des *radii*, la couche superficielle est dépourvue de minéral (Sire & Meunier, 1981; Meunier, 1984b; Zylberberg *et al.*, 1992). L'organisation spécifique de la composante collagénique de la plaque basale (structure en contre-plaqué) induit un mode de minéralisation original : les corpuscules de Mandl (Baudelot, 1873; Schönbornner *et al.*, 1981; Zylberberg *et al.*, 1992). Le diamètre des fibres, qui est significativement plus grand que celui des fibrilles collagéniques de

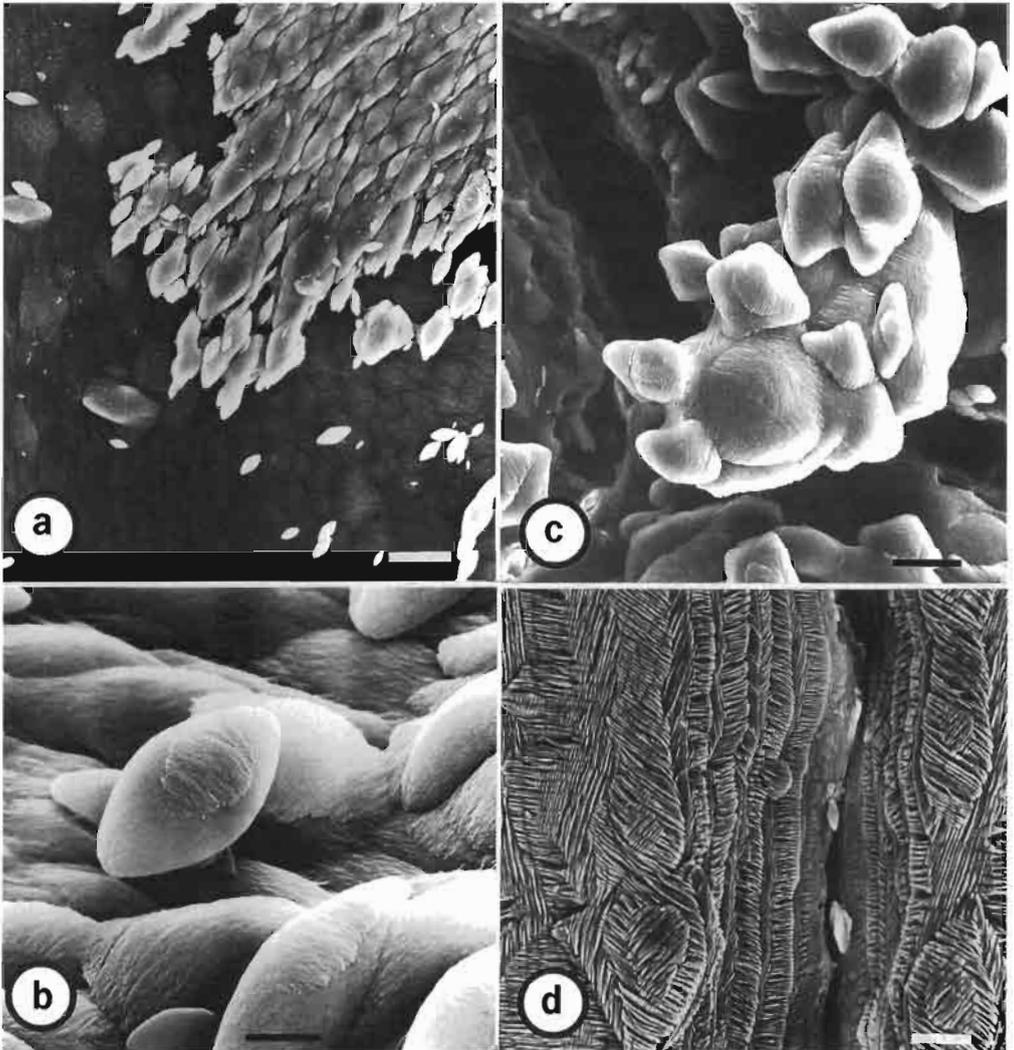


Figure II.B.4 - Front de minéralisation de la plaque basale (MEB). a) Écaille d'*Esox lucius* ; la surface du front de minéralisation est lisse. Échelle = 50 μm . b) Détail des corpuscules de Mandl dans une écaille d'*Astronotus ocellatus*. Échelle identique à c. c) Corpuscules de Mandl fusionnés dans une écaille d'*Ophicephalus striatus*. Échelle = 50 μm . (d) Détail du front de minéralisation de la plaque basale d'une écaille d'*Hoplias aimara*. Le front de minéralisation a un aspect rugueux par suite de la présence de fibres TC. Échelle identique à c (photos F.J. Meunier).

l'os, semble à l'origine du processus des corpuscules de Mandl qui présentent des formes géométriques caractéristiques (fig. II.B.4b,c). Ils se développent en avant du front de minéralisation, se soudent entre eux (fig. II.B.4c) avant de se fusionner au front de minéralisation qui apparaît normalement lisse après destruction de la matrice organique non calcifiée (fig. II.B.4a) (Sire & Meunier, 1981 ; Zylberberg *et al.*, 1992). Quand elles sont présentes, les fibres TC interviennent également dans le processus de minéralisation de la plaque basale (Zylberberg & Nicolas, 1982 ; Zylberberg *et al.*, 1992, *inter alia*) ; dans ce cas, la surface du front de minéralisation apparaît nettement irrégulière avec une alternance de crêtes et de fissures longitudinales si on enlève la matrice organique non calcifiée (fig. II.B.4d) (voir aussi Meunier, 1997).

Étant minéralisées, les écailles constituent un important réservoir de minéraux, spécialement de calcium (Simkiss, 1974 ; Takagi *et al.*, 1989), qui peut être fortement sollicité sous certaines conditions physiologiques (Mugiya & Watabe, 1977 ; Persson, 1997, *inter alia*) comme, par exemple, chez les truites mais aussi les saumons adultes lors de leur maturation génitale (Persson *et al.*, 1998 ; Kacem & Meunier, 2000).

Parmi les différentes fonctions des écailles, nous citerons également leur rôle protecteur et leur rôle hydrodynamique (voir Burdak, 1979). Une importante particularité des écailles élasmoïdes est leur aptitude à se régénérer. Les poissons Téléostéens perdent, au cours de leur vie, une certaine proportion de leurs écailles (McCart, 1967 ; Fouda, 1979 ; Shackleton, 1988). Quand une écaille est perdue, en général, le sac de l'écaille n'est pas endommagé et il se maintient sous forme d'un espace vide dans lequel une nouvelle écaille se régénère rapidement (Sire, 1988 ; Bereiter-Hahn & Zylberberg, 1993). L'écaille régénérée ressemble à l'écaille initiale sauf ses ornements de surface qui sont nettement différentes et la disparition des marques de croissance (Neave, 1940 ; Sire, 1987) ; ainsi, elles sont inutilisables pour faire une estimation de l'âge. Le nombre d'écailles régénérées augmente avec l'âge, ce qui peut rendre le décompte des marques de croissance difficile. Pour cette raison, il est nécessaire de prélever un nombre suffisant d'écailles pour l'étude de l'âge par scalimétrie.

2. Croissance des écailles et marques de croissance

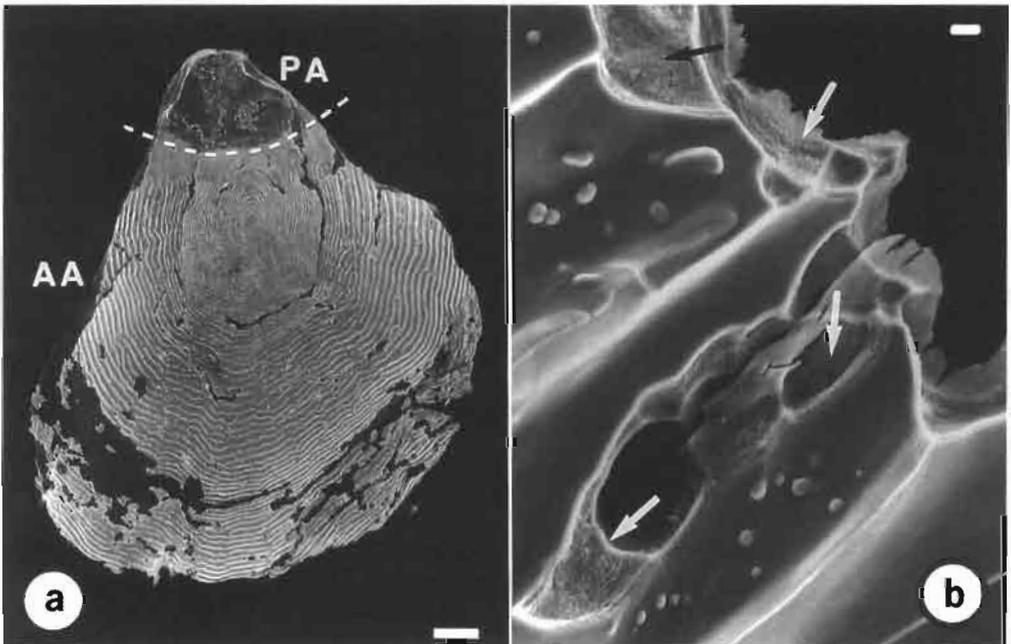
Deux processus interviennent dans la croissance des écailles élasmoïdes :

- la surface de la couche externe s'accroît grâce à l'activité de scléroblastes marginaux (fig. II.B.1d) qui sont de véritables ostéoblastes ;
- la plaque basale s'épaissit avec le dépôt de nouvelles strates de fibrilles de collagène synthétisées par des scléroblastes spécifiques, les élasmoblastes, formant un hyposquame qui couvre la face profonde de l'écaille.

On considère généralement que la surface externe d'une écaille élastoïde ne s'épaissit pas durant la vie du poisson, au moins pour le champ antérieur (Zylberberg *et al.*, 1992). Cependant, dans quelques cas, cette couche montre des épaissements sous forme de fines lignes d'accrétion (Meunier, 1997) mais elles n'ont jamais été utilisées comme indicateur de phénomènes cycliques externes.

Des marques de croissance cycliques ont été décrites uniquement à la surface des écailles et elles sont étudiées en utilisant les techniques de la microscopie classique ou, si nécessaire, le MEB. Les événements cycliques, tels qu'un ralentissement métabolique saisonnier hivernal, une maturation de reproduction, etc., induisent des modifications morphologiques des ornements, tout particulièrement des crêtes ou des *circuli* qui deviennent plus resserrés formant, ainsi, un *annulus*. Fréquemment, quand les écailles croissent à nouveau, au printemps, les nouveaux *circuli* sont plus ou moins discordants par rapport à ceux qui ont été déposés durant l'année précédente. En d'autres circonstances, l'*annulus* peut être renforcé par un processus marginal d'érosion préalable à la reprise de croissance. C'est le cas des Salmonidae migrateurs (Crichton, 1935 ; Van Someren, 1937 ; Richard & Baglinière, 1990) (fig. II.B.5) et de l'aloise-tyran (June & Roithmayr, 1960), par exemple. Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a démontré que des variations climatiques cycliques puissent avoir des répercussions sur l'organisation histologique de la plaque basale. Plus le poisson est âgé et plus les strates de la plaque basale sont nombreuses.

Figure II.B.5
Surface des écailles
d'un saumon montrant
des baies d'érosion.
a) Écaille entière.
Échelle = 500 μ m.
b) Détail des baies
d'érosion. Échelle = 5 μ m
(photos A. Kacem).
AA = champ antérieur ;
PA = champ postérieur.



Cependant, l'étude du nombre de strates de la plaque basale n'a pas permis, par exemple, d'estimer l'âge individuel chez le coelacanthe (Sire, comm. pers.) tandis que l'analyse des marques de croissance de la couche superficielle a donné des résultats intéressants (Hureau & Ozouf, 1977).

En revanche, la présence de marques de croissance est évidente dans la plaque basale des écailles ganoïdes. Elles montrent les mêmes caractéristiques histologiques que celles du squelette osseux, c'est-à-dire de larges zones à croissance rapide et des structures étroites pouvant être hyperminéralisées, à croissance lente, comme dans les écailles de polyptère (Meunier, 1980). Pour cette raison, elles seront abordées avec les marques de croissance osseuses annuelles.

3. Régulation des marques de croissance

Selon notre opinion, les facteurs impliqués dans la régulation des marques de croissance des écailles sont les mêmes que ceux qui gouvernent les marques de croissance du squelette osseux. Elles montrent toutes les deux des rythmes de croissance annuels mais, à notre connaissance, aucun cycle sub-annuel (lunaire ou circadien) n'a été décrit, contrairement au cas des otolithes (voir plus haut). Nous étudierons donc la régulation des marques de croissance des écailles au chapitre suivant dévolu aux marques de croissance squelettiques (voir chap. II.C.3).

C. Squelette

F.J. Meunier

1. Morphologie et organisation structurale des os

Chez les Ostéichthyens, comme chez les Tétrapodes, le terme « os » peut faire référence à plusieurs concepts :

- un organe (échelle anatomique) tel qu'une vertèbre, un operculaire, un rayon épineux de nageoire ;
- le tissu osseux qui constitue l'organe ;
- la substance osseuse, c'est-à-dire les constituants chimiques : macromolécules et fibrilles organiques d'une part, cristallites minéraux d'autre part, tous caractéristiques des tissus osseux. Pour éviter toute confusion, Petersen (1930) a défini quatre niveaux d'intégration successifs de l'os correspondant à quatre modes d'investigation (tab. II.C.1, voir aussi Francillon-Vieillot *et al.*, 1990). Ce sont essentiellement les 1^{er} et 2^e niveaux d'intégration qui sont concernés dans les études de squelettochronologie. Mais, pour une meilleure compréhension de l'histophysiologie de l'os, en relation avec les différentes contraintes cycliques et acycliques qui déterminent la structure osseuse, nous aborderons brièvement les 3^e et 4^e niveaux d'intégration de l'os.

Tableau II.C.1 - Niveaux d'intégration de l'os (modifié d'après Petersen, 1930; Francillon-Vieillot *et al.*, 1990).

Ordre de structure	Échelle approximative	Structures caractéristiques	Exemples de techniques utilisées	Problèmes biologiques étudiés
Premier ordre	1 m-1 mm	<i>Niveau d'intégration anatomique</i> Morphologie des os, Orientation vasculaire, trabécules osseux	Dissection, rayons X, tronçonnage; Observation : à l'œil nu, loupe binoculaire, microscopie	Anatomie et morphologie comparées du squelette; Croissance globale
Deuxième ordre	1 mm-100 µm	<i>Niveau d'intégration histologique</i> Orientation, taille, nombre de trabécules, de canaux vasculaires; Structure de la matrice extracellulaire	Histologie, histochimie, microradiographie, marquage <i>in vivo</i> ; Microscopie optique, MEB	Classification des tissus, croissance de l'os, processus de remodelage de l'os; Histophysiologie osseuse
Troisième ordre	100 µm-1 µm	<i>Niveau d'intégration cytologique</i> Détails des cellules, orientation de la matrice extracellulaire, quantité, organisation	Cellules; Fort grandissement du microscope photonique, microscope polarisant, MEB, MET	Cytologie, cytochimie des cellules osseuses; Métabolisme phosphocalcique cellulaire, Ultrastructure de la matrice osseuse
Quatrième ordre	1 µm-10 nm	<i>Niveau d'intégration moléculaire</i> Organisation chimique et biophysique des composants organiques et minéraux	MET, diffraction X, microsonde électronique, Techniques biochimiques et moléculaires	Relations ultrastructurales entre organelles cellulaires et matrice extracellulaire; biochimie de la matrice osseuse et minéralisation osseuse

1.1. Constituants des tissus osseux

Chez les Ostéichthyens, comme chez les Mammifères, les tissus osseux sont constitués d'une matrice organique, d'éléments minéraux et de différents types de cellule (Francillon-Vieillot *et al.*, 1990; Meunier & François, 1992a). La matrice organique est un assemblage de fibrilles de collagène plus ou moins orientées et emballées dans un ensemble de molécules complexes telles que les protéoglycans (Glimcher, 1998). Les constituants minéraux sont essentiellement des cristallites d'hydroxyapatite qui se déposent directement sur les fibrilles de collagène. La minéralisation des tissus osseux chez les Ostéichthyens est un processus inotropique, c'est-à-dire qu'elle est le résultat d'une interaction entre les fibrilles de collagène et les cristaux d'hydroxyapatite (voir Ørvig, 1968 et chap. II.C.1.1.3).

1.1.1. Cellules

Les cellules osseuses (scléroblastes de Klaatsch, 1890) sont de trois types :

- les ostéoblastes, qui sont localisés sur les surfaces osseuses. Ils déposent la matrice organique et les constituants minéraux de l'os;
- les ostéocytes, qui sont noyés dans la substance osseuse. Ils remplissent une fonction trophique dans l'os;
- les ostéoclastes, dont le rôle principal est la destruction de la substance osseuse (Francillon-Vieillot *et al.*, 1990; Sire *et al.*, 1990; Ricqlès *et al.*, 1991; Meunier & François, 1992a).

Les ostéoblastes synthétisent d'abord les macromolécules protéiques, essentiellement le collagène, sur les surfaces osseuses en ostéogénèse. Ils sont progressivement englobés dans la matrice organique qu'ils sécrètent, devenant alors des ostéocytes. Ils contribuent aussi à la minéralisation de la matrice organique une fois qu'elle est déposée. Quand les ostéoblastes sont relativement nombreux sur la surface externe de l'os, ils forment une sorte de « membrane » épaisse, le périoste. Quand ils s'étalent sur les parois d'une cavité vasculaire ou médullaire, ils forment l'endoste (Francillon-Vieillot *et al.*, 1990).

Les ostéocytes ont généralement une forme plus ou moins étoilée; ils sont prolongés par de nombreuses expansions cytoplasmiques ramifiées qui pénètrent dans la matrice extracellulaire au moyen de fins tunnels appelés *canaliculi* (fig. II.C.1a) (Stephan, 1900). Cependant, une caractéristique spécifique de nombreux Téléostéens est l'absence d'ostéocytes dans leurs os, spécialement dans les groupes les plus évolués comme les Acanthomorphes (perche, labre, etc.) (Kölliker, 1859; Blanc, 1953; Moss, 1961a,b, 1965; Meunier, 1983; Hughes *et al.*, 1994). Ainsi, il y a plus de la moitié des 23 600 espèces connues de Téléostéens (Nelson, 1994) qui ont de l'os acellulaire (os anostéocytaire de Weiss & Watabe, 1979). On considère généralement que l'absence d'ostéocytes dans l'os acellulaire est le résultat d'un retrait progressif des ostéoblastes devant le front de dépôt de la matrice organique de l'os au fur et à mesure qu'ils la synthétisent (Moss, 1963; Meunier, 1987).

Cependant, chez certaines espèces, l'os est traversé par des prolongements cytoplasmiques (voir chap. II.C.1.3.2) partant des ostéoblastes superficiels (fig. II.C.2) (Moss, 1965 ; Meunier, 1983, 1987 ; Meunier & Huysseune, 1992 ; Hughes *et al.*, 1994). Ces expansions cytoplasmiques sont plus ou moins ramifiées dans le tissu osseux.

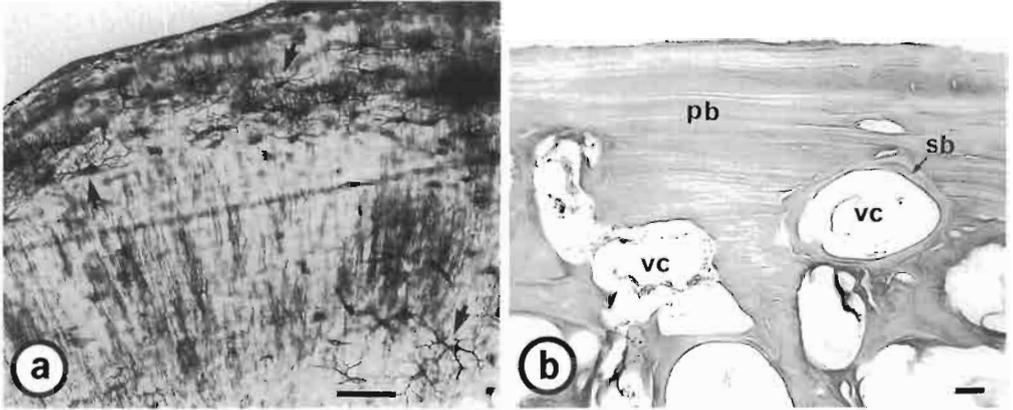


Figure II.C.1 - a) Os cellulaire (lame mince, lumière naturelle transmise) dans l'os frontal d'*Arius proops* (Siluriformes) montrant des ostéocytes étoilés typiques (flèches) avec de nombreux prolongements cytoplasmiques. Échelle = 50 µm.
b) Os acellulaire dans le supra-occipital (coupe transversale, trichrome de Masson) chez *Trachurus trachurus* (Carangidae); pb = os primaire, sb = os secondaire, vc = cavité ou canal vasculaire. Échelle = 100 µm (photos F.J. Meunier).

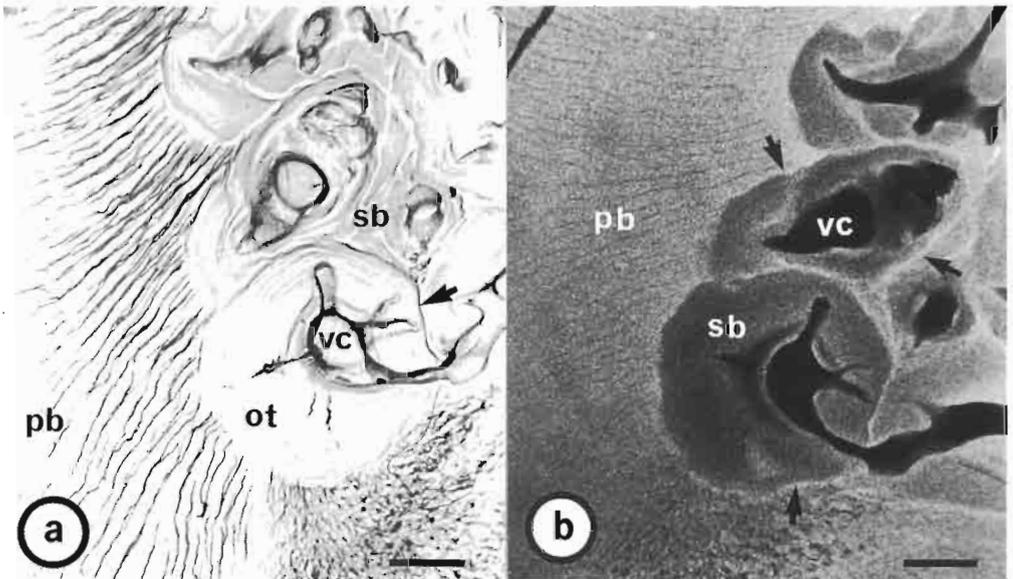


Figure II.C.2 - a) Os acellulaire (lame mince, lumière naturelle transmise) dans un rayon épineux dorsal de *Lethrinus nebulosus* (Perciformes, Lethrinidae) montrant de nombreux canalicules ostéoblastiques dans l'os primaire. L'os secondaire est délimité par une ligne cimentante de réversion (flèche) et est dépourvu de canalicules.
b) Microradiographie de la même section montrant les lignes cimentantes hyperminéralisées (flèches). L'os secondaire est moins minéralisé que l'os primaire; ot = ostéone; pb = os primaire, sb = os secondaire, vc = cavité ou canal vasculaire. Échelle = 100 µm (photos F.J. Meunier).

La nature du tissu osseux, c'est-à-dire qu'il soit acellulaire ou cellulaire, n'a pas d'importance majeure pour la détection des rythmes saisonniers de croissance des os en squelettochronologie. De nombreux os acellulaires montrent des marques de croissance utilisables pour estimer l'âge individuel (Casselman, 1974; Meunier *et al.*, 1979; Johnson & Saloman, 1984, *inter alia*).

Les ostéoclastes, dont l'existence fut niée pendant plusieurs décades (Blanc, 1953; Moss, 1963), sont maintenant reconnus et acceptés (López, 1973; Meunier, 1983; Glowacki *et al.*, 1986) dans l'os cellulaire comme dans l'os acellulaire. Mais, contrairement à l'os des Mammifères chez qui ils sont multinucléés, les ostéoclastes sont fréquemment mononucléés dans l'os des poissons (Sire *et al.*, 1990). Les ostéoclastes détruisent les tissus osseux, formant une petite dépression à la surface de l'os : les lacunes de Howship. Quand plusieurs lacunes confluent, les ostéoclastes peuvent créer d'assez grandes cavités d'érosion. Ultérieurement, ces cavités seront plus ou moins comblées par de nouveaux dépôts osseux (os secondaire) (voir chap. II.C.1.3.2). Ce processus d'érosion et de reconstruction constitue le remaniement osseux (Enlow, 1963). Si le remaniement osseux est très développé, il peut contribuer à faire disparaître des marques de croissance et ainsi conduire à une sous-estimation de l'âge. Pour cette raison, il est essentiel de savoir reconnaître le processus de remaniement (voir plus loin) dans un travail d'estimation de l'âge à l'aide de l'histologie osseuse.

1.1.2. Matrice organique

La plus grande partie de la matrice organique est formée par des fibrilles de collagène. Dans l'os des Mammifères, il est admis que le collagène représente 23 à 32 % du poids sec (Casselman, 1974), selon le taux de minéralisation. La proportion de collagène diminue quand l'os est hyperminéralisé (Herring, 1972). Ces fibrilles sont noyées dans des protéoglycans dont le rôle est mal connu. Les fibrilles de collagène peuvent être regroupées en deux catégories : les fibrilles intrinsèques qui constituent la trame organique de l'os et les fibrilles extrinsèques de structures variées qui ont une fonction d'ancrage dans l'os (en général, ligaments et tendons). Les fibres de Sharpey sont des fibres extrinsèques (Francillon-Vieillot *et al.*, 1990; Meunier & François, 1992a); elles sont constituées de fibrilles étroitement accolées en véritables paquets ancrés plus ou moins perpendiculairement dans la trame collagénique de l'os (fig. II.C.3a). Ces fibres de Sharpey, quand elles sont présentes, garantissent que le tissu osseux est de l'os primaire (voir plus loin).

Les fibrilles intrinsèques constituent un réseau tridimensionnel dont l'organisation est bien connue et dont l'agencement correspond à des contraintes biologiques spécifiques. Trois modèles d'organisation spatiale ont été décrits pour l'arrangement des fibrilles : l'os fibreux ou, mieux, à fibres enchevêtrées (« woven-fibred bone matrix »), l'os pseudo-lamellaire ou à fibres parallèles (« parallel-fibred bone matrix ») et l'os lamellaire (« lamellar bone matrix ») (Francillon-Vieillot *et al.*, 1990; Ricqlès *et al.*, 1991). Décrits en premier dans l'os de Mammifères,

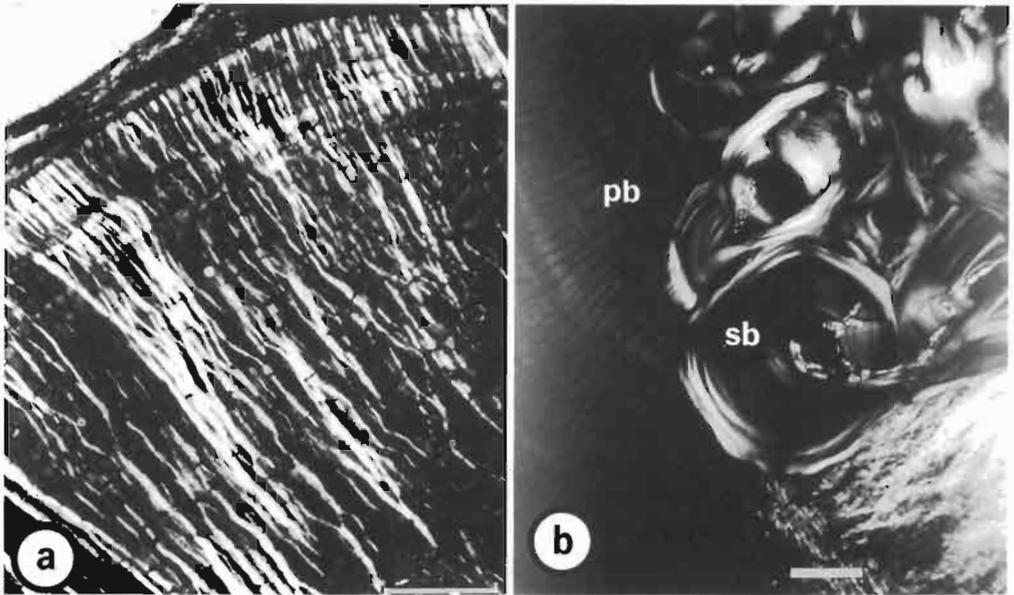


Figure II.C.3

a) Fibres de Sharpey dans le rayon épineux dorsal (lame mince, coupe transversale, lumière transmise polarisée) de *Cyprinus carpio* (Ostariophysii, Cyprinidae). Elles sont illuminées et orthogonales à la surface de l'os.

b) Os acellulaire (lame mince, lumière transmise polarisée) dans un rayon épineux dorsal de *Lethrinus nebulosus* (Perciformes, Lethrinidae) montrant de l'os lamellaire secondaire (comparer avec fig. II.C.2);

pb = os primaire,
sb = os secondaire.
Échelle = 150 μ m
(photos F.J. Meunier).

ces trois modes d'arrangement spatial ont été retrouvés dans l'os des poissons Téléostéens (Meunier & François, 1992a; Meunier & Huysseune, 1992). Les fibrilles de collagène ressemblent à des structures para-cristallines et, comme telles, elles dévient la lumière polarisée. Cette propriété est utilisée pour étudier l'orientation des fibres de collagène dans les tissus osseux avec un microscope polarisant.

L'os à fibres enchevêtrées est formé d'un réseau lâche de fibrilles de collagène différemment orientées et de diamètres variés; elles sont distribuées sans arrangement ordonné particulier. En lumière polarisée, l'os à fibres enchevêtrées apparaît globalement sombre sur les coupes. Quand ils sont présents, les ostéocytes (dans l'os cellulaire) sont disposés çà et là et ils sont globuleux (isodiamétriques), typiquement étoilés et prolongés par un grand nombre de processus cytoplasmiques qui pénètrent la substance osseuse, dans toutes les directions. La faible organisation de l'os à fibres enchevêtrées est interprétée comme caractéristique d'un processus d'ostéogenèse rapide, comme c'est le cas dans l'os embryonnaire ou larvaire (Castanet *et al.*, 1992, 1993).

Dans l'os à fibres parallèles, ou os pseudo-lamellaire, les fibrilles de collagène sont beaucoup plus denses et elles ont toutes la même orientation sur une grande épaisseur. Comme elles sont parallèles les unes aux autres, sur une préparation histologique, l'os pseudo-lamellaire est homogènement sombre ou lumineux en lumière polarisée selon que l'orientation des sections est perpendiculaire ou parallèle à la direction des fibrilles. Les ostéocytes sont aplatis et distribués çà et là; leurs prolongements cytoplasmiques se dirigent préférentiellement dans la même direction que l'axe principal des ostéocytes. L'os à fibres parallèles est interprété comme un type intermédiaire entre l'os fibreux et l'os lamellaire pour ce qui concerne sa signification histophysologique (Castanet *et al.*, 1992, 1993).

L'os lamellaire est le plus organisé des trois types. Il est formé d'une succession de fines couches (ou lamelles) dans lesquelles les fibrilles de collagène sont parallèles les unes aux autres mais leur direction change d'une lamelle à la suivante d'un angle voisin de 90°. Cette organisation régulière conduit, lors d'un examen en lumière polarisée, à une alternance de strates sombres et illuminées, ce qui correspond à une structure en contre-plaqué (Giraud-Guille, 1988). Les ostéocytes sont, en général, plus ou moins aplatis et localisés entre deux lamelles osseuses. L'os lamellaire est en général associé à une ostéogenèse lente, au moins pour l'os primaire (Castanet *et al.*, 1993). Une organisation en contre-plaqué caractérise aussi l'isopédine de la plaque basale des écailles élasmoïdes, avec deux types d'arrangement spatial (Meunier, 1987-1988). Le premier, un contre-plaqué orthogonal « plywood », est très similaire à l'os lamellaire où l'angle des fibrilles entre deux strates successives est de 90°, mais avec un diamètre fibrillaire significativement plus grand et des lamelles plus épaisses dans l'isopédine. Dans le second type, le contre-plaqué torsadé, il y a deux systèmes imbriqués (pair et impair) dans chacun desquels les directions fibrillaires tournent d'un angle plus ou moins régulier et nettement différent de 90° (Giraud *et al.*, 1978; Meunier & Castanet, 1982). La rotation des directions fibrillaires est sénestre dans les écailles élasmoïdes des Actinoptérygiens (Meunier & François, 1980; Meunier & Castanet, 1982; Meunier, 1987-1988) et dextre dans celles des Sarcoptérygiens (Giraud *et al.*, 1978; Meunier & François, 1980).

1.1.3. Matrice minérale

La minéralisation de l'os est un phénomène complexe. Dans ce traité, nous nous limiterons à un bref survol de la question.

La composante minérale est constituée, pour l'essentiel, de phosphate de calcium, qui forme des cristallites proches de l'hydroxyapatite (Glimcher, 1998). Cependant, le minéral osseux des poissons Téléostéens contient une quantité significative de carbonate de calcium ainsi que de faibles quantités d'autres éléments comme du fluor, du citrate et différents cations : Mg, Si, Sr, Mn, Ba (Francillon-Vieillot *et al.*, 1990; Zylberberg *et al.*, 1992). Bien que l'on ait longtemps cru qu'une phase amorphe précédait le dépôt de cristallites (Termine, 1972), il est maintenant proposé que la phase d'hydroxyapatite « amorphe » soit, en fait, constituée de très petits cristallites (Glimcher, 1998). Cependant, l'importante proportion de whitlockite chez plusieurs espèces d'Ostéichthyens montre que la cristallisation du phosphate de calcium n'est pas parfaite (voir aussi Baud, 1978; Tochon-Danguy & Schönborner, 1981).

Le dépôt de la phase minérale suit toujours, dans un bref délai, celui de la matrice organique. La surface de la matrice organique qui se minéralise forme le front de minéralisation. Le délai entre la synthèse des composants organiques et leur minéralisation peut s'allonger de façon significative, spécialement dans la plaque basale des écailles

(voir ci-dessus). De plus, dans ces tissus, le diamètre des fibrilles de collagène est plus grand que celui des fibrilles de l'os. Cette particularité semble être responsable du processus de minéralisation impliquant les corpuscules de Mandl qui sont des concrétions minérales aux formes géométriques caractéristiques et qui se développent en avant du front de minéralisation de la plaque basale avant de fusionner avec ce dernier (Schönbörner *et al.*, 1981).

La matrice organique de l'os contrôle l'orientation des cristallites qui sont normalement fixés le long des fibrilles de collagène. Dans ce cas, la minéralisation est dite inotropique (Ørvig, 1968). La situation alternative est la minéralisation sphérotique caractérisée par une organisation radiaire des cristallites, indépendante des fibrilles de collagène et qui conduit à la formation de globules minéralisés (Francillon-Vieillot *et al.*, 1990). La minéralisation sphérotique est relativement rare.

Il y a deux moyens de mesurer la quantité de minéral dans l'os : le taux de minéral et le degré de minéralisation. Le taux de minéral, obtenu par l'incinération de l'os sec, donne la quantité totale de composés minéraux dans l'os ; les valeurs se situent usuellement entre 60 et 70 % du poids sec de l'os chez les Ostéichthyens (Moss & Freilich, 1963 ; Casselman, 1974 ; Meunier, 1983 ; Casadevall *et al.*, 1990 ; Kacem *et al.*, 2000). Le degré de minéralisation nécessite une approche technique plus complexe (Boivin & Baud, 1984) mais fournit des données plus fines, à l'échelle histologique, mesurant les variations locales de la quantité de minéral dont la signification physiologique peut être importante. Le degré de minéralisation de l'os est exprimé en termes de « masse d'hydroxyapatite par unité de volume », c'est-à-dire en gramme par centimètre cube (Boivin & Baud, 1984). Chez les Ostéichthyens, les quelques valeurs disponibles s'étalent entre 0,8 et 1,35 g/cm³ (valeurs moyennes ; voir Meunier, 1983). Le degré de minéralisation semble être plus élevé dans l'os acellulaire que dans l'os cellulaire (Meunier, 1983, 1984a).

1.2. Organisation spatiale des tissus osseux

La description des types cellulaires, de la matrice organique et de son organisation spatiale ainsi que de la composante minérale permet de caractériser et de classer les tissus osseux (Francillon-Vieillot *et al.*, 1990 ; Ricqlès *et al.*, 1991 ; Meunier & François, 1992a). Cependant, certaines mesures et/ou observations complémentaires peuvent offrir d'autres données utiles au décryptage de l'information physiologique et temporelle « cachée » dans le tissu osseux. De telles données incluent les lignes cimentantes et le réseau vasculaire de l'os.

1.2.1. Lignes cimentantes

Une étude approfondie de préparations histologiques peut mettre en évidence des lignes chromophiles dans les matrices extracellulaires qui peuvent ou non être répétitives (fig. II.C.4). Elles sont normalement très étroites et colorables par l'hématoxyline et l'acide périodique de Schiff (APS). Elles sont brillantes en lumière transmise et sombres en

lumière réfléchi, sur des lames minces non colorées. Il y a deux sortes de lignes cimentantes : les « lignes de repos » ou « lignes d'arrêt de croissance » (LAC) et les « lignes de réversion ». Les lignes d'arrêt de croissance sont concordantes avec les lamelles osseuses (fig. II.C.4a). Chez la carpe, la seule espèce de poisson où leur ultrastructure est connue, les lignes cimentantes ont approximativement $2,5 \mu\text{m}$ d'épaisseur et elles sont constituées de fines fibrilles de 5 nm de diamètre (Castanet, 1981).

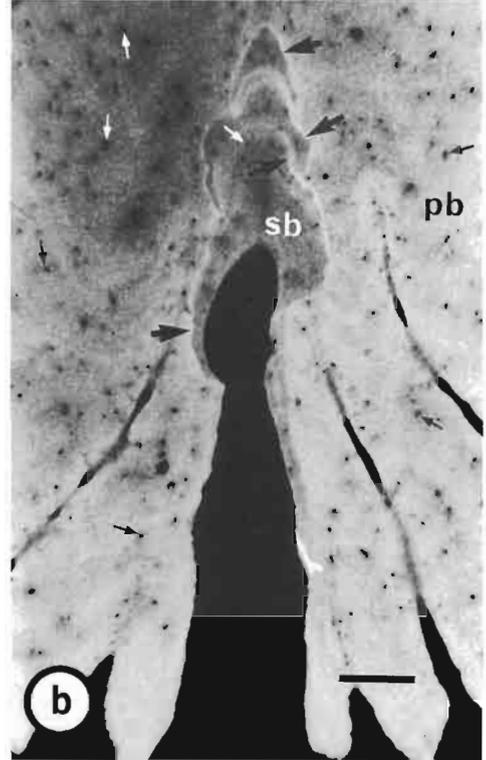
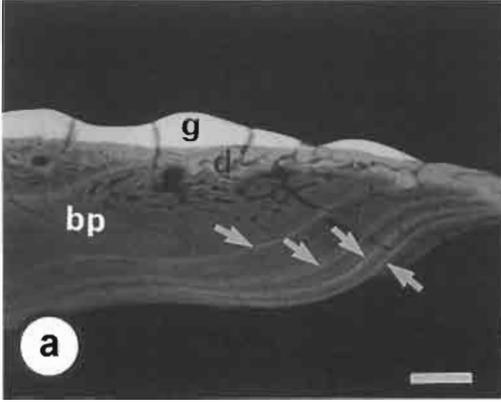


Figure II.C.4

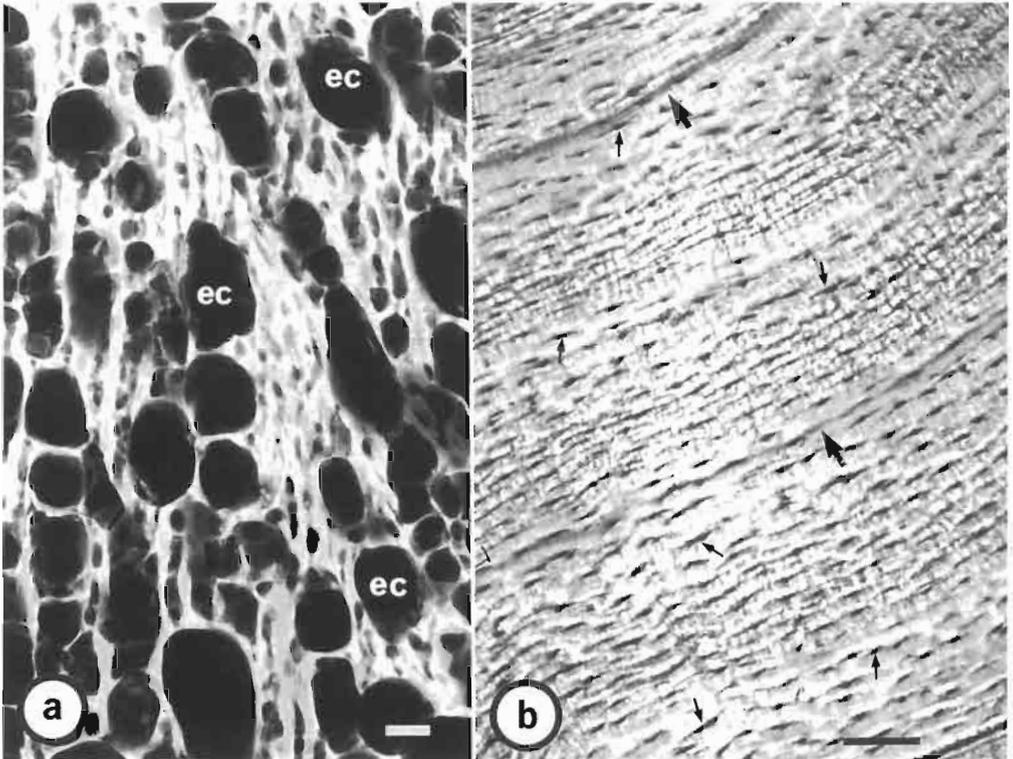
a) Quatre *annuli* (flèches) dans une écaille (lame mince, coupe transversale, microradiographie) de *Polypterus bichir* (Polyptéridae). La minéralisation de ces *annuli* est du même ordre que celle de la dentine (d) mais nettement moins élevée que celle de la ganoïne (g) superficielle. Échelle = $100 \mu\text{m}$.

b) Lignes cimentantes de réversion (grosses flèches noires) dans un rayon épineux dorsal (lame mince, coupe transversale, microradiographie) de *Katsuwonus pelamis* (Perciformes, Thunnidae); remarquer les nombreux ostéocytes (petites flèches blanches et noires). bp = plaque basale, pb = os primaire, sb = os secondaire. Échelle = $100 \mu\text{m}$ (photos F.J. Meunier).

Le second type de lignes cimentantes, les lignes de réversion (« lignes de résorption »), marque nettement des discordances dans les dépôts osseux successifs (fig. II.C.2b, 4b). Les lignes de réversion représentent un arrêt de l'apposition osseuse suivi d'une résorption d'os avant une reprise de l'ostéogenèse (Castanet *et al.*, 1993). Elles sont délicatement crénelées et hyperminéralisées. Elles séparent un dépôt osseux secondaire d'un autre dépôt osseux plus ancien (voir ci-dessous) (Amprino & Engström, 1952). Cette ligne de réversion agit comme un ciment ou une colle entre deux surfaces osseuses. Chez les poissons osseux, ces lignes cimentantes de réversion ont une épaisseur d'un micromètre et consistent en une double bordure de matériel opaque (Castanet, 1981). L'aspect crénelé des lignes de réversion provient de l'activité ostéoclastique qui précède l'os secondaire (Matrajt *et al.*, 1964).

1.2.2. Vascularisation des tissus osseux

Dans l'os, il existe des espaces non osseux qui hébergent des vaisseaux sanguins, des cellules adipeuses et des fibrocytes. Ces espaces sont appelés canaux vasculaires ou cavités vasculaires selon leur forme et leur taille (Francillon-Vieillot *et al.*, 1990; Ricqlès *et al.*, 1991). Une des fonctions des canaux vasculaires est un rôle trophique puisqu'ils apportent les métabolites au cœur de la substance osseuse. Ils forment un réseau plus ou moins développé, selon le taxon. Quand les espaces vasculaires sont présents, ils déterminent un os vasculaire (fig. II.C.5a); quand le tissu osseux est dépourvu d'espaces vasculaires, il est dit avasculaire (fig. II.C.5b) (Francillon-Vieillot *et al.*, 1990; Meunier & François, 1992a). D'une façon générale, les canaux vasculaires sont plus abondants quand l'activité métabolique des poissons est élevée, comme par exemple chez les thons (Amprino & Godina, 1956). Dans l'os spongieux, le volume total des cavités est supérieur à celui de la substance osseuse (fig. II.C.5a).



L'os compact est généralement relativement pauvre en espaces vasculaires, contrairement à l'os spongieux. Ce dernier, quand il est présent, est plutôt localisé dans les secteurs les plus internes d'un os et est entouré par une épaisseur plus ou moins grande d'os compact (Meunier & François, 1992a).

Dans les écailles élasmoïdes, les canaux vasculaires sont rares. Cependant, des pores transversaux (« canalicules perforants » de Baudelot, 1873), traversant complètement l'écaille, ont été décrits dans le champ postérieur des écailles de diverses espèces, par exemple *Cyprinus carpio* et *Mugil cephalus*, où ils ont un diamètre moyen de 30-50 µm (Baudelot, 1873), ou encore *Latimeria* (Meunier, 1980). Ces canaux abritent, notamment, des vaisseaux sanguins et des fibres nerveuses (Baudelot, 1873); ce sont de véritables canaux vasculaires mais ils n'interfèrent pas dans la localisation des marques de croissance superficielles.

Dans un os donné, il est possible de caractériser différents modes d'organisation spatiale des canaux vasculaires. Comme exemple, nous pouvons prendre le rayon épineux pectoral du poisson-chat, *Hoplosternum littorale* (Callichthyidae), qui croît en longueur et en épaisseur pendant la vie de l'animal. On peut définir trois types de canaux vasculaires (Francillon-Vieillot *et al.*, 1990) :

- des canaux vasculaires « radiaires », qui relie la région interne d'un os (éventuellement la cavité médullaire) à ses régions les plus externes ;
- des canaux vasculaires « longitudinaux » parallèles à l'axe proximo-distal de l'os ;
- des canaux vasculaires « circulaires » plus ou moins concentriques et parallèles à la surface de l'os.

Il est clair que, dans un os donné, on peut décrire l'organisation du réseau vasculaire selon les modes d'association des différents canaux vasculaires (voir par exemple fig. II.C.6.a, b).

Il y a deux types de canaux vasculaires : les premiers sont appelés canaux vasculaires primaires. Ils se forment en même temps que le dépôt osseux périostique. Les ostéoblastes sécrètent les composants osseux autour des vaisseaux sanguins du périoste qui sont ainsi directement incorporés dans la matrice osseuse. On considère généralement que plus les canaux ou cavités vasculaires primaires sont nombreux, plus le métabolisme de l'animal est élevé (Ricqlès *et al.*, 1991). Le second type correspond aux canaux vasculaires secondaires qui sont le résultat d'une résorption ostéoclastique préalable. Les ostéoclastes agissent comme un trépan, perforant des cavités, véritables tunnels qui sont envahis par des vaisseaux sanguins. Sur les parois de ces canaux vasculaires secondaires, des ostéoblastes endostéaux déposent de nouvelles couches de substance osseuse qui constituent de l'os secondaire et qui sont séparées de l'os plus ancien par une ligne cimentante de réversion (voir section précédente). Quand ces canaux vasculaires secondaires sont réguliers et plus ou moins parallèles au grand axe de l'os, ils sont appelés ostéones secondaires (fig. II.C.2).

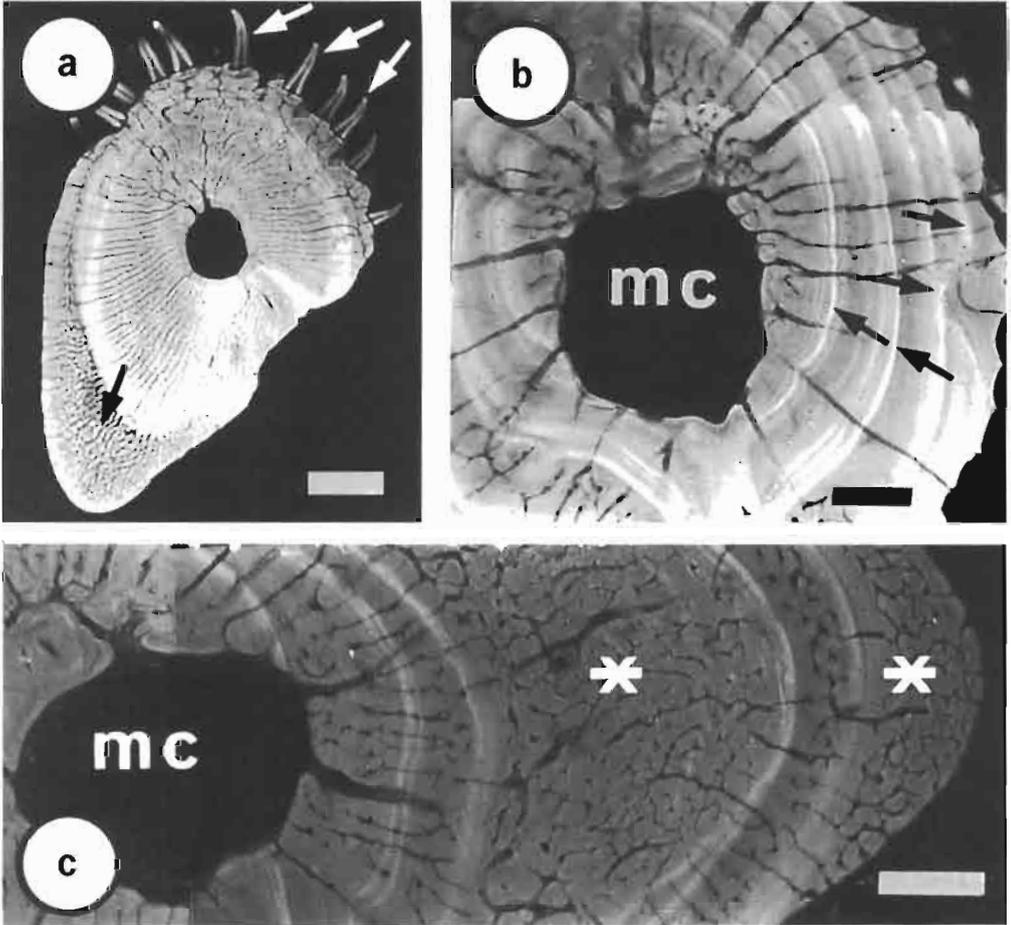


Figure II.C.6 - *Hoplosternum littorale*. Coupe transversale d'un rayon épineux pectoral (microradiographie) (photos F.J. Meunier). a) Un spécimen expérimental d'élevage; on peut voir les odontodes superficiels (flèches blanches) et un secteur d'os hyper-vascularisé (flèche noire) correspondant à la première saison de reproduction. Échelle = 1 mm. b) Une femelle sauvage montrant quatre *annuli* hyperminéralisés et l'os faiblement vascularisé. Échelle = 1 mm. c) Un mâle sauvage montrant deux zones hypervascularisées (astérisques). mc = cavité médullaire. Échelle = 1 mm.

1.3. Signification histophysiologique des tissus osseux

Une étude comparative de l'os chez les différentes classes de Vertébrés (incluant les taxons fossiles) montre que les constituants de base (cellules, matrice organique, cristallites minéraux) apparaissent tous à la même époque géologique, au moment de la différenciation de l'os, c'est-à-dire pendant l'Ordovicien (Ricqlès *et al.*, 1991; Janvier, 1996). De plus, il n'existe pas de véritable tendance évolutive de la structure de l'os qui soit directement reliée à l'évolution des grands taxons de Vertébrés, mais plutôt, aux contraintes des spécialisations ontogéniques, biomécaniques et physiologiques. La typologie des tissus osseux qui est issue des diverses associations entre présence/absence des ostéocytes, arrangement des fibrilles de collagène, présence/absence de canaux vasculaires, etc. n'a pas de signification évolutive. Au contraire, les différents types

osseux ont des significations physiologiques variées qui s'expriment indifféremment chez les Ostéichthyens comme chez les Reptiles ou les Mammifères (Francillon-Vieillot *et al.*, 1990; Ricqlès *et al.*, 1991) et qui sont liées à des contraintes épigénétiques comme la saisonnalité de la croissance, l'intensité de l'activité métabolique, la reproduction, etc.

1.3.1. Croissance osseuse

La croissance osseuse est le résultat d'un processus d'apposition dû à l'activité des ostéoblastes localisés dans la « membrane périostique » (voir plus haut). Le périoste produit l'os primaire qui peut persister durant toute la vie du poisson ou qui peut être plus ou moins partiellement détruit et être remplacé par de l'os nouveau qui est alors considéré comme de l'os secondaire (voir plus haut). La structure de l'os primaire en croissance dépend de la vitesse de l'ostéogenèse, par exemple si l'animal est jeune ou adulte, d'une part, ou si le poisson a une forte ou une faible activité métabolique, d'autre part. Quel que soit le rôle de ces facteurs, le fonctionnement des ostéoblastes est également sous influence des rythmes saisonniers.

La mesure de vitesse de l'ostéogenèse périostique est basée sur la technique du marquage vital (Meunier & Boivin, 1974, 1978; Beamish & McFarlane, 1983; Babaluk & Craig, 1990; Boujard & Meunier, 1991; Trébaol *et al.*, 1991). Il y a peu d'études de la vitesse de croissance périostique chez les poissons. Dépendant de la taille du poisson, de son âge et de son état physiologique, la croissance périostique appositionnelle se situe entre 0,1 et 20 $\mu\text{m}/\text{jour}$ (Simmons *et al.*, 1970; Casselman, 1974; Boujard & Meunier, 1991; Meunier & François, 1992b, *inter alia*).

1.3.2. Remaniement osseux

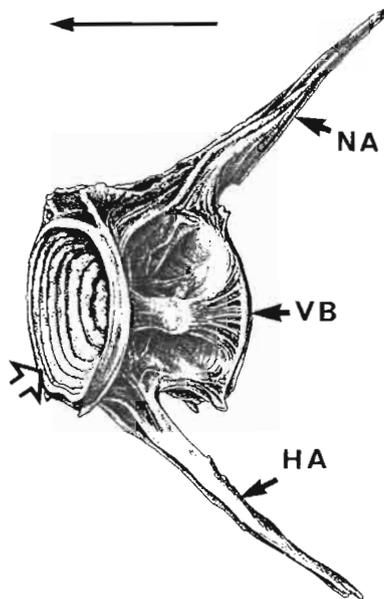
Dans le chapitre II.C.1.1, qui aborde l'étude des composants élémentaires des tissus osseux chez les Ostéichthyens, nous avons vu qu'il est nécessaire de distinguer les tissus osseux primaires et les tissus osseux secondaires. L'os primaire est l'os nouveau déposé par les cellules périostiques, c'est-à-dire le résultat de l'activité des ostéoblastes sans destruction osseuse préalable. Ces cellules sont aussi responsables de l'augmentation en épaisseur de l'os par adjonction de nouvelles couches périphériques. Au contraire, l'os secondaire qui est déposé par des ostéoblastes endostéaux suit un processus érosif, résultat de l'activité des ostéoclastes (fig. II.C.3b, 5a). Ces ostéoclastes, fréquemment unicellulaires dans l'os des poissons (voir plus haut; Sire *et al.*, 1990), sont à l'origine de cavités et/ou de canaux vasculaires qui sont progressivement remplis par du tissu osseux nouveau. Cet os secondaire est toujours séparé de l'os primaire par une ligne cimentante appelée « ligne cimentante de réversion » qui a les mêmes propriétés histologiques que les lignes d'arrêt de croissance, sauf son aspect irrégulier (voir plus haut). Ce phénomène d'érosion-reconstruction est appelé remaniement osseux et, si l'os primaire et l'os secondaire sont constitués des mêmes éléments de base, ils ont une signification morphologique et physiologique très différente (Francillon-Vieillot *et al.*, 1990; Meunier & François, 1992b).

Le remaniement osseux n'est pas très développé chez de nombreux Ostéichthyens, ce qui permet de considérer que les tissus osseux primaires sont relativement permanents tout au long de la vie des poissons. En revanche, les thons et les espèces voisines montrent un abondant remaniement du squelette, au moins du squelette axial (Amprino & Godina, 1956; Poplin *et al.*, 1976), des os superficiels comme les rayons de nageoires étant relativement épargnés (Meunier, observations non publiées). Ce remaniement peut entraîner la destruction de marques de croissance et l'estimation de l'âge peut alors être entreprise par l'étude des otolithes (Stéquert *et al.*, 1995; Itoh & Tsuji, 1996, *inter alia*).

La croissance corporelle des poissons est considérée comme indéfinie (Dutta, 1994; Goss, 1994). Le squelette osseux croît tout au long de la vie, même si après la première reproduction sa croissance chute de façon significative (Brown, 1957). Le squelette enregistre, par des structures spécifiques telles que les marques de croissance, le rythme de croissance ainsi que des événements qui l'affectent. Ainsi, certains éléments du squelette peuvent souvent être utilisés comme enregistreurs de l'âge dès lors que le tissu osseux montre des structures répétitives, les marques de croissance, et si ces structures sont synchronisées par un cycle saisonnier.

Certaines familles de Téléostéens (Carangidae, Drepanidae) ou certaines espèces (appartenant aux Gadidae, par exemple) peuvent développer des hyperostoses, c'est-à-dire des os anormalement renflés (Desse *et al.*, 1981; Driesch, 1994, *inter alia*). Dans ces os, la croissance (os primaire d'apposition) semble être stimulée et le remaniement osseux y est généralement très abondant (Desse *et al.*, 1981; Meunier & Desse, 1994;

Figure. II.C.7
Une vertèbre caudale d'un poisson Téléostéen montrant sept marques de croissance (*annuli*) sur la surface du cône vertébral (flèche creuse). La flèche indique la région antérieure du poisson. (HA = arc hémal; NA = arc neural; VB = corps vertébral) (modifié d'après Laerm, 1976).



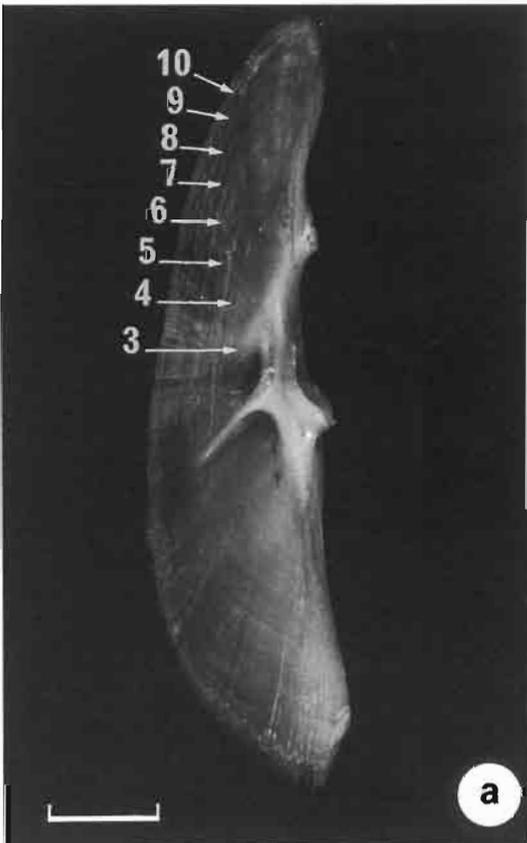
Meunier & Zylberberg, 1998), donc ces pièces squelettiques hyperostées ne conviennent pas pour des études d'estimation de l'âge.

2. Accroissements périodiques ou « le squelette comme une boîte noire »

Les os plats ne nécessitent pas l'utilisation de techniques élaborées pour une étude squelettochronologique (fig. II.C.7, 8a), contrairement aux os longs comme les rayons épineux qui sont préparés avec des techniques histologiques plus ou moins contraignantes (fig. II.C.6, 8b, 9). Normalement, un nettoyage superficiel et une observation dans un milieu éclaircissant (voir chap. VIII) sont suffisants pour l'observation et la discrimination des marques de croissance sur les os plats (Casselman, 1974; Boujard *et al.*, 1991; Lecomte *et al.*, 1993, *inter alia*). D'un autre côté, pour les os longs, le matériel est observé soit à partir de surfaces polies sur des os coupés sans décalcification préalable (Deelder & Willemse, 1973; Beamish & McFarlane, 1987), sur des lames minces (Sneed, 1951; Marzolf, 1955; Van der Waal & Schoonbee, 1975; Olaturunde, 1979; Loubens & Panfili, 1992, *inter alia*), soit sur des coupes à congélation de matériel décalcifié (voir chap. VIII). Le principal avantage de ces techniques est qu'elles permettent un décryptage précis des

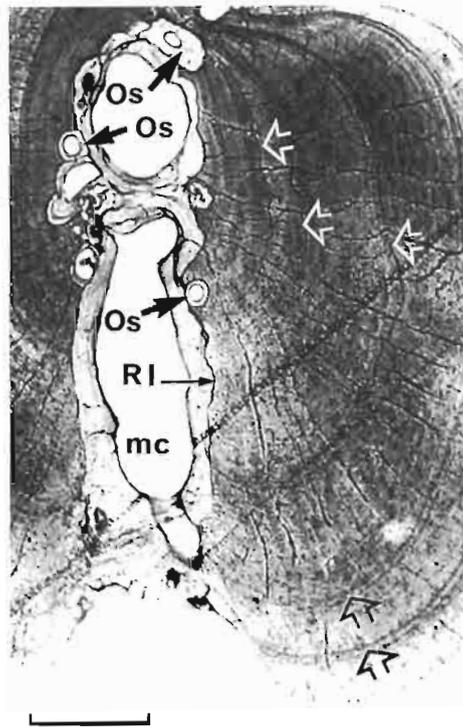
Figure II.C.8

a) *Myleus rhomboidalis*.
Operculaire (lumière réfléchie sur fond noir).
Échelle = 1 cm.
b) *Cyprinus carpio*. Lame mince de rayon épineux de nageoire dorsale, coupe transversale (lumière transmise).
Échelle = 1 mm
(photos F.J. Meunier).



événements spatio-temporels qui ont affecté l'organisme durant la vie du poisson (Castanet *et al.*, 1992, 1993).

Figure II.C.9
Cinq LAC (lignes d'arrêt de croissance) (flèches creuses noires et blanches). Coupe transversale d'un rayon épineux (hématoxyline) de *Plagioscion squamosissimus* (Sciaenidae). Le tissu osseux est acellulaire et montre, autour de la cavité médullaire (mc), de l'os secondaire avec quelques ostéons secondaires (Os), séparés de l'os primaire par une ligne cimentante de réversion (RI). Échelle = 200 µm (photo F.J. Meunier).



D'une façon générale, les marques de croissance des os plats (operculaire, vertèbres, *cleithrum*...) sont des « zones » et des « annuli » (tab. II.C.2) et leur mode d'utilisation pour estimer l'âge est très proche de la scalimétrie. Les auteurs qui ont utilisé la squeletteochronologie ont peu fait attention à la signification du support structural des marques de croissance cycliques. Cependant, la connaissance de leur structure histologique est essentielle pour la compréhension des relations entre le squelette et les facteurs génétiques et épigénétiques de la croissance (Castanet *et al.*, 1977, 1993).

Tableau II.C.2 - Formation des marques de croissance (Castanet *et al.*, 1993, modifié).

	Période à métabolisme élevé		Période à faible métabolisme	
	Tempéré : Tropical :	Printemps-été Saison humide	Tempéré : Tropical :	Hiver Saison sèche
	Jeune -----	Adulte	Jeune -----	Adulte
Os à croissance rapide	Os fibreux	Os pseudo-lamellaire	Os pseudo-lamellaire	Os lamellaire
Os à croissance intermédiaire	Os fibreux	Os pseudo-lamellaire	Os lamellaire avec Annulus avec	LAC
Os à croissance lente	Os pseudo-lamellaire	Os lamellaire	LAC	LAC

2.1. Marques de croissance

Les marques de croissance utiles à l'estimation de l'âge ne sont présentes que dans l'os primaire. C'est pourquoi l'intégrité de cet os est essentielle pour les études squelettochronologiques car le remaniement osseux détruit une partie de l'information (Castanet *et al.*, 1992, 1993). Par exemple, il est pratiquement impossible d'estimer l'âge d'un thon avec ses vertèbres car elles sont soumises à d'importants remaniements qui détruisent de vastes territoires d'os primaire. Par ailleurs, les marques de croissance ont des propriétés spécifiques par rapport à la lumière lors de l'observation microscopique, propriétés qui sont utilisées pour les distinguer lors des études d'estimation de l'âge. Il y a trois catégories de marque de croissance dans l'os : les zones, les *annuli* et les lignes d'arrêt de croissance (LAC).

La « zone » est la marque de croissance la plus large. Elle apparaît sombre en lumière transmise et brillante en lumière réfléchie (fig. II.C.8b). Quand l'os est vascularisé, les canaux et cavités vasculaires sont plus nombreux dans les zones que dans les *annuli*. Chez les jeunes animaux à croissance rapide, les couches opaques, c'est-à-dire les couches à croissance active (zones), sont constituées d'os à fibres enchevêtrées avec des ostéocytes isodiamétriques distribués çà et là dans le tissu osseux. Chez les adultes, la croissance osseuse est moins importante à cause de la compétition du métabolisme de la reproduction et l'os à fibres enchevêtrées est remplacé par de l'os à fibres parallèles ou, éventuellement, par de l'os lamellaire, les deux tissus présentant des ostéocytes plus ou moins aplatis (fig. II.C.5b) (Castanet *et al.*, 1992, 1993).

Les *annuli* sont nettement moins épais que les zones. D'une manière générale, chez les poissons osseux, l'*annulus* consiste en une ou plusieurs strates osseuses qui sont légèrement hyperminéralisées relativement au taux de minéralisation de l'os à croissance rapide (Meunier, 1988; Castanet *et al.*, 1993, *inter alia*) (fig. II.C.4a, 6). De plus, la densité des cellules est légèrement plus faible dans l'*annulus* (Castanet *et al.*, 1977, 1993). Les *annuli* ou couches à croissance ralentie correspondent à une ostéogenèse lente. Ils sont donc normalement plus étroits que les secteurs adjacents (zones) et ils sont constitués d'os lamellaire. Ils apparaissent plus transparents que les zones, c'est-à-dire qu'ils sont illuminés en lumière transmise et sombres en lumière réfléchie.

Les lignes d'arrêt de croissance (LAC) sont des lignes cimentantes qui sont concordantes avec les couches osseuses (voir plus haut). Chez certaines espèces, l'*annulus* est bordé par une LAC, parfois par deux ou plus. Les LAC sont des lignes de repos de la croissance (Castanet, 1981; Ricqlès *et al.*, 1991), c'est-à-dire qu'elles marquent un arrêt temporaire, plus ou moins long, de l'ostéogenèse locale (Castanet *et al.*, 1992, 1993). Elles sont en général plus transparentes et plus réfringentes que les autres marques de croissance. Aussi, apparaissent-elles comme les structures les plus brillantes lorsque l'os est observé avec la lumière polarisée. Elles sont également plus chromophiles (avec les colorations à l'hématoxyline et à l'APS) et, fréquemment, plus minéra-

lisées. Chez les poissons adultes, elles sont souvent le seul signe de la saison froide.

L'association d'une zone de croissance rapide et d'un *annulus* représente la croissance d'une année. La zone est constituée par de l'os déposé pendant la période de grande activité métabolique. Au contraire, l'*annulus* marque le ralentissement de la croissance squelettique quand l'activité métabolique de l'animal chute. Il est maintenant bien connu que les marques de croissance osseuses sont plus ou moins distinctes selon la dynamique de la croissance des différents éléments squelettiques (Castanet *et al.*, 1992, 1993). Aussi, les os qui seront sélectionnés pour le travail de squelettechronologie seront ceux qui ont les marques les plus nombreuses et les plus nettes. De plus, il doit y avoir le moins de remaniement osseux possible (fig. II.C.10b,e).

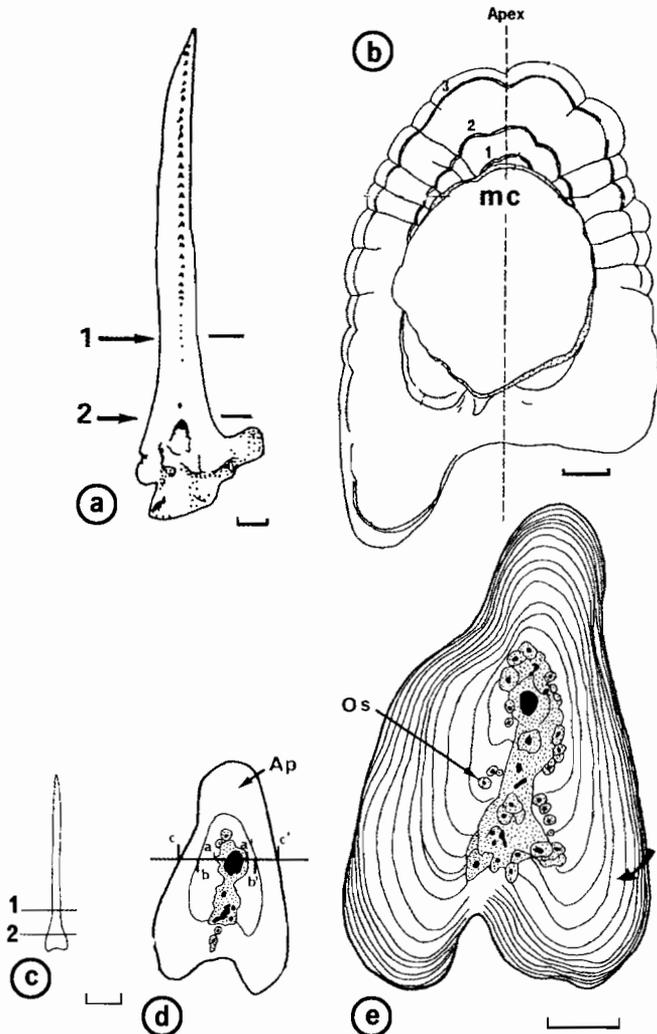
Figure II.C.10

a, b) *Arius proops* (modifié d'après Meunier *et al.*, 1997). a) Rayon épineux pectoral. 1-2 : localisation du niveau convenable pour les sections. Échelle = 5 mm. b) Dessin d'une coupe montrant trois *annuli* et la cavité médullaire (mc). La résorption a détruit une grande partie du premier *annulus*. Échelle = 1 mm.

c, d, e) *Lethrinus nebulosus* (modifié d'après Meunier *et al.*, 1979). c) Rayon épineux dorsal. 1-2 : localisation du niveau convenable pour les sections. Échelle = 10 mm.

d) Dessin d'une coupe montrant un *annulus*. e) Dessin d'une coupe montrant quatorze *annuli* et un net rapprochement des six derniers après la première reproduction. La résorption de l'os a partiellement détruit le premier *annulus*. d et e, échelle = 500 μ m.

Ap = apex, Os = ostéone. pointillés = os secondaire.



2.2. Déterminisme de la structure et de l'organisation spatiale des marques de croissance

Les Ostéichthyens (comme les Chondrichthyens) sont des animaux poikilothermes. Ils grandissent donc tout au long de leur vie, même si le taux de croissance diminue avec l'âge. De plus, la longévité des poissons est hautement variable selon les taxons, certains d'entre eux vivant plus de 50 ans et même plus d'un siècle (Das, 1994, *inter alia*). La vitesse de croissance de l'os dépend de l'âge de l'animal et s'exprime par différentes caractéristiques histologiques (tab. II.C.2) (Castanet *et al.*, 1992, 1993). Les phénomènes externes périodiques et aperiodiques qui conduisent aux variations de croissance osseuse interagissent avec les processus de croissance individuelle et, localement, avec ceux de différentes pièces du squelette. En accord avec la morphogénèse osseuse, la structure histologique et l'aspect spatial des marques de croissance peuvent changer localement dans un même os et entre différents os d'un même individu. Ce fait est très important pour le choix des os comme support d'une étude squelettechronologique.

De même, en accord avec l'évolution générale du taux de croissance tout au long de la vie, la structure des marques de croissance et leur séquence changent de la naissance à la mort. Jusqu'à l'acquisition de la première maturité génitale, quand le taux de croissance du corps est élevé, les *annuli* et/ou les LAC sont séparés par des zones de croissance osseuse active bien individualisées et larges. Ils deviennent de plus en plus rapprochés au cours de la vie adulte et parfois si proches les uns des autres avec l'âge qu'ils sont difficiles à dénombrer (fig. II.C.8b, 10e) (Castanet *et al.*, 1992, 1993). Naturellement, quand la croissance du squelette s'arrête définitivement, plus aucune marque de croissance ne se forme localement alors que l'animal continue de vieillir. Ceci peut alors conduire à une sous-estimation de l'âge. Finalement, les variations de la croissance squelettique individuelle et interpopulation conduisent à des différences de l'expression histologique des marques de croissance osseuse (Castanet *et al.*, 1992, 1993).

Chez les poissons comme chez les Tétrapodes (par exemple, voir Castanet & Naulleau, 1985, pour la vipère), les variations des caractéristiques entre les marques de croissance cycliques sont liées aux différents facteurs internes (par exemple les caractéristiques tissulaires, l'environnement hormonal, la maturité sexuelle, le programme génétique) et externes (par exemple les alternances saisonnières, les ressources alimentaires, les changements de biotope après la migration de recrutement). Le rythme du dépôt osseux et l'alternance des types de substance osseuse déposée ont un déterminisme qui commande la croissance squelettique. Cependant, les facteurs externes agissent comme un synchroniseur s'ils sont eux-mêmes de nature cyclique (Castanet *et al.*, 1992, 1993). Ils règlent la largeur des différents dépôts et, aussi, le moment de leur changement en modulant les effets des rythmes endogènes de la croissance. De plus, toute anomalie d'un facteur externe cyclique peut, en retour, générer des différences structurales plus ou

moins évidentes de la structure du tissu osseux et, ainsi, créer une « fausse marque » ou « marque surnuméraire ». Si certaines marques surnuméraires sont purement accidentelles (par exemple un manque de nourriture, une sécheresse intense, une maladie), d'autres sont le résultat d'évènements vitaux non cycliques : éclosion et/ou résorption des réserves vitellines (marque de naissance) (Lecomte *et al.*, 1985, 1989), migration durant le recrutement (marque surnuméraire acyclique) (Meunier *et al.*, 1979), reproduction (marque de reproduction), migrations annuelles (Compean Jiménez & Bard, 1980). Ces marques surnuméraires apparaissent comme un *annulus* ou une LAC, dont les caractéristiques histologiques sont similaires à celles d'un *annulus* et/ou d'une LAC normaux. De telles marques surnuméraires sont également connues chez les Chondrichthyens (Branstetter & Stiles, 1987 ; Seki *et al.*, 1998 ; Wintner & Cliff, 1999).

2.3. Quelques exemples concrets

La carpe (*Cyprinus carpio*) est un poisson sédentaire des régions tempérées dont le squelette est formé d'os cellulaire faiblement vascularisé, tout particulièrement les rayons épineux des nageoires dorsale et anale (Stephan, 1900 ; Meunier & Pascal, 1981). Plusieurs os montrent des marques de croissance annuelles : la mâchoire inférieure (Castanet *et al.*, 1970), les vertèbres (Castanet *et al.*, 1977), les operculaires (English, 1952 ; Sigler, 1958) et les rayons épineux dorsal et anal (Castanet *et al.*, 1970 ; Meunier & Pascal, 1981). Les rayons épineux sont les plus favorables pour estimer l'âge chez ces animaux. Durant l'hiver, il n'y a pas de croissance en épaisseur du rayon épineux et, avant le retour de l'activité métabolique, un *annulus* est déposé. Il consiste en une ou deux lamelle(s) osseuse(s) et au moins une ligne d'arrêt de croissance. La croissance appositionnelle commence alors et se poursuit durant le printemps, l'été et au début de l'automne avec le dépôt d'une succession régulière de lamelles osseuses (Meunier & Pascal, 1981). L'*annulus* est faiblement hyperminéralisé (Castanet, 1981) et le rapport Ca/P du minéral osseux est le même que celui de l'os à croissance rapide (Meunier, observations non publiées).

De nombreuses espèces de poissons-chats ont des rayons épineux pectoraux et/ou dorsaux. Ils montrent très souvent des marques de croissance (fig. II.C.10b), zones de croissance rapide et secteurs de croissance ralentie ou *annuli*, et ils sont fréquemment utilisés pour l'estimation de l'âge (Marzolf, 1955 ; Boët, 1981 ; Lecomte *et al.*, 1989, *inter alia*) par suite de l'absence d'écailles chez ces poissons dont, par ailleurs, les otolithes ne donnent pas de bons résultats. Un cas intéressant est celui de l'atipa (*Hoplosternum littorale*), un poisson-chat sud-américain (Callichthyidae) qui vit dans des marécages côtiers. Ce poisson construit, avec des herbes aquatiques, un nid flottant (bulles) pour la reproduction. Pendant cette période, les épines pectorales du mâle développent des caractères sexuels secondaires : épaissement de l'épiderme (Wine-miller, 1987) pendant que le rayon épineux s'épaissit par un dépôt d'os

hypervascularisé (Boujard & Meunier, 1991). Quand la reproduction est terminée, la croissance osseuse du rayon chute brutalement et le périoste dépose de l'os pseudo-lamellaire avasculaire. Durant la saison de reproduction suivante, un nouveau secteur d'os hypervascularisé se forme et ainsi de suite. En dénombrant le nombre de secteurs d'os hypervascularisé, l'âge du mâle peut ainsi être estimé. Chez la femelle, les seules marques de croissance sont des alternances de « zones » et d'*annuli* hyperminéralisés (fig. II.C.6b).

Un autre exemple est le brochet, *Esox lucius*, une espèce à os acellulaire. Ce poisson, qui occupe un biotope similaire à celui de la carpe, possède des marques de croissance annuelles sur divers os et particulièrement sur le *cleithrum*. Casselman (1974) a décrit, à partir de lames minces, des *annuli* hyperminéralisés dont le rapport Ca/P est le même que celui de l'os déposé pendant les périodes de croissance active. Cependant, ces os sont des os plats et l'étude des marques de croissance est aisée puisqu'il suffit d'observer les *cleithra in toto* dans un milieu éclaircissant.

Le « bec de canne », *Lethrinus nebulosus*, est un poisson Perciforme tropical du lagon néo-calédonien. Son squelette est constitué d'os acellulaire et il montre de jolies marques de croissance, zones et LAC, sur les rayons épineux de la première nageoire dorsale et sur les vertèbres (Meunier *et al.*, 1979). Le tissu osseux de ces dernières montre d'importantes et irrégulières zones de résorption osseuse si bien qu'elles ne sont pas très favorables à une étude squelettochronologique, contrairement aux rayons. Ce poisson a une assez longue longévité (au moins 25 ans) et une à deux LAC peuvent disparaître chez les plus âgés mais une étude d'otolithométrie comparative a confirmé l'utilité des rayons épineux pour l'estimation de l'âge individuel chez cette espèce (Meunier *et al.*, 1979).

Des alternances de zones de croissance active et d'*annuli* sont également très nettes sur divers os de beaucoup d'autres espèces à os acellulaire, tels les *illicia* de la baudroie, *Lophius* spp. (Peronnet *et al.*, 1992; Yoneda *et al.*, 1997), ou l'épine de la première nageoire dorsale du poisson arbalète, *Balistes* spp., (Johnson & Saloman, 1984), mais également chez des espèces à os cellulaire : rayon épineux pectoral des esturgeons, *Acipenser* spp. (Magnin, 1962; Brennan & Cailliet, 1989), par exemple. Chez cette dernière espèce, les *annuli* sont aussi hyperminéralisés (Meunier, données non publiées). Alors que la grande majorité des Perciformes a de l'os acellulaire, les Thunnidae sont remarquables puisqu'ils ont de l'os cellulaire (fig. II.C.4b) (Stephan, 1900; Amprino & Godina, 1956). Par exemple, la bonite (*Katsuwonus pelamis*) présente des marques de croissance cycliques sur ses rayons épineux dorsaux (Batts, 1972) et sur les vertèbres. Sur les rayons, les *annuli* sont relativement larges et ils apparaissent hyperminéralisés bien qu'il n'y ait pas de LAC. Cependant, le remaniement osseux, qui est lié à la forte activité métabolique de ces poissons, peut détruire une ou plusieurs marques de croissance dans certains cas, conduisant à une sous-estimation de l'âge (Cayré & Diouf, 1980).

3. Régulation de la croissance appositionnelle

En dépit de l'extraordinaire diversité biologique des poissons Ostéichthyens et, tout particulièrement des Téléostéens, les tissus osseux procurent un enregistrement très net des évènements biologiques auxquels sont soumis les animaux, y compris les cycles annuels. À l'heure actuelle, aucun cycle ultra-annuel (sub-annuel), comme les cycles lunaires et circadiens, n'a été reconnu dans les marques de croissance osseuses chez les poissons (voir « Marques de croissance surnuméraires »), contrairement aux otolithes, sauf chez quelques espèces tropicales (voir ci-après).

3.1. Formation des marques de croissance et saisonnalité

En fait, on peut se demander si les variations climatiques annuelles affectent directement la structure histologique de l'os ainsi que le dépôt des différentes marques de croissance ou s'il existe des relais et, plus précisément, des relais biologiques entre les facteurs externes (température, pluie...) et les propriétés d'enregistrement du tissu osseux.

Les poissons sont des espèces poïkilothermes. Quand elles vivent en climats tempérés, celles-ci sont exposées à la saisonnalité de facteurs externes induisant des cycles biologiques annuels, tout particulièrement pour la croissance corporelle et, bien sûr, pour celle du squelette. D'autres fonctions biologiques cycliques telles que la reproduction peuvent induire des marques de croissance cycliques, généralement des LAC. Dans de nombreuses études sur les poissons vivant en pays tempérés, un jeu de marques de croissance (zone + *annulus* et/ou LAC) est déposé, chaque année, comme cela a été validé directement par le marquage vital (voir chap. IV) chez les Ostéichthyens (Casselmann, 1974; Meunier & Pascal, 1981) comme chez les Chondrichthyens (Holden & Vince, 1973; Beamish & McFarlane, 1983; Smith, 1984; Officer *et al.*, 1997, *inter alia*).

Sous climat tropical, la saisonnalité est généralement moins contrastée qu'en région tempérée. Cependant, quelques paramètres physico-chimiques de l'environnement montrent une variation cyclique annuelle plus ou moins faible mais suffisante pour induire et synchroniser des marques de croissance cycliques. En Afrique tropicale comme en Amazonie, les saisons sèches et humides jouent respectivement le même rôle que l'hiver et le printemps des contrées tempérées. L'expression histologique de cette alternance saison sèche-saison humide est bien marquée dans les os de poissons (Quick & Bruton, 1984; Lecomte *et al.*, 1985, 1986, 1989).

Pour le *Lethrinus nebulosus* néo-calédonien, les paramètres physico-chimiques environnementaux sont apparemment stables tout au long de l'année; la température est le seul facteur présentant des fluctuations annuelles significatives mais de faible amplitude : 20,5 à 26,5 °C (Meunier *et al.*, 1979). Cette faible amplitude de la température

semble suffisante pour synchroniser un cycle de croissance annuel du poisson et pour induire la mise en place sur les éléments squelettiques de marques de croissance indiscutables : zones de croissance active et LAC notamment sur les épines de la première nageoire dorsale (Meunier *et al.*, 1979).

Des accroissements saisonniers mais à périodicité sub-annuelle ont été décrits chez des poissons de régions tropicales. Il est donc important d'attirer l'attention sur les cycles de croissance de certaines espèces. Un échantillonnage mensuel sur plusieurs années consécutives en Guyane française a montré que des espèces comme *Arius couma* et *A. proops* (deux Siluriformes), *Leporinus friderici* (Anostomidae) et *Myleus rhomboidalis* (Serrasalimidae) déposent dans leur squelette (rayons épineux pour les Siluriformes, operculaires pour les deux autres) deux « zones » et deux « annuli » par an (Lecomte *et al.*, 1985, 1989, 1993 ; Boujard *et al.*, 1991 ; Meunier *et al.*, 1997). Les deux périodes de croissance active alternent avec deux périodes de croissance ralentie correspondant respectivement aux saisons humides et sèches. Des doubles cycles de croissance annuels sont aussi connus en Afrique tropicale pour des espèces d'eau douce (Garrod, 1959 ; Okedi, 1969 ; Bruton & Allanson, 1974 ; Blake & Blake, 1978 ; Robben & Thys van den Audenaerde, 1984) et des espèces marines (Poinsard & Troadec, 1966 ; Warburton, 1978). Un autre cas d'*annulus* formé deux fois par an (« biannuli ») est celui d'*Oreochromis niloticus* du lac Awassa (Éthiopie) qui a deux saisons annuelles de reproduction séparées par environ six mois (Yosef & Caselman, 1995).

3.2. Métabolisme du calcium

L'hyperminéralisation des *annuli* est fréquente (par exemple : carpe, poissons-chats, thons) mais avec des exceptions comme *Lethrinus nebulosus* qui ne montre pas de marques de croissance hyperminéralisées (Meunier *et al.*, 1979). Quand elle est présente, cette hyperminéralisation ne peut pas être attribuée à des variations de la concentration du calcium plasmatique. Effectivement, dans le cas de la carpe adulte, par exemple, il y a une hypercalcémie plasmatique annuelle en juin-juillet (Meunier & Pascal, 1981), c'est-à-dire au moment où la croissance du squelette est la plus active. La différence de minéralisation entre « zones » à croissance rapide et « annuli » à croissance ralentie doit être recherchée dans des différences physico-chimiques de la matrice organique. De plus, ces différences du degré de minéralisation de l'os se maintiennent pendant toute la durée de vie des animaux ; il n'y a pas de minéralisation standard du tissu osseux des Ostéichthyens.

3.3. Alimentation

L'alimentation est directement sous le contrôle de la saisonnalité dans les pays tempérés. Effectivement, la nourriture est rare ou inexistante durant l'hiver. En conséquence, la prise alimentaire et, par suite, la croissance pondérale décroissent significativement pendant cette

période. Dans les pays tropicaux, l'alimentation peut aussi être un lien important entre saisonnalité et croissance corporelle. Durant la saison humide, les rivières débordent et les poissons envahissent les sous-bois inondés où la nourriture est abondante et riche. Par exemple, en Guyane française, le coumarou, *Myleus rhomboidalis*, qui présente des marques de croissance caractéristiques (Lecomte *et al.*, 1993), se nourrit pendant la saison humide de plantes à haute valeur énergétique et durant la saison sèche de feuilles de Podostemonaceae (« herbe à coumarou ») à valeur nutritive plus faible (Boujard *et al.*, 1990). Une autre espèce guyanaise, *Leporinus friderici*, qui est un poisson omnivore, se nourrit essentiellement de graines, de fruits et d'insectes terrestres qu'il trouve dans les sous-bois inondés et semble jeûner au fond des rivières pendant la saison sèche (Boujard *et al.*, 1990). De telles observations ont été faites à l'ensemble de l'échelle amazonienne (Lowe-McConnell, 1964, 1979; Goulding, 1980; Junk, 1985, *inter alia*).

3.4. Reproduction

La reproduction est une autre fonction vitale qui est étroitement liée à la saisonnalité. Ses effets sur la croissance peuvent être en synergie avec ceux de la période au métabolisme réduit (c'est-à-dire pendant l'hiver) ou bien décalés vers la saison à forte activité métabolique. Dans le second cas, la reproduction peut conduire à la formation de « fausses marques » de croissance au milieu d'une « zone ».

L'acquisition de la maturité sexuelle est une composante importante de l'activité métabolique globale de l'organisme qui doit alors allouer une partie de ses dépenses énergétiques pour la reproduction aux dépens de sa croissance corporelle qui, de fait, diminue, tout comme la croissance du squelette. En conséquence, les *annuli* et/ou LAC successifs deviennent significativement plus rapprochés (Meunier *et al.*, 1979). Quand le poisson vieillit (spécialement chez les formes longévives), les « zones » peuvent devenir si resserrées que le décompte des *annuli* peut être difficile et produire des résultats peu réalistes, par exemple pour l'esturgeon.

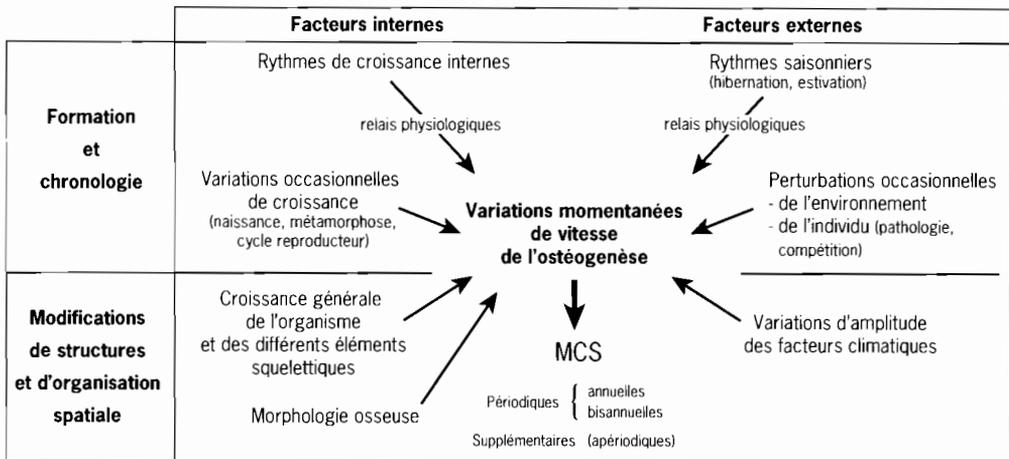
Nous avons vu plus haut (chap. II.C.2.2) que la reproduction peut être responsable des marques de croissance sur les écailles, spécialement chez les Salmonidés (Dahl, 1907, 1911; Johnston, 1905, 1907, 1908, 1910, *inter alia*). Ceci est certainement lié au métabolisme du calcium par suite des forts besoins pour ce cation durant la maturation génitale (voir Persson, 1997, *inter alia*). Les écailles étant un réservoir de calcium disponible, leur intégrité est affectée par des processus d'érosion ostéoclastique libérant l'élément minéral dans l'organisme.

4. Conclusion

Il apparaît que les tissus osseux adaptent précisément leur structure en fonction des variations environnementales par l'intermédiaire de relais physiologiques. De nombreux événements durant la vie du poisson sont

ainsi finement enregistrés par les structures osseuses : cycles saisonniers, changements de biotope et/ou de mode de vie (migrations) et première maturation sexuelle (tab. II.C.3). En conséquence, l'étude histologique des marques de croissance dans l'os primaire peut être une méthode tout à fait adaptée à l'estimation de l'âge individuel d'un poisson, spécialement quand l'otolithométrie et la scalimétrie sont défailtantes. Cependant, la méthode squelettochronologique requiert une connaissance aussi précise que possible de la biologie des animaux puisque la croissance du squelette est sensible à de nombreux facteurs internes et externes. Comme pour la scalimétrie et l'otolithométrie, la validation (marquage vital, échantillonnage mensuel..., voir chap. IV) est une étape nécessaire pour tester l'hypothèse du rythme de croissance annuel.

Tableau II.C.3 - Facteurs internes et externes et organisation spatio-temporelle des marques de croissance squelettiques (MCS) (d'après Castanet *et al.*, 1993).



Quand la squelettochronologie est appliquée de façon appropriée et, si la structure squelettique est adaptée, elle peut conduire à de nombreuses applications pratiques dans les études de dynamique des populations. Elle peut avoir d'autres applications en paléobiologie et archéologie. Des hypothèses paléophysiological (Casteels, 1974 sur des vertèbres) et/ou paléoclimatiques (Burdak, 1979 avec des écailles) peuvent être proposées chez certains Ostéichthyens grâce à l'étude des marques de croissance cycliques sur des pièces osseuses appropriées (ou des écailles et même des otolithes) et par comparaison avec les espèces vivantes actuelles (Van Neer, 1993a). L'analyse squelettochronologique des os de sites archéologiques, si le matériel est abondant et toujours par référence à l'actuel, peut apporter des données intéressantes sur la nourriture des peuples préhistoriques et sur leurs techniques de pêche : taille et/ou âge des poissons capturés, saisonnalité de la pêche, engins de pêche (Desse & Desse, 1983 ; Van Neer, 1993b ; Van Neer *et al.*, 1999).

Chapitre III

Bases de la sclérochronologie

Contrairement aux idées reçues, la sclérochronologie, en particulier l'estimation de l'âge chez les poissons, n'est pas une science aisée. Elle implique une série de processus et de traitements de données qui sont souvent complexes et consommateurs de temps. Avant même de commencer de telles études, il est nécessaire de connaître à l'avance les contraintes sur le temps disponible et sur les coûts et, particulièrement, les objectifs de l'étude ainsi que les résultats attendus. Ce chapitre va aider à choisir la pertinence de telle ou telle technique et de tel ou tel protocole de recherche :

- la distinction est faite ici entre les études dédiées aux estimations de l'âge et celles dédiées à la connaissance des traits de vie des individus (âge à la maturité, longévité, métamorphose, recrutement, migrations, etc.);
- en ce qui concerne la méthodologie, la discussion porte sur la difficulté d'observer les marques de croissance et sur la forme en 3D représentée par la pièce calcifiée au cours de sa croissance. La complexité de cette forme et des patrons de croissance sous-jacents influence en particulier les stades initiaux de préparation des PC.

A. Estimation de l'âge

B. Morales-Nin, J. Panfili

L'estimation de l'âge implique différentes étapes, du choix de la PC qui sert à cette estimation au niveau de précision requis, en passant par les différents problèmes techniques touchant à la préparation et à l'observation des marques de croissance. Le patron de croissance doit être sélectionné et sa signification temporelle doit être déterminée par ailleurs. De plus, le lecteur doit aussi acquérir de l'expérience dans son interprétation de façon à assurer la cohérence de ses critères de reconnaissance et à les transmettre ou à les comparer avec d'autres experts. Une fois ce processus terminé, il devrait être répété et renouvelé à intervalles de temps réguliers pour conserver une cohérence.

L'estimation de l'âge est donc un processus dynamique qui peut être résumé en sept étapes séparées :

- sélection de une ou plusieurs PC, en fonction de leur présence ou de leur absence, des problèmes de résorption et de synchronisme de la croissance des PC dans la population (chap. II);
- reconnaissance des patrons de croissance, incluant la périodicité des marques de croissance étudiées et la gamme de temps couverte (chap. II);
- choix de la méthode de préparation, en fonction des problèmes techniques, de la lisibilité des marques de croissance avec cette méthode et du degré de précision attendu (chap. VIII);
- confirmation de la cohérence et intercalibration (interprétations multiples par un et/ou plusieurs lecteurs) (chap. IV);
- validation de l'exactitude de l'interprétation (i.e. temps écoulé entre les marques de croissance interprétées) (chap. IV);

- formalisation de l'expérience et de la connaissance dans l'interprétation des marques de croissance ;
- application des résultats obtenus (chap. V et VII).

1. Critères de choix des pièces calcifiées

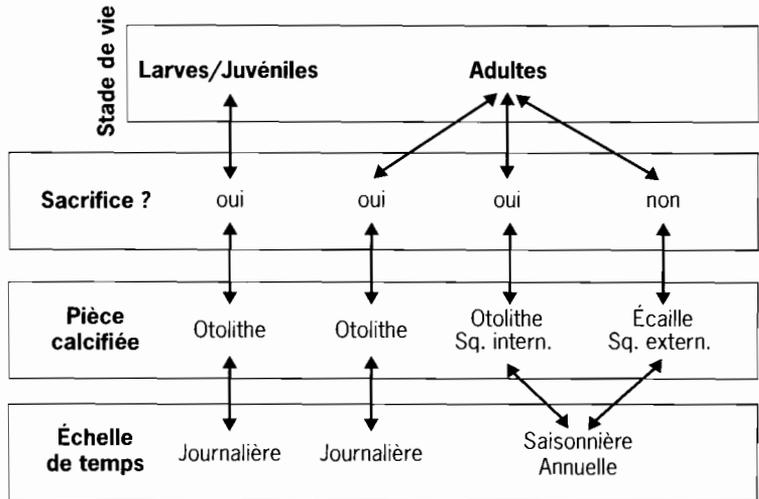
En fonction de la pièce calcifiée choisie, il peut être nécessaire de tuer l'individu pour pouvoir l'extraire (e.g. pour les éléments du squelette interne ou les otolithes). Le choix de la PC va ainsi dépendre d'abord de la nécessité de sacrifier ou non le poisson (fig. III.A.1). Souvent, les échantillonnages en criée lors des débarquements ne permettent pas de mutiler ou de détériorer l'individu, car il peut y avoir une incidence sur la vente, et des précautions doivent être prises pour extraire par exemple les otolithes (chap. VIII.B.3.1.4). Ensuite, selon les espèces, la présence ou non de la PC va déterminer la limite des choix possibles. Par exemple, pour les espèces dépourvues d'écaillés (e.g. Siluriformes) ou présentant de très petites écaillés facilement perdues (petits pélagiques) ou pour les espèces sans otolithes (e.g. Élasmobranches), d'autres structures doivent être utilisées. Pour les grands pélagiques comme les thons, les espadons et les Istiophoridae, qui possèdent de très petits otolithes comparés à la taille du poisson, les vertèbres sont très fréquemment utilisées. Mais, ces généralités souffrent cependant de nombreuses exceptions. D'autres os, comme les rayons de nageoires, les épines, les *cleithra* ou les operculaires, sont plus rarement utilisés. Ils peuvent cependant être très utiles pour les Siluriformes, d'autant plus que les connaissances sur les otolithes de ces espèces sont très limitées. Les épines des nageoires dorsales sont aussi employées pour quelques espèces de grands pélagiques et pour quelques espèces tropicales comme les Balistidae.

Le degré d'exactitude requis dans les estimations d'âge et pour les stades de vie étudiés influence également le choix d'une structure calcifiée plutôt qu'une autre (fig. III.A.1). Comme les marques de croissance journalières ne sont présentes que dans les otolithes, ce sont les structures qui seront obligatoirement utilisées pour accéder à cette échelle de temps. Pour les larves et les juvéniles, les otolithes sont d'ailleurs le seul choix possible. Les otolithes ont aussi une caractéristique particulière qui les rend parfois incontournables, c'est qu'ils ne jouent pas le rôle de réservoir à calcium, comme le font les écaillés et les éléments du squelette interne (Simkiss, 1974). Ils ne sont donc presque jamais résorbés, sauf sous des conditions de stress extrêmes (chap. II.A) et conservent ainsi la séquence complète des marques de croissance enregistrées.

Parmi les trois types d'otolithes, la *sagitta* est le plus fréquemment utilisée sauf chez les Ostariophysés pour lesquels l'*asteriscus* est le plus gros. Dans des études sur les larves ou les juvéniles, ou même sur les poissons adultes, le *lapillus* a pu être utilisé à cause de sa petite taille et de sa facilité de préparation (les accroissements journaliers peuvent être observés directement sur les *lapilli* entiers ou après seulement un léger polissage). Cependant, le démarrage de la formation des otolithes

Figure III.A.1

Choix d'une pièce calcifiée en fonction de l'échelle de temps étudiée, du stade de vie considéré et de la nécessité de sacrifier ou non l'individu pour une étude de sclérochronologie.
 Sq. extern., pièces du squelette externe;
 Sq. intern., pièces du squelette interne.



peut ne pas être synchrone entre les trois paires, la *sagitta* et le *lapillus* étant formés en premier lieu. Ils ne peuvent donc pas être employés indistinctement (Secor *et al.*, 1992).

2. Sélection des marques de croissance

Les critères de sélection pour les marques de croissance présentes dans les PC sont les suivants :

- leur netteté et leur facilité d'identification ;
- la régularité de leur périodicité ;
- leur synchronisme dans une population donnée.

Le degré de précision requis dans l'étude et les stades de vie considérés sont également d'autres informations nécessaires à la sélection appropriée des marques de croissance : journalières, saisonnières ou annuelles. Les stades larvaires et juvéniles ne présentent pas de marques de croissance saisonnières ou annuelles, orientant naturellement le choix vers les marques d'accroissement journalières. Ce choix peut également être indiqué ou le seul disponible pour les espèces à faible longévité (durée de vie de moins de un ou deux ans). Les marques de croissance saisonnières sont employées lorsque leur échelle temporelle convient pour la population étudiée. Lorsqu'elles existent, ces marques sont présentes sur toutes les PC, des os du squelette interne aux otolithes. D'ailleurs, la plupart des études d'estimation de l'âge sont basées sur les marques saisonnières et, plus particulièrement, sur les accroissements annuels qui permettent de donner un âge aux espèces de poissons depuis les tropiques jusqu'aux régions polaires. Contrairement à des idées faussement véhiculées, le changement des saisons sous les tropiques, même à une très petite échelle, conduit à des rythmes saisonniers de dépôts sur les PC, les rendant appropriés pour estimer l'âge des espèces de ces régions. Cette observation reste plus discutable pour les espèces des régions réellement équatoriales où les transitions saisonnières sont très peu ou non marquées. Pour les poissons adultes ou les

espèces à forte longévité, la présence de discontinuités structurales dans les otolithes et la complexité à dénombrer des accroissements journaliers rendent cette dernière méthode moins pertinente. L'utilisation des marques quotidiennes pour estimer l'âge en nombre d'années n'est pas souhaitable, sauf pour des raisons spéciales. De plus, le temps nécessaire à la préparation de lames minces, qui sont pratiquement les seules à permettre la lecture des accroissements journaliers sur les otolithes des poissons adultes, limite aussi la faisabilité de cette méthode pour les otolithes volumineux et épais.

Les méthodes de préparation des PC sont généralement plus simples quand on traite des marques de croissance saisonnières plutôt que des marques quotidiennes, allant de la simple observation de la PC en entier à la préparation de coupes après inclusion dans de la résine (e.g. lames minces d'otolithes). Le temps nécessaire pour préparer une unique pièce est très variable en fonction de la méthode utilisée. Pour les très petits otolithes, les marques journalières peuvent être observées directement sans aucune préparation mais il est souvent nécessaire d'employer des méthodes beaucoup plus complexes pour pouvoir observer ces marques (e.g. ponçage et polissage après enrobage dans de la résine, lames minces, MEB, etc.). L'utilisateur devra donc être soucieux d'évaluer ces paramètres (niveau de préparation, durée de préparation, etc.) avant de commencer son étude. Il devra obligatoirement faire la synthèse des références des autres techniques utilisées avant lui par d'autres expérimentateurs, en particulier dans la littérature scientifique.

L'identification des marques d'accroissement saisonnières et/ou journalières n'est jamais aisée, à cause de la présence d'anneaux doubles, de discontinuités ou d'autres structures qui correspondent à des événements acycliques (e.g. migration, reproduction, etc.). L'identification est donc basée sur leur netteté, leur continuité sur l'ensemble de la PC, leur épaisseur et leur largeur (chap. III.C). Les marques doivent théoriquement décroître en largeur depuis le centre de la PC jusque vers son bord, en relation avec la réduction du taux de croissance avec l'âge (chap. V).

Un autre critère pertinent pour sélectionner une marque de croissance à étudier est le nombre total de poissons qui doit être traité. Ceci inclut également les coûts d'échantillonnage, de préparation des PC, et le temps nécessaire pour les préparations et pour les interprétations. L'utilisation des marques de croissance journalières pour les juvéniles et les adultes est consommatrice de temps (voir ci-dessus et chap. VIII) si l'on désire prendre en compte la séquence de croissance depuis le centre de l'otolithe jusqu'à sa marge extrême. Par exemple, le temps nécessaire pour une personne entraînée pour monter, poncer et polir un otolithe pour obtenir une lame mince est compris entre une et deux heure(s). Préparer un grand nombre de lames minces pour une analyse peut limiter l'utilité de la méthode. Un autre élément à considérer est le fait que, pour certaines espèces et à certains moments de leur cycle de vie (e.g. migration), la dimension des accroissements journaliers puisse se situer en dessous des limites de détection de la microscopie photonique (Campana *et al.*, 1987 ; Morales-Nin, 1988).

Avant de commencer une nouvelle étude, il est donc nécessaire de juger de la pertinence du choix de la PC et des marques de croissance. Le tableau III.A résume l'ensemble de ces considérations. La présence éventuelle de centres de croissance secondaires ou d'autres structures qui pourraient interrompre les patrons de croissance visibles doit aussi être prise en compte dans l'évaluation de la capacité d'une PC à répondre à la question initiale.

Tableau III.A. - Quelques considérations pour le choix d'une pièce calcifiée et des marques de croissance pour une étude de sclérochronologie.

	Otolithe	Écaille	Os
Préparation	+/- longue	aucune	+/- longue
Marques de croissance (échelle de temps)	- primaire (<i>journalière</i>) - opaque (<i>saisonnaire</i>) - translucide (<i>saisonnaire</i>) - discontinuité (<i>apériodique ou saisonnière</i>)	- <i>circuli</i> - discontinuité (<i>saisonnaire</i>)	- opaque (<i>saisonnaire</i>) - translucide (<i>saisonnaire</i>) - discontinuité (<i>saisonnaire</i>)
Avantage	- pas de résorption - parfois pas de préparation	- pas de sacrifice - pas de préparation	- parfois pas de sacrifice
Désavantage	- sacrifice obligatoire - durées de préparation et d'interprétation parfois très longues	- régénération - résorption et remaniement	- résorption et remaniement (parfois important) - durée de préparation parfois très longue

3. Processus d'estimation de l'âge

La première étape du processus d'estimation de l'âge réside en la lecture de la pièce calcifiée sélectionnée en utilisant les marques de croissance appropriées pour les objectifs de l'étude. La deuxième étape consiste à interpréter les résultats en termes d'âge et à donner des applications (chap. V).

Pour les populations et/ou les espèces considérées, certains critères d'interprétation incontournables doivent être définis d'emblée : par exemple, la localisation de la marque de naissance, la première marque de croissance, les zones de transition sur la PC ou encore la nature du bord de la PC, etc. L'information biologique disponible sur l'espèce via la littérature doit être utilisée dans un premier temps pour définir ces critères de façon empirique. Ils peuvent être comparés entre eux de façon à établir un « alphabet » (identification des marques de croissance) et à déterminer des « règles grammaticales » (critères d'interprétation basées sur les connaissances existantes) pour attribuer les âges (Sych, 1974).

La cohérence du processus d'estimation de l'âge doit ensuite être déterminée. Cela signifie qu'il faut être capable d'identifier constamment les mêmes structures de croissance. La répétabilité de la procédure d'estimation (biais interne) doit être déterminée et les âges estimés doivent être calibrés (biais externe) avec d'autres experts (chap. IV.D). L'expérience du lecteur est un facteur essentiel pour pouvoir réduire les différents biais possibles. Cependant, des lecteurs expérimentés pour une

espèce particulière peuvent eux-mêmes donner des résultats inexacts pour une nouvelle espèce. Après avoir atteint un certain niveau d'expertise dans les estimations d'âge, des précautions doivent être prises pour conserver ce savoir et éviter que la méthode mise au point ne se dégrade ou évolue avec le temps. C'est une phase essentielle pour assurer une qualité optimale des procédures d'estimation de l'âge.

Enfin, les estimations doivent être validées et leur exactitude doit être testée. La signification temporelle des marques de croissance interprétées doit donc être déterminée, par ailleurs, pour comparer la valeur de l'âge estimé à celle de l'âge exact de l'individu concerné (chap. IV).

3.1. Estimation de l'âge individuel

L'estimation de l'âge à partir des accroissements journaliers des otolithes donne une valeur de l'âge directe et précise. Cette valeur est calculée à partir du nombre d'accroissements dont l'interprétation a été validée par ailleurs (nombre de zones D ou de zones L) et de l'intervalle déterminé entre l'éclosion et la formation du premier accroissement (chap. II.A.2.1).

À l'opposé, les âges individuels estimés à partir des marques de croissance saisonnières demandent des calculs intermédiaires : ils peuvent être donnés en nombre de mois et/ou en nombre d'années. Après avoir identifié toutes les marques de croissance de la PC, les informations suivantes sont nécessaires pour attribuer un âge correct à l'individu :

- la date de capture ;
- la date de naissance individuelle (exacte ou moyenne ou standardisée pour la population) ;
- les principales périodes de formation de la marque de croissance considérée ;
- la nature du bord de la PC.

La vraie date de naissance des individus d'une population donnée peut être déterminée par des études sur la reproduction et/ou l'analyse des micro-accroissements quotidiens des otolithes mais parfois elle n'est pas connue. Dans ce dernier cas, par commodité et pour faciliter la mise en parallèle des données avec les autres paramètres mesurés sur une base annuelle, la convention est de fixer le 1^{er} janvier comme date de naissance pour tous les individus. Les expériences de validation (chap. IV) permettent de déterminer précisément la période de formation des marques saisonnières sur les PC. La figure III.A.2 montre des exemples de calcul de l'âge en nombre de mois ou en nombre d'années à partir de marques saisonnières pour des poissons capturés à différents moments de l'année. La conversion d'un comptage de marques de croissance en une valeur d'âge estimé implique de mettre en relation la date de formation des marques considérées avec la date de capture individuelle et la date nominale de naissance.

3.2. Définition des groupes et des classes d'âge

Les groupes et classes d'âge individuels sont utilisés fréquemment en dynamique de populations et pour les études des traits d'histoire de

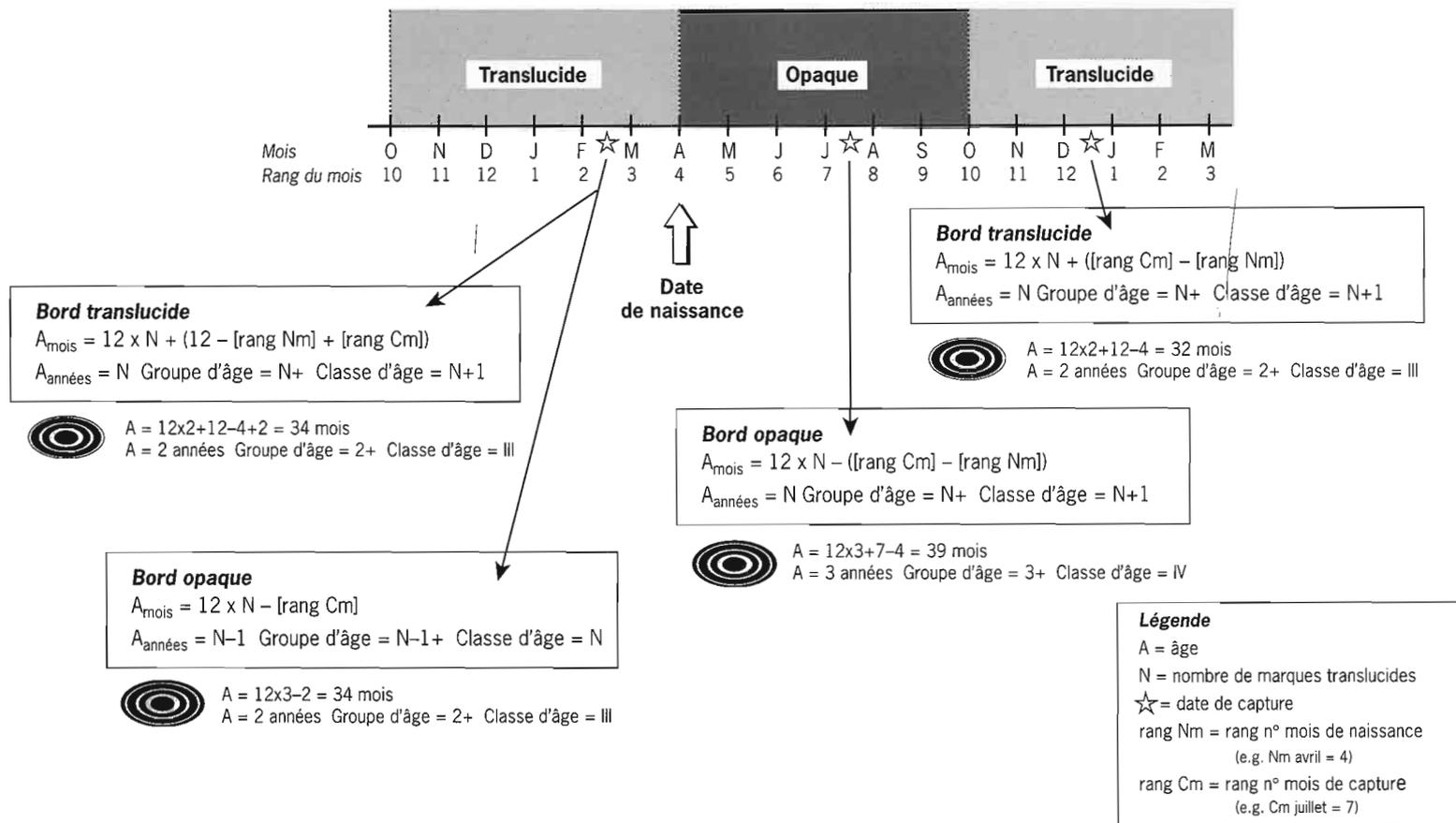


Figure III.A.2 - Calcul théorique de l'âge (en mois et années) et assignation à un groupe d'âge ou à une classe d'âge à partir d'une pièce calcifiée. La date de naissance pour tous les individus de la population considérée est fixée au 1^{er} avril et correspond aussi au début de la formation d'une zone opaque sur la PC. La validation a démontré que chaque année une zone translucide et une zone opaque sont déposées. L'âge est calculé en comptant le nombre de zones translucides, mais en tenant compte également de la date de naissance et de la date de capture. Une règle fixée au départ stipule qu'une zone translucide marginale n'est pas comptée comme une nouvelle marque annuelle. Des exemples d'estimation de l'âge pour des individus capturés à différentes périodes de l'année sont présentés. Pour une date de capture donnée (e.g. février), la nature du bord de la PC peut être différente d'un individu à l'autre (opaque ou translucide), mais l'âge estimé est le même.

vie des populations. Dans ces cas-là, l'âge est donné en nombre d'années. Après avoir identifié les marques de croissance sur la PC, le lecteur peut simplement estimer l'âge du poisson en comptant le nombre d'anneaux saisonniers sur une base annuelle. Comme pour l'estimation de l'âge individuel, un certain nombre d'informations supplémentaires doivent être prises en compte :

- la date de capture ;
- le pic dans la période de reproduction de la population (exact, ou moyen ou standardisé pour la population) ;
- les principales périodes de formation de la marque saisonnière de croissance considérée (voir les études de validation, chap. IV) ;
- la nature du bord de la PC.

Afin de déterminer, à partir de la PC, le groupe ou la classe d'âge auquel appartenait le poisson, il est nécessaire de compter le nombre de marques annuelles depuis le centre jusqu'au bord de la PC. Si la date de capture est connue, il est possible de calculer l'année durant laquelle l'individu a vu le jour. Les chiffres arabes sont traditionnellement utilisés pour coder les groupes d'âge alors que les chiffres romains sont utilisés pour les classes d'âge. Dans l'exemple de la figure III.A.2, les marques translucides sont dénombrées pour estimer l'âge. La règle suivie est que si la marque marginale est translucide, elle n'est pas comptée car elle n'est pas totalement formée. L'assignation à un groupe ou une classe d'âge dépend de l'année de naissance de l'individu et de la date de capture. Le groupe d'âge correspond au nombre d'années calendaires après la naissance. La classe d'âge correspond au nombre d'années écoulées depuis la naissance. La dernière cohorte d'une population (les « jeunes de l'année ») comprend les individus âgés de 0 à 12 mois et constitue le groupe d'âge 0+ et la classe d'âge I. Les individus nés l'année précédente constituent le groupe d'âge 1+ et la classe d'âge II. L'année de naissance est l'année calendaire pendant laquelle le poisson est né. Dans la figure III.A.2, le poisson capturé en juillet 2000 est né en avril 1997.

Dans le cadre de la gestion d'un stock de poissons, la date de naissance véritable est généralement considérée comme inconnue car la période de ponte peut varier légèrement d'une année à l'autre ou, pour certaines espèces (par exemple *Merlangius merlangus*), la saison de ponte peut s'étendre jusqu'à quatre ou cinq mois. Aussi, pour faciliter la collecte des données de sources diverses dans l'hémisphère Nord et pour les différentes espèces de poissons, la date du 1^{er} janvier est fixée comme date de naissance. Une marque annuelle est normalement prise en compte seulement si la zone translucide qui lui correspond est complète et ceci se produit généralement vers les mois de mars-avril. Cependant, à cause de la date de naissance fixée au 1^{er} janvier, même si une zone translucide en bordure est incomplète, elle est comptée comme une marque annuelle terminant sa formation entre janvier et mars. Au 1^{er} janvier de chaque année, le poisson appartenant à une cohorte donnée passe dans le groupe et la classe d'âge supérieurs.

B. Événements marquants de l'histoire individuelle

A.J. Geffen, H. de Pontual, P.J. Wright, H. Mosegaard

1. Âge de la maturité sexuelle

La reproduction engendre une forte demande énergétique chez les poissons et le passage à l'état mature peut être associé à un ralentissement de la croissance somatique, au bénéfice de la constitution de réserves pour l'activité reproductrice. Ce phénomène affecte la croissance des pièces calcifiées et l'influence de la reproduction est souvent enregistrée de manière permanente sur les écailles et les otolithes. Des marques ou discontinuités de reproduction (Williams & Bedford, 1974) ont été rapportées pour de nombreuses espèces, mais il n'existe pas de travaux expérimentaux publiés qui aient établi, de façon précise, les relations entre la reproduction et les discontinuités observées. En théorie, le processus de gamétogenèse utilise à la fois de l'énergie et des réserves de calcium qui pourraient, en d'autres circonstances, être affectées à la croissance des tissus calcifiés. L'ovogenèse implique, en particulier, la production de vitellogenine, qui est une protéine chélatrice du calcium. Kalish (1991a) a observé des variations significatives de la concentration en Ca libre dans le plasma sanguin et dans l'endolymphée liées à l'augmentation des indices gonadosomatiques. Ainsi, pour les poissons femelles, on observe une diminution de la quantité de Ca disponible pour la croissance de l'otolithe. Observées sur les otolithes de poissons femelles, les zones translucides étroites ont été considérées comme hypominéralisées, du fait de la disponibilité réduite en calcium pendant la maturation de la gonade (chap. VII.E.2.2). Cependant, une structure translucide est pauvre en protéines et riche en Ca et les structures translucides observées pourraient résulter d'une diminution du taux de synthèse des protéines constitutives de l'otolithe ainsi que d'autres tissus. En effet, la prise alimentaire est également réduite pour un certain nombre d'espèces pendant les étapes finales de la maturation et lors de la ponte. Cette hypothèse est clairement en conformité avec l'observation ancienne, sur la morue norvégienne arctique (*Gadus morhua*) (Rollefsen, 1933), d'une correspondance entre l'âge de la maturité et l'apparition d'*annuli* étroits avec une zone translucide relativement plus large.

Étant donné que le patron de croissance d'une pièce calcifiée peut changer de manière significative après la maturité sexuelle, on peut souvent estimer directement l'âge de la première maturité par l'observation de la zone correspondant à la période juvénile (sub-adulte). Les poissons qui mûrissent tardivement peuvent présenter de nombreux *annuli* réguliers et l'âge de la première maturité peut être facilement estimé au moyen de méthodes conventionnelles. Pour d'autres espèces,

notamment celles qui mûrissent à moins d'un an, il est nécessaire d'utiliser l'otolithe et d'estimer l'âge de la première maturité par le dénombrement des microstructures. Les espèces diadromes peuvent présenter une complication supplémentaire du fait que les effets de la migration et de la maturation sexuelle ne sont pas toujours synchronisés. Pour les espèces qui effectuent des migrations de reproduction, les difficultés sont moindres, la transition entre les eaux douces, estuariennes et marines pouvant accentuer les marques de reproduction (ou la reproduction accentuer les marques de transition). Cependant, les migrations trophiques peuvent aussi induire des discontinuités ou des variations du patron de croissance des pièces calcifiées, ce qui peut obscurcir le patron induit par l'activité reproductrice.

2. Durée de vie (longévité)

La capacité à estimer l'âge des poissons à partir des PC peut permettre l'estimation directe de la longévité des individus, des populations et des espèces. Pour les espèces à faible longévité, notamment celles qui vivent un an ou moins, la longévité ne peut être étudiée que par le dénombrement des microstructures des otolithes (chap. III.A). Pour ce type d'espèce, l'estimation précise de la longévité peut être compliquée par les effets de la reproduction (voir ci-dessus, chap. III.B.1).

Pour les espèces à durée de vie plus longue, différentes méthodes sont possibles puisque des marques de croissance annuelles peuvent être observées sur divers tissus calcifiés. Basée sur notre capacité à estimer l'âge, l'estimation de la longévité peut être souvent vérifiée en comparant différentes PC (chap. IV.D). Cependant, l'avantage apparent de pouvoir comparer les informations sur l'âge en utilisant différentes méthodes et structures peut générer des controverses. Il existe des contradictions non résolues relatives aux âges maximaux enregistrés sur diverses PC de *Sebastes* spp. De même, l'analyse des microstructures et des macrostructures des otolithes d'*Hoplostethus atlanticus* aboutit à des estimations d'âge très divergentes. Sur la base des macrostructures, la longévité est estimée à plus de 70 ans alors que l'analyse des microstructures aboutit à une longévité estimée à moins de 40 ans. Quand différentes pièces (otolithes, écailles ou os) sont comparées, il faut également noter que les relations d'allométrie entre la croissance somatique et la croissance de la PC dépendent de la PC (Casselman, 1990), ce qui peut influencer sur la capacité de la PC à refléter des variations annuelles chez des poissons âgés. On a pu ainsi montrer que, chez de très vieux poissons, l'analyse des écailles aboutit à une sous-estimation de l'âge par rapport à celui estimé à partir des otolithes.

Les estimations de la longévité peuvent parfois être validées par des techniques de datation radiométrique (chap. VII.E.3). Ces chronomètres chimiques ne fournissent pas des estimations précises de l'âge en raison des limitations techniques actuelles et, jusqu'à présent, ils n'ont été appliqués avec succès qu'aux seules espèces à longévité élevée.

3. Métamorphose et colonisation

Pour la plupart des espèces de poissons, la métamorphose est une phase de transition qui marque la fin de la période larvaire. Une fois la métamorphose achevée, les poissons sont considérés (et souvent définis) comme ressemblant à la forme adulte de l'espèce. On considère parfois que la différence entre les poissons récemment métamorphosés et les adultes n'est qu'une question de taille et de maturité sexuelle. En fait, les conditions et la durée de cette phase de transition varient considérablement d'une espèce à l'autre. Dans le contexte des études de sclérochronologie, les caractéristiques-clés de la métamorphose sont l'arrêt de la respiration cutanée et l'achèvement de l'ossification. Ainsi, vers la fin de la métamorphose, les poissons possèdent des structures squelettiques complètes et des écailles, et les échanges ioniques avec l'environnement sont limités aux transports à travers les branchies et le tractus digestif.

Puisque l'ossification complète définit la fin de la métamorphose, les otolithes sont les seuls à pouvoir être utilisés pour étudier des événements et processus antérieurs ou concomitants à cette phase du cycle vital. La métamorphose est associée à des changements physiologiques, morphologiques, comportementaux impliquant souvent un changement d'habitat. Chez certaines espèces, il s'agit de mutations profondes qui se produisent sur une courte durée alors que, pour d'autres espèces, les transformations sont progressives. N'importe lequel de ces événements peut induire des changements dans la formation de l'otolithe, engendrant une modification de la forme de l'otolithe ou du patron de croissance. Les anguilles subissent en particulier des changements très importants à la fois au niveau de l'aspect et de la composition chimique des otolithes, phénomènes pouvant être directement reliés aux changements physiologiques survenant pendant la métamorphose (Antunes & Tesch, 1997 ; Otake *et al.*, 1994, 1997).

Le changement le plus fréquemment observé dans la forme de l'otolithe est induit par les centres accessoires de croissance (*primordia* accessoires) qui apparaissent habituellement à la fin de la métamorphose. Ceux-ci ont été décrits pour plusieurs espèces de Gadiformes et de poissons plats (fig. III.B). Il existe un lien étroit entre le déroulement des événements liés à la métamorphose et l'apparition des *primordia* accessoires chez la plie (*Pleuronectes platessa*) (Modin *et al.*, 1996). Chez les lançons (*Ammodytes marinus*), l'achèvement de la métamorphose est associé à la formation d'un *primordium* secondaire post-rostral (voir glossaire ; Wright, 1993). Chez *Microstomus pacificus* (Toole *et al.*, 1993), les *primordia* accessoires semblent se former tout au long d'une longue phase de métamorphose. Des changements dans la densité optique et dans la taille des accroissements peuvent également accompagner la métamorphose. Ces changements peuvent être progressifs et concerner plusieurs accroissements, ce qui est observé

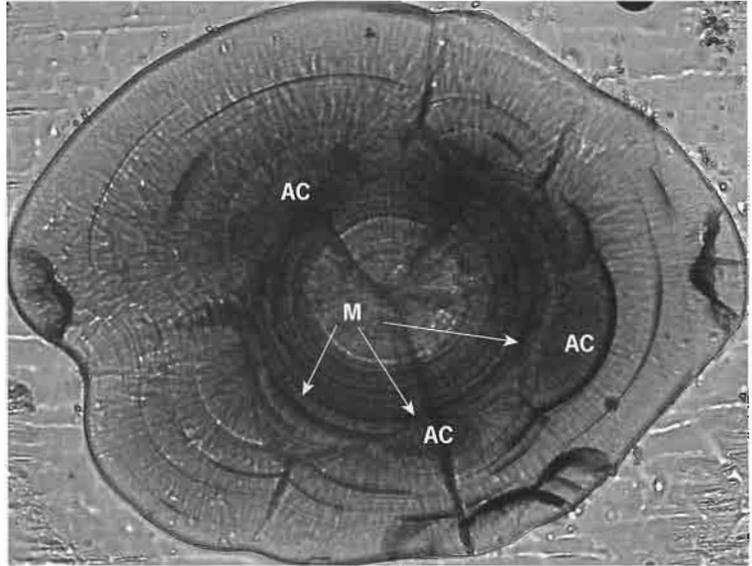
chez le hareng (*Clupea harengus*), ou peuvent être plus brusques, comme pour certaines espèces de récifs coralliens (Victor & Brothers, 1982).

Figure III.B

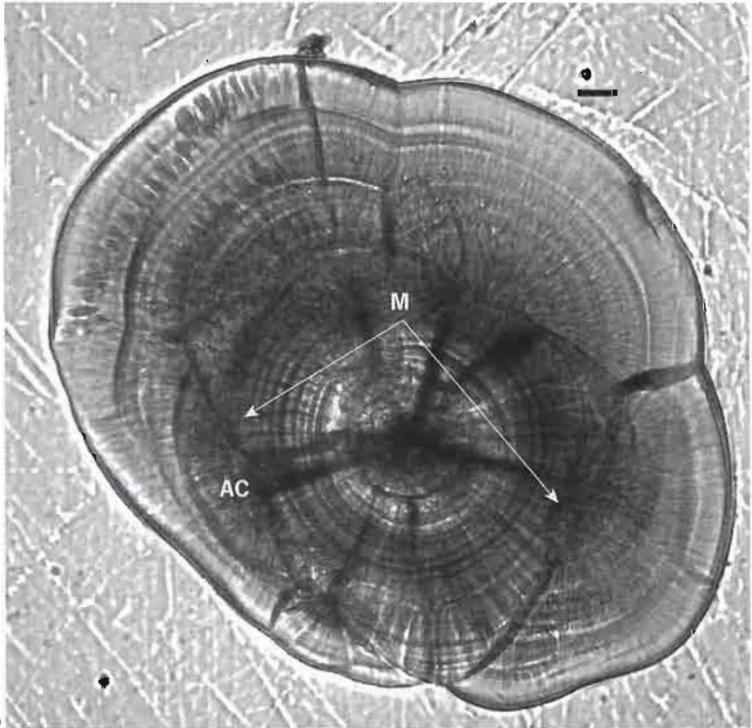
Otolithes de juvéniles de *Pleuronectes platessa* montrant l'accroissement fortement contrasté de l'initiation de la métamorphose (M) et les *primordia* accessoires (AC) formés à la fin de la métamorphose. Le temps minimal écoulé depuis la colonisation est estimé à partir du premier accroissement entourant complètement les *primordia* accessoires.

Échelle = 10 μ m.
(photos A.J. Geffen).

a) poisson de 30 mm, quatre semaines environ après la colonisation.
b) poisson de 25 mm, deux semaines environ après la colonisation.



a



b

L'existence de ces structures permet la réalisation d'études détaillées sur la durée de la phase larvaire, utiles dans les investigations concernant la dispersion larvaire, les dynamiques de métapopulations et le comportement au moment de la reproduction. Dans certains cas, la formation de microstructures journalières a été validée avant, pendant et après la métamorphose, permettant ainsi la réalisation d'études détaillées sur les phases de transition de l'histoire précoce des poissons. Dans d'autres cas où la validation n'a pas inclus la phase de la métamorphose, il est néanmoins souvent possible d'estimer l'âge au début de la métamorphose et la date de son achèvement (fig. III.B).

Les changements physiologiques associés à la métamorphose peuvent également être étudiés au moyen de la microchimie de l'otolithe. On peut observer des variations « ontogéniques » de la composition élémentaire à partir de données obtenues sur des transects réalisés du *nucleus* au bord de l'otolithe. Des changements du rapport Sr/Ca ont notamment été décrits (chap. VII.E.2). Il devrait être possible dans l'avenir de comparer l'évolution de ces rapports élémentaires à celle de la croissance après la métamorphose et de l'utiliser comme moyen d'estimation de l'état physiologique individuel.

La plupart des espèces marines et de nombreuses espèces d'eau douce produisent des larves planctoniques. Quand l'habitat du stade adulte est démersal, il existe généralement une phase de transition de la larve planctonique au stade juvénile démersal et cette transition se nomme « colonisation ». Les connaissances relatives au moment de la colonisation et à la durée de la phase larvaire qui la précède sont précieuses pour les études sur le recrutement, le cycle biologique et l'écologie des espèces et des populations. Des marques de colonisation peuvent être souvent identifiées sur les otolithes et résultent soit des changements physiologiques associés à la métamorphose, soit des changements alimentaires et comportementaux induits par la sortie du milieu planctonique, soit par les deux.

On trouve dans la littérature de nombreux exemples de ce type d'applications, le plus commun étant probablement celui de l'utilisation des marques de métamorphose ou de colonisation. Une fois définie la fin de la période larvaire, cela permet d'en estimer la durée et d'étudier la dispersion larvaire. L'étude d'espèces de récifs coralliens se fonde souvent sur des marques d'otolithes pour fixer les dates de colonisation, identifier les cohortes et déterminer la dispersion larvaire (Heath, 1992 ; Kingsford & Atkinson, 1994 ; Schultz & Cowen, 1994). De même, chez les espèces tempérées, les structures de l'otolithe associées à la métamorphose et à la colonisation sont utilisées pour étudier la dynamique des sous-cohortes (Al-Hossaini *et al.*, 1989), les modèles de mortalité (Van der Veer *et al.*, 2000), la durée de la période larvaire (Suthers & Sundby, 1993) et la dispersion larvaire (Desaunay *et al.*, 1996).

4. Migration

De nombreux poissons se déplacent entre différentes masses d'eau au cours de leurs migrations saisonnières. Un grand nombre d'espèces montrent également des variations ontogéniques dans l'habitat qui consistent en un déplacement vers de nouvelles masses d'eau, permanent ou sur le long terme. Les questions relatives à la biologie des espèces et des populations requièrent souvent des informations sur la période de ces migrations. Ces questions peuvent être étudiées par l'examen des variations dans l'aspect des accroissements sur les otolithes et les écailles.

Sur les écailles, les modifications du patron des *circuli* sont utilisées pour identifier des migrations anadromes chez les Salmonidés et permettent également l'obtention d'informations sur les taux de croissance relatifs en eau douce et en mer. De même, le patron des accroissements de l'otolithe est souvent utilisé pour identifier la période des migrations catadromes chez les anguilles. De telles analyses peuvent également servir à discriminer les individus anadromes des individus résidents, là où des populations présentant différents comportements se mélangent.

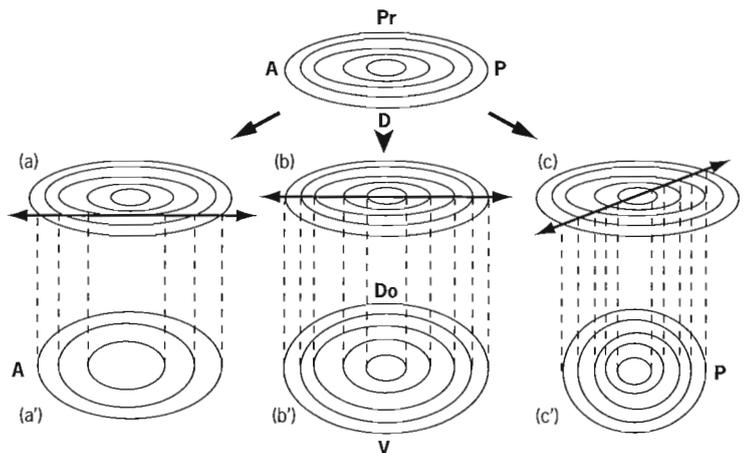
La composition des écailles et des otolithes change également quand les poissons changent d'environnement et ce phénomène peut être exploité pour obtenir des données détaillées relatives à l'âge des poissons lors de la migration et à la durée de la transition entre les différents environnements. Les rapports isotopiques de l'oxygène et les rapports élémentaires (Sr/Ca) varient rapidement en fonction de la salinité et constituent, de ce fait, les moyens les plus utiles pour identifier des migrations diadromes (chap. VII.E.1).

C. Influence de la forme et de la structure des pièces calcifiées sur l'interprétation des marques de croissance

J. Panfili, B. Morales-Nin

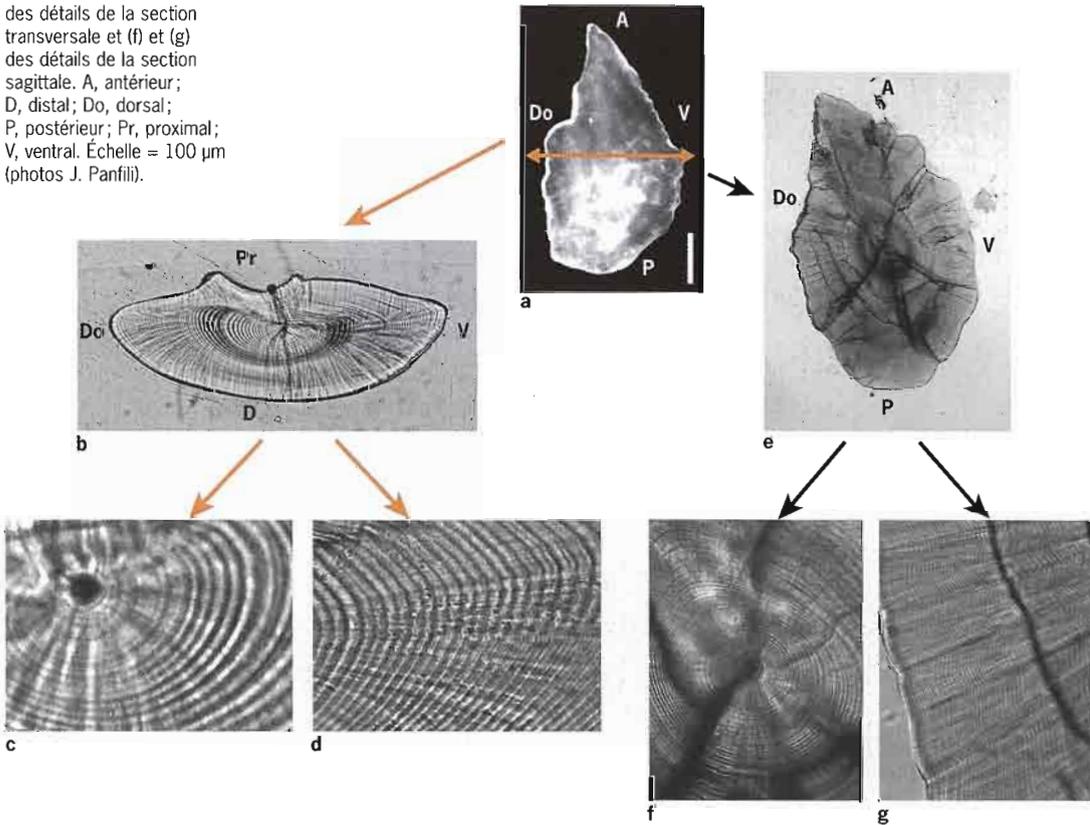
À l'exception des écailles, les marques des PC sont intégrées au fur et à mesure de la croissance dans des structures tridimensionnelles dont la morphologie et la taille sont déterminées par la combinaison de facteurs endogènes (génétique contrôlant la forme) et de facteurs exogènes (environnement contrôlant la taille à travers les processus physiologiques) (chap. II). Le rôle fonctionnel de chaque PC et sa capacité à enregistrer les événements temporels conduisent à des marques de croissance présentant différentes dispositions spatiales. Même pour les pièces entières ou les préparations relativement épaisses, le plan de focalisation de l'observation à travers la loupe binoculaire ou le microscope photonique réduit la quantité de l'information 3D qui est seulement visualisée à un niveau 2D. Ce problème est accentué lorsque l'on prépare des lames minces et conduit à rejeter toutes les préparations qui ne permettent pas d'observer les marques dans le plan choisi. En fonction du plan de préparation et du degré d'excentricité du centre d'origine de la PC, les accroissements apparaissent différemment (Williams & Bedford, 1974). Une section qui n'est pas assez proche du noyau conduit nécessairement à des erreurs dans les estimations d'âge et des divergences dans l'aspect des marques de croissance entre les échantillons (fig. III.C.1). Plus la technique de préparation est complexe et plus les marques seront difficiles à observer par la suite. Pour les otolithes par exemple, les techniques de préparation de surface, comme le MEB, peuvent présenter des images erronées du véritable arrangement interne des microstructures, en fonction du niveau de section utilisé (Panfili & Ximénès, 1992). Des erreurs peuvent en outre apparaître lorsque des mesures sont effectuées.

Figure III.C.1
Schéma théorique d'un otolithe (modèle « oignon ») indiquant les marques de croissance et l'effet de différents plans de coupe sur leur visualisation. (a), (b), (c), vues latérales du même otolithe. La flèche double indique le plan de section. (a'), (b'), (c'), observation sagittale de la section et localisation des marques de croissance. Les images résultant des trois plans de section sont assez différentes. A, antérieur; D, distal; Do, dorsal; P, postérieur; Pr, proximal; V, ventral. (d'après Panfili & Ximénès, 1992, avec la permission de Academic Press).



Les conséquences les plus évidentes de la forme et de la structure sur l'observation des marques se retrouvent pour les otolithes, à cause de l'extraordinaire variété de formes qu'ils présentent en fonction des espèces. Il est utile de rappeler ici que leur forme peut être utilisée pour l'identification des espèces actuelles (Torres *et al.*, 2000), mais aussi en paléontologie pour les espèces du passé (Nolf, 1995) (chap. II). Le problème est cependant moindre pour les otolithes de forme relativement simple qui sont trouvés chez les merlus, les Perciformes et les autres espèces les plus évoluées (fig. III.C.2), mais il devient évident pour de nombreuses espèces dont les otolithes sont épais ou présentent des formes très irrégulières. Les otolithes deviennent aussi plus complexes et plus ornementés avec l'âge des individus, avec une augmentation des distorsions de la croissance due à un épaissement préférentiel de la face interne. Il devient alors très difficile d'obtenir un simple plan de section passant à la fois par le noyau et le bord, et présentant l'ensemble des marques de croissance.

Figure III.C.2
Exemple de l'effet de la structure en 3D sur l'observation en 2D d'un otolithe de Téléostéen typique (*Vinciguerria nimbaria*). Les patrons de croissance sont présentés sur des lames minces après une coupe transversale (b) et après une coupe sagittale (e). (c) et (d) montrent des détails de la section transversale et (f) et (g) des détails de la section sagittale. A, antérieur; D, distal; Do, dorsal; P, postérieur; Pr, proximal; V, ventral. Échelle = 100 µm (photos J. Panfili).



À cause de la croissance différentielle des otolithes en fonction des plans d'orientation, les accroissements vont présenter des densités absolues très différentes d'une région à l'autre. Ceci est évident par exemple dans le cas des micro-accroissements sub-journaliers ou de recouvrement de

marques, en fonction de l'échelle temporelle étudiée (fig. III.C.3). Dans les zones de croissance plus rapide, en général situées selon l'axe antéro-postérieur, les micro-accroissements sub-journaliers sont plus larges et apparaissent plus clairement que dans l'axe dorso-ventral. Cette remarque est la même pour les marques qui se recoupent et qui empêchent parfois une observation claire des marques saisonnières. Les structures tridimensionnelles, comme les centres de croissance accessoires déposés autour du *nucleus* chez les poissons plats et les Gadidés, apparaissent différemment suivant le plan de section choisi (fig. III.C.4). De plus, les accroissements déposés après la formation de ces centres accessoires peuvent être discordants de ceux déposés dans la zone centrale après le noyau (fig. III.B).

Figure III.C.3
Recouvrement
de microstructures (flèches)
sur la coupe transversale
de l'otolithe de *Vinciguerria
nimbaria*. La croissance
est comprimée dans l'axe
proximo-distal.
Les microstructures ne sont
donc pas toutes visibles
sur la face proximale. D, distal;
Do, dorsal; P, proximal.
Échelle = 20 µm
(photo J. Panfili).

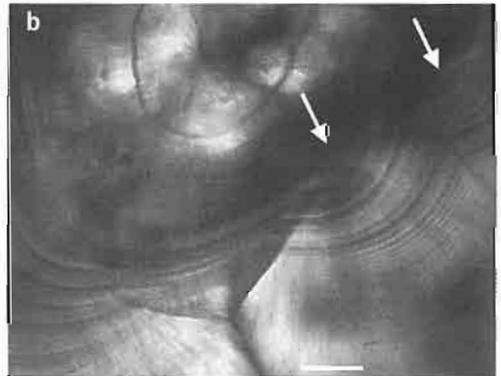
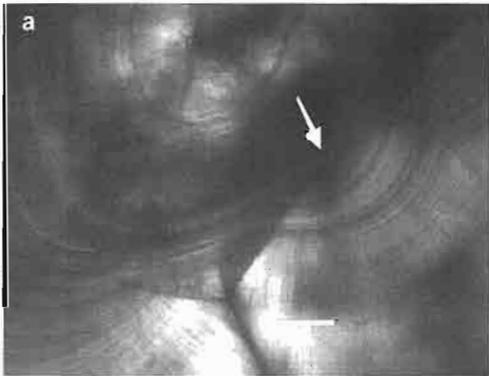
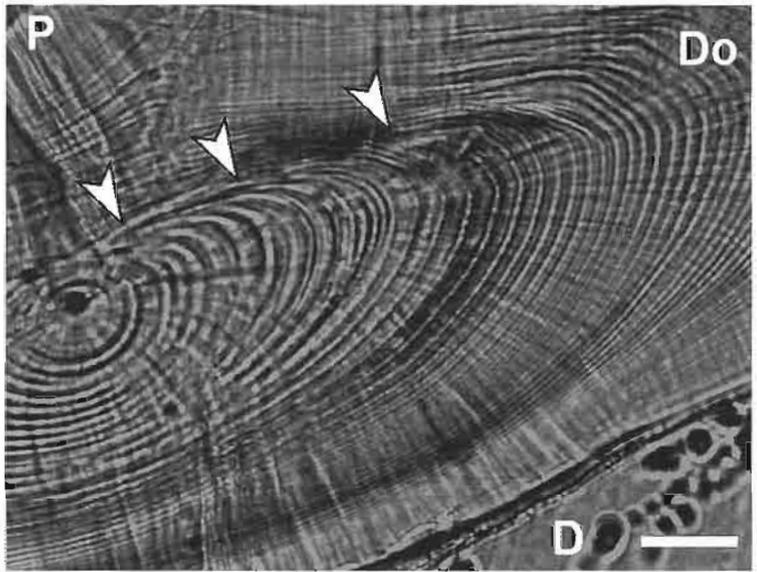


Figure III.C.4 - Différences dans l'observation des marques de croissance dues à un changement de section d'un otolithe de *Merluccius merluccius*. La zone centrale montre le noyau et des *primordia* accessoires (flèches). a) observation avant et b) après plus de ponçage. Échelle = 60 µm (photos B. Morales-Nin).

L'observation des patrons de croissance à l'intérieur des otolithes est rendue difficile à cause des différentes échelles d'observation possibles, qui s'étalent des micro-accroissements journaliers aux marques annuelles. L'observation va dépendre de la méthode de préparation mais aussi du grossissement utilisés. Par exemple, la correspondance entre les microstructures quotidiennes observées sous le microscope photonique et sous le MEB est connue précisément (chap. II.A) mais, par contre, la correspondance entre les microstructures et les marques saisonnières observées à deux échelles différentes est encore un sujet de controverse.

Le problème du passage d'une structure 3D à une observation 2D est similaire lorsque l'on prépare les os du squelette, par exemple les épines (fig. III.C.5), mais il est cependant moins flagrant. La partie basale (ventrale) de l'épine renferme la plupart des marques de croissance mais elle est souvent soumise à un remaniement osseux tandis que la partie apicale (bord dorsal) ne possède pas toutes les marques. La section d'une épine est nécessairement transversale par rapport à son axe d'allongement de façon à éviter les distorsions dans la visibilité des marques. Les vertèbres sont généralement observées en entier mais des sections frontales peuvent être nécessaires pour révéler plus précisément les marques à l'intérieur des corps vertébraux (Loubens & Panfili, 2000).

En théorie, les patrons de croissance devraient être homogènes dans tous les axes d'une pièce calcifiée donnée mais, à cause de taux de croissance variables provoquant des distorsions tridimensionnelles, ils peuvent apparaître hétérogènes d'une région à l'autre. Une standardisation précise est donc obligatoire lorsqu'une section doit être effectuée (chap. VIII.C.2.3) et lorsque les marques de croissance sont interprétées. Ce besoin de standardisation est évident dans le cas d'otolithes de forme complexe et des épines (voir précédemment). Même si la notion de continuité des marques sur l'ensemble d'une PC est un critère de reconnaissance pour l'interprétation, un axe de lecture standardisé doit être défini dès le départ. Dans le cas précis du comptage des micro-accroissements quotidiens sur les otolithes, un axe de lecture simple et linéaire n'est souvent pas approprié à cause de ruptures fréquentes dans la lisibilité des marques. Il est donc nécessaire de changer de direction au cours de la lecture en choisissant un dernier accroissement lisible sur l'axe sélectionné et en le suivant jusqu'à un autre axe où les structures sont à nouveau lisibles (Campana, 1992) (fig. III.C.6). Même après une section et l'obtention d'une lame mince, toute l'information tridimensionnelle qui subsiste sur la préparation de la PC peut empêcher une lisibilité totale des marques sous le microscope photonique : ceci est dû aux problèmes de parallaxe et au plan de focalisation sélectionné (Campana, 1992), entraînant par la suite des erreurs de subjectivité dans l'interprétation. Ces biais sont réduits lorsque l'on utilise des préparations et des observations de surface comme le MEB ou les colorations histologiques (chap. VIII.D.2 et VIII.C.2.8).

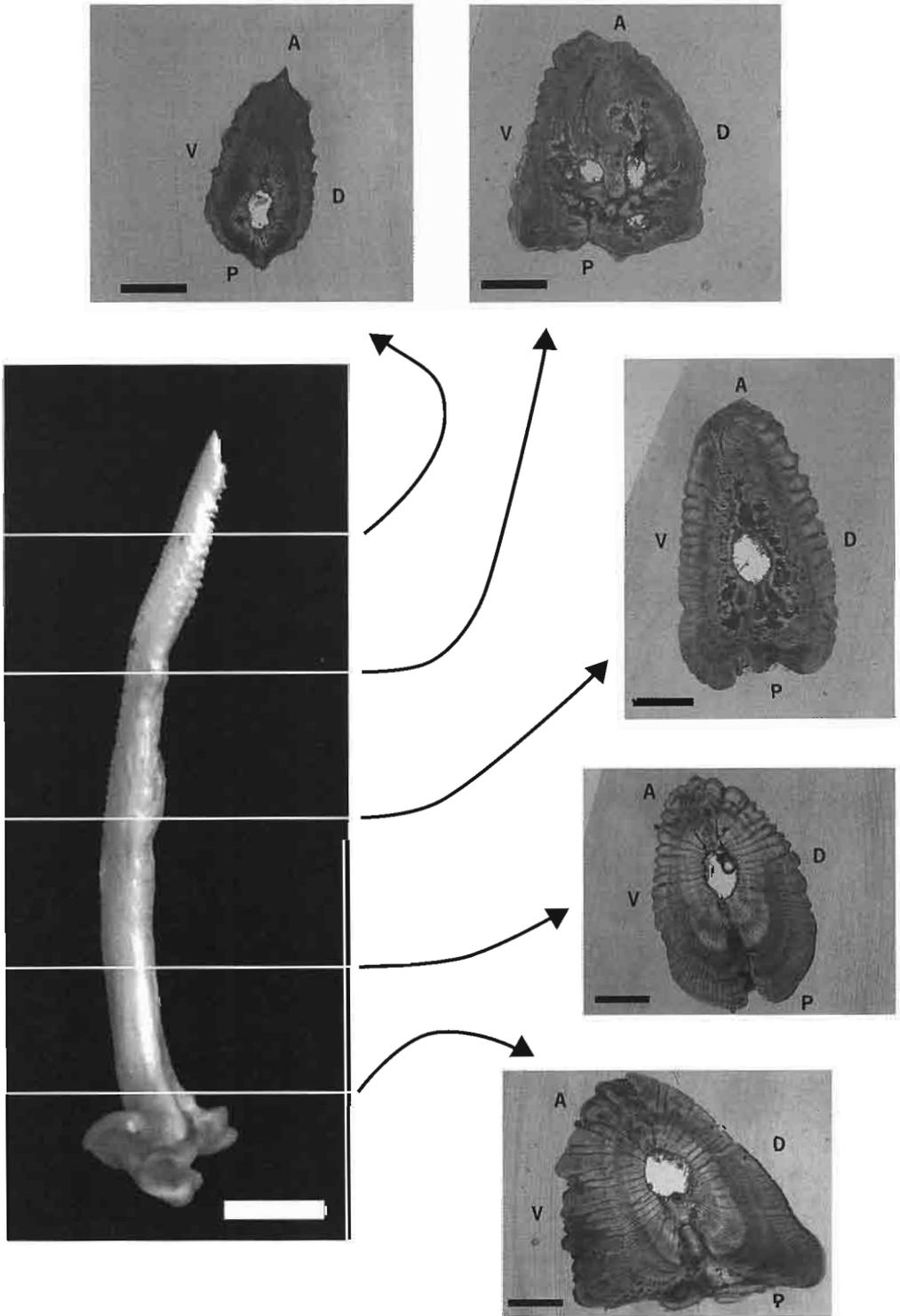
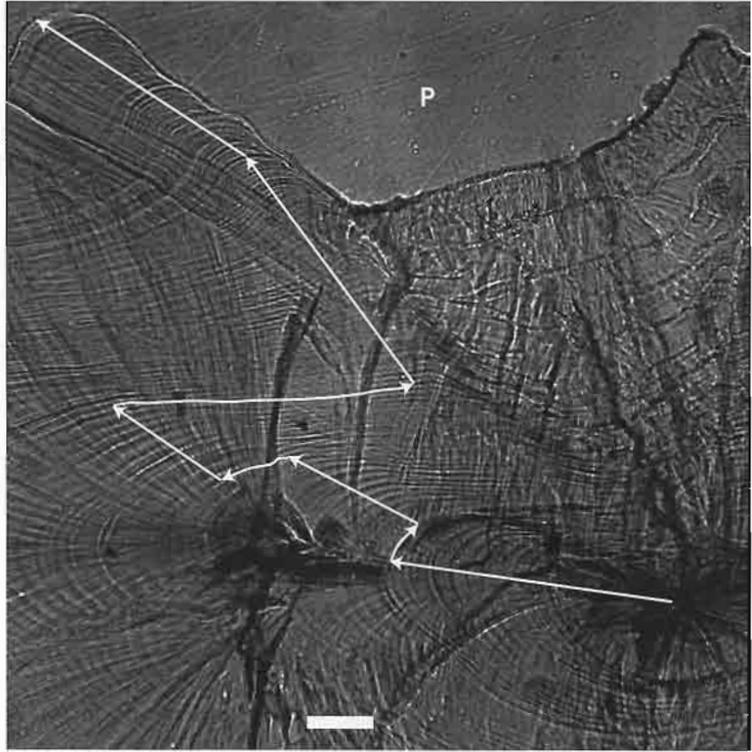


Figure III.C.5 - Différents niveaux de section de l'épine pectorale de *Pangassius hypophthalmus*. Le patron de croissance est très différent d'un niveau à l'autre : une partie de l'information est perdue lorsque l'on progresse vers la zone apicale. La standardisation du niveau de section est donc essentielle pour toute étude de sclérochronologie. A, antérieur ; D, dorsal ; P, postérieur ; V, ventral. Échelle = 15 mm pour l'épine entière et échelle = 200 µm pour les autres photos (photos J. Panfili).

Figure III.C.6
Changement dans l'axe de lecture des microstructures journalières sur une lame mince transversale de l'otolithe de *Oreochromis niloticus*. La lecture se fait depuis le noyau jusque vers le bord le long du *sulcus acusticus* sur la face proximale (P). Les flèches indiquent les changements de direction de l'axe de lecture qui ont lieu lorsque les microstructures sont peu claires ou illisibles. La lecture ne peut se faire sur un axe linéaire depuis le noyau jusque vers le bord car la croissance est réduite sur la face proximale pendant les premiers jours de vie. Échelle = 20 μm (photo A. Malam Massou).



La sélection d'un axe de mesure sur les préparations demande les mêmes critères que pour l'interprétation des marques de croissance (Campana, 1992). À l'heure actuelle, l'estimation de la croissance 3D est extraite d'images 2D et les mesures effectuées doivent suivre les patrons de croissance de façon linéaire ou curvilinéaire le long de l'axe sélectionné. Les mesures curvilinéaires deviennent maintenant possibles avec l'utilisation des systèmes d'acquisition et de traitement d'images (chap. VI).

Chapitre IV

Méthodes de validation et de vérification

Il est impossible de connaître l'âge absolu, « âge véritable », d'un poisson prélevé au hasard dans son environnement naturel. De nombreuses analyses de pêcheries dépendent cependant d'estimations exactes et fiables des structures en âge des captures. La constatation de nombreuses erreurs dans les estimations d'âge a relancé l'intérêt des méthodes de validation. « Valider » signifie qu'il faut prouver qu'une technique est exacte. Ceci peut être démontré ou estimé. Une estimation a bien sûr moins de valeur mais, dans certains cas, c'est la seule voie possible (Archibald *et al.*, 1983). Dans les années quatre-vingt, Beamish & McFarlane (1983) ont souligné l'importance de la validation des estimations d'âge et, dans leur revue de la littérature, ils ont mentionné le fait que, seules quelques études validaient les méthodologies employées. Cependant, depuis lors, de nombreuses études de validation ont été réalisées. Théoriquement, une expérience de validation doit être entreprise pour chaque population d'une espèce donnée car il peut exister d'importantes différences entre les populations : c'est le cas par exemple pour les espèces migratrices comme les saumons et les anguilles. Idéalement, l'étape de validation implique aussi la prise en compte de tous les stades du cycle de vie, depuis l'éclosion jusqu'à l'adulte, en passant par la métamorphose (Geffen, 1992). Et, même si la validation d'une technique pour toute la gamme d'âges d'une population donnée est très difficile à réaliser, une combinaison de plusieurs méthodes peut parfois offrir une plus grande certitude dans les âges estimés.

La validation est une étape obligatoire pour toute étude de sclérochronologie et, en particulier, pour les espèces pour lesquelles aucune étude de l'âge n'a été entreprise auparavant. Deux aspects doivent être pris en considération : (1) les accroissements doivent avoir été déposés avec une périodicité qui peut être reliée à un pas de temps régulier (i.e. exactitude) et (2) les marques de croissance doivent être interprétées de façon cohérente et répétitive pour estimer l'âge (i.e. précision). Les méthodologies disponibles pour valider la fréquence des dépôts des marques inscrites dans les PC peuvent être regroupées autour de quatre principales catégories. Elles constituent les bases de ce chapitre :

- la validation directe, qui prend en compte une marque de référence précise sur une PC par rapport aux autres marques de croissance ; c'est une méthode individuelle qui utilise la plupart du temps les techniques de marquage et/ou d'élevage ;
- la validation semi-directe, qui nécessite l'observation de séries chronologiques de marques de croissance sur un grand nombre d'individus ; c'est une méthode populationnelle ;
- la validation indirecte, qui nécessite la comparaison d'estimations d'âge individuelles avec des estimations statistiques réalisées à partir des distributions de fréquence de tailles ou à partir d'autres données d'âge ; c'est aussi une méthode populationnelle ;
- la vérification, qui implique simplement des interprétations multiples (obtenues à partir de une ou plusieurs lectures effectuées sur une ou plusieurs PC).

A. Validation directe

P.J. Wright, J. Panfili, A. Folkvord, H. Mosegaard, F.J. Meunier

La validation directe conduit à la connaissance de l'âge à partir d'une PC d'un unique individu. Elle prend en compte la plupart du temps une marque de référence temporelle précise qui est comparée aux autres marques de croissance. Les méthodes de validation directe utilisent des séries d'observations d'individus marqués qui sont relâchés dans leur environnement naturel ou qui sont élevés dans des environnements plus ou moins contrôlés (Brothers *et al.*, 1976; Neilson & Geen, 1981; Geffen, 1992). L'introduction d'une marque de référence dans les PC, qui peut ensuite être datée avant l'élevage ou la recapture, est également une étape préliminaire fréquente pour de telles études. Ce genre de marque peut être chimique ou induite intrinsèquement.

1. Marquage

Dans ce chapitre, nous considérons le processus entier du « marquage », depuis la capture des individus dans leur milieu naturel, leur marquage (poissons et/ou PC), leur libération dans un environnement naturel ou artificiel, jusqu'à leur recapture après une période de temps donnée. Comme l'intervalle entre la remise en liberté, contrôlée ou non, et la recapture est connu, la durée de la période de croissance peut être facilement évaluée. Lorsque les PC sont marquées, il est en général très difficile de détecter les marques de façon externe et il est donc nécessaire de marquer également les poissons extérieurement.

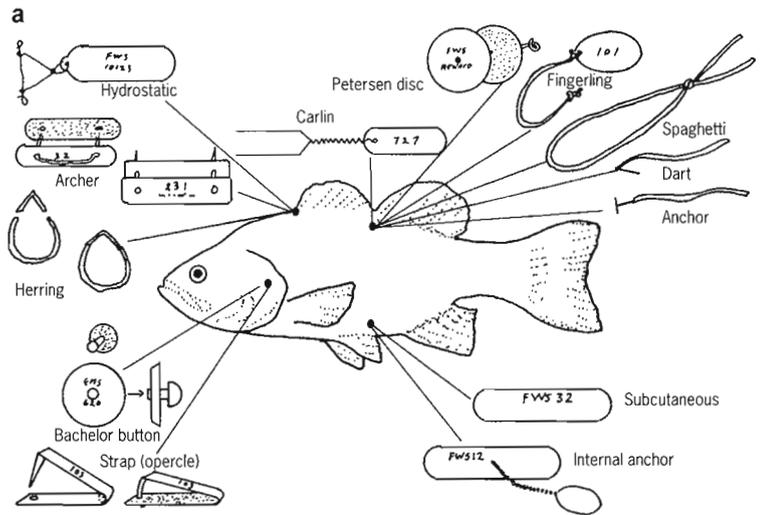
1.1. Marquage des poissons

Le marquage d'individus est une méthode très répandue et largement utilisée dans les études de dynamique des populations. Dans ce chapitre, nous résumons simplement les principales voies et techniques pour le marquage des poissons. De plus amples détails sur ces méthodes peuvent être trouvés dans des ouvrages ou articles de synthèse (Parker *et al.*, 1990). Il est évident que le marquage individuel et le type de marque utilisée dépendent de la taille du poisson considéré et que ce marquage est peu adapté pour les stades larvaires. L'étape de marquage est souvent essentielle pour les études de validation des estimations d'âge car il est nécessaire :

- de repérer les individus ou les groupes de poissons dont les PC ont été marquées;
- de repérer individuellement les poissons auxquels une PC a été prélevée. Ceci n'est possible qu'après l'extraction d'écaille (Beamish & McFarlane, 1983; Matlock *et al.*, 1987; Beall & Davaine, 1988) ou, parfois, après l'extraction d'une partie de rayon de nageoire (Rochard & Jatteau, 1991). Les marques de croissance de ces PC sont ensuite interprétées entre la date de capture initiale (marquage) et la date de recapture.

Une large gamme de marques externes est disponible pour le marquage individuel (McFarlane *et al.*, 1990). Quelques exemples sont présentés sur la figure IV.A.1a. La fixation des marques peut également être facilitée par l'utilisation de pistolets spécialisés (fig. IV.A.1b). L'introduction de petites marques internes, comme les implants codés visibles sous la peau (par exemple dans la région crânienne) ou les micro-marques magnétiques, est préférable aux marques externes car elles n'affectent pas les performances hydrodynamiques des poissons. Les pit-tags électroniques (marques magnétiques) injectés sous la peau permettent aussi de reconnaître les individus avec le minimum de manipulation, à l'aide de lecteurs électroniques spécifiques. Ces types de marque minimisent certainement l'impact biologique du marquage en termes de changement de comportement et conduisent à des données claires et non biaisées.

Figure IV.A.1
Marquage externe des poissons.
a) Principaux types de marques externes et régions anatomiques où elles sont fixées chez les poissons (d'après McFarlane *et al.*, 1990).
b) Marquage externe avec une marque T en plastique chez un tilapia africain (*Sarotherodon melanotheron*). La marque numérotée est placée sous la peau et dans le muscle en utilisant un pistolet spécial (photo J. Parfili).



Pour plus d'informations sur les marques utilisées pour les poissons, le lecteur pourra se renseigner auprès des distributeurs internationaux de marques externes comme Hallprint Tags (Australie), Biomark (USA), FishEagle International (UK), Northwest Marine Technology Inc. (USA). Les marques électroniques les plus récentes désormais disponibles permettent de marquer le poisson extérieurement mais aussi d'enregistrer plusieurs types de données issues de l'environnement naturel traversé par l'individu (e.g. température de l'eau, pression, radiation solaire) ainsi que certaines variables physiologiques (e.g. température interne). Des informations supplémentaires sur ces marques enregistreuses peuvent être trouvées chez des fournisseurs comme Star-Oddi (Islande) et Lotek (Canada).

Les techniques de marquage en masse (marquage de groupes) sont généralement scindées en deux catégories, les méthodes de tatouage et les méthodes de cryomarquage. Le tatouage est fait, la plupart du temps, par injection d'un colorant sous la peau ou à l'aide d'un dermojet pour inoculer des taches de couleur(s) visibles dans certaines régions du corps (en général sur la face ventrale car elle est naturellement moins pigmentée). Comme exemple de marquage de ce type, pour les petits individus, on peut citer l'injection sous-cutanée de bleu alcian à 1 % dilué dans une solution de sérum physiologique. Certaines résines élastomères fluorescentes sont aussi disponibles pour les individus de petite taille et produisent des marques encore plus identifiables (e.g. fournisseur Northwest Marine Technology Inc., USA). Les dermo-jets ne sont préconisés que pour les individus de taille relativement grande (> 10 cm). La technique de cryomarquage quant à elle permet d'obtenir des marques codées sous forme d'empreintes sur la peau. Cette méthode implique d'immerger au préalable des outils munis de caractères en contre-empreinte dans de l'azote liquide et de les appliquer ensuite directement sur la peau des individus. Ces techniques de tatouage et de cryomarquage permettent souvent un codage individuel mais elles ne sont valables que pour des expériences de courte durée car les colorants ou les brûlures par le froid tendent à disparaître avec la régénération de la peau. Ces marques sont cependant visibles pendant plusieurs mois après le marquage.

1.2. Marquages des pièces calcifiées

Sauf si les poissons ont été élevés depuis leur naissance, il est nécessaire de disposer d'une marque particulière sur la PC, servant de repère temporel précis. Les différentes méthodes de marquage des pièces calcifiées peuvent être réparties en cinq catégories :

- les marqueurs fluorescents ;
- les chocs thermiques induisant les marques ;
- les variations lumineuses induisant les marques ;
- les marqueurs radio-isotopiques comme le strontium radioactif ^{85}Sr ;
- les marquages chimiques élémentaires avec du strontium ou des lanthanides.

Les quatre dernières méthodes ne sont cependant valables que pour les otolithes. Les marques induites par l'environnement à la suite, par exemple, d'un changement d'habitat ou de régime alimentaire, peuvent aussi servir de points de référence.

1.2.1. Marqueurs fluorescents

Le marquage chimique utilisant des colorants fluorescents est la principale méthode utilisée, depuis longtemps, dans les expériences de validation directe. Cette méthode repose sur l'incorporation de composants chimiques spécifiques à la surface des tissus en cours de minéralisation. Depuis les années soixante, plusieurs marqueurs ont été testés avec succès chez différentes espèces d'Ostéichthyens, les premiers ayant été les tétracyclines (De Bont, 1967; Weber & Rigway, 1967; Casselman, 1974; Meunier, 1974; Meunier & Boivin, 1974; McFarlane & Beamish, 1987). Depuis lors, la fluoescéine ou calcéine (Meunier, 1974; Meunier & Boivin, 1978; Wilson *et al.*, 1987; Tsukamoto, 1988; Beckman *et al.*, 1990), l'orangé de xylénol (Meunier, 1974) et l'alizarine (Meunier & Boivin, 1978; Tsukamoto, 1988) ont pu être utilisés. Ces substances possèdent un spectre d'action très large et sont d'ailleurs utilisables pour les PC de toutes les espèces de Vertébrés.

Tous ces composés ont la capacité d'émettre une couleur fluorescente spécifique sous une lumière ultraviolette et peuvent ainsi être localisés à l'intérieur des PC *a posteriori*. La tétracycline émet une fluorescence jaune, la fluoescéine, une couleur vert-jaune, et l'alizarine et l'orangé de xylénol, une fluorescence rouge. La coloration de la marque révélée dépend bien sûr de la longueur d'onde de la source lumineuse et des différents filtres optiques utilisés (tab. IV.A.1).

Tableau IV.A.1. - Les différents fluorochromes et leurs longueurs d'ondes d'excitation et d'émission en microscopie photonique (épi-fluorescence).

Fluorochrome	Longueur d'onde d'excitation (moyenne en nm)	Longueur d'onde de fluorescence (moyenne en nm)	Lumière d'excitation	Couleur d'excitation	Filtre (lumière épi-réfléchie)
Tétracycline	390	560	bleu/violet	jaune	D
Alizarine	556	596	vert	rouge	N2
Fluoescéine	490	525	bleu	jaune-vert	A
Orangé de xylénol	470	530-650	bleu	orange-rouge	I2/3

La tétracycline (TC, $C_{22}H_{24}N_{12}O_8$) et ses dérivés (oxytétracycline, OFC; tétracycline hydrochloride, TCHC; tétracycline dihydrochloride, TCDHC) sont également des antibiotiques à spectre large et donnent d'excellents résultats de marquage pour toutes les espèces. Cependant, durant les dix dernières années, l'utilisation des tétracyclines a été réglementée. En effet, dans plusieurs pays dont les États-Unis, le Canada et le Japon, elles ne peuvent désormais plus être utilisées sur le terrain, ni déversées dans les eaux naturelles ou semi-naturelles. Ceci découle du taux de dégradation naturelle extrêmement lent de ces antibiotiques et de l'apparition de résistance de certains microorganismes

aux tétracyclines (Coyne *et al.*, 1994; Kerry *et al.*, 1994; Smith, 1995; Vaughan & Smith, 1996). En tout état de cause, les expérimentateurs devront vérifier la législation nationale en cours sur la protection de l'environnement avant d'utiliser un composé tétracyclinique.

Avec la fluorescéine (FC, $C_{20}H_{12}O_5$), les résultats semblent plus variables dans la littérature, allant de l'obtention de faibles marques (Tsukamoto, 1988) à des marques plus intenses que les autres marqueurs fluorescents (Thomas *et al.*, 1995). Depuis la restriction de l'usage des tétracyclines, deux fluorochromes de la famille des alizarines sont devenus très populaires car ils produisent d'excellentes marques sur les otolithes de poissons : l'alizarine complexone (AC, 1,2-dihydroxyanthraquinone-3-yl-méthylamine-N, N-diacétique acide, $C_{19}H_{15}NO_8 \cdot 2H_2O$) et l'alizarine Red S (AR, 1,2-dihydroxyanthraquinone sodium sulfonate, $C_{14}H_7O_7NaS$).

Ces fluoromarqueurs sont disponibles sous différentes formes. La tétracycline est trouvée dans le commerce sous deux formes :

- en poudre à différentes concentrations, depuis le composé chimique à l'état pur jusqu'à la tétracycline active mélangée à un excipient et généralement utilisée par les vétérinaires (e.g. Acti-Tétra B[®]);
- en solution stable à différentes concentrations (e.g. Terramycine[®]).

La fluorescéine (calcéine) est également disponible en poudre ou en solution. L'alizarine, par contre, n'est disponible que sous forme de poudre et une solution doit être préparée par la suite pour des utilisations en injection ou en balnéation.

Ces fluorochromes sont appliqués en suivant trois principaux protocoles : par injection, par balnéation (immersion de l'individu en entier) ou par incorporation dans un aliment. Les résultats du marquage peuvent cependant être assez différents en fonction des marqueurs et de leur mode d'application (Thomas *et al.*, 1995), mais toutes les structures calcifiées seront marquées en même temps (fig. IV.A.2).

1.2.1.1. Injection

La méthode d'injection intrapéritonéale ou intramusculaire est certainement la plus répandue, et elle peut être utilisée pour marquer les poissons juvéniles ou adultes. L'injection intrapéritonéale est toutefois recommandée (fig. IV.A.3). Des solutions stables de TC existent pour les besoins vétérinaires (e.g. Terramycine[®]) et sont donc particulièrement appropriées. Les injections de concentrations élevées de TC peuvent cependant entraîner la mort des individus (Meunier & Boivin, 1978; Beamish & McFarlane, 1987). Meunier & Boivin (1978) ont estimé qu'une concentration de 50 à 100 mg de TC par kilogramme de poids frais n'affecte pas la croissance ultérieure des individus. McFarlane & Beamish (1987) recommandent des injections de 25 à 35 mg de TC par kilogramme. Sur la base de plusieurs études issues de la littérature, il apparaît que des concentrations comprises entre 25 et 100 mg TC.kg⁻¹, et particulièrement de 50 mg.kg⁻¹ de poisson frais, sont acceptables (Meunier & Pascal, 1981; Babaluk & Campbell, 1987; Babaluk & Craig, 1990; Bumguardner, 1991; Hall, 1991; Murphy & Taylor,

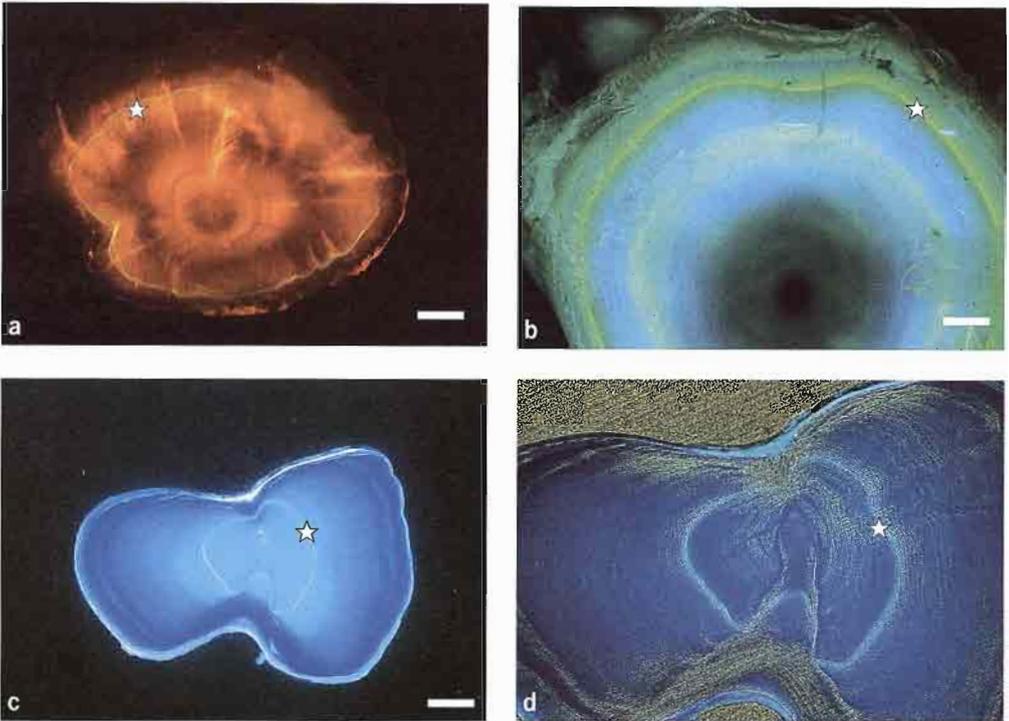


Figure IV.A.2 - Marques de tétracycline (☆) observées sur différentes pièces calcifiées. Toutes les images sont prises sous une lumière ultraviolette en épifluorescence en microscopie photonique (photos J. Panfil).

- a) Otolithe entier d'une anguille (*Anguilla anguilla*) sous une lumière réfléchie. Échelle = 200 µm.
 b) Vertèbre entière d'un sandre (*Stizostedion lucioperca*) sous une lumière réfléchie. Échelle = 1 mm.
 c) Coupe d'un rayon dorsal de sandre (*Stizostedion lucioperca*) sous une lumière réfléchie. Échelle = 400 µm.
 d) Détail du rayon dorsal précédent (c) du sandre (*Stizostedion lucioperca*) sous une lumière transmise.

1991). La concentration à injecter dépend aussi du taux de croissance spécifique, de la longévité et de la PC qui doit être marquée (Casselman, 1983). Des marquages multiples peuvent également être pratiqués en réalisant des injections sur les mêmes individus à des intervalles de plusieurs semaines, mois ou années.

Figure IV.A.3
 Marquage interne
 par injection de tétracycline
 chez un tilapia africain
 (*Sarotherodon melanotheron*).
 Le poisson a été anesthésié
 auparavant. La solution
 est injectée de façon
 intrapéritonéale avec une
 concentration de 50 mg de
 tétracycline par kilogramme
 de poisson frais. Ce poisson
 avait été préalablement
 marqué extérieurement
 avec une marque T
 (fig. IV.A.1) (photo J. Panfil).



Avant d'injecter un fluoromarqueur aux poissons, il est préférable de les anesthésier. Plusieurs produits anesthésiants sont couramment utilisés en aquaculture et sont donc disponibles. Le phénoxyéthanol ($C_8H_{10}O_2$) à une concentration d'environ 3 ‰ est recommandé. La concentration à utiliser doit être testée au préalable car la sensibilité à de tels produits est fonction des espèces et/ou des tailles des individus.

1.2.1.2. Balnéation

La balnéation est particulièrement utile pour les jeunes poissons auxquels il est impossible de faire des injections. Les larves ou les juvéniles sont alors baignés dans des solutions de concentration donnée et pour un temps donné. Dans la littérature, il existe de nombreuses références sur le sujet qui montrent l'utilisation d'une large gamme de concentrations et de durées entre lesquelles il est souvent difficile de faire un choix (tab. IV.A.2).

Tableau IV.A.2. - Concentrations des fluoromarqueurs et durées de l'immersion pour le marquage par balnéation des œufs et/ou des larves.

Substance	Concentration (mg.l ⁻¹)	Solution	Durée	Nombre de poissons	Référence
Tétracycline	100-500	NaCl 1 %	1-2 h		(Hettler, 1984)
Tétracycline	200-300 200-300	non	24-48 h 3-24 h	œufs, larves	(Tsukamoto, 1985)
Tétracycline	100-600	non	12 h	œufs, larves, juvéniles	(Dabrowski & Tsukamoto, 1986)
Oxytétracycline	50	non	12h.j ⁻¹ (4 j)	87000-126000	(Lorson & Mudrak, 1987)
Tétracycline	200-300	non	24 h		(Tsukamoto, 1988)
Tétracycline	400	NaCl 15 %	24 h	200	(Siegfried & Weinstein, 1989)
Oxytétracycline	400-500	non	24 h	15 l ⁻¹	(Tzeng & Yu, 1989)
Alizarine complexone	50 -200	eau de mer	24 h	10 millions	(Tsukamoto <i>et al.</i> , 1989a)
Tétracycline	10000	hyperosmotique	3 mn 30 s	500 kg	(Alcobendas <i>et al.</i> , 1991)
Fluorescéine	20000			1,25 million	
Oxytétracycline	350	non	3 h	1,2-7 millions	(Secor <i>et al.</i> , 1991)
Alizarine complexone	100-200	34 ppt	24 h	1,18 million	(Blom <i>et al.</i> , 1994)
Alizarine Red S	100	eau de mer			
Alizarine complexone	100	non	14 h	1000	(Ahrenholz <i>et al.</i> , 1995)
Oxytétracycline	10000	hyperosmotique	1-10 mn	100-40 000	(Rojas-Beltran <i>et al.</i> , 1995)
Alizarine complexone	250	25 ppt eau de mer	15 h	114	(Szedlmayer & Howe, 1995)
Oxytétracycline	350-400	non	6-8 h	600 000	(Reinert <i>et al.</i> , 1998)

Pour marquer un grand nombre de larves, certains auteurs recommandent d'augmenter les densités de poissons (Secor *et al.*, 1991) ou d'accélérer le temps de balnéation en plongeant au préalable les larves dans une solution hyperosmotique (chlorure de sodium à 5 %) pendant quelques minutes, avant de les baigner dans de la TC à 1 % (Alcobendas *et al.*, 1991). D'autres études montrent que les embryons peuvent être marqués dans l'œuf par balnéation (Tsukamoto, 1985; Ruhlé &

Grieder, 1989; Muth & Bestgen, 1991). Pour les larves, les marquages multiples (même avec des incorporations de plusieurs fluorochromes) sont également possibles en leur faisant subir des bains successifs à intervalles de quelques jours (Tsukamoto, 1988; Hendricks *et al.*, 1991). Il est important de noter que des concentrations de TC trop élevées peuvent tuer les larves (Nagiec *et al.*, 1988).

La technique d'immersion est relativement simple : les poissons sont mis dans de l'eau claire fortement oxygénée artificiellement, la concentration choisie de fluoromarqueur est alors ajoutée à l'eau et les poissons sont laissés dans ce bain pour une durée déterminée, puis le bassin est vidé et rempli avec de l'eau neuve (tab. IV.A.2). Cette procédure peut être adaptée en fonction de l'espèce et du matériel utilisé. Le facteur le plus critique pouvant affecter le succès du traitement semble être l'oxygénation de l'eau car les poissons sont dans ce cas particulièrement sensibles à un manque d'oxygène. La procédure décrite ci-après est généralement utilisable pour marquer des œufs et/ou les premiers stades larvaires avec de l'alizarine (Blom *et al.*, 1994) :

- la quantité de colorant en poudre nécessaire pour la concentration finale (solution du bain d'AC ou d'AR de 100 mg.l⁻¹) est pesée et placée dans un bécher (une concentration d'AC de 50 mg.l⁻¹ a aussi été démontrée comme suffisante dans plusieurs cas);
- l'alizarine est dissoute dans de l'hydroxyde de potassium 1N jusqu'à ce que sa couleur passe d'un rouge-marron foncé à un rouge encore plus foncé tirant sur le bleu (à un pH d'environ 7,5-8,0 pour l'AC et l'AR);
- cette première solution est diluée avec de l'eau distillée pour aboutir à une solution intermédiaire de travail de 50 à 100 ml avant la prochaine dilution;
- une dilution supplémentaire est opérée en ajoutant la dernière solution au bain utilisé pour marquer les poissons et pour atteindre la concentration finale choisie au départ (voir précédemment);
- il est important de vérifier que le pH est inférieur à 9 dans le bain, de façon à éviter des mortalités supplémentaires. Si nécessaire, il faut ajouter de l'acide (e.g. HCl) pour diminuer le pH;
- comme le bain doit rester inchangé pendant la durée du marquage, il est essentiel de maintenir une saturation en oxygène au-dessus de 80 % pendant la durée du traitement, à l'aide d'une aération artificielle;
- la durée du marquage peut s'étendre de 12 à 24 h, après quoi les œufs et/ou les larves doivent être retirés du bain ou le bain remplacé par de l'eau neuve.

1.2.1.3. Incorporation dans la nourriture

Cette technique, suggérée en premier par Weber & Rigway (1967), n'a pas trouvé beaucoup de partisans par la suite. Cependant, Nordeide *et al.* (1992) ont montré que cette méthode pouvait permettre le marquage d'un grand nombre d'individus en utilisant des aliments dans lesquels de la tétracycline avait été ajoutée à une concentration de 10 g d'OTC par kilogramme de nourriture sèche. L'administration orale de fluoromarqueurs semble être efficace à des concentrations de 25 à

50 mg par kilogramme d'aliment pour la calcéine et la tétracycline, et de 50 mg.kg⁻¹ pour l'alizarine complexone (Thomas *et al.*, 1995). Ces auteurs ont démontré que la qualité du marquage est moins bonne avec l'alizarine qu'avec la calcéine ou la tétracycline.

1.2.1.4. Marqueurs fluorescents

Les marqueurs fluorescents sont utiles dans les expériences de validation pour des échelles temporelles variées, de saisonnière à journalière, et pour tous les types de PC. Ils nécessitent l'utilisation systématique d'une lumière ultraviolette pour être révélés. Le taux de croissance d'une PC donnée va influencer le succès de ce type de marquage. Chez la morue ou le hareng par exemple, la croissance de l'otolithe avant l'éclosion est importante et c'est donc une bonne période pour effectuer un marquage. Les marques induites au stade de l'œuf sont en général facilement identifiées durant les stades larvaires et même pendant la phase juvénile (Blom *et al.*, 1994). Dans le cas du hareng, les œufs démersaux sont faciles à faire incuber sur des lames de verre ou des feuilles de plastique : cela rend particulièrement appropriés pour effectuer un marquage à ce stade avec de très faibles volumes de solution et en éliminant plus tard le problème de retrouver les œufs dans la solution. Ceci doit être rappelé car certains fluorochromes, et spécialement l'alizarine, sont chers à l'achat.

Comme il a déjà été mentionné précédemment, les marquages multiples peuvent être utilisés, en particulier pour séparer des sous-populations ayant des caractéristiques différentes (Tsukamoto *et al.*, 1989b). Il est toutefois important d'avoir une durée suffisante entre deux marquages successifs pour éviter un chevauchement éventuel des marques dû à une faible croissance pendant ce laps de temps (fig. IV.A.4). Pendant le stade larvaire, le taux de croissance précédant la période du marquage aura également une influence sur le succès de ce dernier. Par exemple, dans une expérience avec des larves de hareng âgées de 32 jours, le succès du marquage a varié de 10 à 55 % pour les groupes d'individus nourris avec des rations alimentaires minimales pendant les deux semaines qui ont précédé le marquage, alors que la réussite était de 100 % pour les groupes nourris à satiété pendant la même période (Folkvord *et al.*, 2000). Dans les cas où le succès du marquage a été assez faible, la croissance de l'otolithe a été également très limitée avec des largeurs entre deux microstructures n'excédant pas un demi-micromètre.

Pour les expériences de validation des cycles de croissance annuels, il est nécessaire de maintenir les poissons dans un milieu artificiel ou naturel pendant une période dépassant 12 mois. La longévité de la marque fluorescente est très bonne (particulièrement pour la tétracycline et la fluoescéine) sur les PC internes comme les otolithes ou les vertèbres, mais elle est plus courte sur les écailles à cause d'une détérioration de ces marqueurs photosensibles lorsqu'ils sont exposés à la lumière. Plusieurs auteurs ont décrit des expériences dont la durée a dépassé plusieurs années : par exemple, des civelles marquées à la tétracycline et relâchées dans le Rhin (France) ont présenté des marques fluorescentes sur leurs otolithes cinq ans après leur immer-

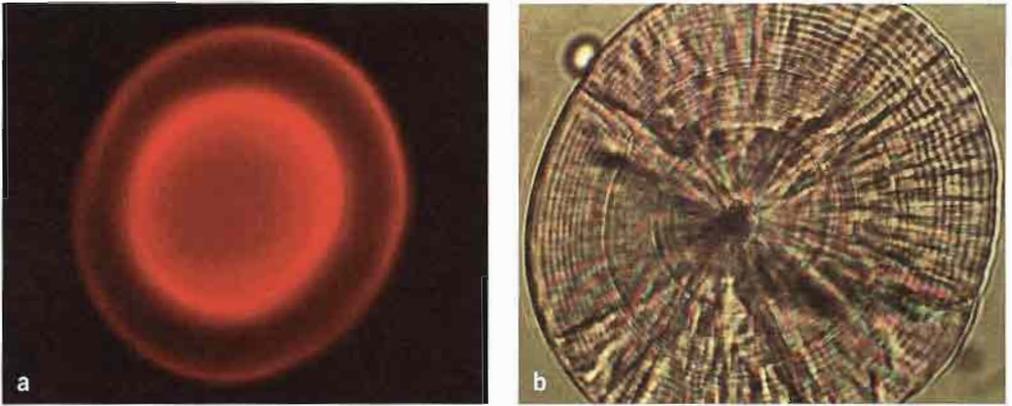


Figure IV.A.4
Exemple de marquage double avec l'alizarine complexone sur une *sagitta* de larve de hareng (*Clupea harengus*) observée sous une lumière ultraviolette (a) et même otolithe observé sous une lumière transmise (b). Échelle = 20 μm (photos A. Folkvord).

sion (Meunier, 1994); Beamish & McFarlane (2000) ont aussi observé des marques de tétracycline sur les otolithes de *Anoplopoma fimbria* plus de vingt ans après que les poissons aient été marqués.

1.2.2. Marques induites par la température sur les otolithes

Il a été démontré que la température a un effet immédiat à la fois sur l'accroissement de l'otolithe et sur sa composition microstructurale (Mosegaard *et al.*, 1987; Berghahn & Karakiri, 1990; Bergstedt *et al.*, 1990; Volk *et al.*, 1990; Munk & Smoker, 1993). Les formations, optiquement opaques ou translucides, sont censées refléter la composition en matière organique et la structure des cristaux d'aragonite. Les fluctuations de température vont alors laisser des traces caractéristiques au niveau des microstructures. Dans une expérience conduite en laboratoire, des manipulations contrôlées de température ont permis d'induire une séquence de discontinuités structurales caractéristiques, en fonction du taux de croissance attendu pour l'otolithe aux différentes températures (variations autour d'une base de 10 °C avec des pics de température à 14 °C; fig. IV.A.5). Les fluctuations de température ont été utilisées pour créer des systèmes de « codes-barres » pour les stocks commerciaux de saumons et sur de très grands nombres d'individus (Volk *et al.*, 1990, 1995). Brothers (1990) et Volk *et al.* (1999) ont écrit des synthèses très complètes sur les techniques de marquage thermique des otolithes.

1.2.3. Marques induites par un cycle lumineux sur les otolithes

La calcification de l'otolithe est sous contrôle des alternances jour-nuit du cycle nyctéméral (Wright *et al.*, 1992). Pour quelques espèces, des cycles de photopériode de 6h jour-6h nuit peuvent masquer la périodicité quotidienne de la formation des micro-accroissements, conduisant à la formation de zones indistinctes sur l'otolithe. Un exemple de marque induite par un cycle de photopériode de 6h jour-6h nuit chez un jeune saumon est montré sur la figure IV.A.6. Cette technique de marquage peut être aussi amplifiée en réchauffant la température de l'eau de 3 °C par rapport à la température ambiante durant la phase lumineuse de cycles sub-journaliers (fig. IV.A.7).

Figure IV.A.5
Exemple de marques induites par manipulation de température sur la *sagitta* d'un alevin de truite (*Salmo trutta*), manipulé à 135 degrés-jour après l'éclosion. Les conditions de base sont une température de 11,5 °C et l'obscurité (photo H. Mosegaard).
a) Six périodes de manipulations avec 2 h à 14,5 °C et 6 h à 11,5 °C.
b) Quatre périodes de manipulation avec 2 h à 14,5 °C et 2 h à 11,5 °C.
La lumière était présente lors de la phase la plus chaude de chaque manipulation.
m = marge de l'otolithe.

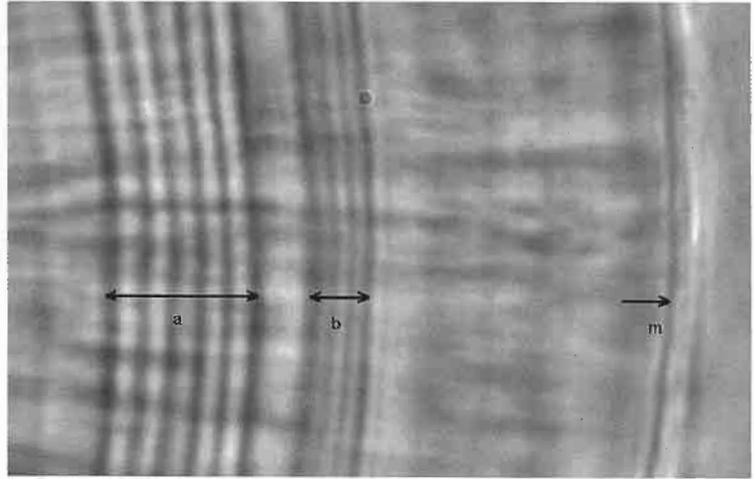


Figure IV.A.6
Exemple de marque induite par une période de 3 jours de cycle de photopériode de 6h jour-6h nuit chez un *Salmo salar* juvénile (photo P.J. Wright).

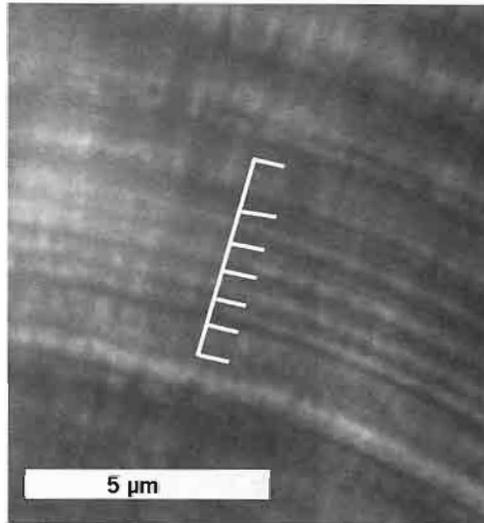
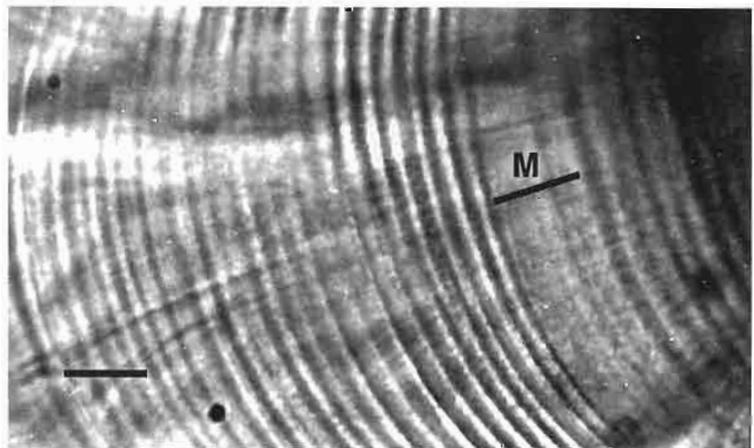


Figure IV.A.7
Exemple de marque (M) induite par la combinaison d'un cycle de photopériode de 6h jour-6h nuit avec une augmentation de la température de 3 °C pendant la phase lumineuse chez *Gasterosteus aculeatus*. Échelle = 10 µm (photo P.J. Wright).



1.2.4. Marquage chimique des otolithes (^{85}Sr , Sr et lanthanides)

Le marquage des otolithes en utilisant du ^{85}Sr n'est pas très répandu, ceci étant dû en partie aux règles de sécurité concernant les travaux qui nécessitent des radio-isotopes. Dans une étude sur la dispersion des larves de corégone, *Coregonus lavaretus*, Lehtonen *et al.* (1992) ont marqué des larves fraîchement écloses avec du ^{85}Sr dans une solution de $1\,400\text{ kBq}\cdot\text{l}^{-1}$ de ^{85}Sr . La marque radioactive a pu être détectée dans les larves entières jusqu'à 60 jours après le marquage. La manière dont l'otolithe intègre le marqueur n'est pas claire et plusieurs études seraient encore nécessaires pour évaluer précisément la procédure de marquage qui conduirait à détecter systématiquement le strontium radioactif dans les otolithes.

Des otolithes de larves et de juvéniles ont été marqués en modifiant la composition chimique de l'eau dans laquelle les poissons étaient élevés. Deux types de méthode ayant des principes opposés peuvent être employés. Le premier concerne l'ajout d'un élément relativement fréquent, comme le strontium (Sr), pour modifier le rapport Sr/Ca dans l'otolithe. Ainsi, le chlorhydrate de strontium a été utilisé pour marquer une ponte de saumon avec succès (Schroder *et al.*, 1995). Une exposition de 24 h dans un bain de SrCl à des concentrations de 120 ppm ou plus conduit à des concentrations de strontium au moins cinq fois plus importantes dans les otolithes des animaux traités que chez les témoins. Les marques de Sr ont pu être détectées après 21 mois à l'aide de microsondes du type WDS ou en microscopie électronique à balayage en rétro-diffusion (chap. VII). Pour la deuxième catégorie de technique, le marquage s'effectue également en immergeant les poissons dans des solutions contenant des quantités très élevées de métaux rares (lanthanides). Ces éléments sont normalement très rares dans les otolithes de poissons et un marquage avec différentes concentrations peut produire des groupes de marques uniques pour les différentes sous-populations traitées. Ennevor & Beames (1993) ont utilisé différentes concentrations et procédures pour marquer les pontes et les smolts des saumons coho (*Oncorhynchus kisutch*) avec du lanthanum et du cérium, et ces éléments ont pu être détectés jusqu'à 10 mois et demi après le traitement. Cependant, le mode d'incorporation de ces éléments rares dans les otolithes est incertain et, de plus, leur détection est très sensible aux outils analytiques utilisés pour révéler leur présence (chap. VII).

2. Élevage et aquaculture

D'une façon générale, les expériences qui relâchent les poissons dans leur milieu naturel ou celles qui utilisent des conditions d'élevage extensif (mésocosmes), en procurant des conditions optimales pour la croissance et les comportements spécifiques, sont nettement préférables lors de l'étape de validation (Geffen, 1992). La meilleure approche pour valider est de laisser les poissons marqués dans le milieu naturel, comme cela a pu être réalisé dans le cas du pageot rose japonais (Tsukamoto *et al.*,

1989a), de l'anguille du Rhin (Meunier, 1994) et du saumon du Pacifique (Volk *et al.*, 1990, 1999). Cependant, comme un grand nombre d'individus doit être marqué pour espérer une recapture suffisante, l'expérience de validation nécessite d'obtenir les individus à partir de pontes récupérées ou provoquées, ou à partir de poissons capturés en nombre dans le milieu naturel (Geffen, 1992). Lorsqu'un élevage est nécessaire, des précautions particulières doivent être prises pour que les conditions soient les plus proches possibles du milieu naturel de l'espèce considérée (fig. IV.A.8). Pour ce faire, des enclos ou des bassins (fig. IV.A.8c, d) ont été utilisés dans plusieurs études mentionnées dans la littérature (Liew, 1974; Geffen, 1982; Simoneaux & Warlen, 1987).



Figure IV.A.8 - Différents types de système d'aquaculture utilisables dans les expériences de validation : d'un système complètement artificiel (a) à un environnement semi-naturel (f). L'expérience doit théoriquement refléter le plus possible le milieu naturel du poisson. a : bassins artificiels pour l'aquaculture en eau douce (université de Thammasat, Thaïlande); b : bassins en béton avec de l'eau douce soumis aux conditions climatiques locales (centre de recherches océanologiques, Layo, Côte-d'Ivoire); c : cages immergées dans une lagune d'eau saumâtre (centre de recherches océanologiques, Layo, Côte-d'Ivoire); d : cages en mer ouverte (Research Institute for Marine Fisheries, Sulawesi, Indonésie); e : large bassin en béton ouvert sur un lagon (Albion Fisheries Research Center, île Maurice); f : étangs semi-naturels pour l'aquaculture en eau douce (centre national de recherche agronomique, Côte-d'Ivoire) (photos J. Panfil).

Les conditions dans lesquelles les expériences de validation sont conduites doivent être particulièrement contrôlées et maîtrisées car des facteurs comme l'apport exogène d'aliments, la fréquence de ces apports, le volume du milieu d'élevage et la température peuvent affecter, chacun à leur niveau, le taux de croissance des poissons et la périodicité des dépôts sur les PC (Geffen, 1982; Neilson & Geen, 1982; Radtke & Dean, 1982; McGurk, 1984; Al-Hossaini & Pitcher, 1988). Lors d'expériences en laboratoire, une périodicité de dépôt inférieure à la journée a été expliquée par l'incapacité d'obtenir en captivité les forts taux de croissance observés dans la nature (Al-Hossaini & Pitcher, 1988). Les conditions d'élevage en laboratoire conduisent souvent à des stress artificiels, à la formation de micro-accroissements sub-journaliers et à des interruptions ou à des discontinuités de croissance (Pannella, 1980; Morales-Nin, 1987a). Les poissons élevés sous des conditions de température constante ou sous une période lumineuse variable présentent sur leurs otolithes des zones-D et des zones-L moins distinctes que les poissons élevés à l'extérieur (Geffen, 1982; Campana, 1984). Pour toutes ces raisons, les expériences de validation devraient être conduites à la fois dans des conditions de laboratoire et dans des conditions naturelles, ou seulement en milieu naturel (Geffen, 1982; Gjosaeter *et al.*, 1984; Campana & Neilson, 1985).

3. Traitement des données

Le traitement statistique des données issues des expériences de validation est relativement simple. En général, la relation entre le nombre de jours écoulés après le marquage et/ou le début de l'élevage et le nombre de marques de croissance sur la PC analysée est calculée en suivant un modèle de régression linéaire :

(IV.A.1) nombre de marques = $a \cdot$ nombre de jours de croissance + b
où a est la pente et b est l'ordonnée à l'origine de la régression.

L'étape suivante de l'analyse consiste à tester si la pente diffère de façon significative d'une pente égale à 1 ($a = 1$) et si l'ordonnée à l'origine est égale à 0 ($b = 0$). Le test de signification utilise la plupart du temps un test t de Student. Plusieurs résultats peuvent être obtenus, par exemple, dans le cas de microstructures :

- si $a = 1$ et $b = 0$, les marques comptées sont liées au nombre de jours de l'expérience. La validation est positive et accomplie ;
- si $a = 1$ et $b \neq 0$, le rythme des dépôts correspond au nombre de jours de l'expérience mais ne débute pas dès le premier jour ;
- si $a \neq 1$ et $b \neq 0$, il n'existe pas de relation directe entre le nombre de marques de croissance et le nombre de jours et le dépôt n'est donc pas journalier. Cependant, si un changement dans la fréquence des dépôts semble apparaître, des tests séparés peuvent être effectués pour chaque intervalle de groupe d'âge pour vérifier si le rythme de dépôt n'est pas journalier pendant un intervalle. Ceci est particulièrement nécessaire lorsque les taux de dépôt initiaux sont inférieurs à un par

jour mais augmentent par la suite. Si tous les micro-accroissements sont inclus dans une telle analyse, le résultat montrera une sous-estimation du taux de dépôt aux stades (âges) concernés et pour lesquels ils auraient dû être quotidiens.

La méthode présentée précédemment est la seule justification statistique possible pour les dépôts d'accroissements quotidiens. Cependant, cette approche, ne rejetant pas une hypothèse de travail nulle, ignore la source potentielle d'erreur de type II et conclut que les accroissements sont formés quotidiennement alors qu'ils peuvent ne pas l'être en réalité. La probabilité d'éviter une erreur de type II peut être mesurée en calculant la puissance statistique du test. En calculant cette puissance pour la régression du comptage des microstructures dans le temps, on peut ainsi déterminer s'il est vraisemblable qu'une différence significative de la pente pourrait être détectée si elle existait réellement et ainsi juger de la pertinence de la conclusion d'un dépôt quotidien. Les méthodes pour calculer les puissances statistiques des régressions sont maintenant largement répandues dans les logiciels de statistique. Rice *et al.* (1987) ont écrit une synthèse très utile sur cette question.

B. Validation semi-directe

J. Panfili, B. Morales-Nin

L'une des méthodes de validation les plus utilisées, la validation semi-directe, consiste à observer l'évolution des zones marginales d'une PC au cours du temps. C'est une méthode puissante qui nécessite l'observation de séries chronologiques régulières de marques de croissance sur la période considérée, en fonction du rythme de dépôt qui doit être mis en évidence (journalier, saisonnier ou autre), et sur un grand nombre d'individus. Cette méthode consiste à choisir une marque donnée et, en observant le bord de la PC, à suivre sa formation au cours du temps pour une population donnée. Le résultat sera exprimé comme une moyenne et/ou un pourcentage d'observations au niveau de la population. La marque de croissance sélectionnée doit être suffisamment précise pour permettre la détection de sa formation à l'extrême bord de la PC, ce qui peut parfois se révéler délicat et difficile. La validation semi-directe est en général utilisée pour étudier les rythmes saisonniers des dépôts ; deux types de méthode sont envisageables, l'une utilisant des données qualitatives et l'autre des données quantitatives.

1. Données qualitatives et/ou quantitatives?

1.1. Données qualitatives

Cette méthode consiste à évaluer la présence ou l'absence d'une marque de croissance donnée sur le bord d'une PC et à exprimer les résultats sous la forme de pourcentages pour la population étudiée. L'évolution de ce pourcentage au cours du temps est alors tracée : la figure IV.B.1 montre le résultat pour un seul cycle de croissance annuel (fig. IV.B.1a) et pour deux cycles consécutifs de croissance annuels (fig. IV.B.1b). Le deuxième cas de figure est beaucoup moins commun dans les zones tempérées mais il a déjà été observé pour des espèces de poissons tropicaux (Yosef & Casselman, 1995). En Amérique du Nord, un système de codification de la marge des PC, présenté en premier par Casselman (1987) et amélioré ensuite par Casselman (1996), est maintenant largement utilisé pour les validations qualitatives semi-directes.

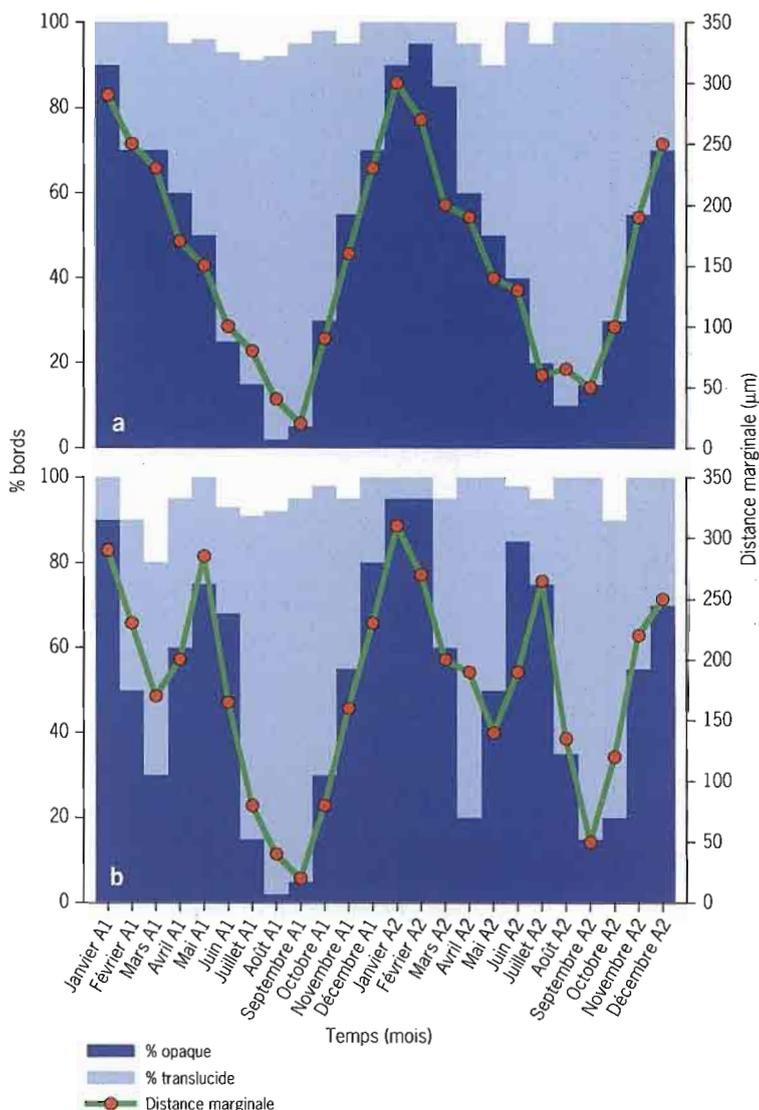


Figure IV.B.1 - Graphique théorique de l'évolution au cours du temps (deux années consécutives) du pourcentage de bords opaques, du pourcentage de bords translucides et de la distance marginale sur une PC. Ces exemples sont complètement artificiels et ne sont donc pas des observations issues du milieu naturel. La nature du bord, opaque ou translucide, est déterminée macroscopiquement. La distance marginale correspond à la distance entre le début de la dernière zone opaque et le bord de la PC.

a) Graphique théorique de l'apparition d'un cycle annuel. La zone opaque est déposée à la fin de chaque année (son pourcentage est maximal) tandis que la zone translucide est totalement formée en août. Pour certaines PC, l'évaluation de la nature du bord n'est pas possible et la somme des pourcentages (opaque + translucide) diffère donc de 100 % (e.g. juillet de l'année 1). La distance marginale suit l'évolution des pourcentages au cours du temps.

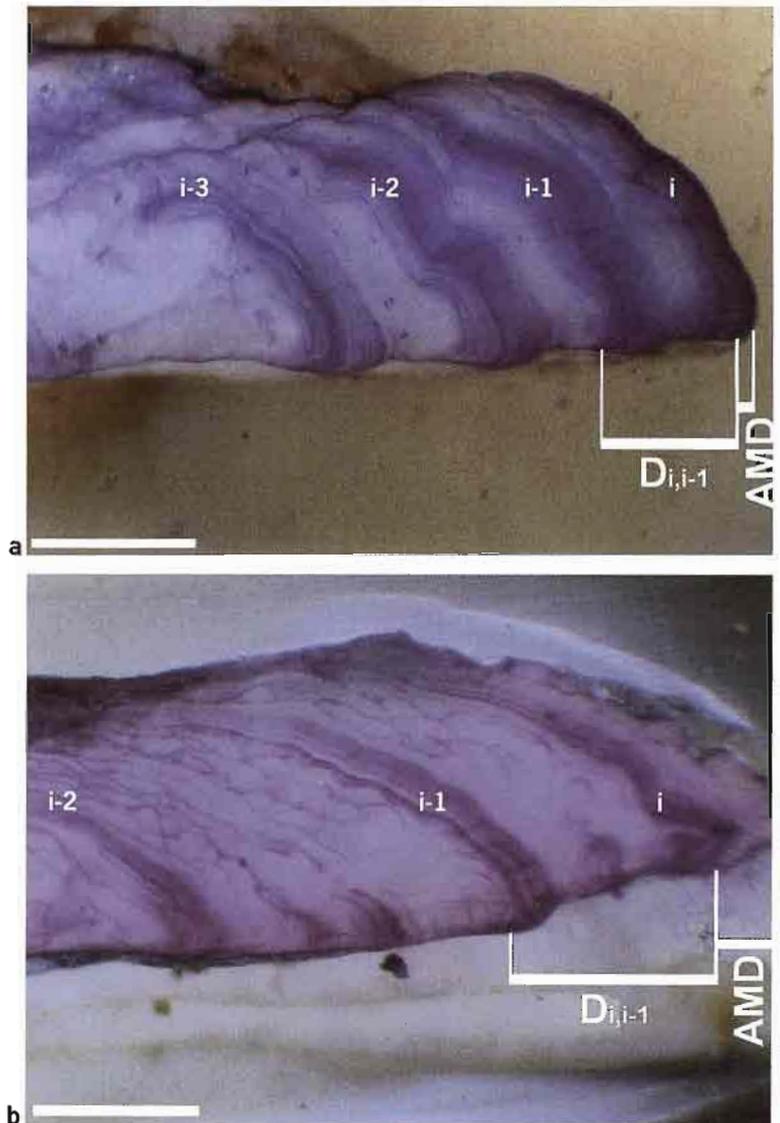
b) Graphique théorique de l'apparition de deux cycles annuels. Les zones opaques sont déposées vers le mois de mai et à la fin de chaque année (pourcentages maximaux) tandis que les zones translucides sont déposées en avril et en août. Une variation inter-annuelle est observée avec un certain glissement de la période des dépôts d'une année à l'autre : la première zone opaque est totalement déposée en mars la première année et en avril la seconde année. Pour certaines PC, l'évaluation de la nature du bord n'est pas possible et la somme des pourcentages (opaque + translucide) diffère donc de 100 % (e.g. mars de l'année 1). La distance marginale suit l'évolution des pourcentages au cours du temps.

1.2. Données quantitatives

Cette méthode consiste à mesurer les distances séparant les dernières marques de croissance sur le bord d'une PC. L'axe de mesure choisi et la description des marques utilisées doivent être rigoureusement standardisés. La distance marginale absolue (AMD) est la distance séparant la dernière marque du bord de la PC (fig. IV.B.2). La distance marginale relative (RMD) est le rapport de la distance marginale absolue sur la distance séparant les deux dernières marques ($D_{i,i-1}$) (fig. IV.B.2) :

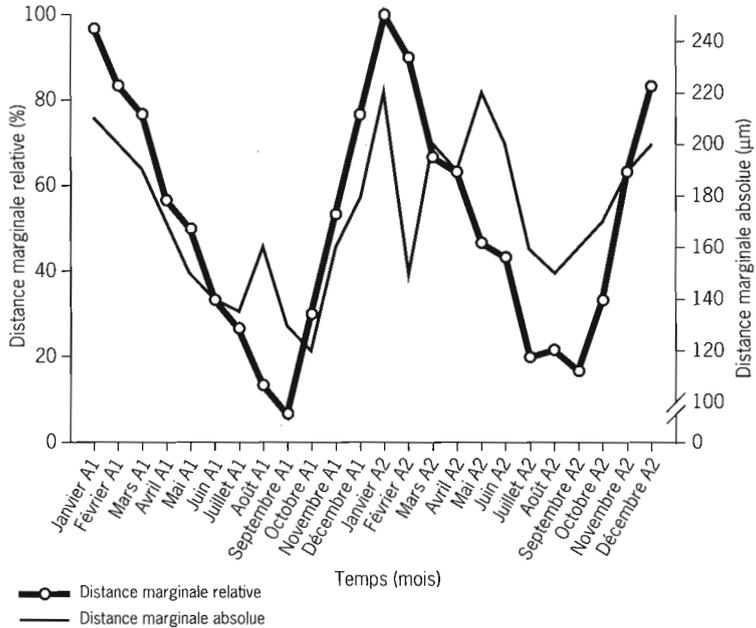
$$(VI.B.1) \quad RMD = \frac{AMD}{D_{i,i-1}}$$

Figure IV.B.2
Aspect des bords des sections transversales colorées des otolithes de *Colossoma macropomum* (Serrasalimidae). AMD, distance marginale absolue; $D_{i,i-1}$, distance entre la dernière zone i et la précédente zone $i-1$. La distance marginale relative est alors $RMD = AMD/D_{i,i-1}$. Échelle = 500 μm (photos J. Panfili)
a) Zone colorée sur le bord de l'otolithe d'un poisson de 455 mm (LS) capturé en septembre dans les eaux boliviennes.
b) Zone non colorée sur le bord de l'otolithe d'un individu de 457 mm (LS) capturé en mars dans les eaux boliviennes.



L'utilisation de l'AMD est recommandée lorsque l'on travaille séparément sur des classes d'âge (ou de marques) différentes. Les différences de taux de croissance entre les individus sont ainsi directement prises en compte. La variable RMD, qui est parfois exprimée en pourcentage, intègre et compense les effets de la diminution de la croissance avec l'âge : elle est moins sensible aux variations des taux de croissance car les mesures sont relatives (fig. IV.B.3). Il est souvent plus difficile de suivre un cycle avec l'AMD qu'avec la RMD. En général, les données quantitatives extraites de la marge d'une PC ne peuvent pas être mesurées pour les individus de la première année (sans marque de croissance saisonnière), sauf s'il a été démontré par ailleurs que la date de naissance des individus correspond exactement à la date de formation des marques de croissance choisies. Sinon, cette méthode quantitative ne peut être utilisée que pour les poissons ayant au moins une année de vie.

Figure IV.B.3
Graphique théorique de l'évolution au cours du temps (deux années consécutives) de la distance marginale de la dernière marque de croissance sur une pièce calcifiée. La distance marginale relative (en pourcentage) est la division de la distance entre le début de la dernière marque de croissance et le bord (AMD) par la largeur de la dernière marque entière ($D_{i,i-1}$). La marque est totalement formée à la fin de chaque année (largeur maximale). Le signal est plus clair pour la distance relative que pour la distance absolue car, dans ce dernier cas, toutes les classes d'âge sont mélangées et la diminution de la croissance avec l'âge n'est donc pas prise en compte.



1.3. Exemples d'études de validation semi-directe

Un exemple est donné ici et concerne l'observation de la marge de sections colorées d'otolithes de *Colossoma macropomum* (Serrasalmidae) du bassin du Mamoré (Amazonie bolivienne). Pour les données qualitatives, l'otolithe est soit coloré (fig. IV.B.2a) soit non coloré (fig. IV.B.2b). Il peut être parfois assez difficile d'interpréter le bord de l'otolithe à cause d'une accumulation de colorant à l'interface résine-otolithe. Pour les données quantitatives, l'axe de mesure et les points précis de mesure de la marque de croissance (début, milieu, fin) doivent être clairement définis et standardisés au départ. Dans l'exemple présenté, le début d'une zone colorée est choisi comme point de

mesure. Cependant, les largeurs des zones mesurées peuvent varier car un anneau de croissance est en fait constitué de plusieurs bandes chromophiles (fig. IV.B.2a). La validation semi-directe appliquée aux otolithes de *C. macropomum* a permis de montrer que les zones colorées sont déposées annuellement et correspondent à la saison sèche dans les eaux douces de l'Amazonie bolivienne (Loubens & Panfili, 1997).

La méthode d'analyse des accroissements marginaux a été très souvent utilisée pour déterminer les périodes de formation de marques de croissance annuelles sur tous les types de PC (écailles, otolithes, vertèbres, rayons de nageoires) pour des espèces de Téléostéens de régions tempérées (Beall & Davaine, 1988; Robert & Vianet, 1988; Crawford *et al.*, 1989; Schramm, 1989; Vianet *et al.*, 1989; Mann & Beaumont, 1990; Fletcher, 1991; Hales & Hurley, 1991; Hyndes *et al.*, 1992; Tserpes & Tsimenides, 1995; Pearson, 1996; Machias *et al.*, 1998; Vilizzi & Walker, 1999, *inter alia*), de Téléostéens tropicaux (Loubens, 1978; Cayré & Diouf, 1983; Davis & Kirkwood, 1984; Sosa-Nishizaki *et al.*, 1989; Loubens & Panfili, 1992, 1997, 2000; Crabtree *et al.*, 1995; Yosef & Casselman, 1995; Fabre & Saint-Paul, 1998; Chung & Woo, 1999; Morales-Nin *et al.*, 1999), pour les espèces profondes (Massutí *et al.*, 1994; Gordon & Swan, 1996; Morales-Nin *et al.*, 1996b) et même pour les requins (Lessa *et al.*, 1999).

La validation semi-directe des micro-accroissements journaliers a été largement moins utilisée mais elle a pu être testée dans quelques cas (Tanaka *et al.*, 1981; Ré *et al.*, 1985; Geffen, 1987; Gartner, 1991). Cette méthode n'a pas été souvent utilisée car elle est techniquement plus compliquée à mettre en œuvre, impliquant aussi des méthodes lourdes de préparation des otolithes (e.g. lames minces, MEB) et de forts grossissements pour l'observation (nécessitant le MEB plutôt que le microscope photonique et son faible pouvoir de résolution).

2. Problèmes d'interprétation du bord des otolithes

Toutes les études ayant utilisé la validation semi-directe à partir des otolithes ont mentionné des difficultés pour évaluer la nature du bord de l'otolithe : opaque ou translucide, coloré ou non coloré, etc. Cela peut parfois aboutir à un certain nombre d'otolithes « non interprétables » au cours de l'analyse. Trois hypothèses explicatives peuvent être avancées lorsque l'on observe des otolithes entiers :

- l'otolithe est plus épais dans sa zone centrale que sur ses bords où les marques sont moins claires et moins bien contrastées. Sous une lumière transmise, le bord de l'otolithe peut être très réfringent (fig. IV.B.4a). Lorsque c'est le cas, l'otolithe devrait être observé après une préparation (e.g. en section épaisse) pour améliorer l'observation des bords ;
- l'interprétation de la nature du bord se réfère toujours à l'observation des marques précédentes (e.g. opaques et translucides) et la densité relative de ces marques peut varier suivant la région d'observation sur l'otolithe ;

- le taux de croissance est variable en fonction des différents champs de l'otolithe (e.g. antérieur, postérieur, dorsal, ventral) et conduit à des marques de croissance plus épaisses sur certains axes préférentiels (fig. IV.B.4b). L'observation est alors différente en fonction du champ considéré et il est nécessaire de définir au préalable des critères précis d'interprétation (continuité d'une marque sur l'ensemble de l'otolithe, présence ou absence de la marque dans une région donnée). Pour les poissons âgés, la croissance est souvent limitée aux faces interne et dorso-ventrale et les marques de croissance ne sont alors visibles que dans ces champs, la face externe ne pouvant être utilisée pour les analyses. Ces remarques sont également valables pour l'observation des micro-accroissements des otolithes car les plus périphériques tendent aussi à être moins discernables (fig. IV.B.4c).

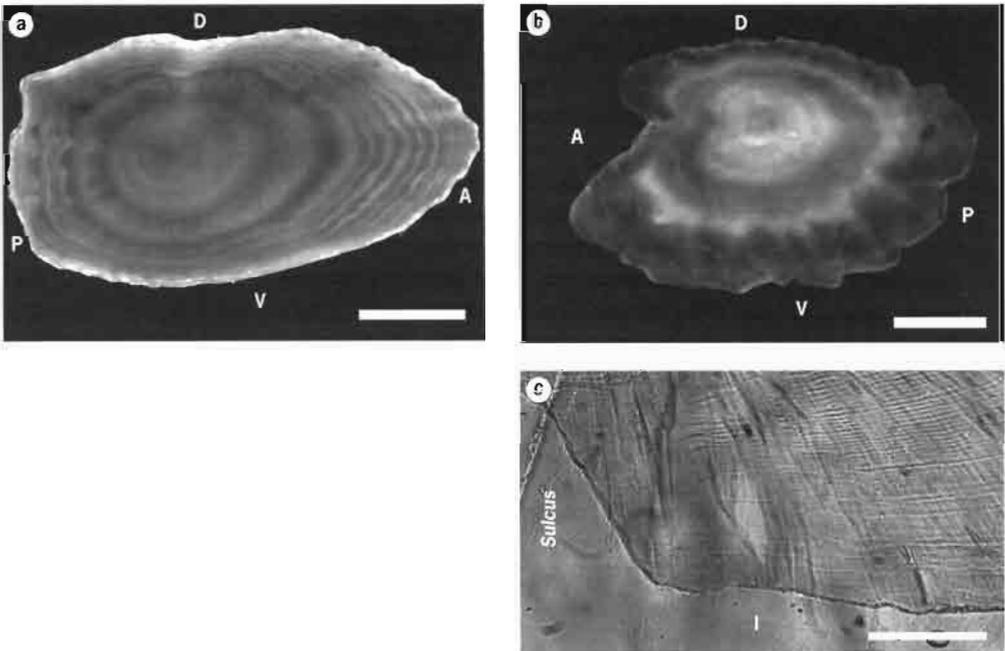


Figure IV.B.4 - Difficultés pour interpréter l'aspect du bord des otolithes. A, antérieur; D, dorsal; I, interne; P, postérieur; V, ventral (photos J. Panfili).

a) Otolithe entier d'une plie (*Pleuronectes platessa*) observé sous une lumière transmise. Le bord de l'otolithe est particulièrement réfringent et il est très difficile à interpréter. Échelle = 2 mm.

b) Otolithe entier d'une anguille européenne (*Anguilla anguilla*) observé sous une lumière réfléchie. L'aspect du bord est opaque sur la face antéro-ventrale et il est plus translucide sur la face postéro-dorsale. Ceci peut être expliqué par deux facteurs : (1) la réduction de l'épaisseur de l'otolithe sur le bord et (2) les différences de taux de croissance entre les faces. Échelle = 500 μ m.

c) Lame mince transversale de l'otolithe de *Selar boops* observée sous une lumière transmise. L'interprétation du bord devient difficile pour les micro-accroissements les plus proches du bord qui perdent alors leur contraste. Échelle = 20 μ m.

C. Validation indirecte

B. Morales-Nin, J. Panfili

Les méthodes de validation indirecte sont basées sur des comparaisons d'informations qui appuient l'interprétation de l'âge mais qui ne valident pas *sensu stricto* la périodicité des dépôts sur les PC. Les méthodes les plus couramment employées sont basées sur l'information issue de l'analyse des distributions de fréquence de taille qui sont également utilisées en routine dans les études de pêcheries. Ces méthodes ont été mises au point à l'origine au cours du XIX^e siècle et ont eu un deuxième pic de popularité avec l'avènement des ordinateurs bon marché et le développement de logiciels spécifiques. Les autres méthodes sont basées sur les informations en âge issues de l'analyse des PC au niveau saisonnier ou journalier.

1. Comparaison avec les distributions de tailles

Les méthodes basées sur l'analyse des compositions en taille des captures conduisent à identifier les différents groupes d'âge présents, en se basant sur l'hypothèse que chaque groupe d'âge possède une distribution gaussienne des tailles individuelles et une taille modale qui lui est propre. Petersen (1891) a été le premier à identifier les modes correspondant aux groupes d'âge dans les distributions de longueurs. La classe d'âge 0 correspond au mode de la plus petite taille présente dans les échantillons collectés après la période de reproduction, alors que le mode suivant correspond à la classe d'âge I, etc. (fig. IV.C).

Depuis lors, de nombreuses méthodes ont été développées pour identifier les classes d'âge dans une distribution de longueurs donnée. Celles-ci incluent :

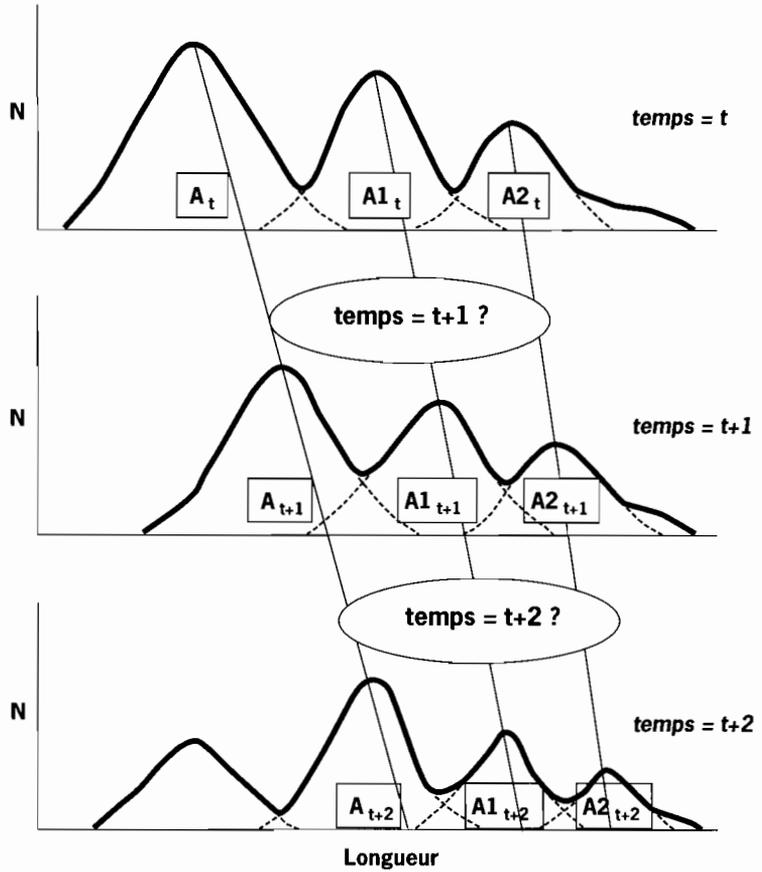
- des méthodes graphiques qui identifient des groupes de points obtenus par transformation mathématique des fréquences en longueurs correspondant aux classes d'âge (Cassie, 1954; Bhattacharya, 1967);
- des méthodes statistiques qui utilisent les rapports de maximum de vraisemblance (Hasselblad, 1966), combinées avec des informations antérieures concernant le nombre de classes d'âge présentes et leur longueur moyenne (McDonald & Pitcher, 1979) ou incorporant d'autres informations biologiques (Schnute & Fournier, 1980, *inter alia*).

Si les clés âge-longueur issues de la lecture des PC sont disponibles pour les mêmes échantillons que ceux utilisés pour l'analyse des fréquences de taille, les distributions de longueurs pour chaque classe d'âge, estimées à partir des PC, peuvent être comparées avec les distributions observées, au moyen d'un test χ^2 .

L'utilité de ces méthodes statistiques pour la décomposition des groupes d'âge à partir des distributions de fréquence est limitée lorsque (a) l'espèce présente une période de reproduction très longue et/ou (b) il existe

Figure IV.C

Principe de la méthode d'analyse des fréquences de taille avec un jeu de données hypothétique présentant les distributions de fréquence pour trois échantillons capturés à trois périodes différentes (t , $t+1$, $t+2$). Au temps t , il existe trois classes d'âge (A_t , $A1_t$, $A2_t$) ayant chacune des distributions normales de fréquence de taille. L'hypothèse de base de l'analyse suppose qu'au temps $t+1$, les âges deviennent égaux à A_{t+1} , $A1_{t+1}$ et $A2_{t+1}$ et qu'au temps $t+2$, les âges deviennent égaux à A_{t+2} , $A1_{t+2}$ et $A2_{t+2}$. Il faut noter qu'au temps $t+2$, une nouvelle classe d'âge apparaît dans la population. Les lignes traversant les graphiques suivent les progressions modales hypothétiques des longueurs pour chaque classe d'âge.



une très forte variabilité dans les taux de croissance, qui augmente en général avec l'âge. Les deux conditions précédentes entraînent un chevauchement des longueurs observées entre les différents groupes d'âge et nuisent à l'identification de ces groupes. Les méthodes basées sur les distributions de longueurs ne peuvent donc être fiables que pour les premiers groupes d'âge ou pour les espèces à faible longévité.

Une autre approche vise à calculer directement les paramètres de l'équation de croissance de von Bertalanffy à partir des fréquences de taille (Pauly & David, 1981 ; Casselman, 1987) et à les comparer avec les paramètres de croissance obtenus avec les clés taille-âge issues de la lecture des PC.

2. Méthodes utilisant d'autres informations sur l'âge

Lorsqu'une classe d'âge exceptionnelle (e.g. faible ou abondante en nombre d'individus) peut être suivie pendant une longue période de temps, elle peut servir de base de référence pour indiquer que la méthode de lecture de l'âge est exacte. La force ou la faiblesse d'une classe d'âge donnée sera très rapidement perdue si la méthode d'estima-

tion de l'âge est incorrecte car les âges seront attribués aux mauvaises classes (Eltink & Kuitert, 1989). Cependant, un biais propre à un lecteur, qui est défini comme l'attribution subjective d'un âge en fonction de l'existence d'une classe d'âge particulièrement identifiable, aura vraisemblablement un effet sur les résultats en termes d'âge. Ce biais peut être évité en utilisant l'ensemble des PC d'une cohorte exceptionnelle échantillonnée avec un nombre d'individus constant et au cours de plusieurs années consécutives. L'analyse de ce genre de donnée pourra déterminer si une PC provenant d'une cohorte exceptionnelle peut être utilisée dans les ateliers de lecture pour estimer la précision, l'exactitude et les différents biais de lecture (relatifs ou absolus) d'une méthode donnée de lecture d'âge : un exemple a été présenté par l'ICES (1999) pour le chinchard commun. Cela peut permettre également de tester les effets d'erreurs d'estimation de l'âge sur la gestion des stocks.

Il est maintenant établi de façon claire que l'observation des marques de croissance journalières peut assister et aider l'interprétation des macrostructures des otolithes (voir synthèse dans Arneri *et al.*, 1998). Le comptage au microscope des micro-accroissements a déjà été utilisé pour vérifier directement qu'une zone opaque et une zone hyaline représentaient bien un *annulus* (Victor & Brothers, 1982). Cette approche de vérification est cependant limitée par :

- le problème pour détecter au microscope ces microstructures pour les poissons de plus de une année ;
- la nécessité de valider au préalable la périodicité quotidienne des micro-accroissements considérés ;
- la difficulté pour identifier les macrostructures (*annuli*) avec les forts grossissements nécessaires pour l'observation des microstructures. À cause de ces différents problèmes, les accroissements journaliers sont normalement utilisés pour valider seulement la formation du premier *annulus*.

Une méthode alternative intéressante consiste à suivre une cohorte unique de juvéniles, recrutée pendant une même année, à partir d'échantillons collectés pendant une période donnée à des intervalles de temps précis, à compter les micro-accroissements sur les otolithes et à comparer les résultats avec le nombre de jours séparant les différents échantillons. La régression linéaire entre les dates de capture et la moyenne des estimations d'âge en nombre de jours pour les échantillons doit avoir une pente égale à 1 s'il existe un dépôt journalier des microstructures (Hoedt, 1992). Cette méthode suppose qu'il n'existe pas de phénomène de migration dans ou hors de la zone d'échantillonnage.

Lorsque l'âge de poissons juvéniles est estimé grâce aux micro-accroissements quotidiens de leurs otolithes, leur date de naissance peut être déterminée rétrospectivement à partir de leur date de capture et de leur âge en nombre de jours. S'il existe une bonne correspondance entre la période de reproduction et la date de naissance recalculée, la nature d'un dépôt quotidien des accroissements est ainsi confortée (Morales-Nin & Aldebert, 1997).

D. Vérification

B. Morales-Nin, J. Panfili

L'étape de vérification permet de contrôler le processus d'interprétation de l'âge à partir des PC, i.e. la répétitivité et/ou la précision des interprétations en termes de valeurs chiffrées, qui peuvent être parfois différentes des âges réels. Par exemple, si deux lecteurs sont d'accord sur le nombre de marques présentes dans une PC, ou si deux PC différentes du même poisson sont interprétées avec le même nombre de marques de croissance, l'étape de vérification est accomplie (Wilson *et al.*, 1983). Des indices de précision sont alors facilement générés et donnent ainsi des informations utiles sur les sources d'erreurs potentielles dans les études d'estimation de l'âge. Les applications les plus courantes concernent les comparaisons d'estimations entre les lecteurs et/ou entre les méthodes employées (Secor & Dean, 1989). Les indices calculés peuvent également servir à juger de la difficulté du processus d'estimation de l'âge pour différentes espèces et à rejeter, par exemple, les échantillons de qualité douteuse (Campana & Jones, 1992). Toutefois, un accord entre les lectures de différentes PC signifie simplement que la formation des marques correspond à des événements majeurs dans la vie des individus et, en aucun cas, il ne peut servir à calculer la fréquence des dépôts sur une base temporelle.

1. Différentes lectures réalisées par un ou plusieurs lecteurs : biais d'uniformité

Lors de l'interprétation d'une PC, il est toujours nécessaire de la lire plus d'une fois de façon à réduire une certaine part de la subjectivité propre au lecteur. Pour garder une certaine indépendance entre les différentes lectures, toutes les données individuelles (e.g. taille, date de capture, etc.) ne doivent pas être connues à l'avance par le(s) lecteur(s). Plusieurs indices et tests statistiques sont disponibles pour déterminer le niveau d'accord entre les lectures. L'une des méthodes les plus simples consiste à comparer les résultats de plusieurs lectures effectuées par un ou plusieurs lecteurs pour la même PC. Le pourcentage d'accord (PA) peut être calculé : il est égal au rapport du nombre de lectures identiques sur le nombre total de lectures (en pourcentage). Le PA dépend cependant de la longévité de l'espèce considérée : un PA de 95 % sur une année entre deux lecteurs pour la morue du Pacifique indiquerait une faible précision des lectures, étant donné le faible nombre de classes d'âge dans la pêcherie ; en contrepartie, un PA de 95 % sur cinq années indiquerait une bonne précision pour une espèce comme l'aiguillat commun (Squalidae), étant donné sa longévité qui atteint 60 ans (Beamish & Fournier,

1981). Ces derniers auteurs ont ainsi proposé l'utilisation de l'indice appelé pourcentage moyen d'erreur (PME) :

$$(IV.D.1) \quad PME = 100 \% \cdot \frac{1}{R} \sum_{i=1}^R \frac{|X_{ij} - \bar{X}_j|}{\bar{X}_j}$$

où X_{ij} est la $i^{\text{ème}}$ estimation d'âge du $j^{\text{ème}}$ poisson, \bar{X}_j est l'âge moyen du $j^{\text{ème}}$ poisson et R le nombre de fois que l'on donne un âge à chaque poisson. Lorsque la moyenne est faite à partir de plusieurs poissons, on obtient un indice sous la forme de PME moyen. Chang (1982) a suggéré d'incorporer un écart type dans l'équation précédente plutôt que d'observer la variance sur l'âge moyen. La nouvelle équation qui en résulte donne l'estimation du coefficient de variation (CV), et ne suppose donc pas que l'écart type est proportionnel à la moyenne :

$$(IV.D.2) \quad CV = 100 \% \cdot \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^R (X_{ij} - \bar{X}_j)^2}{R-1}}}{\bar{X}_j}$$

Le CV peut être moyenné pour un certain nombre d'individus et l'on obtient ainsi un CV moyen. Il est statistiquement plus robuste que le PME et aussi plus souple à utiliser (Kimura & Lyons, 1991). Cependant, il n'existe pas de valeur seuil du CV pour accepter ou rejeter les résultats des lectures, car il est fonction de l'espèce considérée ainsi que de la gamme d'âges représentés. Laine *et al.* (1991) ont suggéré comme limite une valeur maximale de 5 % pour le CV pour considérer que les lectures sont acceptables.

Des efforts considérables sont entrepris par les comités internationaux pour standardiser les processus de lecture d'âge. Des programmes d'échanges et des ateliers de lecture ont été organisés dans ce sens (Eltink *et al.*, 2000). Les résultats des lectures peuvent maintenant être analysés en utilisant des feuilles de calcul spécialement développées (Eltink, 1994, 1997).

Pour la lecture des microstructures journalières des otolithes, il est recommandé de faire une double lecture par un même lecteur, d'abord depuis le *primordium* vers le bord et ensuite à l'inverse, du bord vers le *primordium*, sur le même axe de croissance (Campana, 1992). Pour l'échantillon considéré, si aucune différence significative n'est trouvée entre ces deux lectures à l'aide d'un test t pour échantillons appariés, la moyenne des lectures peut être utilisée comme valeur de l'âge (Campana & Jones, 1992). Ces derniers auteurs ont aussi suggéré d'utiliser une pondération pour permettre de prendre en compte la crédibilité des lectures individuelles.

2. Différentes lectures réalisées à partir de plusieurs pièces calcifiées

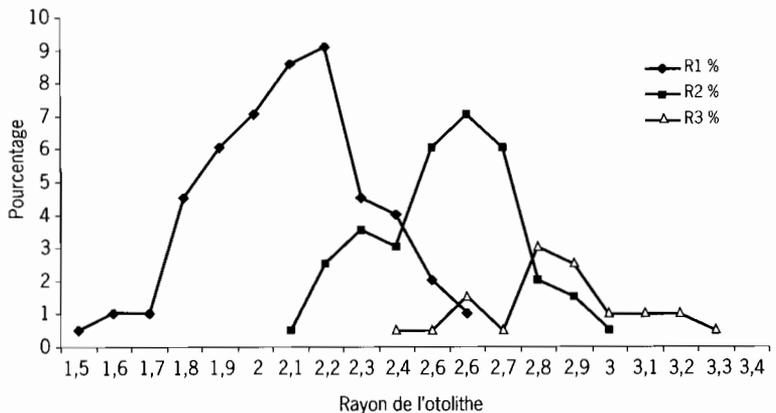
Si la formation des marques de croissance est causée par des événements majeurs au cours de la vie des individus, elles doivent se retrouver sur toutes les PC de l'échantillon considéré. Les différentes lectures de plusieurs PC doivent donc aboutir aux mêmes résultats. Dans le but de comparer ces résultats, les mêmes indices que ceux décrits dans le chapitre précédent (chap. IV.D.1), PME et/ou CV, sont utilisés. Un autre test de comparaison de deux lectures de PC différentes (e.g. otolithes vs vertèbres) consiste à préparer une table de contingence (tableau croisé) à double entrée et à opérer un test de symétrie (Hoenig *et al.*, 1995).

Même si les otolithes droit et gauche sont en général similaires (sauf chez les poissons plats, chap. II.A), la lecture devrait toujours concerner les otolithes du même côté pour éviter d'éventuels biais. Si toutefois un problème d'interprétation survient, l'otolithe restant de l'autre côté peut être utilisé.

3. Tendance dans les patrons de croissance

Un autre critère de vérification peut être représenté par la régularité de formation des marques de croissance. La largeur de chacune des marques doit montrer une diminution des taux de croissance avec l'augmentation de l'âge. Cette décroissance plus ou moins linéaire des intervalles entre les marques saisonnières représente le fondement des méthodes d'estimation de l'âge (May, 1965). De plus, si leur formation est une réponse à des événements environnementaux, un synchronisme doit être observé à l'échelle de la population. La régularité des patrons de croissance peut ainsi être démontrée en traçant le graphique de la fréquence des distances entre le centre de la PC et la marque considérée pour toutes les PC (fig. IV.D.1) et en testant la normalité des distributions par un test de Kolmogorov-Smirnov.

Figure IV.D.1
Distances des trois premiers anneaux des otolithes de *Salpa salpa*, mesurées sur des rayons depuis le centre vers chaque anneau (R1, R2, R3). Les anneaux présentent des distributions normales et une tendance à une diminution de la croissance (de leur rayon) avec l'âge.

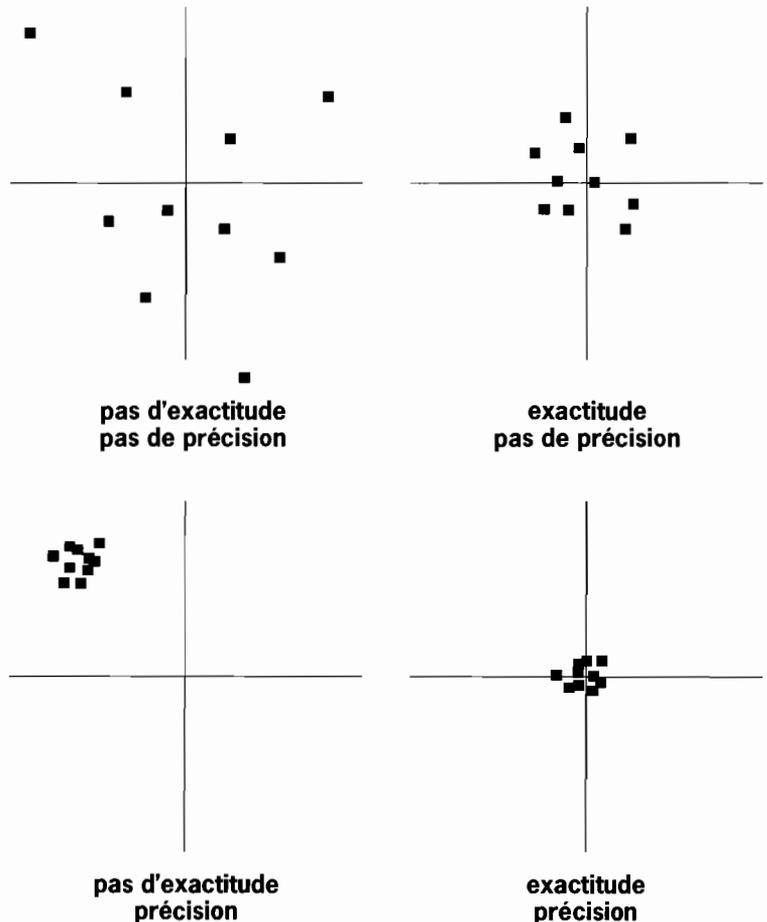


Une autre méthode utilisant les tendances dans les patrons de croissance consiste à comparer les tailles aux âges obtenues directement à partir de la lecture des PC avec les tailles rétrocalculées à chaque âge (chap. V.A.2). Les longueurs aux âges observées à partir de l'interprétation des PC doivent être calculées à l'aide de poissons échantillonnés pendant la période de formation des marques (translucide, opaque, discontinuité, etc.) considérées pour le rétrocalcul. Autrement, la taille à un âge donné correspond à une période d'une année complète pour un groupe d'âge donné tandis que la taille rétrocalculée correspond obligatoirement à un moment donné de l'année (lors de la formation de la marque mesurée) : ceci entraîne des différences à la fois pour les tailles moyennes et les écarts types.

4. Exactitude et précision

L'exactitude correspond à la proximité d'une estimation quantitative (valeur mesurée ou calculée) par rapport à sa vraie valeur (fig. IV.D.2).

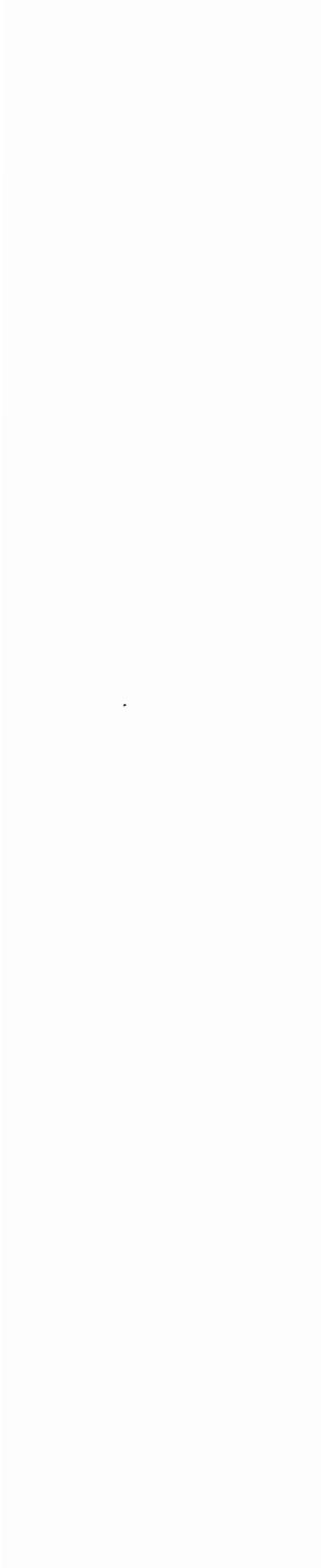
Figure IV.D.2
Exactitude et précision
dans les études
de sclérochronologie.
Les résultats
des estimations d'âge
(carrés noirs)
sont tracés
par rapport à la vraie valeur
de l'âge (intersection
des axes X et Y).
L'exactitude correspond
à la proximité par rapport
à la vraie valeur tandis
que la précision correspond
à la proximité de mesures
répétées.



La précision correspond à la proximité de mesures répétées de la même quantité (fig. IV.D.2). Pour des mesures techniques sans biais, la précision implique aussi de l'exactitude mais les deux termes ne sont pas équivalents. Dans toute étude d'estimation de l'âge, il est théoriquement nécessaire de calculer chacun de ces deux paramètres de façon à les améliorer à chaque étape de la méthode utilisée. Cependant, les estimations exactes n'ont pas besoin d'être précises et *vice versa* (Campana & Moksness, 1991). Ainsi, un âge moyen peut être exact alors que les observations individuelles qui conduisent à son estimation ne sont pas précises. À l'opposé, et c'est souvent le cas dans les études sur l'âge, les estimations peuvent être précises (entre les lecteurs ou pour le même lecteur) mais pas nécessairement exactes (Campana & Jones, 1992).

Chapitre V

Quelques exemples d'utilisation des données d'âge individuel



Les taux de croissance et de mortalité sont des paramètres essentiels de la dynamique des populations ichthyologiques et, en principe, les informations concernant l'âge sont nécessaires à l'estimation précise de ces taux. Ce manuel ne visant pas à passer en revue tous les exemples possibles d'applications, nous avons choisi de présenter quelques cas représentatifs d'utilisation des données d'âge. Dans la première partie du chapitre, nous présentons des définitions générales des mesures de la croissance faisant appel à des données d'âge. Au cours du développement d'un organisme, les diverses parties du corps peuvent croître à des vitesses différentes : nous évoquerons brièvement cette question dans le cadre d'étude de l'allométrie et de la condition. Un avantage majeur des marques de croissance des PC est de permettre l'estimation de la taille acquise par un poisson à des moments successifs de son cycle de vie, grâce à des procédures de rétrocalcul qui reconstituent une séquence ou une trajectoire de croissance sur une base individuelle. Le principe général et les hypothèses de base du rétrocalcul de la taille du poisson à partir de mesures sur des PC sont présentés dans cette partie.

La seconde partie du chapitre propose des exemples d'applications écologiques nécessitant l'utilisation des données d'âge. La prise en compte de ces dernières est considérée comme essentielle pour la compréhension des principaux processus régulant le recrutement des populations ichthyologiques marines. Des taux de mortalité plus élevés peuvent être associés à des individus de faible taille, à une croissance sous-optimale et/ou à des dates de naissance ne coïncidant pas avec des conditions de milieu favorables. Le mécanisme causal peut être étudié grâce à l'analyse des PC à partir d'individus échantillonnés au cours de la période de mortalité sélective (e.g. Meekan & Fortier, 1996).

De nombreux stocks exploités dans les pêcheries de pays développés sont évalués à l'aide de modèles de population structurés en âge. Les laboratoires halieutiques du monde entier utilisent régulièrement les PC pour estimer l'âge des poissons par la lecture des marques de croissance saisonnières. La collecte, l'étude et le traitement des PC telles que les otolithes, les écailles et les structures osseuses représentent une part considérable des coûts associés aux évaluations de stocks halieutiques. Dans la dernière partie du chapitre, nous donnons un certain nombre d'exemples illustrant la manière dont les données d'âge sont intégrées dans les modèles d'évaluation de stocks. Nous insistons plus particulièrement sur les avantages mais aussi les exigences des modèles structurés en âge par rapport à d'autres types de modèle. Nous montrerons ainsi dans quelle mesure l'information supplémentaire fournie par l'estimation de l'âge peut justifier le surcroît de travail.

A. Croissance et analyse de la croissance

A. Folkvord, H. Mosegaard

1. Modèles de croissance

1.1. Mesures de la croissance

La croissance absolue correspond à l'augmentation totale de la matière corporelle ou de la dimension du corps et le taux de croissance absolue est défini comme la croissance absolue sur une période donnée (voir ci-dessous). On peut citer comme exemple l'accroissement journalier des otolithes de larves de poissons qui représente la croissance radiale de l'otolithe au cours d'une période de 24 heures. Si le taux de croissance absolue demeure constant dans le temps ou si l'augmentation est constante en valeur absolue (i.e. si l'augmentation de la taille de l'otolithe s'effectue de manière régulière en termes absolus), nous avons une croissance linéaire.

Dans ce qui suit, S désigne la taille de la pièce calcifiée (PC représentant une écaille, un otolithe, etc.) et T désigne le temps. La taille peut correspondre à des mesures de rayon, de longueur, de surface ou de poids. Le taux de croissance absolue (TCA) peut être défini comme :

$$(V.1) \quad \text{TCA} = \frac{S_2 - S_1}{T_2 - T_1}$$

Les mesures de croissance absolue sont parfois d'un intérêt limité puisqu'elles dépendent largement des dimensions de la structure mesurée. Une façon de contourner ces problèmes de différences de taille consiste à calculer la croissance relative, en rapportant la croissance absolue à la taille initiale. La croissance relative exprime ainsi l'augmentation proportionnelle de la taille. Comme pour le taux de croissance absolue, nous pouvons calculer le taux de croissance relative (TCR) comme la croissance relative (moyenne) observée sur une période donnée :

$$(V.2) \quad \text{TCR} = \frac{S_2 - S_1}{S_1 \cdot (T_2 - T_1)}$$

Lorsque le taux de croissance relative est constant sur une courte période, on peut l'exprimer selon la formule suivante :

$$(V.3) \quad g = \frac{dS}{dt \cdot S}$$

dans laquelle g est également appelé taux instantané de croissance. En intégrant ces éléments dans le temps, on obtient l'expression de g suivante (en supposant g constant) :

$$(V.4) \quad g = \frac{\ln S_2 - \ln S_1}{T_2 - T_1}$$

Dans les cas où le taux de croissance est correctement décrit par la relation ci-dessus, nous avons un cas de croissance exponentielle, en d'autres termes une situation où l'augmentation proportionnelle de

taille est constante par unité de temps. Si cette unité est une journée, le taux de croissance journalier peut alors être déterminé comme suit :

$$(V.5) \quad TCJ = (e^g - 1)$$

g étant calculé comme précédemment, sur une base quotidienne (Ricker, 1975). TCR, g et TCJ sont donnés comme proportions journalières. Afin d'obtenir le taux de croissance en pourcentage et par jour, on peut multiplier chacune de ces mesures de croissance par 100. Le terme de taux de croissance spécifique, TCS, est souvent utilisé pour désigner g ou $100 \cdot g$.

Lorsque le taux de croissance par unité de temps est particulièrement élevé, le TCS et le TCJ donnent des valeurs de plus en plus divergentes. Ceci résulte d'une situation « d'intérêt combiné », où la croissance s'ajoute à la croissance pendant un jour. Ce phénomène peut être illustré en remplaçant TCJ par g (TCS) dans l'équation suivante :

$$(V.6) \quad S_2 = S_1 \cdot (1 + TCJ)^{T_2 - T_1}$$

L'utilisation du TCS à la place du TCJ dans l'équation conduira à une valeur S_2 sous-estimée.

La plupart des courbes de croissance peuvent être considérées comme linéaires sur de courtes périodes. Toutefois, lorsque l'on considère un pas de temps plus grand, la plupart des courbes de croissance deviennent non linéaires. Une courbe de croissance exponentielle peut rester pertinente pour des périodes plus courtes, comme par exemple le stade larvaire du hareng (Fiksen & Folkvord, 1999). Cependant, dans la majorité des cas, les organismes sont incapables de maintenir une croissance exponentielle à taux constant sur le long terme, du fait des variations dans la disponibilité de nourriture et/ou des contraintes physiologiques (contraintes surface-volume dépendantes de la taille). Quand on considère des données de croissance individuelles, une distinction importante doit être faite entre les données longitudinales et les données transversales (Chambers & Miller, 1995). Les données longitudinales correspondent au cas où plusieurs mesures de la taille d'un seul individu sont disponibles à différentes périodes tandis que, dans le cas de données transversales, seules les tailles à l'échantillonnage (à la capture, de fait) sont disponibles (fig. V.A.1). En halieutique, on utilise généralement des données taille-âge basées sur la taille individuelle lors de la capture (données transversales) pour établir des courbes de croissance. Cela revient à utiliser la taille d'individus à l'intersection de la droite verticale (moment de l'échantillonnage) avec les courbes de croissance individuelles respectives (fig. V.A.1b). De toute évidence, l'ensemble de ces points ne représentera pas le taux de croissance réel des individus étudiés et, de plus, toute perte sélective d'individus de grande ou de petite taille dans le temps entraînera un biais sur les estimations de croissance. D'un autre côté, si on utilise plusieurs mesures de taille-âge de tous les individus de la projection en bas à droite de la figure V.A.1b, alors des estimations non biaisées de croissance individuelle peuvent être obtenues. Une PC permet l'extraction de telles données longitudinales à partir d'individus et, selon les questions posées, il

peut valoir la peine de consacrer l'effort supplémentaire requis pour estimer l'âge et construire des trajectoires individuelles de croissance (chap. V.B et V.C). L'utilisation de données transversales nécessitera aussi d'estimer l'âge du poisson mais, dans ce cas, seules des mesures de croissance moyennes sur la population seront obtenues, au lieu de mesures de croissance individuelles. Dans ces différents cas, des comparaisons de tailles aux âges entre les groupes peuvent être effectuées par analyse de covariance (ANCOVA) sur les données taille-âge provenant des groupes respectifs. Par ailleurs, le traitement statistique de données longitudinales peut résoudre le problème de corrélations sérielles entre largeurs d'accroissement des PC (Chambers & Miller, 1995 ; Ralston & Howard, 1995 ; Jones, 2000). Les ANOVA sur mesures répétées et les méthodes de séries temporelles (e.g. ARIMA) sont prévues pour cela, et une discussion plus approfondie de ces techniques est présentée dans les références citées ci-dessus.

Dans de nombreux cas, lorsque la mortalité sélective dans la population est négligeable, ou peut être corrigée pour le devenir, les données transversales peuvent suffire. Afin de tenir compte de la mortalité sélective selon la taille entre échantillons, on peut par exemple ordonner les poissons de l'échantillon initial selon leur taille et exclure la proportion de cet échantillon initial qui correspond à la mortalité sélective entre les échantillons, avant de calculer le taux de croissance pour la population (Folkvord, 1997). On peut également obtenir des mesures moyennes de croissance individuelle à partir de données transversales. La taille d'un poisson capturé à l'âge de cinq ans fournira une mesure suffisamment précise de la croissance moyenne depuis la naissance, mais aucune information fine sur les modalités de croissance de cet individu au fil du temps ne peut être obtenue dans ce cas.

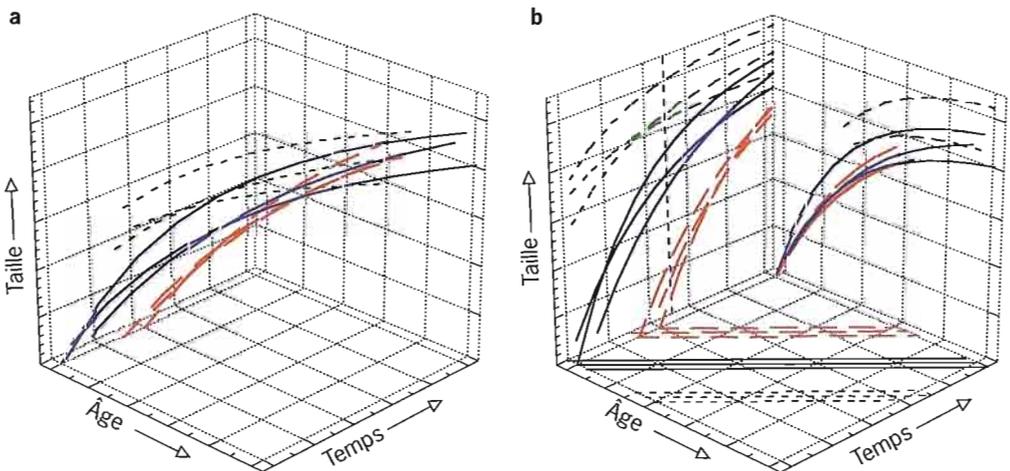


Figure V.A.1 - Représentation en trois dimensions de la croissance et de la longueur à chaque âge (modifiée d'après Chambers & Miller, 1995). Les individus des différentes cohortes sont présentés avec des lignes et des couleurs différentes. a) Croissance des individus au cours du temps et en fonction de l'âge. b) Projections des trajectoires individuelles de croissance dans le plan âge-taille, dans le plan temps-taille, et dans le plan temps-âge, respectivement. L'intersection entre la ligne verticale en pointillés sur le plan temps-taille et les courbes de croissance respectives représente les données croisées classiques de tailles aux âges obtenues à partir d'un échantillon donné.

1.2. Allométrie et modèles de croissance indépendants de l'âge

Les diverses parties du corps présentent des taux de croissance relatifs différents. Pour le poids et la longueur, les relations entre ces mesures sont souvent utilisées de diverses manières afin d'évaluer la croissance et la condition globales du poisson (e.g. Ferron & Leggett, 1994). La taille relative des PC (par exemple les otolithes) comparée à la taille du poisson peut également être influencée par « l'historique » de la croissance et de l'environnement du poisson (Casselman, 1990).

Dans ce qui suit, on notera W la mesure de la taille du poisson (poids) et S la taille de l'otolithe (ou de l'écaille). Une relation allométrique entre la taille du poisson et celle de l'otolithe peut être exprimée comme suit :

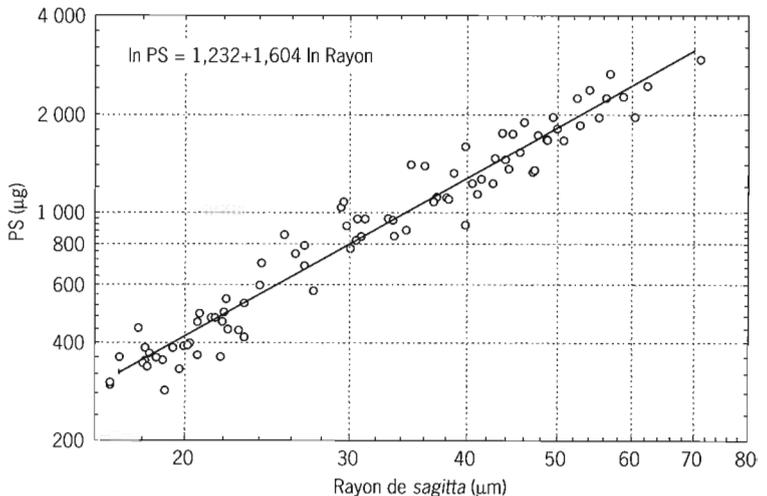
$$(V.7) \quad W = a \cdot S^b$$

ou sous forme logarithmique :

$$(V.8) \quad \log W = \log a + b \log S$$

Dans les relations longueur-poids des poissons, b vaut généralement entre 2 et 4 et il est souvent très proche de 3. Dans le cas des relations taille de l'otolithe-taille somatique, b dépendra du type de mesure utilisé. Lorsque l'on utilise une mesure monodimensionnelle de la taille de l'otolithe (par exemple le rayon le long de l'axe antéro-postérieur) et une mesure tridimensionnelle de la taille du poisson (par exemple le poids sec), une valeur de b proche de 3 correspondrait à une croissance isométrique. Ceci implique que le taux de croissance relatif est identique dans toutes les dimensions (axes) (chap. II.A). Une valeur de b inférieure à 3 indique que la croissance de l'otolithe dans l'axe antéro-postérieur est relativement plus rapide que celle des autres parties (dimensions) du poisson (fig. V.A.2). Lorsque la longueur du poisson est utilisée comme mesure de taille monodimensionnelle, b doit être plus proche de 1 lorsque la taille de l'otolithe est également mesurée à l'aide d'une mesure monodimensionnelle, comme précédemment (e.g. Hare & Cowen, 1995).

Figure V.A.2
Relation allométrique entre le rayon de l'otolithe (*sagitta*) et le poids sec (PS) de la larve. Données issues de larves de harengs (*Clupea harengus*) ayant un rayon d'otolithe > 18 µm et élevées à 8 °C (données de Folkvord et al., 2000). Noter que la pente de la droite de régression est inférieure à 3, indiquant que la croissance n'est pas isométrique.



On a observé que la croissance des différentes PC n'est isométrique par rapport à la croissance somatique que de façon transitoire (Casselman, 1990). La croissance des os, et plus encore celle des écailles, suit une allométrie positive (croissance des os et des écailles relativement plus rapide que la croissance somatique lorsque les taux de croissance augmentent), alors que la croissance de l'otolithe suit une allométrie négative (croissance de l'otolithe relativement plus lente que la croissance somatique lorsque les taux de croissance augmentent). Pour le brochet du Nord, la relation entre le taux de croissance des PC et le taux de croissance de la taille du corps L peut être modélisée par un polynôme du second degré :

$$(V.9) \quad dPC/dt = a \cdot (dL/dt) + b \cdot (dL/dt)^2$$

avec b inférieur à 1 pour la croissance de l'otolithe, mais supérieur à 1 pour la croissance des écailles et du *cleithrum* (Casselman, 1990). Ce modèle permet d'expliquer certaines observations générales sur l'impact des conditions de nutrition telles que la disponibilité de proie, qui influencent les tailles relatives des pièces calcifiées et du corps. Ainsi, lorsque les proies sont plus abondantes, le brochet présente des *cleithra* relativement plus grands. La taille relative des PC est donc un indicateur de croissance, qui reflète les variations du taux de croissance et de l'état de nutrition. Cependant, le modèle simplifié ne permet pas de rendre compte de certains cas extrêmes tels que la poursuite de la croissance d'otolithes alors même qu'un anneau d'arrêt se marque, ou encore la résorption des écailles lorsque les vieux poissons cessent de grandir (Mosegaard *et al.*, 1989; Casselman, 1990).

Dans de nombreux cas, les taux de croissance relatifs dans différentes dimensions ne restent pas constants sur de longues périodes, ce qui fait que la relation log-log entre les variables peut sembler non linéaire. Une transition marquée dans les relations longueur-poids (ou taille de l'otolithe-taille du poisson) peut intervenir lors d'événements marquants du développement, tels que la métamorphose des poissons plats ou la smoltification des Salmonidés, donnant lieu à des relations qui changent entre les différents stades. Dans de tels cas, il est normal de calculer des relations distinctes pour chaque stade (Bagenal & Tesch, 1978).

De la même façon que l'on peut utiliser directement les résidus de la régression log longueur-log poids comme mesures de la condition relative, les résidus des régressions taille somatique-taille de l'otolithe peuvent être considérés comme des mesures de taille relative de ce dernier (Hare & Cowen, 1995). La condition morphologique est le résultat cumulé de toute l'histoire de l'alimentation et de la croissance d'un individu ainsi que de son stade de maturité si bien que des individus ayant un taux de condition élevé se distinguent par un poids relativement élevé à une taille donnée. En ce qui concerne les otolithes, les plus gros d'entre eux tendent à être associés à des poissons à croissance lente plutôt qu'à ceux à croissance rapide, à taille identique (Reznick *et al.*, 1989; Secor & Dean, 1989; Casselman, 1990; Hare & Cowen, 1995; fig. V.A.3). Si la taille des PC et la taille somatique sont étroitement

liées, les résidus longueur-âge et rayon d'otolithe-âge doivent être corrélés positivement. C'est en effet le cas dans l'exemple présenté sur la figure V.A.3c : plus la corrélation entre les résidus est forte et plus la variabilité, indépendante de l'âge, de la taille somatique et de la taille des PC est faible. Dans le cas d'une corrélation parfaite, $r=1$, il n'y a aucune variabilité indépendante de l'âge ; le fait de connaître la taille somatique implique que la taille des PC est connue exactement, et inversement. De même, la corrélation entre les résidus âge-longueur de la figure V.A.3d et les résidus rayon d'otolithe-longueur de la figure V.A.3e sera positive si les individus à croissance lente tendent à avoir de plus gros otolithes à une longueur donnée, comme c'est le cas dans la figure V.A.3f. Si la taille relative de l'otolithe est indépendante de la croissance, alors la corrélation entre les derniers résidus sera égale à 0 : cette corrélation a donc été nommée « effet du taux de croissance » (ETC) (Hare & Cowen, 1995).

Si on peut décrire la croissance des poissons par un modèle général différentiable, et si la PC augmente de façon allométrique par rapport à la taille du corps, alors la relation du taux de croissance de la PC comme fonction du taux de croissance du corps, $dPC/dt = f(dL/dt)$, peut être résolue pour un groupe homogène d'individus, avec la relation allométrique $PC = c + a \cdot L^b$, indépendante du taux de croissance corporelle (Xiao, 1996). Trois modèles de croissance différents, i) von Bertalanffy, ii) logistique et iii) Gompertz, ont donné des types de relation très différents entre le taux de croissance somatique et le poids de l'otolithe. Le fait d'ajouter de la variabilité dans les paramètres de chacun de ces modèles a révélé la fragilité de cette approche lorsque les individus ne respectent pas strictement les hypothèses. En outre, dans le même article, l'auteur a étudié numériquement l'observation commune d'un prétendu effet du taux de croissance sur la relation taille de l'otolithe-taille du poisson (e.g. Reznick *et al.*, 1989). Templeman & Squires (1956) avaient observé que, chez l'églefin (*Melanogrammus aeglefinus*), le ratio longueur de l'otolithe sur longueur totale diminuait avec la taille du poisson, mais augmentait avec l'âge pour une taille de poisson identique. Xiao (1996) a utilisé ces données sur l'églefin dans un exercice de simulation où il modélisait la taille de l'otolithe en fonction du taux de croissance du poisson avec les trois modèles mentionnés ci-dessus. Il a obtenu, quel que soit le modèle, des représentations peu réalistes de la relation entre la longueur de l'otolithe et le taux de croissance somatique. Cet exercice démontre que, même si le poids et la longueur de l'otolithe peuvent évoluer proportionnellement à la longueur du poisson selon une relation dépendante de l'âge, les trajectoires de croissance individuelles taille de l'otolithe-taille du poisson ne peuvent être aisément déduites de moyennes sur la population. À terme, le développement de nouveaux modèles intégrés reflétant le contrôle de la croissance de l'otolithe par le métabolisme pourrait fournir des représentations plus réalistes de la relation taux de croissance somatique-taille de l'otolithe.

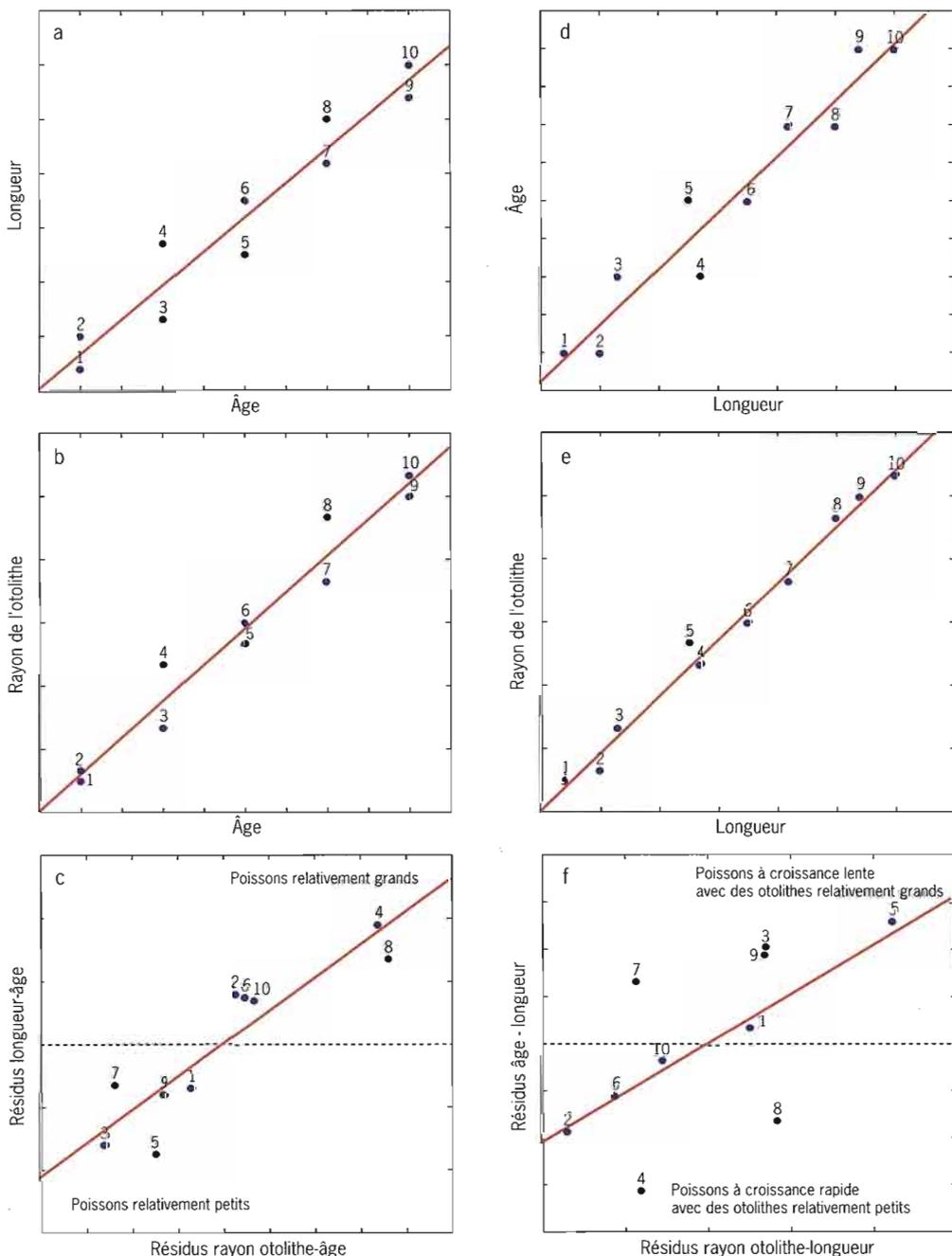


Figure V.A.3 - Exemples schématiques de la croissance de différents éléments du corps chez un poisson : a) longueur, b) otolithe, c) corrélation correspondante des résidus longueur-âge et rayon d'otolithe-âge issus de a) et b). Une forte corrélation entre les résidus indique une faible variabilité indépendante de l'âge sur la relation otolithe-longueur du poisson, suggérant que la croissance cumulée de l'otolithe reflète globalement la croissance somatique et vice versa. La corrélation entre les résidus des relations âge-longueur d) et rayon d'otolithe-longueur e) représente une mesure globale du fait que les poissons à croissance relativement rapide possèdent des otolithes relativement petits (dans le cas d'une corrélation positive) pour une longueur de poisson donnée (ou dans le cas d'une corrélation négative que les poissons à croissance relativement lente ont des otolithes relativement grands). Les corrélations positives sont synonymes d'un effet «taux de croissance» lorsque les poissons à croissance lente ont des otolithes relativement grands et les poissons à croissance rapide ont des otolithes relativement petits f). (modifié d'après Hare & Cowen, 1995).

1.3. Modèles de croissance basés sur l'âge

Le modèle de croissance le plus fréquemment utilisé dans la recherche en halieutique est la fonction de croissance de von Bertalanffy (FCVB). Dans sa forme basée sur la longueur, elle s'énonce comme suit :

$$(V.10) \quad L_t = L_\infty(1 - e^{-K(t-t_0)})$$

où L_t est la longueur moyenne à l'instant t , et L_∞ , K et t_0 sont les paramètres à déterminer. Une hypothèse implicite de la FCVB est que le taux de croissance instantané est :

$$(V.11) \quad \frac{dL}{dt} = a + bL$$

avec b négatif.

Ceci implique que le taux de croissance en longueur diminue à mesure que la taille augmente et s'approche de 0 lorsque la taille avoisine L_∞ , la longueur asymptotique moyenne (Francis, 1995a). Le paramètre K est lié à la courbure de la trajectoire de croissance, des valeurs de K plus élevées indiquant un changement plus rapide du taux de croissance en longueur lorsque la longueur augmente. Le dernier paramètre t_0 représente l'âge (théorique) auquel la longueur moyenne vaudrait 0. Les courbes de croissance individuelles de la figure V.A.1 sont toutes basées sur la FCVB. Les différentes formes de trajectoires correspondent à des valeurs différentes des trois paramètres du modèle.

Bien que la FCVB soit basée sur des principes physiologiques, étant donné certaines hypothèses, c'est essentiellement un modèle empirique utilisé pour l'estimation de paramètres. Une méthode simple pour estimer K et L_∞ de la FCVB implique le recours au graphique de Ford-Walford, où L_{t+1} est tracé en fonction de L_t . Pour obtenir les paramètres avec cette méthode, on réécrit la FCVB avec le changement de variable $e^{-K} = k$, et on résout en $t+1$ pour obtenir :

$$(V.12) \quad L_{t+1} = L_\infty(1 - k^{(t-t_0)} \cdot k)$$

Ceci peut être réécrit comme suit :

$$(V.13) \quad L_{t+1} = L_\infty(1 - k) + kL_t$$

qui est de la forme $Y = a + bX$, où les paramètres peuvent être estimés par des méthodes de régression ordinaire. La pente est égale à k (ou e^{-K}), ce qui nous donne le paramètre K . Le paramètre L_∞ peut être obtenu en déterminant l'intersection entre la droite de régression et la bissectrice $Y = X$. Ces droites se coupent à la taille où $L_t = L_{t+1}$, ce qui correspond à la longueur asymptotique. L_∞ peut aussi être obtenue en injectant la valeur de k dans l'expression du point d'intersection, $L_\infty(1 - k)$.

La FCVB peut aussi être utilisée comme modèle de croissance en poids :

$$(V.14) \quad W_t = W_\infty(1 - e^{-K(t-t_0)})^3$$

où K et t_0 ont la même signification que ci-dessus et W_∞ est le poids asymptotique (Campana & Jones, 1992). À la différence de la FCVB basée sur la longueur, cette fonction de croissance présente un point d'inflexion où le taux de croissance est à son maximum.

Une autre fonction souvent utilisée en recherche halieutique est la fonction de croissance de Gompertz. La courbe correspondante présente également un point d'inflexion et, à l'instar de la FCVB, elle est

asymétrique autour du point d'inflexion. La fonction de Gompertz peut être formulée de plusieurs manières (Kaufmann, 1981), l'une d'entre elles étant sous forme intégrée :

$$(V.15) \quad W_t = W_\infty \cdot e^{(-e^{-g(t-t_0)})}$$

où W_∞ est le poids asymptotique et g une constante liée à la variation du changement de taux de croissance avec la taille.

Les paramètres de la FCVB, et ceux d'autres modèles de croissance, peuvent à présent être estimés de manière précise au moyen de techniques d'ajustements non linéaires pour mesures répétées (Jones, 2000). Celles-ci prennent correctement en compte l'interdépendance de données séquentielles sur de mêmes individus et évitent ainsi l'erreur commune qui consiste à procéder à l'estimation avec un nombre exagéré de degrés de liberté.

2. Rétrocalcul

L'un des principaux avantages de l'utilisation des informations d'accroissement enregistrées par les pièces calcifiées des poissons est la disponibilité de données sur la taille à des âges successifs, au niveau individuel (données longitudinales).

2.1. Éléments de base et hypothèses

Les premiers rétrocalculs de la taille des poissons remontent à 1910 lorsque Lea et ses collègues utilisèrent les marques de croissance sur les écailles de hareng pour estimer les taux de croissance. Par la suite, diverses applications ont impliqué l'utilisation des otolithes, des os (*cleithra*, vertèbres) et des épines, ainsi que l'usage de marques de croissance annuelles (macrostructures) et journalières (accroissements primaires et microstructures) (chap. II). Le rétrocalcul est une des principales méthodes permettant d'obtenir des estimations de croissance individuelle ainsi que les tailles aux âges successifs. Dans les études de terrain, c'est la principale alternative aux méthodes de marquage-recapture, avec toutefois l'avantage qu'elle peut être utilisée sur quasiment tous les individus capturés d'une population (stock), et pas seulement sur un nombre limité d'individus ayant été marqués puis recapturés. La méthodologie employée ressemble en de nombreux points à la dendrochronologie (étude des anneaux de croissance des arbres), qui a été utilisée pour étudier l'effet des variations climatiques sur les taux de croissance (e.g. Cook & Kairiukstis, 1990).

La procédure de rétrocalcul peut être définie comme l'estimation de la taille du poisson à une époque (ou des époques) passée(s), sur la base d'un ensemble de mesures de dimension des PC et de la taille du poisson réalisées à un seul instant (généralement à la capture) (Francis, 1990). Nous utiliserons ci-après les notations L pour la taille du poisson (par exemple sa longueur) et S pour la taille des pièces calcifiées (par exemple les écailles ou les otolithes). Les mesures de taille sont indexées avec i , représentant un âge arbitraire, et c , l'âge lors de la capture. Dans

ce contexte, une formule de rétrocalcul (FRC) permet de rétrocalculer L_i à partir de L_c , S_c et S_i .

Afin d'effectuer correctement un rétrocalcul, trois hypothèses principales doivent être respectées :

- la taille de la marque de croissance est la même que la taille de la PC au moment où cette marque a été formée (pas de résorption, ni de dégénération);
- le moment de formation supposé est correct ;
- la FRC rattache de manière précise la taille du corps à la taille des PC pour chaque poisson.

Concernant la première hypothèse, les longueurs rétrocalculées seraient biaisées si la taille de la marque sur la PC avait évolué dans le temps depuis son dépôt. Dans le cas des otolithes, on pense généralement que les structures ne changent pas après leur formation, notamment parce que l'otolithe est considéré comme une structure non cellulaire inerte (chap. II). En revanche, les écailles sont susceptibles de se résorber, en particulier chez les poissons proches de leur longueur asymptotique (Casselman, 1990). Pour cette raison, la validité des rétrocalculs basés sur les écailles peut être incertaine chez ces poissons. Pour la seconde hypothèse, il est essentiel de connaître l'âge à la formation des marques de croissance afin d'attribuer un âge correct à la taille rétrocalculée. La validation des marques (chap. IV) est indispensable, quelle que soit la PC utilisée. Enfin, il est essentiel d'établir une relation entre la taille des PC et la taille somatique qui permette de traduire les mesures sur les PC en tailles somatiques estimées. De nombreux articles ont été écrits sur la manière de procéder par rétrocalcul (voir la revue de Francis, 1990). Les sections suivantes présentent un résumé de quelques techniques employées.

2.2. Méthodes par régression versus méthodes proportionnelles

La taille passée du poisson peut être calculée sur la base d'une relation entre la taille des PC et la taille somatique (certaines transformations peuvent être effectuées sur l'une ou l'autre variable mais ce point n'est pas essentiel ici). L'approche par régression est fondée sur une relation commune entre la taille somatique et la taille des PC, qui peut être décrite de la manière suivante :

$$(V.16) \quad \text{FRC avec régression : } L_i = b(S_i) \quad \text{où } b \text{ est une fonction.}$$

Dans sa forme la plus simple, cette approche ne tient pas compte du point à la capture (S_c , L_c) qui caractérise l'individu de façon unique (fig. V.A.4a). Dans ce cas, toutes les tailles rétrocalculées seraient en fait dérivées de la même droite de régression. On peut également utiliser les droites parallèles (pente commune) à partir de chaque point terminal (S_c , L_c) et déterminer ainsi les tailles passées à partir d'une série de droites parallèles (fig. V.A.4b). Le problème est que ce type de méthode par trop simplifiée suppose que la même pente de la relation taille de PC-taille somatique peut être appliquée à tous les poissons. Une approche par régression simplifiée n'est en général pas recommandée pour les rétrocalculs (Francis, 1990).

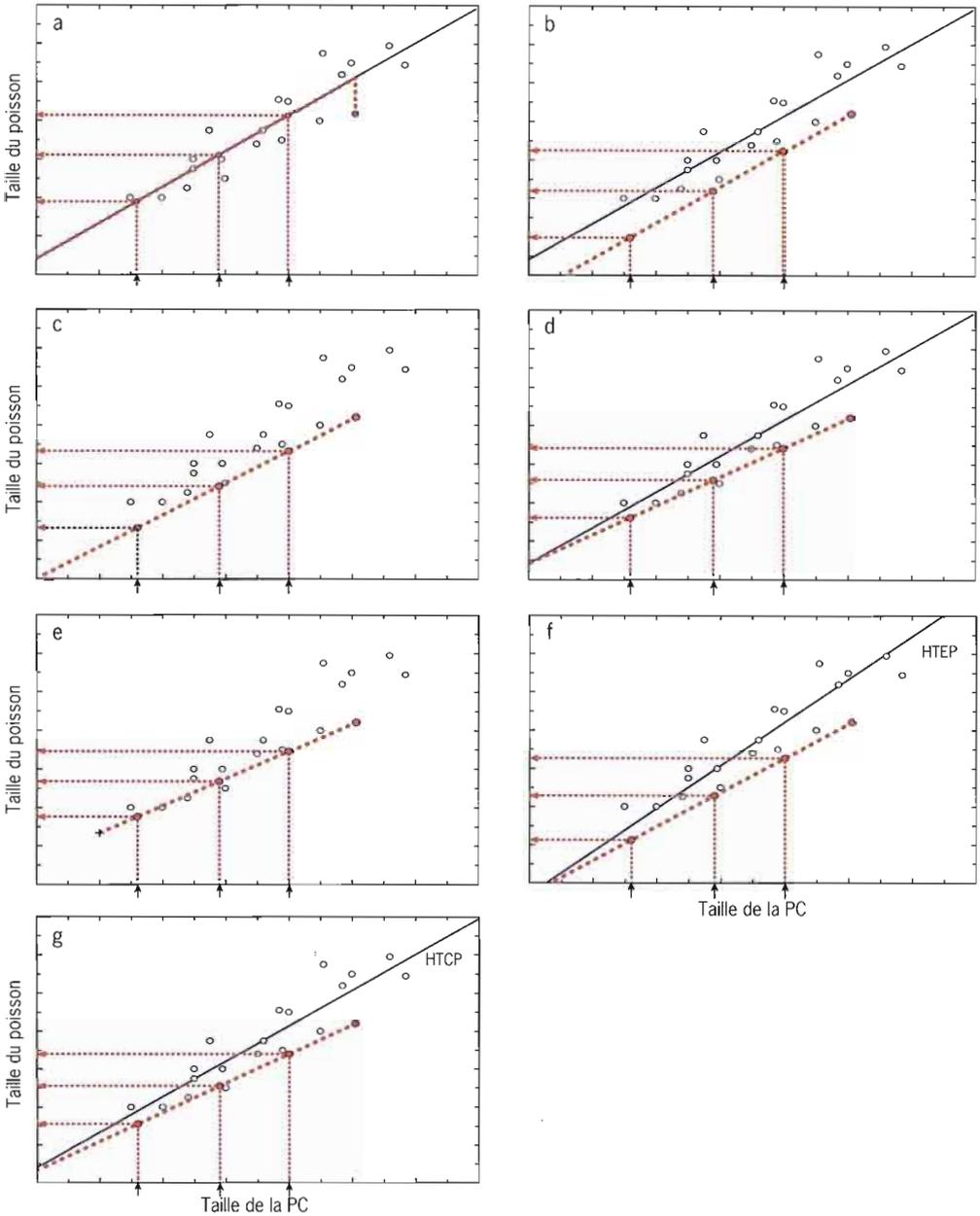


Figure V.A.4 - Rétrocalcul de la taille du poisson basé sur différents modèles de rétrocalcul. a) Approche par régression supposant que toutes les trajectoires de croissance individuelle sont équivalentes. b) Approche par régression impliquant des pentes similaires pour les relations taille de PC-taille du poisson pour tous les individus. c) Procédure de Dahl-Lea utilisant une proportionnalité directe (ordonnée à l'origine). d) Procédure de Fraser-Lee utilisant des intersections fixes sur l'ordonnée. e) Méthode du point d'intersection biologique utilisant un point de départ déterminé biologiquement (marqué +). f) Méthode HTEP linéaire. g) Méthode HTCP linéaire. Le même jeu de données est utilisé dans chaque cas et la croissance est seulement calculée pour l'un des poissons (cercles pleins). Les trois flèches sur l'axe des abscisses représentent les tailles respectives des marques de croissance de la PC du poisson étudié. La ligne en pointillés à partir de la taille à la capture représente la trajectoire de croissance rétrocalculée, tandis que les lignes pointillées verticales et horizontales illustrent la transformation de la taille de la PC en taille de poisson correspondante. Des différences dans les tailles rétrocalculées sont visibles sur l'axe des ordonnées. La droite de régression (trait continu) représente la relation entre la taille de la PC (PC) et la taille du poisson (L) utilisée pour calculer les paramètres des équations de rétrocalcul. La régression de L en PC est montrée pour a, b, d et g, tandis que f est basé sur la régression de PC en L.

Par opposition, les méthodes proportionnelles définissent une série de droites (une droite par poisson) partant d'un point commun. Ces droites présenteront des pentes différentes et le point (S_c, L_c) déterminera la droite devant être utilisée pour chaque individu dans le rétrocalcul. Dans cette approche, le raisonnement sous-jacent est que les poissons présentant des otolithes relativement grands à la capture, à une taille somatique donnée, sont également ceux qui ont vraisemblablement présenté de gros otolithes à des tailles précédentes ; de même, les poissons présentant des otolithes relativement petits par rapport à leur taille ont sans doute eu de petits otolithes au moins à une certaine époque antérieure à la capture. La principale différence entre une approche par régression et une approche proportionnelle est illustrée sur la figure V.A.4, et l'on peut noter que le mauvais usage de la méthode par régression dans la figure V.A.4a conduit à estimer une diminution irréaliste de la taille du poisson depuis la dernière marque de croissance, notamment à cause de la taille relativement faible de l'otolithe lors de la capture. L'autre méthode, en utilisant la pente commune de la régression pour chaque point (S_c, L_c) , générerait des droites parallèles aux droites de régression globales mais, dans les exemples présentés dans la figure V.A.4b, des tailles de poissons non réalistes en seraient déduites pour les PC de petite dimension.

2.3. Points de départ des méthodes proportionnelles : détermination statistique versus points de référence biologique

Il y a de bonnes raisons de penser que, pour le rétrocalcul, les méthodes proportionnelles sont préférables aux méthodes par régression à pente unique. Tout d'abord, rien ne permet d'affirmer qu'une seule relation taille de PC-taille somatique suffise pour tous les individus d'une population. Au contraire, on a fréquemment observé des poissons présentant différentes dimensions de PC à une taille donnée, de même qu'il existe des poissons présentant des indices de condition relative différents. En second lieu, on dispose d'une vaste documentation permettant d'affirmer que les écailles de poissons (et/ou les otolithes) se forment dans une fenêtre d'âge et de taille relativement étroite. Dans une perspective d'âge et de temps plus étendue, cela permet d'avoir un point de départ relativement bien défini de la relation taille de PC-taille somatique : en d'autres termes, les droites individuelles partiront d'un point commun plutôt que d'évoluer en parallèle. En matière de rétrocalcul, il existe deux voies essentielles pour déterminer le point de départ commun des méthodes proportionnelles. Ce point est soit calculé par une régression, soit déterminé manuellement sur la base de critères biologiques (par exemple la longueur du poisson au moment où l'écaille commence à se former).

La méthode la plus élémentaire pour déterminer le point d'intersection sur la base de critères biologiques est celle de Dahl-Lea, qui suppose une proportionnalité constante entre la taille de la PC et la taille somatique.

Ceci oblige toutes les droites à passer par l'origine ; autrement dit, si la taille du poisson est 0, alors celle de la PC est également 0 (fig. V.A.4c) :

$$(V.17) \quad \text{FRC de Dahl-Lea : } L_i = \frac{L_c}{S_c} S_i$$

Un développement plus approfondi du concept de point d'intersection biologique est intuitif puisque l'on peut avancer que la taille à laquelle un poisson développe des écailles, par exemple, est relativement constante. Chez le hareng, cette étape intervient vers la métamorphose, à des longueurs d'environ 40 à 50 millimètres. Ceci correspondrait au point d'intersection sur la figure V.A.4d (c'est-à-dire la taille du poisson lorsque la taille de la PC est nulle). C'est ainsi que se justifie la correction du point d'intersection dans la procédure de Fraser-Lee, que celui-ci soit prédéterminé sur une base biologique ou estimé sur l'échantillon par régression. Dans de tels cas, la formule de rétrocalcul (FRC) peut être écrite comme suit :

$$(V.18) \quad \text{FRC de Fraser-Lee : } L_i = c + (L_c - c) \cdot (S_i / S_c)$$

où c est le point d'intersection prédéterminé (ou déterminé par la régression $L = c + dS$). La logique du choix d'un point déterminé à partir de la régression de L sur S dans la FRC est probablement que L sera déterminée à partir de S . La validité mathématique de ce raisonnement a été remise en question par Francis (1990). Nous proposons ci-après une formulation plus rigoureuse.

L'un des avantages d'une détermination manuelle du point d'intersection devient apparent quand il n'y a pas linéarité dans les relations taille de PC-taille somatique dans les stades précoces (ou qu'elle ne peut être obtenue par des transformations *ad hoc*). Dans de tels cas, le rétrocalcul proportionnel par méthodes de régression dépendra du nombre relatif d'individus de petite et de grande tailles présents dans l'échantillon. S'il y a beaucoup d'individus de petite taille, la droite de régression obtenue pourrait être biaisée et ne pas refléter la linéarité globale de la relation taille de PC-taille somatique chez les poissons plus gros et plus âgés (Campana, 1990).

Campana (1990) propose une extension de la méthode de correction de Fraser-Lee. Il a développé la méthode du point d'intersection biologique avec une correction qui n'est pas établie sur l'ordonnée mais en un point situé hors du quadrant où taille des PC et taille somatique sont toutes deux positives. Dans le cas des otolithes, cette méthode est plus pertinente car ces derniers sont déjà présents dans le poisson au moment de l'éclosion, contrairement aux écailles qui apparaissent plus tard dans le développement. En pratique, le point d'intersection biologique peut également être déterminé par les tailles moyennes de la PC et du corps au début de la proportionnalité. La FRC pour la méthode du point d'intersection biologique peut être formulée comme suit (Campana, 1990) :

$$(V.19) \quad L_i = L_c + (L_c - L_0) \cdot (S_i - S_0) / (S_c - S_0)$$

où (L_o, S_o) représente le point d'intersection biologique (fig. V.A.4e). La formule peut également s'écrire :

$$(V.20) \quad \frac{(L_i - L_o) - (L_c - L_o)}{(L_c - L_o)} = \frac{(S_i - S_o) - (S_c - S_o)}{(S_c - S_o)}$$

Lorsque $L_o = 0$ et $S_o = 0$, cette FRC est identique à la méthode de Dahl-Lea (proportionnalité directe à partir de l'origine). Quand seule $S_o = 0$, elle est identique à la FRC de Fraser-Lee.

Bien que la méthode du point d'intersection biologique donne, la plupart du temps, des tailles rétrocalculées plausibles, elle a été critiquée pour son manque de rigueur mathématique et ses propriétés statistiques discutables (Francis, 1995a). Cette méthode ne prend pas en compte la variabilité dans les relations taille de PC-taille somatique autour de l'éclosion, même si celle-ci est de fait très faible dans l'absolu. Puisque le point d'intersection biologique est établi plus ou moins manuellement, il est difficile de comparer les précisions de divers exemples de rétrocalcul, car on ignore encore dans quelle mesure le résultat dépend du choix du point de départ.

Bien que l'utilisation d'un point d'intersection réaliste soit importante quant à la précision des tailles rétrocalculées à des âges intermédiaires, la corrélation effective entre taille du poisson et taille de l'otolithe à ce stade initial, ainsi que les changements ultérieurs de proportionnalité entre croissance somatique et otolithique sont les deux facteurs qui déterminent la précision de la taille rétrocalculée à l'éclosion. On a montré à plusieurs reprises que la variabilité de la relation taille d'otolithe-taille du poisson au stade de l'éclosion était forte, avec pour résultat le fait que la taille de l'otolithe explique moins de 25 % de la variabilité de la taille des poissons. Pour cette raison, le strict respect de la proportionnalité (allométrique) est essentiel dans la méthode de rétrocalcul.

Un aperçu du changement de proportionnalité entre la taille de l'otolithe et celle du poisson chez les juvéniles peut être obtenu en réexaminant les résultats d'une étude menée sur des alevins de saumon *Oncorhynchus nerka* (Wilson & Larkin, 1982 : valeurs approximatives lues sur leur fig. 3). Des alevins pesant entre 0,5 et 1 g ont été marqués et pesés individuellement au départ puis après 28 jours de croissance. Les *sagittae* ont été mesurées le long du même axe jusqu'au bord en comptant à rebours 28 microstructures. L'hypothèse d'une croissance allométrique sous la forme d'une fonction puissance entre le poids du poisson et le rayon de l'otolithe peut être énoncée de la manière suivante :

$$(V.21) \quad W = k_j \mu S^v$$

où k_j est le paramètre d'échelle individuel de la trajectoire de croissance rayon d'otolithe-poids du poisson. Un graphique log-log poids du poisson-rayon d'otolithe pour les deux opérations de pesée combinées a révélé une tendance linéaire, indiquant à première vue un respect de l'hypothèse de départ.

Si k_j reste constant pour un poisson donné j , la corrélation entre les résidus individuels $\log(k_j(t_1))$ vs $\log(k_j(t_2))$ lors de la 1^{re} et de la 2^e pesées (t_1 et t_2) devrait être égale à l'unité. Un réexamen des valeurs présentées par Wilson & Larkin (1982) a cependant révélé un R^2 de seulement 0,32, indiquant un degré élevé de croisement entre les trajectoires de croissance. Cette expérience montre l'un des pièges d'une hypothèse de proportionnalité injustifiable dans l'analyse par rétrocalcul.

2.4. Méthodes proportionnelles : HTEP versus HTCP

Lorsque l'on considère les méthodes proportionnelles de rétrocalcul, on peut définir la proportionnalité essentiellement de deux façons : la taille de la PC d'un poisson peut être proportionnelle à la taille moyenne des PC pour n'importe quelle taille de poisson donnée, ou bien la taille de l'individu peut être proportionnelle à la taille moyenne pour n'importe quelle taille de PC donnée. Dans le premier cas, nous avons ce que Francis (1990) a appelé une hypothèse de taille de l'écaille proportionnelle (HTEP), alors que le second cas correspond à une hypothèse de taille du corps proportionnelle (HTCP). On remarquera ici que le mot « écaille » est assimilable à celui de « PC ». En reprenant la terminologie précédente (d'après Francis, 1990) pour la taille de la PC et la taille somatique, on peut exprimer les deux relations sous la forme $S = f(L)$, où la taille moyenne des PC est une fonction de la taille somatique observée, ou bien sous la forme $L = g(S)$, où la taille somatique moyenne est une fonction de la taille observée de la PC. Dans le cas linéaire cela s'exprime comme suit :

$$(V.22) \quad S = f(L) = a + bL$$

$$(V.23) \quad L = g(S) = c + dS$$

Dans le premier cas, nous utilisons la longueur de poisson observée pour estimer la taille moyenne de l'écaille pour toute taille de poisson donnée. Puisque la relation entre la taille moyenne des écailles et leur taille observée doit être constante sur toute la gamme de taille des individus, cette proportionnalité peut être globalement exprimée de la manière suivante :

$$(V.24) \quad f(L_1)/S_1 = f(L_2)/S_2 = \dots f(L_c)/S_c = \text{constante}$$

La constante entre la taille (moyenne) espérée des écailles et leur taille observée (mesurée) peut être, par exemple, de 0,9, ce qui veut dire que la taille moyenne des écailles représente 90 % de leur taille mesurée sur les individus, pour toute longueur donnée. En d'autres termes, la taille de l'écaille du poisson en question est environ 10 % plus grande que la moyenne pour toute longueur donnée. La FRC pour l'hypothèse de taille de l'écaille proportionnelle peut s'écrire sous la forme générale :

$$(V.25) \quad f(L_i) = (S_i / S_c) \cdot f(L_c)$$

Dans le cas linéaire habituel, cela devient :

$$(V.26) \quad a + bL_i = (S_i / S_c) \cdot (a + bL_c)$$

Avec des réarrangements mineurs, la FRC pour la HTEP (hypothèse avec taille de l'échelle proportionnelle) est alors :

$$(V.27) \quad \text{HTEP : } L_i = -(a/b) + (L_c + a/b) \cdot (S_i / S_c)$$

où a et b sont les coefficients (ordonnée à l'origine et pente) de la régression de S sur L (fig. V.A.4f).

Inversement, si on utilise une hypothèse de taille du corps proportionnelle (HTCP), cela implique que :

$$(V.28) \quad g(S_1) / L_1 = g(S_2) / L_2 = \dots g(S_c) / L_c = \text{constante}$$

Si dans ce cas la constante est de 1,01, cela implique que la longueur moyenne (taille du corps) est 1 % plus grande que la taille du corps observée, pour toute taille d'échelle. En d'autres termes, la taille du corps du poisson en question est environ 1 % inférieure à la moyenne, pour toute taille d'échelle donnée. La forme générale de la FRC correspondant à cette HTCP est alors :

$$(V.29) \quad L_i = [g(S_i) / g(S_c)] \cdot L_c$$

Ce qui donne dans le cas linéaire :

$$(V.30) \quad \text{HTCP : } L_i = [(c + dS_i) / (c + dS_c)] \cdot L_c$$

où c et d sont les coefficients (ordonnée à l'origine et pente) de la régression de L sur S (fig. V.A.4g).

La procédure de Fraser-Lee n'est pas fondée de manière exacte sur une HTEP ni une HTCP (Francis, 1990). Il lui manque une hypothèse sous-jacente, mathématiquement rigoureuse, telle que la HTEP ou la HTCP. On peut également se poser la question de savoir s'il est correct d'estimer une valeur de L moyenne pour une valeur de S donnée, ce qui est la pratique courante. Dans la procédure de Fraser-Lee, le paramètre c estimé (lorsqu'il est estimé par régression) sera toujours supérieur à $-(a/b)$ dans la HTEP (voir ci-dessus), et les longueurs rétrocalculées correspondantes seront par conséquent plus faibles en utilisant la HTEP. La procédure de Fraser-Lee semble donner des résultats similaires à la HTCP puisqu'ils sont basés sur la même régression (S sur L) (fig. V.A.4d,g).

Il y a débat sur le choix de la méthode de régression appropriée pour l'estimation des paramètres utilisés dans la FRC. Francis (1990) a vivement plaidé pour l'utilisation de la régression classique, étant donné la forme du modèle et les propriétés statistiques souhaitables pour ce problème d'inférence. Comme alternative, Ricker (1992) recommande l'usage de l'axe majeur réduit (GM) car il est difficile d'identifier quelles seraient la variable dépendante et la variable indépendante pour une régression ordinaire. La droite intermédiaire obtenue à partir de l'axe majeur réduit donnerait donc un meilleur ajustement aux données. La pente de la droite de régression GM (Ricker) est donnée par :

$$(V.31) \quad v = \frac{b}{r} = \sqrt{\frac{b}{d}}$$

où v = pente GM estimée, b = pente estimée par régression de Y sur X , r = coefficient de corrélation entre X et Y , et d = pente estimée par régression de X sur Y .

Cependant, le type de régression approprié devrait dépendre de l'hypothèse de proportionnalité choisie (voir ci-dessus), mais il n'existe malheureusement aucune règle stricte permettant de décider quelle est la bonne méthode de proportionnalité. Une comparaison des tailles rétrocalculées sous hypothèse HTEP ou HTCP permet d'apprécier l'imprécision inhérente à la procédure même de rétrocalcul. Une corrélation forte entre la taille de la PC et la taille somatique pour la population étudiée réduira la différence entre les résultats sous HTEP ou HTCP. Dans tous les cas de rétrocalcul, il est utile de comparer l'écart-type des tailles rétrocalculées aux âges avec les tailles observées à ces âges. Des écarts types exagérés des tailles rétrocalculées comparées aux tailles observées pourraient être le signe de problèmes dans la procédure de rétrocalcul.

2.5. Formules de rétrocalcul (FRC) non linéaires

Comme indiqué par la FRC générale mentionnée plus haut, on n'est pas obligé de se limiter à des relations linéaires pour la proportionnalité entre la taille de la PC et la taille somatique. Plusieurs relations non linéaires peuvent être utilisées et deux alternatives sont présentées ci-après :

$$(V.32) \quad \text{Alt. 1 :} \quad L = g(S) = \mu S^{\nu}$$

Dans ce cas, la taille du poisson est une fonction non linéaire (puissance) de la taille de la PC. Cette équation peut être ramenée à une forme linéaire en prenant le logarithme naturel de chacun des membres de l'égalité :

$$(V.33) \quad \log L = \log \mu + \nu \log S$$

On détermine ν par régression puis on applique la FRC :

$$(V.34) \quad \text{FRC :} \quad L_i = (S_i / S_c)^{\nu} \cdot L_c$$

Lorsque ν est déterminé à partir de la régression de L sur S , la FRC est cohérente avec une HTCP. Les droites de rétrocalcul sont linéaires et parallèles sur un graphique log-log (pente commune), et convergeront vers $L_i = 0$ et $S_i = 0$ sur le graphique des données brutes. Si $\nu = 1$, la FRC est égale à la FRC de Dahl-Lea.

Dans le second exemple de FRC non linéaire, la taille du poisson est exprimée comme fonction polynomiale de la taille de la PC :

$$(V.35) \quad \text{Alt. 2 :} \quad L = g(S) = c + dS + eS^2$$

La FRC correspondante peut être réécrite comme suit :

$$(V.36) \quad \text{FRC :} \quad L_i = L_c \cdot (c + dS_i + eS_i^2) / (c + dS_c + eS_c^2)$$

Lorsque c , d et e sont estimés par régression non linéaire de L sur S , la FRC est compatible avec une HTCP. Si $e = 0$, alors la FRC est identique à la HTCP linéaire usuelle. Tout comme dans le cas linéaire, une FRC peut être basée sur la HTEP, en supposant que la taille moyenne des écailles est une fonction polynomiale de la taille du poisson observée. Si l'on se rappelle les hypothèses sous-jacentes concernant la proportionnalité, une large gamme de FRC peut être obtenue sur la base de

principes mathématiques rigoureux. L'avantage est que les propriétés statistiques des paramètres estimés dans la FRC seront connues et que des mesures de la précision des tailles rétrocalculées pourront être obtenues.

2.6. Problèmes relatifs au rétrocalcul

La validité du rétrocalcul dépend en grande partie du respect des hypothèses évoquées précédemment. Pour autant, même si les rétrocalculs ont été effectués correctement, les résultats eux-mêmes doivent être interprétés avec prudence. À l'instar d'autres études écologiques, les inférences obtenues par rétrocalcul dépendent de la (partie de) population étudiée. Bien que des inférences précises puissent être faites concernant les trajectoires de croissance individuelles, le but est plus souvent d'estimer le modèle de croissance de la population dans son ensemble. Dans ce cas, des procédures d'échantillonnage adaptées sont essentielles afin de s'assurer que nous travaillons bien sur un sous-ensemble aléatoire, ou bien aléatoire stratifié, de la population. Si l'on tient compte du fait qu'il puisse y avoir une disparition sélective de membres de la population du fait de la mortalité naturelle ou de la pêche, les caractéristiques de la population, à quelque âge que ce soit, dépendront de l'âge des poissons utilisés pour évaluer ces caractéristiques (e.g. taille moyenne à 2 ans).

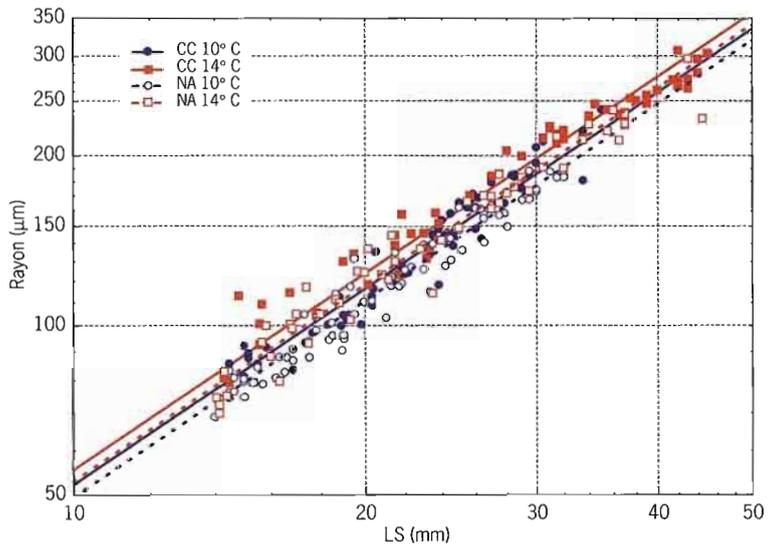
Il n'est pas rare d'observer que la taille moyenne d'un groupe d'âge donné obtenue par rétrocalcul est plus faible lorsqu'elle est calculée à partir de poissons âgés qu'à partir de poissons jeunes (Ricker, 1975). C'est ce que l'on appelle le « phénomène de Lee », qui pourrait être dû à une mortalité sélective, à un échantillonnage biaisé, à des problèmes de rétrocalcul ou à une combinaison de ces différentes causes.

L'un des aspects essentiels des méthodes de proportionnalité est l'hypothèse d'une proportionnalité constante chez un individu. Plusieurs auteurs ont remis en question cette hypothèse et sont parvenus à la conclusion que, pour un même individu, il existe une variabilité au cours du temps de la proportionnalité entre taille des PC et taille somatique (Zivkov, 1996). Des études expérimentales ont également montré que la croissance des PC peut être « découplée » de la croissance somatique à certaines périodes, alors même que la corrélation globale entre la taille de la PC et la taille somatique reste forte (Mosegaard *et al.*, 1988; Secor & Dean, 1989). Dans le cas des otolithes, il a été démontré que ces derniers continuent de croître même quand la croissance somatique a totalement cessé par manque de nourriture, voire en période de jeûne (Folkvord *et al.*, 2000). On peut imaginer que des individus, même légèrement privés de nourriture, ont moins de chances de survie en milieu sauvage, et que les problèmes de « découplage » ont bien moins de chances de se produire dans les conditions naturelles qu'en laboratoire car, seuls des poissons en bonne santé peuvent vivre assez longtemps dans leur milieu pour être un jour échantillonnés.

En outre, des variations saisonnières autour d'une relation allométrique globale entre la croissance somatique et celle des PC pourraient poser un problème ardu pour le rétrocalcul. Chez le brochet du Nord, on a mesuré des rapports de taux instantanés de croissance PC/corps, aussi bien pour les écailles que pour les *cleithra*, supérieurs à 1 au cours de la croissance estivale rapide et inférieurs à 1 lors de la croissance hivernale ralentie (Casselman, 1990).

La relation entre la taille du poisson et la taille de la PC dépend également des paramètres environnementaux (e.g. température ; Mosegaard *et al.*, 1988), et ceci augmente l'incertitude sur les résultats de rétrocalculs. Un effet de la température sur la relation entre la taille du poisson et la taille des PC peut engendrer un biais dans les tailles rétrocalculées si une relation commune est utilisée. Or, nombreux sont les exemples où l'on a démontré que la taille relative des otolithes dépendait de la température (fig. V.A.5). Dans de tels cas, les tailles de poissons rétrocalculées reflèteront dans une certaine mesure l'historique de la température ambiante, en plus de celle de la croissance elle-même. Le problème résultant de ce type d'effet de la température peut être moindre si les individus de la population concernée ont grandi dans des conditions de température similaires.

Figure V.A.5
Relations allométriques stock-dépendantes et température-dépendantes entre la longueur du poisson et le rayon de l'otolithe (*lapillus*) pour des juvéniles de morue (*Gadus morhua*). Les alevins de morue des côtes de Norvège (CC) et ceux du nord-est de l'Arctique (NA) ont été élevés à des températures constantes (Otterlei *et al.*, soumis).



3. Recommandations

L'analyse de la croissance peut parfois apparaître comme un problème assez simple, mais le choix du traitement approprié des données n'est pas toujours évident (Ricker, 1975 ; Kaufmann, 1981 ; Francis, 1995a). Nous proposons ci-après une série de recommandations applicables aux études de croissance impliquant l'utilisation des pièces calcifiées.

La structure des données relatives aux largeurs des marques de croissance des PC devrait être analysée au moyen de techniques statistiques multivariées (Chambers & Miller, 1995 ; Ralston & Howard, 1995 ; Jones, 2000). Les ANOVA avec mesures répétées et les MANOVA (ANOVA multivariées) peuvent prendre en compte les inévitables autocorrélations. Toutefois, on préfère généralement une MANOVA qui impose des hypothèses moins rigoureuses concernant la structure sous-jacente des données (Chambers & Miller, 1995). Les corrélations sérielles entre largeurs des accroissements peuvent également être traitées grâce aux méthodes de séries temporelles (e.g. ARIMA ; Ralston & Howard, 1995). L'utilisation de techniques univariées sans prendre en compte la dépendance des données entraîne un nombre de degrés de liberté exagéré dans les tests statistiques, menant à une précision artificiellement élevée et, par conséquent, une probabilité plus forte d'erreurs de type I.

Une attention particulière devrait être apportée aux algorithmes de classement combinant plusieurs lectures indépendantes à partir d'un même otolithe. Le problème se pose en particulier avec les données issues des microstructures, pour lesquelles on compte et mesure de nombreuses marques de croissance. Dans de nombreux exemples, cela implique de combiner des lectures avec des nombres de marques variables et ceci nécessite par conséquent soit une partition, soit un regroupement de ces données pour pouvoir considérer un schéma de croissance commun (Methot, 1981). Dans les cas où les secteurs lus sont de tailles différentes, l'utilisation de largeurs d'accroissements relatives (par rapport au rayon total, par exemple) peut fournir la base requise pour estimer un modèle commun de croissance des otolithes. D'un point de vue statistique, des lectures uniques d'otolithes individuels donneraient une structure d'erreur relativement simple et adaptée à l'analyse. Les techniques faisant largement appel à l'informatique peuvent offrir des voies alternatives lorsque les hypothèses sous-jacentes des méthodes statistiques traditionnelles ne peuvent être satisfaites. La méthode du « bootstrap » peut fournir des intervalles de confiance pour les accroissements et les tailles d'anneaux (e.g. Anderson, 1995).

Une bonne stratégie d'échantillonnage est également fondamentale. Si l'on envisage d'effectuer des comparaisons valides entre des sous-populations, ou des comparaisons temporelles pour de mêmes populations, il faut définir et décrire clairement les unités de population étudiées. Des schémas de croissance différents obtenus à partir de deux échantillons collectés à des endroits ou des périodes différents peuvent être dus soit à des différences entre sous-populations, soit à des différences au sein d'une même sous-population (causées par la mortalité sélective ou par la sélectivité des engins de pêche).

Pour le rétrocalcul de tailles des poissons, aucune procédure ne peut être considérée comme meilleure que les autres dans l'absolu, si bien que l'on ne peut en recommander aucune en particulier. Cependant, l'utilisateur doit être conscient des limites et hypothèses de base

propres à chaque procédure de rétrocalcul, et devra par conséquent vérifier et comparer soigneusement la cohérence entre les tailles rétrocalculées et les tailles observées à différents âges. Francis (1990) recommande d'essayer plusieurs procédures de rétrocalcul sur chaque jeu de données, conseil pertinent à plus d'un titre. Tout d'abord, cela offre la possibilité de déterminer quel modèle correspond le mieux aux données étudiées. En second lieu, les différences entre tailles rétrocalculées au moyen des diverses méthodes donneront une indication de la part de variabilité associée au seul choix de la procédure.

Une autre manière d'exploiter les données longitudinales issues des PC consiste à utiliser directement les mesures d'accroissement prises sur les PC plutôt que de les « traduire » en tailles de poisson (Anderson, 1995 ; Hare & Cowen, 1995). Dans la mesure où il existe une forte corrélation entre la taille du poisson et celle des PC, les données sur les accroissements pourront être utilisées comme indices de la taille du poisson. Ces données restent également utilisables pour l'étude de la mortalité liée à la taille (voir chap. V.B).

B. Applications écologiques

H. Mosegaard, A. Folkvord, P.J. Wright

1. Études du recrutement

Le développement des techniques d'estimation de l'âge à l'échelle annuelle permit à Hjort (1914) d'avancer son hypothèse pionnière sur les fluctuations des classes d'âge annuelles dans les stocks de poissons. La distribution de ces classes d'âge chez *Clupea harengus* révéla que l'une d'entre elles, la classe 1904, fut très précocement nettement plus abondante et resta la classe d'âge dominante pendant presque deux décennies. Les raisons sous-jacentes de cette abondance n'étaient pas très claires, bien que l'importance de cette classe fût mise en évidence très tôt. La découverte des marques de croissance journalières par Pannella (1971) a ouvert de nouvelles possibilités d'études de la dynamique de la croissance et de la survie pendant la première année de vie des poissons. Elle a ainsi permis aux chercheurs de répondre à une question fondamentale en recherche halieutique : pourquoi existe-t-il des variations dans la survie des individus avant le recrutement ?

1.1. Information sur la mortalité sélective

L'une des applications les plus puissantes de l'utilisation des données individuelles structurées en âge acquises à partir des pièces calcifiées (par exemple, et surtout, à partir des otolithes) est la combinaison d'études de la croissance et d'études de la mortalité en fonction de la taille. Dans un otolithe, les largeurs des accroissements formés à un âge donné (mais également la taille d'un otolithe à un âge donné) restent inchangées lorsque le poisson continue de grandir. Si la signification temporelle de ces accroissements a été établie par ailleurs (voir chap. IV), les comparaisons des largeurs des accroissements à des âges donnés pourront potentiellement révéler n'importe quel changement survenu dans le patron de la taille des accroissements (ou dans la distribution en taille des otolithes) entre les différents poissons de la population échantillonnée.

Alors que de nombreuses études se sont focalisées sur la croissance et les taux de survie, peu d'entre elles ont essayé de tester des hypothèses spécifiques. Anderson (1988) a fourni un cadre général pour étudier l'importance du succès de la prise alimentaire et de la prédation sur la mortalité : hypothèse de la mortalité en fonction de la croissance. Trois mécanismes, mutuellement non exclusifs, ont été proposés comme fondements de cette hypothèse :

1) Le mécanisme « mieux vaut être plus grand » : si la mortalité diminue quand la taille augmente, alors, à un âge donné, la probabilité de mortalité sera plus faible pour les plus grands individus que pour les individus plus petits du même âge (Leggett & Deblois, 1994);

2) Le mécanisme du « taux de croissance » : si la probabilité de mortalité dépend de la taille, alors les taux de croissance les plus élevés minimiseront le temps pendant lequel les individus subissent de forts taux de mortalité et, ainsi, les larves à croissance plus rapide auront une plus faible probabilité de mortalité que celles à croissance plus lente (Ware, 1975 ; Shepherd & Cushing, 1980) ;

3) Le mécanisme de la « durée du stade de vie » : si les taux de mortalité sont indépendants de la taille et du taux de croissance pour un stade de vie donné, un faible pourcentage de changement dans le taux de croissance instantané peut avoir des conséquences considérables sur le nombre de survivants atteignant un stade de développement donné, si ce stade est sujet à un plus faible taux de mortalité. Ainsi, les individus qui se développent plus rapidement et qui effectuent des transitions à des âges plus précoces auront une plus faible probabilité de mortalité que les individus qui font ces transitions à des âges plus tardifs (Chambers & Leggett, 1987 ; Houde, 1987).

Il est évident que les mécanismes 1) et 2) se recoupent largement car une taille plus grande à un âge donné est directement liée à un taux de croissance globalement plus élevé. Le mécanisme 3) est aussi potentiellement lié aux deux premiers car, au niveau individuel, la vitesse de développement est corrélée au taux de croissance ainsi qu'à la taille. Si ces mécanismes sont définis les uns par rapport aux autres, ils peuvent avoir une définition distincte selon l'existence d'une mortalité sélective totale ou partielle.

Une approche consisterait à montrer l'effet partiel de l'un des mécanismes sur la survie lorsque les autres sont soit laissés constants, soit expliqués individuellement. La vérification du mécanisme « mieux vaut être plus grand » nécessiterait la comparaison d'individus ayant un taux de croissance équivalent ainsi qu'un même rapport taille/âge au stade de transition. Cela n'est évidemment pas possible avec le mécanisme du « taux de croissance » car la croissance entraîne un changement de taille : à ce niveau, la validité du mécanisme demanderait une démonstration indirecte à travers une meilleure survie, au cours de la croissance, d'individus initialement plus petits par rapport aux individus initialement plus grands, jusqu'à ce qu'une certaine taille soit atteinte.

Jusqu'à maintenant, seule l'étude de Hare & Cowen (1997) a tenté de tester les trois hypothèses. Dans le but de tester celle de la mortalité dépendante de la taille (i.e. mieux vaut être plus grand), ces auteurs ont évalué si la distribution des rayons de l'otolithe pour un accroissement donné, comme mesure de la taille, changeait avec l'augmentation de l'âge. Une augmentation, avec l'âge, de la proportion d'individus avec des grands rayons a été considérée comme une démonstration d'une sélection taille-dépendante positive. Ces auteurs, ainsi que d'autres (e.g. Hovenkamp, 1992), ont testé l'hypothèse d'une mortalité dépendante de la croissance en regardant si la distribution de la croissance des otolithes entre des marques données, comme mesure de la croissance, augmentait avec l'âge. Une augmentation avec l'âge de la distance entre des marques données a été interprétée comme résultant d'une sélection

croissance-dépendante positive. Cependant, des corrélations élevées entre la taille de l'otolithe et le taux de croissance de l'otolithe empêchent de résoudre la question des effets partiels des mécanismes « mieux vaut être plus grand » et « taux de croissance ». Des comparaisons similaires ont été faites en mesurant les largeurs de micro-accroissements journaliers individuels plutôt que celles correspondant au cumul de plusieurs micro-accroissements (Gallego *et al.*, 1999), même si une telle approche est sujette à des limites d'ordre technique pour identifier et mesurer avec exactitude ces marques quotidiennes.

La présence dans les otolithes de marques pouvant être associées avec l'éclosion et la métamorphose larvaire (chap. II.A.2) permet de réaliser des comparaisons sur la durée des différents stades. Cependant, tester une sélection sur la base de la durée d'un stade de vie donné est difficile à partir d'échantillons provenant du milieu naturel car il est normalement impossible d'effectuer un échantillonnage représentatif de la population avant la sélection, pour évaluer la taille et l'âge à un stade de transition et pour les comparer avec un échantillon représentatif de poissons ayant survécu à cette transition. Un moyen pour résoudre ce problème consiste à comparer les distributions en taille et en âge au stade de transition de poissons élevés expérimentalement avec celles de poissons survivants issus du milieu naturel (Hare & Cowen, 1997). Cela suppose cependant qu'il n'existe pas de sélection ni de différence dans le trait de vie étudié pour le groupe de poissons d'élevage.

La proportion de poissons possédant des micro-accroissements de largeur relativement petite à un âge donné peut décroître avec le temps, indiquant ainsi un effet de mortalité dépendante de la taille (i.e. une perte plus importante d'individus relativement petits au sein d'une cohorte). Dans l'exemple montré sur la figure V.B.1, la mortalité des individus les plus petits (et ayant une croissance plus faible) intervient entre les 20^e et 40^e jours. Après le 40^e jour, aucun des individus présentant les plus petites largeurs de microstructures au 10^e jour n'est encore présent dans la population. La chronologie de cette mortalité dépendante de la taille serait difficile, voire impossible à détecter sans avoir recours à l'analyse des patrons de croissance enregistrés sur les PC. Un exemple est donné à partir d'une étude conduite dans un mésocosme sur des larves de hareng pour lesquelles les conditions trophiques initiales étaient défavorables (mésocosme A, fig. V.B.2). Les derniers survivants sont devenus plus grands en moyenne que la population initiale à un stade relativement précoce et ce résultat suggère que les fortes mortalités observées au départ dans le mésocosme étaient en fait dépendantes de la taille. De la même façon, la proportion de poissons dans la population ayant des otolithes à croissance relativement lente diminue au cours du temps, indiquant ainsi l'existence d'une mortalité dépendante de la croissance. L'interprétation de tels résultats dépend d'échantillonnages répétés de la même population à différents intervalles de temps, et la puissance des analyses repose sur le phénomène d'accrétion continu des PC permettant l'obtention de données sur l'histoire de la croissance entre les échantillonnages.

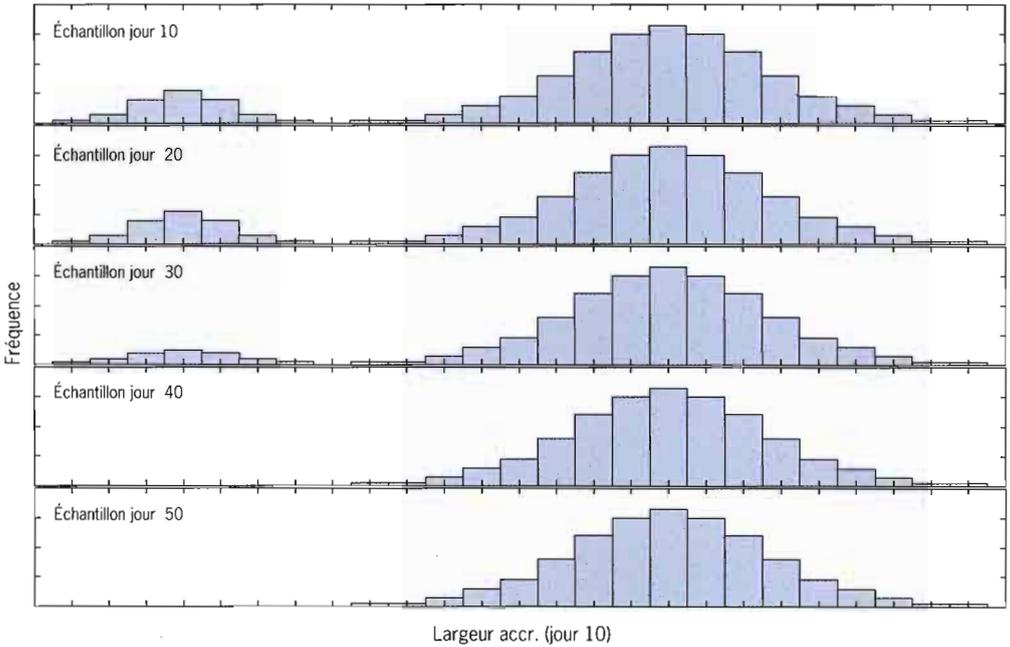


Figure V.B.1 - Graphiques théoriques de la distribution des largeurs des microstructures d'une cohorte de larves de poissons (nés le même jour) échantillonnée juste avant minuit à différents jours. Le graphique supérieur représente la distribution de la largeur de la dernière microstructure le jour de l'échantillonnage, alors que les autres graphiques présentent, respectivement, les largeurs de la 10^e, 20^e, 30^e et 40^e microstructure à partir du bord correspondant ainsi aux microstructures formées le 10^e jour (en prenant pour hypothèse une formation quotidienne des microstructures).

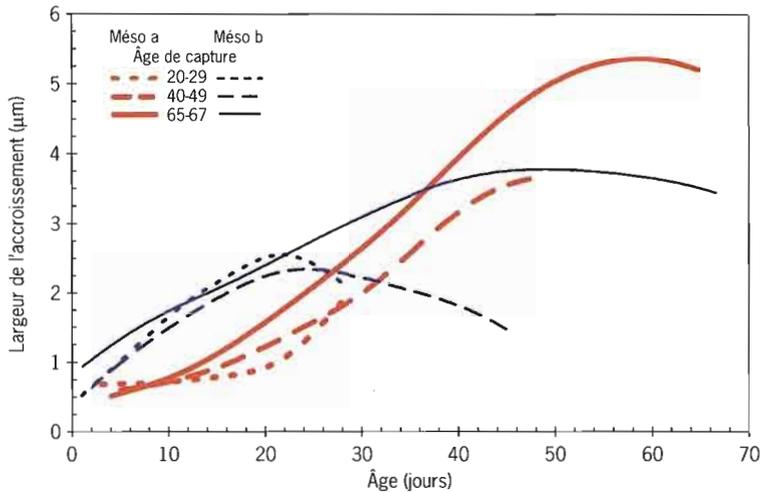


Figure V.B.2 - Patron de largeur des accroissements (ajustement par les moindres carrés) chez des larves de hareng (*Clupea harengus*) élevées dans deux mésocosmes (les lignes épaisses correspondent au mésocosme a et les lignes fines correspondent au mésocosme b; modifié d'après Folkvord, 1997). Les larves ont été échantillonnées avec des filets à deux poches pendant l'expérience (lignes en pointillés, jours 20-29, lignes en tiretés, jours 40-49), et les survivants (ligne pleine, jours 65-67) ont été récupérés à la fin de l'expérience par vidange du mésocosme.

Cependant, si des phénomènes de migrations ont lieu vers ou depuis la population étudiée entre les échantillonnages, ils ne peuvent être différenciés de la mortalité apparente dépendante de la taille pendant la même période.

1.2. Mieux vaut être plus grand

Un exemple d'analyse ayant utilisé la méthode décrite précédemment est donné par Meekan & Fortier (1996). Des larves, des stades pélagiques et des juvéniles établis de morue ont été échantillonnés de façon répétée sur une grille couvrant une partie du plateau continental écossais dans l'Atlantique Nord-Est. Sur la base d'une forte corrélation linéaire, ne montrant pas de variation annuelle, entre le rayon du *lapillus* et la longueur standard de la morue ($R^2 = 0,97$), les auteurs ont utilisé la méthode du point d'intersection biologique (Campana & Jones, 1992) pour rétrocalculer la longueur standard à un âge donné. En utilisant des intervalles successifs de dix jours pour rétrocalculer les croissances individuelles à partir des otolithes et une approche statistique avec des mesures répétées, ils ont été capables de démontrer l'existence de différents modes de survie des juvéniles de morue pendant deux années consécutives. Pour l'une des années, la proportion de juvéniles avec une faible croissance a décru pendant l'hiver et les juvéniles qui se sont établis et qui ont finalement été recrutés dans le stock, étaient des poissons relativement grands pendant le stade juvénile pélagique. Dans une étude similaire, Campana (1996) a présenté une corrélation entre le recrutement final et la croissance des juvéniles de morue pendant le stade juvénile pélagique. Ces études fournissent une preuve que les survivants n'étaient pas issus d'un sous-échantillon aléatoire de la population initiale de larves de morue et que, dans les deux cas, il existait un avantage pour la survie associé à une croissance relativement rapide.

1.2.1. Corrélations entre les tailles à différents âges et hiérarchies

La maximalisation de la survie jusqu'au recrutement a conduit au développement de différentes stratégies au cours des premiers stades de l'histoire de vie dans les différents groupes phylogéniques et écologiques. On pense que l'investissement parental dans la survie des œufs et des embryons a engendré des tendances évolutives qui optimisent la taille individuelle de la descendance. Le patron d'accroissement primaire enregistré dans la PC permet d'analyser plus en détail l'aptitude à franchir les étapes de transition pendant les phases de croissance successives de la vie.

Dans une étude sur le saumon sockeye de la rivière Frazer, West & Larkin (1987) ont utilisé la formation d'une discontinuité dans l'otolithe pour rétrocalculer la distribution des tailles individuelles à l'éclosion : cette étude visait à comprendre l'effet de la sélection par la taille sur la survie à des stades juvéniles ultérieurs. Ils ont pu montrer que les individus ayant des grands otolithes à l'éclosion avaient une plus grande probabilité de survie. Une nouvelle analyse de ce même matériel par

Mosegaard (1990) a montré que, à cause d'une faible corrélation entre la taille du poisson et la taille de l'otolithe à la fin du stade vitellin, la sélection d'alevins de grande taille ne pouvait expliquer le changement des distributions observées de la taille des otolithes. Avec une faible corrélation, une mortalité sélectionnant les tailles doit entraîner un très important glissement dans la distribution des tailles des alevins pour générer un faible glissement dans la distribution des tailles des otolithes, comme le montre la figure V.B.3.

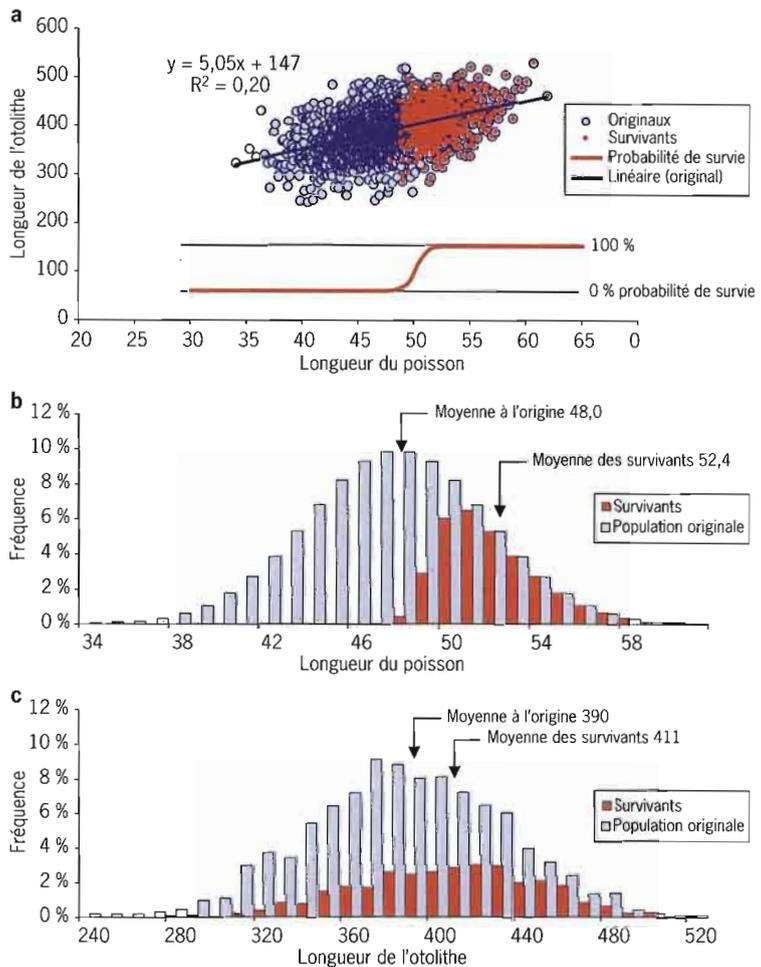


Figure V.B.3 - Données simulées démontrant le glissement dans la distribution de la taille des otolithes par sélection à la première prise de nourriture des saumons de grande taille (l'échelle de tailles est arbitraire).

a) Longueur de l'otolithe versus longueur du poisson. Une fonction logistique de survie aléatoire basée sur la longueur des poissons a été employée dans la simulation (courbe rouge tracée séparément dans le graphique); la survie est égale à $1 / (1 + \text{EXP}(100 - 2 \cdot L_{\text{alevin}}))$ > nombre aléatoire [0;1], où L_{alevin} indique des tailles d'alevins suivant une distribution normale; la taille de l'otolithe est une fonction linéaire de la taille du poisson avec une erreur aléatoire normale.

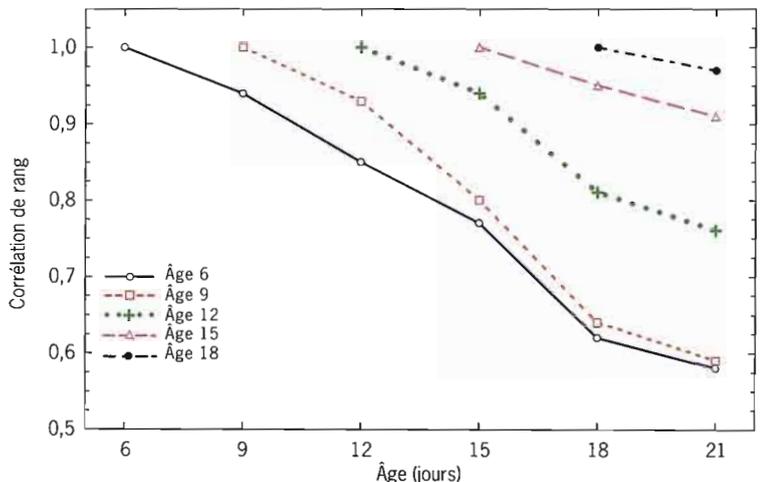
b) Distribution des fréquences de tailles des poissons avant (bleu) et après (rouge) sélection.

c) Distribution des fréquences des tailles des otolithes avant (bleu) et après (rouge) sélection. Avec une faible corrélation entre la longueur du poisson et la taille de l'otolithe ($R^2 < 0,25$) à la première prise de nourriture, une forte sélection pour la taille du poisson entraînera seulement une dérive mineure dans la distribution de la taille des otolithes.

Une survie sélective entraînant un fort glissement dans la distribution des tailles des otolithes peut être expliquée par l'association d'une grande taille d'otolithe à l'éclosion avec la performance individuelle pour la compétition lors de l'établissement de hiérarchies de dominance quand les larves commencent à se nourrir, comme cela a pu être démontré expérimentalement chez la truite, *Salmo trutta* (Titus & Mosegaard, 1991), et le saumon atlantique, *Salmo salar* (Metcalfé *et al.*, 1992). Une explication physiologique de la faible relation entre la taille de l'otolithe et la taille du poisson après la résorption du sac vitellin repose sur le contrôle métabolique du taux d'accroissement de l'otolithe (Mosegaard *et al.*, 1988 ; Wright, 1991a) et l'augmentation du coût énergétique réduisant la croissance somatique chez les embryons à fort taux de renouvellement ainsi que sur une augmentation du potentiel de croissance après l'émergence (Titus & Mosegaard, 1991). L'association d'un statut de dominance et d'un taux particulier d'accroissement de l'otolithe avec le métabolisme au repos a également été mise en évidence dans un travail sur le saumon masu, *Oncorhynchus masu* (Yamamoto *et al.*, 1998). Les implications des caractères individuels au moment des stades de transition du cycle de vie sur la survie ultérieure ont aussi été étudiées grâce à l'analyse des microstructures des otolithes dans d'autres groupes systématiques. Des marques à l'éclosion de grande taille ont pu être corrélées avec une augmentation de la survie chez les larves de morue (*Gadus morhua*) de la mer Baltique (Gronkjaer & Schytte, 1999).

Les données individuelles des tailles aux âges issues de l'analyse des PC peuvent être utilisées pour étudier les corrélations de rang sur les tailles à l'intérieur d'une même cohorte. Dans un exemple pris chez des larves d'aloise-tyran (*Brevoortia tyrannus*) capturées dans le milieu naturel, la corrélation de rang de la taille des otolithes a diminué de 100 % jusqu'à presque 80 % après 6 jours, et jusqu'à environ 60 % après 12 jours supplémentaires de croissance (fig. V.B.4). Ceci démontre qu'il existe un important chevauchement dans le rang de la taille durant une très courte

Figure V.B.4
Corrélations de rang basées sur la taille des rayons des otolithes de larves d'aloise-tyran (*Brevoortia tyrannus*) de l'Atlantique. Les corrélations sont calculées pour des otolithes âgés de 6 à 18 jours et pour les âges ultérieurs de 6 à 21 jours avec des intervalles de trois jours (données de Chambers & Miller, 1995).



période de temps. Cela peut refléter des variations à moyenne échelle dans les conditions environnementales et la disponibilité alimentaire rencontrées par les individus d'une cohorte, ou cela peut être dû à des différences génétiques du potentiel de croissance ou à des interactions sociales liées à des hiérarchies dépendantes de la taille entre les individus de la population (Imsland *et al.*, 1998).

2. Chronologie de l'histoire de la vie

Les séquences de croissance liées à l'âge sur les pièces calcifiées des poissons permettent de dater l'apparition d'événements importants au cours de l'histoire de vie individuelle, lorsque le poisson subit des changements soudains de son environnement et/ou lorsqu'il subit des événements ontogéniques majeurs.

2.1. Distribution des dates de naissance

Un argument majeur proposé pour expliquer la variabilité des taux de survie précoce concerne le synchronisme entre les dates de ponte et d'éclosion et l'existence de conditions environnementales favorables. Un asynchronisme entre le moment d'arrivée des larves et des conditions favorables provoquerait une absence de correspondance entre la composition des dates de naissance des recrues ayant survécu et le moment réel de la ponte. Une telle comparaison de la composition des dates d'éclosion est possible à travers l'analyse des microstructures quotidiennes déposées dans les otolithes (Campana & Jones, 1992). La date de naissance peut être extrapolée en soustrayant la durée estimée du développement embryonnaire de la date d'éclosion. Cela nécessite des mesures de la température sur le terrain et l'étude expérimentale de la relation entre le développement embryonnaire et la température. Campana & Jones (1992) ont donné une synthèse détaillée sur l'analyse des dates d'éclosion. Pour résumer, la méthode compare les distributions de fréquence des dates d'éclosion entre deux échantillons successifs de poissons au minimum, capturés au hasard dans une population. La chronologie de l'apparition des larves doit être normalement déterminée grâce à de fréquents échantillonnages pendant la durée de la période d'éclosion. La distribution de fréquence des véritables dates d'éclosion est alors comparée avec les dates d'éclosion rétrocalculées à partir des survivants à un âge donné, estimées à partir d'échantillonnages ultérieurs de la population. Les comparaisons statistiques des distributions des dates d'éclosion impliquent une approche similaire à celle employée pour l'analyse de la mortalité dépendante de la croissance. Le principal problème rencontré avec l'analyse des dates d'éclosion réside dans le fait que les larves arrivées précocement dans la saison sont soumises à une mortalité cumulée plus grande que celles nées plus tard dans la saison : les premières seront donc sous-représentées dans les distributions de dates de naissance rétrocalculées. Aussi, dans le but de calculer la distribution réelle des dates d'éclosion des survivants, ces

derniers doivent être collectés dans l'absolu sur une période égale à la durée de la période d'éclosion. Dans la pratique, la plupart des études ont essayé de contourner le problème d'une mortalité différentielle cumulée en multipliant les nombres d'individus à un âge donné par l'inverse du taux de survie entre l'âge à la capture et l'âge du plus jeune individu dans l'échantillon. Ce taux de survie devrait se baser sur un estimateur indépendant pris sur le terrain. Comme la mortalité a tendance à diminuer en fonction de l'âge, la nécessité de différencier des mortalités cumulées diminue avec l'âge. Pour cette raison, l'analyse des dates d'éclosion convient mieux lorsqu'elle est appliquée sur des stades ultérieurs de la vie, comme le stade juvénile, qui ont tendance à présenter des taux de mortalité plus faibles que ceux des stades larvaires. En utilisant l'analyse des dates de naissance, il est possible d'évaluer les conséquences de l'adaptation de la chronologie de la reproduction. La plupart des études sur les espèces tempérées ont montré qu'une sélection s'exerce, entre l'éclosion et la métamorphose, en faveur des individus nés tardivement (Crecco & Savoy, 1987 ; Rice *et al.*, 1987 ; Moksness & Fossum, 1991 ; Wright & Bailey, 1996). Cependant, cette forme de sélection peut refléter le stade de développement étudié plutôt qu'une adaptation au cours de la vie car, chez la plupart des espèces tempérées, les facteurs favorisant une production tardive de descendants agissent plus tôt dans le cycle de vie, alors que ceux qui influencent une production précoce agissent plus tard dans ce cycle (Schultz, 1993 ; Anderson, 1995 ; Miller, 1997). Par exemple, les conditions pour une croissance précoce ont tendance à être meilleures pour les poissons nés au printemps, favorisant ainsi la sélection pour une éclosion tardive. Cependant, comme une éclosion précoce maximise la durée de la croissance, ce dernier trait peut s'avérer important lorsqu'il y a un avantage sélectif pour une date plus précoce des événements ontogéniques comme une métamorphose (Sinclair & Tremblay, 1984) ou l'âge d'acquisition de la première maturité (Schultz, 1993). Étant donné l'importance du stade de développement pour interpréter les effets de la date d'éclosion sur l'adaptation, les études sur les dates de naissance devraient théoriquement inclure des échantillonnages répétés d'une même classe d'âge tout au long de son développement, comme cela a été le cas dans l'étude de Schultz (1993).

2.1.1. Différentes approches pour tester l'hypothèse d'une mortalité dépendante de la taille et pour l'étude des dates d'éclosion

Les différences entre les dates d'éclosion réelles et rétrocalculées et les distributions de tailles ont généralement été testées statistiquement au moyen d'un test de Kolmogorov-Smirnov, qui compare les distributions de fréquence cumulée. Plusieurs approches ont cependant été développées pour caractériser les différences entre les échantillons avant et après sélection. Deux exemples sont décrits ci-après.

La méthode non paramétrique de Schluter (1988), modifiée par Anderson (1995) pour les données représentatives de l'ensemble des

individus, a été utilisée pour déterminer des fonctions de survie relative. Cette méthode utilise des splines cubiques pour estimer la forme d'une sélection agissant sur des traits quantitatifs. Cette méthode basée sur des splines ne fait aucune hypothèse sur une fonction de « fitness » sous-jacente, suppose que la fonction change graduellement et permet le calcul d'intervalles de confiance. La forme non linéaire de la sélection est calculée en utilisant un groupe de mesures de tailles d'otolithes « avant sélection » et un groupe « après sélection ». Une régression non paramétrique basée sur des splines est ajustée sur les données avant et après sélection, en utilisant un maximum de vraisemblance en log et des limites de confiance calculées par « bootstrap », permettant ainsi une interpolation entre les points non échantillonnés. Cette approche permet d'estimer une « fitness » relative, alors que la fonction de « fitness » absolue peut être trouvée seulement si les tailles des populations ou l'efficacité relative de l'échantillonnage sont connues (Anderson, 1995). Il faut noter également que la taille de l'otolithe n'est habituellement pas le premier trait soumis à sélection mais qu'elle est seulement corrélée à d'autres traits, comme la taille corporelle, l'intensité de la croissance ou l'activité métabolique (West & Larkin, 1987 ; Titus & Mosegaard, 1991 ; Wright, 1991a).

Miller (1997) a proposé une approche basée sur l'analyse des résidus de patrons de croissance dans des échantillons pré-sélectionnés. Dans cette approche, une relation rayon d'otolithe-âge est utilisée, à partir d'échantillons issus du milieu naturel, pour produire l'échantillon « avant sélection » en utilisant une fonction de meilleur ajustement. Cette fonction est ensuite ajustée aux données rayon d'otolithe-âge issues du groupe « après sélection » et les résidus sont tracés. Une déviation systématique représente une sélection phénotypique directionnelle tandis qu'une sélection phénotypique stabilisante et perturbée conduit à une tendance croissante ou décroissante dans les résidus. Toutes ces méthodes sont basées sur une approche représentative de la population sur un seul trait. Cependant, toute évaluation d'un processus de sélection requiert la capacité à caractériser les traits d'histoire de vie précoces chez les individus qui sont sélectionnés. Cette tâche est relativement simple pour des traits tels que la date d'éclosion, car des changements entre des séries chronologiques ne peuvent refléter qu'une sélection. Mais, les traits comme la taille individuelle, qui changent indépendamment du processus de sélection, sont beaucoup moins facilement quantifiables, car la taille et le taux de croissance peuvent covarier. Bien que la taille corporelle puisse être rétrocalculée à partir de la taille de l'otolithe, aucun processus d'analyse n'est encore connu pour tenir compte des effets combinés des changements de croissance et de taille, même si des approches par suivis de cohortes basées sur la reconstruction de phénotypes ont été suggérées (voir Miller, 1997).

2.2. Transitions ontogéniques

Les discontinuités dues à l'éclosion et à la première prise de nourriture sont souvent utilisées, sans faire de distinction, pour les analyses des distributions de dates de naissance chez les espèces ayant de petits embryons et une courte période vitelline. Cependant, chez les espèces ayant un stade vitellin prolongé, comme les Salmonidae, la formation des micro-accroissements primaires pendant cette phase de développement permet l'estimation de chacune des dates d'éclosion et de première prise de nourriture.

La métamorphose conduisant du stade larvaire au stade juvénile implique généralement une transition morphologique et ontogénétique marquée. La plupart des *sagittae* et des *lapilli* des larves grandissent graduellement à partir d'une forme plus ou moins sphérique pendant le stade vitellin jusqu'à une forme discoïdale et légèrement asymétrique pour les stades larvaires avancés. La transition vers le stade juvénile est, pour certains taxa, accompagnée par l'apparition de centres de croissance accessoires sur les *sagittae* : par exemple, chez les lançons (Wright, 1993) et la plie (Modin *et al.*, 1996). Les taux d'accrétion de ces centres accessoires sont plus élevés que ceux de la croissance concentrique initiale et influencent donc nettement la forme des otolithes (chap. II.A ; fig. III.B). Le décompte des microstructures journalières à partir du centre de l'otolithe jusqu'au premier centre de croissance accessoire, ou à partir du bord de l'otolithe vers le premier centre de croissance accessoire, permet d'estimer, respectivement, l'âge ou la date de cet événement particulier du cycle de vie. Chez un certain nombre d'espèces démersales, la métamorphose coïncide aussi avec la transition d'un habitat pélagique vers un habitat démersal. Lorsque les habitats pélagique et benthique diffèrent de façon importante, les transitions dans la croissance de l'otolithe induites par l'ontogenèse peuvent être accompagnées par des changements du patron de croissance provoqués par l'environnement.

2.3. Changement d'environnement

De nombreuses espèces de poissons subissent des changements profonds de leur environnement pendant leur cycle de vie. Plusieurs exemples sont trouvés chez les Salmonidae dont de nombreuses espèces migrent d'un milieu dulçaquicole où elles sont nées vers un environnement marin où elles se nourrissent jusqu'à finalement retourner vers leurs rivières d'origine pour se reproduire. La durée de la dévalaison peut être suivie sur l'otolithe, à partir des marques de changement retrouvées dans le patron de croissance ou à partir de la composition chimique après que les smolts soient passés en mer. Chez le saumon chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), les juvéniles présentent plusieurs stratégies migratoires, et les microstructures spécifiques des otolithes, caractéristiques des habitats océanique et dulçaquicole, permettent de distinguer les différents traits de vie des juvéniles et d'estimer la durée

de leur migration vers l'océan (Zhang & Beamish, 2000). Chez les juvéniles de truite de la Baltique (*Salmo trutta* L.), une migration depuis les petits torrents d'eau douce vers les environnements estuariens saumâtres a été mise en évidence pour quelques individus par des rapports Sr/Ca élevés accumulés tôt dans les otolithes (Elfman *et al.*, 1999) : ceci a confirmé des observations directes faites antérieurement sur un groupe 0+ effectuant des migrations vers la mer dans cette région (Titus & Mosegaard, 1991).

L'un des premiers exemples de la datation des migrations a été fourni à partir des otolithes de l'anguille américaine, sur lesquels la chronologie de la migration depuis la mer vers l'amont a pu être suivie par une augmentation de la concentration en Ca et une diminution de la concentration en Sr en utilisant une sonde WDA (Casselman, 1982).

Les différences saisonnières de nourriture et de température peuvent être également reflétées dans l'enregistrement temporel des micro-accroissements primaires des otolithes.

2.4. Reproduction

Les poissons immatures allouent leur excédent d'énergie à la croissance somatique tandis que, lorsqu'ils atteignent la maturité, ils ont besoin de dépenser une proportion grandissante de leur surplus énergétique net au développement des gonades. Le moment de la première maturité est souvent enregistré dans la PC comme un changement dans le patron de croissance. Des exemples de changement dans le patron de la croissance des otolithes sont trouvés chez des poissons appartenant à des régions climatiques très variées : la morue norvégienne de l'Arctique, *Gadus morhua* (Rollefsen, 1933), le capelan, *Mallotus villosus* (Hopkins *et al.*, 1986), la plie, *Pleuronectes platessa* L. (Rijnsdorp & Storbeck, 1991), l'empereur, *Hoplostethus atlanticus* (Francis & Horn, 1997). Une autre caractéristique des PC, associée au frai, est la zone de résorption sur les écailles, souvent observée chez les Salmonidae, qui est provoquée par des changements du métabolisme du calcium, induits par des hormones, pendant la maturation des gonades (Persson *et al.*, 1998).

3. Sélectivité de l'échantillonnage

Les différences dans les relations taille de l'otolithe-âge peuvent également être utilisées pour étudier les effets d'évitement lors de l'échantillonnage et le moment à partir duquel ce phénomène pose un problème. Il est souvent démontré dans les études sur les larves et les juvéniles que le poisson devient à un moment donné suffisamment grand pour pouvoir éviter les filets utilisés pour capturer les plus jeunes larves. Si un autre échantillon de la population, non biaisé, peut être obtenu en utilisant un moyen de capture différent, une comparaison des patrons de croissance des accroissements des poissons capturés avec les deux engins indiquera le moment à partir duquel le processus

d'évitement apparaît (fig. V.B.2). Dans cet exemple, les larves du mésocosme B ont été échantillonnées correctement jusqu'au 20^e jour avec un filet à deux poches mais, par la suite, les poissons capturés avec ce même filet représentent clairement les plus petits poissons de la population comparés aux survivants à la fin de l'expérience. Bien que les bénéfices de l'utilisation des patrons de croissance individuels soient évidents dans une étude de ce type, le respect des hypothèses faites sur la signification temporelle des accroissements et sur la qualité de l'échantillonnage de la population demeure essentiel.

Des différences dans les comportements spécifiques à un stade ou à une taille donné peuvent également induire des biais sur les estimations des taux des variables lorsque l'on utilise des échantillons standards issus des pêcheries professionnelles. Par exemple, les lançons juvéniles et adultes présentent un comportement fouisseur qui influence leur capturabilité par la pêche pendant des périodes nocturnes et saisonnières d'inactivité dans le sédiment. Un exemple de cette observation est montré pour l'estimation de la croissance du lançon nordique (*Ammodytes marinus*) en mer du Nord (Pedersen *et al.*, 1999), chez lequel une diminution de la taille pour un âge donné était généralement observée vers la fin de la saison de croissance. Dans une étude sur un site particulier, des échantillons non biaisés de lançons ont été obtenus en détarrant les individus hibernant dans le sédiment en février-mars à l'aide d'une drague. Une analyse par rétrocalcul de la distribution des tailles des otolithes au début de la formation de la zone translucide a montré que des fractions d'individus de la classe de l'année, différentes en tailles, étaient capturées par la pêche professionnelle à différentes périodes de la saison de pêche. En mettant en relation la taille individuelle avec la largeur de la première marque de croissance annuelle, les estimations de croissance saisonnière ont pu être corrigées du biais dû à l'échantillonnage (Worsøe & Mosegaard, non publié).

C. Structures démographiques dans les modèles d'évaluation de stocks

B. Mesnil

Les chercheurs qui étudient la dynamique de populations terrestres ou marines sont souvent amenés à prendre explicitement en compte la structure d'âge de ces populations (e.g. Charlesworth, 1994; Tuljapurkar & Caswell, 1996). La raison première est que les paramètres de plusieurs processus clés (tels que croissance, fécondité ou survie) qui déterminent l'évolution des effectifs ou des biomasses de ces populations au fil du temps diffèrent notablement selon les groupes d'âge. Dans le cas des poissons, de très nombreux travaux scientifiques concernent la dynamique de populations exploitées, i.e. affectées à la fois par des facteurs écologiques et par des activités humaines, et visent à étayer des avis sur l'utilisation durable des ressources aquatiques. Les recherches de ce type sont souvent désignées sous le vocable général « évaluations de stocks » (en anglais « stock assessment »). Comme le soulignent Hilborn & Walters (1992), le but de ces travaux ne se limite pas à une évaluation de l'état des stocks et des pêcheries par rapport à des repères historiques, à des points de référence biologiques ou aux objectifs de gestion; ils visent aussi à évaluer les conséquences, tant pour les stocks que pour les pêcheurs, de divers scénarios de gestion.

L'objet de ce sous-chapitre n'est pas de passer en revue les méthodes et modèles utilisés pour les évaluations de stocks halieutiques. Il est plutôt d'expliquer les motivations qui ont amené au développement et à l'utilisation de quelques grands types de modèle structuré en âge. En d'autres termes, on cherchera à montrer la « valeur ajoutée » de la prise en compte de la structure d'âge par rapport aux approches qui l'ignorent. Pour faire le lien avec les autres chapitres de ce manuel, on insistera sur deux aspects. Le premier, qui sera traité dans la discussion de chaque modèle, concerne la mesure dans laquelle le passage à un modèle plus élaboré modifie la demande en matière d'estimation d'âge. Le second aspect concerne les opérations qui doivent être effectuées entre le moment où l'on « lit » les âges sur un échantillon de pièces calcifiées et le stade où les données (en général des compositions en âge des captures ou de quantités associées) sont utilisées pour estimer les paramètres des modèles structurés en âge. On montrera que les gains de performance procurés par des modèles plus détaillés ont un coût en termes de quantité et de qualité des données requises, ce qui justifie le recours à des méthodes plus efficaces pour estimer les structures d'âge, telles que celles présentées dans cet ouvrage.

1. Modèles structurés en âge pour les évaluations de stocks et les avis sur la gestion des pêches

La plupart des méthodes utilisées pour les évaluations de stocks combinent un modèle mathématique de dynamique de population et un modèle statistique qui relie les observations à des attributs de la population (NRC, 1998). Les biologistes des pêches doivent aussi évaluer les effets attendus de différents régimes d'exploitation sur les états futurs des stocks et des pêcheries. Pour cela, ils ont également besoin de modèles qui permettent de faire varier les paramètres de dynamique de la population en réponse aux variations des variables de contrôle (captures et/ou effort de pêche) correspondant aux mesures de gestion envisagées. L'introduction des structures d'âge dans les modèles halieutiques résulte du constat que les différents groupes d'âge qui constituent une population (fig. V.C.1) fournissent, au fil du temps, des contributions distinctes à la production de biomasse, à la reproduction ou aux captures, ou sont inégalement affectés par les mesures de gestion. Ceci les distingue des modèles dits « globaux » (e.g. Schaefer, 1954) plus simples qui décrivent la dynamique des stocks uniquement en termes de biomasse totale.

Figure V.C.1
Structure typique d'une population, sur une base annuelle. On a représenté ici les effectifs par âge mais la même structure vaut pour d'autres variables telles que captures, biomasses, poids moyens, fécondités, mortalités naturelles et mortalités dues à la pêche par âge. Une cohorte (la classe 1992) est mise en évidence.

Âges	Années						
	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998
0	N0,92						
1	N1,93						
2	N2,94						
3	N3,95						
4				N4,96			
5			N5,97				
6+							N6+,98

1.1. Espèce unique, pêcherie homogène

Les modèles de base à partir desquels les extensions présentées plus loin ont été développées sont les modèles dits « analytiques » ou « structuraux » associés aux travaux pionniers de Beverton & Holt (1957) et de Ricker (1958). Ces modèles reconnaissent qu'une population est constituée de cohortes (ensembles d'individus issus d'une saison de ponte donnée) distinctes et considèrent explicitement les quatre processus principaux qui déterminent l'évolution d'une population : le recrutement et la croissance, qui augmentent sa biomasse, et la mortalité naturelle et la mortalité due à la pêche, qui la diminuent. Les paramètres associés à ces processus peuvent dépendre de l'âge. Ceci est évident dans le cas du **recrutement** qui ne concerne que le plus jeune groupe d'âge entrant dans la pêcherie chaque année. Beaucoup de stocks présentent des variations inter-annuelles considérables du nombre de recrues, et il importe donc d'en tenir compte dans les évaluations. La **croissance** est clairement une fonction de l'âge, que l'on

considère un ensemble discret de poids moyens par âge ou les incréments de poids d'un pas de temps à l'autre. Les modalités de croissance de la plupart des espèces de poissons sont telles que le taux de croissance est élevé chez les plus jeunes puis ralentit progressivement jusqu'à ce que la taille ou le poids atteigne une asymptote. L'analyse de la croissance est souvent la première étape de l'étude d'un stock de poissons et constitue l'utilisation la plus immédiate des données sur l'âge (chap. V.A). Le potentiel reproductif d'une population est aussi une question qui intéresse beaucoup les biologistes car c'est un élément essentiel des indicateurs de durabilité. Or, chez la plupart des espèces, la **fécondité** (combinant le nombre et la qualité des œufs) dépend de la taille et de l'âge du poisson. La **mortalité naturelle** est très difficile à estimer et, plus encore, ses variations avec l'âge. C'est pourquoi, elle est supposée constante dans la plupart des applications mais, comme on le verra plus loin avec les modèles multi-spécifiques, il est important que la structure du modèle autorise une variation de ce paramètre selon l'âge. Les incertitudes relatives aux valeurs adoptées pour la mortalité naturelle sont souvent le problème le plus critique dans les évaluations de stocks et les prévisions. Enfin, du fait que les divers groupes d'âge sont inégalement vulnérables aux différents engins de pêche, la **mortalité par pêche** ne peut que varier avec l'âge à intensité de pêche donnée. Ceci s'exprime formellement par ce que l'on appelle parfois le « modèle séparable », selon lequel la mortalité par pêche $F_{a,y}$ à l'âge a l'année y est le produit d'un facteur de sélectivité spécifique de l'âge S_a (appelé « diagramme d'exploitation » en France ou « recrutement partiel » au Canada) par un facteur f_y spécifique de l'année et proportionnel à l'intensité de pêche globale. **Immigration** et **émigration** sont aussi des processus qui peuvent affecter la biomasse d'une population, avec des paramètres dépendant de l'âge en général, mais tous les modèles évoqués ici considèrent des populations fermées.

Au cours des décennies récentes, les modèles analytiques ont surtout été utilisés pour formuler des avis sur les TAC (totaux autorisés de capture) et les quotas de captures, qui sont l'outil de gestion principal des pêcheries de l'Atlantique Nord, entre autres. Pour cette application, les modèles sont utilisés en mode simulation, avec prise en compte de la structure (abondance par âge) de la population initiale et, si possible, de l'abondance des recrutements attendus. Dans certains cas, les changements prévisibles des poids ou des fécondités aux âges sont également pris en compte. Chaque cohorte est projetée individuellement dans le temps, et la capture et les biomasses prédites à chaque pas de temps (année) sont calculées comme sommes des contributions de chaque groupe d'âge (fig. V.C.2). Le produit typique de ces simulations est un tableau présentant les captures prédites pour l'année où le TAC doit être décidé, ainsi que les biomasses totales ou de reproducteurs survivant en fin de cette année, pour une gamme de régimes d'exploitation (i.e. combinaisons d'intensités de pêche globales et de diagrammes d'exploitation). Les gestionnaires fixent ensuite le TAC en choisissant dans le tableau la capture prédite sous l'option qui concilie les besoins

de conservation du stock et les considérations sociales et économiques. Quand les stocks sont intensément exploités, la contribution des recrues aux captures peut être très importante. Toutefois, vu que le recrutement est par essence très difficile à prédire, même lorsque l'on dispose de bonnes campagnes d'estimation des pré-recrues, les prévisions de TAC sont généralement limitées à des horizons très courts (un ou deux ans). Cette myopie du système ne permet pas aux gestionnaires d'anticiper les conséquences de leurs décisions. Pour pallier cet inconvénient, les scientifiques ont cherché à élargir le cadre de leurs simulations, de telle sorte que les impacts à moyen terme des options de gestion puissent être mis en évidence. Ceci repose nécessairement sur des variantes stochastiques (au sens le plus large) des modèles analytiques. Le but est aussi d'estimer dans quelle mesure les incertitudes affectant les données (dont les compositions en âge estimées) et les paramètres des modèles se traduisent en incertitudes et en risques associés aux décisions de gestion (e.g. Hilborn *et al.*, 1993 ; Smith *et al.*, 1993 ; Francis & Shotton, 1997).

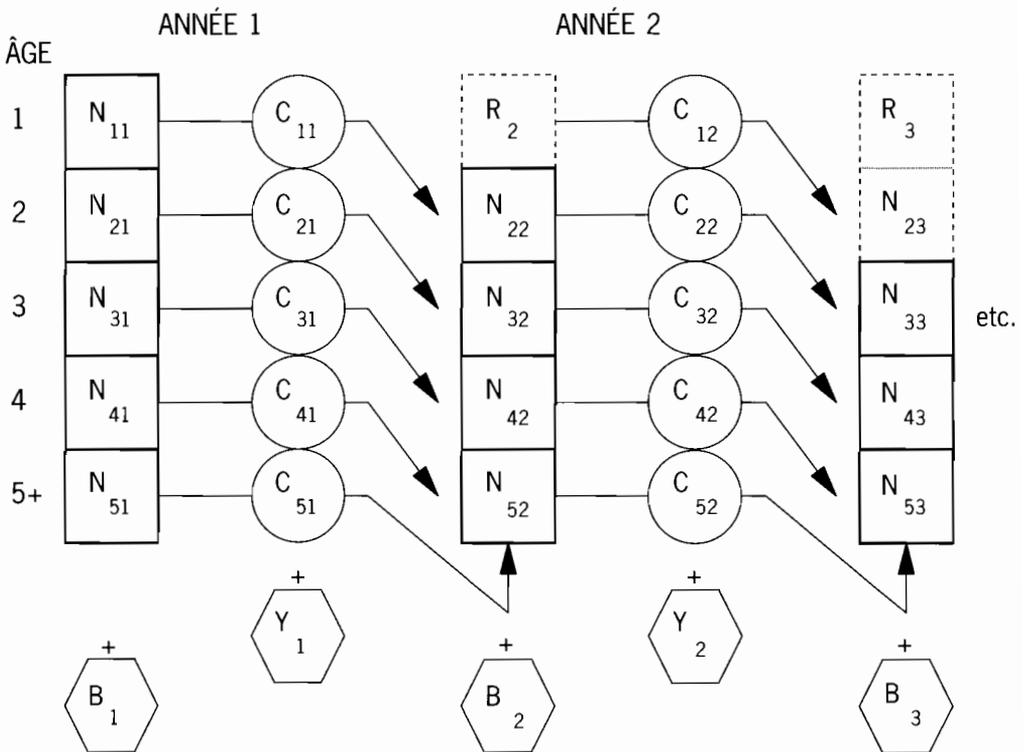


Figure V.C.2 - Esquisse d'une simulation structurée en âge.

N : effectifs par âge de la population en début d'année; le recrutement R est l'effectif à l'âge le plus jeune. À chaque pas de temps de la simulation, les recrutements doivent être introduits, soit manuellement, soit comme produits de calculs internes (relations stock-recrutement).

B : biomasse du stock, somme des effectifs multipliés par les poids moyens aux âges.

C : captures en nombre calculées en fonction des mortalités par pêche aux âges cohérentes avec le scénario de gestion simulé.

Y : capture en poids, i.e. somme des captures en nombre multipliées par les poids moyens aux âges.

Pour mettre en œuvre ces modèles, il faut pouvoir en estimer les paramètres. Les méthodes privilégiées pour estimer les paramètres des modèles analytiques relèvent de la classe des techniques désignées en français par le terme générique « analyses de cohortes ». Ces méthodes sont également utilisées pour reconstruire les abondances et les structures en âge historiques des stocks exploités et pour évaluer leur état actuel. Megrey (1989) présente une excellente revue des nombreux outils développés au cours des dernières décennies, y compris les diverses formes d'Analyses de populations virtuelles (APV, plus connues sous leur sigle anglais VPA) ou Analyses séquentielles de populations (ASP) et d'analyses statistiques des captures aux âges. Fondamentalement, toutes ces techniques visent à estimer les effectifs du stock et les mortalités par pêche, pour chaque âge et chaque année, étant donné le nombre de poissons de chaque cohorte capturés au cours des années successives. On s'intéresse en particulier à l'estimation des effectifs par âge pour l'année la plus récente, car c'est la structure initiale à partir de laquelle on procède aux simulations pour prévoir l'évolution à court terme de la pêcherie, qui est le souci principal des gestionnaires et des pêcheurs dans les systèmes de gestion basés sur les TAC. Cependant, ceci est précisément le point faible de la plupart de ces techniques : elles fournissent des estimations fiables des états passés (pour autant que toutes les captures aux âges soient connues avec une exactitude suffisante), mais les estimations d'effectifs et de mortalités par pêche aux âges pour la période récente sont imprécises, sauf si l'on dispose d'informations supplémentaires pour corriger ce défaut. De fait, la plupart des recherches consacrées à cette méthodologie au cours de la dernière décennie ont été axées sur la mise au point de méthodes statistiquement valides pour incorporer des données auxiliaires de façon à « calibrer » la procédure d'estimation et à réduire l'indétermination du système due au fait qu'il y a plus d'inconnues que d'équations. Dans la plupart des cas, les données auxiliaires sont des séries temporelles d'indices d'abondance, de préférence par âge, obtenus lors de campagnes scientifiques en mer ou issus des captures par unité d'effort de flottilles de pêche particulières. Des indices différenciés par âge sont particulièrement précieux car ils fournissent de l'information pour les éléments individuels de la matrice des effectifs, mais ceci implique des échantillonnages et des lectures d'âge supplémentaires. Une autre contrainte forte de ces techniques, avec des implications en termes d'estimations d'âge, est qu'elles exigent une continuité dans la disponibilité des captures aux âges ; toute interruption dans les séries temporelles crée des problèmes quasiment insurmontables, sauf à poser des hypothèses très fortes (mais difficiles à valider).

1.2. Espèce unique, flottilles multiples

Il est rare qu'un stock soit exploité par un seul type homogène de navires, comme le suppose le modèle de base ci-dessus. Dans la plupart des pêcheries, plusieurs types de navire sont impliqués, qui mettent en œuvre, toute l'année ou à des saisons particulières, une vaste

gamme d'engins fixes ou mobiles ayant des caractéristiques de sélection (taille des mailles ou des hameçons) différentes et qui ciblent différentes composantes du stock (e.g. les juvéniles ou les adultes). Ces flottilles peuvent aussi faire l'objet de mesures de gestion distinctes. Une source fréquente de conflits est le fait que certaines flottilles ciblent les jeunes poissons aux dépens d'autres flottilles qui dépendent entièrement de la disponibilité de poissons âgés, à cause de leur choix particulier d'engin ou de lieu de pêche (pêcheries dites séquentielles). Selon la nature du compromis décidé par les gestionnaires entre les flottilles ciblant respectivement les poissons juvéniles et adultes, les conséquences pour la dynamique du stock et pour la viabilité de la pêcherie dans son ensemble peuvent être très différentes.

Les modèles globaux sont par nature incapables de manipuler des diagrammes d'exploitation distincts associés à différents segments de flottille, ce qui rend impératif le recours aux modèles analytiques. L'honnêteté oblige à reconnaître que les modèles structurés en longueur sont mieux adaptés que ceux structurés en âge pour analyser les changements de sélectivité des engins, processus lié avant tout à la taille des poissons. Toutefois, ils posent quelques problèmes pour quantifier les effets transitoires de tels changements alors que ceux-ci sont la préoccupation première des gestionnaires et des pêcheurs. Des simulations multi-flottilles ne sont pas difficiles à mettre en œuvre, pour autant que la structure initiale de la population et les mortalités par pêche partielles aux âges dues à chaque flottille aient pu être estimées. Ces mortalités par pêche peuvent être ajustées pour simuler des changements de sélectivité et/ou multipliées par des facteurs adéquats pour simuler des variations de l'effort de pêche nominal des différentes flottilles. On notera au passage que, pour les pêcheries où les rejets sont importants, la même procédure est utilisée pour traiter séparément les débarquements et les rejets.

Dans la mesure où des séries temporelles de captures aux âges sont disponibles pour toutes les flottilles, la structure de la population pour toute année est estimée avec la même méthodologie d'analyse de cohortes que pour le modèle simple, qui fournit aussi les estimations de mortalités par pêche totales par âge. Si l'on fait l'hypothèse que tout groupe d'âge est également disponible à toutes les flottilles, les mortalités par pêche partielles sont alors facilement calculées *au prorata* de la capture de chaque flottille sur la capture totale à chaque âge et chaque année. En principe, ces applications n'exigent pas d'échantillonnages supplémentaires pour l'estimation des âges.

1.3. Plusieurs espèces, interactions techniques

Une limite évidente des approches mono-spécifiques d'évaluation et de gestion, qui restent les plus utilisées, et la cause des critiques les plus fréquentes tiennent à ce qu'elles ne prennent pas en compte le fait notoire qu'aucune espèce en quelque lieu des océans n'est indépendante ni isolée des autres espèces. Par conséquent, toute décision de gestion prise pour une espèce est susceptible d'avoir un impact sur les

espèces associées et peut être inadéquate pour ces dernières ou pour la pêcherie totale. Pour cette présentation, nous adopterons la distinction usuelle entre les approches multi-spécifiques selon que l'accent est mis soit sur les interactions biologiques, soit sur les interactions techniques (ou technologiques), tout en gardant à l'esprit que, dans beaucoup de pêcheries, les deux types existent simultanément. Les secondes se traitant à l'aide d'extensions relativement simples du modèle précédent, on les abordera en premier.

Les interactions techniques surviennent quand les distributions de différentes espèces se chevauchent, si bien que toute opération de pêche visant une espèce entraîne, intentionnellement ou non, la capture d'espèces sympatriques. En d'autres termes, tout effort de pêche déployé sur une zone provoque une mortalité par pêche sur l'espèce cible A, mais inévitablement aussi sur les espèces incidentes (ou accessoires) B, C, etc. De même, la distribution des mortalités par pêche selon les âges peut être différente pour les diverses espèces concernées : une flottille peut capturer les adultes de A en même temps que les juvéniles de B, ou *vice versa*. Ainsi, une stratégie de pêche appropriée ou une mesure de gestion adéquate pour l'espèce A peut avoir des effets non désirés sur la dynamique des espèces associées, particulièrement quand ces dernières sont moins productives. Si l'on souhaite évaluer si une stratégie ou une réglementation est cohérente avec les objectifs de gestion pour la totalité de la pêcherie, c'est-à-dire pour toutes les espèces, il est donc important que les méthodes employées permettent de modéliser la dynamique de toutes les espèces pertinentes et ce, de préférence avec des paramètres spécifiques de l'âge pour les raisons déjà évoquées pour les cas mono-spécifiques. La plupart des applications dédiées aux interactions techniques utilisent des modèles dits de « pêcheries composites » (Mahon, 1985) dans lesquels les flottilles de pêche sont subdivisées en groupes ou « métiers » (Laurec *et al.*, 1991) ayant des stratégies similaires à l'égard de sous-ensembles particuliers de l'assemblage d'espèces.

Les modèles de pêcheries composites structurés en âge sont relativement faciles à concevoir et à appliquer (CEC, 1987). En bref, il faut simuler simultanément les dynamiques de toutes les espèces, les liens entre espèces étant manipulés via les paramètres de mortalité par pêche : toute variation d'effort d'un métier est censée résulter en la même variation proportionnelle de mortalité par pêche sur toutes les espèces et âges vulnérables à ce métier. Pour chaque espèce, la structure en âge de la population initiale et les diagrammes d'exploitation de référence par métier sont estimés par des APV mono-spécifiques indépendantes, i.e. en utilisant la même procédure que pour les modèles plus simples. Il peut y avoir des besoins supplémentaires d'échantillonnages et d'estimations d'âge pour quelques espèces qui ne sont pas étudiées en routine, car leur importance marginale à l'échelle nationale ou régionale n'en justifie pas le coût, mais qui représentent une part significative des revenus de flottilles locales

affectées par les mesures de gestion envisagées. Si les données par âge n'existent pas ou sont trop chères à acquérir, des approches mixtes traitant certaines espèces avec des modèles structurés en âge et d'autres avec des modèles globaux sont une alternative envisageable (Laurec *et al.*, 1991).

La simplicité apparente des modèles d'interactions techniques dissimule au moins deux questions épineuses. L'une concerne les rejets. Dans de nombreux cas, les interactions techniques les plus critiques entre espèces (ou leurs groupes d'âge) affectent des stades vitaux correspondant aux tailles rejetées par quelques flottilles. Si les paramètres de mortalité par pêche sont estimés par analyse des données de débarquements seulement, la compréhension du réseau d'interactions peut être faussée ; l'évaluation de la pertinence ou des effets d'une option de gestion peut aussi être sérieusement biaisée. Par conséquent, il est essentiel de prendre en compte les rejets dans les évaluations de pêcheries composites. Les pêcheurs étant généralement réticents à déclarer leurs rejets, ceci entraîne souvent un surcoût notable pour l'acquisition des données. En revanche, s'agissant des estimations d'âge, le surcroît de travail devrait être marginal par rapport à celui sur les débarquements (ajout des tailles qui ne sont jamais débarquées). L'autre question concerne la prévision de la réaction des pêcheurs aux changements dans l'abondance des diverses espèces ou dans les règlements. La plupart des applications supposent que chaque navire conservera sa stratégie actuelle, i.e. la matrice des coefficients de capturabilité par espèce et par âge qui le caractérise est fixe. Dans la réalité, on peut s'attendre à ce que les pêcheurs ajustent leurs pratiques de pêche quand l'abondance ou la valeur marchande relative des espèces change, ou quand de nouvelles mesures de gestion affectent les coûts d'opération des métiers. Toutefois, comprendre les déterminants personnels, économiques ou sociaux des choix des pêcheurs assez bien pour les modéliser et les prévoir dans des évaluations est un défi colossal (Allen & McGlade, 1986).

1.4. Plusieurs espèces, interactions biologiques

Dans un écosystème, des espèces peuvent interagir naturellement de plusieurs façons. Les interactions prédateurs-proies sont sans doute les plus évidentes et sont une cause importante de mortalité naturelle pour les espèces proies. L'abondance et la qualité des proies influencent aussi la croissance des prédateurs. En outre, il peut y avoir des compétitions pour la nourriture ou pour les habitats.

Il est évident que la prise en compte des structures de taille et d'âge est importante pour l'analyse des interactions prédateurs-proies. Qu'ils soient prédateurs ou proies, tous les individus d'une population ne sont pas égaux. La mortalité par prédation affecte surtout les stades jeunes, puis diminue à mesure que la taille et l'âge augmentent. Des poissons d'une même cohorte peuvent être des proies quand ils sont jeunes et devenir prédateurs quand ils sont plus vieux (par exemple

dans le cas du cannibalisme). Les prédateurs passent parfois d'un type de proie à un autre quand ils grandissent. Les effets quantitatifs de la prédation dépendent de l'abondance des prédateurs et varient selon que des cohortes de prédateurs faibles ou fortes traversent le système. C'est pourquoi, dès l'origine, les modèles évoqués ci-après ont été conçus avec une structure d'âge. Aussi, le terme « prédateur » est utilisé dans toute cette section pour désigner un âge donné d'une espèce prédatrice, et de même pour « proie ». Dans la mesure où la plupart des applications halieutiques ne considèrent que des espèces prédatrices et proies d'importance commerciale, pour lesquelles les données en âge sont de toutes façons compilées pour les évaluations mono-spécifiques, il n'y a pas nécessairement de surcoût associé à la forme structurée en âge. La « facture très élevée » (Hilborn & Walters, 1992) des modèles d'interactions biologiques est surtout liée à la récolte et à l'analyse des contenus stomacaux.

Comme on l'a évoqué plus haut, selon les valeurs adoptées pour la mortalité naturelle dans les évaluations, la perception des états historiques du stock et, plus encore, les implications à moyen et long termes des options de gestion sur les diverses espèces peuvent être radicalement différentes. C'est pourquoi, dans le contexte halieutique et, notamment, au sein du Conseil international pour l'exploration de la mer (CIEM), la plupart des travaux ont été consacrés à l'impact de la prédation, y compris le cannibalisme, sur la mortalité naturelle (Daan & Sissenwine, 1991). Néanmoins, dans quelques cas, les effets des variations d'abondance des proies sur la croissance et la reproduction des prédateurs sont également étudiés (e.g. Stefansson & Pálsson, 1998).

Les détails techniques des modèles d'interactions biologiques sont trop complexes pour être présentés ici. Les lecteurs intéressés peuvent consulter les revues de Magnusson (1995) ou de Sparre (1991). En bref, pour estimer la fraction du taux de mortalité naturelle M à chaque âge due aux prédateurs inclus dans l'analyse, on fait appel à des coefficients de préférence qui « mesurent ce que le prédateur aime manger ainsi que ce qu'il est capable de manger » (Magnusson, 1995). Dans la communauté du CIEM, la méthode la plus employée pour estimer ces paramètres a été l'analyse de populations virtuelle multi-spécifique (plus connue sous le sigle anglais MSVPA). Celle-ci vise à estimer l'effectif de chaque cohorte au fil du temps, en rendant compte non seulement des prélèvements par la pêche mais aussi de ce qui a disparu par prédation, tel que mesuré dans les contenus stomacaux des prédateurs. Puisque, chaque année, la mortalité par prédation subie par une cohorte de proies dépend de l'abondance de toutes les cohortes de prédateurs et de proies, les équations doivent être résolues simultanément pour toutes les cohortes de toutes les espèces. Le critère d'ajustement est que les compositions relatives calculées par espèce et par âge des proies, pondérées par les coefficients de préférence, doivent coïncider avec celles observées dans les estomacs de prédateurs échantillonnés. Puisque les coefficients de préférence reflètent en partie le

recouvrement spatial des distributions des prédateurs et des proies, lequel dépend de la saison, tous les calculs sont réalisés sur une base de temps trimestrielle. La conséquence est qu'il faut récolter des estomacs de toutes les espèces et âges (ou tailles) de tous les prédateurs, par trimestre, sur toute l'aire de répartition, et les analyser pour estimer la composition en espèces et en âges de leurs proies. Au cours de l'opération coordonnée par le CIEM en 1981, plus de 54 000 estomacs ont été récoltés (Daan, 1987) et, même s'ils ont été regroupés par taille de prédateur avant analyse, on réalise l'énorme travail de traitement que cela a impliqué. C'est pourquoi seulement deux opérations d'échantillonnage à grande échelle ont pu être menées en mer du Nord, à dix ans d'intervalle. Il a également fallu analyser un très grand nombre d'otolithes (par espèce, zone et trimestre); on notera, cependant, que l'analyse d'une bonne part d'entre eux aurait aussi dû être réalisée pour calculer les indices d'abondance par âge qui sont un produit systématique des campagnes en mer.

1.5. Modèles spatiaux

Tous les modèles présentés jusqu'ici supposent que les poissons et/ou l'effort de pêche soient distribués aléatoirement sur toute l'aire de la pêcherie. On assiste cependant à une prise de conscience progressive du fait que les modèles halieutiques devraient être conçus avec des structures spatiales explicites, tant pour les poissons que pour les activités de pêche. Ce besoin devient d'autant plus pressant qu'un mouvement très actif (avec parfois les excès du militantisme) a émergé ces dernières années pour ressusciter les cantonnements (ou aires marines protégées) comme outils de gestion «de précaution» (e.g. Guénette *et al.*, 1998). Or, les modèles traditionnels sont simplement inadéquats pour évaluer correctement les effets de tels dispositifs.

Bien que divers modèles spatiaux aient été proposés ces dernières années, beaucoup dépendent pour leur mise en œuvre opérationnelle de la disponibilité de données particulières (issues de marquages, de campagnes scientifiques, de journaux de pêche) et une méthodologie standard reste à établir. Il fait peu de doute, cependant, que la pertinence des modèles spatiaux pour les besoins de la gestion est nettement améliorée quand ils prennent en compte les structures d'âge. Chez de nombreuses espèces, les divers groupes d'âge ont des distributions spatiales nettement distinctes (e.g. nourriceries vs zones de frai), et leurs schémas de migration diffèrent sensiblement (e.g. migrations ontogénétiques vs reproduction). Les paramètres correspondants dans les modèles ont donc de grandes chances de varier selon l'âge. Le design d'une aire protégée doit aussi tenir compte de critères tels que les espèces et les âges concernés (localisation, saison, taille de la réserve), la durée de leur séjour dans l'aire protégée (sa taille intervient là encore), leur vitesse de croissance ou de maturation pendant le séjour, etc. À cet égard aussi la considération des structures d'âge est importante.

2. De l'estimation des âges à l'application des modèles

2.1. Estimation de la composition en âge des captures

Quel que soit le type de modèle envisagé, son application à des cas concrets suppose que l'on puisse estimer les paramètres à partir de données. Comme on l'a précisé dans la section précédente, les paramètres de la plupart des modèles structurés en âge sont estimés à l'aide des techniques d'analyse de cohortes. Typiquement, ces techniques réclament en entrée une matrice des nombres totaux d'individus capturés par la pêche à chaque âge, chaque année. La plupart des variantes couramment utilisées cherchent aussi à tirer parti d'informations auxiliaires telles que les indices d'abondance par âge mesurés lors de campagnes scientifiques ou calculés d'après les rendements de pêche par âge de flottilles commerciales sélectionnées. Ces données sont des cas particuliers de captures par âge.

Pour estimer la composition en âge des captures, deux stratégies peuvent être adoptées. La première consiste à échantillonner des poissons au hasard sur les lieux de débarquement, à estimer l'âge de tous ces poissons et à appliquer directement au nombre total de poissons capturés les proportions des divers âges observées dans cet échantillon (échantillonnage aléatoire simple). La seconde est l'échantillonnage à deux niveaux : au premier niveau, des poissons sont prélevés aléatoirement pour être mesurés puis, au deuxième niveau, un sous-échantillon est prélevé parmi les poissons mesurés et l'âge de ces poissons est estimé. Le sous-échantillon est généralement stratifié par classe de taille (i.e. un nombre fixe ou proportionnel est pris à chaque longueur) et ceci conduit à la clé taille-âge (CTA). La CTA est un tableau, généralement avec les âges en colonnes et les tailles en lignes, qui exprime la probabilité qu'un poisson ait l'âge i sachant qu'il est de longueur j (fig. V.C.3). Après passage en proportions, la somme des cellules de la CTA calculée à chaque longueur (somme marginale par ligne) doit être égale à l'unité (100 %). Quand le vecteur des nombres de poissons capturés par classe de longueur est multiplié par la matrice de CTA, on obtient le vecteur des nombres de poissons capturés par âge. Pour passer de l'échantillon à la capture totale, l'élévation peut être faite soit sur la composition en taille (avant d'appliquer la CTA), soit sur la composition en âge (après la CTA). Le chapitre 8 de Quinn & Deriso (1999) présente les formules de variance pour les deux stratégies ; on y trouve aussi une discussion sur les relations entre taille des échantillons et précision, et sur le traitement des erreurs d'âgeage dans les évaluations de stocks. Si l'on s'en tient à des critères purement statistiques (variance), aucune des deux stratégies n'est systématiquement supérieure à l'autre (Kimura, 1977). En revanche, si l'on fait intervenir le rapport coût-précision, la balance penche en faveur du double échantillonnage car, en règle générale, le traitement des pièces dures pour l'estimation des âges est beaucoup plus coûteux que l'échantillonnage des compositions en taille (e.g. Lai, 1993). C'est pourquoi cette dernière stratégie et la procédure de la CTA sont utilisées le plus fréquemment.

		Âge						Âge			
Taille	1	2	3	etc.	Taille	1	2	3	etc.		
10	6				10	100					
11	8	2			11	80	20				
12	7	7			12	50	50				
13	3	9			13	25	75				
14		6	2		14		75	25			
15		1	9		15		10	90			
etc.					etc.						

Figure V.C.3 - Format d'une clé taille-âge (abrégée).

À gauche : relevé des nombres d'otolithes ou d'écaillés assignés par âge lors de l'examen des échantillons ;

À droite : données transformées en proportions (pourcentages) au sein des classes de taille.

Par exemple, la capture en nombre à l'âge 1 est calculée comme somme de tous les poissons capturés de taille 10, plus 80 % de ceux de taille 11, 50 % de ceux de taille 12 et 25 % de ceux de taille 13.

Il y a un problème récurrent concernant la CTA qui mérite d'être clarifié. Alors que la distribution des longueurs à âge donné est essentiellement déterminée par le schéma de croissance, qui peut ne pas varier beaucoup d'une année à l'autre, la distribution des âges à longueur donnée (la CTA) est aussi largement influencée par l'abondance des classes annuelles (ou cohortes). Par conséquent, la CTA établie pour une année ne doit jamais être appliquée à la composition en taille d'une autre année. Comme on le verra dans l'exemple ci-après, on peut facilement démontrer que ceci entraîne une mauvaise allocation entre âges, et donc des erreurs dans les évaluations. Plus précisément, comme Kimura (1977) et d'autres experts le répètent avec insistance, l'échantillon utilisé pour construire une CTA doit être tiré de la même population que celle à laquelle elle est appliquée. C'est pourquoi certains instituts de recherche utilisent à juste titre des plans d'échantillonnage, pour les tailles et les âges, indépendants par sous-zone et par saison chaque année pour les divers stocks, du fait que la structure des populations sous-jacentes diffère. Au minimum, il faut reconstruire une nouvelle CTA tous les ans. Notons, cependant, que cette contrainte s'applique également si l'on adopte la stratégie de l'échantillonnage aléatoire simple.

2.2. Étude de cas : la clé taille-âge en pratique

Le but principal de cet exemple est de mettre en évidence, à partir de données réelles (merlan de mer Celtique, *Merlangius merlangus*, données aimablement communiquées par R. Bellail, Ifremer, Lorient, France), les conséquences de l'application à des compositions en taille d'une clé taille-âge impropre.

Le tableau V.C.1 présente la clé taille-âge (CTA, en nombre de poissons âgés à chaque longueur) et, dans la deuxième colonne, la composition en taille des captures d'une flottille particulière obtenues pour l'année 1992. La dernière ligne contient la composition en âge de ces captures résultant de l'application de la CTA, suivant la procédure détaillée dans la figure V.C.3. Cet exemple utilise des données agrégées sur l'année

entière alors que, en réalité, le traitement est réalisé avec des CTA et des compositions en taille trimestrielles, mais ceci n'altère pas le message essentiel. On notera seulement que l'utilisation de données annuelles peut entraîner des erreurs d'allocation pour les groupes d'âge (les plus jeunes, typiquement) dont la croissance est notable en cours d'année. On peut d'ailleurs soupçonner que c'est le cas ici : dans la gamme des 30-36 cm, les poissons pris tôt dans l'année sont plutôt d'âge 2 ou 3, mais les poissons d'âge 1 nés tôt ou croissant rapidement peuvent aussi atteindre ces tailles vers la fin de l'année et on peut les trouver dans les échantillons d'otolithes prélevés au dernier trimestre. Quand les échantillons sont simplement agrégés (sans pondération selon le nombre pris à chaque saison) pour construire la CTA annuelle, les proportions des âges au sein des classes de taille observées en fin d'année influencent l'allocation pour l'année entière, ce qui peut provoquer un certain biais dans la composition en âge estimée. Ce biais peut être important quand, comme c'est le cas ici, un fort recrutement arrive dans le stock. La dispersion des tailles à chaque âge et le chevauchement entre âges adjacents augmentent également quand on utilise des données annuelles.

Ces problèmes peuvent être largement évités quand toute la procédure est mise en œuvre sur une base saisonnière (e.g. compositions en taille et CTA trimestrielles), ce qui est généralement fait en pratique en dépit des coûts supplémentaires. Un inconvénient, cependant, des CTA saisonnières est qu'il peut être plus difficile d'obtenir suffisamment d'otolithes pour certaines tailles. Ainsi, le tableau V.C.1 montre que les échantillonneurs ont eu du mal à trouver des poissons de grande taille, même sur l'année entière, alors que la variance des âges est généralement plus forte pour ces grands poissons, caractéristique qui obligerait normalement à augmenter la taille de l'échantillon pour améliorer la précision. Toutefois, sur un stock aussi fortement exploité, les vieux poissons contribuent peu aux captures et à la biomasse, si bien qu'une connaissance précise de leur nombre n'est pas un souci majeur. On remarquera enfin que près de 1 700 poissons ont été âgés cette année-là. Du fait du sous-échantillonnage proportionnel adopté, certaines tailles ont pu être sur-représentées par rapport à d'autres mais cette option est statistiquement meilleure qu'une allocation constante par taille. Ce nombre est considérable, surtout quand on songe que ceci n'est qu'un des multiples stocks que l'équipe scientifique doit suivre en routine.

Le tableau V.C.2 présente les mêmes informations relatives aux échantillons analysés en 1993, pour lesquels les considérations qui viennent d'être discutées sont également pertinentes. Il est surtout intéressant de constater, en comparant ce tableau au précédent, que les proportions pour les âges 1 et 2 dans la CTA ont changé radicalement alors que la forte classe 1991 a avancé de l'âge 1 à l'âge 2. La probabilité de tirer un poisson d'âge 1 dans la gamme de taille « normale » pour cet âge a été beaucoup plus faible qu'en 1992 et, ceci vaut aussi taille par

taille. Pour la classe 30, par exemple, les proportions des âges 1 et 2 étaient d'environ 6 % et 80 % respectivement en 1993, contre 18 % et 53 % en 1992. Ceci met bien en évidence le fait que la structure de la CTA est influencée non seulement par le schéma de croissance mais aussi par l'abondance relative des différents groupes d'âge dans la population sur laquelle les échantillons sont prélevés. Elle est donc amenée à changer d'une année à l'autre selon que des classes fortes ou faibles progressent dans la population, ou d'une région à l'autre si les groupes d'âge ont des distributions spatiales différentes.

Le tableau V.C.3 récapitule d'abord les compositions en âge obtenues quand la procédure est appliquée correctement, avec des compositions en taille et des CTA échantillonnées la même année. Le seul examen des captures d'une flottille ne suffit pas pour tirer des conclusions sur l'abondance absolue (laquelle doit être estimée par une analyse de cohortes sur la série des captures totales), d'autant que l'âge 1 n'est que partiellement recruté, mais les valeurs pour les deux années semblent indiquer que la classe 1991 a été relativement forte. On peut en dire autant de la classe 1987 (âge 5 en 1992 et 6 en 1993) dont la contribution aux captures est plus forte que celle des classes adjacentes. On a bien une cohérence dans la progression démographique, et les évaluations de stocks ultérieures ont confirmé que ces deux classes ont été parmi les plus fortes dans la décennie. Mais, si l'on fait l'erreur d'appliquer la CTA de 1992 à la composition en taille de 1993 (colonne de droite), cette cohérence disparaît. On note d'abord que la contribution de la classe 1992 aux captures à l'âge 1 est amplifiée par un facteur d'environ trois, d'où une sous-estimation des captures aux âges 2 et 3. De plus, il semble y avoir une forte contribution du groupe d'âge 5, c'est-à-dire de la classe 1988 plutôt que de la forte classe 1987. Or, ceci est incompatible avec ce que l'on sait de la classe 1988, dont on a pu prouver que ce fut une des plus faibles dans l'histoire de ce stock. Si l'on avait utilisé des compositions en âge affectées de ce type d'erreur dans des analyses de cohortes, quelle qu'en soit la variante, on aurait gravement faussé les estimations d'abondance et de mortalité par pêche pour toutes les cohortes. L'erreur particulière mise en lumière dans cet exemple (où de fortes captures sont réparties sur les groupes d'âge adjacents) aurait vraisemblablement entraîné une sous-estimation de l'abondance et de la mortalité par pêche de la cohorte forte, mais on ne peut pas en tirer une règle générale : les effets des erreurs d'âge sur les résultats d'évaluation de stocks varient selon la proximité et l'abondance des groupes d'âge affectés par excès ou par défaut. Les erreurs sur les estimations d'âge ne sont qu'une des sources d'incertitude et doivent être traitées en conjonction avec les autres sources, via une méthodologie appropriée, si l'on veut apprécier la qualité globale d'une évaluation de stock.

Tableau V.C.1 - Composition en taille, clé taille-âge et composition en âge résultante pour 1992.

Composition en taille		Clé taille-âge								
L(cm)	Capture (Nb '000)	Âge	1	2	3	4	5	6	7+	Total âgé
24	16,4		5	0	0	0	0	0	0	5
25	75,7		7	1	0	0	0	0	0	8
26	296,0		13	6	0	0	0	0	0	19
27	622,5		22	15	1	0	0	0	0	38
28	973,4		19	29	5	0	0	0	0	53
29	1 227,5		14	45	7	0	0	0	0	66
30	1 419,5		14	42	22	1	0	0	0	79
31	1 356,8		11	47	12	4	0	0	0	74
32	1 298,1		8	56	13	0	1	0	0	78
33	1 241,2		6	52	20	2	3	0	0	83
34	905,1		2	45	27	3	5	2	0	84
35	717,6		2	43	41	5	8	2	0	101
36	525,6		1	47	28	5	7	2	1	91
37	423,1		0	31	41	6	5	0	0	83
38	322,0		0	30	30	8	5	1	0	74
39	215,9		0	20	26	3	8	2	0	59
40	164,6		0	18	25	9	5	6	0	63
41	134,3		0	12	33	7	13	2	0	67
42	122,7		0	14	38	14	10	3	1	80
43	94,5		0	15	37	8	7	3	1	71
44	69,1		0	8	27	9	13	8	1	66
45	56,8		0	7	24	11	11	2	0	55
46	40,2		0	2	23	9	14	3	0	51
47	32,8		0	0	14	8	23	4	1	50
48	24,5		0	0	11	7	9	8	2	37
49	19,9		0	1	11	12	9	1	1	35
50	14,6		0	0	7	4	12	4	0	27
51	9,0		0	0	4	2	5	7	0	18
52	9,7		0	0	5	0	13	4	0	22
53	9,7		0	0	2	3	10	2	0	17
54	11,4		0	0	2	3	11	3	1	20
55	6,1		0	0	1	1	7	4	1	14
56	4,1		0	0	0	0	4	6	0	10
57	5,4		0	0	1	1	3	3	1	9
58	2,6		0	0	0	2	1	2	2	7
59	3,2		0	0	0	0	4	2	1	7
60	2,2		0	0	0	0	3	2	1	6
61	1,3		0	0	0	0	0	4	0	4
62	1,8		0	0	0	0	2	1	1	4
63	0,0		0	0	0	0	0	0	1	1
64+	0,4		0	0	0	0	1	1	0	2
Total	12 477,4									1 738
		Composition en âge								
		1972,6	6598,0	2892,0	416,9	452,8	129,3	15,9		

Tableau V.C.2 - Composition en taille, clé taille-âge et composition en âge résultante pour 1993.

Composition en taille		Clé taille-âge								Total âge
L(cm)	Capture (Nb '000)	Âge	1	2	3	4	5	6	7+	
24	4,0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
25	17,0	1	2	0	0	0	0	0	0	3
26	75,1	0	7	0	0	0	0	0	0	7
27	178,6	2	12	1	0	0	0	0	0	15
28	379,6	4	22	0	0	0	0	0	0	26
29	751,7	8	42	4	0	0	0	0	0	54
30	847,3	3	43	8	0	0	0	0	0	54
31	995,5	4	42	15	0	0	0	0	0	61
32	970,6	1	33	31	1	0	0	0	0	66
33	1089,4	2	47	28	2	0	0	0	0	79
34	886,2	0	40	33	2	0	0	0	0	75
35	788,0	0	41	50	4	0	1	0	0	96
36	622,9	0	44	49	6	0	0	0	0	99
37	498,8	0	39	55	17	2	0	1	1	114
38	348,3	0	32	58	14	1	1	0	0	106
39	271,1	0	24	58	9	3	0	0	0	94
40	223,6	0	15	60	12	5	0	0	0	92
41	163,5	0	11	51	14	1	2	1	1	80
42	107,1	0	6	43	12	1	0	1	1	63
43	94,4	0	3	44	10	4	1	1	1	63
44	86,9	0	2	37	10	3	1	1	1	54
45	78,7	0	1	43	13	1	2	0	0	60
46	56,8	0	0	19	14	5	4	2	2	44
47	39,6	0	0	18	15	1	1	2	2	37
48	36,1	0	0	9	12	1	7	0	0	29
49	28,5	0	0	9	13	0	3	2	2	27
50	32,9	0	0	7	9	1	8	5	5	30
51	19,0	0	0	2	8	2	4	5	5	21
52	23,0	0	0	3	10	3	5	2	2	23
53	15,8	0	0	3	4	2	4	1	1	14
54	20,6	0	0	2	4	3	7	3	3	19
55	16,4	0	0	1	3	2	5	2	2	13
56	14,4	0	0	0	1	5	5	2	2	13
57	9,5	0	0	0	2	2	5	1	1	10
58	8,0	0	0	0	2	1	2	3	3	8
59	9,1	0	0	0	0	2	6	2	2	10
60	6,6	0	0	0	0	2	2	5	5	9
61	4,8	0	0	0	0	1	0	5	5	6
62	4,8	0	0	0	0	0	0	6	6	6
63	0,6	0	0	0	0	0	0	1	1	1
64+	0,6	0	0	0	0	0	0	1	1	1
Total	9825,2									1 683
		Composition en âge								
		353,9	5 142,0	3 575,8	516,6	83,9	94,4	58,5		

Tableau V.C.3 - Compositions en âge pour 1992 et 1993 obtenues avec les CTA établies pour chacune de ces années.

Âge	Tailles 92 CTA 92	Tailles 93 CTA 93	Tailles 93 CTA 92
1	1972,6	353,9	989,2
2	6598,0	5142,0	4985,5
3	2892,0	3575,8	2665,0
4	416,9	516,6	439,5
5	452,8	83,9	543,7
6	129,3	94,4	178,2
7+	15,9	58,5	24,1

Colonne de droite : composition en âge estimée pour 1993 en utilisant la CTA établie avec les échantillons de 1992.

3. Résumé et critique

Si tous les individus d'un stock étaient équivalents en termes de traits vitaux (croissance, fécondité, mortalités naturelle et par pêche), voire d'abondance, il n'y aurait pas besoin d'aller chercher des modèles structurés en âge relativement complexes avec ce qu'ils impliquent comme coûts d'acquisition de données. Malheureusement, tel n'est pas le cas et les halieutes sont souvent forcés de tenir compte des structures d'âge pour évaluer correctement l'état des stocks et des pêcheries. Sur ce point, les opinions peuvent cependant diverger. Quand les évaluations de stocks n'ont pour finalité que d'étayer des avis de gestion, des modèles qui décrivent la réalité avec force détails peuvent s'avérer moins pertinents que des modèles qui favorisent une gestion saine dans la durée. Ces derniers doivent, en particulier, être robustes face aux incertitudes de toutes sortes. Or, il est bien établi que plus un modèle est détaillé, plus il a de paramètres et plus cela le rend sensible aux incertitudes. Dans certaines applications, il a pu être démontré que des modèles globaux simples avaient des performances meilleures que des modèles structurés en âge, notamment quand les données concernant les âges sont imprécises. Toutefois, cette supériorité a été mise en évidence dans des contextes où toute la gestion repose sur des TAC simplement exprimés en masse totale de poissons. On arriverait à des conclusions différentes si les tests avaient porté sur l'évaluation d'autres mesures de gestion (maillages des engins, zones de cantonnement, etc.) ou de pêcheries très composites. Compte tenu des préoccupations croissantes du public à l'égard des écosystèmes et de la biodiversité, il est vraisemblable que des avis basés sur des évaluations de populations agrégées seront de plus en plus considérés comme inacceptables si ceci amène à ignorer le sort d'espèces ou de composantes des stocks particulièrement fragiles. Les modèles simples ont aussi l'inconvénient d'être incapables de tirer parti de certaines connaissances ou informations (dont des données par âge) qui seraient disponibles.

Plutôt que d'opposer les modèles qui prennent complètement en compte les structures d'âge à ceux qui les ignorent totalement, il est plus constructif de s'intéresser au potentiel de modèles de complexité intermédiaire (e.g. Conser, 1994; Jacobson *et al.*, 1994). Leur idée générale est de ne tenir compte des structures d'âge que pour les groupes dont les paramètres ont une forte dynamique, les autres étant agrégés dans un seul compartiment. En général, les premiers sont les groupes d'âge les plus jeunes et l'avantage opérationnel est que ce sont aussi ceux pour lesquels l'estimation de l'âge est la plus facile et la moins coûteuse. Une option extrême, qui peut être justifiée quand les fluctuations du recrutement sont la cause principale de variation de la production de biomasse, consiste à ne modéliser explicitement que deux stades dans la population, les recrues et tous les autres. Les recrues sont faciles à identifier, même sur un simple examen des compositions en taille, surtout quand celles-ci sont établies sur une base saisonnière. Si le problème à traiter l'impose, on peut être amené à identifier quelques groupes d'âge en plus dans la phase juvénile. Au demeurant, même avec des modèles parfaits, on ne pourrait pas améliorer la gestion de pêcheries pour lesquelles la volonté d'appliquer les décisions manque.

En fait, la complexité en soi des modèles d'évaluation de stocks structurés en âge, qui reste très modeste si on les compare aux modèles utilisés par d'autres disciplines, n'est pas le plus gros problème. La principale entrave est le coût de collecte et de traitement des données requises pour en estimer les paramètres, exacerbé par l'obligation d'opérer en routine pour répondre aux exigences des gestionnaires des pêches. Le traitement des matériaux pour l'estimation des âges représente généralement une part prépondérante de ce coût, vu la quantité de pièces calcifiées à manipuler, les compétences et la technologie mobilisées, et les normes de qualité à respecter. De plus, comme on l'a souligné dans la section V.C.2, tout ce travail doit être repris entièrement chaque année. Étant donné qu'il faut prendre des échantillons assez importants pour l'estimation des âges de façon à obtenir une précision acceptable, et que de nombreux espèces et stocks doivent être suivis en routine, la quantité de pièces (écailles, otolithes, etc.) qu'il faut traiter chaque année finit par être considérable. Pour faire face à l'ampleur de la tâche, il faut pouvoir disposer de procédures de traitement très efficaces, qui doivent s'inspirer des chaînes de production industrielles (Morison *et al.*, 1998). Bien entendu, la qualité doit aussi être un souci permanent, ce qui implique que ces procédures soient rigoureusement validées (chap. IV). De plus, les évaluations de stocks exigeant d'entretenir des séries temporelles, la cohérence des interprétations de pièces dures au cours du temps est un aspect crucial de la qualité qui doit être soigneusement surveillé.

Toutes ces exigences impliquent clairement qu'il y a un prix élevé à consentir si l'on veut bénéficier des avantages des modèles structurés en âge, même dans leurs formes les plus simples. Si l'on veut être en

mesure de continuer à utiliser ces modèles, y compris dans leur configuration de base pour des avis élémentaires sur les TAC, il est essentiel que soient développées des procédures plus efficaces et automatisées, conçues pour contenir les coûts tout en améliorant la précision et la cohérence des estimations d'âge. Cela est d'autant plus crucial que les gestionnaires des pêches continuent à demander des diagnostics plus détaillés, pour toujours plus d'espèces (commerciales ou non), de flottilles, de régions, etc., alors que les ressources des instituts scientifiques en personnel et en moyens financiers ne cessent de diminuer.

Chapitre VI

Estimation de l'âge assistée par ordinateur

H.Troadec, A. Benzinou

L'estimation de l'âge à partir de pièces calcifiées est, avant tout, basée sur un processus répétitif d'interprétation de zones de croissance associant des mécanismes de perception visuelle et des connaissances biologiques. Devant la multiplicité des sources de biais et la subjectivité de certains critères d'interprétation, les sclérochronologues ont cherché à introduire une certaine objectivité à la fois dans l'acquisition des informations de base, essentiellement visuelles, et dans les schémas logiques de leur interprétation. L'apparition dans les années soixante d'ordinateurs couplés à des systèmes micro-densitométriques marqua le début d'une série d'études visant à explorer diverses voies d'objectivation. L'objectif premier de ce chapitre est de présenter les différentes manières d'assister ce processus d'interprétation à l'aide d'un ordinateur.

Force est de constater en préambule que la « machine » humaine excelle dans l'identification des formes et que les résultats des tentatives d'automatisation sont restés bien souvent en deçà des espoirs suscités par les techniques de reconnaissance de formes. Leur application au traitement des pièces calcifiées n'a pas dérogé à la règle et les premières tentatives d'automatisation se sont rapidement heurtées à la complexité du problème. En fait, l'ordinateur a du mal à faire ce qu'un jeune enfant est en mesure de réaliser. La plupart des systèmes d'estimation de l'âge et de la croissance assistée par ordinateur (EACAO) ont en commun d'être essentiellement basés sur des outils de traitement d'images reposant sur des concepts mathématiques de théorie du signal. L'objectif second de ce chapitre est d'amener le lecteur à une meilleure compréhension de ces concepts et surtout d'analyser les effets de leur application à du matériel biologique.

La multiplicité des équipements d'EACAO actuellement utilisés dans les laboratoires spécialisés est le reflet à la fois (1) de la complexité inhérente aux pièces calcifiées (perception de la continuité, modulation du signal, qualité des images, etc.), (2) de la diversité des situations rencontrées (macrostructures, microstructures, travail en routine, espèce, etc.), (3) de la multiplicité des objectifs (confort visuel, automatisation ou aide au comptage, à la prise de mesures ou à l'interprétation) et (4) des solutions techniques disponibles (analyse d'images, intelligence artificielle, réseaux de neurones, formes 2D ou 3D, analyse spectrale). Notre troisième objectif est ainsi de venir en aide au lecteur dans son choix de l'outil adapté à ses besoins.

A. Qu'est-ce qu'un système d'estimation de l'âge et de la croissance assistée par ordinateur (EACAO) ?

Un système d'EACAO idéal serait un ordinateur muni d'un système logiciel et matériel pouvant assurer (1) une assistance à la quantification des images de PC, (2) une assistance au processus d'interprétation des données et (3) une gestion efficace du stockage et de diffusion de ces données. Pour autant, parmi les systèmes d'EACAO disponibles actuellement, on trouve essentiellement des systèmes basés sur un noyau logiciel d'analyse d'images, apportant donc principalement une aide à la quantification des données. Certains d'entre eux présentent des fonctionnalités spécialisées (rétro-calcul, profils courbés, mémorisation des positions des zones de croissance, introduction de contraintes biologiques, etc.) mais pratiquement aucun n'offre une réelle assistance à l'interprétation malgré quelques tentatives clairsemées. C'est pourquoi nous détaillerons essentiellement le traitement des informations visuelles. Un système d'EACAO est composé essentiellement de trois unités (fig. VI.1) :

- une unité d'acquisition d'image (caméra, scanner, tablette numérique, MEB, microsonde, etc.);
- une unité centrale de traitement, de stockage et de visualisation;
- une unité logique qui caractérise le degré d'assistance fourni par le système d'EACAO en apportant une fonctionnalité spécialisée pour l'identification des caractéristiques de base, la morphométrie et, si possible, l'interprétation.

1. Traitement de l'information visuelle

La rapide évolution des technologies numériques rend périlleux l'exercice qui consiste à décrire, avec nombre de détails, la composition d'un système d'analyse d'images. Il y a quelques années nous aurions pu vanter les performances offertes par les cartes de traitement d'images procurant mémoire de trame et fonctions spécialisées temps réel (processeurs image, processeurs morphologiques, etc.) mais l'accroissement des fréquences d'horloge et des capacités de mémoire vive des micro-ordinateurs les a rendus aujourd'hui presque obsolètes. C'est pourquoi nous focaliserons notre présentation sur ce que nous considérons être les composants fondamentaux d'un système d'analyse d'images.

1.1. Unité d'acquisition

1.1.1. Formation de l'image numérique : échantillonnage 2D

D'une simple représentation de phénomènes optiques visibles, l'image est devenue progressivement le support de visualisation de rayonne-

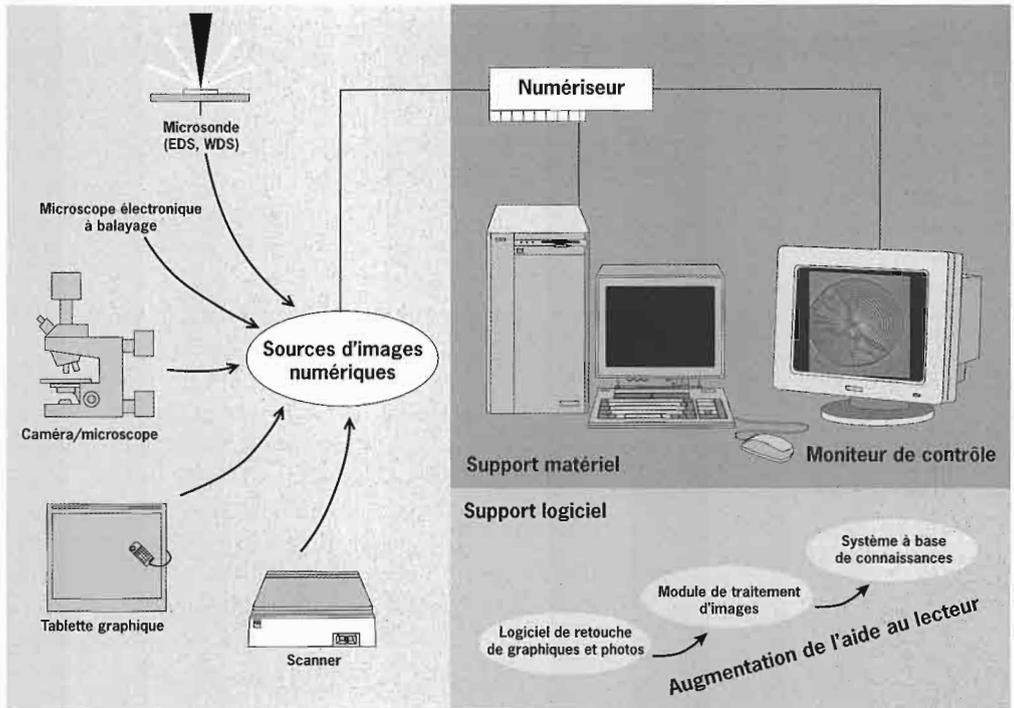


Figure VI.1 - Structure d'un système typique d'EACAO (Estimation de l'âge et de la croissance assistée par ordinateur). Les images numériques peuvent aussi bien provenir d'une caméra classique qu'être des images chimiques générées par des microsondes (e.g. Casselman, 1983). La rapide évolution de la puissance des ordinateurs et des capacités de mémoire permet aujourd'hui de manipuler des images de plus grande taille et d'utiliser des algorithmes plus sophistiqués. Le support logiciel détermine le degré d'assistance fourni au lecteur par des systèmes allant de la simple localisation interactive d'anneaux jusqu'au système d'interprétation entièrement automatisé.

ments provenant du spectre invisible (infrarouge, UV) puis de toutes sortes de quantités physiques mesurées (imagerie radar, microscope électronique à balayage, tomographie, analyse microchimique, etc.). Le terme « numérique » fait quant à lui référence à la nature discrétisée de l'information constituant l'image par opposition à la structure continue des signaux analogiques. Le monde qui nous environne étant tridimensionnel et dynamique, l'image formée sera bien évidemment une vue instantanée d'une projection de la scène observée sur la surface du capteur.

Le capteur conditionne la nature de l'information que va représenter l'image. Pour des informations de type photonique, le capteur est un dispositif sensible à l'énergie lumineuse et se charge de transformer l'image de nature optique en signaux électriques. Les capteurs d'images peuvent alors être une caméra vidéo analogique à tube à vide, bien que les caméras modernes soient basées sur des matrices de composants à semi-conducteurs appelés « capteurs à transfert de charges : Charge-coupled devices » (CCDs). Les éléments d'un capteur CCD sont des photodiodes de quelques microns de diamètre qui réagissent à l'excitation photonique et produisent des charges d'électrons, collectées à

travers les matrices et converties sous forme de tension électrique. Ce processus de « collecte » produit un signal vidéo analogique pour chaque rangée d'éléments photosensibles, ce qui implique que (1) le signal doit encore être échantillonné même si on utilise un capteur numérique et que (2) la résolution horizontale de l'image numérique ne dépend pas directement du nombre de colonnes CCD.

La discrétisation du signal vidéo analogique est assurée au moyen d'un convertisseur analogique-numérique (CAN) suite aux trois étapes suivantes (fig. VI.2) :

- **L'amplification** qui adapte la dynamique du signal analogique à numériser en vue d'avoir des niveaux convenables à l'entrée du dispositif de conversion analogique-numérique. À ce stade, la plupart des numériseurs offrent la possibilité de pouvoir moduler le gain et la composante continue du signal ;
- **L'échantillonnage** qui transforme le signal vidéo continu analogique, provenant de la caméra, en une suite discrète de données. À ce stade, la fréquence d'échantillonnage détermine la résolution spatiale de l'image ;
- **La quantification** qui arrondit les échantillons analogiques en valeurs numériques afin qu'ils puissent être codés en un nombre fini

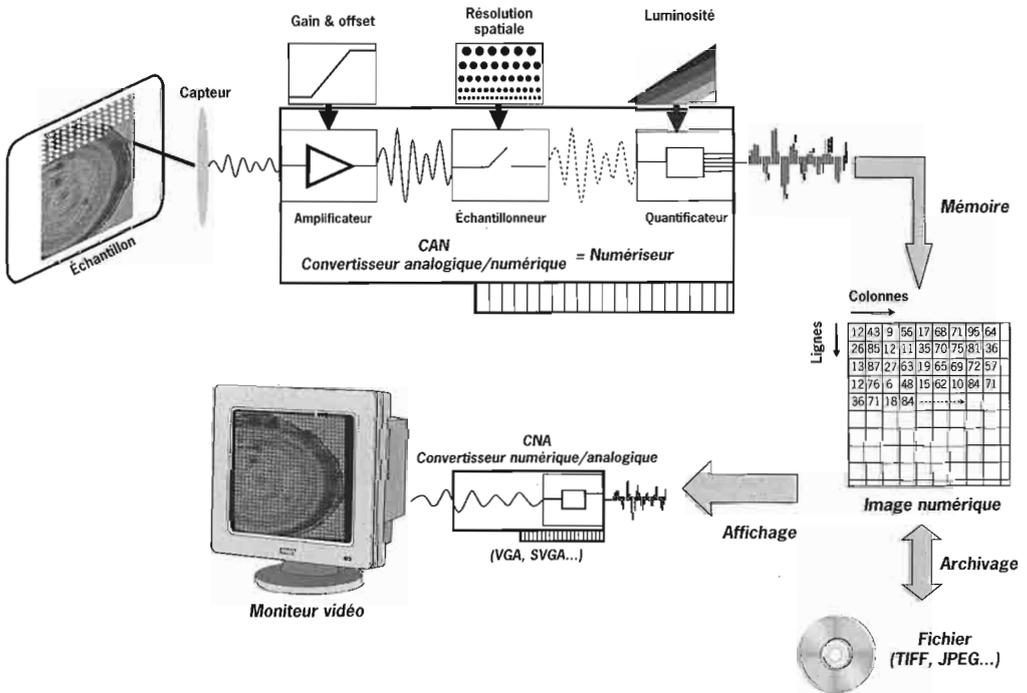


Figure VI.2 - Présentation schématique d'un procédé de numérisation d'image. Le signal électrique produit par le capteur est amplifié, échantillonné et quantifié par le numériseur. Ces étapes de numérisation détermineront les propriétés de la dynamique de l'image numérique résultante, sa résolution spatiale et sa profondeur. L'image est temporairement enregistrée dans la mémoire de l'ordinateur ou dans la mémoire vive (RAM) de la carte de numérisation. Elle peut être alors affichée sur un écran vidéo ou écrite sur le disque dur ou sur un CD-ROM pour le stockage à long terme.

de bits. Ceci détermine la **résolution de brillance** (ou **profondeur de l'image en niveaux de gris**). Le codage de ces mesures sur 8 bits fournit une amplitude de 256 nuances de gris. Le fait que l'œil humain ne puisse en distinguer qu'une soixantaine souligne l'importance des opérations de modification de la dynamique de l'image et de rehaussement du contraste. Avec des capteurs standards, la résolution peut varier de 512^2 pixels à 2048^2 pixels, représentant donc une taille de fichier comprise entre 262 Koctets et 4,2 Moctets. Les effets de différentes résolutions spatiales et de brillance sont présentés dans la figure VI.3.

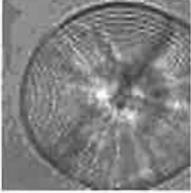
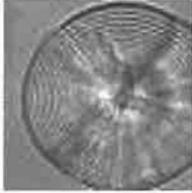
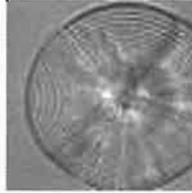
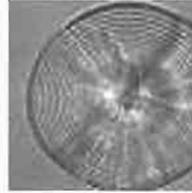
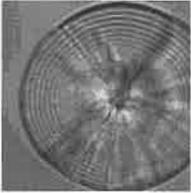
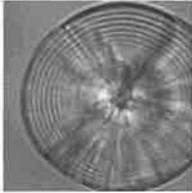
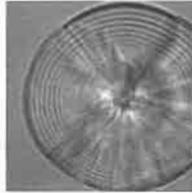
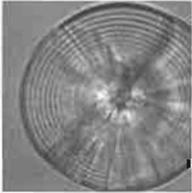
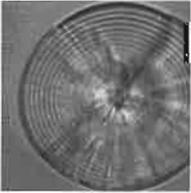
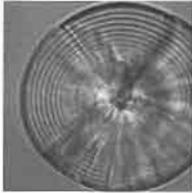
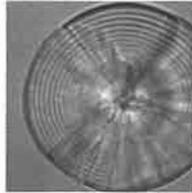
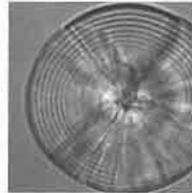
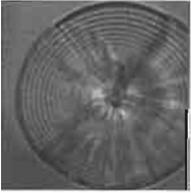
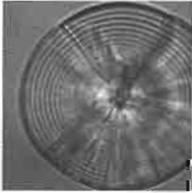
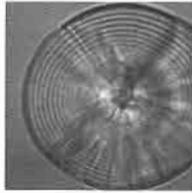
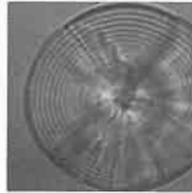
Niveaux de gris Taille de l'image	8 (3 bits)	16 (4 bits)	32 (5 bits)	256 (8 bits)
64 x 64 pixels				
128 x 128 pixels				
256 x 256 pixels				
512 x 512 pixels				

Figure VI.3 - Effets de la variation de la profondeur et de la résolution spatiale sur la qualité d'une image numérique. La résolution de l'image passe de 64^2 à 512^2 pixels et la profondeur des niveaux de gris de 3 à 8 bits.

Les images couleurs, quant à elles, sont formées soit par un seul capteur et avec l'aide de 3 filtres colorés RVB (rouge, vert, bleu), soit à partir de trois capteurs différents comme c'est le cas pour les caméras tri-CCD.

La plupart des numériseurs actuels fournissent des pixels carrés, i.e. des images au format 1:1. Cependant, l'électronique régulant la fréquence d'échantillonnage est susceptible d'une dérive, et c'est la raison pour laquelle les images standards de télévision sont au format vidéo 4:3. Cela signifie que l'échantillonnage le long d'une ligne vidéo sera différent de celui entre les lignes, donnant lieu à des images numériques de pixels rectangulaires. Ignorer ce facteur de déformation géométrique conduirait à introduire des biais de manière systématique lors des mesures. Pour cette raison, la plupart des logiciels scientifiques de traitement d'images permettent d'intégrer des facteurs de correction métrique.

Chaque point (pixel) d'une image I est caractérisé par ses coordonnées spatiales (x,y) et son niveau de gris donné par la valeur $I(x,y)$. Afin d'être récupérée et visualisée, l'image numérique stockée dans la mémoire RAM est retransformée en un signal vidéo continu par le convertisseur numérique-analogique CNA (fig. VI.2).

Il convient de noter que l'échantillonnage au format 4:3 peut être particulièrement pernicieux car, au moment de l'affichage sur l'écran vidéo, le CAN peut apporter une modification géométrique de l'image. Cela peut être facilement vérifié en numérisant un objet circulaire, et en le mesurant horizontalement et verticalement par le calcul simple de la distance euclidienne à partir des coordonnées (x,y) . Si vous notez une différence significative, vous devez alors la prendre en compte dans vos mesures, notamment s'il s'agit de mesures relatives à la caractérisation des formes.

1.1.2. Acquisition d'images de PC

Conformément à l'idée selon laquelle « une bonne image évite de longs traitements », on veillera à utiliser le meilleur matériel disponible ainsi qu'à standardiser et à optimiser les conditions d'éclairage. Les pièces calcifiées résultent d'un processus de calcification par couches concentriques plus ou moins cristallines, orientées dans diverses directions et présentant des contrastes très variables. Les techniques combinées de microscopie en polarisation, d'intégration d'images et les outils de construction de mosaïque peuvent, pour cela, vous aider à obtenir les images dont vous avez besoin.

1.1.2.1. Microscopie en polarisation

D'une manière plus générale, l'éclairage des loupes binoculaires et, dans une moindre mesure, celui des microscopes seront soumis à des perturbations soit ambiantes sous la forme de reflets, soit générées par le matériel observé lui-même (biréfringence de certains cristaux). De par leur nature, ces mêmes éclairages peuvent également générer une multitude de rayons incidents (cas des éclairages à fond noir). Dans tous ces cas, l'utilisation d'un filtre polarisant permettra de sélectionner certaines

sources et, en particulier, dans le cas d'éclairage transmis à fond noir, d'éliminer totalement les imperfections du fond (Macy, 1995; Welleman & Storbeck, 1995; Troadec *et al.*, 2000) (fig. VI.4).

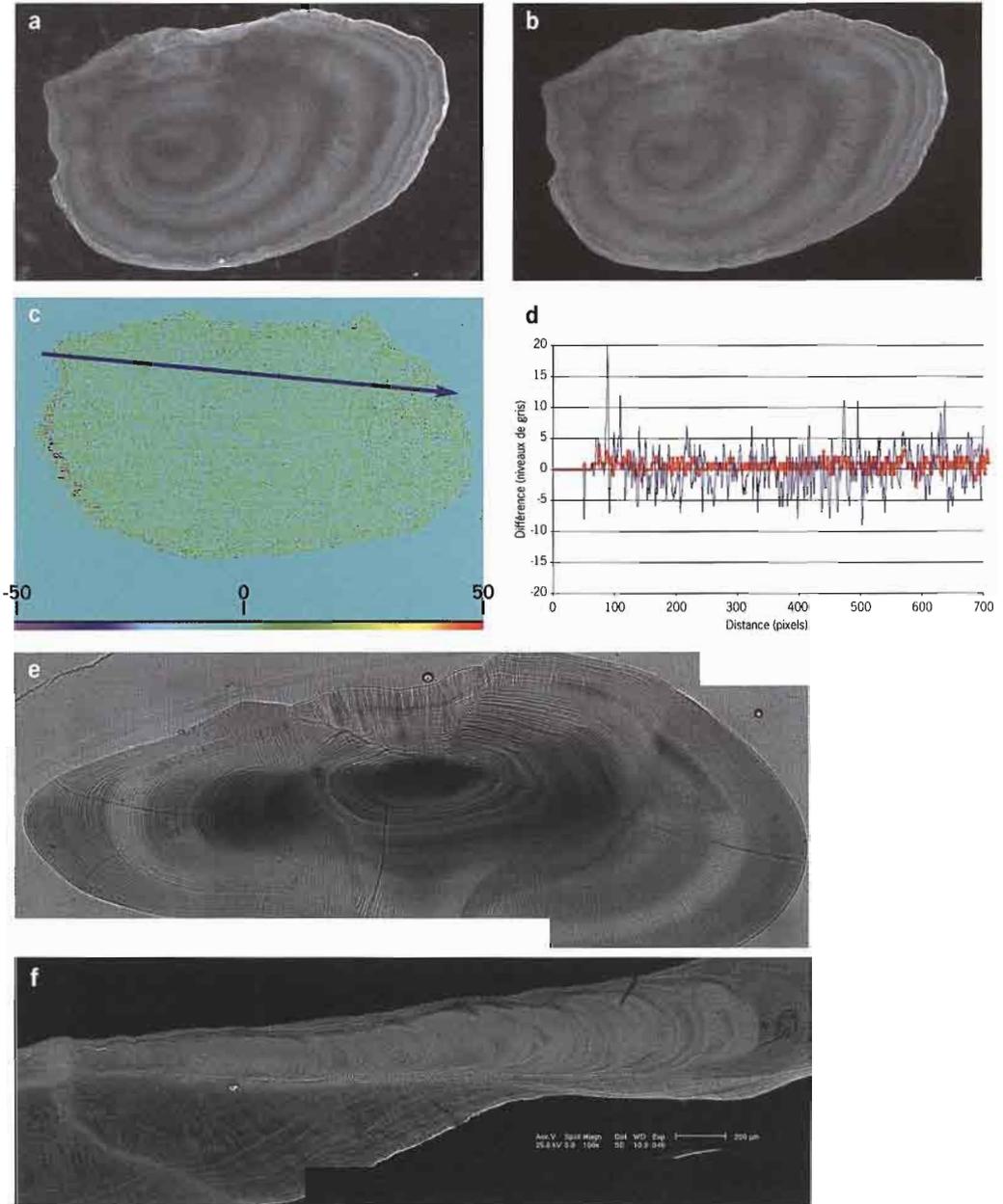


Figure VI.4 - Numérisation d'image de PC : image d'otolithe de plie (*Pleuronectes platessa*) (a) en lumière normale et (b) en lumière polarisée. Effet du moyennage d'images sur la distribution du bruit : (c) représentation en fausse couleur de la différence entre deux images consécutives saisies avec une caméra standard CCR. Un profil d'intensité (d) montre une différence d'amplitude significative de la valeur du pixel pour une numérisation simple (ligne bleue) par rapport au moyennage de plusieurs images successives (ligne rouge, N=10). Construction d'une mosaïque d'images de PC permettant le traitement de l'ensemble de la PC en haute résolution sur (e) un otolithe de merlan (*Merlangius merlangus*) (4 images), (f) une image au MEB d'un otolithe d'hoplostète (*Hoplostethus atlanticus*) (3 images).

1.1.2.2. Moyennage d'images

Le bruit généré lors de l'étape d'acquisition (défauts d'éclairage, bruit électronique, etc.) peut être perçu comme une variabilité de la réponse d'un simple pixel sous éclairage constant. La figure VI.4c montre une fausse image couleur représentant la différence entre deux prises de vue consécutives obtenues par une caméra standard CCIR. Le profil d'intensité tiré le long de cette image (fig. VI.4d) montre que la valeur d'un pixel peut varier de plus ou moins 50 niveaux de gris pour une même scène. Pour réduire les effets de cette dispersion, plusieurs prises de vue successives peuvent être moyennées afin d'éliminer ce bruit aléatoire. Quand on travaille avec des images microscopiques statiques, comme dans notre cas, le moyennage de trames successives peut s'avérer très efficace. Il peut être réalisé par logiciel ou même par traitement « câblé » sur certaines cartes (ex : Matrox Meteor, Scion AG-5, etc.). De nos jours la qualité du matériel (caméra, numériseur, etc.) améliore constamment le rapport signal/bruit. Cependant, le profil d'intensité représentant la différence entre images moyennées (fig. VI.4d) montre que la variabilité d'acquisition peut être considérablement réduite par simple moyennage de prises consécutives. Par ailleurs, le réglage du paramètre « temps d'exposition » disponible sur certaines caméras numériques est une autre manière de moyenner cette variabilité.

1.1.2.3. Mosaïque d'images

Le rapport entre la dimension des zones de croissance et celle de la pièce calcifiée ne permet que très rarement de visualiser la PC dans sa totalité au travers d'un oculaire de microscope. De plus, lorsque la résolution le permet, l'adaptation du cadrage à chaque échantillon à l'aide d'un zoom est en pratique très lourde du fait de la nécessité de disposer d'une calibration pour chaque image. On remarquera également que certains traitements, tels que les méthodes de rétro-calcul de type proportionnel, exigent de disposer de l'ensemble de la pièce calcifiée. L'acquisition d'image champ par champ est alors souvent inévitable et pose le problème de mise en correspondance des informations disponibles dans chacun d'eux.

Une solution satisfaisante consiste à construire une vue panoramique de la pièce calcifiée au moyen d'une mosaïque d'images (fig. VI.4e, f). Cette construction peut être réalisée soit manuellement (Macy, 1995), soit automatiquement comme le proposent certains logiciels actuels, moyennant un recouvrement entre deux champs consécutifs. Ces outils sont maintenant relativement fiables pour peu que l'on veuille à ne pas provoquer des changements brusques de mise au point ou d'éclairage, ce qui peut être difficile sur certaines pièces calcifiées dont les zones de croissance ne sont pas visibles dans un même plan focal et pour lesquelles les zones marginales sont plus claires. Ces images de mosaïque peuvent représenter plusieurs dizaines de Mottets. Ainsi, leur manipulation nécessitera de disposer d'une mémoire RAM en conséquence et leur stockage l'emploi de formats procurant des taux de compression d'image importants (e.g. JPEG).

1.2. Traitement d'images numériques

L'image que l'on voit s'afficher instantanément sur l'écran est une représentation complète ou partielle d'une pièce calcifiée (1) résultant d'un processus de calcification induisant une alternance de zones protéiques et hypercalcifiées, (2) observée en général sur une lame mince obtenue par un processus de découpe, rodage et polissage (excepté les écailles), (3) numérisée au travers d'une série de processus optiques, électroniques et numériques qui sont chacun générateurs de différents types de bruit. Comme on peut le noter, les sources de dégradation de l'information pertinente sont nombreuses et la diversité du matériel ne permet pas toujours d'extrapoler les solutions mises au point sur une espèce et un type de préparation donnés. Ainsi, Welleman & Storbeck (1995) considèrent que le rehaussement du contraste de l'image n'est pas nécessaire alors que Macy (1995) utilise l'égalisation d'histogramme et itère deux fois un filtre de détection de bord directionnel. Il est vrai que les premiers travaillent sur des otolithes de plie (*Pleuronectes platessa*), otolithes présentant des macrostructures très contrastées et observés *in toto* et le deuxième sur des statolithes d'encornet (*Loligo pealei*) avec des microstructures peu contrastées et fortement bruitées par du matériel cristallin radiaire.

En général, une image numérique ne sera pas exploitée sous sa forme brute mais nécessitera au préalable des traitements de rehaussement du contraste et de filtrage de certaines composantes considérées comme du bruit. L'utilisation d'algorithmes de filtrage appropriés peut considérablement améliorer la « lisibilité » d'une PC mais toute utilisation non conforme, comme par exemple un mauvais paramétrage de l'opérateur employé, l'ignorance de ses propriétés intrinsèques ou encore un processus d'itération abusif, peut avoir des effets non négligeables sur les résultats obtenus, allant du simple déplacement d'une marque de croissance à l'introduction de marques supplémentaires. Nombre de logiciels actuels de retouche d'images présentent des algorithmes de rehaussement de contraste qui produisent des images flatteuses pour l'œil mais dont les possibilités de paramétrage de la résolution spatiale restent limitées. Notons aussi que l'application de certains filtres à l'image peut inévitablement biaiser les mesures quantitatives. Cette partie a pour objectif de présenter uniquement les algorithmes à effets spatiaux clairement énoncés et réputés contrôlables.

La mise au point d'une chaîne de traitement efficace nécessite non seulement de connaître les principes de base des filtres utilisés, mais aussi de savoir faire intervenir le bon filtre au bon endroit dans la chaîne de traitement. Une chaîne classique de traitement d'images numériques va comporter trois étapes fondamentales (fig. VI.5) :

- le prétraitement (optimisation de la dynamique, rehaussement du contraste, réduction du bruit, détection de bords);
- l'analyse (mesure d'objets et traitement de l'information symbolique);
- l'interprétation (compréhension de la scène).

Pour de plus amples détails, le lecteur pourra se reporter à la littérature (González & Wintz, 1987; Coster & Chermant, 1989; Haralick & Shapiro, 1992; Cocquerez & Philipp, 1995; Davies, 2000).

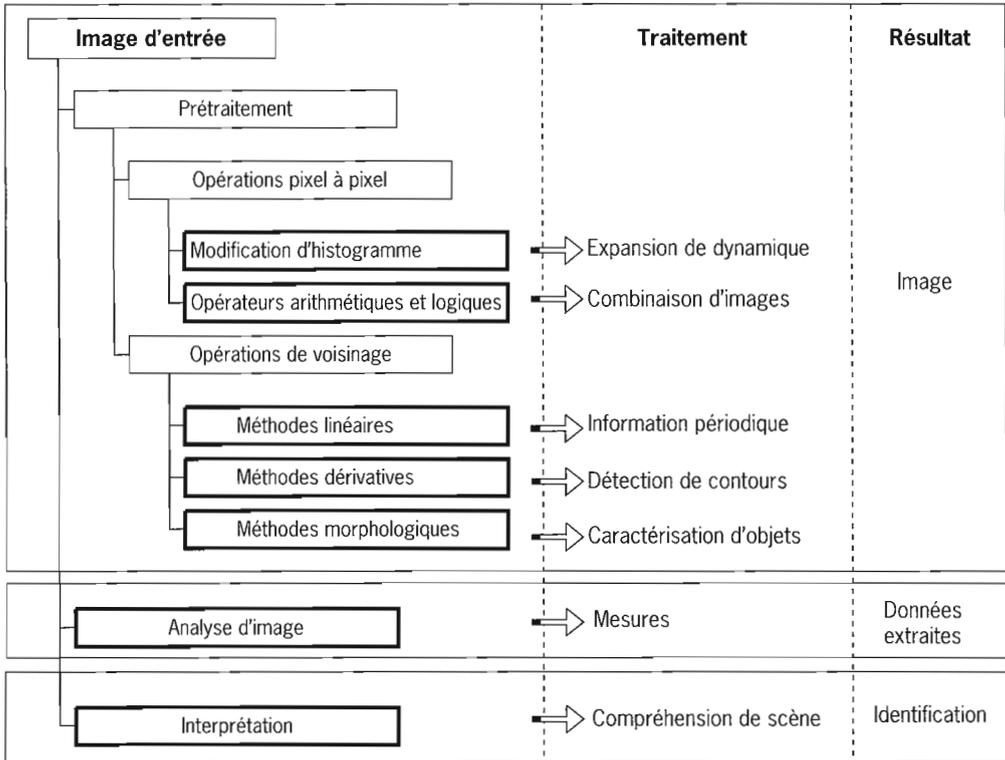


Figure VI.5
Classification des principales techniques de traitement d'images, présentées en structure d'arborescence avec les résultats les plus importants produits par chaque classe.

1.2.1. Rehaussement du contraste avec des opérations point à point

L'une des erreurs les plus communément commises par les nouveaux utilisateurs de systèmes de traitement d'images est de « ne croire que ce qu'ils voient ». Comme cela a été évoqué précédemment (voir chap. VI.A.1.1.1), les capacités humaines de discernement des nuances de gris sont bien inférieures aux capacités de rendu des capteurs. Ainsi, selon les conditions d'acquisition, une image pourra présenter toute l'information pertinente dans une plage dynamique réduite mais imperceptible à l'œil de l'observateur. L'opérateur gradient en donne un parfait exemple (voir chap. VI.A.1.2.3); en calculant son amplitude, nous obtenons une image avec des valeurs positives et négatives de faible amplitude, puisqu'il s'agit d'une dérivée du 1^{er} ordre. Si on n'améliore pas la dynamique de cette image, il est probable que l'on ne notera jamais qu'elle contient en fait toute l'information disponible concernant les contours d'objets. La concentration de l'information sur peu de niveaux de gris engendrera, d'une part :

- une lisibilité moins agréable pour l'observateur, du fait d'un manque de contraste et, d'autre part ;
- une imprécision des calculs, du fait des erreurs d'arrondi.

Une image bien contrastée est une image dont la distribution des niveaux de gris, appelée aussi histogramme, s'étire sur l'ensemble de la dynamique disponible. On modifiera cette distribution en transformant l'histogramme au moyen de translations, d'étirements et de compressions locaux de l'histogramme, obtenus à l'aide d'une fonction d'anamorphose linéaire ou non. La figure VI.6 illustre diverses modifications d'histogrammes et leurs impacts sur la lisibilité des images.

Le résultat visé n'est pas toujours un équilibrage de la dynamique mais peut être aussi la mise en évidence de certaines caractéristiques de l'image ou l'extraction de certaines zones d'intérêt particulier. On pourra réaliser ainsi des fonctions de transformation d'histogramme opérant des seuillages simples ou des transformations plus complexes telles que la normalisation ou l'égalisation. Il est cependant important de remarquer que le choix du type de transformation dépend à la fois du type d'image et de l'objectif poursuivi, esthétique ou fonctionnel, et que certaines anamorphoses, faisant croître le contraste des détails, peuvent avoir le défaut majeur d'amplifier aussi le bruit.

Les images peuvent également être combinées pixel par pixel par des opérations arithmétiques (+, -, ·, ÷, min, max) ou logiques (AND, OR, XOR, NOT). Grâce à ces opérateurs, on peut par exemple réaliser l'image de la moyenne, superposer deux images, extraire une forme du fond de l'image ou même détecter le mouvement d'objets d'une image à l'autre. Ces opérations dites point à point sont fréquemment utilisées lors du filtrage spatial afin de soustraire certaines composantes fréquentielles de l'image ou dans des filtres morphologiques dans le but de réaliser des tests logiques.

1.2.2. Réduction du bruit avec des opérations de voisinage

Opérant pixel par pixel, quels que soient la localisation et le voisinage, les opérations point à point ne permettent pas la modification spatiale des détails de l'image. Or, comparer une valeur de pixel avec ses valeurs voisines fournit une information sur les tendances de brillance locale. Les opérations de voisinage se basent, quant à elles, sur des transformations prenant en compte l'environnement de chaque pixel. Les techniques les plus couramment utilisées pour cela sont :

- le filtrage linéaire, fondé sur l'analyse fréquentielle, agissant par modification de la transformée de Fourier de l'image ou par l'utilisation d'opérateurs de convolution ;
- le filtrage non linéaire dont les fonctions de traitement d'images usuelles sont basées sur les transformations morphologiques ou les statistiques d'ordre (filtre médian).

Ces techniques, extrêmement nombreuses et variées, constituent l'essentiel des algorithmes proposés par les logiciels de traitement d'images ; leur description nous a donc semblé indispensable. La présentation qui suit ne met en lumière que quelques techniques mais devrait constituer une introduction utile à leur utilisation.

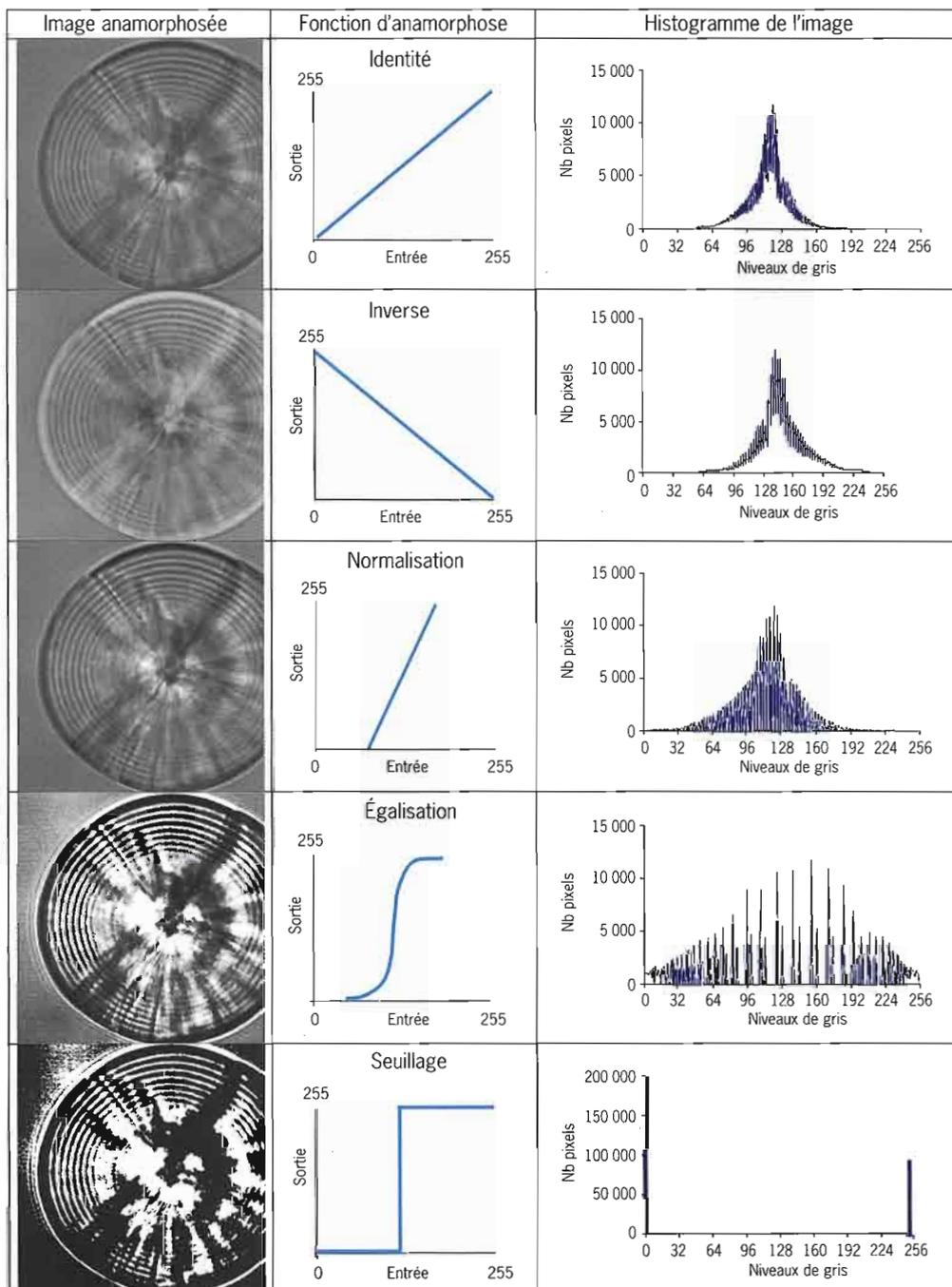


Figure VI.6 - Exemples d'amélioration du contraste d'une image par transformation d'histogramme, c'est-à-dire sur une base de pixel par pixel. Chaque colonne présente respectivement l'image anamorphosée, la fonction d'anamorphose et l'histogramme résultant de l'image anamorphosée. Le calcul de la valeur anamorphosée d'un pixel se fait par projection de l'axe «entrée» sur l'axe «sortie» via la fonction d'anamorphose qui agit comme une fonction de manipulation de table de correspondance.

1.2.2.1. Profil d'image de PC : un signal multi-composante

Lorsque l'on utilise des opérations de voisinage, il est fondamental de garder à l'esprit la manière dont les images numériques sont traitées, dans le domaine spatial ou fréquentiel, et que, dans un cas comme dans l'autre, il s'agit bien de représentations du même phénomène. Le passage de la représentation spatiale à la représentation fréquentielle s'effectue au moyen de la transformation de Fourier. Elle consiste à convertir l'image en une somme pondérée de sinus et cosinus, des composantes simples périodiques mono-fréquentielles qui représentent le contenu fréquentiel de l'image (ou son spectre). Chaque valeur de pixel du spectre correspond au poids de chaque composante fréquentielle sur l'ensemble du signal. Cette transformation, bien connue depuis sa découverte par Jean Baptiste Joseph Fourier en 1807, doit son succès en matière de traitement numérique du signal au développement en 1965 d'un algorithme de calcul rapide appelé FFT (fast Fourier transform). Notons que les images compressées au format JPEG, le sont au moyen d'une variante de la FFT, nommée DCT (transformation de cosinus discrète), utilisant uniquement les fonctions de base de type cosinus. Cette compression JPEG consistera essentiellement à éliminer les hautes fréquences, considérant qu'elles ne sont pas perçues par l'œil humain. De plus, l'élimination de ces hautes fréquences peut affecter l'analyse ultérieure de l'image par l'ordinateur.

Avec une représentation spatiale, l'unité de base étant le pixel, il est possible de venir modifier l'image localement. Inversement, en utilisant une représentation fréquentielle, l'unité de base étant la fréquence, un filtre altérera l'ensemble de l'image. Le choix d'une représentation plutôt qu'une autre dépend de la nature de l'information recherchée (structurale ou fréquentielle) mais l'efficacité d'un filtre, développé pour et opérant dans un domaine de représentation spécifique, peut être évaluée dans l'autre domaine de représentation.

L'alternance des zones claires et sombres sur une image de PC peut être considérée comme un ensemble d'anneaux concentriques placés côte à côte (ou juxtaposés) ou une forme oscillante centrée. Dans une représentation fréquentielle, un profil le long d'une image de PC peut être modélisé sous la forme d'un signal monodimensionnel multi-composante ; c'est-à-dire un signal intégrant plusieurs composantes fréquentielles de base, comme par exemple la composante périodique, les tendances de brillance et de contraste ou le bruit généré par le processus d'acquisition. Dans le profil d'image d'otolithe de plie présenté dans la figure VI.7, on peut voir que le signal présente schématiquement :

- une composante basse fréquence correspondant à l'évolution spatiale de la luminance moyenne de la PC ;
- une composante haute fréquence correspondant au bruit électronique et à la texture fine de la PC ;
- une composante « anneau » correspondant à la périodicité temporelle des zones de croissance observées ;
- une composante de croissance correspondant à la modulation dans le temps de la largeur des zones de croissance.

Globalement, on retrouve, de façon plus ou moins claire, chacune de ces composantes dans tout signal de PC. Négliger l'une de ces composantes, quand elle est fortement représentée, réduit sensiblement l'efficacité de détection. Selon nos objectifs et le matériel biologique disponible, nous cherchons à réduire le bruit en supprimant les composantes hautes fréquences de l'image, à homogénéiser la luminosité de l'image en atténuant les basses fréquences ou à améliorer le contraste de la PC en rehaussant la composante périodique relative aux anneaux de croissance.

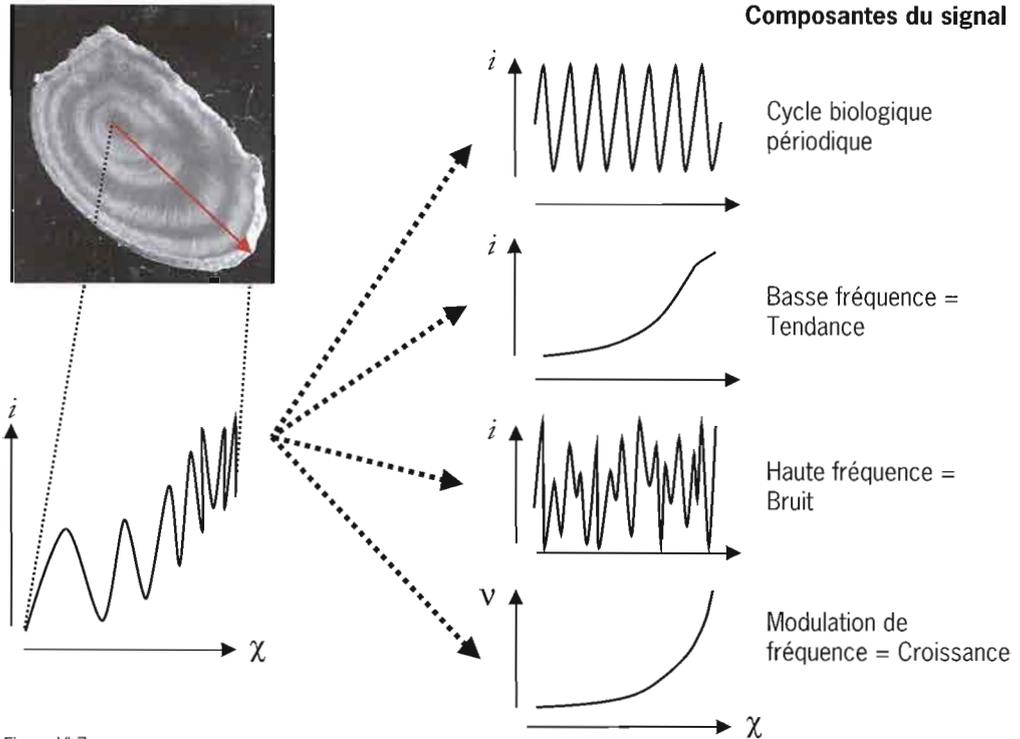


Figure VI.7
Modélisation d'un signal de PC : décomposition du profil d'une image d'otolithe de plie (*Pleuronectes platessa*) en composantes principales du signal. Le symbole i se rapporte à la valeur d'intensité (niveau de gris) et v à la fréquence.

1.2.2.2. Convolution spatiale : de la moyenne mobile au filtrage gaussien

Le filtrage spectral est basé sur l'opération de convolution d'une image par une fenêtre de coefficients appelée noyau de convolution. Il s'agit de déplacer ce noyau à travers l'image et de recalculer la valeur de chaque pixel comme la somme pondérée des pixels dans un voisinage donné par la taille de ce même noyau (fig. VI.8). Ainsi, selon la distribution de ces coefficients, on pourra choisir de sélectionner dans l'image les transitions lentes de niveaux de gris, qui correspondent à des fréquences basses, en utilisant un ensemble de coefficients passe-bas ou, au contraire, de sélectionner les transitions rapides correspondant aux fréquences hautes et donc de réaliser un filtre passe-haut.

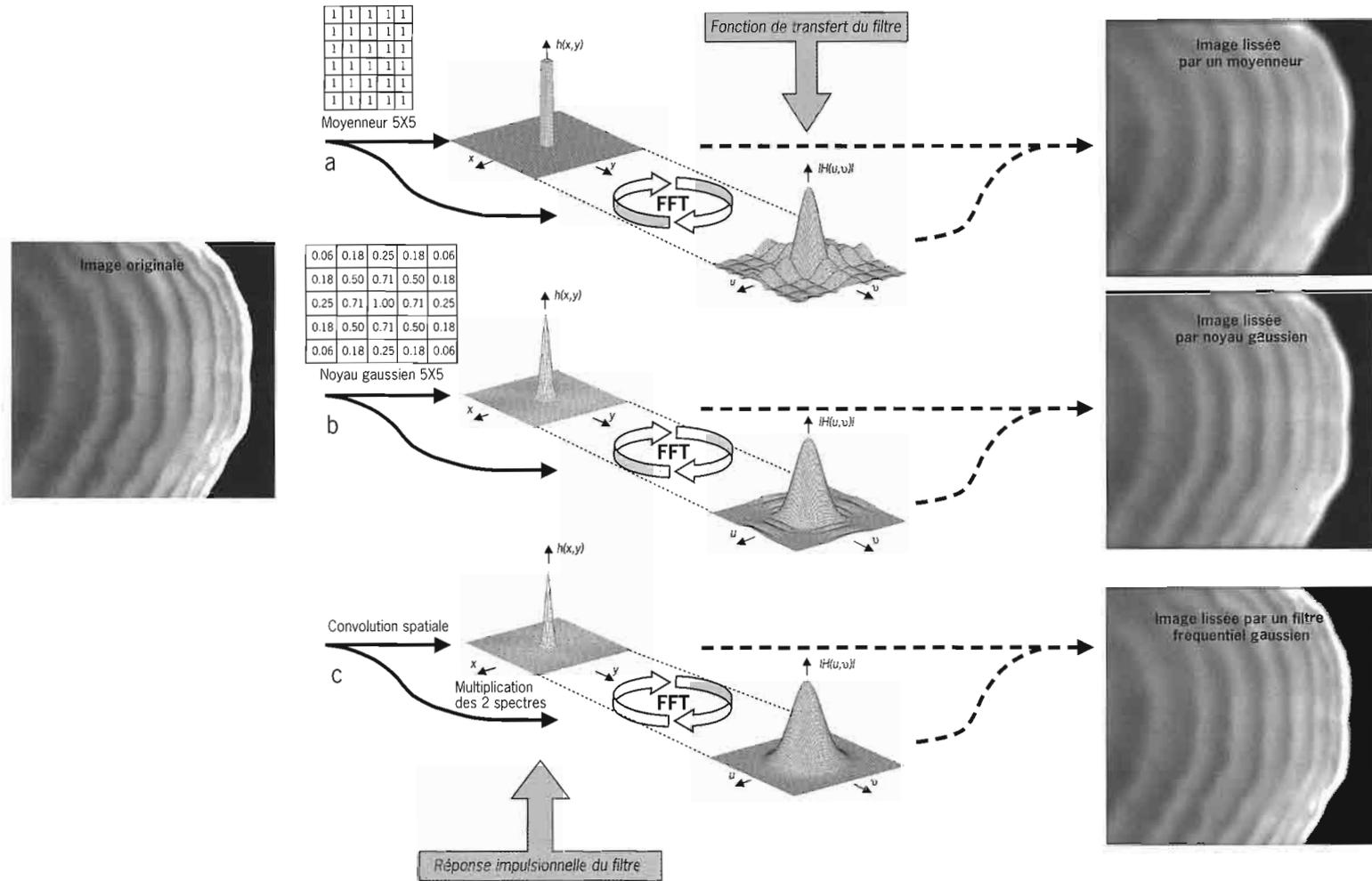


Figure VI.8 - Filtrés linéaires : filtres de lissage conçus à partir d'un noyau de convolution et à partir de fonctions de transfert. a) Le filtre moyeneur est un bon filtre de lissage mais, dans le domaine fréquentiel, il affiche des lobes qui le rendent peu sélectif vis-à-vis des fréquences, ce qui entraîne un flou des contours des petites stries. b) Le filtre gaussien produit de meilleurs résultats : un noyau gaussien est difficile à paramétrer et est une fonction gaussienne tronquée. c) Une version de ce filtre gaussien conçue pour être appliquée dans le domaine fréquentiel produira des résultats plus précis et plus sélectifs.

Pour mieux comprendre ce principe, observons comment opère une moyenne mobile. Cette opération de lissage, bien connue, consiste à remplacer la valeur d'un pixel par l'intensité moyenne sur un voisinage donné. L'efficacité d'un filtrage de ce type, c'est-à-dire l'augmentation du rapport signal sur bruit, est fortement proportionnelle à la taille du noyau de convolution utilisé. Toutefois, plus la taille de ce noyau augmente et plus les transitions associées aux frontières entre zones de différentes intensités s'élargissent. Ceci a tendance à délocaliser les contours dans l'image qui devient, par conséquent, un peu plus floue (fig. VI.8a). Une meilleure préservation de la localisation de ces contours implique nécessairement un noyau de petite taille, mais l'image sera très peu lissée. Dès lors, ces considérations nous mettent face à deux propriétés antagonistes du filtre, c'est-à-dire son efficacité dans le domaine spatial et dans le domaine fréquentiel. La réponse en fréquence du filtre moyenneur représentée dans la figure VI.8a montre clairement que ce dernier ne permet pas de séparer une bande de fréquences d'une autre. En fait, la moyenne mobile est un excellent filtre de lissage mais, en même temps, elle est un filtre passe-bas relativement médiocre, dans le sens où l'atténuation du bruit implique simultanément une perte de précision dans la localisation des objets. Il faut donc trouver un compromis ; c'est effectivement possible en modifiant la forme du filtre : ce sera le filtre gaussien.

La modification des coefficients du noyau permet d'équilibrer l'influence de certains pixels sur la moyenne globale et d'être ainsi plus sélectif dans le choix des composantes fréquentielles. Au lieu d'avoir une réponse impulsionnelle en forme de porte (cas du moyenneur), cette réponse est en forme de cloche avec le filtre gaussien. Ce dernier réalise le meilleur compromis entre le rapport signal sur bruit et l'erreur de localisation. Les fondements théoriques de cet outil fréquemment utilisé sont largement traités dans la littérature scientifique depuis les travaux de Marr basés sur l'étude du système visuel humain (Marr & Hildreth, 1980 ; Marr, 1982).

1.2.2.3. Filtrage spectral : la transformée de Fourier

Le filtrage spectral est fondé sur la modification du signal dans le domaine fréquentiel. La représentation fréquentielle d'un signal spatial est obtenue en employant la transformée de Fourier. Comme nous l'avons vu précédemment, la convolution spatiale opère à la fois dans le domaine spatial et fréquentiel. Parmi les différentes raisons qui justifient l'emploi du filtrage spectral, citons que :

- il s'avère plus efficace lorsque le problème original peut être exprimé en termes de fréquences ;
- la convolution de deux signaux se simplifie en un produit de leurs transformées de Fourier, ce qui permet d'accélérer considérablement le traitement de la convolution ;

- il permet de développer des filtres relativement plus efficaces, avec un support plus large, diminuant ainsi les effets de troncation imposée dans le domaine spatial par l'approximation d'une forme de filtre sur un noyau réduit.

Comment concevoir un filtre dans le domaine des fréquences ? La première approche consiste à appliquer une fonction porte bidimensionnelle à la transformée de Fourier de l'image. Cette manière brutale de limiter le nombre de coefficients de la transformée de Fourier engendre des oscillations et des dépassements dans le domaine spatial au niveau des discontinuités de l'image (contours et points anguleux), phénomène connu sous le nom d'« effet de Gibbs ». Là encore, dans le domaine fréquentiel, nous sommes confrontés au problème classique de la recherche d'un compromis sur la localisation en fréquence et la localisation en espace. Il peut être trouvé en modifiant la forme du filtre (voir figure VI.8) ou en utilisant une implémentation récursive des filtres analogues, implémentation qui permet d'éviter l'effet de Gibbs en simulant un support infini.

1.2.2.4. Filtrage linéaire des images de PC

L'apparition d'une composante de tendance dans l'image d'une pièce calcifiée (voir chap. VI.A.1.2.2.1), se traduisant par une évolution spatiale de la luminance moyenne, peut avoir pour origine de manière non exclusive :

- un éclairage non homogène ;
- une variabilité spatiale des propriétés optiques du matériel déposé (resserrement des zones de croissance avec l'âge rapprochant les zones translucides) ;
- une variabilité de l'épaisseur de l'échantillon.

Ce phénomène se manifeste souvent par un éclaircissement de la pièce calcifiée vers le bord. Ceci signifie que les caractéristiques de luminance d'une zone de croissance, translucide ou opaque, ne seront pas constantes spatialement. On imagine très bien la difficulté à appliquer des techniques de seuillage simple à des images de ce type puisque aucune valeur ne pourra séparer convenablement les différentes zones de croissance. Les techniques classiques de filtrage linéaire présupposent une stationnarité du signal, c'est-à-dire que sa moyenne et son écart type soient spatialement constants. De même, l'efficacité de filtres réputés adaptatifs, c'est-à-dire robustes à ce genre de phénomène, sera néanmoins accrue par une élimination ou du moins par une atténuation de cette tendance. Pour cela, on utilisera des filtres de type « passe-bas » afin de récupérer la composante basse fréquence et de l'éliminer de l'image d'origine. Ce raisonnement pourra être appliqué au moyen d'un filtre linéaire gaussien, présentant un bon compromis entre localisation spatiale et localisation fréquentielle (fig. VI.9), ou d'un filtre morphologique de type « ouverture » (fig. VI.12).

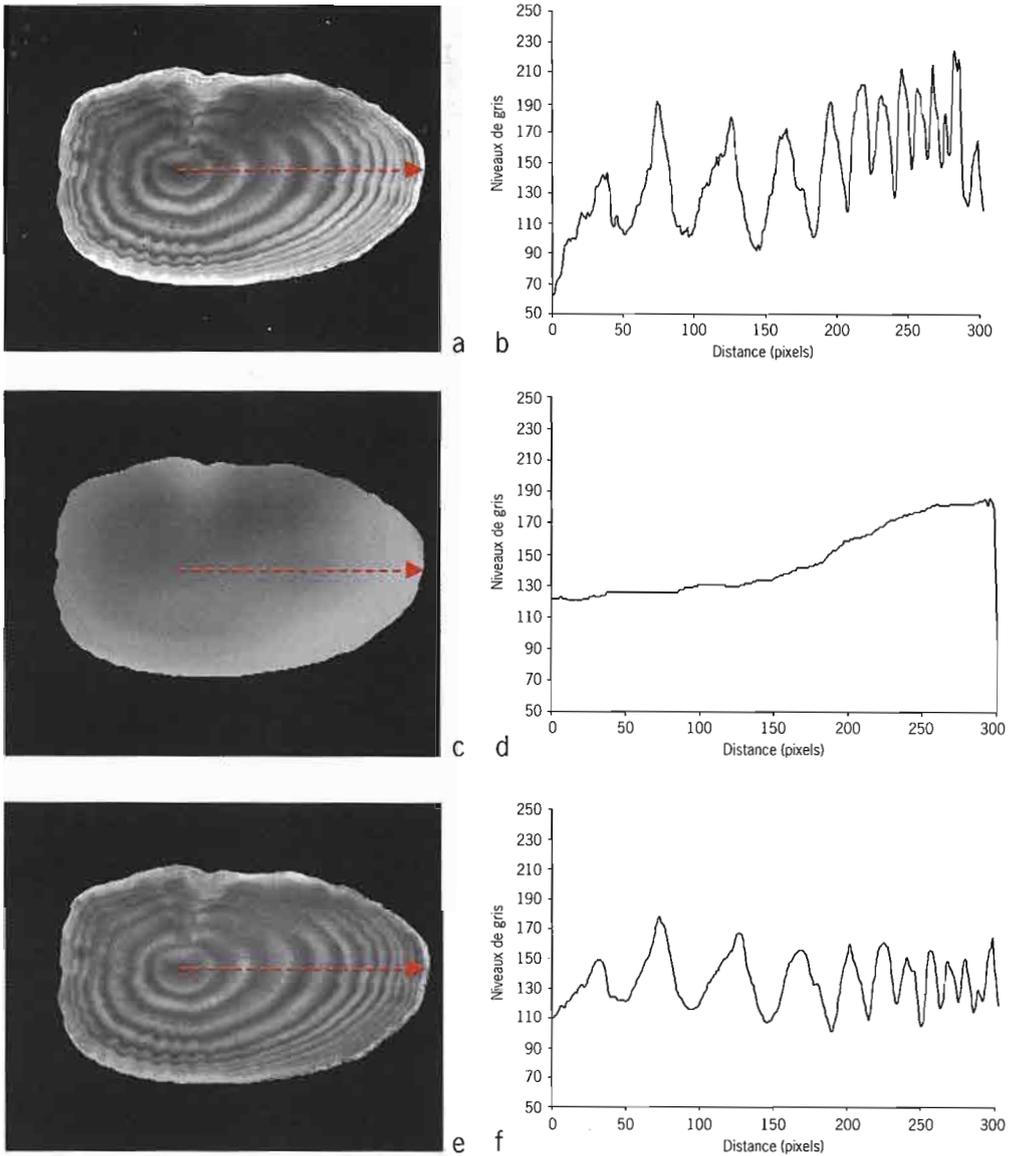
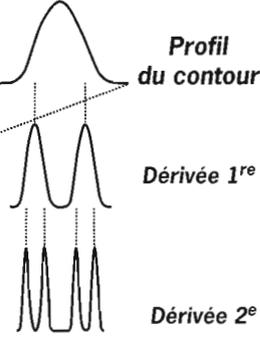
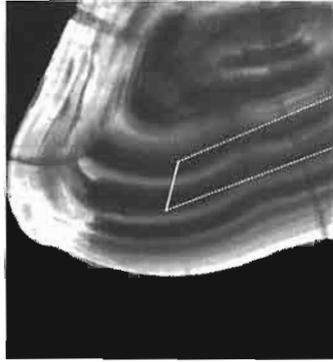


Figure VI.9
Élimination de la tendance de luminance sur une image de PC et profil associé : a-b) image brute d'otolithe de plie (*Pleuronectes platessa*), c-d) image de la tendance estimée, e-f) image sans tendance. Un tel traitement facilite la détection des marques de croissance.

1.2.3. Détection de contours par opérations dérivatives

Envisageons maintenant l'image, non plus comme une somme de composantes fréquentielles mais comme un relief dont les niveaux de gris représenteront l'altitude. L'image est alors constituée d'une succession de collines et de vallées dont les pentes sont plus ou moins abruptes. Un objet fortement contrasté présentera sur son contour une forte pente de niveaux de gris alors que, au contraire, une faible pente caractérisera une zone de luminance homogène. La détection de discontinuités locales au moyen de calculs de pentes par des opérateurs dérivatifs permettra ainsi la localisation des bords des objets (fig. VI.10).

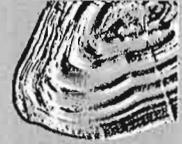


Gradient

$$\text{Gradient Sud} = \nabla_y = I(x,y) * \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \end{bmatrix} =$$

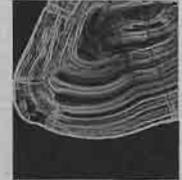


$$\text{Gradient Est} = \nabla_x = I(x,y) * \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 1 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} =$$



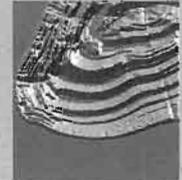
Amplitude du gradient

$$Gm(x,y) = [\nabla_x^2(x,y) + \nabla_y^2(x,y)]^{\frac{1}{2}} =$$



Orientation du gradient

$$\Theta(x,y) = \arctan(\nabla_y(x,y) / \nabla_x(x,y)) =$$



Laplacien

$$= I(x,y) * \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & -8 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \end{bmatrix} \text{ Prewitt}$$

Laplacien d'une gaussienne (LoG)

$$= \Delta G(x,y) * I(x,y)$$

* est l'opérateur de convolution

Figure VI.10 - Détection de bords par opérateurs dérivatifs : traitement d'une section d'otolithe de lieu jaune (*Pollachius pollachius*) par différents opérateurs dérivatifs du 1^{er} et du 2^e ordre (logiciel Visilog, Noesis).

Dans le cas monodimensionnel, le point de pente maximale d'une transition correspond au maximum de sa dérivée première, c'est-à-dire son gradient. Le système de perception visuelle humain applique, lui, un rehaussement de type dérivée seconde ou laplacien.

Le gradient en 2D peut être approché au moyen des opérateurs de convolution de Robert, Prewitt ou Sobel présentés dans la figure VI.10. Cependant, l'utilisation de masques de petite taille va rendre difficile la distinction entre des variations locales correspondant à des bords et celles correspondant à du bruit. L'augmentation de la fenêtre de calcul permet d'obtenir un opérateur plus robuste au bruit, robustesse obtenue aux dépens de la précision. En fait, tous les opérateurs dérivatifs opèrent un lissage et imposent encore une fois la contrainte d'un compromis entre une bonne localisation de bords bruitée et une mauvaise localisation sans bruit. Le meilleur compromis sera obtenu par l'opérateur de Marr & Hildreth (1980), le « laplacien d'une gaussienne », permettant d'associer au laplacien les avantages du filtre gaussien. Dans le même ordre d'idée, le détecteur de contours de Canny-Derichie est un algorithme récursif basé sur la détermination du gradient. Pour minimiser les effets du bruit, cet opérateur procède à une opération de lissage de l'image avant de calculer le gradient. Un paramètre d'échelle permet de jouer sur la taille du filtre et donc de régler l'intensité du lissage. Si sa valeur est grande, le bruit sera réduit davantage mais les bords seront moins abrupts, seuls les plus significatifs demeureront. Il importe alors de choisir le bon coefficient afin de diminuer le bruit de manière suffisante sans pour autant altérer la position des contours.

Pour rehausser une image de PC, l'une des méthodes est de transformer son histogramme par anamorphose. Comme nous l'avons mentionné au paragraphe 1.2.1, il existe différentes façons de le faire, bien que l'étirement linéaire (ou normalisation) et l'égalisation soient les techniques le plus fréquemment utilisées. Cette dernière est vraisemblablement une des plus efficaces puisqu'elle tente de répartir équitablement les niveaux de gris sur toute la plage disponible, bien qu'elle ait tendance à amplifier le bruit. Une autre méthode plus performante consiste à utiliser des algorithmes d'accentuation des bords des objets constituant l'image. En fait, les images floues sont caractérisées par un faible contraste dû plus particulièrement à des transitions de bord adoucies. L'opération inverse rehausse le contraste en diminuant l'étendue des transitions. Comme le flou provient en grande partie d'une opération de moyennage ou d'intégration, l'opération inverse utilisera un opérateur calculant la dérivée. Le rehaussement d'une image $I(x, y)$ s'obtient à l'aide de (fig. VI.11) :

$$(VI.1) \quad D(x, y) = I(x, y) - k \cdot \Delta I(x, y)$$

où Δ est l'opérateur laplacien (dérivée seconde) et k une constante.

1.2.4. Détection d'information structurelle par opérations morphologiques

Contrairement aux méthodes linéaires qui considèrent l'image comme une somme de composantes fréquentielles, la morphologie mathéma-

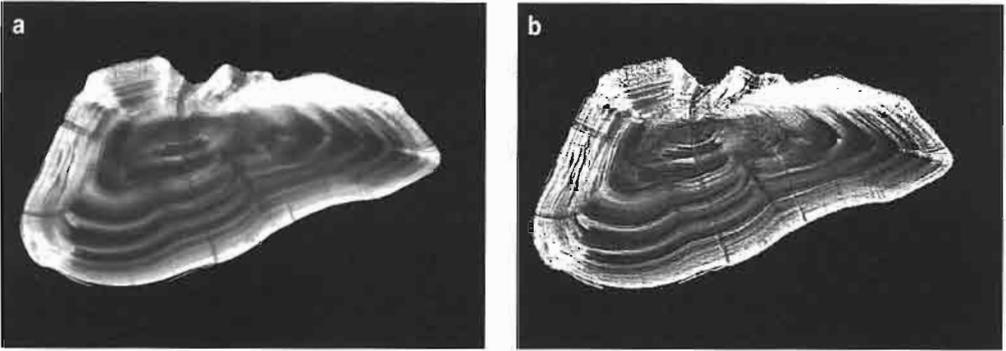


Figure VI.11
Rehaussement d'image
par soustraction
de son laplacien (dérivée
du second ordre) (logiciel
Visilog, Noesis).

tique (Matheron, 1975 ; Serra, 1982, 1988) traite l'image comme un ensemble d'objets opaques au sein duquel la superposition se traduit par un masquage et non pas par une addition. Dire qu'un objet A cache un objet B revient à dire que le contour de B est inclus dans A. Ainsi, la morphologie mathématique examinera, à l'aide d'opérateurs sur les ensembles (\cap , \cup , \subseteq), la structure géométrique d'une image au moyen d'un objet de référence de taille et de forme connues : l'élément structurant.

L'érosion et la dilatation constituent les opérations de base de la morphologie mathématique. Au lieu de recalculer un point au moyen d'un ensemble de coefficients comme dans la convolution, on testera en chaque point de l'image l'inclusion ou l'intersection de l'élément structurant. Sur une image binaire, codée sous forme d'une série de 0 et de 1, une érosion consistera à conserver les zones dans lesquelles l'élément structurant est entièrement inclus. Une dilatation, au contraire, consistera à ajouter à un objet tous les points pour lesquels l'élément structurant est en intersection avec lui. Une érosion supprimera les points isolés et les petits objets et en déconnectera certains, alors qu'une dilatation bouchera les trous et connectera les objets (fig. VI.12). Ces opérations sont applicables également aux images en niveaux de gris : l'érosion sera la fonction min des pixels du voisinage défini par l'élément structurant, alors que la dilatation en sera le max. À partir de ces opérateurs de base, on peut construire des opérations présentant des propriétés similaires mais moins destructrices, en préservant mieux les formes originales. L'ouverture d'une image est la combinaison d'une érosion suivie d'une dilatation et la fermeture est une dilatation suivie d'une érosion. Toutes ces transformations ont la propriété d'être croissantes, c'est-à-dire que, si un objet O_1 est inclus dans un autre objet O_2 , alors la transformation de O_1 par une transformation T est incluse dans $T(O_2)$. Par contre, les propriétés topologiques (trous, nombre de composantes connexes, etc.) ne sont pas préservées.

Ces opérations de base fournissent un détecteur très efficace d'anneaux de croissance de PC : l'opérateur « chapeau haut-de-forme » (Top-Hat). Il consiste en la soustraction à l'image originale de son ouverture, lorsque l'on recherche des anneaux translucides ou de l'image originale à sa fermeture dans le cas d'anneaux opaques (fig. VI.12f).

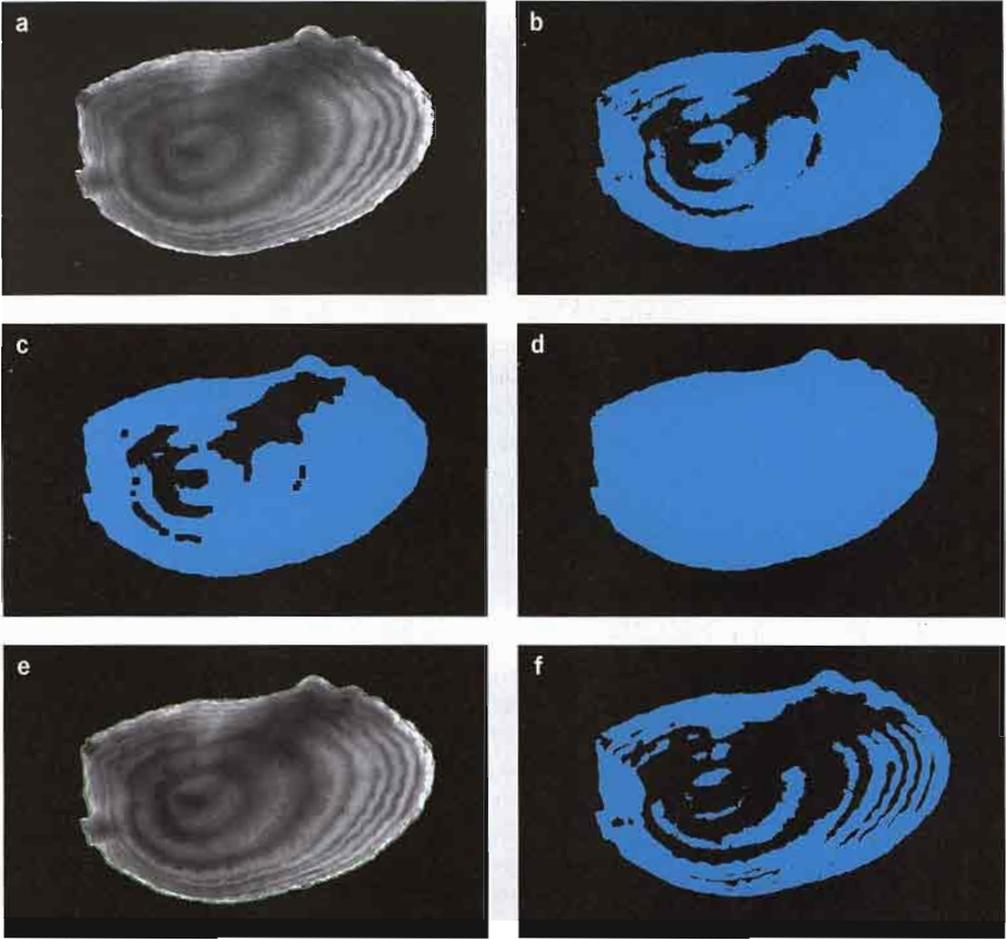


Figure VI.12 - Extraction du contour d'un otolithe de plie (*Pleuronectes platessa*) (a) par des opérateurs morphologiques : à partir d'une image seuillée (b), un opérateur de fermeture procédant par dilatation de l'image puis érosion fermera le contour (c). Les trous à l'intérieur de l'objet sont bouchés par un algorithme de remplissage de trous (d) basé sur la dilatation géodésique du complément de l'image. Le contour de l'objet le plus grand correspondra au contour de l'otolithe (e). Le filtre « chapeau haut-de-forme » (Top-Hat) est un opérateur adaptatif permettant de seuiller les objets d'une taille définie (f).

D'autres transformations permettent de préserver les propriétés topologiques des images. Elles consistent à rechercher, sur des images binaires, des configurations de voisinage particulières et à enlever les pixels correspondants dans le cas d'une opération d'amincissement, ou à les ajouter dans le cas d'une opération d'épaississement.

1.2.5. Patron de croissance : la limite des filtres classiques

Une des principales propriétés des filtres numériques classiques linéaires et non linéaires est qu'ils sont invariants par translation. Ceci permet de détecter le même objet quel que soit son emplacement dans l'image. Lorsque l'image représente une scène en perspective, par exemple une autoroute vue d'un pont, on ne peut pas détecter les

objets du premier plan en utilisant les mêmes paramètres de filtre que ceux adoptés pour détecter les objets du fond. Avec des filtres classiques, nous serons amenés à élargir les critères sur la plage de taille, ce qui conduit finalement à détecter les objets du premier plan correspondant à du bruit. Dans le cas des PC, le modèle de croissance agit comme une perspective, faisant varier la largeur des anneaux, permettant d'assouplir les critères de taille et de récupérer le bruit.

Lorsque l'on a une idée approximative du modèle de croissance, une solution possible serait d'adapter le paramètre du filtre à la fonction de perspective ou de modèle de croissance. La solution opposée consiste à remodeler le signal, toujours sur la base de la connaissance *a priori* du modèle de croissance, afin de soustraire, ou tout au moins atténuer, la variation d'amplitude des pics et des vallées. En théorie du signal, ceci est connu comme la démodulation de fréquence (fig. VI.13).

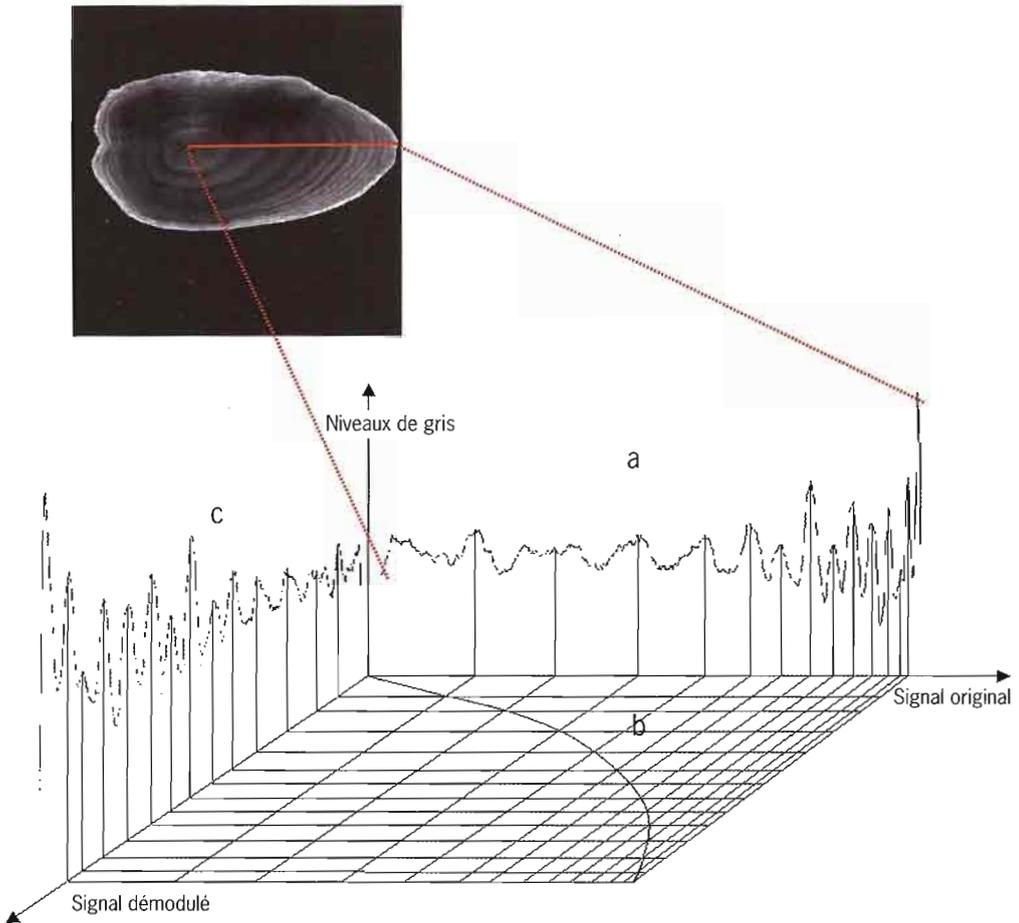


Figure VI.13 - Élimination de la tendance due à la croissance : illustration graphique de l'algorithme de démodulation sur un profil d'image d'otolithe de plie (*Pleuronectes platessa*) (a) en utilisant un modèle de croissance *a priori* de type von Bertalanffy (b). Le profil démodulé (ou anamorphosé) (c) présente des anneaux de même largeur, à la différence des anneaux d'origine.

Cette démodulation a été appliquée aux otolithes de larves de *Solea solea* (Troadec, 1991 ; Lagardère & Troadec, 1997) avec une fonction de croissance exponentielle, aux otolithes de *Pollachius virens* adultes (Troadec, 1991) ainsi qu'à des sections de rayons de nageoire dorsale de *Thunnus alalunga* (Troadec & Antoine, données non publiées) avec une fonction de croissance de von Bertalanffy. Le but premier était d'améliorer la détection des anneaux et, en même temps, d'estimer le nombre d'anneaux peu contrastés ou manquants, à cause de l'altération osseuse par exemple. La démodulation a été suivie d'une transformation de Fourier et les fréquences présentant les énergies les plus élevées ont été utilisées pour estimer par extrapolation le nombre d'anneaux manquants.

1.3. Analyse quantitative des PC : du 1D au 3D

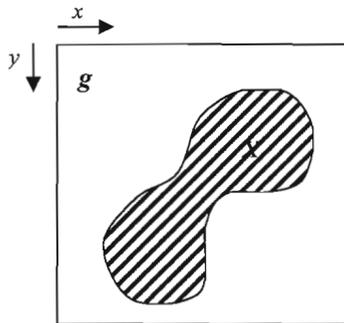
Alors que le traitement d'images transforme une image en une autre, l'analyse quantitative produit des mesures à partir d'une image. Ces mesures sont généralement calculées sur des images binaires bien que, dans certains cas, une pondération avec une échelle de gris puisse être introduite. La figure VI.14 présente et illustre les paramètres de base, notre but étant d'attirer l'attention du lecteur sur l'existence de diverses méthodes de traitement d'un même paramètre.

1.3.1. Dénombrement de structures : du profil d'image 1D au profil synthétique (1,5D)

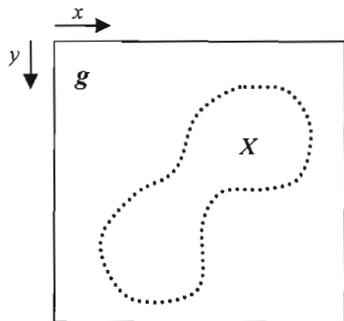
Avant l'apparition des systèmes de traitement d'images, les sclérochronologues réduisaient leur localisation d'anneau à un axe simple, notamment lorsque des mesures de croissance d'anneau étaient nécessaires. Aujourd'hui, mis à part certains travaux prospectifs (Welleman & Storbeck, 1995 ; Troadec *et al.*, 2000), les outils disponibles se limitent encore à l'utilisation des profils simples pour détecter des zones de croissance sur des images numériques. Pourquoi existe-t-il de telles différences dans leurs performances respectives ?

L'une des raisons essentielles est que le lecteur humain détecte les anneaux en 2D et les localise en 1D alors que la plupart des logiciels actuels de détection d'anneaux effectuent la totalité du traitement en s'appuyant uniquement sur l'information 1D. Néanmoins, si la taille des zones de croissance ne varie pas beaucoup, si leur contraste est suffisant et si les paramètres du filtre peuvent être convenablement ajustés, on peut s'attendre à un bon taux de détection, de l'ordre de 80 %. En général, on peut dire que si l'on peut facilement compter les anneaux sur une image, alors les systèmes automatiques ne seront pas « trop mauvais ».

En travaillant sur un seul profil d'image, on perd de façon certaine toute information relative à la continuité des anneaux. Le signal sera par conséquent très sensible aux défauts locaux pouvant être interprétés à tort comme des pics ou des vallées. Afin d'améliorer ce signal de profil d'image et de se rapprocher d'une perception de la continuité



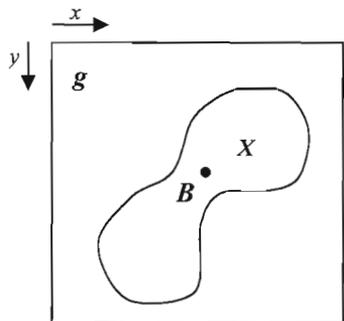
SURFACE
 $A(X) = \sum_{ij} g(x_i, y_j)$
 avec : $g(x_i, y_j) = 1$ si $X \subset X$
 $g(x_i, y_j) = 0$ si $X \not\subset X$



PÉRIMÈTRE = Longueur du bord de l'élément X

1 - Somme des pixels du bord dans les différentes directions
 $L(X) = N_{0^\circ} + N_{90^\circ} + N_{45^\circ} + N_{135^\circ}$

2 - Périmètre de Crofton = somme des pixels du bord corrigés (a = taille du pixel carré)
 $L(X) = \frac{\square}{4} \times \left[a \times (N_{0^\circ} + N_{90^\circ}) + \frac{a}{\sqrt{2}} \times (N_{45^\circ} + N_{135^\circ}) \right]$

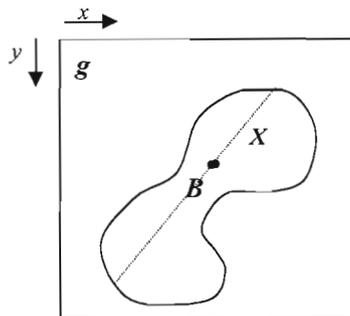


BARYCENTRE = Centre de gravité

$(X) = (M_{1x}, M_{1y})$ avec :

$$M_{1x} = \frac{1}{A(X)} \sum_x x_i$$

$$M_{1y} = \frac{1}{A(X)} \sum_y y_j$$



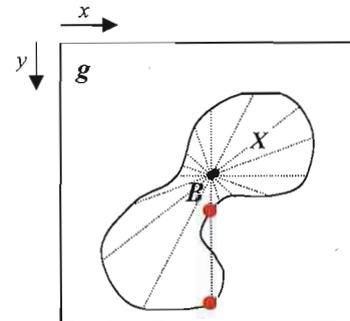
ORIENTATION = Direction de l'axe majeur d'inertie estimée à partir des moments du 2^e ordre

$$\theta = \frac{1}{2} \text{atan} \frac{M_{2xy}}{M_{2x} - M_{2y}}$$

avec : $M_{2x} = \frac{1}{A(X)} \sum_x (x_i - M_{1x})^2$

$$M_{2y} = \frac{1}{A(X)} \sum_y (y_j - M_{1y})^2$$

$$M_{2xy} = \frac{1}{A(X)} \sum_x (x_i - M_{1x})(y_j - M_{1y})$$



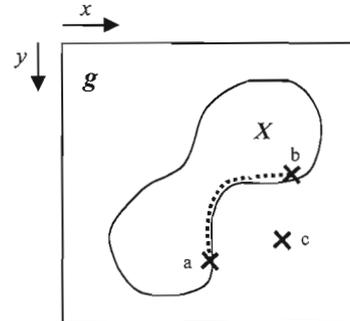
DESCRIPTEURS de FOURIER :

• Avec une représentation polaire (les points rouges montrent une ambiguïté sur la radiale)

$$R(\theta) = A_{0+} \sum_{n=1}^{\infty} A_n \cos(n\theta - \Phi_n)$$

• Avec des descripteurs elliptiques (deux séries de Fourier correspondent à la projection de la forme sur les axes x et y)

$$X_i = A_{0+} \sum_{n=1}^N X_n, \quad Y_i = C_{0+} \sum_{n=1}^N Y_n$$



DISTANCE GÉODÉSIQUE

$dX(a, b) = \text{arc}(a, b)$ si a et b $\subset X$

$dX(a, c) = +\infty$

Figure VI.14 - Analyse d'images : illustration graphique de quelques paramètres de base employés pour mesurer et caractériser les objets sur des images numériques.

locale, certains logiciels permettent maintenant d'intégrer les données à partir de plusieurs profils pour les combiner. Cela peut être réalisé de deux manières (fig. VI.15) :

- rang par rang, ce qui implique que tous les pixels à équidistance de l'origine sont combinés. Cette manière simple ne peut être appliquée que lorsque l'ensemble des profils est parfaitement perpendiculaire aux zones de croissance et lorsque les points de données ne présentent pas de courbure trop prononcée, de sorte que les données ne soient pas combinées de façon incorrecte ;

- après synchronisation de deux points de repère, par exemple le *nucleus* et le bord. Dans ce cas, tous les profils sont redimensionnés (remis à l'échelle) et les données peuvent être combinées de manière plus sûre. La combinaison des données des différents profils peut être réalisée en calculant des estimateurs statistiques comme la moyenne (Cailliet *et al.*, 1996) mais l'estimateur médian, plus robuste aux points aberrants, lui est généralement préféré (Troadec, 1991 ; Welleman & Storbeck, 1995).

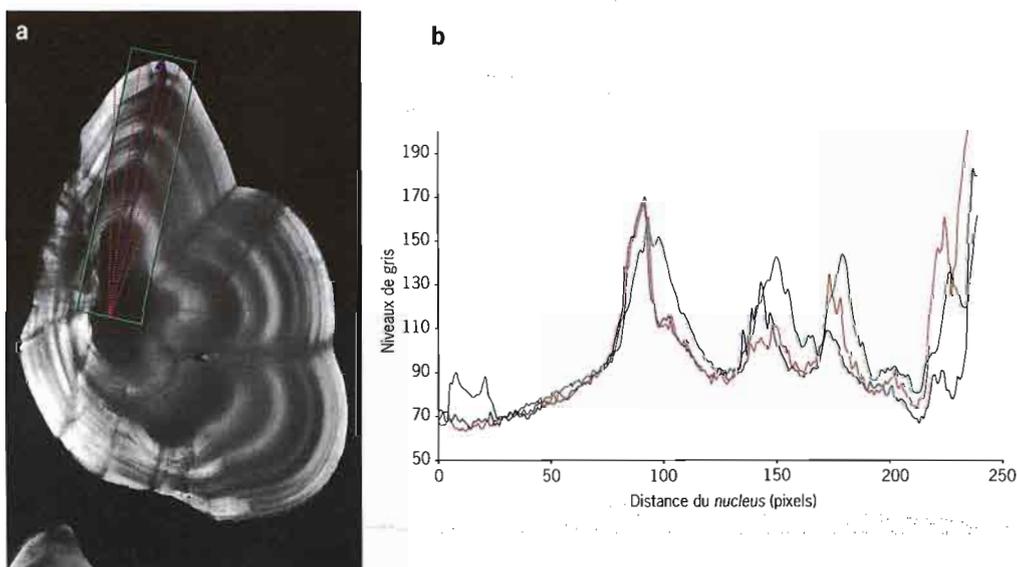


Figure VI.15 - Acquisition de profils d'image : comparaison de différents procédés de calcul sur une image d'otolithe de tacaud (*Trisopterus luscus*) (a) : profil simple (flèche bleue), multiples profils parallèles moyennés (cadre vert) et médiane de multiples profils radiaires synchronisés (lignes de points rouges). Représentation graphique (b) de chaque type de procédé montrant que les profils simples manqueront quelques anneaux tandis que les profils multiples tendront à déplacer des anneaux ou à surestimer leur largeur (logiciel TNPC, Noesis).

Dans un profil 1D, les anneaux sont assimilés à des maxima ou minima (pics ou vallées). Des filtres linéaires de lissage sont utilisés pour sélectionner les pics ou les vallées les plus significatifs, et ceci à partir d'un simple algorithme de moyenne mobile (Cook & Guthrie, 1987 ; McGowan *et al.*, 1987 ; Szedlmayer *et al.*, 1991), puis, ulté-

rieurement, à l'aide de filtres de Fourier plus sélectifs (Troadec, 1991 ; Cailliet *et al.*, 1996 ; Morales-Nin *et al.*, 1998) ou de transformations « chapeau haut-de-forme » (Top-Hat) adaptatives (Troadec, 1991) (fig. VI.12f).

Lorsque l'on considère un pic (ou une vallée), on peut localiser la zone de croissance comme étant :

- la valeur de niveaux de gris maximale dans le pic (ou minimale pour une vallée) ;
- le centre géométrique du pic ;
- le début du pic ;
- la fin du pic.

La méthode de la valeur extrême est la plus utilisée mais il est essentiel de vérifier si la localisation automatique de l'anneau correspond à la perception de l'opérateur. En fait, lorsque l'on est devant une zone homogène, on a plutôt tendance à localiser l'anneau au centre géométrique du pic mais, s'il y a un maximum de luminance, ce dernier attire l'attention et l'anneau est localisé à cette extrémité. De façon générale, la localisation des début et fin de pics reste considérablement influencée par les paramètres des filtres.

Toutes ces méthodes qui opèrent anneau par anneau peuvent être considérées comme « locales », par opposition aux méthodes « globales » qui sont basées sur une estimation spectrale dans laquelle le nombre d'anneaux est estimé sur le signal tout entier et donc sur une base globale. Ces méthodes peuvent être utilisées dans certains cas où le modèle de croissance ne varie pas beaucoup, ou lorsqu'un prétraitement approprié a été effectué en vue de l'enlever (Troadec, 1991 ; Lagardère & Troadec, 1997).

1.3.2. Formes 2D et 3D des PC

Les formes des PC peuvent être utilisées pour l'analyse de la croissance d'une surface ou d'un volume, simplement en étant considérées comme une signature spécifique ou comme une marque qui intègre l'historique de croissance du poisson caractérisant un stock donné et permettant d'identifier l'origine de ses individus. Cela a été appliqué, par exemple, aux écailles afin de distinguer le *Salmo salar* nord-américain du *Salmo salar* européen (Pontual & Prouzet, 1987 ; Reddin & Pontual, 1992) ainsi que les individus d'origine sauvage de ceux issus de l'aquaculture (Ross & Picard, 1990). Ce procédé fut également appliqué aux otolithes pour la discrimination des stocks (Messieh *et al.*, 1989 ; Campana & Casselman, 1993 ; Friedland & Reddin, 1994). Les formes peuvent être numérisées à l'aide d'une tablette de numérisation mais l'utilisation d'une caméra est généralement préférable afin d'éviter les erreurs de traçage manuel. Par ailleurs, l'éclairage des PC doit être optimisé afin de limiter la segmentation (séparation de la PC du fond de l'image) à un simple seuillage qui fournira une image binaire.

Pour les PC, deux types de caractéristiques de forme sont principalement calculés (fig. VI.14) :

- des facteurs de forme simples comme la compacité (largeur/longueur) et les rapports périmètre/longueur, périmètre/largeur, périmètre/surface^{1/2}, etc. ;
- des coefficients de Fourier, par lesquels le bord est décomposé en une somme de composantes sinus et cosinus dont les fréquences augmentent avec les harmoniques. En fait, la forme grossière de la PC est décrite par les basses fréquences alors que l'addition des harmoniques les plus élevées raffine cette description. Le bord de la PC peut être déterminé par un algorithme de suivi de contours et par les coefficients de Fourier calculés à partir d'une représentation en coordonnées polaires du contour (Younker & Ehrlich, 1977), ou à partir des coordonnées cartésiennes mais avec des coefficients elliptiques (Giardina & Kuhl, 1977). La dernière approche doit être logiquement préférée puisqu'elle évite le problème de l'identification du point centre de la représentation polaire et peut être appliquée, contrairement à la première approche, à des formes complexes présentant des convexités prononcées.

L'information 3D est généralement utilisée par un lecteur confronté à une nouvelle espèce. Le choix du meilleur plan de coupe nécessite l'observation de la PC à partir de différents stades de croissance, dans différents plans et suite à une série d'étapes de rodage. Ceci est fait jusqu'à ce que le lecteur puisse reconstruire mentalement une dynamique de forme tridimensionnelle de la PC. En attendant que des méthodes non destructives comme la tomographie informatisée soient disponibles pour être appliquées aux PC (Hamrin *et al.*, 1999), la représentation 3D est aujourd'hui réalisée par alignement de coupes successives. Ces méthodes demeurent fastidieuses et, par conséquent, peu répandues dans les laboratoires d'estimation d'âge.

Le point critique dans ces techniques (fig. VI.16) est leur capacité à aligner les différents éléments de l'ensemble des tranches. Les différentes étapes impliquées sont :

- enrobage de la PC dans de la résine ;
- découpe avec une scie lente ou une scie à fil. Cette étape détermine la résolution sur l'axe des z ;
- alignement réalisé par logiciel par rapport à une référence qui peut être obtenue en perçant des trous perpendiculaires au plan de rodage (Bailey *et al.*, 1995) ou à l'aide d'un carré noyé dans la résine avec la PC (Troadec & Fichou, données non publiées) ;
- numérisation de la tranche à l'aide d'un numériseur.

L'ensemble des images peut alors être visualisé comme suit :

- une représentation 3D approximative comme image de volume, les pixels deviennent des points 3D appelés voxels. Certains logiciels permettent de faire des mesures de distance en 3D ;
- une vue reconstruite du bord extérieur et/ou des bords d'anneaux après numérisation manuelle ou automatique, comme décrit ci-dessus, pour les formes 2D. Le logiciel de reconstruction peut alors fournir des caractéristiques de formes 3D.

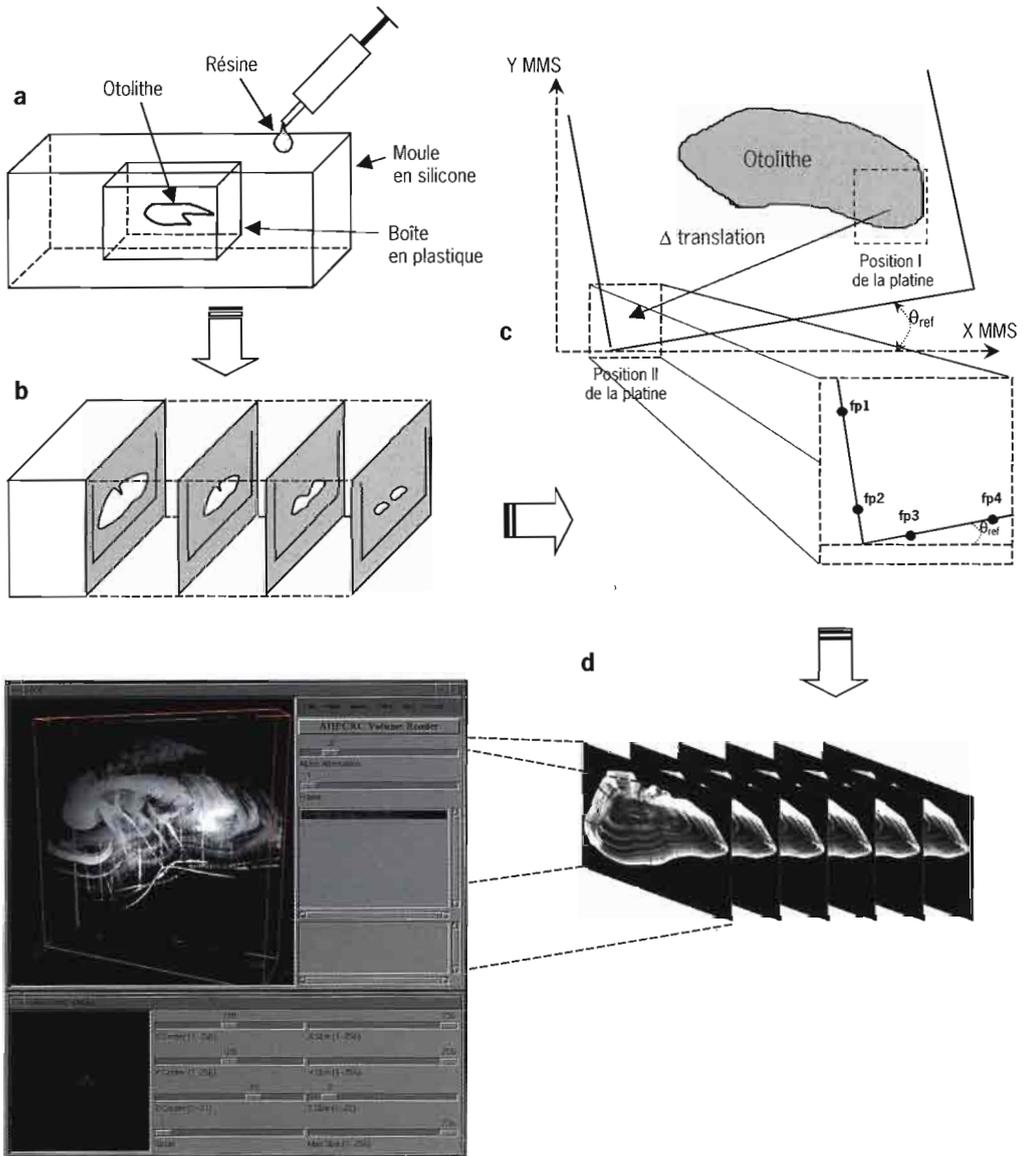


Figure VI.16 - Reconstruction 3D de PC : description du procédé de préparation pour la reconstruction 3D de la PC à partir de coupes successives. (a) Inclusion dans une boîte en plastique et enrobage dans un moule en silicone, (b) découpe séquentielle avec une scie à fil diamanté. (c) Numérisation de la 1^{ère} tranche de PC sur un microscope équipé d'une platine motorisée (MMS). Quatre points de référence (fp) sont saisis et l'orientation de l'échantillon est calculée. Puis, toutes les autres tranches sont alignées suivant la même translation et la même rotation que le référentiel. (d) Visualisation du jeu d'images en perspective avec un logiciel rendant compte des volumes 3D (logiciel BOB (Brick of bytes) AHPCRC).

2. Traitement de l'information cognitive : vous lisez ou vous interprétez ?

Demander à un ordinateur de simuler, entièrement ou même partiellement, une estimation d'âge suppose de disposer d'un cadre conceptuel clair fondé sur une terminologie précise. Mettant le doigt sur la confusion sémantique entretenue encore aujourd'hui par les sclérochronologues dans l'usage indifférencié des termes « lecture » et « interprétation », Sych (1974) propose de distinguer deux composantes dans une opération d'estimation de l'âge :

- la **lecture**, qui est la reconnaissance de certaines marques avec un alphabet maître ou une clé ;
- l'**interprétation**, qui est la mise en relation de structures avec des événements du cycle de vie.

Cette simple distinction, évidente à première vue, a permis à Sych d'être le premier à proposer un cadre logique et statistique pour l'analyse des pièces calcifiées basé sur des arbres décisionnels rigoureux, permettant de gérer des incertitudes sur les règles de décision. Selon la même démarche, Casselman (1987) propose que les deux étapes, acquisition de données et interprétation, soient clairement séparées et ajoute que « ... dans les approches précédentes, le mauvais raisonnement a été de considérer que les deux composantes - extraction des données et interprétation - pouvaient être traitées simultanément... ». En effet, la localisation d'un anneau de croissance dans une pièce calcifiée ne préjuge en rien de sa périodicité. Il s'agit donc là d'une perception visuelle qui peut nécessiter un apprentissage plus ou moins long. Cet anneau de croissance peut être alors classé comme étant d'une périodicité donnée (annuel, journalier, faux anneau, etc.). C'est alors la phase d'interprétation qui fait appel aux connaissances acquises lors de l'étape de validation et durant les multiples interprétations précédentes. La première phase est basée sur des critères d'identification purement visuels (anneau de croissance, *nucleus*, *primordia*, discontinuité, etc.), dont on peut s'acquitter en général très rapidement pour une pièce calcifiée et une méthode de préparation données. La deuxième repose sur des schémas logiques plus ou moins complexes, intégrant des informations liées entre autres à l'espèce concernée, au stock ou à la population et/ou à la zone de capture et ce, de manière à la fois instantanée (ou individuelle) et historique (fig. VI.17).

Bien qu'ils puissent être parfois intimement liés, ces deux processus font appel à des informations de nature tout à fait différente (Troadec, 1992). Leur manipulation à l'aide d'un ordinateur relèvera de deux domaines scientifiques distincts :

- la reconnaissance de forme pour la perception visuelle ;
- les sciences cognitives pour l'interprétation.

Bien que les systèmes d'EACAO disponibles actuellement soient presque exclusivement basés sur des systèmes d'analyse d'images, on

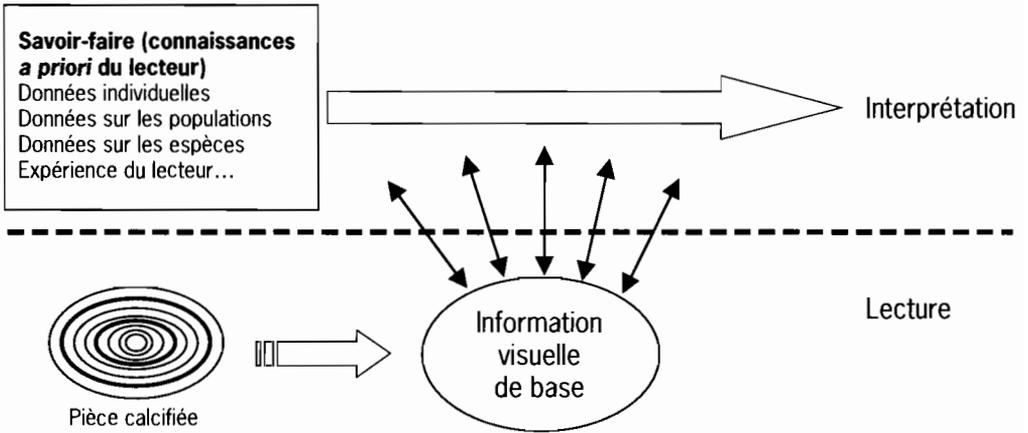


Figure VI.17

Schéma conceptuel décrivant l'estimation de l'âge des poissons comme un processus à deux niveaux : (1) un niveau de lecture basé sur la perception visuelle et (2) un niveau d'interprétation qui combine la connaissance des données de base et l'expérience du lecteur.

voit apparaître de plus en plus le souci de prendre en compte la phase d'interprétation qui constitue probablement la plus forte source de variabilité (Morison *et al.*, 1998).

Une première approche a été l'utilisation de critères objectifs pour attribuer une zone de croissance à une périodicité donnée. Small & Hirschhorn (1987) notent que les zones de croissance se déposent selon un modèle de croissance relativement régulier et proposent un système fondé sur l'ajustement d'un modèle de croissance. Pour chaque pièce calcifiée, un modèle de croissance du type von Bertalanffy est ajusté à un ensemble de positions de zones de croissance acquises par digitalisation manuelle. L'analyse des résidus de cet ajustement donne une indication sur la validité des anneaux de croissance. Cette approche a été ensuite étendue par l'introduction d'une contrainte dans le processus de lecture, en démodulant le profil de l'image par un modèle de croissance (Troadec, 1991 ; Lagardère & Troadec, 1997).

Une autre approche consiste à ne confier à l'ordinateur que le soin de gérer le niveau d'interprétation du processus d'estimation de l'âge. Casselman (1987, 1996) a proposé un système d'interprétation de pièces calcifiées CSAIS (Calcified structure age interpretation system), puis a développé et optimisé un logiciel CSAGES (Calcified structure age-growth data extraction software ; Casselman & Scott, 2000), intégrant le système et découplant les phases d'acquisition et d'interprétation des données. Le logiciel est architecturé autour :

- d'un module d'acquisition de données, CSAS (Calcified structure analysis software), utilisant un numériseur intégré à un ordinateur via un clavier ;
- d'un module d'interprétation, CSAGES, Version 5.2, manipulant un jeu important de données associées à la pièce calcifiée (paramètres

environnementaux, variables morphométriques, conditions d'acquisition de données, etc.). La volonté est de laisser entièrement à l'opérateur humain la tâche de perception visuelle, pour laquelle il est censé être plus performant que les systèmes actuels d'analyse d'images par ordinateur. Il est demandé à l'opérateur de localiser et de classifier les discontinuités et zones de croissance (*annulus*, pseudo-*annulus*, *annulus* partiel) et de caractériser le bord de la pièce calcifiée.

3. Un peu de théorie : perception visuelle et estimation d'âge

En 1992, dans un article intitulé « Why progress in machine vision is so slow ? », Théo Pavlidis souligne, entre autres causes, le désintérêt vis-à-vis des principes fonctionnels de base de notre système visuel. L'application des techniques de vision artificielle à l'interprétation des pièces calcifiées ne fait pas exception et un petit retour sur les théories sous-jacentes permet de mieux évaluer la complexité du problème.

Différentes théories...

Au long des trois dernières décennies, s'est construite l'ambition de reproduire sur ordinateur des mécanismes de perception visuelle similaires à ceux de l'être humain. Cette tâche, trivialement résolue par un observateur humain quelconque et qui semble simple et évidente, est en réalité particulièrement complexe, contrairement aux apparences, et pose d'énormes problèmes loin d'être tous entièrement résolus en psychologie cognitive, physiologie et neurophysiologie expérimentale. Pour simplifier, trois théories correspondant à trois écoles de pensée s'affrontent (Benzinou, 2000) :

- la théorie de la « perception directe » avancée par Gibson entre 1950 et 1979, selon laquelle la structure spatio-temporelle du système sensoriel impliqué dans la vision, ou « réseau optique », suffit au processus perceptif. Toute interprétation, construction ou représentation est alors considérée comme post-perceptive ;
- la théorie « gestaltiste » associant deux processus, l'un primaire, qualifié de « bottom-up », transformant et organisant l'image rétinienne en unités discrètes selon leurs caractéristiques géométriques et dynamiques, l'autre secondaire, non visuel, dirigé par concepts et pour cela qualifié de « top-down », consistant à associer, par ajustements progressifs, ces « composantes objectives » à des informations cognitives préexistant dans la mémoire (fig. VI.18a) ;
- enfin, la théorie « constructiviste », pour laquelle la perception est une sorte de construction inconsciente de la signification à partir d'informations incomplètes fournies par l'image rétinienne.

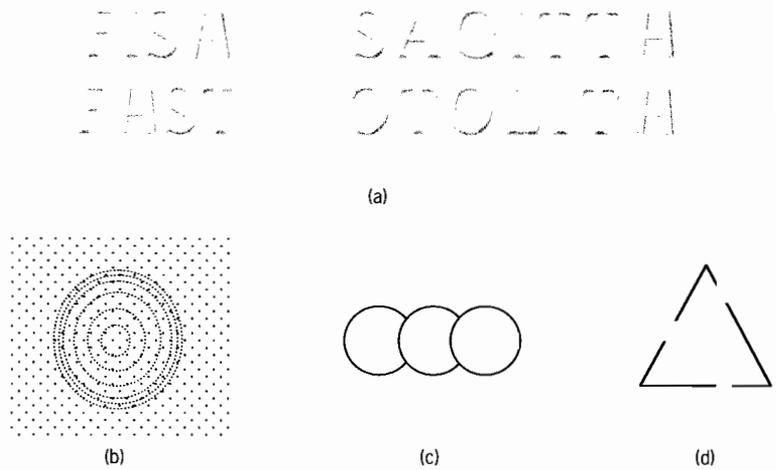


Figure VI.18 - Perception visuelle. (a) Influence du contexte et de la connaissance *a priori* sur la perception et la complétude des formes. (b) Le système perceptif a rassemblé les éléments fragmentés de chaque cercle en une seule unité bien que ceux-ci soient noyés dans un fond bruité. En (c) émerge une figure composée de trois disques complets et interposés l'un derrière l'autre, plutôt que celle d'un seul disque en contact avec deux formes contiguës incomplètes. (d) Par interpolation perceptive, les parties manquantes d'un triangle sont perçues comme si elles étaient aussi présentes.

L'appoint des neurosciences...

Ainsi, la perception visuelle apparaît comme un processus complexe pour lequel la disponibilité d'une image rétinienne incomplète n'est cependant nullement un obstacle. Pour identifier un objet, le système visuel humain est souvent amené à ignorer des données, à rechercher des significations, à regrouper des éléments, à séparer des entités, à continuer des contours, à compléter des formes et à combler des lacunes.

La conception gestaltiste, selon laquelle notre système visuel est une machine à construction de formes, a reçu récemment le soutien des neurosciences en montrant que certaines cellules rétinienne réagissent à un stade très précoce sélectivement à des discontinuités de l'intensité lumineuse. La perception globale des formes met ensuite en jeu des groupements cellulaires des corps genouillés et du cortex visuel (colonnes corticales) chargés pour certains de coder les alignements locaux et de prolonger les contours dans un voisinage donné, et pour d'autres, de coder les polarités du contraste et les discontinuités. Des connexions entre ces groupements permettent de faire émerger les formes dans notre perception (fig. VI.18b-d).

Et les pièces calcifiées...

La perception de formes primaires sur les pièces calcifiées met en jeu des processus d'identification de contours concentriques plus ou moins fermés, présentant des contrastes variables et des interruptions dans leur continuité et dans leur densité optique, tous ces paramètres

variant ensuite selon l'individu, le stade de développement, le secteur géographique et l'espèce concernée. À cela s'ajoute la perception de formes secondaires tels les *annuli* des écailles, formés par des resserrements de *circuli* ou le *nucleus* des otolithes, contour englobant un ensemble de *primordia*, ou encore le patron de croissance, constitué de la disposition relative des marques de croissance.

En conclusion, nous pouvons dire que l'estimation d'âge à partir des pièces calcifiées est un processus complexe impliquant des informations de différentes natures (visuelle, logique et biologique) (Troadec, 1992) et à différents niveaux de perception. En outre, il faut ajouter que les techniques et concepts de la vision artificielle sont, d'une part, très nombreux et variés et, d'autre part, difficilement compréhensibles par des non-spécialistes et parfois même inappropriés au but pour lequel ils sont employés (Benzinou, 2000). Ainsi, nous pensons que seule une analyse interdisciplinaire, associant des concepts biologiques et de traitement du signal, permettra de développer des systèmes d'EACAO efficaces.

B. En quoi et comment l'ordinateur peut-il aider à l'analyse d'une pièce calcifiée ?

L'ordinateur est peu à peu devenu une composante nécessaire dans l'équipement des laboratoires d'estimation de l'âge mais n'a pas toujours été considéré par tous comme indispensable. Ce débat sur l'utilité des ordinateurs, maintes fois entendu lors de rencontres, faisait en fait « s'opposer » les collègues de différents « métiers » de la sclérochronologie, les plus éloignés étant souvent ceux impliqués dans l'analyse des microstructures et ceux spécialisés dans l'interprétation des macrostructures d'otolithes en routine. De fait, les arguments des uns perdaient leur pertinence une fois replacés dans le contexte de travail des autres. Aujourd'hui, un système d'EACAO permet l'accès à toute une palette d'outils que tout lecteur d'âge doit connaître. Outre ses fonctions propres d'acquisition, de manipulation, de traitement et de stockage de données, l'ordinateur est également une porte ouverte vers d'autres méthodes d'analyse puissantes, telles les techniques de traitement du signal ou les sciences cognitives (c'est-à-dire l'étude des processus cognitifs naturels et artificiels, y compris l'intelligence artificielle, la psychologie cognitive...) qui sont, elles-mêmes, en pleine évolution.

1. Que peut-on attendre d'un système d'EACAO ?

Si les systèmes d'EACAO sont souvent parés de nombreuses vertus (objectivité, justesse, précision, productivité, mémorisation), beaucoup d'entre elles sont tout simplement l'apanage de n'importe quel système d'assistance par ordinateur. Mais, qu'en est-il réellement de leur application à la problématique de l'estimation de l'âge ? En mettant en avant la notion discutable d'objectivité, n'a-t-on pas occulté d'autres qualités tout aussi essentielles à l'analyse des pièces calcifiées ? L'utilisation systématique des ordinateurs en sclérochronologie s'est amorcée dans les années quatre-vingt afin de faciliter les prises de mesures répétitives (analyse des microstructures) ainsi que l'extraction de facteurs de forme. Les fonctionnalités d'assistance morphométrique ont bien été, en pratique, les premières motivations des sclérochronologues dans leur recours aux systèmes d'EACAO. Leurs autres potentialités de standardisation, de précision, de productivité ou de mémorisation, exploitées de manière éparse, ne semblent s'imposer que très lentement dans les laboratoires travaillant en routine pour l'évaluation de stocks.

1.1. Aide à la quantification

Les premiers systèmes d'EACAO sont nés de l'association d'un ordinateur et d'un microdensitomètre (Ichiara, 1963 ; Van Utrecht & Schenkkan, 1972) permettant l'enregistrement et l'analyse de profils

optiques. Puis, l'apparition des caméras a permis la prise en compte de l'information bidimensionnelle (Mason, 1974), bien que l'analyse quantitative ait continué, à quelques exceptions près, à se limiter à des profils d'image. Parmi les informations quantitatives aujourd'hui disponibles sur les pièces calcifiées, on distinguera :

- les informations de contraste directement liées aux variations de densité optique (zones de croissance, discontinuités, *circuli*, patrons de croissance);
- les informations structurelles relatives à des événements particuliers (*nucleus*, *primordia*, sites de renucléation), l'agencement particulier de structures (« crossing-over », marques de résorption, etc.) ou de repères de positionnement (axe de lecture);
- les informations de forme.

Si les systèmes d'EACAO offrent une assistance très efficace dans l'acquisition des informations de contraste, voire indispensable pour la quantification des formes, il en va tout autrement pour les informations structurelles qui sont pour la plupart des constructions psychovisuelles plus complexes où l'opérateur humain reste encore le plus performant.

Un système d'EACAO permet de :

- fournir une image de bonne qualité, avec une bonne résolution, présentant un bon rapport signal/bruit;
- d'en améliorer, si besoin, la qualité (rehaussement de contraste, élimination de bruit); le traitement d'images numériques offre pour cela de nombreuses solutions (voir chap. VI.A.1.2).

Puis, partant de cette image, il permet également de localiser les zones de croissance d'une manière plus ou moins automatisée et donc d'en faire le dénombrement. Cette localisation des zones de croissance, associée à celles d'informations structurelles telles que le *nucleus*, ouvre ensuite un accès immédiat aux données morphométriques de distances inter-accroissements ainsi qu'à d'autres caractérisations fines des zones de croissance (intensité, contraste, fréquence, etc.). L'analyse de ces données par des méthodes spectrales permet d'identifier des phénomènes périodiques (Vasil'kov, 1977, 1979; Geffen & Nash, 1995) et la connaissance *a priori* de l'une des composantes du signal permet d'introduire des contraintes dans le processus d'estimation de l'âge (Small & Hirschhorn, 1987; Lagardère & Troadec, 1997). De même, l'analyse de signatures temporelles associée à des méthodes bayésiennes permet l'exploitation d'historiques de croissance incomplets (Ogle *et al.*, 1996).

La manipulation des contrastes de l'image permet également d'obtenir un contour 2D de pièces calcifiées et conduit ainsi à une quantification de leurs formes, à l'automatisation de leurs mesures et de leur classification (Campana, 1987). Cette approche a suscité de nombreux travaux de discrimination de stocks - tant sur les écailles que sur les otolithes (Pontual & Prouzet, 1987; Campana & Casselman, 1993; Richards & Esteves, 1997) - basés sur les contours externes des pièces

calcifiées, limitation qui devrait disparaître avec le développement récent d'algorithmes à base de modèles déformables (Benzinou *et al.*, 1997 ; Troadec *et al.*, 2000).

1.2. Objectivité ou standardisation ?

L'objectivité est la qualité la plus fréquemment mentionnée concernant les systèmes d'EACAO (Fawel, 1974 ; Planes & Laval, 1990 ; Wellemann & Storbeck, 1995 ; Cailliet *et al.*, 1996 ; Lagardère & Troadec, 1997). Cependant, il s'agit là d'une notion ambiguë qui cache bien souvent une méconnaissance des mécanismes profonds mis en jeu au niveau des ordinateurs en vision artificielle et qui nécessite d'être éclaircie. Par définition, si l'on se réfère au Cambridge International Dictionary of English, l'objectivité n'est « ...pas influencée par des convictions ou sentiments personnels, mais se fonde sur des faits réels... ».

Où réside en fait l'objectivité de l'ordinateur ? dans la subjectivité du programmeur ?

Selon l'algorithme retenu, l'ordinateur va détecter objectivement, mais plus ou moins bien, des maxima ou des minima sur un profil d'image, ou des anneaux si l'algorithme a été conçu en 2D (plus rare), et, enfin, détectera d'éventuels faux anneaux si une définition claire est disponible. La plupart des algorithmes produiront alors, en présence des mêmes données, les mêmes résultats, qu'ils soient valides ou non. L'objectivité de l'ordinateur est ainsi structurée par la conjonction de notre capacité à lui décrire correctement une réalité et la disponibilité de concepts mathématiques adaptés.

En fait, le caractère « objectif » des ordinateurs réside :

- dans la reproductibilité et la constance des résultats produits, limitant les dérives mais également les capacités d'adaptation souvent nécessaires sur du matériel biologique ;
- dans notre aptitude à définir les informations introduites dans le processus d'interprétation, soit par masquage d'informations (Morison *et al.*, 1998), soit par l'introduction contrôlée d'informations et de contraintes (Lagardère & Troadec, 1997).

Ainsi, l'objectivité des méthodes de vision par ordinateur est toute relative ; face à un désaccord de diagnostic, un expert ne devra pas abdiquer son jugement et, de même, un novice devra, pour longtemps encore, faire son apprentissage auprès d'opérateurs humains confirmés.

1.3. Justesse et précision

La notion de justesse ou d'exactitude revêt un caractère absolu et n'a de sens en sclérochronologie qu'en référence à du matériel d'âge connu ou à des expériences de validation qui auront permis d'estimer la périodicité d'apparition des marques de croissance. La justesse d'un système d'EACAO dépendra très directement (1) de la qualité des images et (2) de la qualité et de la disponibilité de critères d'identification des zones de croissance ainsi que de leur implémentation sous

forme d'algorithmes. Ainsi, certains travaux sur les méthodes automatisées concluent soit à une tendance à la sous-estimation (Troadec, 1991 ; Cailliet *et al.*, 1996), soit à une surestimation pour certains groupes d'âge (Welleman & Storbeck, 1995 ; Troadec *et al.*, 2000), voire à une meilleure justesse que l'expert (Lagardère & Troadec, 1997). Le doublement de la résolution des images ne fournit pas forcément un accroissement des performances (Troadec *et al.*, 2000). Tout dépend en fait de l'adéquation de l'algorithme retenu ; une sous-estimation du nombre de zones de croissance sur les individus âgés est souvent liée à une mauvaise prise en compte de la décroissance dans le temps de la largeur des zones de croissance marginales ; une surestimation peut être liée à une implémentation réductrice des schémas d'interprétation empêchant le recours à des critères habituels de validation des anneaux (continuité, largeur/position sur le patron de croissance, etc.). De même, la focalisation de l'analyse des opérateurs humains sur certaines zones de la pièce calcifiée (Troadec *et al.*, 2000) ou son adaptation à des cas particuliers est encore très mal modélisée par les systèmes actuels. On remarquera cependant la capacité des systèmes d'EACAO à limiter les dérives d'interprétation (Morison *et al.*, 1998) en guidant les opérateurs dans un processus standardisé qui est en soit un facteur essentiel d'amélioration de la justesse des estimations d'âge. Accessoirement, le recours à l'ordinateur aura pour effet de limiter de manière appréciable les erreurs accidentelles telles que les erreurs de retranscription ou de calibration (Fawel, 1974 ; Morison *et al.*, 1998). Il faut néanmoins reconnaître qu'actuellement, malgré l'amélioration continue de leurs performances, les systèmes d'EACAO ne s'approchent de la justesse des experts que dans le cas de pièces calcifiées présentant des anneaux bien contrastés (Jearld, 1995) et restent en général très en deçà lorsque les experts eux-mêmes éprouvent des difficultés d'interprétation.

La notion de précision est considérée comme étant la capacité d'un système à produire des mesures répétées (voir glossaire). Par nature, l'utilisation d'une procédure fortement standardisée, codée sous forme de programme informatique, doit permettre d'accroître la précision des estimations. La précision d'un système d'EACAO peut se définir à deux niveaux :

- au niveau de la localisation des zones de croissance et donc de leurs mesures. Bien que peu évaluée par les utilisateurs, la reproductibilité des positionnements, lorsqu'ils sont réalisés par un algorithme, est très élevée comparée à celle d'un opérateur humain ;
- au niveau de l'estimation de l'âge ou du nombre de zones de croissance. En permettant d'appliquer de manière rigoureusement identique des traitements, il favorise la production d'estimations moins variables à la fois dans le temps et entre différents échantillons. En comparant des résultats produits par des systèmes d'EACAO avec des méthodes manuelles, Cailliet *et al.* (1996) ont conclu à un ordre de

précision comparable alors que d'autres auteurs ont noté un léger avantage en faveur des opérateurs humains (Szedlmayer *et al.*, 1991 ; Lagardète & Troadec, 1997).

1.4. Productivité

La productivité des systèmes d'EACAO peut s'apprécier à différentes échelles du processus d'estimation d'âge, soit au niveau d'une tâche spécifique telle que la localisation des zones de croissance, soit au niveau de l'ensemble du processus d'analyse de la pièce calcifiée, ou à l'échelle de l'organisation d'un laboratoire d'évaluation de stocks, en prenant en compte la capacité de conservation, d'échange et de révision des interprétations. Les systèmes d'EACAO permettent-ils de réels gains de productivité ? Et, si oui, de quelle manière ?

L'obtention d'un gain de temps est évoquée par différents auteurs (Cailliet *et al.*, 1996). Planes & Laval (1990) trouvent un gain de 50 % sur des microstructures d'otolithes, Watarai & Igarashi (1990, 1992) trouvent un gain de 30 % sur des écailles de saumon, Szedlmayer *et al.* (1991) un gain d'un facteur 3,3 mais aucun ne semble inclure le temps de contrôle des détections. Or, dans l'état actuel, les algorithmes développés sont essentiellement basés sur l'analyse des profils d'image. Sur peu d'espèces, ils permettent un comptage entièrement automatisé, c'est-à-dire suffisamment fiable pour se passer d'un contrôle *a posteriori* systématique pouvant être fastidieux et coûteux en temps dans le cas de microstructures. En fait, tous ces auteurs travaillent dans des contextes différents : macrostructures ou microstructures, otolithes ou écailles, échantillons en lames minces ou *in toto*, etc. Nous touchons là au cœur du problème qui sera évoqué par la suite : quel type d'étude réalisons-nous ? Ainsi, Cailliet *et al.* (1996) considèrent que les systèmes d'EACAO ne permettent pas de traiter des échantillons préparés au moyen de méthodes rapides (brûlage, *in toto*) alors que Welleman & Storbeck (1995) et Troadec *et al.* (2000) évaluent des algorithmes entièrement automatisés sur des otolithes *in toto*. Contradictoires en apparence, ces comparaisons montrent que, bien que travaillant tous dans des contextes bien standardisés, les uns travaillent sur un sébaste profond, *Sebastes rufus*, à forte longévité et les autres sur un poisson plat, *Pleuronectes platessa*, à faible longévité et forte croissance.

Si les technologies numériques renferment un fort potentiel de gain de productivité, particulièrement dans le cadre des analyses en routine et de l'analyse des microstructures (numérisation par lots, travail en continu), celles-ci ne trouveront leur pleine expression que dans le développement d'algorithmes automatisés plus fiables permettant de limiter les interventions humaines et donc d'opérer en continu si nécessaire. Ce développement aura cependant pour corollaire un besoin accru en standardisation des préparations et des procédures de lecture, phénomène qui sera une des tendances lourdes en sclérochronologie dans les dix prochaines années.

1.5. Mémorisation

Qu'elle soit momentanée ou à long terme, la mémorisation des informations est un avantage certain des systèmes d'EACAO, allant de la simple possibilité de commenter en groupe sur un écran une image de la pièce calcifiée (Morison *et al.*, 1998), au lieu de se succéder sur les oculaires d'un microscope, jusqu'au stockage direct des mesures (Cailliet *et al.*, 1996) ou d'images interprétées (EFAN, 1998).

Cette capacité d'archiver des informations, brutes ou élaborées, est essentielle à toute activité à long terme et/ou à tout travail s'inscrivant dans un cadre d'échanges, en facilitant l'apprentissage des lecteurs novices, en permettant d'intensifier les échanges inter-lecteurs, en accroissant la stabilité dans le temps des interprétations et, enfin, en permettant d'éventuelles révisions de ces interprétations. Toutes ces vertus sont indispensables, notamment à qui veut s'inscrire dans une démarche d'« assurance qualité ».

Cet archivage présente cependant encore quelques défauts :

- l'image numérique, avec des moyens de numérisation conventionnels (caméra CCIR), ne permet pas d'atteindre la qualité de résolution d'un microscope moyen. Cette limitation tendra à s'estomper avec l'amélioration des matériels d'acquisition d'images ; les caméras numériques haute-définition (1024² pixels) fournissent déjà des images d'une qualité proche pour l'œil humain de celle des microscopes ;

- la disponibilité d'images figées (Morison *et al.*, 1998) qui ne permettent plus les effets dynamiques en cours d'observation, comme des variations d'éclairage, des changements d'orientation de l'échantillon ou de sa focalisation. De telles opérations sont cependant indispensables dans de nombreux cas de figures où l'information, tridimensionnelle par nature, doit souvent être exploitée dans l'épaisseur de l'échantillon. La plupart de ces limitations peuvent être partiellement résolues par l'acquisition de séquences d'images ou par la combinaison de données de différents plans focaux. Cela représente une quantité considérable de données, même stockées avec un taux de compression élevé, et signifie de toute façon la perte de l'interactivité. L'observation directe au microscope est encore souvent nécessaire ;

- la longévité des formats d'archivage d'images n'est pas connue, contrairement à celle des médias conventionnels. Les formats sont nombreux, depuis le célèbre format TIFF jusqu'au format JPEG, un des plus performants au niveau du taux de compression. Le rapport d'une table ronde de l'EFAN (EFAN, 1999) recommande, pour le stockage à long terme des images, l'utilisation de formats non compressés et, pour leurs données associées, le recours à un format ASCII. En fait, il s'agira de définir exactement la nature des informations à stocker et la durée nécessaire. La cellule « Traitement de l'information » de l'EFAN (EFAN, 1998, 2000) a suggéré un protocole utilisant un format propriétaire (PaintShopPro, JascTM) qui permettrait de gérer des « overlays » graphiques pour constituer une base de données d'images annotées accessible via Internet à toute la communauté scientifique (<http://www.efan.no/trol/refdbin.htm>).

Cette procédure a déjà été reprise par certains ateliers de lecture (Anon., 1998). Les solutions de stockage doivent s'adapter à l'utilisation.

2. Pour quel type d'étude ?

Nous venons de voir que les raisons de recourir à un système d'EACAO sont nombreuses et, bien que ces systèmes présentent encore quelques défauts, leur coût n'est plus réellement un obstacle. Néanmoins, les divers critères impliqués n'auront pas le même poids selon les objectifs de l'étude. Avons-nous besoin d'automatiser le comptage des zones de croissance, de mémoriser les interprétations, d'avoir un support d'échange avec d'autres lecteurs ? On distingue habituellement les estimations d'âge liées à des études ponctuelles de celles liées à des évaluations de ressources, qui sont par essence récurrentes (Morison *et al.*, 1998).

2.1. Études «ponctuelles»

Ces études visent à répondre à des questions ponctuelles sur l'âge et la croissance de certaines populations ou utilisent les pièces calcifiées comme enregistreurs afin d'analyser et de resituer temporellement certains paramètres (salinité, signature environnementale, etc.) ou certains événements (éclosion, migration, reproduction, métamorphose, etc.). Les échantillons sont alors collectés pendant quelques années puis sont traités au fur et à mesure ou regroupés pour un traitement en fin d'étude, bien souvent par une seule et même personne.

Dans ce type d'étude, le besoin de préservation à très long terme est moins évident et concerne souvent des analyses de microstructures, analyses qui nécessitent des outils permettant une bonne productivité. Si l'expérience en estimation de l'âge sur l'espèce cible est inexistante, on réalisera alors une étude de validation, sinon on cherchera à s'inter-calibrer avec d'autres lecteurs. Les études de validation peuvent être regroupées dans les études ponctuelles puisque leur but est de répondre à une question ponctuelle, c'est-à-dire celle de définir la périodicité d'apparition de certaines structures de PC. Dans ce cas, la préservation des résultats sous une forme arbitraire s'avère fondamentale.

2.2. Analyses en routine

Ces analyses consistent à établir sur une longue durée l'évolution de la structure démographique d'une population exploitée. C'est probablement le type d'activité le plus exigeant concernant la justesse, la précision et la stabilité des schémas interprétatifs inter et intra-lecteurs. Il exige évidemment une forte productivité pour faire face au volume important des échantillons. En général, les analyses en routine mettent en œuvre de multiples intervenants : échantillonneurs, préparateurs, lecteurs et dynamiciens. Elles devraient donc faire appel massivement aux systèmes d'EACAO. Il n'en est pourtant rien et la pénétration de ces systèmes s'avère plus forte parmi les experts impliqués dans les études

de recherche ponctuelle que dans les laboratoires réalisant des estimations d'âge en routine. Bien que possédant la plupart des qualités requises, leurs performances sont encore jugées en deçà de celles des opérateurs humains, notamment lorsqu'il ne s'agit que du comptage de quelques stries de croissance saisonnières. De plus, l'introduction de tels systèmes pourrait amener à une réfection des protocoles d'interprétation, d'une part, et nécessitera, d'autre part, de disposer de logiciels d'EACAO intégrant toute la chaîne d'analyse (acquisition, interprétation, mémorisation). Ces systèmes constitueront probablement l'ossature des laboratoires d'analyse en routine de demain, mais ils restent encore à développer.

Chapitre VII

Microchimie de l'otolithe

H. de Pontual, A.J. Geffen

A. Introduction

Depuis le début des années soixante-dix, un effort de recherche croissant a été consenti pour utiliser la composition chimique des pièces calcifiées (PC) comme source d'information permettant d'aborder un large éventail de questions en halieutique. Cette approche suppose que la composition chimique des tissus durs des poissons reflète les caractéristiques physico-chimiques de l'environnement au sein duquel ces poissons évoluent.

Les otolithes en particulier ont été qualifiés d'enregistreurs permanents de l'exposition à l'environnement (Campana *et al.*, 1997). Les otolithes sont métaboliquement inertes, peu susceptibles d'être résorbés ou remaniés (Campana & Neilson, 1985) et ils grandissent tout au long de la vie du poisson, de sorte que leur composition présente vraisemblablement le potentiel d'information environnementale le plus élevé de toutes les PC existantes.

Au cours des dernières années, on a assisté à un développement rapide des possibilités d'applications de la microchimie des otolithes (MCO) globalement divisées en deux thèmes de recherche : d'une part, les applications relatives à l'écologie halieutique (reconstitution de l'histoire individuelle des poissons) et, d'autre part, celles concernant les populations (discrimination de populations de poissons, validation des estimations d'âge). Comparés à d'autres carbonates biogéniques, les otolithes sont d'une exceptionnelle pureté. La MCO s'intéresse souvent à des variations à micro-échelle des concentrations élémentaires et dépend, par conséquent, d'un certain nombre d'avancées technologiques récentes en chimie analytique et en géochimie.

Le décodage de l'information chimique de l'otolithe se heurte à plusieurs problèmes : (i) les mécanismes de l'incorporation des éléments chimiques et leurs systèmes de régulation sont mal connus, (ii) il est difficile d'estimer l'incertitude (probabilité d'erreur) associée au résultat d'un processus de mesure particulièrement complexe puisque toutes les étapes menant à ce résultat, à partir de la capture du poisson, sont des sources potentielles d'erreur de mesure, et (iii) les analyses sont relativement coûteuses. Il en a parfois résulté des interprétations spéculatives et des conclusions contradictoires. Cependant, les avancées en matière de MCO se poursuivent, bénéficiant d'une base d'information croissante grâce aux études en cours, de développements technologiques et de progrès actuels concernant la compréhension du processus de biominéralisation.

Ce chapitre vise à donner un aperçu de l'état de l'art en MCO, en traitant des applications développées en écologie et gestion des pêcheries, des procédures analytiques et des incertitudes dans les processus analytiques. Il se réfère largement aux publications récentes de Campana (1999) et de Thresher (1999) qui offrent une vue d'ensemble des

connaissances actuelles en chimie de l'otolithe des poissons. Quelques définitions et principes chimiques de base sont proposés pour permettre au lecteur d'acquérir les notions essentielles à la compréhension des applications de la microchimie. La composition de l'otolithe et ses relations avec les conditions physiologiques et environnementales sont décrites en préalable à une discussion sur diverses applications. L'utilisation d'autres PC (écailles, vertèbres, rayons de nageoire, etc.) n'est que brièvement traitée, le développement des méthodes et des applications ayant été principalement focalisé, ces dernières années, sur l'analyse des otolithes. La fin de ce chapitre expose certains des problèmes méthodologiques qui doivent être pris en considération au démarrage de toute étude de microchimie.

B. Quelques définitions et principes chimiques de base

La théorie atomique de la matière de Dalton, laquelle constitue le fondement de la chimie moderne, définit l'ATOME comme la plus simple unité de matière capable d'une existence propre (i.e. qui ne peut être subdivisée en particules présentant les mêmes propriétés caractéristiques), l'ÉLÉMENT comme une substance constituée d'un seul type d'atomes, le COMPOSÉ comme une substance constituée de plus d'un type d'éléments et la MOLÉCULE comme une substance contenant deux atomes ou plus.

Bien que de nombreuses particules subatomiques soient maintenant connues, dans la plupart des cas, l'atome peut être considéré comme composé d'un noyau chargé positivement, contenant des protons (chargés positivement) et des neutrons (neutres), et entouré par un nuage d'électrons chargés négativement.

L'atome (et par conséquent l'élément et sa position dans le tableau périodique) est caractérisé par son numéro atomique (Z) correspondant au nombre de protons présents dans le noyau et par son nombre de masse (A) qui correspond au nombre total de protons et de neutrons (collectivement appelés nucléons) du noyau.

Les atomes ayant la même valeur Z mais différentes valeurs A (i.e. différents nombres de neutrons) sont appelés ISOTOPES. Les isotopes d'un même élément ont des propriétés chimiques presque identiques mais peuvent présenter des propriétés nucléaires très différentes, en termes de radioactivité, de caractéristiques magnétiques ou de masse.

Les variations de l'abondance relative des différents isotopes de chacun des éléments sont liées à différents processus tels que les fractionnements de masse, la désintégration radioactive ou certaines activités anthropiques (e.g. traitement des combustibles nucléaires, tests

d'armes atomiques, etc.). Les isotopes radioactifs sont des isotopes instables qui se désintègrent spontanément pour former d'autres isotopes. Les isotopes stables ne se désintègrent pas mais peuvent être produits par la désintégration d'isotopes radioactifs et sont alors appelés radiogéniques. Par exemple, il existe quatre isotopes naturels du strontium : ^{84}Sr (0,56 %), ^{86}Sr (9,86 %), ^{87}Sr (7,0 %), ^{88}Sr (82,58 %). Les nombres entre parenthèses indiquent l'abondance naturelle relative de ces isotopes stables. Le ^{87}Sr peut provenir de la nucléosynthèse primordiale, avec les autres isotopes stables de Sr, ou de la désintégration radioactive de ^{87}Rb .

Les isotopes stables des éléments légers tels que H, C, N, O et S sont souvent mesurés dans diverses études : écologie trophique, effets de la température et du métabolisme. On s'intéresse également depuis peu à la chimie des isotopes d'éléments lourds (e.g. Sr, U, Pb) comme indicateurs environnementaux (Chesney *et al.*, 1998 ; Hobson, 1999).

Les données isotopiques sont exprimées comme étant la différence relative d'un échantillon par rapport à un standard, selon la notation suivante :

$$(VII.1) \quad \delta^hM = ((^hM / ^lM)_x / (^hM / ^lM)_{std} - 1) \cdot 1000$$

où hM et lM sont des isotopes respectivement lourd et léger d'un élément M, x est l'échantillon et *std* le standard. Les valeurs delta (δ) sont exprimées en pour mille. Une valeur delta positive (négative) indique que le rapport d'un isotope lourd à un isotope léger est plus élevé (plus faible) dans l'échantillon que dans le standard. Plusieurs standards sont utilisés en fonction de l'élément analysé. Pour des carbonates formés à basse température, les valeurs $\delta^{18}\text{O}$ et $\delta^{13}\text{C}$ sont rapportées relativement soit au standard Peedee belemnite (PDB), soit à l'équivalent Vienna-PDB (VPDB). Les valeurs isotopiques de l'oxygène dans l'eau sont généralement rapportées relativement au standard mean ocean water (SMOW) ou au Vienna standard mean ocean water (VSMOW) pour les études en milieu marin, ou au Standard light Antarctic precipitation (SLAP) pour les études en milieu continental.

1. Fractionnement de masse des isotopes stables

Dans les molécules, la force requise pour rompre une liaison chimique entre les atomes diffère entre un isotope lourd et un isotope léger, ce qui explique que des fractionnements isotopiques se produisent entre des phases coexistantes au cours de processus physiques ou chimiques. Le fractionnement se produit par des processus cinétiques ou d'équilibre thermodynamique, ce dernier donnant lieu à un fractionnement isotopique qui dépend de la température. C'est le fondement de l'utilisation des isotopes stables en thermométrie.

Le fractionnement des isotopes entre deux phases A et B est exprimé, pour une température donnée, par le facteur de fractionnement α :

$$(VII.2) \quad \alpha_{A-B} = R_A/R_B$$

où R est un rapport isotopique tel que $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$, $^{18}\text{O} / ^{16}\text{O}$, etc.

En termes de valeurs δ , cette expression devient :

$$(VII.3) \quad \alpha_{A-B} = (1000 + \delta_A) / (1000 + \delta_B)$$

Les valeurs de α sont généralement très proches de l'unité pour la plupart des éléments intéressants, typiquement 1,00X, et il est habituel de discuter de fractionnement isotopique en termes de valeurs de X en pour mille.

De plus, le fractionnement en pour mille est approximativement égal à $10^3 \ln \alpha$ puisque $10^3 \ln(1,00X) \approx X$. En outre, quand les valeurs δ_A et δ_B sont inférieures à 10 environ, le fractionnement $10^3 \ln \alpha$ est très bien approché par la valeur Δ , définie comme :

$$(VII.4) \quad \Delta_{A-B} = \delta_A - \delta_B \approx 10^3 \ln \alpha$$

L'un des avantages de l'utilisation de l'expression « $10^3 \ln \alpha$ » tient au fait qu'aux températures usuelles en biologie (< 200° C), $10^3 \ln \alpha$ est quasi proportionnel à l'inverse de la température (1/T).

L'intérêt porté à l'utilisation des isotopes de l'oxygène des carbonates marins comme outil de mesure de paléotempératures remonte au début des années cinquante et Epstein *et al.* (1951, 1953) ont fourni les premières équations de paléotempérature à partir de l'étude de bivalves élevés en laboratoire. Le fractionnement isotopique est souvent mentionné comme étant à l'équilibre. Dans ce contexte, l'équilibre ne se réfère pas à une situation isotonique stable mais à un état d'énergie. L'état d'énergie d'équilibre peut être calculé directement à partir de la force des liaisons atomiques, qui diffère pour les différents isotopes. Étant donné que la température affecte l'état d'énergie d'une manière prévisible, le fractionnement isotopique lors de processus chimiques, tels que la précipitation, peut être calculé. Lorsque les rapports isotopiques mesurés dans les carbonates sont conformes aux prévisions (comme illustré dans les équations ci-dessus), le système est dit en équilibre.

2. Désintégration radioactive

Seule une faible proportion d'isotopes sont connus pour être indéfiniment stables. Tous les autres se désintègrent spontanément par des processus désignés sous le nom de désintégration radioactive. Ce processus transmute un isotope radioactif dit « père » en un isotope plus stable, dit « fils », spécifique à l'isotope père. Le processus continue jusqu'à ce qu'un noyau stable soit produit. Par exemple, la série radioactive de ^{238}U est constituée de 14 réactions de désintégration avant que l'isotope indéfiniment stable, ^{206}Pb , ne soit formé. La désintégration radioactive est un processus statistique qui dépend uniquement de l'instabilité de chaque radio-isotope particulier. L'activité de décroissance en fonction du temps peut être exprimée par l'équation radioactive exponentielle suivante :

$$(VII.5) \quad A^t = A^0 \cdot e^{-\lambda t}$$

où A^0 est l'activité initiale de l'isotope père (en becquerel ou en désintégration par unité de temps), A^t est l'activité au temps t et λ est la constante radioactive (en temps⁻¹).

Le taux de décroissance radioactive est exprimé soit par la demi-vie ou période radioactive T , temps nécessaire à la transformation de la moitié du stock initial d'un radio-isotope donné en son isotope fils, soit par la constante radioactive. Elles sont reliées comme suit :

$$(VII.6) \quad T = \ln 2/\lambda = 0,693/\lambda$$

Si l'activité initiale A^0 d'un système clos est connue ou peut être estimée, le temps écoulé depuis la formation du système peut être estimé à partir de l'équation VII.5. C'est le principe de base de la datation radiométrique. Quand A^0 n'est pas connu, la datation radiométrique peut être effectuée dans certains cas en employant les méthodes dites de déséquilibre radioactif, basées sur la mesure du taux d'activité de deux membres d'une famille radioactive.

Le principe est le suivant : dès lors qu'un isotope père (P) a été incorporé à un système, il commence à se désintégrer, processus qui génère une augmentation de l'activité d'un descendant D de plus courte période. L'activité de D, qui dépend de l'équilibre entre sa propre décroissance et sa production par la décroissance de P, est donnée par l'équation de Bateman :

$$(VII.7) \quad A_D = A_P^0 [\lambda_D / (\lambda_D - \lambda_P)] (e^{-\lambda_P t} - e^{-\lambda_D t}) + A_D^0 e^{-\lambda_D t}$$

dans laquelle le second terme correspond à l'activité résiduelle du descendant D qui était présent à $t=0$.

Le rapport des activités des isotopes père et fils peut être dérivé des équations VII.5 et VII.7 :

$$(VII.8) \quad A_D / A_P = [\lambda_D / (\lambda_D - \lambda_P)] (1 - e^{-(\lambda_D - \lambda_P)t}) + A_D^0 / A_P^0 e^{-(\lambda_D - \lambda_P)t}$$

Si le système n'est pas perturbé, un état d'équilibre dans lequel le rapport des activités reste constant sera atteint à une vitesse qui dépend des demi-vies de l'élément fils et de l'élément père. Deux situations peuvent se produire :

La première situation, connue sous le nom d'équilibre transitoire, apparaît lorsque les demi-vies de P et de D sont du même ordre, avec cependant, $T_P > T_D$. Dans ce cas, le rapport des activités augmente en fonction du temps, approchant la valeur de $T_P / (T_P - T_D)$ de manière asymptotique (fig. VII.1a).

La deuxième situation, appelée équilibre séculaire, se produit lorsque la demi-vie de P est beaucoup plus longue que la demi-vie de D et que la diminution de l'activité de P est négligeable à l'échelle de temps considérée. Dans ce cas, l'équation de Bateman se réduit à l'équation VII.9 et le rapport des activités se simplifie à l'équation VII.10 :

$$(VII.9) \quad A_D \approx A_P (1 - e^{-\lambda_D t}) + A_D^0 e^{-\lambda_D t}$$

$$(VII.10) \quad A_D / A_P = 1 - e^{-\lambda_D t} + A_D^0 / A_P^0 e^{-\lambda_D t}$$

Dans ce cas, le rapport des activités augmente avec le temps, approchant la valeur de 1 de manière asymptotique à une vitesse qui dépend de la demi-vie de l'isotope fils (fig. VII.1b).

En conclusion, dans les deux situations, la mesure du rapport des activités peut fournir une estimation du temps écoulé depuis l'incorporation de l'isotope père, dans l'échantillon de carbonate pour le cas

présent. Les demi-vies respectives des isotopes père et fils régissent l'échelle de temps sur laquelle la méthode pourra être appliquée. En raison de la forme exponentielle de la loi de décroissance, la précision des estimations, qui dépend des erreurs de mesure analytiques de l'activité des isotopes père et fils, diminue au fur et à mesure que l'on s'approche de l'état d'équilibre (fig. VII.1). Il est important de noter que la méthode n'est valide que si le système satisfait à certains critères discutés ci-après pour la datation radiométrique des otolithes.

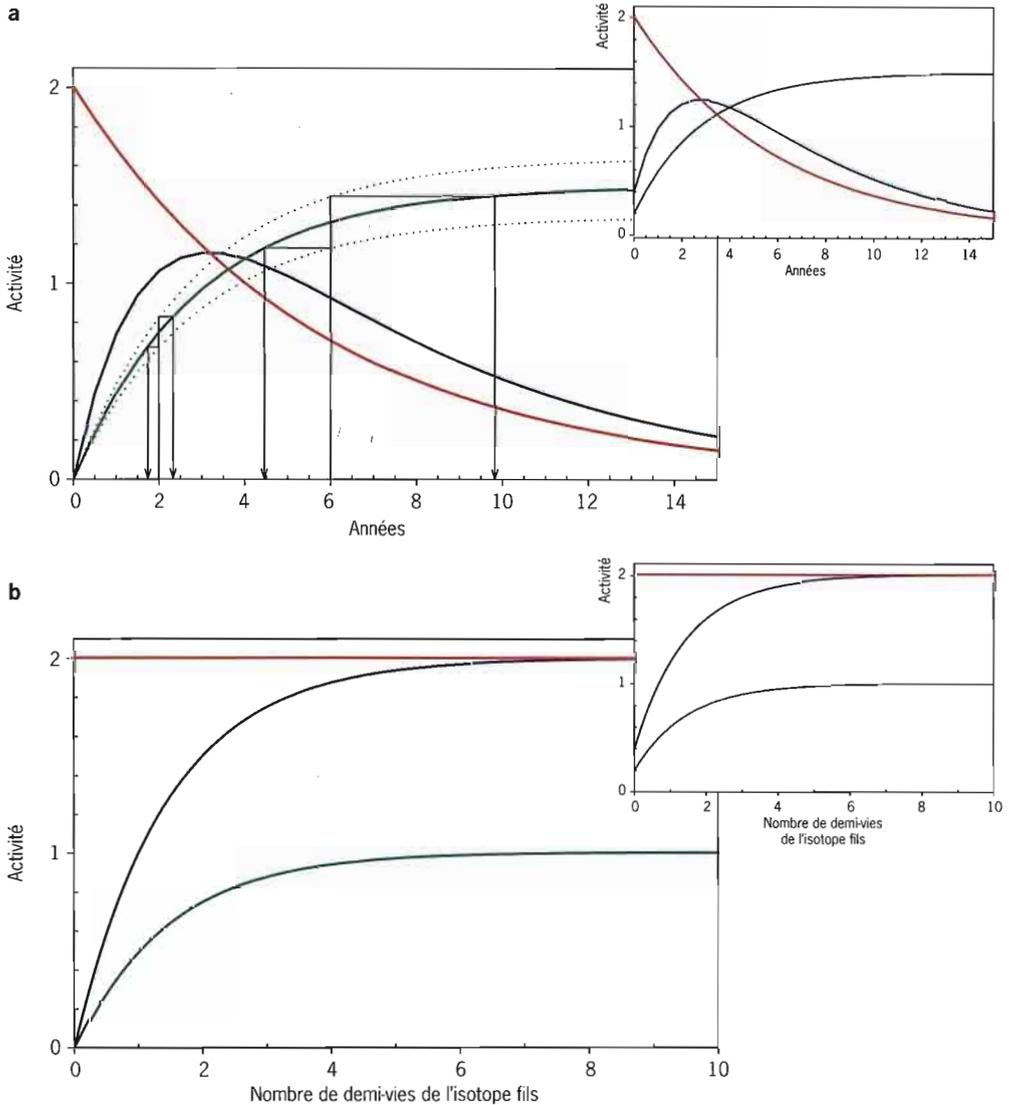


Figure VII.1 - Relations entre les activités de l'isotope père (courbe rouge) et de l'isotope fils (courbe bleue) et rapport des activités (courbe verte) en fonction du temps. (.....) estimations maximales et minimales du rapport des activités avec une erreur de mesure de $\pm 10\%$; (→) effet de l'erreur de mesure sur l'intervalle d'estimation de l'âge.

a) Situation d'équilibre transitoire. Modélisée avec $T_P = 5,76$ années et $T_D = 1,91$ année, correspondant respectivement aux demi-vies de ^{228}Th et de ^{228}Ra , et A_P arbitrairement fixée à 2. En encart: même modèle avec un rapport des activités initial fixé à 0,2.

b) Situation d'équilibre séculaire. A_P a été arbitrairement fixée à 2. En encart: même modèle avec un rapport des activités initial fixé à 0,2.

C. De quoi les otolithes sont-ils composés ?

Les otolithes se composent de carbonate de calcium (CaCO_3) cristallisé sur une matrice organique (Dannevig, 1956; Degens *et al.*, 1969). Ce sont des composés relativement purs, comme l'ont montré de nombreux travaux ciblés sur l'analyse élémentaire. Il est apparu, en effet, que la quantité totale d'impuretés inorganiques représente moins de 1 % de la masse de l'otolithe (Edmonds *et al.*, 1992; Thresher *et al.*, 1994; Proctor *et al.*, 1995; Campana *et al.*, 1997). Des études récentes suggèrent également que l'otolithe soit imprégné d'endolymphe, liquide dans lequel il baigne (Gauldie & Coote, 1997; Gauldie & Cremer, 1998; Milton & Chenery, 1998; Proctor & Thresher, 1998), ce qui suppose que la composante fluide peut jouer un rôle essentiel dans la détermination de la composition ultime de l'otolithe (Thresher, 1999).

Quelques études seulement ont été réalisées sur les composantes fluide et organique des otolithes bien qu'elles soient tout à fait essentielles à une meilleure compréhension de la croissance et de la composition des otolithes.

Comparée au plasma sanguin, l'endolymphe est riche en K^+ , relativement pauvre en Na^+ , elle présente une concentration en Ca total de $\sim 1\text{-}2$ mM et une teneur en protéines relativement faible (fig. VII.2). Son pH est plus alcalin que celui du plasma sanguin, contrairement à ce qui est observé chez les Vertébrés supérieurs (Mugiya & Takahashi, 1985; Payan *et al.*, 1997, 1998). Une caractéristique importante de l'endolymphe est que ses principaux constituants présentent des gradients de concentration proximo-distaux croissants ou décroissants. Ils agissent probablement comme des forces directrices dans le processus de biominéralisation et pourraient en outre générer une répartition hétérogène de certains éléments (e.g. K) à la surface de l'otolithe (Payan *et al.*, 1999). Bien que les mécanismes en soient encore mal appréhendés, il est aujourd'hui admis que les protéines de l'endolymphe jouent un rôle clé dans la précipitation du carbonate de calcium ou dans l'inhibition du processus, comme elles le font d'ailleurs dans d'autres processus de biominéralisation ou d'organominéralisation (impliquant de la matière organique non vivante) (voir e.g. Trichet & Defarge, 1995).

La matrice protéique de l'otolithe a été analysée pour la première fois par Degens *et al.* (1969) et dénommée « otoline ». La teneur en protéines totales d'un otolithe peut être divisée en deux composantes : protéines hydrosolubles (WSPs), d'une part, et protéines insolubles dans l'eau (WIPs), d'autre part. Chez le tilapia, les WSPs représentent près de 50 % du total des protéines. Elles sont caractérisées par une forte teneur en acides aminés acides et ont une excellente capacité de chélation du calcium (Asano & Mugiya, 1993). Elles contiennent une glycoprotéine probablement impliquée dans la régulation du taux d'accrétion en agissant comme inhibiteur de la calcification (Wright, 1991b). Le rôle des WIPs est vraisemblablement structural (Campana, 1999).

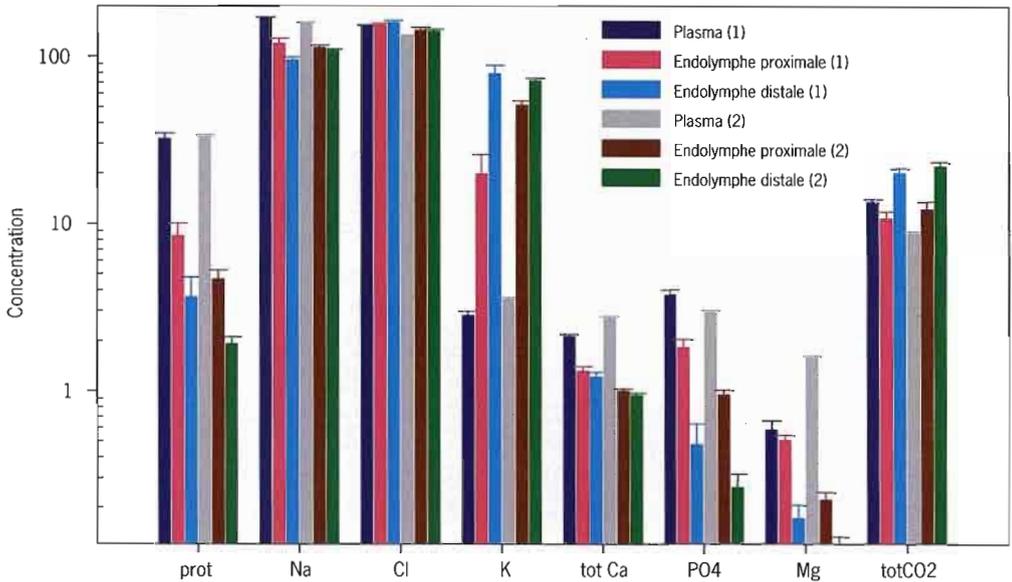


Figure VII.2

Concentrations en ions, en CO₂ total et en protéines dans le plasma et l'endolymphe sacculaire de la truite (1) et du turbot (2). Les concentrations sont données en millimole par litre pour tous les constituants excepté pour les protéines qui sont données en gramme par litre. D'après les données de Payan *et al.* (1999).

La composition élémentaire des otolithes a été largement établie ces dernières années pour une grande variété d'espèces et d'environnements. Campana (1999) fait état d'un total de 31 éléments détectés dans les otolithes, sans compter les radio-isotopes tels ceux de Th et de Ra. Comme on pouvait s'y attendre, étant donné les améliorations apportées aux limites de détection analytiques, d'autres éléments ont été détectés depuis (e.g. Sc, Ti, V : Geffen *et al.*, données non publiées, et Tl, Rb : Pontual *et al.*, 2000).

La figure VII.3 montre, sur le tableau périodique, la répartition des éléments détectés dans les otolithes. Pour les espèces marines, les éléments les plus abondants appartiennent aux groupes 1-2 et 14-17 du tableau périodique, ce qui reflète dans une certaine mesure l'abondance relative de ces éléments dans l'eau de mer. Les métaux de transition ainsi que les lanthanides et actinides sont moins abondants.

La gamme des concentrations élémentaires de l'otolithe en fonction des principaux types d'habitat est résumée dans la figure VII.4. Ca, C, et O constituent les éléments majeurs de l'otolithe du fait de la prédominance du carbonate de calcium. Sr, Na, K, S, N, Cl et P ont été trouvés à des concentrations supérieures à 100 ppm (éléments mineurs) tandis que tous les autres éléments sont présents à l'état de traces ou d'ultra-traces et ne peuvent être étudiés qu'au moyen de techniques analytiques extrêmement sensibles.

Il convient de noter que la composition élémentaire dépend de la forme cristalline de CaCO₃. Bien que l'aragonite soit la forme cristalline normale pour les *sagittae* et les *lapilli*, elle peut être remplacée, souvent partiellement, par la vaterite (ou plus rarement par la calcite) dans les otolithes anormaux dits « cristallins » (Carlström, 1963 ; Gaudie *et al.*, 1993). Les mécanismes de remplacement ne sont pas encore entièrement compris mais il en résulte clairement des différences dans les

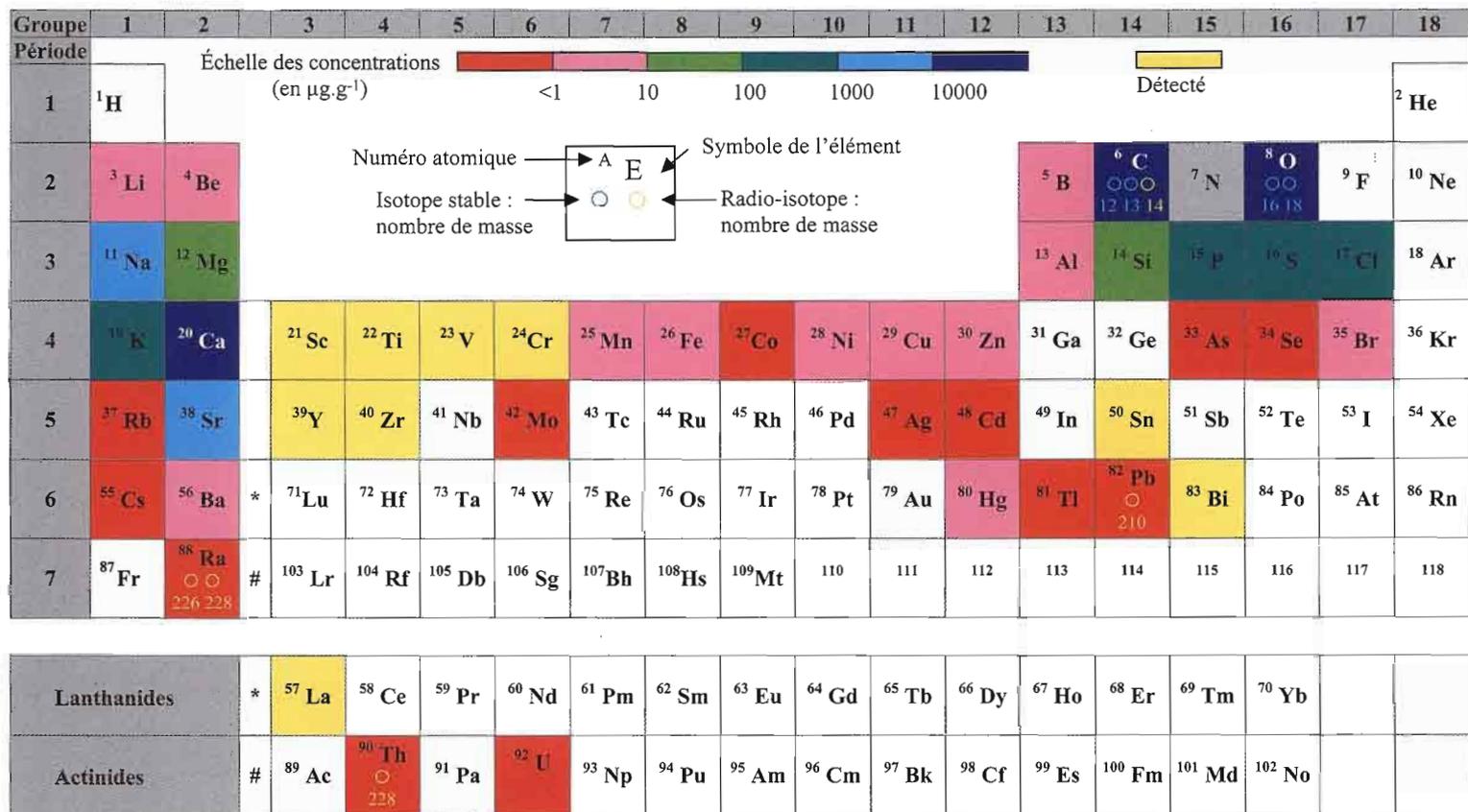


Figure VII.3 - Distribution, sur le tableau périodique, des éléments détectés dans les otolithes. La masse atomique est précisée pour les isotopes utilisés en chimie des isotopes stables ou pour la datation radiométrique. Les gammes de concentration s'appliquent aux résultats obtenus à partir de l'étude d'espèces marines. L'azote est présent en quantité significative en tant qu'élément de la composante protéique, mais sa concentration absolue est difficile à quantifier.

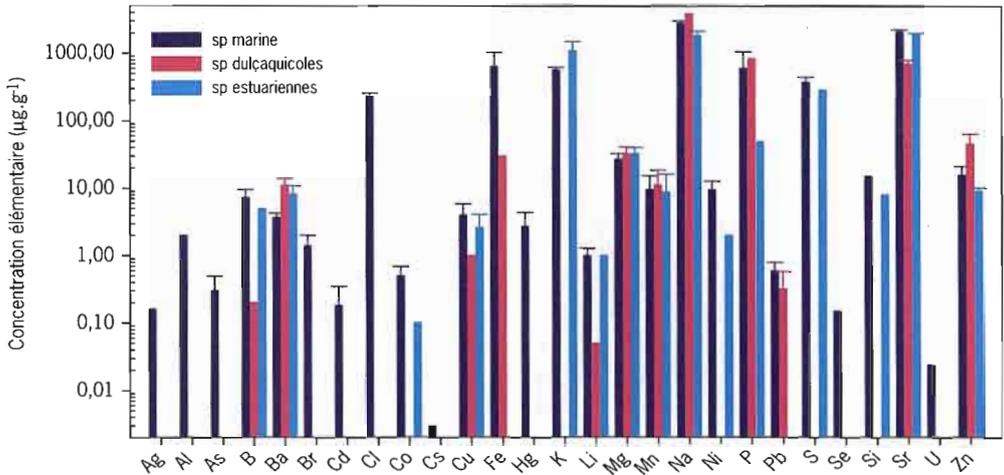
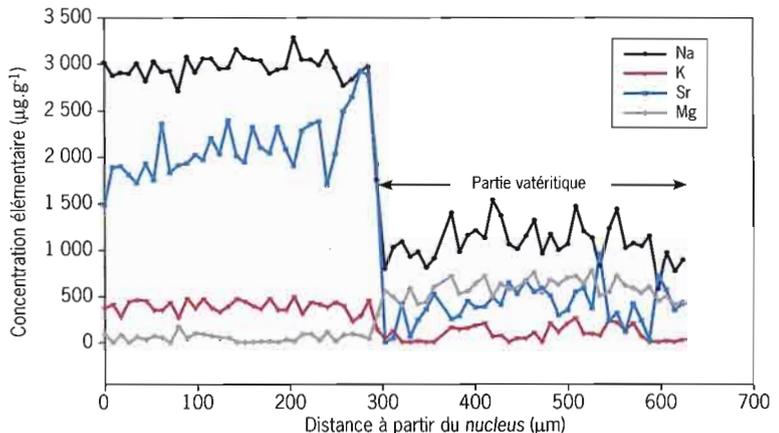


Figure VII.4 - Visualisation synthétique des données publiées concernant la composition des otolithes en éléments mineurs ou traces (moyenne \pm 1 ET) d'espèces occupant trois principaux types d'habitat. Les bâtons sans barres d'erreur indiquent les concentrations d'éléments qui n'ont été observées que dans une seule étude. La concentration en calcium (non représentée) correspond à $38,02 \pm 0,50 \%$ et $40,72 \pm 1,82 \%$ du poids des otolithes pour les espèces marines et d'eau douce respectivement. D'après les données de Campana (1999).

teneurs en éléments mineurs et traces : à titre d'exemple, la portion vatrétique d'un otolithe de turbot présente des concentrations inférieures en Sr, Na et K et supérieures en Mg et Ca à celles observées dans la partie aragonitique normale de l'otolithe (fig. VII.5). Brown & Severin (1999) rapportent également une diminution des concentrations en Sr, Na et K dans des otolithes vatrétiques, mais ne fournissent aucune donnée sur la concentration en Mg. Il est donc important de s'assurer que les otolithes soumis à l'analyse chimique sont normaux (aragonitiques), les otolithes vatrétiques devant être écartés des analyses de routine. La spectroscopie micro-raman peut déterminer avec précision la présence et la localisation de changements dans la forme cristalline de CaCO_3 (Gauldie *et al.*, 1997), information qui peut être utile pour l'interprétation de changements soudains (à une échelle spatiale fine) dans la composition élémentaire.

Figure VII.5
Changement dans la concentration élémentaire d'un otolithe de turbot partiellement vatrétique. Les mesures ont été obtenues en utilisant une microsonde WDS Cameca SX 50 équipée de cinq spectromètres (Pontual, données non publiées).



D. Incorporation des éléments dans l'otolithe : comment et où ?

Bien que cette question n'ait, jusqu'à présent, suscité qu'une attention relativement faible, il est crucial pour les applications de la MCO d'évaluer ce que recouvre réellement le processus de formation de l'otolithe.

À la différence d'autres processus de biominéralisation, la formation de l'otolithe est un processus acellulaire totalement dépendant de l'endolymphe. La translation de facteurs environnementaux dans la composition de l'otolithe est un processus complexe qui implique quatre compartiments emboîtés :

- le milieu extérieur où se produisent des variations des facteurs abiotiques ;
- le plasma sanguin qui répond au milieu extérieur mais présente également des variations endogènes ;
- l'endolymphe qui module les divers signaux et régule la formation de l'otolithe ;
- l'otolithe lui-même qui intègre et enregistre une réponse à l'ensemble de ces signaux.

L'état des connaissances concernant chacune de ces étapes dans la formation de l'otolithe et la façon dont elles affectent la composition de l'otolithe est résumé ci-après.

1. Du milieu extérieur (eau et nourriture) au plasma sanguin

Le contenu inorganique du plasma est principalement dérivé des eaux environnantes, soit par les échanges branchiaux chez les poissons d'eau douce, soit par assimilation à travers l'épithélium intestinal chez les poissons marins qui avalent des quantités d'eau considérables, phénomène impliqué dans les processus d'osmorégulation (Simkiss, 1974). Les processus d'absorption dépendent de multiples facteurs, y compris des propriétés chimiques de chacun des éléments (voir e.g. Phillips & Rainbow, 1994). Schématiquement, l'absorption des principaux ions métalliques alcalins, tels que Ca, Na et Cl, et celle des espèces ioniques non métalliques, telles que le chlorure, le sulfate et le phosphate, s'effectuent par l'intermédiaire de pompes de transport actif et elles sont fortement régulées. L'absorption de métaux traces dépend des concentrations ioniques ambiantes relatives et peut varier en fonction de l'espèce et de l'environnement. Le processus d'incorporation est alors considéré comme passif, n'exigeant pas de dépense d'énergie. Il dépend de l'affinité des ions hydrosolubles avec des ligands organiques (e.g. protéines chélatrices de métaux) présents dans la membrane des surfaces d'échange.

L'absorption des éléments dépend également des caractéristiques abiotiques de l'environnement telles que le pH, la salinité, l'oxygène dissous et la température, lesquelles déterminent la concentration en ions libres disponibles pour l'incorporation.

Parallèlement à l'absorption réalisée à partir des eaux environnantes, certains éléments, micronutriments essentiels et contaminants en particulier, sont fournis, au moins partiellement, par la nourriture, comme l'ont montré diverses études en nutrition des poissons et en écotoxicologie (voir e.g. Bijvelds *et al.*, 1998; Cooley & Klaverkamp, 2000). Actuellement, il est encore difficile de généraliser quant aux voies d'incorporation de tous les éléments. On a pu montrer, en particulier, que le Sr de l'otolithe provenait de l'assimilation à partir de la nourriture et de l'eau chez les stades juvéniles d'alose, *Alosa sapidissima* (Limburg, 1995), de tilapia, *Oreochromis niloticus* (Farrell & Campana, 1996) et de *Girella elevata* (Gallahar & Kingsford, 1996), et uniquement à partir de l'eau chez le tambour rouge, *Sciaenops ocellatus* (Hoff & Fuiman, 1995).

2. Du plasma sanguin à l'endolymphe

Quelques rares études ont examiné les relations entre la chimie du plasma et celle de l'endolymphe. Dans la continuité des tout premiers travaux sur la biominéralisation de l'otolithe menés par Mugiya et ses collaborateurs (Mugiya, 1966; Mugiya & Takahashi, 1985), Kalish (1991a) a examiné les effets de la physiologie et de l'environnement sur la chimie de l'otolithe en analysant les variations saisonnières de sa composition (Ca, Sr, Na, K, S) en fonction des variations de la chimie du plasma et de l'endolymphe. Le contenu ionique et divers métabolites tels que les protéines ont été analysés. Ces dernières déterminent la proportion d'ions libres échangeables par l'épithélium sacculaire. Les résultats ont indiqué que le statut physiologique des poissons du point de vue de la reproduction était le facteur principalement impliqué dans la variation saisonnière du rapport Sr/Ca de l'otolithe. Le jeûne diminue légèrement la concentration plasmatique en Ca et modifie l'équilibre acido-basique du plasma et de l'endolymphe mais le contenu ionique des deux fluides reste similaire, que les poissons soient alimentés ou privés de nourriture (Payan *et al.*, 1998). Edeyer *et al.* (2000) ont montré que la composition du plasma et de l'endolymphe varie au cours du nyctémère chez le turbot, les gradients ioniques endolymphatiques mis en évidence par Payan *et al.* (1999) étant cependant maintenus. Il n'existe aucune donnée sur le contenu de l'endolymphe en éléments traces et les mécanismes de transport des différents éléments par l'épithélium sacculaire sont encore discutés. Vu la complexité de la cartographie cellulaire de l'épithélium sacculaire, présentant différents types de ionocytes (Takagi, 1997; Pisam *et al.*, 1998), il est probable que des transports ioniques actifs et régulés se produisent au niveau de cette interface. De la correspondance entre

les rapports Sr/Ca plasmatique et endolymphatique, Kalish (1991a) a déduit que Ca et Sr sont vraisemblablement transportés dans l'endolymph par une voie paracellulaire. Mugiya & Yoshida (1995), travaillant sur des *sacculi* isolés de *Carassius auratus*, ont conclu, quant à eux, au transport de ces éléments par une voie transcellulaire.

3. De l'endolymphe à l'otolithe

La mesure dans laquelle les variations de la composition de l'endolymph affectent effectivement la composition de l'otolithe n'est pas encore clairement établie et les rares données disponibles sur ce sujet ne concernent que le calcium et quelques ions mineurs. Bien qu'il existe des relations évidentes entre la composition de l'endolymph et celle de l'otolithe (Kalish, 1989, 1991a; Payan *et al.*, 1999), il semble que la corrélation entre les deux milieux ne soit pas aussi forte qu'initialement présumée. Les données de Kalish (1991a) ne montrent pas de correspondance étroite entre les variations saisonnières de la composition de l'endolymph et celles de l'otolithe pour Na, K et Sr, bien que des tendances générales semblables soient observées pour Sr. Payan *et al.* (1999) ont montré que l'augmentation de la concentration endolymphatique distale en K est reflétée par le rapport K/Ca dans la partie distale de l'otolithe. Cependant, la différence entre les valeurs du rapport Na/Ca observées sur les faces proximale et distale de l'otolithe n'a pu être expliquée par les variations du rapport Na/Ca dans l'endolymphe.

Ce type d'étude pose divers problèmes du fait des caractéristiques propres de l'endolymphe et de l'otolithe et de limitations d'ordre méthodologique. Tout d'abord, la résolution temporelle diffère pour la mesure de la composition de l'endolymphe et celle de l'otolithe. Dans l'endolymphe, des changements instantanés peuvent être mesurés, ce qui permet d'observer des variations au cours du nyctémère (Edeyer *et al.*, 2000). Dans l'otolithe, les variations sont intégrées sur une durée qui dépend du diamètre de la sonde analytique (voir ci-dessous) et du taux de croissance de l'otolithe. De plus, les études de la composition endolymphatique ont le plus souvent utilisé une méthode limitant la mesure au contenu ionique total, alors que c'est la concentration en ions libres (i.e. non liés aux protéines chélatrices de métaux) qui constitue l'information utile en termes d'incorporation élémentaire dans l'otolithe. Enfin, les méthodes de mesure de la composition chimique des otolithes peuvent également être limitées par des interférences analytiques pour certains des éléments intéressants. Les processus d'incorporation spécifiques aux éléments n'ont pas encore été étudiés en détail. Les éléments peuvent être incorporés au cristal, adsorbés à sa surface ou directement liés aux polymères de la matrice organique. L'incorporation au cristal peut se produire soit par substitution, qui a lieu pour des cations de taille et de charge semblables à Ca (e.g. le Sr peut remplacer le Ca), soit par coprécipitation (e.g. formation de magnésite $MgCO_3$). On présume que Li et Ba partagent également

ce mode d'incorporation tandis que des éléments tels que Na, Cl, Zn et K pourraient être adsorbés à la surface du cristal dans l'espace inter-cristallin (Campana, 1999). On ne sait pratiquement rien des éléments qui pourraient être liés aux composés organiques, à l'exception de ceux qui constituent les acides aminés (C, H, O, N, P, S). De façon générale, les modes d'incorporation des cations sont mieux connus que ceux relatifs aux anions. L'incorporation des cations bivalents, par substitution dans la partie minéralisée de l'otolithe, et celle des cations monovalents, par adsorption au niveau des espaces inter-cristallins, sont les hypothèses qui ont prévalu par le passé. Cependant, au fur et à mesure que s'améliore la fiabilité du dosage des éléments traces, l'existence des différents mécanismes d'incorporation devra être prise en compte et conciliée avec les modèles de composition de l'otolithe. Dans cette perspective, le manque actuel de données sur les éléments liés à la composante organique de l'otolithe s'avère particulièrement problématique.

4. Éléments susceptibles de varier en fonction de leur disponibilité dans l'environnement

Cette question est évidemment de première importance pour la MCO. Campana (1999) a identifié les éléments susceptibles de varier selon leur disponibilité environnementale, sur la base d'arguments résumés ici.

Tout d'abord, le coefficient de distribution D_e d'un élément entre l'eau et l'otolithe est un indicateur utile de son niveau de régulation physiologique, permettant sa discrimination à l'une ou plusieurs des interfaces (branchie, intestin, épithélium sacculaire, otolithe). Le coefficient de distribution est donné par :

$$D_e = (\text{élément}/\text{Ca})_{\text{otolithe}} / (\text{élément}/\text{Ca})_{\text{eau}}$$

où élément et Ca sont des concentrations molaires.

De très faibles coefficients de distribution ($< 0,05$) sont observés pour des éléments tels que Na, K et Cl. Pour Sr, le coefficient de distribution est d'environ 0,14 et, pour de nombreux éléments traces, il est supérieur à 0,25, voire proche de 1.

De plus, des comparaisons de données publiées sur les compositions (normalisées à Ca) de l'eau, du plasma sanguin et des otolithes pour des espèces vivant en eau douce et en mer ont donné des relations contradictoires pour Mg, Cu, P et Na. Une meilleure cohérence a pu être relevée dans le cas d'éléments tels que Sr, Zn, Pb, Mn, Ba et Fe, indiquant que leur abondance relative dans l'environnement pouvait être reflétée dans l'otolithe. Campana (1999) a également noté que les concentrations en Li, Cd, Ni et autres éléments moins abondants dans l'otolithe pourraient également refléter correctement leurs disponibilités environnementales.

Cette classification demeure quelque peu spéculative et demande de plus amples recherches. Comme l'a noté Thresher (1999), la distinction entre, d'une part, les ions mineurs, régulés physiologiquement et, d'autre part, les éléments traces « non régulés » pourrait s'avérer problématique puisque certains éléments traces sont connus pour leur implication dans le métabolisme du poisson comme micronutriments essentiels ou pour leur toxicité (ou encore les deux en fonction du niveau de concentration). Par exemple, on sait que Zn, micronutriment essentiel impliqué dans la formation des tissus osseux et cartilagineux du poisson, devient toxique à des concentrations élevées. On pense par ailleurs que le cadmium, métal toxique également présent dans l'environnement, est susceptible d'interférer avec le métabolisme de Zn. Baskin *et al.* (1999) ont montré que l'assimilation intestinale des deux éléments pouvait varier, peut-être du fait de la présence de transporteurs de Zn dans l'intestin. En ce qui concerne l'incorporation de Zn dans l'otolithe, on ne sait pas, par exemple, si les oscillations annuelles de la concentration en Zn observées dans les otolithes de *Salvelinus alpinus* reflètent des variations de la biodisponibilité environnementale ou du métabolisme du poisson (Halden *et al.*, 2000).

E. Applications de la microchimie de l'otolithe

1. Schémas migratoires et histoire environnementale

1.1. Salinité

1.1.1. Comportement migratoire révélé par le rapport Sr/Ca

En milieu océanique, le Sr et le rapport Sr/Ca présentent une variabilité spatiale relativement faible (2-3 %), avec des eaux de surface légèrement appauvries par rapport aux eaux profondes, ainsi que des valeurs pour les eaux de surface plus élevées aux hautes latitudes et dans les zones d'upwelling (Villiers, 1999). Bien qu'elles varient fortement en fonction de la géologie et des conditions climatiques et hydrographiques, les concentrations en Sr et Ca en eau douce sont beaucoup plus faibles (environ $60 \mu\text{g.l}^{-1}$ et $1,5 \cdot 10^4 \mu\text{g.l}^{-1}$ respectivement, contre $8000 \mu\text{g.l}^{-1}$ et $4,2 \cdot 10^5 \mu\text{g.l}^{-1}$ en eau de mer). La variabilité du rapport Sr/Ca (d'un facteur 5 environ) entre l'eau douce et l'eau de mer a servi de fondement à l'utilisation du rapport Sr/Ca dans les recherches sur les stratégies de migration de nombreuses espèces. Le rapport Sr/Ca peut être mesuré à l'aide de techniques diverses dont certaines offrent une résolution spatiale (donc temporelle) élevée (fig. VII.5 et chap. VII.G).

Les espèces qui entreprennent des migrations diadromes au cours de leur cycle de vie ont été largement étudiées. Les anguilles (*Anguilla* spp.) présentent une nette diminution du rapport Sr/Ca dans l'otolithe lors de leur migration du milieu marin au milieu continental (Casselman, 1982; Otake *et al.*, 1994; Tzeng *et al.*, 1997). Cependant, la comparaison du profil chronologique de la concentration en Sr avec les discontinuités structurales observées sur l'otolithe au moment de la métamorphose indique que la diminution initiale du rapport Sr/Ca n'est pas due au changement d'habitat mais serait associée à la transformation de la larve leptocéphale en civelle. De tels profils chronologiques ont également fourni un certain nombre d'informations concernant la vitesse à laquelle les poissons colonisent les nourriceries estuariennes.

Des relations étroites entre la concentration en Sr dans l'otolithe et la salinité ambiante ont également été observées chez des Salmonidés et ont été utilisées afin de distinguer les individus anadromes des individus sédentaires (Kalish, 1990; Halden *et al.*, 1995; Babaluk *et al.*, 1997). Certains cas de sédentarité ont également été identifiés chez des populations de bar d'Amérique *Morone saxatilis* auxquelles on attribuait auparavant un comportement migratoire anadrome (Secor *et al.*, 1995b; Secor & Piccoli, 1996).

La concentration en Sr dans les otolithes a été également utilisée pour étudier l'avalaison de juvéniles d'aloses *Alosa* spp. (Limburg, 1995, 1998), la dépendance côtière spécifique à l'âge et la taille de *Morone*

saxatilis adultes et les migrations de frai de différentes espèces (Secor & Rooker, 2000).

Les études de terrain ont été confirmées par des validations en laboratoire. Par exemple, Secor *et al.* (1995b) ont montré que les rapports Sr/Ca dans les otolithes de juvéniles de *M. saxatilis* étaient corrélés à la salinité ambiante. Ces auteurs ont également montré que les otolithes de poissons exposés à des changements de salinité présentaient également des fluctuations du rapport Sr/Ca correspondant aux variations de salinité expérimentales (Secor *et al.*, 1995b). Le rapport Sr/Ca dans l'otolithe reflète le rapport Sr/Ca ambiant, plus que la salinité *per se* ou que la concentration absolue de l'eau en Sr. Cela pourrait expliquer pourquoi les études ayant manipulé la salinité sur une gamme de variations relativement étroite (e.g. Fowler *et al.*, 1995) ont échoué dans leurs tentatives d'établir une relation claire entre le rapport Sr/Ca dans l'otolithe et la salinité ambiante.

1.1.2. Composition isotopique du Sr

Il est clairement établi que la composition isotopique de Sr dissous (mesurée par le rapport $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$) dans les rivières dépend de la géologie locale et qu'elle est donc spécifique du lieu considéré. Partant de l'hypothèse selon laquelle il n'y a pas de fractionnement isotopique de Sr lors de l'absorption et de l'incorporation, l'existence d'une forte corrélation entre le rapport $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ dans l'otolithe et le rapport $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ dans l'eau ambiante était prévisible. Cette hypothèse a été validée pour la première fois sur des juvéniles de *Salmo salar* (Kennedy *et al.*, 1997). En outre, Kennedy *et al.* (2000) ont montré que la nourriture contribuait à la majeure partie du Sr de l'otolithe de saumon, suggérant ainsi le risque d'identification erronée de l'origine des individus lorsque les comparaisons sont réalisées à partir de la seule signature chimique des eaux alimentant les éclosiers (Ingram & Weber, 1999).

En manipulant expérimentalement la température et la salinité de l'eau d'élevage de juvéniles de *Brevoortia patronus*, Chesney *et al.* (1998) ont trouvé que le rapport $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ dans l'otolithe reflétait la salinité de l'eau d'élevage mais qu'il n'était pas affecté par la température de l'eau. Cependant, ils ont conclu que l'utilité des rapports isotopiques de Sr comme indicateurs précis de la salinité était limitée aux environnements de faible salinité (<20) ou pour des gammes de salinité étendues.

1.1.3. Isotopes stables

Les masses d'eau sont souvent caractérisées par des différences dans les rapports isotopiques de l'oxygène. Ce phénomène permet de retracer les mouvements des poissons entre les masses d'eau en mesurant les rapports isotopiques de l'oxygène dans les otolithes. Le rapport des isotopes de l'oxygène dans l'otolithe dépend à la fois de la température et de la composition de l'eau. En milieu océanique, la gamme de variation des isotopes dans l'eau est étroite et la plupart des variations des rapports isotopiques de l'oxygène observées dans les otolithes sont

dues à des différences de température (fig. VII.6a). En eau douce par contre, les rapports isotopiques de l'oxygène varient considérablement en fonction de l'origine de l'eau. Pour les poissons d'eau douce ou de zones côtières recevant des eaux continentales, ces rapports sont influencés à la fois par la température et par les rapports des isotopes de l'oxygène des eaux environnantes (fig. VII.6b). Dans ces milieux, une reconstitution précise des températures exige la réalisation d'échantillonnages simultanés de l'eau afin de mesurer les rapports isotopiques environnementaux. Cependant, pour étudier les migrations, des valeurs relatives de rapports isotopiques peuvent s'avérer suffisantes et permettre, par exemple, de différencier des individus migrateurs et sédentaires (Nelson *et al.*, 1989; Kalish, 1990; Northcote *et al.*, 1992).

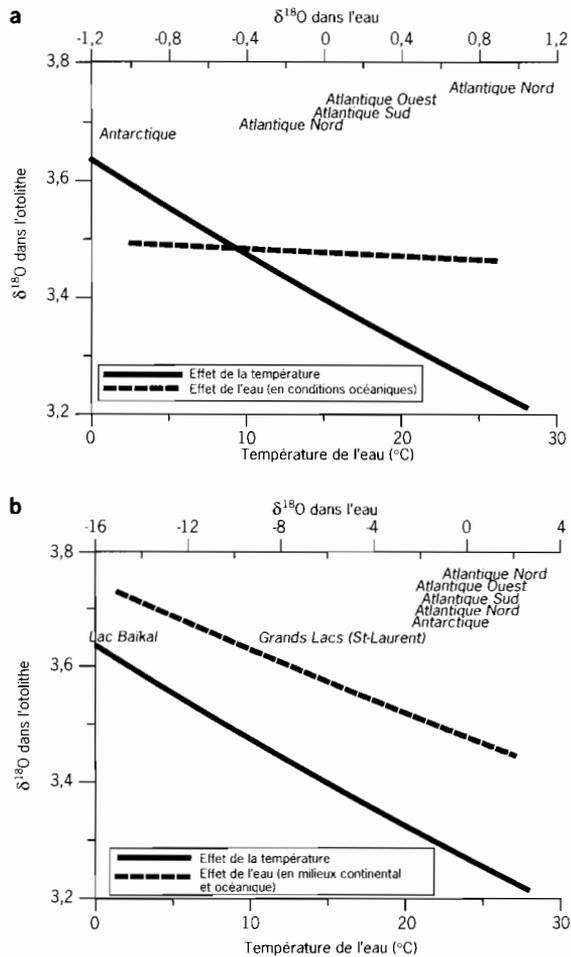


Figure VII.6 - Relations entre le rapport des isotopes de l'oxygène dans l'otolithe ($\delta^{18}O$ dans l'otolithe) et la température de l'eau (trait continu, axe inférieur) et le rapport des isotopes de l'oxygène dans l'eau ($\delta^{18}O$ dans l'eau).

- a) dans des environnements marins représentatifs comme spécifiés.
 b) en milieux continentaux et marins représentatifs comme spécifiés.

Jusqu'à une date récente, les rapports des isotopes de l'oxygène dans les otolithes ne pouvaient être mesurés que globalement (après dissolution d'otolithes entiers, éventuellement de noyaux d'otolithes) et il était, par conséquent, difficile de retracer des mouvements à petite échelle et des migrations individuelles. L'utilisation de micro-fraises permet aujourd'hui d'échantillonner l'otolithe de façon ponctuelle en suivant les zones de croissance. Jusqu'à 20 échantillons de ce type peuvent être retirés de chaque *annulus* grâce à des systèmes de micro-fraisage contrôlés par ordinateur (Wurster *et al.*, 1999; Weidman & Millner, 2000).

1.2. Température

1.2.1. Les rapports Sr/Ca peuvent-ils servir d'indicateurs de l'histoire thermique individuelle?

Selon certaines études pionnières en géochimie, des quantités croissantes de Sr doivent se substituer à Ca dans les carbonates inorganiques au fur et à mesure que la température diminue (Kinsman & Holland, 1969 *in* Gallahar & Kingsford, 1996). Les rapports Sr/Ca ont été mesurés dans des squelettes coralliens et considérés comme des thermomètres enregistreurs (e.g. Smith *et al.*, 1979). De nombreuses expériences de terrain et de laboratoire ont été réalisées sur les otolithes mais les conclusions avancées sont pour le moins contradictoires. Des relations négatives, positives, inexistantes ou non cohérentes ont été trouvées entre le rapport Sr/Ca et la température (tab. VII.1).

Kalish (1989) a rapidement émis des doutes au sujet de la dépendance universelle du rapport Sr/Ca à la température dans les otolithes de poissons, suggérant que la concentration en Sr de l'endolymphe pouvait varier de manière saisonnière et en fonction de l'âge pour une espèce donnée, plutôt que répondre directement à la température.

Townsend *et al.* (1992) ont avancé qu'à des températures extrêmement basses, les poissons perdent leur capacité à réguler physiologiquement la pénétration de Sr dans l'endolymphe par la concentration plasmatique en protéines chélatrices du calcium. Ces auteurs ont également montré que le ralentissement de la croissance et du métabolisme au cours de l'hiver confortait l'hypothèse de processus d'interférence physiologique sur l'incorporation du strontium. Cette hypothèse a été confirmée par Sadovy & Severin (1992, 1994) qui n'ont pas trouvé d'effet direct de la température mais ont rapproché la variation du rapport Sr/Ca de celle du taux de croissance somatique.

L'absence d'un effet universel de la température a été « expliquée » par plusieurs auteurs comme résultant des différents processus de régulation de l'incorporation du strontium et, plus généralement, de chacun des éléments. À cause de l'influence potentielle de multiples facteurs endogènes (espèce, ontogenèse, âge, croissance somatique, sexe, statut reproductif) et exogènes (température, salinité, « stress » et régime alimentaire) et de leurs interactions, la généralisation de cet effet semble être aujourd'hui bien plus complexe que prévue.

Tableau VII.1 - Quelques effets de la température sur le rapport Sr/Ca (voir aussi Secor & Rooker, 2000).

Espèces	Stade ontogénique	Expérience	T° C	Sr/Ca = f(T)	Commentaires	Référence
<i>Arripis trutta</i>	Juvénile	Élevage en laboratoire	13-22	→ ↗	Pas de relation évidente	(Kalish, 1989)
<i>Fundulus heteroclitus</i>	Larve	Élevage en laboratoire	16-32	↗ ↘	Ajustement d'un modèle linéaire	(Radtke & Morales-Nin, 1989)
<i>Clupea harengus</i>	Larve	Élevage en laboratoire	6-13	↗ ↘	Ajustement d'un modèle linéaire	(Radtke <i>et al.</i> , 1990)
<i>Clupea harengus</i>	Juvénile	Élevage en laboratoire	2-18	↗ ↘	Ajustement d'un modèle hyperbolique	(Townsend <i>et al.</i> , 1992)
<i>Gadus morhua</i>	Larve	Élevage en laboratoire	5-14	↗ ↘	Ajustement d'un modèle exponentiel	(Townsend <i>et al.</i> , 1995)
<i>Haemulon plumieri</i>	Adulte	Pêche	11-30	→ ↗	Relation inverse entre Sr/Ca et taux de croissance somatique	(Sadovy & Severin, 1992)
<i>Epinephelus guttatus</i>	Adulte	Pêche	17-30	→ ↗	Relation inverse entre Sr/Ca et taux de croissance somatique	(Sadovy & Severin, 1994)
<i>Sciaenops ocellatus</i>	Larve Juvénile	Élevage en laboratoire	21-34	↗ ↗	Modèle ajusté (Sr/K, Ca, Na); le jeûne et la salinité ont également été étudiés	(Hoff & Fuiman, 1995)
<i>Pagrus major</i>	Juvénile	Élevage en mer	21-29	↗ ↗	Fe, Mn, Zn ont également été étudiés	(Arai <i>et al.</i> , 1995)
<i>Girella elevata</i>	Juvénile	Élevage en laboratoire	19 et 28	→ ↗	Incohérence des effets d'une température croissante ou décroissante; les effets d'un enrichissement de l'eau en Sr et du jeûne ont également été étudiés	(Gallahar & Kingsford, 1996)
<i>Morone saxatilis</i>	Juvénile	Élevage en laboratoire	15 et 25	→ ↗, ↗ ↘	Incohérence des effets de la température avec des salinités variables	(Secor <i>et al.</i> , 1995b)

1.2.2. Isotopes stables

Le $\delta^{18}\text{O}$ des organismes marins a été largement utilisé en géosciences pour estimer les conditions de température rencontrées par les organismes au cours de leur vie. L'utilisation de coraux vivants et fossiles et de foraminifères est devenue un outil standard pour l'estimation des variations climatiques à l'échelle des temps géologiques et la littérature disponible sur le sujet est tout à fait considérable. De récents articles fournissent des exemples de la diversité des travaux : étude des oscillations du phénomène El Niño dans le Pacifique par l'analyse de coraux bâtisseurs de récifs (Wellington & Dunbar, 1995), étude des changements globaux de température, basée sur l'analyse de la silice biogène (Shemesh *et al.*, 1992) et estimation du réchauffement au cours des périodes interglaciaires dans la mer Egée, en partie basée sur l'analyse de foraminifères fossiles (Aksu *et al.*, 1995).

L'application de ces techniques repose sur l'hypothèse selon laquelle le fractionnement des isotopes de l'oxygène au cours de la précipitation du carbonate biogénique est gouverné par des conditions d'équilibre thermodynamique prévisibles, uniquement déterminées par des propriétés physico-chimiques. La température affecte le rapport des isotopes de l'oxygène impliqués dans des réactions chimiques (et, dans le cas présent, lors de la précipitation du carbonate de calcium) parce que la force des liaisons chimiques diffère d'un isotope à l'autre. Le $\delta^{18}\text{O}$ augmente quand la température diminue parce que les liaisons ^{18}O sont plus résistantes et qu'une quantité d'énergie moindre est disponible pour relâcher ces isotopes dans les réactions chimiques. Deux processus essentiels peuvent affecter les rapports des isotopes de l'oxygène et, par conséquent, les estimations de température à partir de carbonates biogènes. Le premier processus concerne l'existence de possibles « effets vitaux » englobant les différences interspécifiques dans la relation température-isotope et les mécanismes physiologiques affectant potentiellement la participation préférentielle des isotopes. Des différences interspécifiques ont été notées. Lorsqu'ils existent, les écarts à l'équilibre sont généralement attribués à des facteurs biochimiques et métaboliques qui résultent en une modification des signatures isotopiques préservées dans le carbonate de calcium. Ainsi, des variations du taux de croissance peuvent générer des changements dans la cinétique de la précipitation et dans l'incorporation de CO_2 respiratoire additionnelle à celle de CO_2 inorganique dissous, normalement utilisé au cours de la calcification. Dans de telles circonstances, l'enregistrement isotopique conservé par l'aragonite n'est plus simplement fonction de la variation de la température et dépendra en partie de facteurs physiologiques pouvant être spécifiques à l'organisme. Il est par conséquent fondamental de vérifier l'hypothèse d'équilibre du fractionnement isotopique et, plus particulièrement, de pouvoir tester indépendamment les influences respectives du métabolisme individuel (ou du taux de croissance) et de la température. Il est par ailleurs probable que, à une température donnée, les différentes formes de carbonate telles que l'aragonite et la calcite diffèrent dans leur concentration en ^{18}O (Grossman & Ku, 1986).

Le second processus qui affecte le rapport des isotopes de l'oxygène dans les carbonates est le rapport des isotopes de l'oxygène dans l'eau (fig. VII.6), lequel varie principalement en fonction de la salinité et de l'origine de l'eau. De manière générale, les eaux marines présentent une gamme de variation peu étendue (-0,30 – 0,05). Les eaux polaires présentent des valeurs inférieures à celles de l'océan moyen. Les eaux appauvries en ^{18}O par rapport au SMOW (δ négatif) sont dites plus légères. Les eaux douces quant à elles présentent des variations plus importantes. Ainsi, le $\delta^{18}\text{O}$ du lac Baïkal est de -15,8, celui des Grands Lacs du Saint-Laurent variant de -6 à -9.

L'utilisation des rapports isotopiques pour l'étude de la biologie de populations actuelles de poissons a été principalement basée sur l'étude d'échantillons provenant d'habitats naturels variés (Devereux, 1967; Mulcahy *et al.*, 1979; Nelson *et al.*, 1989; Doering, 1991; Iacumin *et al.*, 1992; Meyer-Rochow *et al.*, 1992; Northcote *et al.*, 1992; Gauldie *et al.*, 1994).

À ce jour, la plupart des études expérimentales sur les poissons ont démontré une étroite relation entre la température et les rapports isotopiques de l'oxygène. Les rapports isotopiques du carbone sont plus fortement influencés par la croissance que par la température ambiante (Radtke, 1984; Kalish, 1991b,c; Gauldie, 1996; Radtke *et al.*, 1996, 1998; Thorrold *et al.*, 1997; Gao & Beamish, 1999). Cependant, il existe peu d'études qui aient suivi ou contrôlé des facteurs importants tels que le taux de croissance individuel ou bien les rapports isotopiques dans l'eau des bassins expérimentaux. Au cours d'une expérience soigneusement contrôlée, Thorrold *et al.* (1997) ont montré que le rapport des isotopes de l'oxygène constituait un indicateur fiable de la température chez *Micropogonias undulatus*, et qu'il était en outre relativement indépendant du taux de croissance individuel.

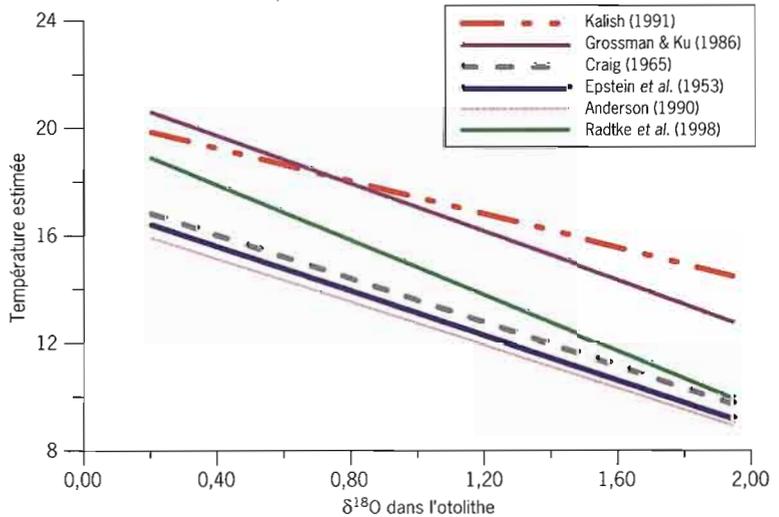
De nombreuses équations reliant la température aux rapports isotopiques de l'oxygène dans les carbonates ont été publiées (tab. VII.2 et fig. VII.7). Ces équations ont été obtenues sur différents taxons, voire différentes formes cristallines, et elles se distinguent principalement par l'ajustement de modèles polynomiaux ou linéaires. Elles diffèrent également par leurs ordonnées à l'origine et parfois leurs pentes (fig. VII.7). Peu d'études ont comparé des groupes d'espèces sur une large gamme de températures. Les travaux publiés concernent deux espèces de poissons marins, *Micropogonias undulatus* (Thorrold *et al.*, 1997) et *Gadus morhua* (Radtke *et al.*, 1996, 1998) et une espèce d'eau douce, *Arripis trutta* (Kalish, 1991c). Les gammes de température rencontrées dans ces études ne se chevauchent pas. Il est par conséquent difficile de généraliser sur la relation exacte entre la température et les rapports isotopiques de l'oxygène dans les otolithes de poissons. Il est vraisemblable que la relation soit curvilinéaire bien que les modèles polynomiaux publiés soient dérivés d'études sur les Invertébrés et non sur les Poissons.

Toutes les preuves expérimentales disponibles indiquent qu'il existe une relation fiable entre la composition isotopique de l'oxygène de l'aragonite de l'otolithe et les conditions environnementales rencontrées par les individus bien que l'estimation de la température dépende de l'équation utilisée (tab. VII.2). Il existe de nombreuses applications pour lesquelles des variations relatives de température constituent de précieuses informations et où la justesse des estimations de température n'est en conséquence pas un problème essentiel. Pour obtenir des estimations de température justes, il faudrait davantage de données expérimentales afin de mieux définir la forme exacte de la relation entre le rapport des isotopes de l'oxygène dans l'otolithe et la température de l'eau.

Tableau VII.2 - Équations publiées donnant la température de l'eau en fonction des rapports isotopiques de l'oxygène dans les carbonates.

Taxon	Forme cristalline du CaCO ₃	Relations avec la température	Références
Mollusques	calcite & aragonite	$T^{\circ}\text{C} = 16,5 - 4,3 (\delta^{18}\text{O}_{\text{carb}} - \delta^{18}\text{O}_{\text{eau}}) + 0,14 (\delta^{18}\text{O}_{\text{carb}} - \delta^{18}\text{O}_{\text{eau}})^2$	(Epstein <i>et al.</i> , 1953)
Non précisé	calcite	$T^{\circ}\text{C} = 16,9 - 4,2 (\delta^{18}\text{O}_{\text{carb}} - \delta^{18}\text{O}_{\text{eau}}) + 0,13 (\delta^{18}\text{O}_{\text{carb}} - \delta^{18}\text{O}_{\text{eau}})^2$	(Craig, 1965)
Foraminifère	aragonite	$T^{\circ}\text{C} = 20,6 - 4,34 (\delta^{18}\text{O}_{\text{carb}} - \delta^{18}\text{O}_{\text{eau}})$	(Grossman & Ku, 1986)
Non précisé	calcite	$T^{\circ}\text{C} = 16,0 - 4,14 (\delta^{18}\text{O}_{\text{carb}} - \delta^{18}\text{O}_{\text{eau}}) + 0,13 (\delta^{18}\text{O}_{\text{carb}} - \delta^{18}\text{O}_{\text{eau}})^2$	(Anderson, 1990)
Poisson	aragonite	$T^{\circ}\text{C} = 20,52 - 3,067 (\delta^{18}\text{O}_{\text{carb}})$	(Kalish, 1991a)
Poisson	aragonite	$T^{\circ}\text{C} = 22,09 - 4,76 (\delta^{18}\text{O}_{\text{carb}} - \delta^{18}\text{O}_{\text{eau}})$	(Thorrold <i>et al.</i> , 1997)
Poisson	aragonite	$T^{\circ}\text{C} = 18,96 - 5,00 (\delta^{18}\text{O}_{\text{carb}} - \delta^{18}\text{O}_{\text{eau}})$	(Radtke <i>et al.</i> , 1998)

Figure VII.7
 Comparaison
 des estimations
 de température obtenues
 à partir du rapport
 des isotopes de l'oxygène
 dans les otolithes en
 utilisant différentes relations
 isotopes-température
 publiées (tableau VII.2).



2. Métabolisme et événements ontogéniques

De nombreux facteurs affectent la composition chimique des otolithes de poisson et interagissent. Ils compliquent l'interprétation des données, ce qui a parfois généré des conclusions erronées concernant la relation entre les conditions environnementales et la composition de l'otolithe. Cette dernière reflète les effets combinés de processus endogènes tels que le développement et la reproduction ainsi que les conditions externes associées à l'habitat, au comportement et au régime alimentaire. Les paragraphes suivants traitent de l'influence des processus physiologiques sur la disponibilité des éléments et leur incorporation dans l'otolithe.

Le taux métabolique est déterminant pour la croissance de l'otolithe et peut, de ce fait, en influencer la composition par le contrôle du taux d'incorporation de chacun des éléments. Le métabolisme d'un poisson détermine également son exposition aux facteurs de l'environnement en jouant sur la consommation de nourriture et sur le taux d'échanges à travers les branchies et les épithéliums. Ces facteurs pourraient lier métabolisme et composition de l'otolithe d'une manière générale de telle sorte que les concentrations en divers éléments dans l'otolithe varient au niveau inter-individuel mais aussi intra-individuel en fonction des cycles saisonniers. Plusieurs études sur les concentrations en métaux dans les otolithes de poissons ont révélé l'existence de concentrations plus élevées dans les otolithes d'individus présentant une croissance rapide (Papadopoulou *et al.*, 1978; Protasowicki & Kosior, 1988), ce qui pourrait indiquer que les taux d'incorporation de certains éléments sont positivement corrélés au taux métabolique.

La meilleure démonstration de l'influence du métabolisme sur la composition de l'otolithe provient d'études du rapport Sr/Ca. Les fluctuations de ce rapport ont initialement été interprétées en relation avec les variations saisonnières de la température. De nouveaux résultats ont indiqué que ces fluctuations étaient plutôt induites par le métabolisme individuel. Le rapport Sr/Ca varie inversement au taux de croissance somatique (Sadovy & Severin, 1994; Friedland *et al.*, 1998), suggérant ainsi que les quantités de strontium incorporées dans l'otolithe soient plus importantes lorsque la synthèse de la matrice protéique et le taux d'accrétion sont moindres.

Des preuves expérimentales directes indiquent que le métabolisme est impliqué dans la détermination du $\delta^{13}\text{C}$ dans les otolithes de poissons (Kalish, 1991b; Thorrold *et al.*, 1997). À la différence de $\delta^{18}\text{O}$, le rapport $\delta^{13}\text{C}$ ne montre pas toujours de relation étroite avec la température mais il est, en revanche, très souvent associé à la taille des poissons et au taux de croissance individuel. Il a été suggéré qu'une partie du carbonate de l'otolithe provienne de sources de carbone métabolisé (entrant dans le plasma comme CO_2) et dépende ainsi du métabolisme du poisson plutôt que des conditions environnantes.

Les variations observées dans la composition de l'otolithe ont souvent été attribuées à des changements ontogéniques. Pour la plupart, il reste à déterminer si ces variations sont directement liées à des événements du développement et sont, par conséquent, ontogéniques *sensu stricto* ou si elles sont fonction de la taille ou de l'âge du poisson. Des variations cycliques de la composition chimique ont été observées le long de profils temporels (axe allant du *nucleus* à la marge de l'otolithe) et l'amplitude de ces variations décroît souvent vers la fin du profil. Ce modèle est très probablement une fonction de l'âge du poisson et on peut, par exemple, émettre l'hypothèse que le poisson adulte se déplace pour minimiser les changements de température. Chez les poissons, les changements liés à la taille, à l'âge et au stade de développement sont souvent étroitement associés. Il est par conséquent

difficile de différencier les réponses strictement ontogéniques de celles liées à la taille et à l'âge. Les modèles ontogéniques devraient être clairement reliés aux processus de développement et aux événements, aux stades de l'histoire individuelle du poisson. Certaines variations de la composition de l'otolithe seront à la fois d'origine ontogénique et liées à la taille. Par exemple, une variation due à la maturation des gonades et à l'activité de reproduction présente des composantes dépendant à la fois de la taille et du développement. Le passage à la maturité sexuelle est plus vraisemblablement lié à la taille qu'à l'âge et signale le commencement d'un stade de vie bien distinct. Certains modèles de migration sont uniquement liés à la taille et le fait qu'ils doivent ou non être considérés comme changements ontogéniques est une question encore débattue. Dans d'autres cas, tels que la métamorphose chez certains poissons plats, les changements liés au développement semblent indépendants de la taille du poisson. On observe souvent des tendances temporelles dans les concentrations de différents éléments dans l'otolithe mais, pour éviter toute confusion, ces changements ne devraient être considérés comme ontogéniques que s'ils sont clairement associés au développement. De la même manière, les fluctuations saisonnières ne doivent pas être confondues avec les changements de nature ontogénique, puisqu'elles peuvent être directement induites par les conditions externes plutôt que par des changements endogènes.

2.1. Métamorphose

Chez certaines espèces de poissons, la transition entre les périodes larvaire et juvénile est marquée par de spectaculaires changements de morphologie, de comportement et d'utilisation de l'habitat. Ces changements peuvent être fréquemment observés à partir de modifications de la composition et de la structure de l'otolithe (chap. III.B.3). Bien que de telles variations de composition n'aient pas encore été examinées en détail, plusieurs études ont attribué des modifications de la composition de l'otolithe à des facteurs ontogéniques. Par exemple, il a été montré que le début de la métamorphose de la larve leptocéphale en civelle induisait une chute rapide des rapports Sr/Ca dans l'otolithe, coïncidant avec une augmentation rapide de la taille des microcroissements chez *Anguilla japonica* (Arai *et al.*, 1997), *A. rostrata* et *A. anguilla* (Arai *et al.*, 2000). Ces profondes modifications ne semblent pas être liées au changement d'habitat. Otake *et al.* (1994, 1997) ont associé la baisse du rapport Sr/Ca à celle de la teneur corporelle en Sr, en l'expliquant par la dégradation de la matrice gélatineuse extracellulaire composée de glycosaminoglycans (GAG) sulfatés dont on sait qu'ils ont une forte affinité pour le Sr. Pontual *et al.* (données non publiées) ont également identifié des changements dans la composition des otolithes de larves de *Solea solea*, qui auraient pu être interprétés comme la conséquence de la migration des eaux côtières vers les estuaires si des modifications similaires n'avaient pas été observées dans les otolithes d'individus élevés en conditions stables. Fowler *et al.*

(1995) ont également décrit des différences de composition significatives entre les noyaux et la marge des otolithes chez des poissons élevés en laboratoire en conditions constantes.

Les changements d'habitat associés à la métamorphose peuvent certainement affecter la composition de l'otolithe, de même que les changements de régime alimentaire, même si les effets de ces derniers sont moindres. Les effets des changements anatomiques et physiologiques au cours de la métamorphose doivent être encore étudiés en milieu naturel et contrôlé. Des processus tels que la calcification et le développement du système circulatoire peuvent limiter les éléments et concentrations disponibles pour l'incorporation dans l'otolithe. Il est possible que le développement de systèmes enzymatiques en réponse aux changements de régime alimentaire soit à l'origine d'une compétition entre divers métaux qui pourraient avoir été incorporés dans les otolithes au cours de la période larvaire.

2.2. Reproduction

Deux aspects de la reproduction peuvent potentiellement affecter la composition des otolithes de poissons par le biais de processus physiologiques endogènes. Chez les poissons femelles, la gamétogenèse implique la translocation de substances pour la constitution du vitellus de l'œuf en développement. Le processus de vitellogenèse nécessite du calcium, d'où une augmentation de la synthèse de protéines chélatrices du calcium (vitellogénine en particulier). Sur l'otolithe, les conséquences de ce processus sont une réduction des concentrations en calcium disponible et un détournement de la synthèse des protéines. Les discontinuités de reproduction observées sur les otolithes de femelles adultes pourraient être la traduction visible de ce processus, bien que trop peu d'études aient été réalisées pour déterminer systématiquement l'origine de ces structures. S'agissant de la composition de l'otolithe, on pourrait s'attendre à des fluctuations du rapport de la composante minéralisée à la composante organique, fluctuations éventuellement accompagnées de modifications dans le taux d'incorporation des éléments traces.

Les poissons des deux sexes fabriquent des tissus adipeux pouvant être utilisés comme réserves d'énergie pour la gamétogenèse et les besoins métaboliques au cours de la saison de reproduction, et ceci plus particulièrement s'ils cessent de s'alimenter. De nombreux éléments peuvent être facilement incorporés dans les tissus adipeux et, par conséquent, la mobilisation de ces réserves peut induire ou accentuer des fluctuations saisonnières de la concentration de ces éléments dans l'otolithe.

Quelques rares auteurs ont orienté leurs recherches sur l'étude directe des effets de la reproduction sur la composition de l'otolithe, malgré les impacts potentiels sur la planification des études et sur l'interprétation des résultats au niveau des populations (Thresher, 1999). Dans un certain nombre d'études, les variations de concentration des éléments les plus abondants de l'otolithe, Ca, Sr, Na et K, ont été interprétées

comme étant liées à l'activité de reproduction (Fuiman & Hoff, 1995). Kalish (1989) a établi, chez *Arripis trutta*, la correspondance entre le changement de l'indice gonadosomatique et les concentrations plasmatiques en protéines chélatrices du calcium, en Ca et en Sr en les reliant à des variations du rapport Sr/Ca dans l'otolithe. Des travaux expérimentaux sur *Poecilia reticulata* (Thresher, 1999) ont suggéré que les augmentations en Sr et Na dans l'otolithe étaient liées à des épisodes de frai (incubation des œufs). Cependant, pour ces espèces comme pour d'autres, la variabilité interindividuelle est élevée chez les femelles et il est difficile de généraliser sur les effets effectifs de la reproduction en termes de changements spécifiques dans la composition de l'otolithe. Ces changements dépendant de processus endogènes, il est possible que la variabilité interindividuelle soit intrinsèque et que les variations cycliques de la concentration en certains éléments (Sr, Na) puissent apporter davantage d'information au niveau individuel (par exemple sur l'effort reproductif) qu'au niveau des populations.

3. Estimation de l'âge

L'estimation de l'âge des poissons basée sur la MCO n'entre pas en concurrence avec les méthodes conventionnelles d'estimation de l'âge. Ce champ d'investigation s'est développé afin de valider ces dernières lorsque leur application est problématique (e.g. espèces à grande longévité) ou de fournir des estimations susceptibles d'aider à l'élaboration de critères conventionnels pour l'estimation de l'âge. Trois types de méthode ont été examinés :

- les méthodes radiométriques basées sur les déséquilibres naturels des radio-isotopes ;
- l'utilisation comme traceur du ^{14}C produit lors des essais nucléaires atmosphériques ;
- les variations cycliques de la composition élémentaire des otolithes.

3.1. Utilisation des rapports $^{210}\text{Pb}/^{226}\text{Ra}$ et $^{228}\text{Th}/^{228}\text{Ra}$

Les deux paires de nucléides utiles à la datation radiométrique de l'otolithe sont $^{210}\text{Pb}/^{226}\text{Ra}$ et $^{228}\text{Th}/^{228}\text{Ra}$, appartenant respectivement aux séries radioactives de ^{238}U et de ^{232}Th (tab. VII.3). Ces deux paires impliquent des isotopes du radium, lesquels existent à l'état naturel dans l'eau douce et dans l'eau de mer. Le radium est un analogue du calcium et emprunte des voies métaboliques similaires. Il peut de ce fait s'accumuler dans les pièces calcifiées. ^{210}Pb et ^{228}Th y sont également présents bien qu'en moindre abondance. Du fait de leurs très faibles teneurs, ils présentent une activité radioactive faible, ce qui entraîne un certain nombre de difficultés dans l'obtention de mesures précises.

Les deux paires de nucléides peuvent être considérées comme de simples paires de désintégration fils/père puisque, dans les deux cas, les nucléides intermédiaires ont une période extrêmement courte (tab. VII.3).

Tableau VII.3 - Datation radiométrique des otolithes de poissons : radionucléides intéressants provenant de la désintégration de ^{238}U et de ^{232}Th avec leurs demi-vies respectives. Les tirets indiquent l'existence de radionucléides intermédiaires non montrés.

Série ^{238}U	Demi-vie	Série ^{232}Th	Demi-vie
^{238}U	4,49 10^9 années	^{232}Th	1,41 10^{10} année
-----		^{228}Ra	5,76 années
^{226}Ra	1622 années	^{228}Ac	6,13 heures
^{222}Rn	3,82 jours	^{228}Th	1,91 année
^{218}Po	3,05 minutes	-----	
^{214}Pb	26,8 minutes	^{208}Pb	stable
^{214}Bi	19,7 minutes		
^{214}Po	164 microsecondes		
^{210}Pb	21 années		

^{206}Pb	stable		

La méthode $^{210}\text{Pb}/^{226}\text{Ra}$, qui répond au modèle d'équilibre séculaire, devrait théoriquement être applicable pour estimer des âges de plus de 100 ans (cinq fois la durée de la demi-vie de ^{210}Pb). En réalité, les niveaux actuels de précision analytique la rendent plus adaptée (avec une incertitude acceptable) à une gamme d'âge comprise entre 0 et 50 ans (Campana, 1999). Le facteur limitant est actuellement l'erreur de mesure sur ^{210}Pb puisque la détermination de l'activité de ^{226}Ra dans les otolithes a été récemment améliorée (Andrews *et al.*, 1999b).

Les demi-vies de ^{228}Ra et ^{228}Th sont similaires de sorte que le rapport de leurs activités varie au cours du temps conformément au modèle d'équilibre transitoire. Selon Campana (1999), la gamme d'âge applicable est de 0 à 8 ans (voir également fig. VII.1).

La principale difficulté de la datation radiométrique provient de la croissance continue de l'otolithe au cours de la vie du poisson. Si l'on utilise des otolithes entiers, le dépôt continu de nouveau matériel doit être pris en compte et les équations radiométriques reformulées à l'aide d'un modèle tenant compte de l'augmentation de la masse dans le temps. De telles équations ont été dérivées pour la première fois par Bennett *et al.* (1982) dans leurs travaux novateurs sur l'estimation de l'âge des poissons par radiométrie et elles ont, par la suite, été corrigées et adaptées à différents modèles de croissance (Campana *et al.*, 1993 ; Kimura & Kastle, 1995). D'un autre côté, en partant du principe que le noyau a environ le même âge que le poisson (plus le temps passé entre l'échantillonnage et l'analyse), l'équation de Bateman peut être directement appliquée lorsque l'on utilise de la matière provenant uniquement du noyau. Cette méthode a été employée pour la première fois par Campana (1990) et devrait être privilégiée lorsque son utilisation est possible.

L'estimation de l'âge par datation radiométrique repose sur 3 trois hypothèses :

1) Dès lors qu'ils ont été incorporés, les radionucléides ne migrent pas dans l'otolithe et les pertes ou gains de tous nucléides, y compris les

nucléides intermédiaires, sont dus au seul processus de désintégration radioactive. En d'autres termes, l'otolithe est un système chimique clos pour tous ces nucléides ;

2) Le rapport initial des activités fils/père dans l'otolithe est faible, idéalement proche de zéro et il peut être estimé ;

3) Les nucléides père et fils sont incorporés à l'otolithe à un taux constant en poids.

La question de la fermeture du système est la plus problématique et a été largement débattue de façon théorique dans plusieurs articles. À l'exception des travaux de Gauldie & Cremer (1998), qui ont démontré la possibilité d'une diffusion de ^{222}Rn hors de l'otolithe de *Hoplostethus atlanticus*, il y a un manque évident de preuve expérimentale permettant de valider l'hypothèse de fermeture pour les principaux radionucléides des otolithes. En tout état de cause, une perte significative de ^{222}Rn au cours de la désintégration de ^{226}Ra devrait résulter en une activité moindre de ^{210}Pb , avec pour corollaire l'obtention d'âges sous-estimés. Cependant, un certain nombre de travaux ont abouti à des estimations d'âge radiométriques élevées, souvent comparables aux estimations obtenues par des méthodes conventionnelles. Il a été démontré que certaines méthodes de stockage et de préparation des otolithes pouvaient affecter la stabilité spatio-temporelle de la distribution de certains éléments chimiques dans l'otolithe (Milton & Chenery, 1998 ; Proctor & Thresher, 1998), ce qui pourrait avoir des incidences sur les méthodes radiométriques d'estimation de l'âge. Il convient de noter que le problème de la migration interne des éléments ne se pose que pour les études basées sur l'analyse du noyau.

La seconde hypothèse concerne le problème de l'incorporation allogène (i.e. de source externe) de l'isotope fils ou de tout autre produit intermédiaire. On peut résoudre cette question en utilisant les otolithes de jeunes poissons pour estimer le rapport initial des activités fils/père. Si la méthode utilisée est celle du noyau, les « poissons de référence » devront avoir le même âge que celui des noyaux des poissons adultes devant être analysés et pouvoir être disponibles pour des classes d'âge et localisations adéquates.

La troisième hypothèse n'a d'importance que lorsque des otolithes entiers et un modèle de croissance en masse de l'otolithe en fonction du temps sont utilisés. Elle suppose que le taux d'incorporation des nucléides père et fils soit constant par rapport à Ca tout au long de la vie du poisson. La violation de cette hypothèse peut éventuellement apparaître pour des espèces qui subissent d'importants changements d'habitat au cours de leur cycle de vie (Fenton *et al.*, 1990 ; Andrews *et al.*, 1999a) ou si le taux d'incorporation est un processus dépendant de l'âge (Kastelle *et al.*, 2000). Elle suppose également que le taux de croissance en masse de l'otolithe soit connu ou estimé, ce qui aboutit à un raisonnement circulaire si un modèle de croissance est construit sur la base d'âges estimés par une méthode conventionnelle que l'on cherche elle-même à valider (West & Gauldie, 1994 ; Francis, 1995b ; Kimura & Kastelle, 1995).

Le déséquilibre $^{228}\text{Th}/^{228}\text{Ra}$ a été utilisé pour étudier la longévité de *Hirundichthys affinis*, espèce pour laquelle ni les écailles ni les otolithes ne peuvent être utilisés pour des estimations d'âge conventionnelles (Smith *et al.*, 1991 ; Campana *et al.*, 1993). Bien que l'incertitude liée à la mesure de Ra soit encore un facteur limitant (l'activité étant extrêmement basse), cette méthode pourrait trouver de nombreuses applications pour l'étude d'espèces à faible longévité.

Le déséquilibre $^{210}\text{Pb}/^{226}\text{Ra}$ a été utilisé de manière plus intensive afin de confirmer les estimations d'âge ou la longévité de certaines espèces tels que les *Sebastes* spp. (Bennett *et al.*, 1982 ; Campana *et al.*, 1990 ; Kastle *et al.*, 2000), *Anoplopoma fimbria* (Kastle *et al.*, 1994), *Hoplostethus atlanticus* (Fenton *et al.*, 1992 ; Francis, 1995b ; Smith *et al.*, 1995), *Alloctytus verrucosus* (Stewart *et al.*, 1995), *Coryphaenoides acrolepis* (Andrews *et al.*, 1999a), *Macruronus novaezelandiae* (Fenton *et al.*, 1990) et *Lutjanus* spp. (Milton *et al.*, 1995).

3.2. Utilisation du radiocarbone de la bombe atomique comme chronomètre

Le ^{14}C est un radio-isotope cosmogénique naturellement produit par la désintégration du noyau de ^{14}N (stable) lorsqu'il entre en collision avec des rayons cosmiques. Le ^{14}C est instable et se désintègre en ^{14}N avec une période de 5 730 années, si bien que la célèbre méthode de datation au ^{14}C (basée sur la désintégration de ^{14}C) n'a pas d'intérêt pratique pour des travaux sur la validation d'estimations d'âge (voir cependant Kalish, 1995). Cependant, les niveaux de radiocarbone atmosphérique naturel ont été modifiés par les activités humaines depuis le début de l'ère industrielle (émission des combustibles fossiles, énergie nucléaire) et ils ont été plus particulièrement affectés dans les années cinquante-soixante, par les essais nucléaires atmosphériques. En moins de dix ans, les concentrations atmosphériques de ^{14}C ont doublé après plusieurs milliers d'années de relative stabilité. Depuis la fin de ces essais atmosphériques, cette concentration a chuté (fig. VII.8a) du fait des échanges de radiocarbone, sous sa forme oxydée $^{14}\text{CO}_2$, avec les autres réservoirs de CO_2 . Ainsi, les couches supérieures des océans ont subi un apport significatif de radiocarbone clairement visible dans les séries historiques de ^{14}C dérivées de mesures du carbone inorganique dissous (DIC) dans l'eau de mer ou provenant de l'utilisation de proxies tels que les coraux (e.g. Druffel & Linick, 1978) ou les coquilles de bivalves (Weidman & Jones, 1993). Les analyses de la distribution spatiale de ^{14}C et de ses variations temporelles tridimensionnelles (fig. VII.8b,c) par le mélange et l'advection fournissent des informations inestimables dans plusieurs domaines de recherche (cycle du carbone, circulation océanique globale, etc.). Kalish (1993) a démontré que le traceur ^{14}C de la bombe était également incorporé dans les otolithes de poissons et a suggéré son utilisation comme moyen de datation. Les analyses ont été faites sur des noyaux d'otolithes de poissons de Nouvelle-Zélande, dont les âges avaient été estimés au préalable à l'aide de méthodes

conventionnelles. Les séries temporelles de ^{14}C reconstituées ont révélé une remarquable concordance de phase avec les séries dérivées de mesures sur des coraux de régions proches (fig. VII.8d), confirmant ainsi l'estimation de l'âge de ces poissons basée sur le dénombrement des *annuli*. Dans l'hypothèse où un échantillon adéquat de jeunes poissons d'une espèce et d'un endroit donnés peut être utilisé pour établir une courbe de référence, alors des références externes de ^{14}C ne sont pas nécessaires (Campana, 1997).

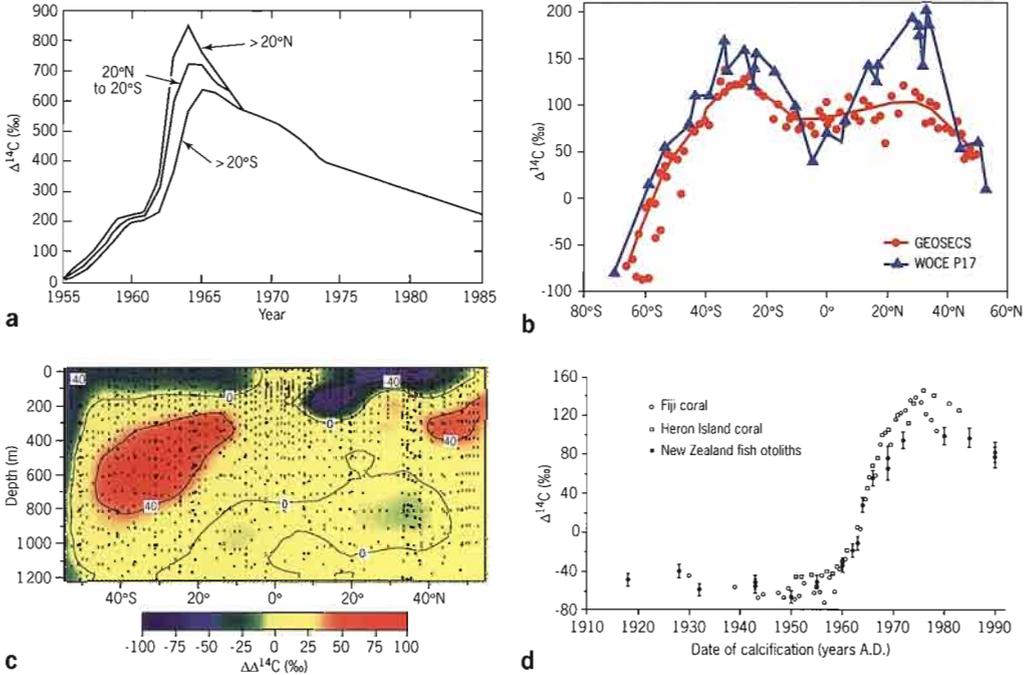


Figure VII.8 - Le ^{14}C des essais nucléaires atmosphériques utilisé comme chronomètre.

a) Relevés historiques du $\Delta^{14}\text{C}$ dans l'atmosphère des hémisphères nord (20°N) et sud (20°S) montrant l'importance des effets des essais atmosphériques des armes nucléaires. Reproduit de Broecker *et al.* (1985).

b) Valeurs de surface de la section Pacifique orientale de GEOSECS (1973) comparées aux données collectées le long du méridien 135°W section P17 (1992) du programme WOCE. Les valeurs dans les zones tempérées des deux hémisphères ont diminué tandis que celles des latitudes tropicales et équatoriales ont augmenté. Reproduit de Key (1997).

c) Graphique 3D des variations de $\Delta^{14}\text{C}$ (WOCE P17 : astérisques noirs - Pacifique oriental GEOSECS : X gris) entre 1973 et 1992. Reproduit de Key (1997).

d) $\Delta^{14}\text{C}$ (± 1 ET) de l'aragonite des otolithes de *Pagrus auratus* de Nouvelle-Zélande au cours de la période 1918 à 1990. Les mesures de $\Delta^{14}\text{C}$ de coraux hermatypiques prélevés aux Fiji et à l'île du Héron, Australie, sont présentées pour comparaison. Reproduit de Kalish (1993) avec la permission de Elsevier Science.

Si l'on regarde la chronologie de la contamination au radiocarbonate de la surface de l'océan, les otolithes de poissons dont les dates d'éclosion présumées se situent entre 1960 et 1970 sont les plus adaptés aux études de validation, bien que les années suivantes (de 1970 à nos jours) puissent être utilisées si le taux de décroissance de ^{14}C dans la région concernée est suffisamment rapide (Kalish, 1995). Il convient

de noter que les estimations de l'âge au ^{14}C fournissent des âges minimums puisque la contamination potentielle du noyau par du matériel adjacent plus récent augmenterait la concentration en ^{14}C dans l'échantillon pour un poisson né au cours de la période d'augmentation du signal. Cette observation ne s'applique pas si l'on travaille sur la période de décroissance du signal. Le synchronisme de la contamination des couches supérieures de l'océan au ^{14}C nucléaire a été bien établi, bien qu'il y ait des variations spatiales substantielles dans l'amplitude du phénomène (fig. VII.8b). C'est la raison pour laquelle cette approche est plus utile (ou plutôt moins problématique) pour des espèces dont les stades de vie précoces se déroulent dans les couches mélangées de surface (Kalish, 1995). Pour les espèces vivant en deçà de cet habitat, la méthode reste applicable à des profondeurs modérées (Kalish *et al.*, 1997). Un facteur de correction pour les âges de poisson déduits de ^{14}C doit cependant pouvoir être estimé à l'aide des données existantes sur le taux de pénétration du radiocarbone, ce taux présentant d'importantes variations géographiques (fig. VII.8c). En ce qui concerne les espèces vivant en estuaires, le signal ^{14}C des essais nucléaires semble se situer à un niveau intermédiaire, en phase et en amplitude, entre les séries temporelles atmosphériques et océaniques (Campana & Jones, 1998). Ce phénomène s'explique du fait d'échanges eau-air plus intenses et rapides dans les zones peu profondes et fortement brassées, caractérisées en outre par d'importants apports d'eaux fluviales. Comme l'a indiqué Campana (1999), au sein des habitats de type estuaire ainsi qu'en eau profonde, le signal du radiocarbone de l'otolithe peut être obscurci dans une certaine mesure par la proportion de carbone d'origine métabolique (un tiers selon Kalish, 1991b) si le poisson se nourrit de proies dont la teneur en ^{14}C est différente de celle des eaux environnantes.

Ce type d'étude nécessite l'utilisation de la spectrométrie de masse par accélérateur (Accelerator mass spectrometry ou AMS), une technique particulièrement précise mais extrêmement coûteuse. C'est probablement l'une des raisons pour lesquelles les applications en matière de biologie des poissons demeurent relativement peu nombreuses en dépit d'avantages indiscutables, en comparaison, par exemple, à la précision relativement faible de l'estimation de l'âge par datation radiométrique.

Il convient de noter que, hormis les études de validation des estimations de l'âge, les données de radiocarbone peuvent fournir un certain nombre d'informations susceptibles d'aider à résoudre différentes questions relatives à la biologie des poissons telles que la localisation des habitats occupés à des stades de vie précoces (Kalish, 1995). De plus, en utilisant des poissons d'âge connu ou validé, les séries temporelles de ^{14}C dans l'otolithe peuvent constituer une source d'informations utiles à d'autres disciplines.

3.3. Autres chronomètres potentiels

Les résultats de travaux déjà anciens ont suggéré que les variations des concentrations élémentaires et des rapports de concentrations pouvaient être utilisées pour valider les estimations d'âge des poissons, si toutefois ces variations étaient induites par des facteurs saisonniers cycliques tels que la température. Des différences de concentration en Ca coïncidant avec des zones de densités optiques différentes ont été utilisées comme indicateurs de cycles saisonniers dans les otolithes d'anguille (Casselman, 1982, 1987). L'utilisation du rapport Sr/Ca comme chronomètre a également été suggérée (Radtko & Targett, 1984) mais des études plus poussées ont révélé que l'incertitude de la relation entre le Sr de l'otolithe et les conditions environnementales était trop grande pour cette application. Cependant, Thorrold & Shuttleworth (2000) ont récemment observé des variations cycliques du rapport Sr/Ca correspondant étroitement au patron des anneaux annuels validés dans les otolithes de *Pogonias cromis*.

La concentration de certains autres éléments présente également des oscillations. Par exemple, Halden *et al.* (2000) ont observé un modèle oscillatoire de la concentration en Zn dans les otolithes de *Salvelinus alpinus*, correspondant étroitement aux structures optiques annuelles. Dans certaines situations, de tels signaux pourraient être d'utiles chronomètres bien que leur utilisation nécessite une étude préalable rigoureuse.

Weidman & Millner (2000) ont mesuré des oscillations de $\delta^{18}\text{O}$ sur des profils temporels d'otolithes de morue par le microforage de très petits échantillons pour des analyses à l'IRMS. Le nombre d'oscillations observées correspondait à l'âge estimé par une lecture conventionnelle, suggérant ainsi que ces profils puissent être utilisés pour estimer l'âge chez des espèces soumises à un cycle annuel de température.

4. Discrimination de stocks et populations

L'application principale ayant guidé la plupart des développements de la microchimie des otolithes concerne la discrimination de stocks. Dans de nombreuses régions du monde, les stocks de poissons se mélangent sur des aires de reproduction ou d'engraissement et la gestion des pêcheries, ainsi que certaines questions juridiques, impliquent de pouvoir identifier et quantifier les proportions relatives des composantes individuelles de ces stocks. Même pour un stock donné, il est souvent souhaitable de pouvoir identifier les sous-populations séparées pouvant contribuer à l'ensemble de la pêcherie.

La discrimination de stocks à l'aide de la MCO ne s'appuie pas sur des différences génétiques. Elle se fonde sur les différences observées dans les « empreintes » élémentaires pouvant être induites par la physiologie ou l'environnement chez des poissons qui évoluent dans des milieux différents pendant une partie au moins de leur existence.

Les études de discrimination de stocks font appel à l'analyse de la composition élémentaire de l'otolithe entier (analyses globales, chap. VII.G.1.1.2) ainsi qu'à l'analyse de zones spécifiques de ce dernier (analyses de surface, chap. VII.G.1.1.1). Les informations obtenues à partir d'otolithes entiers dissous peuvent être généralement collectées plus rapidement et avec des risques de contamination moindres. Pour autant, dans de nombreux cas, l'information requise est contenue dans les couches internes de l'otolithe et ne peut être extraite qu'à l'aide de techniques de surface. Deux axes de recherche sont actuellement retenus afin de poursuivre le développement des applications d'identification de stock. Le premier porte sur le perfectionnement continu des outils et protocoles analytiques afin de permettre une analyse efficace et précise d'un plus grand nombre d'éléments. Le second concerne le développement de techniques d'analyse de données, techniques qui permettront d'obtenir la meilleure classification des composantes d'un stock sur la base du plus petit nombre d'éléments. Il est vraisemblable que les techniques analytiques et les méthodes d'analyse de données varieront en fonction d'applications spécifiques. En effet, en certains endroits, des différences peuvent exister pour quelques éléments mineurs (Sr, Na) alors que, dans d'autres, les différences peuvent être plus subtiles et déterminées en premier lieu par la présence ou l'absence d'éléments traces ou ultra-traces. Thresher (1999, fig. 9) cite Na, Sr, Ba et Mg comme étant les éléments les plus fréquemment utilisés pour les applications réussies de discrimination de stocks.

La microchimie de l'otolithe a été utilisée dans des études d'identification de stocks pour des espèces occupant divers types d'habitats, qu'ils soient côtiers ou océaniques. Dans leur majorité, les travaux publiés rapportent de bonnes performances de discrimination de groupes de poissons mais on ignore encore si cette technique peut être appliquée de manière universelle ou si les échecs de cette approche pour la discrimination de stocks sont peu publiés. Cependant, Kalish *et al.* (1996) n'ont détecté aucune différence indicative d'éventuelles variations géographiques dans la composition de l'otolithe de *Macruronus novaezelandiae*, Merlucciidae de l'océan Austral capturé sur différentes zones de reproduction. Le taux de succès des identifications de stocks décroît à mesure que des analyses stratifiées plus spécifiques sont réalisées. Des différences attribuées au facteur géographique peuvent disparaître lorsque la composition des otolithes est contrôlée pour la taille du poisson par des méthodes statistiques appropriées (Edmonds *et al.*, 1989) ou par l'analyse de différentes portions de l'otolithe (Dove *et al.*, 1996), pour la classe d'âge (Edmonds *et al.*, 1995) ou pour le sexe (Kalish *et al.*, 1996).

Les travaux publiés sur l'identification des stocks représentent la majorité de la littérature disponible sur la microchimie de l'otolithe et la plupart de ces travaux sont passés en revue dans la synthèse de Thresher (1999). Des études préliminaires ont été réalisées un peu partout dans le monde. Elles se sont généralement intéressées aux stocks d'im-

portance commerciale et dont les différentes composantes étaient déjà bien connues (Campana *et al.*, 1995) ou elles ont utilisé une population témoin pour comparaison (Secor & Zdanowicz, 1998). Des chercheurs australiens ont monté des applications à grande échelle (Edmonds *et al.*, 1991, 1992, 1999) et ils ont inclus la microchimie de l'otolithe dans leurs méthodes standard d'évaluation des stocks.

La composition de l'otolithe peut encore servir à identifier les changements d'habitat des individus, les empreintes élémentaires étant alors utilisées comme marques naturelles. Cette information peut être utilisée pour suivre les mouvements de poissons évoluant entre divers environnements ou masses d'eau et analyser la composition du stock. Les différences de composition du noyau de l'otolithe ont aussi été utilisées pour identifier les zones de frai et de nourricerie, comme première étape vers l'évaluation des contributions relatives de ces composantes au stock d'adultes. La plupart des travaux menés sur l'identification des zones de nourricerie sont préliminaires et se limitent à démontrer l'applicabilité de la méthode. Des différences de composition de l'otolithe en fonction de l'origine ont été détectées chez des juvéniles de différentes espèces : *Cynoscion regalis* (Thorrold *et al.*, 1998b), *Alosa sapidissima* (Thorrold *et al.*, 1998a) et *Solea solea* (Pontual *et al.*, 2000). L'analyse des isotopes de l'oxygène et du carbone a permis de différencier des individus migrateurs et sédentaires (Northcote *et al.*, 1992) ainsi que des saumons nés dans des rivières différentes (Gao & Beamish, 1999). Les différences de composition peuvent être utilisées pour identifier l'origine des individus contribuant à la formation de la population adulte, pourvu que la caractérisation des individus en conditions d'isolement géographique (frayères ou nourriceries) et celle des individus du stock composite soient réalisées dans un laps de temps pendant lequel les caractéristiques physico-chimiques environnementales restent stables. Ce point a été débattu dans deux applications intégrales récentes, la première basée sur l'analyse du noyau de *Tenuulosa toli* au stade juvénile (Milton *et al.*, 1997) et la seconde sur l'analyse d'otolithes entiers de *Gadus morhua* (Campana *et al.*, 2000).

Les données microchimiques sont généralement traitées par des techniques statistiques de discrimination multivariées. Ces dernières autorisent la prise en compte d'un grand nombre d'éléments (ou d'isotopes) et disposent de procédures permettant de quantifier l'importance de chacun des éléments pour la discrimination. Les analyses en composantes principales (ACP) constituent une famille de techniques fournissant des représentations synthétiques de vastes ensembles de données, généralement au moyen de visualisations graphiques. La relative proximité des variables (en l'occurrence concentrations élémentaires ou isotopiques dans l'otolithe) est interprétée en termes de corrélation, tandis que la proximité des individus est interprétée en termes de similarité globale des valeurs observées. L'analyse discriminante est un ensemble de techniques développées pour la classification (i.e. l'affectation à des classes préexistantes, en l'occurrence

des groupes de poissons) d'individus caractérisés par un grand nombre de variables numériques. L'analyse discriminante linéaire, méthode la plus couramment employée, est à la fois descriptive et prédictive. La puissance des fonctions discriminantes devrait être estimée au moyen de méthodes de « bootstrap » ou de « jack-knife » qui procurent des estimations précises et leurs intervalles de confiance. Les méthodes basées sur le maximum de vraisemblance peuvent s'avérer plus adaptées à la classification d'échantillons provenant de stocks mixtes quand les analyses discriminantes manquent de résolution.

5. Autres applications

5.1. Caractérisation de l'habitat par les empreintes élémentaires

Outre des informations essentielles concernant les populations de poissons, les différences de composition de l'otolithe peuvent également servir à dégager certaines inférences sur les habitats et les environnements. Les microstructures des otolithes ont permis d'évaluer la qualité de l'habitat en utilisant la taille des accroissements de l'otolithe comme indicateur du taux de croissance du poisson (Szedlmayer & Conti, 1999). La compréhension des processus d'incorporation des différents éléments dans l'otolithe est encore incomplète et il est peu probable que les concentrations élémentaires individuelles puissent être directement utilisées pour déterminer les concentrations présentes dans l'environnement. Cependant, les variations de concentrations élémentaires sur des profils temporels d'otolithe pourraient indiquer des modifications à court terme du milieu et permettraient de distinguer les environnements stables des environnements dynamiques. Certains éléments peuvent probablement être utilisés pour tracer des masses d'eau spécifiques et identifier la fréquence d'incursion dans un habitat occupé par une population de poissons, plus particulièrement lorsque cette dernière est connue comme pouvant être sédentaire ou migratrice. Le baryum, par exemple, est associé aux eaux océaniques et sa présence dans l'otolithe permettrait d'enregistrer les échanges entre les milieux côtiers et le large. Comme nous l'avons mentionné précédemment, à l'instar de Sr, d'autres éléments (ou rapports isotopiques) tels que Pb et U pourraient également s'avérer être de précieux indicateurs d'incursion en eau douce ou en mer.

5.2. Marquage en masse

Parmi les méthodes développées pour le marquage des otolithes et plus généralement celui des pièces calcifiées de poissons (chap. IV.A.1.2), le radiomarquage à l'aide du radioisotope ^{85}Sr et le marquage à l'aide d'éléments spécifiques reposent plus particulièrement sur des techniques de MCO. La première approche fut utilisée par Leh-tonen *et al.* (1992) afin de marquer des *Coregonus lavaretus* anadromes récemment éclos, avant leur relâchement en milieu naturel, dans le but d'étudier le rythme de leur dévalaison.

L'immersion d'alevins d'*Oncorhynchus kisutch* dans de l'eau enrichie en lanthanides (La, Ce et Sm) a permis d'observer des concentrations détectables dans les tissus osseux jusqu'à 10 mois après le traitement (Ennevor & Beames, 1993 ; Ennevor, 1994).

L'immersion dans une solution de chlorure de strontium (SrCl_2) a été également proposée comme méthode efficace, peu coûteuse et relativement respectueuse de l'environnement pour le marquage de grandes quantités de petits poissons. Des marques de Sr parfaitement identifiables ont été observées, après 21 mois d'élevage en eau douce, sur des otolithes de saumons (*Oncorhynchus keta* et *O. nerka*) marqués au stade alevin (Schroder *et al.*, 1995). Le potentiel de cette méthode a été récemment évalué comme moyen de marquage de l'épine dorsale de *Pagrus auratus* (Pollard *et al.*, 1999).

À partir d'une expérience à grande échelle de marquage-recapture, Clear *et al.* (2000) ont prouvé, à l'aide d'injections de SrCl_2 , que les macrostructures des otolithes de *Thunnus maccoyii* ont une périodicité annuelle au moins jusqu'à l'âge de treize ans.

En fonction des expériences, diverses méthodes analytiques de mesure du Sr ont été utilisées : microscopie électronique rétrodiffusée, EDS, WDS et ICP-MS (chap. VII.G). Bien qu'elle soit très utile pour diverses recherches sur les pêcheries, l'utilisation de SrCl_2 sur les poissons destinés à l'alimentation n'est pas approuvée dans tous les pays, limitant ainsi la généralisation de son usage.

5.3. Analyse de carbonates biogéniques fossiles en paléoclimatologie et paléocéologie

Les tissus osseux des poissons, les dents et les otolithes ont été analysés dans le cadre d'études géologiques, paléontologiques et archéologiques. Les rapports des isotopes de l'oxygène d'otolithes fossiles (Devereux, 1967 ; Patterson *et al.*, 1993) et de dents de poissons fossilisées (Kolodny *et al.*, 1983) peuvent fournir un certain nombre d'informations sur les paléotempératures. Smith & Patterson (1994) et Patterson *et al.* (1993) ont non seulement estimé des températures à partir d'otolithes fossiles mais ont également reconstruit les variations saisonnières de température subies par les populations de poissons étudiées. L'un des aspects les plus discutés parmi les paléontologistes et les géochimistes concerne l'opportunité de l'application à des matériaux fossiles de relations isotopes-température établies expérimentalement (tab. VII.2). Au cours de la fossilisation, un phénomène de diagenèse peut exister et transformer l'aragonite en calcite, forme cristalline plus stable de CaCO_3 . Plusieurs études ont tenté de reproduire ce processus de manière expérimentale pour en extraire des facteurs de conversion (Yoshioka *et al.*, 1985 ; Nelson *et al.*, 1986). L'effet de la diagenèse sur les rapports isotopiques de l'oxygène est peu concluant, même si on observe un rejet de Mg et de Sr lorsque l'aragonite se transforme en calcite (Yoshioka *et al.*, 1985).

5.4. Historique de la pollution et influences anthropogéniques

Les programmes de surveillance de la qualité de l'eau et les études d'impact de la contamination environnementale se fondent sur l'analyse du milieu physico-chimique et du biote. L'impact de la pollution sur les organismes peut se mesurer au niveau de l'écosystème, de la communauté, de la population et de l'individu. Malencontreusement, la surveillance et l'évaluation impliquent des études à long terme et il est particulièrement difficile de détecter une pollution dans les régions pour lesquelles on ne dispose pas de données de référence. L'analyse chimique de la composition des otolithes de poissons peut permettre d'améliorer de façon significative la capacité à détecter les niveaux de contamination actuels, récents ou anciens et, en même temps, d'évaluer l'impact de cette pollution au niveau des individus et des populations. Un changement environnemental affecte la physiologie des individus, effet qui se propage également à des niveaux d'organisation plus élevés, modifiant ainsi les populations de poissons et la communauté aquatique dans son ensemble.

Les otolithes peuvent être analysés pour révéler des informations cruciales concernant l'histoire environnementale des poissons, les taux de croissance comparatifs dans différents milieux et les effets à long terme de l'exposition à une pollution de l'environnement. Bien que les mouvements et les migrations des poissons ne facilitent pas la localisation précise du lieu de contamination d'un individu, l'enregistrement des concentrations présentes dans l'otolithe peut fournir une preuve de la durée de cette exposition. Chez les espèces dont les populations sont locales, et plus particulièrement en eau douce, la puissance de cette approche pour la mise en évidence d'événements spécifiques de pollution et de leur localisation est considérablement améliorée. Les collections historiques d'otolithes peuvent également révéler l'enregistrement de pollutions survenues sur des périodes de plusieurs décennies. Sur un certain nombre d'espèces échantillonnées en milieu côtier, des concentrations en métaux lourds ont pu être mesurées dans des otolithes entiers après dissolution. Les concentrations mesurées dans les otolithes reflètent généralement des différences spatiales de concentrations environnementales de métaux. Par exemple, la teneur en zinc d'otolithes de poissons prélevés dans les eaux côtières de la Grèce s'est avérée plus élevée à proximité des villes opérant des rejets industriels de ce métal (Papadopoulou *et al.*, 1978). Des métaux lourds ont par ailleurs été analysés dans des otolithes de *Gadus morhua* de la mer Baltique (Protasowicki & Kosior, 1988) et de *Scomberomorus cavalla* (Grady *et al.*, 1989). Des études plus récentes ont utilisé les techniques d'ICP-MS et de LA-ICP-MS pour étudier les variations temporelles de l'exposition des poissons à une pollution d'origine anthropique (Dove & Kingsford, 1998 ; David Milton, CSIRO, comm. pers.).

En complément à ces résultats de terrain, les études en laboratoires montrent que les concentrations métalliques dans les otolithes de

poissons répondent à différentes concentrations d'exposition (Geffen *et al.*, 1998). À ce jour, les travaux expérimentaux indiquent que l'incorporation des éléments dans l'otolithe n'est pas simplement le reflet de leur disponibilité dans le milieu. Les éléments présentent différents coefficients de distribution (Milton & Chenery, 1998 ; Campana, 1999 ; Bath *et al.*, 2000) du fait de caractéristiques chimiques propres, d'exigences métaboliques et de réponses aux éléments toxiques. Les conditions environnementales telles que le pH et la température peuvent modifier la biodisponibilité et l'assimilation des métaux et autres éléments toxiques par le poisson. Une fois assimilés, les différents éléments, et tout particulièrement les métaux, sont métabolisés, séquestrés ou détoxifiés par divers processus, ce qui en affecte la teneur disponible pour l'incorporation dans l'otolithe. Les toxines stockées dans les tissus adipeux peuvent n'être libérées que lorsque les réserves lipidiques sont sollicitées, ce qui peut induire un déphasage entre l'exposition et l'incorporation dans l'otolithe. Les caractéristiques chimiques propres des métaux et les conditions présentes dans l'endolymphe peuvent engendrer des précipitations différentielles ou des inclusions dans l'otolithe. En outre, les interactions entre métaux et protéines sont extrêmement complexes et il est vraisemblable que de nombreux éléments puissent être incorporés à l'otolithe par le biais des composants organiques. Bien que cette hypothèse n'ait, jusqu'à présent, suscité que peu d'attention, elle découle des études réalisées sur les tissus minéralisés d'autres taxons.

F. À propos des autres pièces calcifiées

On a très rapidement admis la nécessité d'évaluer dans quelle mesure les organismes possèdent des marquages naturels ou empreintes chimiques, le temps pendant lequel ils sont conservés ainsi que la possible acquisition de nouvelles marques (Calaprice, 1971), ce qui a conduit à initier de nombreuses études concernant la composition chimique des tissus squelettiques tels que les écailles, le *cleithrum* et les vertèbres.

Bien que l'otolithe soit la PC la plus couramment utilisée pour des études en écologie et en halieutique, des analyses basées sur les écailles et les tissus osseux sont régulièrement menées. Les analyses d'écailles et de rayons de nageoire peuvent être les seules méthodes d'échantillonnage envisageables sur des espèces en voie de disparition ou à haute valeur commerciale (pêcheries récréatives, Salmonidés, esturgeon, etc.) pour lesquelles soit les individus ne peuvent être sacrifiés, soit l'extraction des otolithes réduit fortement la valeur commerciale du spécimen.

La description de ces structures et de leurs processus de minéralisation sont hors de portée de ce chapitre (voir cependant chap. II.B et II.C et e.g. Francillon-Vieillot *et al.*, 1990). D'un point de vue chimique, tous les tissus squelettiques sont constitués de composants organiques et minéraux. En résumé, la matrice organique est constituée de substances collagènes et non collagènes (protéoglycans, phosphoprotéines, phospholipides, etc.). La phase minérale est constituée d'hydroxyapatites « impures » ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) contenant du carbonate, du fluorure qui se substitue aux ions OH en fluoroapatite, ainsi que des constituants mineurs et traces (Mg, Si, Sr, Mn, Ba, Na, etc.).

Il est important de noter que, à la différence des otolithes, excepté dans de très rares situations, les tissus squelettiques sont impliqués à divers degrés dans le contrôle de l'homéostasie, par le stockage et le relargage de calcium et de sels de phosphore et subissent, par conséquent, des processus de résorption et de remaniement. De telles propriétés doivent être prises en compte lors de l'interprétation de la composition chimique de ces pièces osseuses.

L'étendue des applications reflète approximativement celle de l'analyse de la composition de l'otolithe (tab. VII.4).

Les recherches en écotoxicologie et la surveillance de la pollution des systèmes aquatiques se sont également appuyées sur l'analyse de la composition chimique des écailles et des tissus osseux de poissons. La littérature en la matière est particulièrement abondante et représente sans aucun doute une source d'information précieuse concernant les mécanismes de l'assimilation d'éléments ou de radionucléides à partir de l'eau ou de la nourriture ainsi que leurs distributions différentielles dans les tissus corporels.

Tableau VII.4 - Exemples d'études sur la composition chimique des PC (la littérature citée est loin d'être exhaustive).

Application	Espèces	Analyses	PC	Références
Migration	<i>Morone saxatilis</i>	Sr	Écaille	(Coutant & Chen, 1993)
	<i>Acipenser transmontanus</i>	Sr	Rayon de la nageoire pectorale	(Veinott <i>et al.</i> , 1999; Veinott & Evans, 1999)
Salinité	<i>Brevoortia patronus</i>	$^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$	Vertèbre	(Chesney <i>et al.</i> , 1998)
Variation saisonnière	<i>Thunnus thynnus</i>	Composition élémentaire	Vertèbre	(Calaprice, 1983)
	<i>Esox lucius</i>	Ca	<i>Cleithrum</i>	(Casselman, 1974)
Différenciation entre groupes de poissons	Salmonidae	Composition élémentaire	Écaille	(Lapi & Mulligan, 1981)
	<i>Scomberomorus cavalla</i>	$\delta^{15}\text{N}$	Vertèbre	(Yamada <i>et al.</i> , 1987)
Régime alimentaire et position trophique		$\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$	Collagène de l'os	(Roelke & Cifuentes, 1997)
Marquage chimique	Salmonidae	Sr	Os operculaire	(Guillou & de-la-Nouée, 1987)
			Écaille	(Snyder <i>et al.</i> , 1992; Mulligan, 1997)
	<i>Pagrus auratus</i>		Épine dorsale	(Pollard <i>et al.</i> , 1999)
Paléosalinités	Sélacien	$^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$	Émail dentaire	(Schmitz <i>et al.</i> , 1997)
Pollution par les métaux	<i>Salvelinus alpinus</i>	Pb	Opercule	(Koeck <i>et al.</i> , 1996)
	Poissons marins	Se, Cr, Co, Fe, Zn, Cs, Ag	Écaille	(Papadopoulou & Moraitopoulou-Kassimati, 1977)
	Sélaciens	Cd, Mn, Zn	Vertèbre	(Vas <i>et al.</i> , 1990)
	<i>Fundulus heteroclitus</i>	Zn	Écaille	(Sauer & Watabe, 1989)

G. Microchimie : exigences méthodologiques et problèmes rencontrés

1. Techniques analytiques

De nombreuses techniques analytiques ont été utilisées pour les études de MCO. En tout état de cause, aucune méthode particulière ne peut satisfaire à l'ensemble des exigences sous-jacentes à l'éventail des questions abordées. La décision relative au choix de la technique la plus appropriée dépend de l'application, de l'information chimique à extraire, de la sensibilité requise et du degré de résolution spatiale (temporelle) exigé. Ces considérations sont illustrées par un diagramme synoptique reliant les principales applications, types de mesure, résolutions et techniques (fig. VII.9). Parallèlement, certaines caractéristiques des principaux outils analytiques sont présentées dans le tableau VII.5. Dans les sections suivantes, nous résumons les principes de base et potentialités des techniques les plus importantes, sans pour autant essayer de couvrir l'ensemble de leurs possibilités et limites respectives.

1.1. Composition élémentaire

Les techniques analytiques se divisent globalement en techniques d'analyse de « surface » permettant d'obtenir des informations sur la composition de l'otolithe à des endroits spécifiques (i.e. ponctuels) et en techniques d'analyse globale qui permettent de collecter des informations sur la composition globale, généralement intégrée sur l'ensemble de l'otolithe. Certaines techniques mesurent simultanément les concentrations de divers éléments (techniques multi-élémentaires) tandis que d'autres ne peuvent mesurer qu'un seul élément à la fois. La sélection de la technique la plus appropriée pour une application donnée est fonction de l'hypothèse que l'on doit tester, cette dernière déterminant la résolution spatiale requise et les éléments à doser. Divers critères, tels que les limites de détection (LODs) par rapport aux concentrations attendues, la nécessité d'obtenir des concentrations absolues (par opposition à l'obtention de rapports élémentaires ou de différences relatives) ainsi que la justesse et la précision des mesures par rapport aux standards analytiques (SRM), doivent être pris en compte lors de la sélection de la méthodologie la plus appropriée.

Tableau VII.5 - Techniques analytiques utilisées en MCO et leurs principales caractéristiques.

Technique	Acronyme	Type	Information	LODs Résolution spatiale	Commentaires
Spectrométrie à énergie dispersive (associée au MEB ou au MET)	EDS (ou ED-EM)	S	- analyse élémentaire - cartographie X	> 1000 ppm - x : 0,5 µm à 10 µm	Analyse multi-élémentaire État de surface critique
Spectrométrie à longueur d'onde dispersive	WDS (ou WD-EM)	S	- analyse élémentaire - cartographie X	100-1000 ppm - x : 0,5 µm à 10 µm	Appropriée pour les éléments légers (Na, K...) avec Sr et Ca Mono et multi-élémentaire État de surface critique
Spectrométrie d'émission ionique secondaire	SIMS	S	- analyse élémentaire - analyse isotopique - échantillonnage dans la profondeur	< 1 ppm à 100 ppm - x : 0,1 µm à 0,5 mm - z : 1 nm à 10 nm	État de surface critique
Émission X induite par bombardement de protons	PIXE	S	- analyse élémentaire	≈ 1 ppm - x : 10 µm à 1 cm - z : 1-10 µm	Non appropriée pour les éléments légers
Spectrométrie de masse à torche à plasma inductif - par ablation laser	LA-ICP-MS	S	- analyse élémentaire - analyse isotopique	≈ 1 ppm - x : 5-20 µm - z : 5-20 µm	Meilleur compromis entre la gamme d'éléments détectés et la sensibilité Analyse multi-élémentaire État de surface non critique
Spectrométrie d'absorption atomique	AAS (flamme, four)	B	- analyse élémentaire	0,1 ppb à 500 ppb (flamme) 0,005 ppb à 50 ppb (four)	Mono ou multi-élémentaire Plus adaptée pour les éléments légers
Spectrométrie d'émission atomique	AES (flamme, arcs et étincelles)	B	- analyse élémentaire	> 5 ppb	Analyse multi-élémentaire Moins sensible aux interférences (que AAS)
Spectrométrie d'émission atomique couplée à une torche à plasma	ICP-AES (ou ICP-OES)	B	- analyse élémentaire	< 1 ppb à 30 ppb	Analyse multi-élémentaire Moins sensible aux interférences
Spectrométrie de masse à torche à plasma inductif	ICP-MS	B	- analyse élémentaire - analyse isotopique	ppt à ppb	Analyse multi-élémentaire Quelques éléments sont susceptibles d'être interférés (e.g. Ca, Na...). Meilleur compromis entre la gamme d'éléments détectés et la sensibilité
Spectrométrie de masse à ionisation thermique	TIMS		- analyse isotopique		Excellente précision et justesse des mesures de rapports isotopiques Nécessite une bonne séparation chimique de l'analyte à mesurer
Spectrométrie de masse des rapports isotopiques	IRMS	B	- isotopes stables (H, C, N, O, S)		Des micro-prélèvements automatiques peuvent améliorer la résolution spatiale (10 µm) Limitée par la taille des échantillons

S : technique de surface ; B : technique globale ; MEB : microscope électronique à balayage ; MET : microscope électronique à transmission ; x : taille du spot d'analyse ; z : profondeur de l'échantillonnage. Pour les techniques globales, les LODs sont données pour des solutions. Elles doivent donc être multipliées par le facteur de dilution pour être comparées au matériel solide.

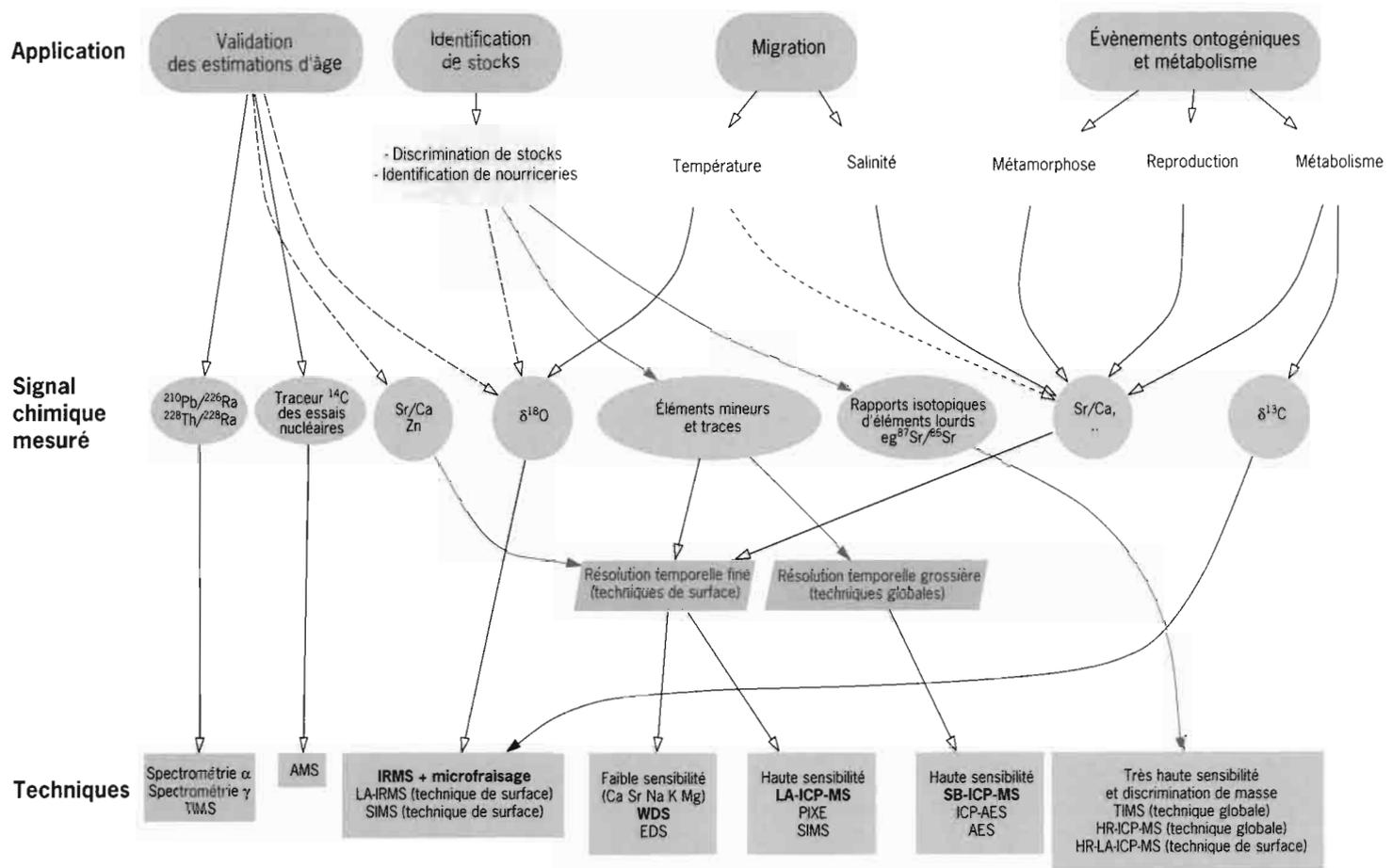


Figure VII.9 - Schéma synoptique des principales applications de la microchimie de l'otolithe. Pour chaque application, le signal chimique mesuré est précisé avec les techniques analytiques appropriées. Flèches solides : méthodes généralement utilisées; flèches en traits et points : méthodes plus rarement utilisées; flèche en pointillés : méthode non recommandée; texte en caractère gras : techniques les plus fréquemment utilisées.

La pratique consistant à exprimer les compositions élémentaires en termes de rapports élémentaires s'est répandue dans les travaux publiés en microchimie. Dans certains cas, il s'agit d'un résultat ou d'une limitation inhérent au fonctionnement des machines analytiques. Pour certaines applications, il peut être également raisonnable d'examiner les relations existant entre les rapports élémentaires, particulièrement lorsque l'on s'attend à ce que le rapport soit influencé par des conditions spécifiques. Cependant, le fait d'exprimer de manière automatique des concentrations élémentaires sous forme de rapports élémentaires, et particulièrement par rapport au calcium, est inapproprié, voire biologiquement inexact.

1.1.1. Analyses de surface

De nombreuses techniques analytiques utilisent l'interaction d'un rayonnement d'énergie incident (photons, électrons, ions) avec la matière. L'interaction donne lieu à une émission secondaire (rayon X, électrons ou ions) dont les caractéristiques dépendent de la nature, de la structure et de la composition de l'échantillon. Parmi les instruments couramment utilisés en MCO (cf. tab. VII.5 pour la signification des acronymes), l'EDS et la WDS utilisent un faisceau incident d'électrons, alors que le PIXE utilise un faisceau de protons. Tous ces instruments analysent l'émission de rayons X. Ils sont multi-élémentaires (le nombre d'éléments pouvant être analysé simultanément avec la WDS dépend du nombre de spectromètres équipant la machine), non destructifs en conditions « normales » et permettent une excellente résolution spatiale. Leurs LODs respectives, qui varient généralement d'un élément à l'autre, diffèrent par plusieurs ordres de grandeur (tab. VII.5). Ils ne peuvent pas mesurer la composition isotopique.

Plusieurs autres techniques sont dérivées de la spectrométrie de masse (SM). Les techniques SM séparent les atomes ou les molécules ionisés sur la différence de leur rapport masse/charge (m/z) et peuvent ainsi être utilisées pour mesurer les compositions isotopiques ou élémentaires. La première étape de l'analyse consiste à créer une phase gazeuse ionisée à partir d'un matériel donné. Cette étape est réalisée en SIMS à l'aide d'un rayon ionique incident accéléré et focalisé sur la surface du matériau. Il convient de noter que la SIMS permet l'obtention de profils en profondeur par pulvérisation continue et régulière de la surface du matériau. Pour la technique LA-ICP-MS, la source d'excitation (ICP pour Inductively coupled plasma) est un plasma d'argon à haute température qui assure avec une bonne efficacité l'excitation et l'ionisation des atomes. L'ICP-MS a été à l'origine développée pour analyser des échantillons sous forme liquide. Le récent couplage d'une sonde à ablation laser (LA) opérant dans l'UV lointain autorise à présent l'échantillonnage de points localisés à la surface d'échantillons solides (surfaces brutes, poudre, sections polies ou lames minces).

La mise en œuvre de ces techniques nécessite le montage des otolithes sur des lames de verre ou dans des blocs de résine époxy. Certaines techniques sont particulièrement sensibles à la rugosité de la surface

(EDS, WDS, SIMS, PIXE). Elles requièrent en conséquence la réalisation de préparations parfaitement polies, présentant une excellente planéité et exemptes de défauts. D'autres techniques telles que LA-ICP-MS peuvent être employées avec des méthodes de préparation plus légères après la coupe et le nettoyage. Des détails complémentaires sur les préparations sont proposés dans le chapitre VIII.C.

1.1.2. Analyses globales

Les analyses globales en MCO font appel aux méthodes de spectrométrie atomique ou aux méthodes de SM. Les premières sont basées sur l'interaction des radiations électromagnétiques avec la matière. La spectrométrie d'absorption atomique (AAS) mesure l'absorption de la lumière pour déterminer la concentration des atomes dans une phase gazeuse. La source de lumière est généralement une lampe à cathode creuse constituée de l'élément à mesurer, ce qui fait de cette technique un procédé de mesure mono-élémentaire. L'échantillon est désolvaté puis vaporisé (pour obtenir des atomes libres) soit par une flamme, soit dans un four en graphite. La première de ces techniques d'atomisation ne s'applique que sur des solutions tandis que la seconde peut également être appliquée à des échantillons solides et elle présente un meilleur rendement d'atomisation. La Spectrométrie d'émission atomique (AES, également appelée OES : spectrométrie d'émission optique) détermine les concentrations élémentaires d'échantillons en solution en mesurant l'émission optique des atomes excités. On peut utiliser diverses sources d'excitation, y compris une flamme ou un plasma (ICP-AES) qui assure une bien meilleure efficacité de l'atomisation. L'AES est une technique multi-élémentaire, ce qui constitue l'un de ses principaux avantages par rapport à l'AAS.

Du fait de meilleures potentialités (meilleure sensibilité et réduction des problèmes d'interférence sauf pour quelques éléments ; voir ci-dessous), l'ICP-MS supplante actuellement les autres techniques pour la détermination d'éléments traces et ultra-traces. Elle peut être opérée en mode standard ou par dilution isotopique (ID-ICP-MS), ce dernier fournissant une précision de mesure inégalée. Comparés aux ICP-MS conventionnels (quadrupôles), les ICP-MS haute résolution (HR-ICP-MS) récemment développés offrent des améliorations considérables en termes de sensibilité et de problèmes d'interférences. Certains fabricants annoncent des limites de détection inférieures à 1 ppq (pg.l^{-1}) pour des isotopes non interférés.

L'analyse globale est généralement réalisée sur des échantillons en solution obtenus par la dissolution de l'otolithe dans une solution acide. Préalablement à la dissolution, les échantillons sont nettoyés, séchés et pesés (voir chap. VII.G.2 et VIII.C pour plus de détails).

1.2. Mesure des isotopes stables

Les techniques de spectrométrie de masse sont utilisées afin de mesurer les isotopes stables. Cependant, les méthodes analytiques adaptées dépendent des isotopes analysés. Les éléments lourds tels que Sr peu-

vent être mesurés par des techniques de surface ou globales (LA- ou SB-ICP-MS), mais les éléments légers tels que C, N et O sont mesurés par la spectrométrie de masse de rapports isotopiques (IRMS pour Isotope ratio mass spectrometry). La source de vaporisation utilisée en ICP-MS ionise les éléments, mais le risque existe qu'une partie seulement des éléments légers et volatils soit canalisée dans le détecteur MS, conduisant ainsi à des sous-estimations de leurs concentrations.

La procédure d'analyse en routine des isotopes de C et de O implique une dissolution soignée de l'otolithe dans un système hermétique, afin de capturer le dégagement de CO₂. Les molécules gazeuses sont ionisées et chargées positivement. Les molécules chargées passent dans un champ magnétique qui les sépare en fonction de leur masse. Des collecteurs de Faraday mesurent alors l'intensité des faisceaux d'ions de masse donnée après qu'ils aient été séparés. Les rapports de masse de l'échantillon gazeux sont mesurés par rapport à un gaz de référence calibré avec un standard international. Les rapports isotopiques doivent être corrigés pour les effets de ¹⁷O conformément aux procédures de Craig (1957). De plus, le fractionnement (température-dépendant) des isotopes de l'oxygène entre l'aragonite et le CO₂, généré par la réaction avec l'acide phosphorique, doit être lui-même corrigé en utilisant un coefficient de fractionnement (α) de 1,01034 (Friedman & O'Neill, 1977).

Avant de procéder aux analyses, les otolithes doivent être traités afin de retirer les composants organiques puisque les protéines contiennent du carbone et de l'oxygène avec des rapports isotopiques différents de ceux de l'aragonite. Les protéines peuvent être détruites par brûlage ou oxydation chimique (hypochlorite de sodium ou peroxyde d'hydrogène). On peut également effectuer un traitement au plasma d'oxygène (à haute température) pour retirer la matière organique des otolithes, bien que ce procédé de pré-traitement ne soit pas encore répandu.

Les précisions analytiques typiques (σ_{n-1}) obtenues pour des répliquats de mesure sur des matériaux standard sont de 0,05 ‰ et 0,07 ‰ pour les rapports isotopiques du carbone et de l'oxygène respectivement. Pour l'oxygène, cette valeur correspond à une précision de $\pm 0,2$ °C pour l'estimation de la température.

Une IRMS peut être équipée d'un dispositif de préparation automatique permettant de travailler avec des échantillons de carbonate extrêmement petits (5 µg) et associée à un système de prélèvement automatisé (micro-fraiseuse pilotée par ordinateur) capable de prélever des échantillons discrets sur des sections d'otolithes (Wurster *et al.*, 1999).

Les développements récents des sondes ioniques (SIMS) et laser (LA-IRMS) ont permis de mesurer les isotopes de C et O *in situ*, c'est-à-dire à la surface d'échantillons solides. Avec une résolution spatiale de 20 à 30 µm, les SIMS se sont déjà avérées des outils performants dans l'analyse des isotopes de l'oxygène de carbonates géologiques (Graham *et al.*, 1996). La précision analytique a été estimée à ± 1 ‰, correspondant à une précision de l'estimation de la température de ± 4 °C. Les

sondes à laser produisent un échauffement modéré de l'échantillon pour en extraire lentement le CO₂ et ne permettent pas l'obtention d'une résolution spatiale aussi fine que celle de la SIMS. Toutefois, une précision analytique de 0,08 ‰ ($\pm 0,4^\circ\text{C}$) a été rapportée pour les isotopes de l'oxygène mesurés sur des dents (apatite) d'herbivores (Kohn *et al.*, 1996). Dans un proche avenir, ces développements pourraient permettre de réaliser des analyses de rapports isotopiques à une échelle spatiale très fine sur les otolithes. Pour ces analyses de surface, le pré-traitement des otolithes par traitement à l'hypochlorite de sodium ou brûlage pourrait s'avérer nécessaire avant l'enrobage afin d'extraire les composants protéiques.

1.3. Radionucléides

Un certain nombre de méthodes peuvent être utilisées pour l'analyse des isotopes radioactifs selon la masse de ces isotopes, leur abondance, le type de désintégration mis en jeu et la précision requise. Les méthodes employées dans l'estimation de l'âge radiométrique comprennent la spectroscopie alpha, la spectroscopie gamma, la spectrométrie de masse à ionisation thermique (TIMS) et la spectrométrie de masse par accélérateur (SMA).

La spectroscopie alpha et la spectroscopie gamma sont basées sur le type de désintégration des radionucléides par émission de particules (soit une particule α , qui est un noyau d'hélium, soit une particule β qui est un électron ou, plus rarement, un positron β^+) et de photons de haute énergie appelés rayon gamma (γ).

Les particules α émises à partir d'un nucléide donné ont toutes la même énergie ou sont divisées en quelques groupes mono-énergétiques entre 4 et 6 MeV. Les radionucléides émetteurs de particules alpha sont généralement quantifiés par spectroscopie alpha. Cette technique requiert une séparation chimique des éléments préalablement à l'analyse, afin de minimiser les interférences entre les différents nucléides émetteurs de particules α dont les énergies peuvent varier dans une fourchette proche de la résolution des détecteurs utilisés sur les spectromètres alpha.

Comme les particules α , les rayons gamma sont mono-énergétiques. Les radionucléides γ -émetteurs produisent lors de leur désintégration des spectres gamma caractérisés par des pics d'énergie bien définis, fréquemment utilisés pour quantifier des nucléides spécifiques.

S'agissant des otolithes, ²¹⁰Pb est généralement dosé indirectement par spectroscopie α par la mesure de son petit-fils ²¹⁰Po ($T_{1/2} = 138$ jours), émetteur de particules α . Ce dernier se situe à 5 ‰ ou moins de l'équilibre séculaire avec ²¹⁰Pb pour des otolithes analysés une année ou plus après échantillonnage (Bennett *et al.*, 1982; Fenton *et al.*, 1990).

Dans l'otolithe, ²²⁶Ra a pu être mesuré soit directement par spectroscopie alpha (Fenton *et al.*, 1990), soit par la technique dite d'émanation de ²²²Rn, ce dernier ($T_{1/2} = 3,82$ jours) étant utilisé comme proxy de l'isotope père ²²⁶Ra (Bennett *et al.*, 1982).

La spectroscopie alpha a également été utilisée pour mesurer ^{228}Th , tandis que ^{228}Ra a été mesuré par spectroscopie gamma au moyen des énergies gamma de l'isotope fils ^{228}Ac ($T_{1/2} = 6,13$ heures).

Il convient de noter qu'en préalable à l'analyse, les échantillons doivent être minutieusement nettoyés afin d'enlever toute contamination exogène puis soumis à des processus de séparation chimique. Les procédures détaillées pourront être consultées dans Fenton *et al.* (1990) pour l'analyse $^{210}\text{Pb}/^{226}\text{Ra}$ ainsi que dans Smith *et al.* (1991) pour l'analyse $^{228}\text{Th}/^{228}\text{Ra}$.

Afin d'améliorer la précision de l'estimation radiométrique de l'âge des otolithes, une technique de séparation de Ra par échange d'ions en préalable à l'analyse par TIMS a été récemment utilisée (Andrews *et al.*, 1999b). Comparée aux méthodes conventionnelles, cette dernière s'est avérée plus juste et précise et plus rapide; elle nécessite en outre une moindre quantité de matériel calcifié.

Étant donné la très faible abondance naturelle de ^{14}C (1 atome de ^{14}C pour 10^{12} atomes de ^{12}C) et l'incapacité de la SM conventionnelle à distinguer ^{14}C de ^{14}N , isotope de l'azote très abondant, les mesures de ^{14}C de l'otolithe nécessitent l'utilisation de la SMA (spectrométrie de masse par accélérateur).

2. Qualité des données

Un certain nombre de questions relatives à la qualité des données ont émergé au fur et à mesure du développement des applications sans cesse plus nombreuses de la MCO. Il est important de réaliser que l'obtention d'informations sur la composition des otolithes de poissons exige de nombreuses étapes de traitement pendant lesquelles divers facteurs peuvent potentiellement affecter la qualité des données. Ces difficultés affectent directement l'interprétation des données de microchimie puisqu'elles ont des incidences directes sur les données quantitatives (e.g. concentration élémentaire) attribuées à chaque individu ou zone de l'otolithe. De plus, il est essentiel d'évaluer la justesse et la précision des différents outils analytiques utilisés de façon à sélectionner la technique la plus appropriée pour une application donnée. La qualité des données et la nécessité de quantifier l'incertitude des mesures analytiques sont des sujets de préoccupation permanents pour les analystes. Un guide pratique présentant un certain nombre de procédures recommandées pour quantifier l'incertitude analytique est proposé par un groupe de travail d'Eurachem/Citac (Ellison *et al.*, 2000). Bien que ce guide soit plutôt orienté vers des applications en routine, il constitue une source de méthodes utiles dans le cadre de l'évaluation de la qualité des données dans les études en MCO.

2.1. Sources potentielles d'incertitude

Il apparaît clairement de la discussion et des exemples fournis dans ce chapitre que la MCO est une discipline récente et encore en plein

développement. On ne dispose pas encore d'informations suffisantes pour quantifier précisément toutes les opérations et processus susceptibles d'altérer les données sur la composition des otolithes de poissons. Certains facteurs d'incertitude tiennent aux processus biologiques qui sont encore mal compris. D'autres facteurs interviennent au niveau de la capture du poisson, de la préparation de l'échantillon ou de l'analyse (fig. VII.10). L'incertitude (probabilité d'erreur) induite par chacun de ces facteurs n'a pas encore été quantifiée et seuls quelques-uns peuvent être manipulés pour minimiser l'erreur. Si l'incertitude n'est pas complètement connue pour les mesures d'éléments intéressant la MCO, il semble aujourd'hui évident que les mesures des éléments qui sont soit liés à la matrice organique, soit adsorbés à la surface de l'otolithe sont les moins robustes (i.e. plus affectées par la procédure analytique). Les paragraphes suivants traitent des différentes étapes mentionnées dans la figure VII.10 et les mots en italique font, quant à eux, référence aux problèmes listés pour chacune des étapes.

2.1.1. Échantillonnage

La *stratégie d'échantillonnage* utilisée pour la collecte d'échantillons de poissons peut engendrer par inadvertance des problèmes dans l'interprétation des résultats de MCO. En fonction de l'application, il convient de décider si l'échantillonnage doit être sélectif ou représentatif. La méthode de capture est, elle aussi, essentielle car les *conditions de capture* peuvent aggraver les modifications de l'endolymphe induites par le stress ou les changements post mortem. L'intervalle de temps entre la capture du poisson et la récupération peut suffire à altérer la concentration de certains éléments si le poisson est capturé à l'aide de pièges ou au filet maillant.

2.1.2. Conservation des poissons

Les poissons sont conservés après la capture jusqu'à l'extraction et l'analyse des otolithes. On a montré que la *méthode de conservation* peut altérer la composition de l'otolithe. Des différences significatives de concentration en Na et K ont pu être observées entre les otolithes de poissons congelés et ceux conservés dans de l'éthanol (Milton & Chenery, 1998; Proctor & Thresher, 1998). Par ailleurs, la pureté du milieu de conservation est très probablement un facteur important et on ignore les effets de la *durée de conservation*. La plupart des études ont testé des méthodes de conservation pendant des semaines ou des mois, mais certaines applications impliquent l'analyse d'échantillons conservés pendant beaucoup plus longtemps. Il doit exister un seuil à la quantité d'éléments libérée ou incorporée dans l'otolithe pendant la conservation mais celui-ci dépend probablement de l'élément considéré. L'effet de la méthode et de la durée de conservation varie également en fonction de la *taille du poisson* et de l'espèce, puisque la taille des otolithes et leur position dans la boîte crânienne affectent le taux d'échange entre l'otolithe et le milieu externe ou les tissus du poisson au cours de la décongélation ou de la conservation dans l'éthanol.

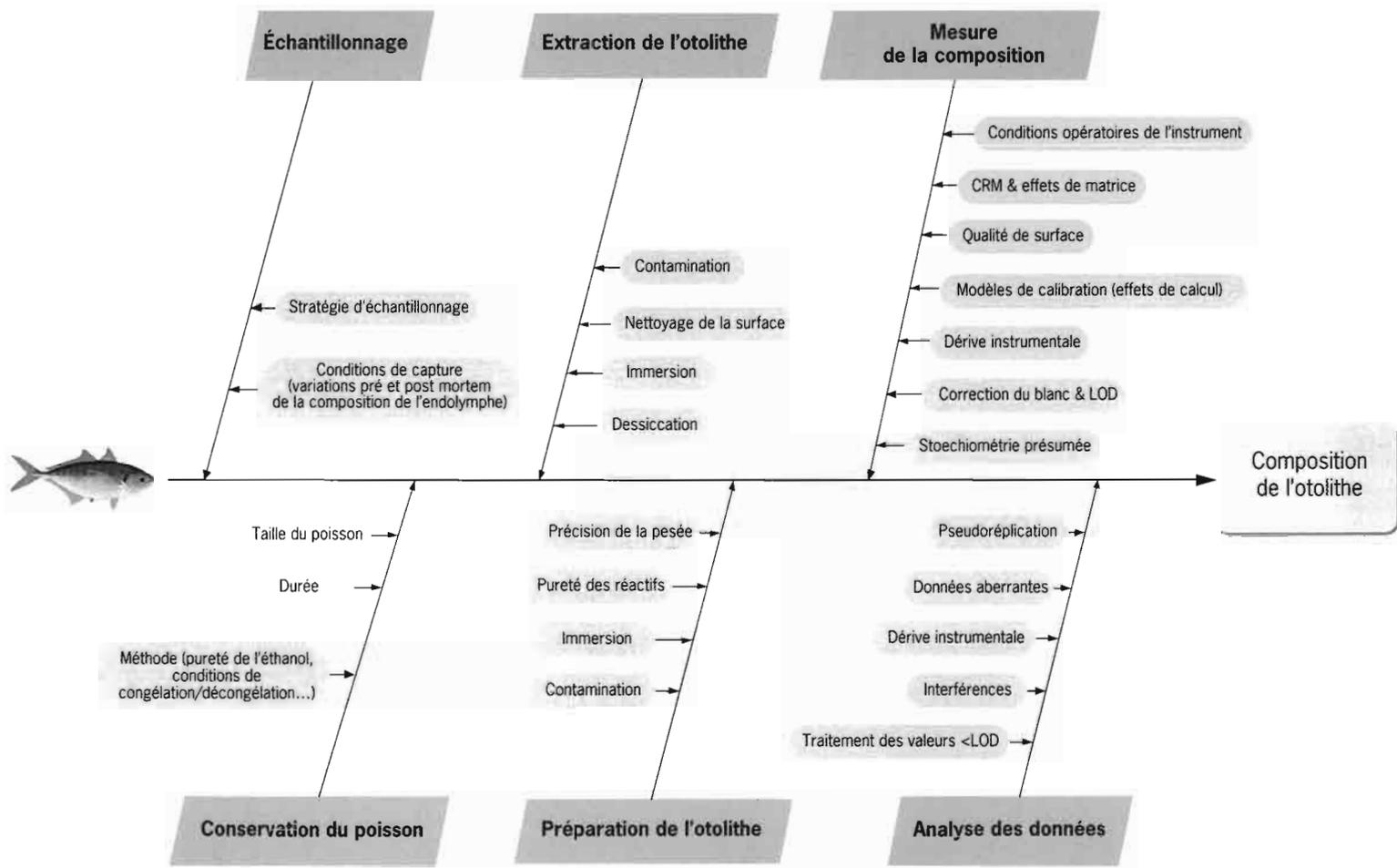


Figure VII.10 - Sources potentielles d'incertitude liées au processus d'analyse de la composition chimiques d'otolithes et d'autres PC de poissons.

2.1.3. Extraction de l'otolithe

Il existe un risque de *contamination* de l'otolithe lors de son extraction, en particulier si l'on utilise des outils de dissection métalliques ou des enveloppes en papier pour le stockage. En outre, le *nettoyage de la surface* après l'extraction est essentiel afin de retirer tous les tissus adhérents. Le nettoyage peut également engendrer une contamination pour certains éléments (en particulier Na) s'il est fait à mains nues. Les effets de la contamination sont difficiles à quantifier car ils diffèrent pour chaque otolithe et chaque opération. Aussi est-il préférable d'utiliser des outils en plastique ou en céramique pour l'extraction et des récipients chimiquement inertes pour le stockage. La composition de l'otolithe est souvent analysée après une phase de lecture d'âge et les lecteurs d'otolithe utilisent parfois des procédés destinés à améliorer le contraste des structures optiques. Les otolithes sont parfois *immergés* dans de l'eau, de la glycérine ou de l'huile, ce qui peut les contaminer ou mobiliser différents éléments et modifier leur distribution spatiale. Les otolithes sont généralement conservés à sec avant l'analyse, à la fois pour la facilité de stockage et du fait du risque potentiel de mobilisation d'éléments par les fluides de conservation. La *dessiccation* ajoute, elle aussi, une erreur non quantifiée, la composante protéique et les éléments qui lui sont associés perdant leur intégrité. Les éléments situés dans les espaces intercrystallins peuvent enfin être déplacés.

2.1.4. Préparation de l'otolithe

La contamination de l'otolithe est quasiment inévitable au cours de la préparation d'échantillons pour l'analyse de surface. Les noyaux ou les parties marginales de l'otolithe coupés pour une analyse globale sont également exposés à la contamination. Les scies, les liquides de lubrification, les disques de ponçage et de polissage ainsi que les suspensions doivent être soigneusement sélectionnés afin de minimiser la contamination (chap. VIII.C). Même si l'on utilise de l'eau ultra-pure pour le nettoyage et la lubrification, l'*immersion* en elle-même peut engendrer la mobilisation de certains éléments (notamment Na). Les otolithes sont poreux et les fluides pénètrent facilement dans les espaces intercrystallins par capillarité. Il est important de s'assurer de la *pureté des produits* utilisés de façon à ne pas introduire de contaminants. Certains sprays ou suspensions de polissage contiennent de l'éthanol ou des huiles, les disques et suspensions utilisés pour le ponçage pouvant également présenter des teneurs significatives en Al et autres métaux. Le verre est une source de Si, de S et de Pb et il peut contaminer la surface de l'otolithe. Les résines utilisées pour l'enrobage de l'otolithe peuvent contenir de faibles teneurs en éléments traces et il est souvent très utile d'analyser la résine parallèlement aux échantillons d'otolithe afin d'évaluer les concentrations de base ou les niveaux potentiels de contamination. Le port de gants est fortement recommandé pendant la préparation de l'échantillon afin de prévenir toute contamination provenant des sels et graisses cutanés.

Les analyses globales donnent des résultats qui doivent être normalisés par rapport à la masse de l'otolithe. La *précision de la pesée* a donc un effet direct et quantifiable sur le calcul de la concentration des éléments.

2.1.5. Analyse de la composition

L'étape la plus difficile en MCO concerne la mesure des éléments dans les échantillons. Cette tâche est rendue plus délicate encore par le fait que la plupart des applications exigent que le biologiste connaisse certains principes de physique et de chimie et apprenne parfois à opérer sur des machines construites et développées pour d'autres disciplines scientifiques. Les applications biologiques ont aussi tendance à pousser ces machines à la limite de leurs performances parce que les concentrations des éléments intéressants ainsi que la quantité de matière disponible sont faibles et que la résolution spatiale requise peut être élevée. Les sources d'incertitude liées à l'étape de mesure de la composition ne sont pas toujours évidentes pour les nouveaux utilisateurs. Des expériences analytiques systématiques peuvent être réalisées pour quantifier l'essentiel de l'erreur de mesure mais seules quelques rares études ont été à ce jour publiées (chap. VII.G.2.2).

Les *conditions opératoires des instruments* ont un effet considérable sur la mesure des concentrations élémentaires. Par exemple, pour les microsondes électroniques, la qualité des données dépend de l'interaction entre le diamètre du faisceau d'électrons, l'intensité et la tension du courant d'excitation, et le temps d'acquisition. La sensibilité des analyses globales est affectée par les taux de dilution des échantillons et par le nombre d'éléments mesurés. Elle varie également en fonction de l'élément ou de l'isotope mesuré. Dans tous les cas, les réglages de l'instrument représentent un compromis entre les exigences parfois incompatibles de justesse, de précision et de rapidité d'analyse.

L'une des principales sources d'incertitude de mesure résulte de la difficulté à se procurer des matériels de référence adaptés (chap. VII.G.2.2). L'amplitude de l'erreur peut être évaluée en comparant des analyses incluant différents *matériels de référence certifiés* (CRM). La disponibilité de nouveaux CRM pour les otolithes devrait limiter ce problème. Même avec des CRM adaptés, les *effets de matrice* doivent être contrôlés ou pris en compte. Deux types d'effet peuvent être considérés en MCO. Le premier est dû au fait que l'ensemble des éléments associés à la composante protéique, et leurs concentrations relatives, ne sont pas connus. Or, certains protocoles de digestion utilisés pour les analyses globales aboutissent à la dissolution des protéines de sorte que les deux composantes organique et inorganique sont mesurées. D'autres protocoles de digestion laissent un « fantôme » organique visible qui représente une partie de la composante organique initiale de l'otolithe. Les effets de la matrice protéique sur la mesure des éléments par les méthodes de surface sont plus difficiles à quantifier mais ils incluent les variations de la *qualité de la surface*, lesquelles altèrent

l'efficacité des sondes. En chimie analytique, les effets de matrice à proprement parler se rapportent aux difficultés analytiques liées à la mesure d'éléments dans des composés. En ICP-MS et WDS, la mesure des différents éléments de l'otolithe est compliquée par la prédominance de CaCO_3 . L'erreur induite par ces effets de matrice peut être contrôlée par la prise en compte de la matrice avec, notamment, la réalisation de standards analytiques présentant des concentrations comparables en CaCO_3 . Il est plus facile d'y parvenir pour la technique SB-ICP-MS que pour les techniques LA-ICP-MS ou WDS pour lesquelles on ne dispose pas de CRMs adaptés. Seule la technique LA-ICP-MS est insensible à la qualité de la surface (la surface devant être cependant toujours exempte de contamination). Des micro-fissures à la surface de l'otolithe entraînent la dispersion des électrons et induisent par conséquent des erreurs dans la détection des éléments et dans la quantification de leurs concentrations.

La conversion du signal mesuré par la machine en concentrations élémentaires dépend du *modèle de calibration*, modèle établi à partir du signal mesuré sur les standards analytiques. L'ajustement de la calibration doit être vérifié avant l'analyse des échantillons d'otolithes, sans quoi des *effets de calcul* généreront des erreurs de mesure.

La *dérive instrumentale* est l'un des problèmes importants de ces techniques analytiques. Ce terme désigne la variation graduelle ou parfois abrupte de la sensibilité de la machine au cours d'une ou plusieurs session(s) d'analyse(s) consécutive(s). Plusieurs méthodes sont utilisées pour minimiser les effets de dérive sur la détermination de la composition de l'otolithe. L'approche habituelle consiste à analyser les échantillons sur une courte durée. On peut aussi remesurer un sous-échantillon à des intervalles réguliers afin de quantifier et corriger la dérive de l'instrument lors de l'étape ultérieure de calcul. Le passage des échantillons dans un ordre aléatoire permet de s'assurer que les erreurs liées à la dérive n'affectent pas systématiquement un groupe d'échantillons particulier.

Le blanc analytique est une source d'erreur de mesure significative. La qualité des blancs analytiques affecte la *correction du blanc* utilisée par le logiciel de l'instrument pour le calcul des concentrations. Les blancs sont également utilisés pour le calcul des LODs et toute contamination ou effet de matrice résultera en une sensibilité amoindrie. Les procédures logicielles de correction de la valeur du blanc peuvent générer des valeurs négatives de concentrations. Elles sont équivalentes à des concentrations inférieures à la limite de détection.

En WDS, les *limites de détection* (LOD) sont estimées pour chaque élément à partir de l'écart type des mesures du fond lorsque les standards sont mesurés. Pour l'ICP-MS en solution, les limites de détection sont estimées à partir l'écart type de mesures répétées sur des blancs correspondant à la solution utilisée pour dissoudre les échantillons. Les estimations de concentration correspondent à celles des échantillons en solution et doivent être corrigées par le facteur de dilution pour se

référer à l'échantillon solide, i.e. pour exprimer les LODs en microgramme par gramme (ppm) d'otolithe. À ce jour, il n'y a pas de consensus sur la méthode d'estimation des limites de détection en LA-ICP-MS et plusieurs méthodes ont été proposées :

- estimation à partir de mesures sur le flux d'argon (i.e. sans ablation);
- estimation à partir de mesures sur des standards (e.g. verres dopés NIST 612 & 610);
- estimation à partir de mesures sur des standards de poudre.

Chaque méthode conduit à une estimation différente des LODs mais aucune d'entre elles n'est satisfaisante du fait d'un manque d'ajustement à la matrice de l'otolithe. La première est la moins « conservatrice » puisqu'elle ne prend pas en compte la quantité de matière ablatée qui influe de manière significative sur les valeurs des LODs.

Lorsque la quantité de matière réellement analysée varie entre les différents points d'analyse (comme dans le cas de l'ablation laser), ou lorsqu'elle n'est pas mesurée, les concentrations élémentaires sont généralement rapportées à une constante. Dans l'analyse des isotopes stables, l'IRMS mesure les rapports isotopiques dans les échantillons et compare ce résultat à celui obtenu sur un standard (PDB, SMOW, etc.). En LA-ICP-MS, la méthode habituelle consiste à normaliser le nombre de coups obtenu sur chacun des éléments par le nombre de coups obtenu simultanément sur Ca. Lorsque la concentration en calcium n'est pas connue, le calcul de la concentration élémentaire est basé sur le *calcul stœchiométrique* du calcium dans CaCO_3 . Si l'on considère les otolithes comme du carbonate de calcium pur, la proportion de calcium est de 40 %. La différence par rapport à la valeur « vraie » affectera les concentrations élémentaires dans les otolithes mais elle n'affectera pas les abondances relatives. Cependant, toute hétérogénéité dans la distribution du calcium au sein de l'otolithe aboutira à une sous- ou sur-estimation des concentrations élémentaires effectives.

2.1.6. Analyse des données

Concernant les applications en MCO, il existe de nombreuses situations dans lesquelles les concentrations mesurées sont proches des LODs. Les méthodes de *traitement de valeurs inférieures aux LODs* doivent alors être arrêtées avant l'analyse statistique. Malheureusement, la littérature disponible en matière de MCO ne contient que peu de détails sur le calcul des LODs ou sur le traitement de valeurs inférieures à ces dernières. Il est indispensable de rapporter la façon dont les LODs ont été calculées, la manière dont les résultats analytiques inférieurs aux LODs sont traités sur un plan statistique et quel pourcentage des résultats pour chaque élément se situe en deçà des LODs. Ces données doivent être prises en compte séparément pour chaque groupe d'échantillons. Des différences de valeurs entre les sessions peuvent obscurcir les comparaisons réelles entre les groupes et générer des tendances trompeuses dans les données.

Il existe plusieurs options pour le traitement des résultats analytiques situés en deçà des LODs :

- inclure toutes les données en utilisant les valeurs inférieures aux LODs dans les calculs statistiques ultérieurs ;
- affecter la valeur 0 aux valeurs inférieures aux LODs en utilisant 0 dans les calculs statistiques ultérieurs ;
- affecter la valeur de la LOD aux valeurs inférieures aux LODs, en utilisant la valeur de LOD dans les calculs statistiques ultérieurs ;
- considérer les valeurs inférieures aux LODs comme données manquantes ;
- convertir toutes les valeurs des éléments présentant des mesures en deçà ou proches de la limite de détection en données de présence/absence et utiliser des méthodes statistiques appropriées.

Dans certaines applications, il est possible d'ignorer les éléments qui présentent de nombreuses valeurs inférieures aux LODs. Cette option est utile pour améliorer la qualité des données lorsqu'elles sont soumises à des analyses multivariées, en particulier pour les problèmes de discrimination de stocks. Dans tous les cas, l'existence de valeurs inférieures aux LODs doit être rapportée pour chaque élément comme :

- pourcentage des mesures inférieures aux LODs ;
- pourcentage des individus présentant des points inférieurs aux LODs.

Des méthodes statistiques incluant l'analyse de la proportion des points inférieurs aux LODs devraient être développées pour aider à la caractérisation des populations et des réponses individuelles.

Les valeurs obtenues pour les concentrations élémentaires ne sont fiables que si les mesures sont exemptes d'*interférences chimiques* ou spectrales. Les interférences peuvent augmenter artificiellement les concentrations mesurées ou rendre la mesure difficile. La présence d'interférence peut généralement être détectée en examinant les concentrations calculées à partir des différents isotopes d'un élément donné. Si les rapports entre les concentrations isotopiques dans l'échantillon correspondent aux proportions apparaissant naturellement, les données peuvent être considérées comme non interférées. Avant de commencer une étude en MCO, il est utile de connaître les sources probables d'interférence. Les *interférences spectrales* entre les raies d'émission X sont publiées pour la WDS et l'EDS, tandis que les logiciels des ICP-MS récents permettent de vérifier les interférences probables (avec une quantification associée) pour chacun des isotopes d'un élément donné avec des composants de masse nominale semblable. En ICP-MS, les interférences spectrales risquent de se produire avec les ions isobariques (e.g. ^{87}Sr et ^{87}Rb), les oxydes réfractaires (MO^+) et les ions d'argon polyatomiques (ArX^+ avec $\text{X} = \text{H}, \text{C}, \text{O}, \text{N}$) formés à partir du plasma d'argon. Concernant cette dernière situation, le cas le plus souvent évoqué est celui de l'interférence entre $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ et $^{56}\text{Fe}^+$. Un certain nombre d'ions ArX^+ peuvent interférer avec les différents isotopes

de Fe, à des degrés variables, ce qui complique la mesure de cet élément par cette technique. Le fait qu'une interférence puisse être séparée d'un isotope intéressant dépend de la résolution en masse de l'instrument, paramètre qui a été considérablement amélioré ces dernières années.

Comme nous l'avons indiqué plus haut, la dérive instrumentale peut produire des tendances dans les données de MCO, tendances qui sont en fait des artefacts de l'analyse. Certaines techniques utilisent des logiciels automatiques pour corriger la dérive de l'instrument avant de produire les valeurs de concentration finales. Il est important d'examiner les données de concentration avant l'analyse statistique afin de détecter la présence et l'influence de la dérive instrumentale. Les valeurs de chaque élément doivent être portées sur un graphique en fonction de l'ordre des mesures. S'il existe des tendances temporelles dans les données, elles peuvent parfois être estimées et corrigées à l'aide d'un modèle de régression ajusté sur les mesures de blancs ou de standards réalisées au début, au milieu et en fin de session d'analyse. Préalablement aux analyses statistiques, les données doivent être examinées et des critères de sélection appliqués afin d'exclure les *points aberrants*, ou résultats analytiques aberrants. Certains points de données doivent être écartés des analyses ultérieures et plus particulièrement lorsqu'ils résultent d'irrégularités ou de fractures à la surface de l'otolithe, de la présence de résine à un point d'analyse, etc. En analyse WDS, les mesures peuvent parfois être effectuées par inadvertance sur des fractures ou des rayures présentes sur la préparation, notamment si le dispositif de visualisation possède un faible grossissement ou si les mesures sont faites le long de radiales pré-programmées. Des points aberrants en WDS peuvent être facilement identifiés par leurs valeurs en Ca. Les résultats concernant l'ensemble des éléments mesurés sur ces points doivent être rejetés. En LA-ICP-MS, les points d'ablation peuvent inclure, par erreur, des fractures voire de la résine en périphérie de l'otolithe, le volume exact de l'ablation étant variable et ne pouvant être contrôlé. Ces points doivent être identifiés par les valeurs d'éléments abondants tels que Sr ou Mg. Les améliorations constantes de la technologie laser devraient réduire les erreurs liées à l'ablation. L'identification et le rejet de points aberrants doivent être basés sur des critères déterminés en fonction de l'amplitude de l'écart de la mesure à la moyenne. Des zones localement contaminées peuvent également produire des points aberrants, lesquels doivent être, de la même manière, rejetés.

Lorsque des points de mesures suspectes résultent de problèmes analytiques, ils doivent être retirés avant l'analyse statistique. Il arrive que l'on observe des valeurs anormales ne pouvant être attribuées à des problèmes analytiques. Cela peut se produire lors de déterminations multi-élémentaires pour lesquelles un élément est en concentration « anormale » alors que les concentrations de tous les autres éléments

sont « normales » sur un même point de mesure. Dans certaines publications, ces données aberrantes sont retirées de l'analyse statistique sans qu'il y ait de réelle justification à ce choix.

L'analyse des données de composition de l'otolithe présente un risque d'*erreurs de pseudoréplication*. La MCO est onéreuse et très chronophage, ce qui entraîne une incitation forte à réduire le nombre d'échantillons soumis à l'analyse. Dans certaines études, des points mesurés le long d'une radiale sur un otolithe sont regroupés de façon à représenter une mesure sur un individu. De la même façon, plusieurs points mesurés sur une zone donnée de l'otolithe sont souvent analysés statistiquement comme étant des répliquats indépendants de cet individu. Les valeurs mesurées le long d'une radiale ne sont généralement pas indépendantes à cause de l'existence de tendances liées à l'âge ou à la taille. Dans l'idéal, des répliquats indépendants pour chaque individu devraient être obtenus par l'analyse des deux otolithes. Un sous-échantillon aléatoire des mesures d'une radiale peut être utilisé pour l'analyse statistique afin d'éviter le problème de co-dépendance. Thresher (1999) évoque d'autres problèmes de pseudoréplication associés à la stratégie d'échantillonnage et au traitement du poisson.

2.2. Justesse et précision des outils analytiques

Très peu d'études se sont focalisées sur les aspects méthodologiques. Gunn *et al.* (1992) ont passé en revue les principes d'utilisation de la micro-analyse par sonde électronique (EPMA) pour l'analyse de la composition de l'otolithe (Ca, Sr, Na, K et S). Ils ont fourni la première comparaison quantitative des capacités de détection de l'EDS et de la WDS et en ont conclu que l'EDS n'était pas une technique suffisamment sensible et précise pour produire des données adaptées à l'analyse de la composition de l'otolithe. Ils ont étudié les effets des conditions opératoires de la WDS (diamètre du faisceau (A), tension d'accélération (E), intensité du courant (I) et temps d'acquisition) sur la qualité des données et conclu qu'une densité de puissance du faisceau ($BPD = EI/A$) de $3\mu W \cdot \mu m^{-2}$ était un compromis acceptable. Toole & Neilsen (1992) ont également discuté les effets des erreurs de mesure associées à la quantification de Sr et Ca par WDS sur les hypothèses tirées de l'analyse des rapports Sr/Ca dans les otolithes.

Plus récemment, une expérience internationale sur la composition de l'otolithe a comparé les potentialités des techniques de surface les plus répandues (EDS, WDS, LA-ICP-MS et PIXE) et examiné les différences entre les laboratoires utilisant un même type d'instrument (Campana *et al.*, 1997). Les résultats ont montré que :

- aucune technique n'est préférable à une autre pour l'analyse élémentaire. Na et K ont été mesurés uniquement par EPMA (EDS et WDS) tandis que les éléments traces ont été mesurés par LA-ICP-MS ou PIXE ; comme attendu, les moins bonnes LODs et la plus mauvaise précision ont été obtenues avec l'utilisation de l'EDS ;

- la justesse, la précision et les LODs diffèrent entre laboratoires utilisant le même type d'instrument. De telles différences peuvent être imputées en partie à des conditions opératoires spécifiques aux laboratoires. Ce fait rend particulièrement difficile la comparaison des données publiées et indique, en outre, qu'une intercalibration est nécessaire lorsque des projets impliquent plusieurs laboratoires ;
- le développement de matériels de référence certifiés (CRMs) adaptés à l'analyse des otolithes est essentiel à la progression de cette discipline et c'est, en outre, une condition préalable à la comparaison des données publiées. En fait, les CRMs géologiques souvent utilisés en MCO ne correspondent pas à la matrice de l'otolithe (aragonite et protéines), ni les substituts qui ont été proposés pour l'analyse par des techniques de type sonde tels que les poudres d'otolithes fusionnées dans des billes de verre (Campana *et al.*, 1997) ou encore le pastillage de carbonate sous presse (Perkins *et al.*, 1991 ; Pearce *et al.*, 1992). Un CRM pour les analyses en solution, préparé à partir d'otolithes de *Lutjanus sebae* a été annoncé, avec des valeurs certifiées pour Na, Mg, K, Ca, Sr, et Ba et des valeurs de référence pour Cu, Zn, Cd et Pb (Yoshinaga *et al.*, 2000).

Chapitre VIII

Techniques de préparation et d'observation

Les chapitres précédents ont montré que les écailles, les otolithes et les os du squelette sont utilisés pour estimer l'âge des poissons en année, en saison ou en jour. La préparation des PC nécessite une série d'étapes de traitement qui peuvent être longues et complexes. Préalablement au démarrage d'une étude de sclérochronologie, il est nécessaire d'identifier les contraintes en termes de temps et de coûts et surtout les objectifs finaux et les résultats attendus (chap. III). Le choix d'une méthode d'estimation de l'âge pour une espèce donnée implique de choisir une PC appropriée (e.g. écaille, otolithe, vertèbre, épine, etc.) et une méthode de préparation pour cette PC (e.g. PC entière, impression, section, lame mince, etc.). Ce chapitre vise à aider le lecteur à choisir l'une des multiples techniques disponibles.

Quelle que soit l'espèce étudiée, le choix d'une méthode de préparation peut également dépendre de la taille du poisson (e.g. enrobage direct des otolithes de larves) ou du type d'analyse finale à effectuer (e.g. rodage et polissage d'otolithes pour l'étude des microstructures ou techniques d'extraction et de préparation « propres » pour les études de microchimie). Dans ce dernier cas, les techniques de préparation sont principalement guidées par la nécessité de réduire la contamination des échantillons.

Le but de ce chapitre est donc de guider le choix du lecteur vers une ou plusieurs méthode(s) d'étude en utilisant des arbres d'aide à la décision. Ce choix devrait aboutir au moins à une méthode d'extraction pour une PC donnée, une technique particulière de préparation et, enfin, une méthode d'observation. La sélection de la méthode de préparation comme celle de la technique d'observation devraient aussi tenir compte de la demande croissante de garantie sur la qualité des résultats (assurance qualité et contrôle qualité) (McCurdy *et al.*, 2000), voir également le site Web

<http://www.mar.dfo-mpo.gc.ca/science/mfd/otolith/english/quality.htm>

A. Arbres d'aide à la décision

H.Troadec, H. de Pontual

Le but premier de ce sous-chapitre est de fournir au lecteur une vision d'ensemble des procédures d'extraction, de préparation et d'observation décrites par la suite. Il vise aussi à donner au lecteur un accès direct aux procédures de traitement appropriées en fonction de leurs buts et de leurs contraintes. La conception de ces arbres d'aide à la décision a été un exercice complexe. Une représentation exhaustive des différentes manières de traiter chaque PC, pour autant qu'elle eut été possible, aurait généré des arbres gigantesques et inutilisables. Pour cette raison, nous avons choisi de réduire le champ des arbres de décision aux principales procédures de traitement des PC et de cibler en priorité un public d'utilisateurs novices. Ces arbres ont été construits à partir de l'information extraite du présent ouvrage dans lequel ils constituent l'unique lien entre la théorie et la pratique. Sans doute les experts en matière de PC pourront-ils les considérer comme incomplets, trop simplifiés ou même faux puisque nombre de contre-exemples peuvent être aisément trouvés dans la littérature, alors même que les novices pourront rencontrer des difficultés à répondre à certaines des questions posées. Néanmoins, nous espérons que ce sous-chapitre pourra au minimum guider les lecteurs débutants dans leur choix d'une PC, particulièrement dans les cas où la littérature est pauvre, et leur permettre d'accélérer la mise au point d'une procédure de traitement des PC.

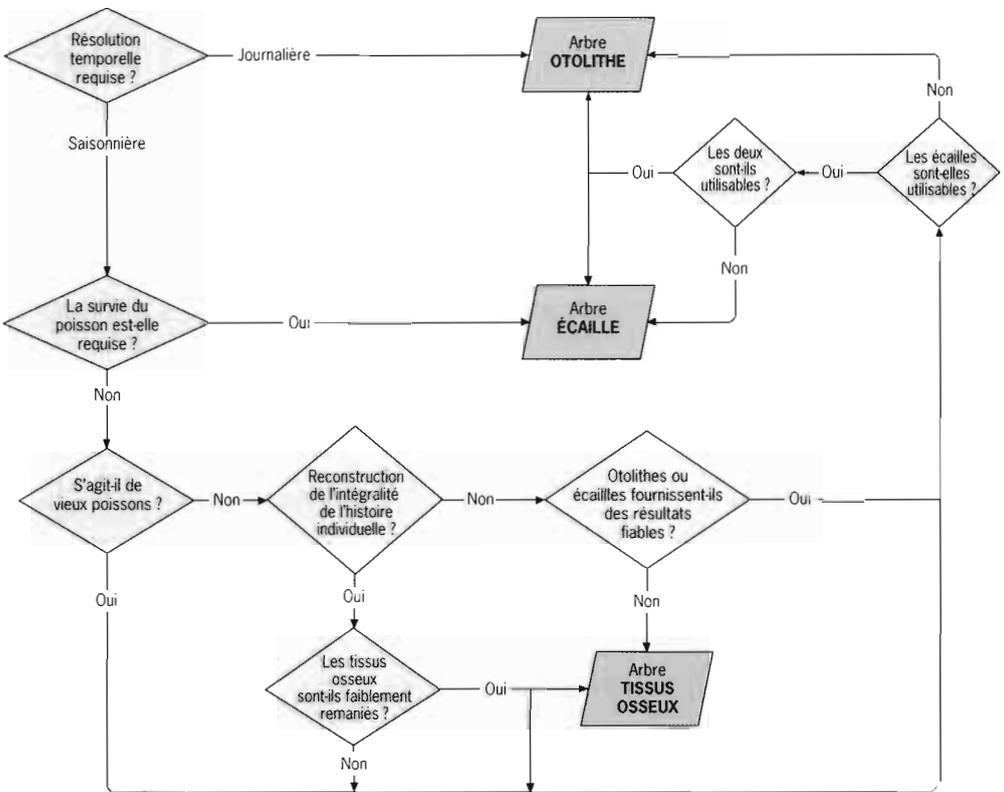
Les arbres se composent de :

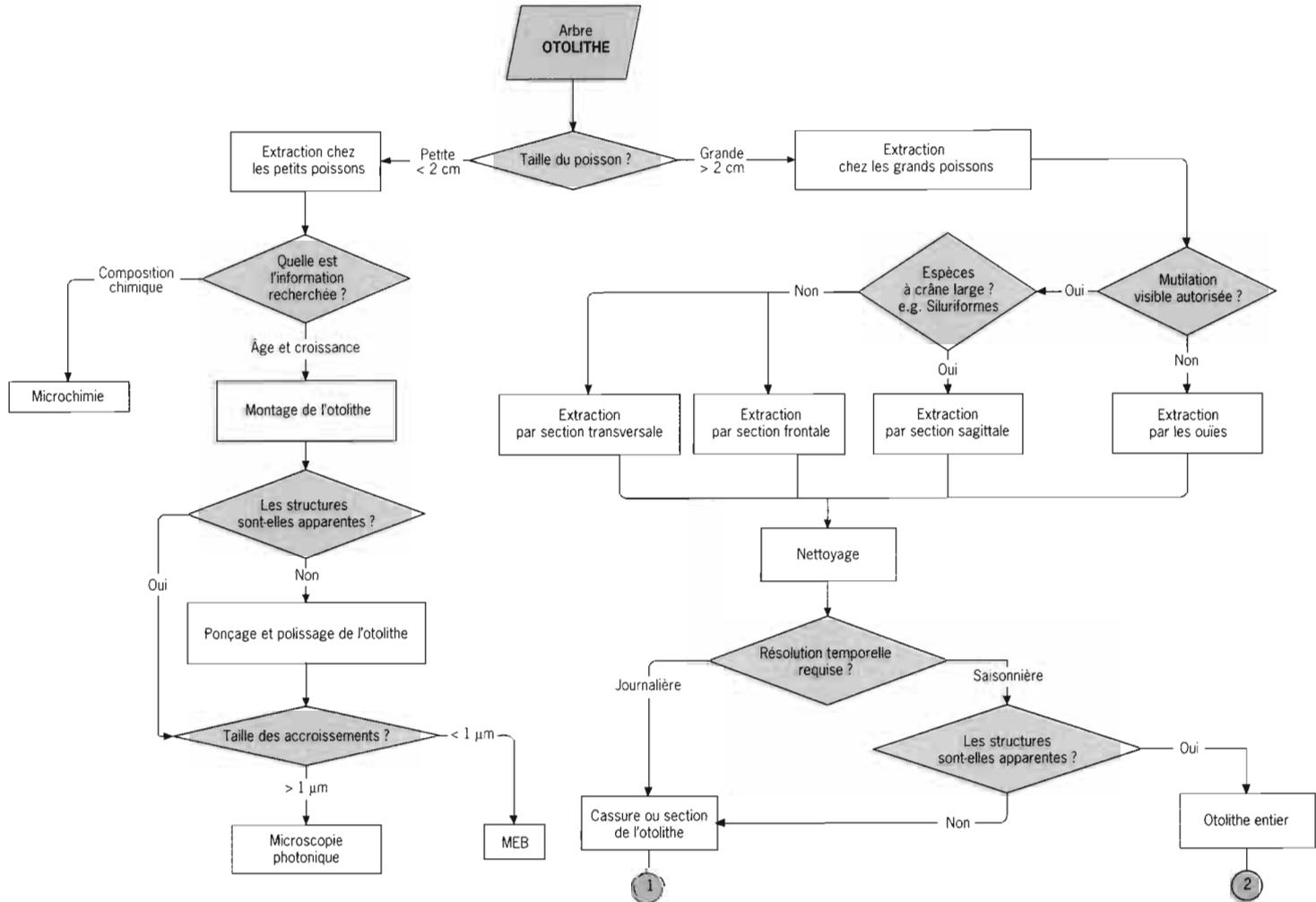
- feuilles représentées par des pavés rectangulaires et correspondant aux procédures décrites dans les sous-chapitres suivants. La version multimédia du manuel possède des liens hypertextes entre chaque feuille et le sous-chapitre correspondant. Les procédures facultatives sont signalées par un texte en italique ;
- branches de contrôle représentées par les symboles en forme de losange qui contiennent des conditions permettant d'orienter le parcours de l'arbre quand un nœud est atteint. La plupart des conditions se réfèrent aux objectifs de l'étude, mais certaines exigeront qu'une préparation de PC soit faite avant que l'on puisse répondre à une question (e.g. « amélioration nécessaire du contraste des anneaux ? »).

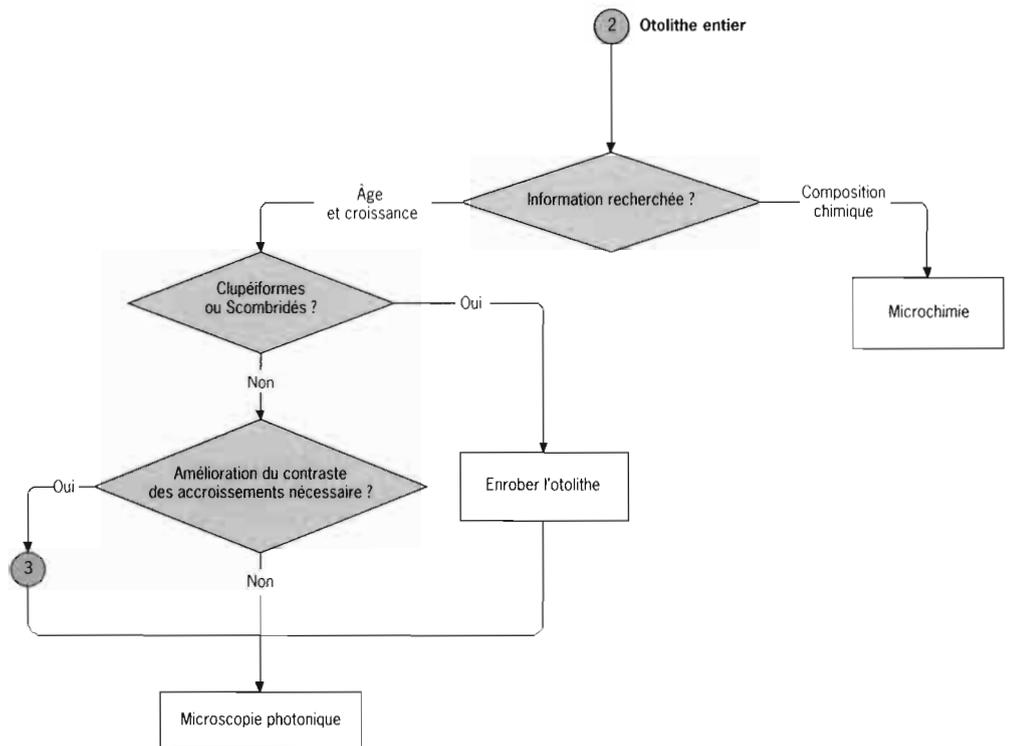
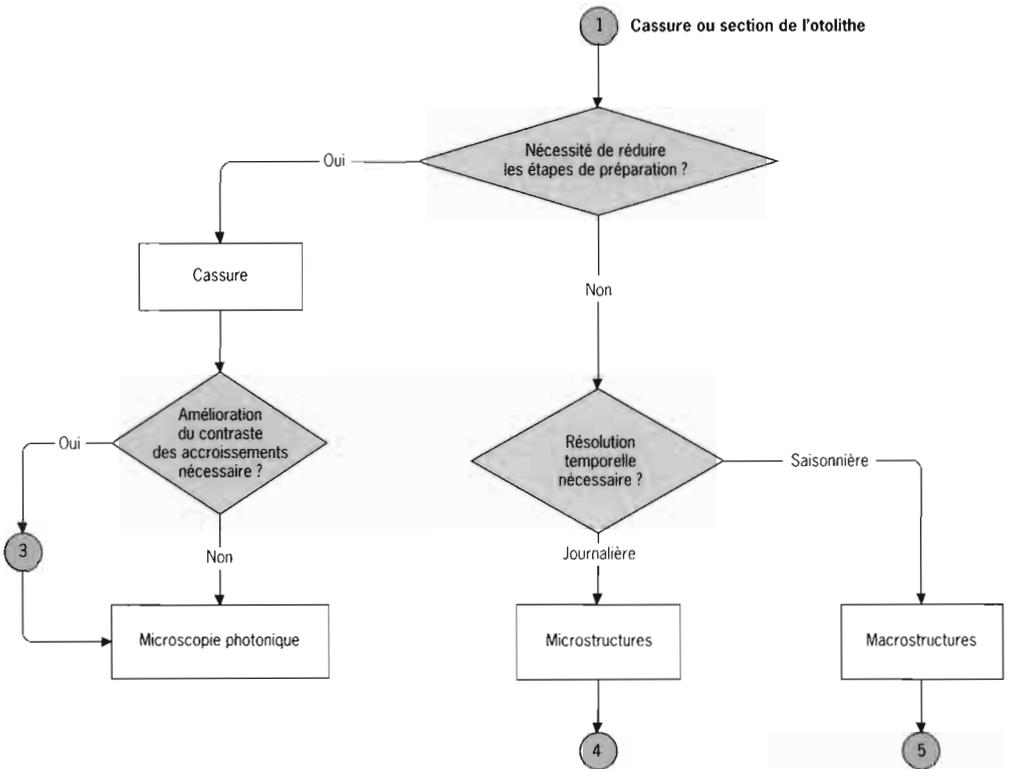
Le parcours d'un arbre est achevé lorsqu'une feuille terminale est atteinte : le protocole à mettre en œuvre correspond alors à l'ensemble des procédures identifiées pendant le parcours. Lors de la rencontre d'une branche à choix multiple ou d'un nœud contenant une question jugée ambiguë, il convient de se référer à la littérature et/ou à son expérience personnelle afin de comparer les différentes solutions. Si l'on envisage d'introduire une innovation technique (i.e. en modifiant

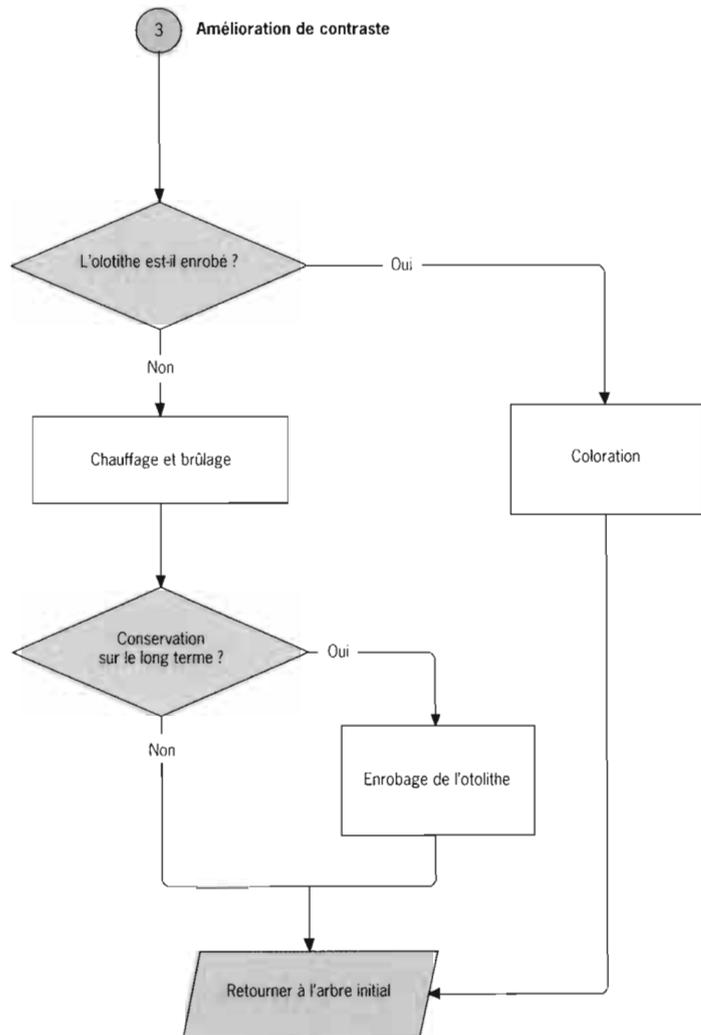
un procédé de préparation ou en utilisant une PC différente), il est conseillé d'évaluer l'avantage relatif fourni par cette amélioration technique par rapport aux possibilités de comparer ses propres résultats à ceux d'études précédentes. Enfin, si l'utilisation de plusieurs techniques d'observation est prévue, il faut s'assurer, avant de commencer le travail, que toutes les procédures de préparation sont compatibles et qu'elles peuvent être combinées correctement aux différentes étapes.

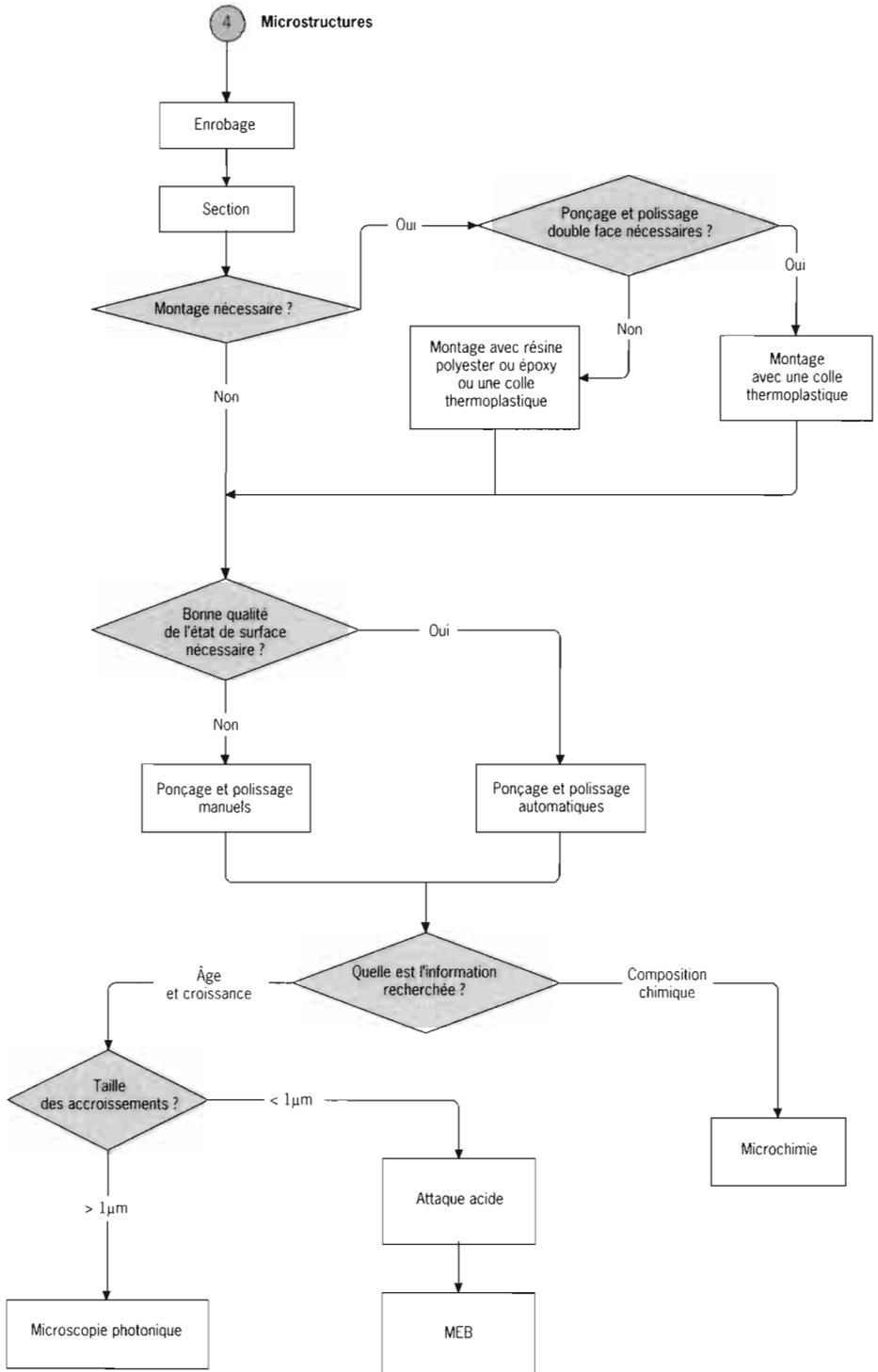
Le premier arbre de décision se base sur des critères très généraux pour le choix d'une PC appropriée, otolithe, écaille ou tissu osseux. Les trois arbres suivants sont dédiés à chaque type de PC et leurs méthodes de traitement respectives.

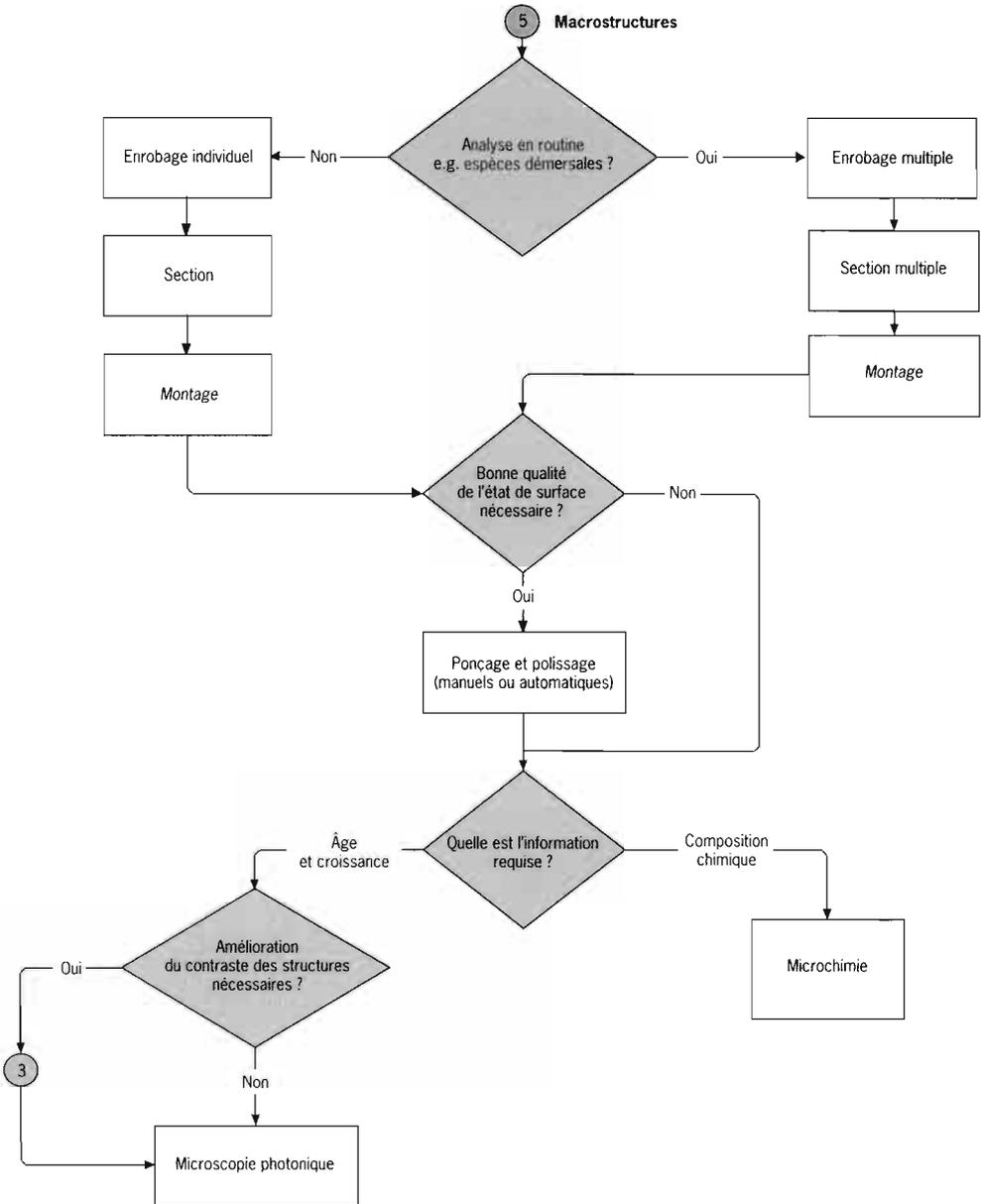


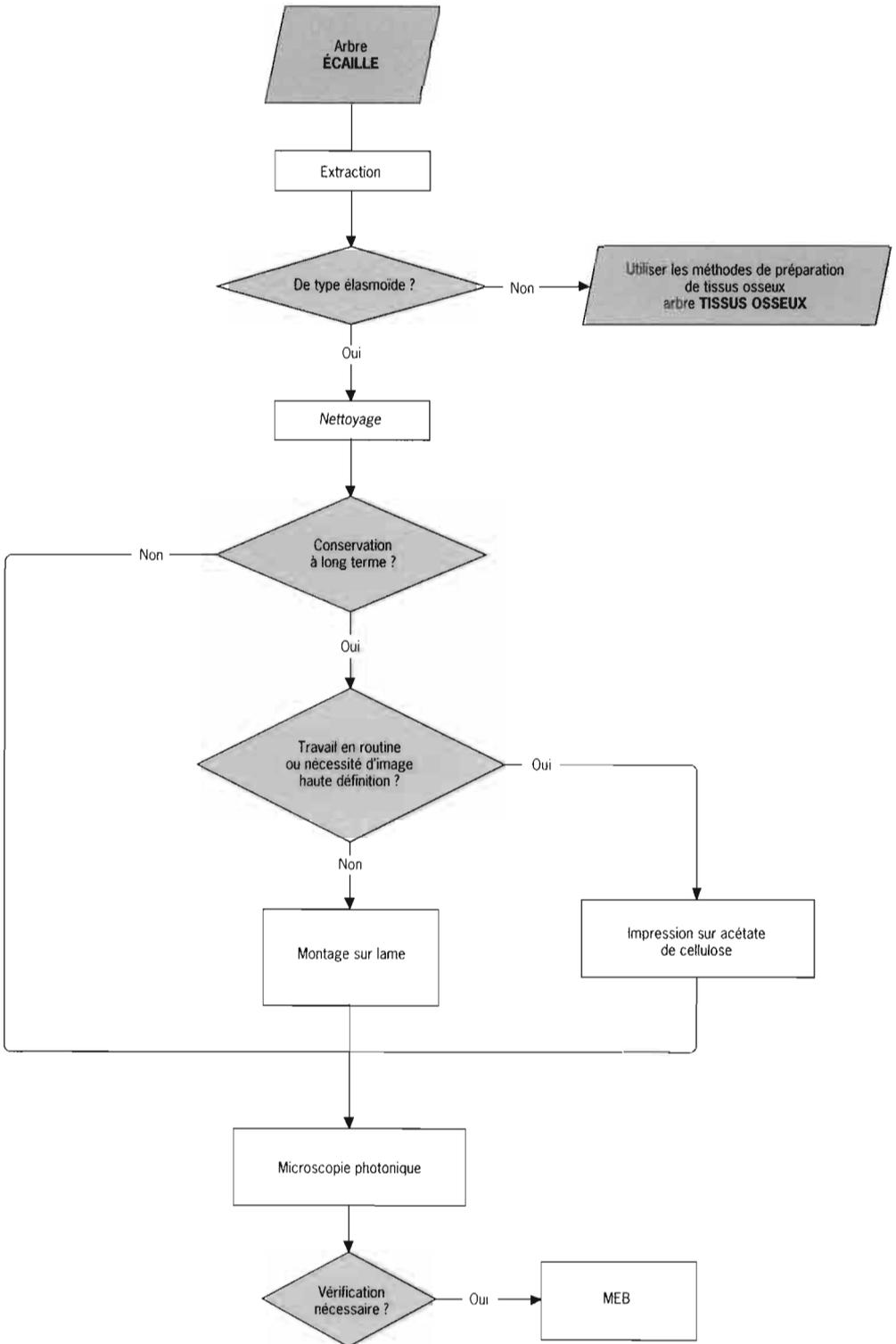


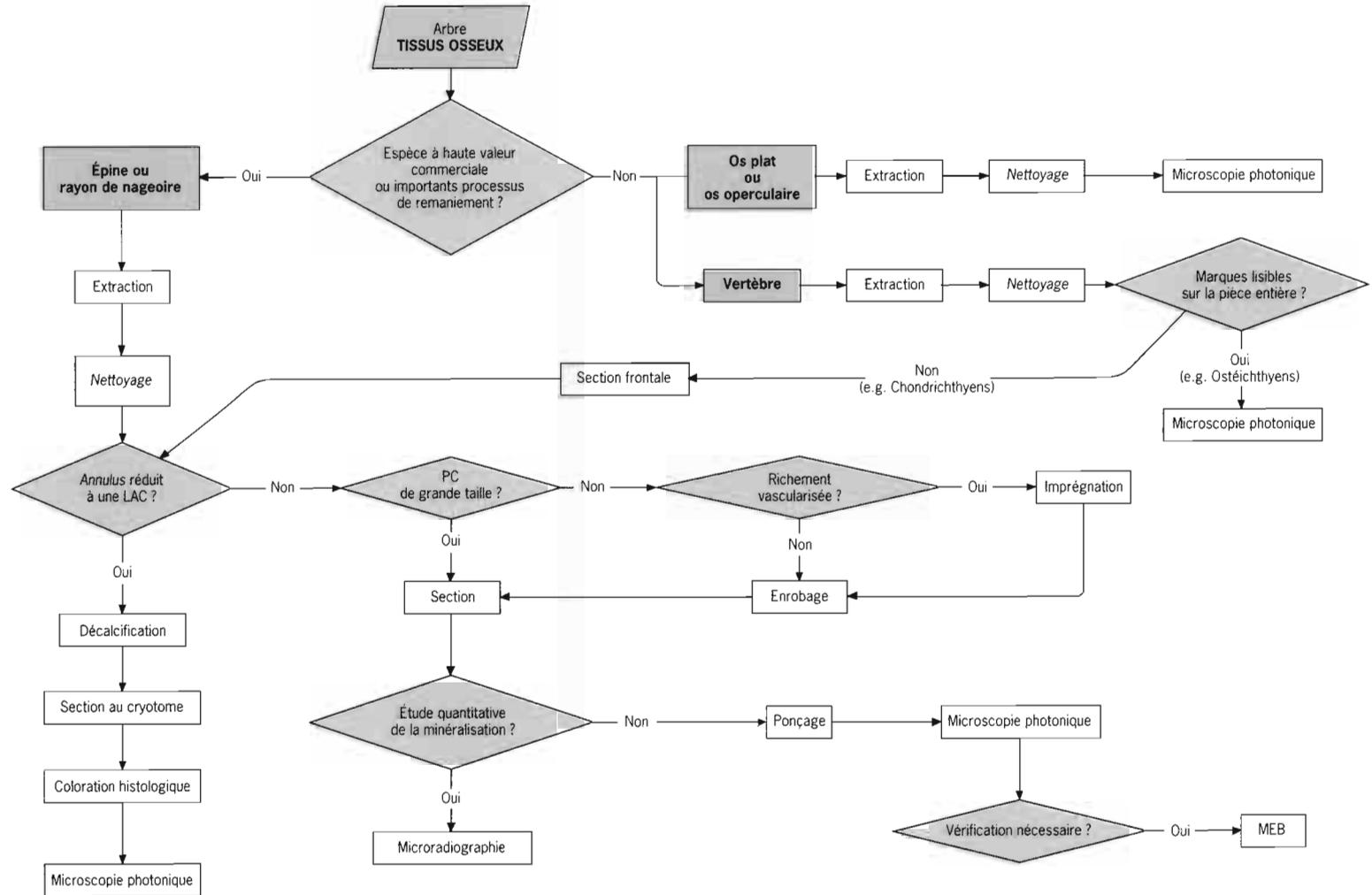












B. Extraction et conservation des pièces calcifiées

J. Panfili

Les étapes d'extraction, de manipulation et de conservation des PC sont primordiales pour le succès des analyses ultérieures (estimation d'âge, analyse microchimique, etc.). Une mauvaise technique de conservation peut entraîner une dégradation irréversible des échantillons.

Lorsque les PC sont collectées dans le but d'étudier leur composition (microchimie), il devient primordial de réduire au maximum les sources potentielles de contamination. À cet effet, des gants doivent être utilisés pour éviter la contamination par les sels et les graisses de la peau. Les outils métalliques de dissection sont aussi une source de contamination et leur utilisation pour l'extraction nécessite qu'ils soient en matière plastique ou en céramique. Le stockage peut affecter également la composition des otolithes ou celle des autres PC : les échantillons doivent être conservés dans des flacons ou des récipients inertes (et non des enveloppes en papier) et ne doivent pas l'être dans des liquides. L'extraction et la manipulation d'échantillons pour les études de microchimie doivent être réalisées dans des environnements très propres et, si possible, sous une hotte à flux laminaire.

Tous les plans d'extraction, de préparation et d'observation qui seront décrits dans ce chapitre font référence aux plans d'orientation classiques des organismes symétriques vivants : les plans sagittal, frontal et transversal.

1. Conservation et préservation des poissons entiers

S'il est nécessaire de conserver le poisson entier, la méthode utilisée influencera également la conservation et l'intégrité de ses PC. Par exemple, la structure de l'otolithe peut être altérée par une technique de conservation inappropriée, car une dégradation *post mortem* ou une dissolution ultérieure est possible à l'intérieur du labyrinthe de l'oreille interne (Brothers, 1987). Cette remarque est généralisable à l'ensemble des PC internes.

Il est toujours préférable d'extraire le matériel calcifié à partir de poissons fraîchement tués, et ceci à tous les stades de la vie des individus. Des précautions particulières doivent être prises lors de l'extraction des otolithes chez les larves et les juvéniles car ils sont plus petits et donc plus exposés à une dégradation ultérieure (Brothers, 1987). Si la conservation du poisson entier est nécessaire, elle peut être réalisée (1) par congélation ou (2) dans l'alcool. Plusieurs solutions alcooliques ont été citées dans la littérature mais nous recommandons l'utilisation

de l'éthanol à 95 % (il existe toujours un risque de détérioration à une concentration inférieure). Le volume de l'alcool par rapport au volume du poisson doit également être vérifié de façon à éviter une dilution trop importante de la concentration initiale. Il est évident qu'il faut éviter absolument les solutions acides, comme le formol, pour la conservation à cause de la nature minérale des otolithes (carbonate de calcium) ou des autres PC (phosphate de calcium), et donc de la possibilité de destructions secondaires (Williams & Bedford, 1974). Il est préférable d'éviter également le formol tamponné (Brothers, 1987).

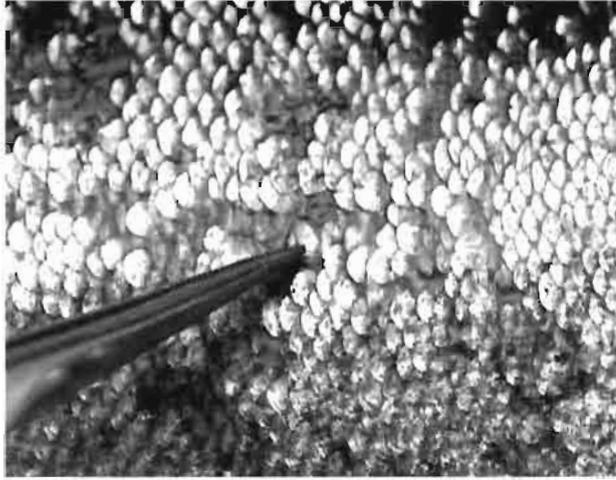
2. Écailles

Les écailles sont certainement les structures les plus simples à extraire. Elles peuvent être prélevées avec soin directement à l'aide de pinces fines, même sur les poissons vivants (fig. VIII.B.1). La survie des individus après un prélèvement d'écaille ne pose pas de problème particulier car la perte d'écailles est aussi un phénomène naturel. La zone du corps à partir de laquelle le prélèvement est opéré doit être rigoureusement choisie à l'avance et standardisée : la forme des écailles diffère en effet d'une région à une autre pour un même individu. La région choisie varie également d'une espèce à une autre (Werder & Soares, 1984 ; Baglinière & Le Louarn, 1987). La première étape pour une espèce nouvelle doit servir à comparer différents endroits de prélèvement avant de choisir celui pour lequel il existe très peu de variation de la forme des écailles ou encore très peu d'écailles régénérées (Paul, 1968 ; Werder & Soares, 1984 ; Al-Absy & Carlander, 1988). Ces sites d'échantillonnage se situent en général dans la région latéro-dorsale du corps (e.g. sous la nageoire dorsale) ou dans une région où les écailles sont plus protégées (e.g. sous la nageoire pectorale pour certaines espèces). Les régions du corps au niveau desquelles les écailles sont modifiées, comme la zone de la ligne latérale, sont bien sûr à éviter. À chaque fois, plusieurs écailles doivent être prélevées au même endroit dans le but de faciliter les futures comparaisons. Le principal avantage du prélèvement des écailles est que le poisson peut être maintenu en vie lors de l'échantillonnage.

Après extraction, les écailles doivent être nettoyées. L'opération de nettoyage est relativement simple, allant de la conservation directe après un nettoyage sommaire (e.g. essuyage dans du papier absorbant) jusqu'à l'utilisation de bains à ultrasons. Ces bains peuvent contenir de l'eau distillée, de l'eau du robinet, de la potasse diluée, du peroxyde de sodium ou de la trypsine. La durée de l'immersion dans la solution active doit être contrôlée de façon à éviter une destruction partielle.

Les écailles sont généralement conservées à sec dans des pochettes référencées ou des enveloppes. Les tissus de l'écaille sont normalement hydrophiles (collagène) et une conservation à sec va nécessairement déformer la morphologie originelle. Lorsqu'une écaille a été conservée depuis un certain temps et qu'elle doit être observée, il est parfois utile

Figure VIII.B.1
Extraction d'écailles chez un
Salmonidae (*Salmo trutta*),
avec l'aide de pinces fines,
dans la région médio-dorsale.
A, antérieur; D, dorsal;
P, postérieur; V, ventral
(photo © Ifremer
O. Dugornay).



de la réhydrater (e.g. pour les écailles grosses ou épaisses de certaines espèces) : ceci est fait normalement dans de l'eau sans précaution particulière. Les écailles sont aussi très souvent conservées après montage entre deux lames de verre pour préparation microscopique (chap. VIII.C.1).

3. Otolithes

Les otolithes doivent être extraits de préférence sur des poissons venant d'être tués ou venant juste de mourir, ou conservés dans l'alcool ou encore congelés. Il est également possible d'extraire les otolithes sur des poissons cuits, en s'assurant toutefois que la structure et l'intégrité de l'otolithe n'ont pas été altérées pas le processus de cuisson. L'extraction est relativement aisée pour les grands poissons, en fonction de l'espèce et/ou de la taille individuelle, mais elle est plus délicate pour les larves et les juvéniles. Le prélèvement des otolithes sera évidemment facilité si l'anatomie du crâne et de l'appareil vestibulaire sont connus à l'avance. La plupart du temps, seul l'otolithe le plus grand et le plus volumineux est extrait et conservé pour les études ultérieures (la *sagitta* chez les non-Ostariophyses et l'*asteriscus* chez les Ostariophyses). La procédure est beaucoup plus complexe lorsque l'on désire prélever tous les otolithes à cause de la très petite taille des 2^e et 3^e paires : dans ce cas, l'utilisation d'une loupe binoculaire devient obligatoire.

Dans une synthèse récente sur la description des oreilles internes des poissons cartilagineux, Lychakov *et al.* (2000) ont souligné le fait que ces poissons ne possèdent pas d'otolithes comme chez les poissons osseux. Le terme « otolithe » est donc réservé uniquement aux Ostéichthyens. Chez les Chondrichthyens, l'âge est estimé à partir des éléments du squelette interne (vertèbres) ou des rayons épineux des nageoires dorsales.

Lorsque les otolithes sont prélevés pour la première fois chez une espèce donnée, il est particulièrement souhaitable de repérer les différents plans d'orientation du matériel étudié : ceci est primordial pour les étapes suivantes de préparation et pour assurer une description très précise des structures. Les images des otolithes présentées par la suite doivent toutes indiquer les plans d'orientation.

3.1. Extraction chez les poissons de grande taille

À l'exception des espèces de très petite taille, les otolithes peuvent être extraits à l'œil nu sans avoir recours à un grossissement particulier (e.g. loupe binoculaire). Il existe quatre principales techniques d'extraction, dont le choix dépend essentiellement du plan de coupe du crâne :

- la section frontale ;
- la section transversale ;
- la section sagittale ;
- la section ventrale par la cavité pharyngienne à travers les branchies.

Le plan de coupe en section frontale est universel et peut être utilisé avec succès pour tous les types de poissons (quelle que soit l'espèce, la taille individuelle ou encore la morphologie crânienne). Cependant, une méthode donnée est utilisée pour une espèce donnée après une phase d'adaptation et de mise au point technique. Les outils de coupe varient en fonction de la taille du crâne mais vont du simple scalpel pour les plus petits individus jusqu'aux scies électriques pour découper les os crâniens des plus grands poissons (e.g. thons, espadons, marlins), mais un couteau de cuisine est la plupart du temps parfaitement adéquat. La coupe doit être réalisée avec précaution pour éviter de sectionner l'oreille interne et les otolithes. Après avoir effectué la coupe appropriée, les otolithes sont en général prélevés avec des pinces fines. Un prélèvement soigneux et contrôlé peut permettre d'extraire la totalité du système des canaux semi-circulaires de l'oreille, contenant les trois otolithes dont, en général, seul le plus gros est retiré.

3.1.1. Section frontale de la tête (fig. VIII.B.2)

Une section frontale de la partie supérieure du crâne est pratiquée, en passant généralement à travers la partie dorsale de l'œil, parallèlement à l'axe d'allongement principal du poisson, et terminant au niveau du bord postérieur de l'os operculaire (fig. VIII.B.2a). La partie supérieure décalottée du crâne est enlevée (fig. VIII.B.2b, b'). Le cerveau est alors prélevé délicatement à l'intérieur de la cavité crânienne apparente (fig. VIII.B.2c, c', d, d'). Les cavités des oreilles internes contenant les canaux semi-circulaires sont ainsi visibles par le dessus : elles sont positionnées à la base du crâne, vers la partie postérieure de la cavité contenant le cerveau et latéralement par rapport à l'axe principal du poisson. Les otolithes sont prélevés à l'aide de pinces fines (fig. VIII.B.2e, e'). Cette méthode est utilisée principalement pour les espèces ayant le corps comprimé latéralement (espèces les plus évoluées) et pour les poissons plats.

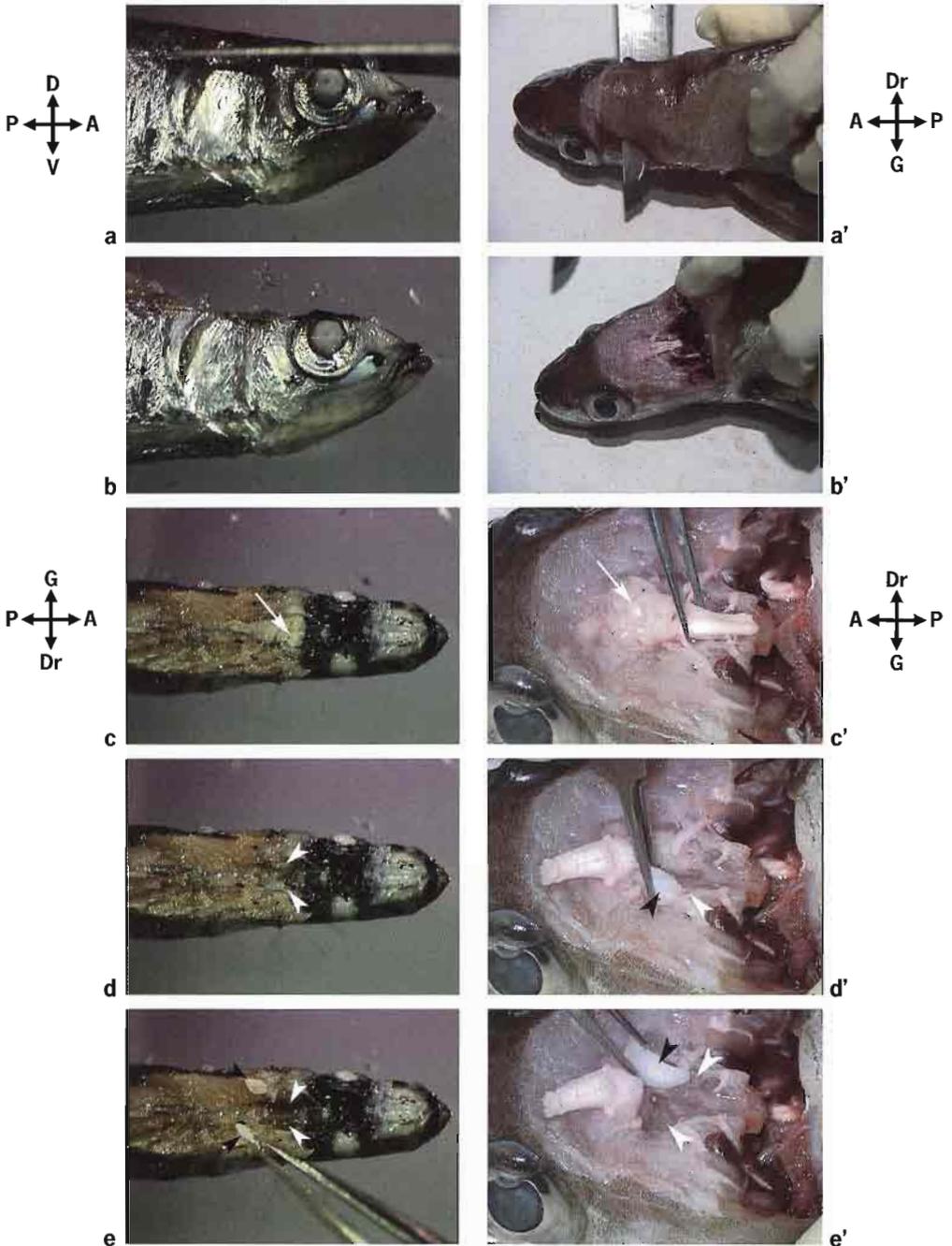


Figure VIII.B.2 - Prélèvement d'otolithes à partir d'une section frontale de la tête. a, b, c, d, e : Espèce de petite taille (*Vinciguerria nimbaria*, Photichthyidae, 4 cm LS). a', b', c', d', e' : Espèce de taille moyenne (*Trisopterus luscus*, Gadidae, 25 cm LS). a) Vue latérale de la section frontale avec la lame de scalpel. a') Vue dorsale de la section frontale avec le couteau de découpe. b, b') Vues de la section frontale après suppression de la partie dorsale du crâne et des muscles. c, c') Localisation du cerveau (flèche blanche) avant sa suppression. d, d') Localisation des otolithes après avoir supprimé le cerveau; les flèches blanches indiquent la localisation des oreilles internes et les flèches noires montrent les *sagittae*. e, e') Extraction de l'otolithe (*sagitta*) avec des pinces fines; les flèches blanches indiquent la localisation des cavités de l'oreille interne et les flèches noires montrent les otolithes (*sagittae*). A, antérieur; D, dorsal; Dr, droite; G, gauche; P, postérieur; V, ventral (photos © Ifremer O. Dugornay).

3.1.2. Section transversale de la tête (fig. VIII.B.3)

Une section transversale de la tête est pratiquée au niveau de la partie postérieure du crâne, en passant généralement à travers la région postérieure de l'os pré-operculaire (fig. VIII.B.3a, a'). La tête entière est coupée et la partie antérieure est séparée du reste du corps. En regardant cette section de la tête par-derrière, la partie postérieure du cerveau (bulbes rachidiens) est alors visible dans la partie supérieure du crâne, et les deux cavités des oreilles internes sont localisées latéralement et sous le cerveau. Normalement, il n'est pas nécessaire d'enlever le cerveau. Les otolithes et les canaux semi-circulaires sont directement prélevés avec des pinces fines (fig. VIII.B.3b, b', c, c'). Il faut noter que cette méthode demande très souvent un entraînement préalable, en

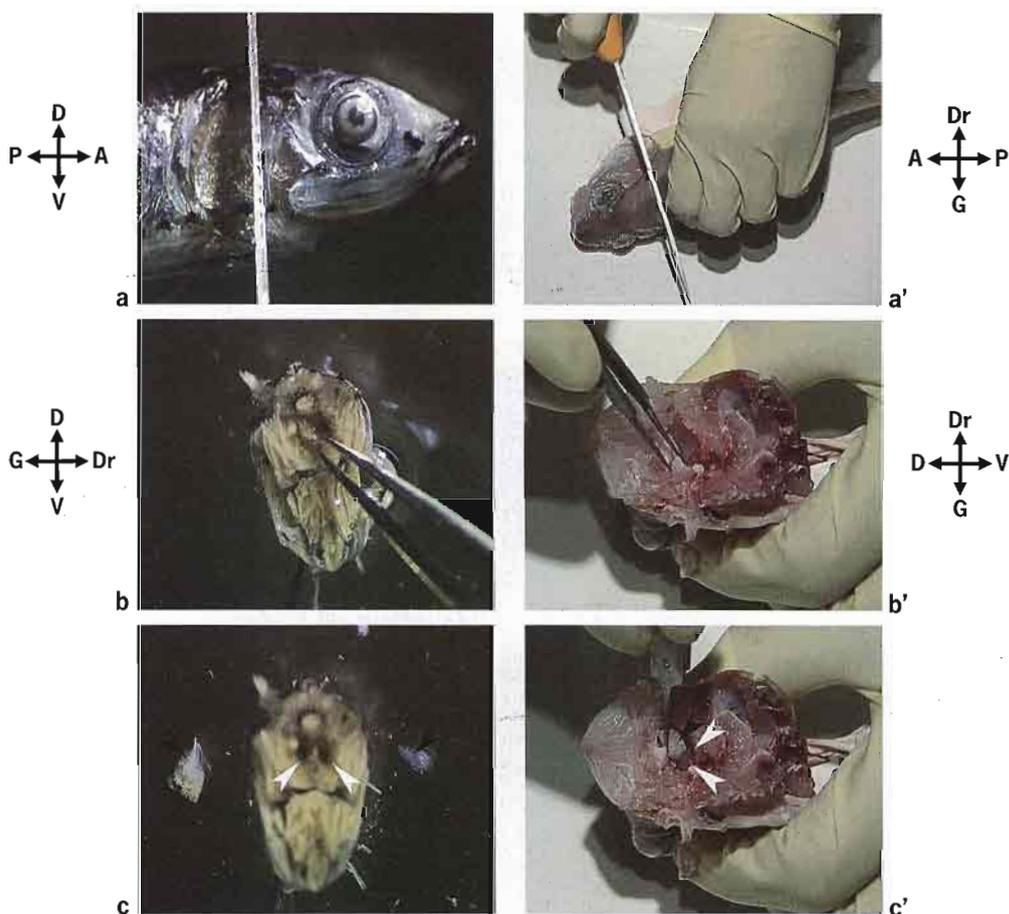


Figure VIII.B.3 - Prélèvement d'otolithes à partir d'une section transversale de la tête. a, b, c : Espèce de petite taille (*Vinciguerria nimbaria*, Photichthyidae, 4 cm LS). a', b', c' : Espèce de taille moyenne (*Trisopterus luscus*, Gadidae, 25 cm LS). a) Vue latérale de la section transversale avec la lame de scalpel. a') Vue dorsale de la section transversale avec le couteau de découpe. b, b') Extraction de l'otolithe (*sagitta*) avec l'aide de pinces fines et après suppression du cerveau. c, c') Prélèvement des otolithes (*sagittae*); les flèches blanches indiquent la localisation des cavités des oreilles internes; les flèches noires montrent les otolithes. A, antérieur; D, dorsal; Dr, droite; G, gauche; P, postérieur; V, ventral. (photos © Ifremer. O. Dugornay).

fonction de la morphologie de la tête, de façon à localiser parfaitement le niveau antéro-postérieur de la coupe : il existe en effet un risque non négligeable de couper ou de casser les otolithes. Cette méthode est utilisée principalement pour les espèces de grande taille comme les thons et les espadons, et aussi pour les Anguilliformes.

3.1.3. Section sagittale de la tête (fig. VIII.B.4)

Une section sagittale de la tête est pratiquée en passant à travers le milieu du crâne (fig. VIII.B.4a, a'), depuis la bouche et au moins jusqu'à la fin de l'os operculaire. À cause de la position latéro-centrale des oreilles internes dans le crâne, la coupe doit être réalisée de façon très précise. Ensuite, une section de la tête dans la région operculaire permet de séparer les deux moitiés. Chaque moitié est alors traitée séparément. Le cerveau est enlevé pour permettre de localiser entièrement l'oreille interne, positionnée à l'arrière et en dessous du cerveau (fig. VIII.B.4b, b', c, c'). Les otolithes et les canaux semi-circulaires sont alors extraits de l'oreille avec soin (fig. VIII.B.4d, d'). Cette méthode est surtout utilisée pour les espèces possédant un crâne large comme les Siluriformes. Elle permet aussi de prélever plus facilement et à coup sûr les trois paires d'otolithes, car la position anatomique du labyrinthe est mise à jour de façon précise et elle est donc recommandée dans le cas des espèces peu connues.

3.1.4. Section ventrale de la tête à travers les branchies (fig. VIII.B.5)

Sur la face ventrale, l'opercule est écarté par rapport à la tête du poisson (fig. VIII.B.5a). Les branchies sont alors visibles et les arcs branchiaux sont coupés sur leur bord interne. La structure ventrale des os du neurocrâne apparaît (fig. VIII.B.5b) et tous les tissus environnants doivent ensuite être retirés. Les bulles pré-otiques sont alors localisées dans la partie médio-latérale du neurocrâne. Une légère incision dans la partie externe de ces bulles ouvre l'oreille interne à partir de laquelle le principal otolithe (généralement la *sagitta*) peut être prélevé (fig. VIII.B.5c). Lors du prélèvement, si la *sagitta* est poussée malencontreusement à l'intérieur du cerveau, il devient extrêmement difficile de l'extraire sans avoir à couper tous les os crâniens et à supprimer le cerveau entier. Cette méthode convient particulièrement lorsqu'il est nécessaire de conserver l'aspect originel de la tête après la suppression des otolithes, par exemple pour les espèces commercialisées et destinées à la vente. Elle est alors utilisable pour toutes les espèces non-Ostariophyses, donc seulement pour l'extraction des *sagittae*. D'autres méthodes semi-automatiques de prélèvement des otolithes avec des foreuses ont été mises au point et utilisées sur les marchés de vente de poissons : elles sont maintenant disponibles pour les espèces commercialement importantes comme les Scombridae (Thorogood, 1986).

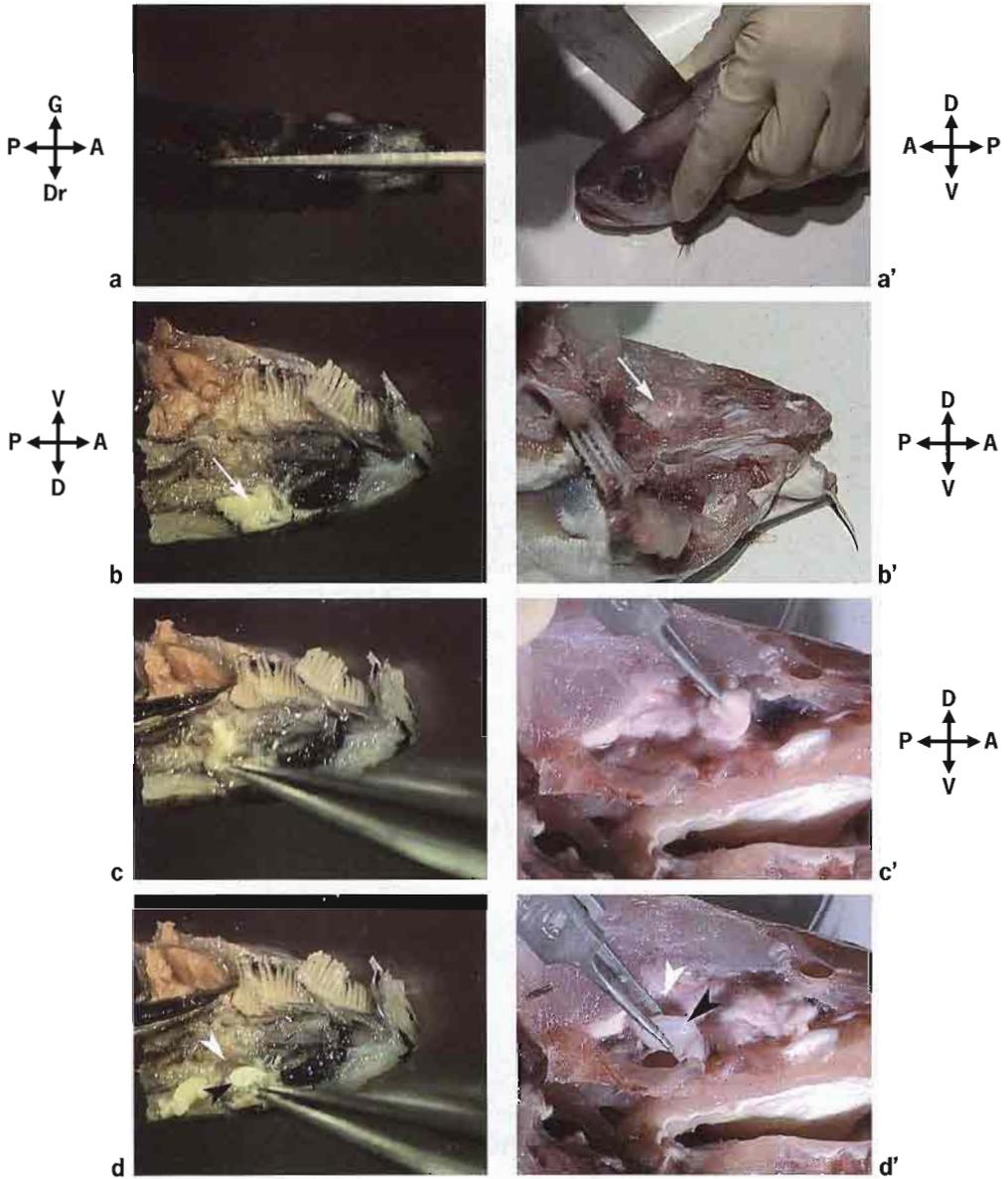


Figure VIII.B.4 - Prélèvement d'otolithes à partir d'une section sagittale de la tête. a, b, c, d : Espèce de petite taille (*Vinciguerria nimbaria*, Photichthyidae, 4 cm LS). a', b', c', d' : Espèce de taille moyenne (*Trisopterus luscus*, Gadidae, 25 cm LS). a) Vue dorsale de la section sagittale avec la lame de scalpel. a') Vue médio-dorsale de la section sagittale avec le couteau de découpe. b, b') Vues de la localisation du cerveau (flèche blanche) dans la demi-tête. c, c') Suppression du cerveau avec des pinces fines à l'intérieur de chaque demi-tête. d, d') Extraction d'un otolithe (*sagitta*) avec des pinces fines; les flèches blanches indiquent la localisation des cavités de l'oreille interne; les flèches noires montrent l'otolithe (*sagitta*). A, antérieur; D, dorsal; Dr, droite; G, gauche; P, postérieur; V, ventral (photos © Ifremer O. Dugornay).

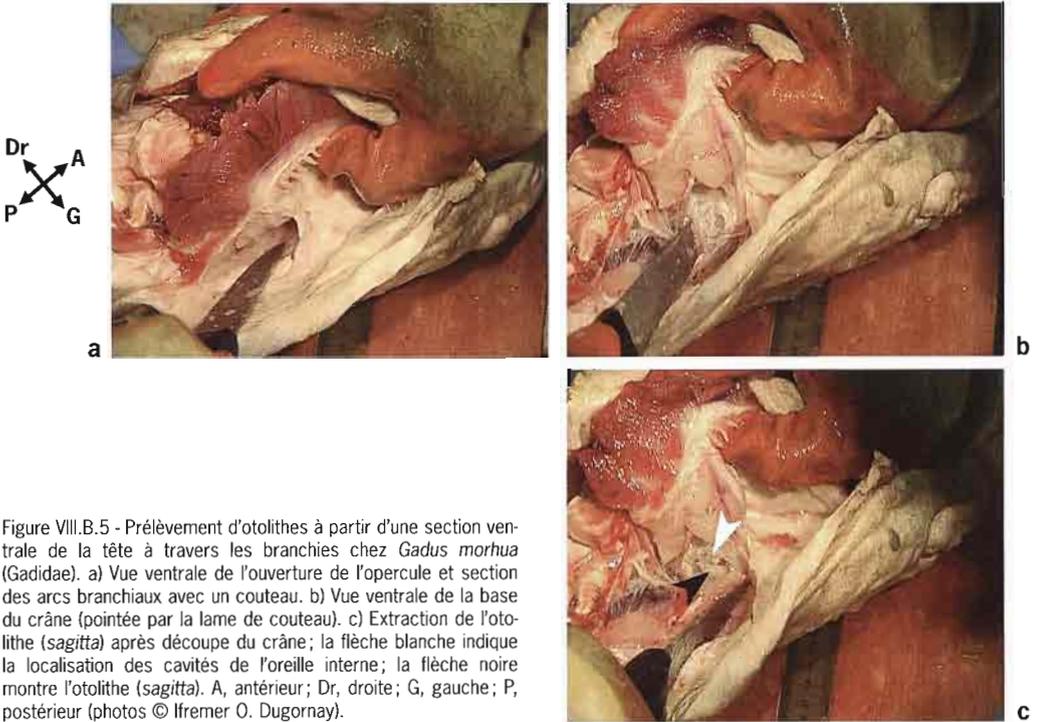


Figure VIII.B.5 - Prélèvement d'otolithes à partir d'une section ventrale de la tête à travers les branchies chez *Gadus morhua* (Gadidae). a) Vue ventrale de l'ouverture de l'opercule et section des arcs branchiaux avec un couteau. b) Vue ventrale de la base du crâne (pointée par la lame de couteau). c) Extraction de l'otolithe (*sagitta*) après découpe du crâne; la flèche blanche indique la localisation des cavités de l'oreille interne; la flèche noire montre l'otolithe (*sagitta*). A, antérieur; Dr, droite; G, gauche; P, postérieur (photos © Ifremer O. Dugornay).

3.2. Extraction chez les poissons de petite taille (fig. VIII.B.6)

Cette description concerne toutes les espèces de poissons et les stades de vie dont les tailles n'excèdent pas 2 cm, et donc principalement les larves et/ou les juvéniles. L'extraction doit être réalisée dans un liquide d'immersion : nous recommandons l'éthanol à 95 % mais certains auteurs utilisent aussi l'eau, la glycérine ou le xylène. L'utilisation de l'éthanol à 95 % empêche une érosion secondaire des structures de l'otolithe. Le prélèvement est normalement réalisé dans le même liquide que celui utilisé pour la conservation des individus entiers. Les otolithes peuvent être assez facilement extraits, même chez les plus petites larves, en utilisant un microscope pour la dissection (généralement une loupe binoculaire) avec de la lumière polarisée. Les otolithes ont en effet pour caractéristique d'être réfringents à la lumière polarisée, ce qui permet de les distinguer des tissus avoisinants (fig. VIII.B.6a). Les otolithes sont séparés et prélevés avec l'aide de minuties (e.g. 150 µm de diamètre), en dilacérant les muscles, les os et autres tissus de la tête (fig. VIII.B.6b). Ils sont alors nettoyés des tissus adhérant à leur surface en les frottant et les grattant avec les minuties. La manipulation pendant la dissection nécessite des gestes sûrs et précis, des outils appropriés, de la pratique et de la patience (Secor *et al.*, 1992). L'étape la plus délicate est certainement leur manipulation et leur transport après la dissection. Si les otolithes ne nécessitent pas de préparation supplémentaire, la meilleure technique consiste à les

enrober directement dans de la résine (chap. VIII.C.2.2.3). Auparavant, ils sont transportés en les aspirant directement dans une goutte de résine non polymérisée au bout d'une pipette ou d'une fibre de verre. Autrement, les otolithes doivent être manipulés et stockés à sec.

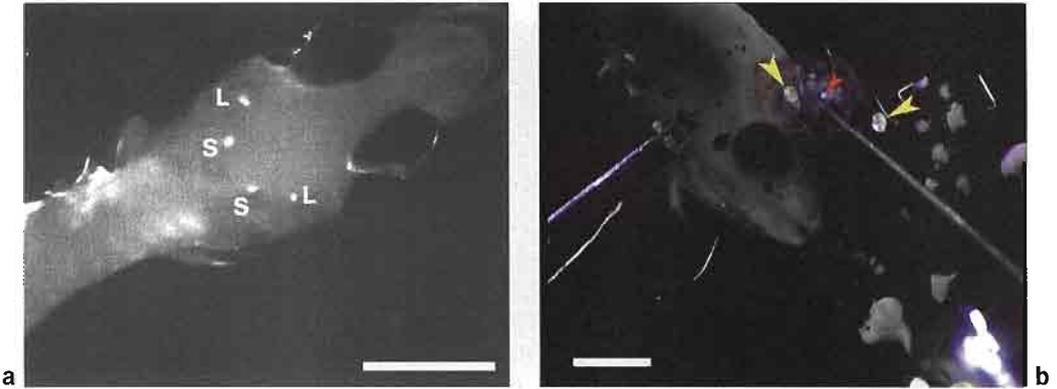


Figure VIII.B.6 - Prélèvement d'otolithes de larves sous une loupe binoculaire en lumière polarisée chez *Vinciguerria nimbaria* (Photichthyidae). Les otolithes sont facilement localisés grâce à leur réfringence sous la lumière polarisée. a) Vue dorsale de la face antérieure d'une larve; S, *sagitta*; L, *lapillus*; échelle = 500 µm (photo J. Tomás). b) Prélèvement d'otolithes avec l'aide de minuties; les os crâniens et le cerveau sont enlevés avant l'isolement de la *sagitta* (flèche jaune) et du *lapillus* (flèche rouge); échelle = 1 mm (photo © Ifremer O. Dugornay).

La même procédure de dissection peut être employée pour prélever les otolithes des embryons dans l'œuf. Dans un premier temps, l'embryon est extrait de l'œuf et les otolithes sont alors enlevés comme décrit précédemment pour les larves.

Secor *et al.* (1992) ont décrit deux autres méthodes pour extraire les otolithes de très petite taille, le passage à l'eau de Javel et l'inclusion, mais ces techniques nécessitent beaucoup plus de temps et de pratique, et elles ont finalement moins de réussite : elles ne peuvent être recommandées. Le passage dans l'eau de Javel consiste simplement à immerger le matériel dans de l'hypochlorite de sodium et à extraire les otolithes après la lyse des tissus. D'autres enzymes protéiniques comme la trypsine ont été utilisées (Rojas-Beltran & Vincent, 1993), mais le succès de la procédure d'extraction semble beaucoup plus variable et il est impossible de confirmer qu'il n'y a pas eu d'érosion de la partie protéique de l'otolithe. La technique d'inclusion nécessite au préalable une déshydratation complète de l'individu et ensuite une inclusion dans une résine synthétique (chap. VIII.C.2.2). La manipulation du poisson est alors facilitée et il peut être coupé (par section et/ou ponçage, chap. VIII.C.2.3 et VIII.C.2.5) selon n'importe quel plan et plus particulièrement au niveau des otolithes. Cette dernière méthode est cependant très compliquée à mettre en œuvre et nécessite une très grande habitude de chacune de ses étapes. De plus, en fonction de l'épaisseur des lames de scie servant aux sections par rapport à la taille effective des otolithes, il est souvent très difficile de les atteindre dans la région du cerveau.

3.3. Nettoyage et conservation des otolithes

3.3.1. Nettoyage et manipulation

Les otolithes doivent être obligatoirement nettoyés avant leur conservation dans le but d'éliminer tous les tissus de la *macula* et du vestibule adhérent après la dissection. En effet, après séchage, tous les restes de ces tissus empêcheront une observation correcte de l'otolithe entier et/ou une bonne qualité d'inclusion dans un produit synthétique. Le meilleur moyen est de les nettoyer directement pendant ou immédiatement après l'extraction. Un nettoyage mécanique peut être opéré en supprimant les tissus avec des outils comme des pinces fines ou des minuties alors que l'otolithe est encore plongé dans un liquide d'immersion (e.g. eau ou éthanol) (Secor *et al.*, 1992). Les otolithes peuvent être aussi simplement essuyés dans du papier absorbant juste après leur extraction. Une réaction de nettoyage peut être aussi provoquée par immersion dans de l'eau de Javel plus ou moins diluée (10 à 100 % d'hypochlorite de sodium) pendant un temps donné (quelques minutes à plusieurs heures), après quoi il est absolument nécessaire de rincer abondamment le matériel traité plusieurs fois avec de l'eau et/ou de l'éthanol, avant de le sécher.

La manipulation ne pose pas de problème majeur dans le cas des gros otolithes ($> 500 \mu\text{m}$) : ils peuvent être manipulés à l'aide de pinces fines et/ou à la main. Les otolithes plus petits ($< 500 \mu\text{m}$) sont beaucoup plus difficiles à manipuler et, en particulier, ceux des larves qui peuvent avoir des diamètres n'excédant pas quelques microns. Ils sont également extrêmement fragiles et susceptibles de se casser par une simple pression. On peut recommander de tenir compte de leur future utilisation avant d'adopter un protocole donné. Secor *et al.* (1992) ont décrit quatre techniques pour manipuler et transférer d'un endroit à un autre les très petits otolithes :

- prélever les otolithes à l'aide d'une micropipette avec une petite quantité du liquide utilisé pour la conservation et la dissection ; transférer ensuite le liquide contenant les otolithes sur une lame propre ou dans un récipient de stockage propre ;
- pousser les otolithes après dissection dans une zone propre du milieu de dissection et laisser sécher ; après séchage, presser un doigt sur le dessus de l'otolithe et le transférer directement dans le récipient de stockage (l'utilisation d'une loupe binoculaire est parfois nécessaire) ;
- recueillir l'otolithe sec avec une minutie humectée et le placer directement dans un milieu aqueux ;
- utiliser un petit pinceau, une anse d'inoculation (loop öse) ou des pinces fines d'entomologiste pour transférer les otolithes.

La manipulation de très petits otolithes nécessite cependant beaucoup de pratique. Si, après extraction, l'otolithe entier n'a pas besoin d'être examiné sur sa surface, nous recommandons de l'enrober directement dans une résine (chap. VIII.C.2.4.1). L'otolithe peut être aspiré dans une goutte de résine d'enrobage placée à l'extrémité d'une minutie, directement, qu'il soit posé à sec ou immergé au sein du liquide de dissection

(e.g. eau ou éthanol) : il n'y a pas de risque de mélange entre la résine et le liquide car la plupart des résines sont hydrophobes. Une fois à l'intérieur de la goutte de résine, l'otolithe est alors placé directement dans une autre goutte elle-même disposée sur une lamelle de microscopie. L'utilisation de ce genre de lamelle permet ensuite d'observer l'otolithe sur ses deux faces (interne et externe) et/ou de le préparer avec une autre technique (e.g. ponçage, polissage).

3.3.2. Stockage et conservation

La meilleure méthode pour conserver les otolithes est de les stocker complètement à sec. Après nettoyage, ils sont séchés par simple exposition à l'air à température ambiante ou dans une étuve à basse température. Ils peuvent alors être placés dans des microtubes référencés (e.g. Eppendorf®, Treff®). Ces derniers sont, par exemple, préférables aux boîtes de culture tissulaire car ils peuvent être manipulés individuellement ou disposés dans des supports de classement spécifiques. Les microtubes sont aussi suffisamment rigides pour protéger les otolithes des cassures consécutives à leur forme concavo-convexe. Ceci arrive fréquemment lorsqu'ils sont conservés dans des enveloppes comme il avait pu être recommandé auparavant (Williams & Bedford, 1974). Les endroits de stockage frais et obscurs sont probablement les meilleurs et les otolithes séchés peuvent ainsi être conservés indéfiniment (Brothers, 1987).

Certains auteurs ont également mentionné une conservation dans un milieu comme l'alcool. Ceci peut être particulièrement utile pour les otolithes petits et fragiles. La concentration de l'alcool doit être de 95 % au minimum. Un montage direct dans de la résine a déjà été mentionné précédemment (voir ci-dessus) mais, dans ce cas, il faut contrôler la quantité de résine déposée au-dessus de l'otolithe car, si elle est trop épaisse, elle peut empêcher la mise au point à très fort grossissement (Brothers, 1987).

4. Pièces du squelette

4.1. Extraction

Toutes les autres pièces squelettiques appartiennent au squelette interne et doivent obligatoirement être extraites par dissection. Il existe cependant une différence notable entre les os « superficiels », comme ceux des nageoires (épines, rayons, operculaires), qui sont extraits facilement et les os « profonds » qui constituent la charpente du corps (vertèbres, *cleithrum*, etc.). Les outils utilisés pour la coupe varient en fonction de la taille du poisson mais vont du scalpel pour les petits individus jusqu'aux scies électriques pour les plus gros, en passant par les différents types de couteau. Le prélèvement d'un rayon de nageoire commence par la séparation du rayon choisi (généralement le 1^{er} ou le 2^e) et des rayons contigus à l'aide d'un couteau (fig. VIII.B.7a) et continue en découpant les muscles à la base du rayon de façon à extraire la

pièce entière (fig. VIII.B.7b). La structure de l'os doit être extraite avec soin de façon à conserver son intégrité pour les futures analyses. Le prélèvement des os internes (e.g. vertèbres) est souvent assez aisé mais la dissection est plus complexe : les muscles, les ligaments et les tissus entourant l'os choisi doivent être retirés en premier (fig. VIII.B.8a), l'os est alors coupé au niveau de ses articulations et toujours extrait intégralement (fig. VIII.B.8b). Si les plans de dissection sont incertains, il est préférable de prélever l'os avec les muscles qui lui sont attachés, même s'il est nécessaire de le nettoyer après.



Figure VIII.B.7 - Prélèvement de rayon de nageoire chez un poisson de grande taille : *Thunnus alalunga* (Scombridae). a) Vue dorsale du prélèvement du premier rayon de nageoire avec un couteau. b) Une coupe transversale est faite au niveau de la peau avant et après le rayon choisi. Ce dernier est extrait en s'assurant de l'intégrité de la totalité de l'os. A, antérieur ; D, dorsal ; P, postérieur ; V, ventral (photos © Ifremer O. Dugornay).

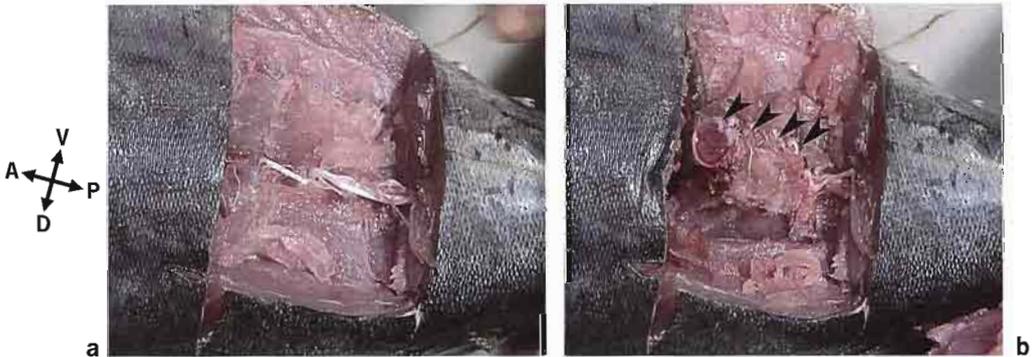


Figure VIII.B.8 - Prélèvement de vertèbres caudales chez un poisson de grande taille : *Thunnus alalunga* (Scombridae). a) Section avec l'aide d'un couteau et suppression de la peau et des muscles au-dessus des dernières vertèbres. b) Une coupe est faite entre deux vertèbres et les corps vertébraux (flèches) sont extraits après section des arcs vertébraux. A, antérieur ; D, dorsal ; P, postérieur ; V, ventral (photos © Ifremer O. Dugornay).

4.2. Nettoyage et conservation

Le nettoyage des pièces du squelette est une étape obligatoire pour une bonne qualité de conservation. Les ligaments et les muscles attachés à l'os sont généralement enlevés à la main, souvent après un passage dans un bain d'eau bouillante, d'eau de Javel diluée, de potasse diluée

ou de trypsine. On peut recommander la méthode la plus simple qui utilise le bain dans l'eau bouillante. La durée de l'immersion doit être contrôlée fréquemment pour éviter une surchauffe des tissus des éléments squelettiques ou leur lyse : elle s'étale de quelques minutes pour les plus petites pièces jusqu'à plusieurs heures pour les plus grandes. Le processus de nettoyage doit être contrôlé à intervalles de temps réguliers.

La conservation est en général très simple et se fait à sec. Pour tous les types d'os, un stockage dans des enveloppes en papier est recommandé car la plupart des os résiste à la dessiccation. Le papier permet, en outre, d'assurer une certaine ventilation des tissus et de recevoir toutes les indications concernant la PC. Les enveloppes sont cependant une source de contamination importante, en particulier si l'on veut effectuer ultérieurement des analyses de microchimie. Un stockage dans des sachets en plastique conduit la plupart du temps à l'apparition de champignons qui peuvent détruire l'os secondairement. Pendant la durée de la conservation, un soin particulier devra être porté pour s'assurer que les tissus ne sont pas attaqués par une faune d'insectes spécialisés : des insecticides et/ou de la naphthaline peuvent être ajoutés dans les enveloppes. Pour les échantillons les plus fragiles, l'alcool peut servir de fixateur, tout en prenant soin de ne pas utiliser des fixateurs acides (Meunier, 1988). Dans ce but, l'éthanol entre 70 et 95 % est préconisé.

C. Préparation des pièces calcifiées

W.J. McCurdy, J. Panfili, F.J. Meunier, A.J. Geffen, H. de Pontual

1. Écailles

Les écailles n'ont généralement pas besoin d'être préparées pour que leurs marques de croissance puissent être observées. Cependant, comme ce sont des structures hydrophiles, une conservation à sec entraîne parfois une déshydratation et une déformation. Il est alors préférable de les préparer sur un support pour préserver leur forme initiale.

1.1. Observation directe

Les écailles non montées peuvent être observées directement sous une loupe binoculaire et/ou sous un microscope photonique : elles sont observées soit à sec, soit après immersion dans un bain hydratant et nettoyant (e.g. eau, alcool 70 % à 95 %, eau glycérinée) (chap. VIII.D.1).

1.2. Montage sur lame

La méthode de montage la plus simple consiste à bloquer les écailles entre deux lames de microscopie (fig. VIII.C.1). Les écailles sont d'abord réhydratées (dans de l'eau ou de l'alcool dilué) et elles sont alors placées directement sur une lame de microscopie référencée (fig. VIII.C.1a). Une deuxième lame est déposée sur le dessus des écailles et fixée à la première grâce à du ruban adhésif (fig. VIII.C.1b). Il est essentiel de vérifier parfaitement le collage des deux lames et de le renforcer si nécessaire avec de l'adhésif. La préparation est alors à la fois utilisable pour observation et prête à être stockée. Si les écailles sont assez larges et épaisses, il est possible qu'une nouvelle déshydratation après montage les déforme à nouveau et exerce une pression sur les

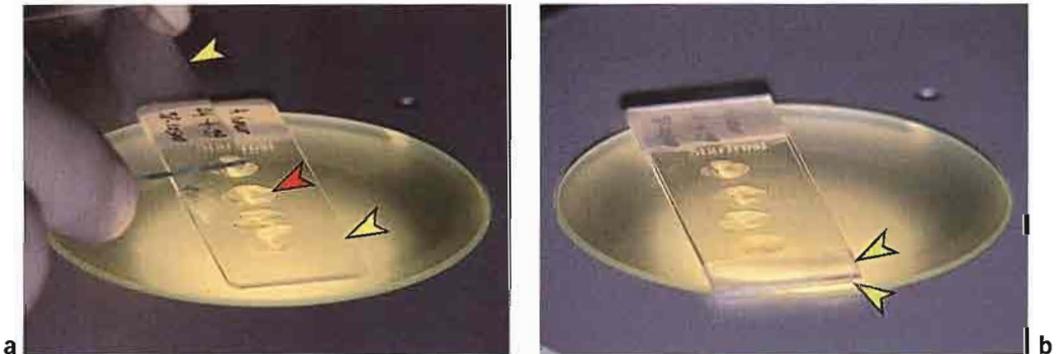


Figure VIII.C.1 - Montage d'écailles entre deux lames. a) Les écailles (flèche rouge) sont positionnées sur la lame référencée (flèche jaune). Il est préférable que les écailles soient humidifiées dans le but de pouvoir les déformer (compresser) plus facilement lors du montage. b) Une deuxième lame (flèche jaune) est déposée sur la précédente et vient comprimer les écailles. Les deux lames (flèches jaunes) sont fixées ensemble en utilisant du ruban adhésif (photos © Ifremer O. Dugornay).

lames de verre, pouvant même entraîner leur décollement. Au cours du temps les écailles auront tendance à glisser de leur support. Il est donc nécessaire de vérifier de temps à autre la solidité de la cohésion des lames et de la consolider soit avec du ruban adhésif, soit avec une colle suffisamment souple (e.g. mastic de silicone).

1.3. Impression sur acétate de cellulose

Une méthode alternative de préparation des écailles consiste à réaliser des empreintes de leur face externe sur des feuilles d'acétate de cellulose (fig. VIII.C.2). Ces dernières sont des feuilles de plastique relativement flexibles qui marquent les empreintes de tout élément rigide qui leur est appliqué en pression. Les écailles sont placées entre deux feuilles d'acétate et l'ensemble est passé dans une presse de joaillier (fig. VIII.C.2a). Les feuilles sont ensuite séparées et les écailles enlevées (fig. VIII.C.2b). La feuille d'acétate, qui était directement en contact avec la face externe des écailles présentant les crêtes des *circuli*, montre alors leurs empreintes (fig. VIII.C.2b). Cette feuille est donc directement observable sous une loupe binoculaire ou sous un microscope photonique et peut être conservée dans cet état pendant de nombreuses années.

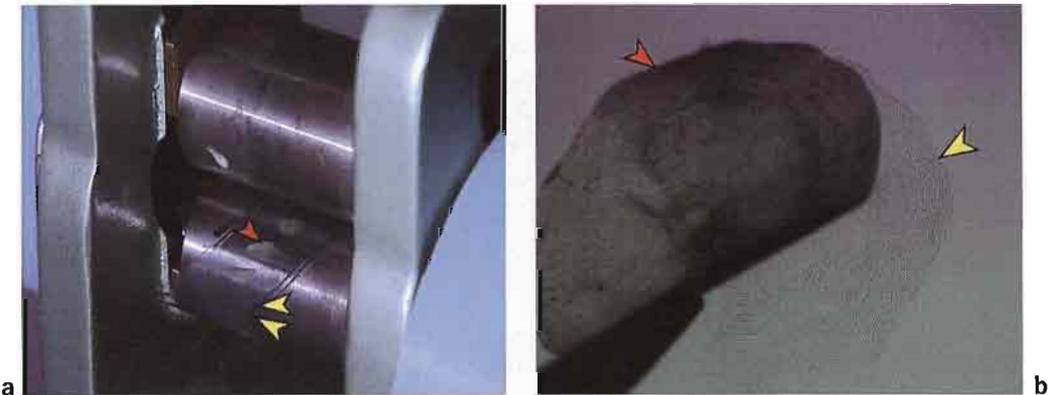


Figure VIII.C.2 - Impression d'écaïlle sur feuille d'acétate de cellulose. a) Les écailles (flèche rouge) sont positionnées entre 2 feuilles d'acétate (flèches jaunes). L'ensemble est passé entre les deux rouleaux d'une presse (e.g. presse de joaillier). b) La face externe de l'écaïlle (flèche rouge) est alors séparée de la feuille d'acétate (flèche jaune) et son empreinte reste visible (flèche jaune) (photos © Ifremer O. Dugornay).

2. Autres pièces

2.1. Préparations simples

Certaines PC, par exemple les os operculaires, peuvent être observées directement dans leur état originel et d'autres, comme les vertèbres, les *cleithra* ou les otolithes, après seulement un minimum de préparation. Aucune de ces préparations n'implique d'ailleurs un enrobage préalable avant observation. Ces pièces calcifiées sont généralement

observées, directement ou après immersion dans un liquide éclaircissant (chap. VIII.D.1), en utilisant un outil de grossissement simple muni d'un éclairage additionnel ou une loupe binoculaire.

2.1.1. Pièce calcifiée entière

Pour les otolithes peu épais, et plus particulièrement les *sagittae* des poissons plats et de certaines espèces pélagiques, il est possible de dénombrer les *annuli* sans avoir recours à une préparation. Les otolithes sont individuellement immergés dans de l'eau, de l'alcool ou dans de l'huile essentielle végétale et observés directement en utilisant une lumière transmise ou réfléchie (chap. VIII.D.1.1.2 et VIII.D.1.1.4). Une large gamme de substances à éclat gras est utilisée pour « éclaircir » la lisibilité ou réduire les reflets de la surface observée des PC. Historiquement, on a pu ainsi utiliser l'huile essentielle de clou de girofle, d'autres huiles essentielles ou les huiles d'immersion. Certaines, comme le créosote, ne sont plus recommandées car elles ont des effets carcinogènes. Les huiles et essences végétales dont les propriétés et les effets ne sont pas connus sont donc déconseillées. L'huile baptisée « baby oil » est souvent prisee des lecteurs d'otolithes. Une source de lumière froide est recommandée pour éviter l'évaporation de l'huile pendant l'observation.

2.1.2. Cassure des otolithes

Les otolithes peuvent être cassés à la main ou avec l'aide de pinces fines, d'un scalpel ou d'un cutter. Les morceaux cassés peuvent ensuite être fixés sur de la pâte à modeler (e.g. Plasticine™) et badigeonnés avec de l'huile éclaircissante (e.g. baby oil) pour une observation sous une lumière incidente. Ils peuvent également être manipulés dans des cellules d'observation individuelles remplies de liquide éclaircissant (eau, alcool, mélange eau-alcool).

2.1.3. Préparations simples pour les autres pièces

Certains os, comme les vertèbres, les operculaires ou les *cleithra*, peuvent être observés sans préparation préalable. Ils sont alors examinés directement ou après immersion dans un liquide éclaircissant, sous une lumière transmise ou réfléchie (chap. VIII.D.1.1.2 et VIII.D.1.1.4). D'autres os, comme les épines et rayons épineux des grands poissons ou les vertèbres, sont simplement sectionnés (chap. VIII.C.2.3) avant observation, sans enrobage préalable. La section ou la tranche est alors directement observée, sèche ou humidifiée, sous une loupe binoculaire.

2.2. Enrobage et imprégnation

2.2.1. Produits d'enrobage

Tous les produits d'enrobage doivent être conservés dans un endroit sombre et frais, en suivant les instructions fournies par les fabricants. Les résines polyester hautement transparentes ont une durée de vie très courte et doivent être achetées en petite quantité car elles deviennent

rapidement opaques en se détériorant. Les principaux produits d'enrobage et leurs applications sont listés dans le tableau VIII.C.1, repris d'après Mosegaard *et al.* (1998). Les produits d'enrobage les plus utilisés pour des préparations ultérieures sont les résines synthétiques dont le durcissement est irréversible (polyester, époxy, etc.). Il est toujours nécessaire d'utiliser un catalyseur pour démarrer et accélérer leur polymérisation (fig. VIII.C.3) : en fonction de la résine utilisée, le mélange peut être fait en proportion de poids ou de volume. Par exemple, le catalyseur est utilisé à 1-2 % du poids pour la résine polyester (e.g. 25 g de résine polyester pré-accélérée et 0,2 g de catalyseur).

Tableau VIII.C.1 - Produits d'enrobage et de montage standard (d'après Mosegaard *et al.*, 1998).

Produit	Utilisation	Avantages	Désavantages
Résine polyester (RP)	- fixateur permanent de haute qualité - enrobage et ponçage de surface	- multi-usage - transparence optique moyenne - bonnes propriétés pour le ponçage-polissage - stable à la lumière	- non réversible - qualité de durcissement variable - polymérisation lente (12-24 h) - toxique - faible retrait - catalyseur nécessaire
Résine époxy	- fixateur permanent de haute qualité - enrobage et ponçage de surface	- plus dure que la RP - transparence optique élevée - stable à la lumière - faible contamination chimique - rétraction minimale - large gamme d'applications	- non réversible - polymérisation plus ou moins lente - toxique - cher - catalyseur nécessaire
Colles thermofusibles	- fixateur réversible de haute qualité - enrobage et ponçage de surface	- prise rapide (en minutes) - facilement enlevées - transparence optique élevée - non toxiques - bonnes propriétés pour le ponçage-polissage	- chaleur nécessaire (70-160 °C) - produit des bulles de gaz - faible retrait - haute teneur en Si
Super Glue® (cyanoacrylate)	- fixateur très résistant à polymérisation rapide - ponçage de surface	- facile à utiliser - durcit sans chaleur ni catalyseur chimique	- haute teneur en S et Pb - décollement possible de la lame
Colles dentaires UV	- fixateur très résistant à polymérisation rapide - ponçage de surface	- durcissent sans chaleur ni catalyseur chimique - non toxiques	- très chères - transparence optique non connue
Wax	- fixateur temporaire à prise rapide - enrobage seulement	- rapide - peu onéreux - facile à enlever	- souple - faible qualité optique - non permanent
Vernis à ongles	- fixateur temporaire à prise rapide - ponçage de surface	- peu onéreux - facile à enlever	- souple - se dissout dans les huiles
Eukitt®	- fixateur souple de bonne qualité - enrobage seulement	- facile à utiliser - pas de catalyseur - bonne transparence optique - facile à enlever	- durcissement très lent - reste souple - peu stable dans le temps - décollement possible de la lame

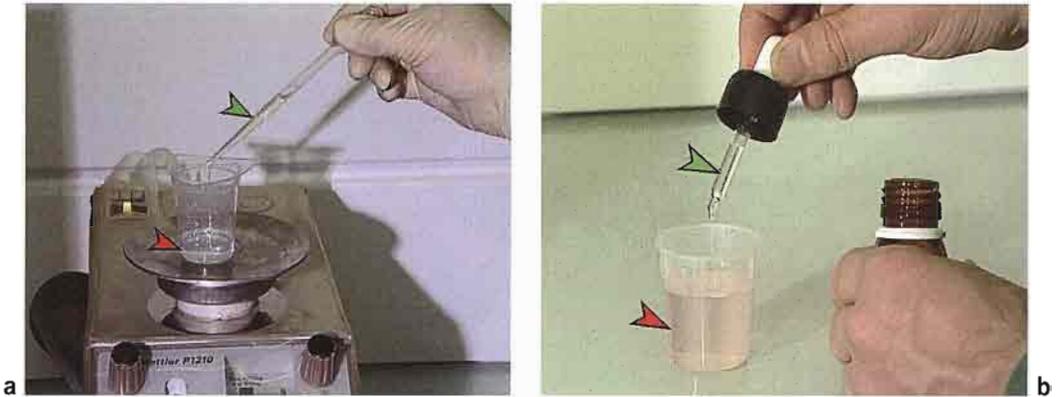


Figure VIII.C.3 - Préparation de la résine d'enrobage sous une hotte d'extraction. a) Exemple de mélange en fonction du poids (e.g. résine époxy). Le catalyseur (flèche verte) est ajouté à la résine (flèche rouge) dans un bocal en polypropylène posé directement sur une balance. Le mélange doit ensuite être remué. b) Exemple de mélange direct à partir d'un nombre de gouttes (e.g. résine polyester). Les gouttes de catalyseur (flèche verte) sont ajoutées à la résine (flèche rouge) dans un bocal en polypropylène en fonction du volume de résine. Le mélange doit ensuite être remué (photos © Ifremer O. Dugornay).

Le tableau VIII.C.2 donne des calculs simplifiés pour les quantités de mélange de résine et de catalyseur, en fonction des proportions désirées. Les résines polyester sont dissoutes dans du styrène et nécessitent toujours l'addition simultanée d'un accélérateur et d'un catalyseur pour polymériser. Comme il existe un risque d'explosion si l'accélérateur non dilué et le catalyseur sont mélangés, les résines polyester sont vendues pré-accéléérées pour des raisons de sécurité. Cependant, si le catalyseur est ajouté en excès dans ce type de résine, le risque d'explosion subsiste.

Tableau VIII.C.2 - Dosages simples de la résine polyester (en volume et/ou poids) et du catalyseur (en nombre de gouttes) en fonction de leurs proportions. Plus la quantité de catalyseur est importante et plus la vitesse de polymérisation est élevée. Le préparateur ne doit pas dépasser un seuil de 2 % de catalyseur pour éviter les risques d'explosion.

Résine volume (ml)	Résine poids (g)	Nombre de gouttes de catalyseur	
		1 % du mélange	2 % du mélange
91,0	~ 100	20	40
45,5	~ 50	10	20
23,3	~ 25	5	10
11,5	~ 12,5	2,5	5
9,1	~ 10	2	4

La résine et son catalyseur sont mélangés avec précaution dans le but d'éviter la formation de bulles au sein du mélange, qui pourraient par la suite empêcher une bonne préparation et/ou observation de la PC. Le mélange est ensuite laissé à reposer pendant quelques minutes pour que les plus grosses bulles qui subsistent s'échappent. La durée nécessaire pour le durcissement total varie de quelques secondes (pour une colle cyanoacrylate, une résine dentaire à prise rapide) à quelques

heures (pour une résine époxy ou polyester). Nous recommandons l'utilisation d'une étuve pour accomplir parfaitement le processus de polymérisation, après que la résine ait dépassé le stade de gel. Par exemple, la polymérisation complète de la résine polyester est meilleure après une durée minimale de 24 h dans une étuve sèche (à une température d'environ 30 °C).

La résine peut être colorée par addition d'un pigment, en général noir, ou elle peut être achetée directement pré-colorée. Toutes les résines et leurs catalyseurs, souvent encore appelés « durcisseurs », sont disponibles auprès des revendeurs spécialisés. Des kits de montage contenant de petites quantités de produits, comme de la résine pré-colorée et son durcisseur, sont également disponibles chez certains revendeurs.

2.2.2. Enrobage individuel de pièces pour section ultérieure

Les PC peuvent être individuellement enrobées avant d'être sectionnées, poncées et/ou polies. Elles sont alors préparées pour leur futur traitement en les enrobant dans de la résine transparente. Les PC doivent être nettoyées et séchées à l'air libre ou dans une étuve avant d'être enrobées.

L'utilisation de moules individuels est nécessaire pour l'enrobage (fig. VIII.C.4). Ces moules sont en général fabriqués avec une résine d'élastomère de silicone et sont dimensionnés en fonction de la taille des PC. Ils sont souvent référencés individuellement (avec un numéro de référence ou un symbole imprimé sur la base de chacune des cellules du moule). L'élastomère de silicone est un matériau très flexible qui facilite par la suite le démoulage lorsque la résine d'inclusion a polymérisé.

Dans un premier temps, une couche de base de résine (e.g. polyester) est déposée dans les différentes cellules du moule avec l'aide d'une pipette en plastique souple et elle est laissée à polymériser. Après un temps suffisant de durcissement (par exemple 4 à 24 h pour le polyester), la PC à inclure est placée sur le fond d'une cellule du moule (fig. VIII.C.4a) et elle est ensuite recouverte par une nouvelle couche de résine d'enrobage (fig. VIII.C.4b, c), en s'assurant que la PC est recouverte complètement par la résine. Lors de cette étape, il est très important de pouvoir retourner la PC dans son moule pour chasser les bulles d'air qui sont souvent piégées en dessous et de la repositionner au cas où elle aurait dévié de sa position originale. Cette phase de positionnement doit prendre en compte les futures manipulations et préparations (par exemple, le positionnement par rapport à un futur plan de coupe). Après environ 20 minutes (ce temps varie cependant avec le type de résine utilisé et l'âge de la résine), la résine catalysée commence à durcir et il sera ensuite impossible d'enlever ou de bouger à nouveau la PC. La durée totale pour une polymérisation complète est comprise entre quelques minutes et quelques heures et, par exemple, il faut prévoir un minimum de 24 h pour la résine polyester (chap. VIII.C.2.2.1). Les pièces enrobées sont alors prêtes à être sectionnées et/ou polies pour les analyses ultérieures (fig. VIII.C.4d).

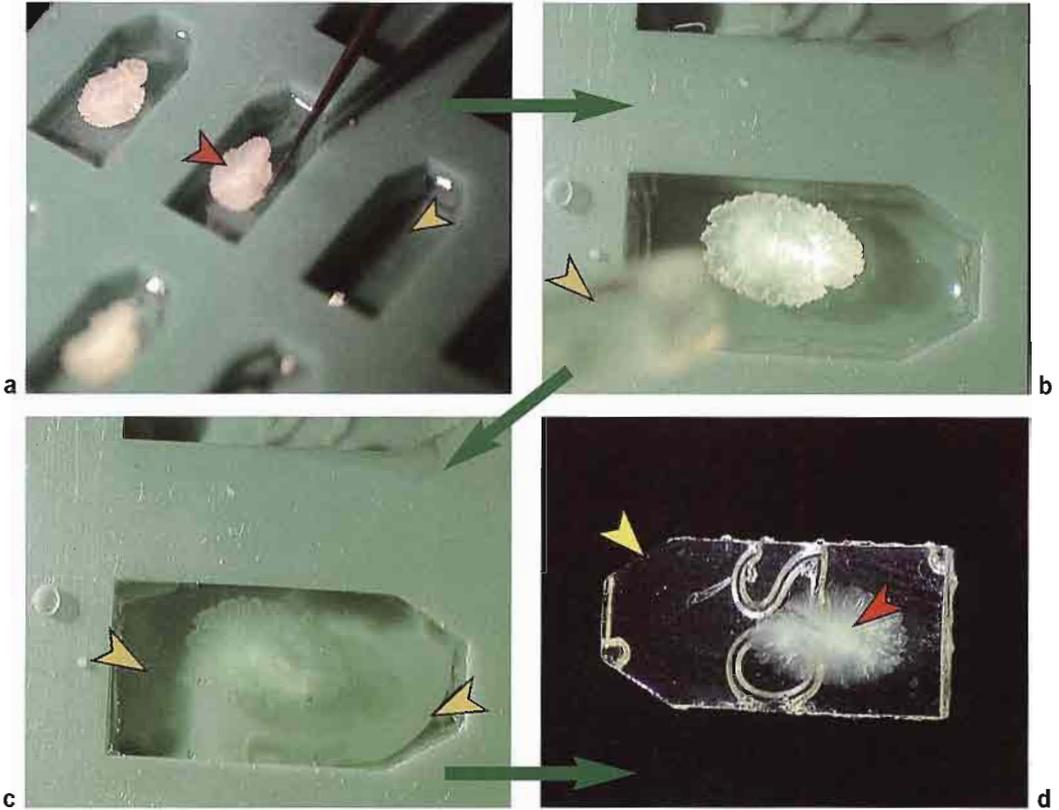


Figure VIII.C.4 - Exemple d'enrobage : otolithe enrobé à l'intérieur d'un moule en élastomère de silicone. a) Une couche de résine (flèche jaune) a été coulée au préalable dans le fond de chaque moule : après polymérisation, elle devient la base de support pour l'otolithe (flèche rouge). Chaque otolithe est déposé sur le fond de résine durcie. b) L'otolithe est orienté convenablement et il est enrobé dans une deuxième couche de résine qui vient juste d'être préparée (flèche jaune). c) Il faut s'assurer que la résine encore à l'état liquide (flèche jaune) vienne remplir complètement le moule. Sur l'exemple présenté la résine n'atteint pas encore le bord droit du moule. L'otolithe doit alors être retourné pour éliminer les bulles d'air prisonnières. d) Otolithe (flèche rouge) enrobé définitivement dans la résine polymérisée (flèche jaune). Le bloc de résine porte un numéro d'identification (20) moulé en empreinte sur la face inférieure (photos © Ifremer O. Dugornay).

2.2.3. Enrobage pour observation avec une lumière incidente

Les pièces calcifiées, et principalement les otolithes, peuvent être enrobées dans un produit transparent, classiquement de la résine polyester pour inclusion hautement transparente, sur des supports avec des cavités ou sur des plaques porte-objet en plastique noir. Le fond noir de ces dernières fournit un meilleur contraste pour l'observation des *annuli*. Cette technique, issue des méthodes décrites en premier par Parrish & Sharman (1959), Raitt (1961) et Watson (1965), est utilisée pour des observations en lumière réfléchie de la face externe des *sagittae* d'espèces pélagiques (surtout des Clupéidés et Scombridés). Elle convient également pour l'observation en lumière incidente de la surface de petites PC et fournit une méthode de conservation à long terme permettant d'effectuer des relectures à une date ultérieure.

Des grilles contenant vingt-cinq cavités peu profondes, mesurant chacune environ 7 mm de diamètre et 1,2 mm de profondeur, sont disponibles à cet effet : elles sont usinées dans des plaques en Perspex™ de 3 mm d'épaisseur (dimensions 65 x 60 mm). Chaque plaque possède une bande de 10 mm non usinée, qui permet en outre de la référencer par simple gravure (à l'aide de stylo en métal ou de graveur électrique à pointe de tungstène). Les numéros de référence peuvent être également surlignés avec des crayons gras de couleur (blanc ou jaune).

Chaque paire d'otolithes doit être correctement positionnée à l'intérieur d'une cavité de la plaque de plastique, i.e. avec le *sulcus acusticus* (face interne) tourné vers le bas et ainsi non visible (fig. VIII.C.5a). Les petits otolithes, comme ceux du sprat (*Sprattus sprattus*) (fig. VIII.C.5a), acquièrent souvent une charge électrostatique qui les rend difficiles à positionner. Ces problèmes d'électricité statique peuvent parfois être solutionnés en augmentant le taux d'humidité atmosphérique ou en changeant les vêtements du manipulateur. Une pipette en plastique souple est utilisée pour déposer une goutte de résine mélangée à son catalyseur sur chaque paire d'otolithe, en s'assurant qu'ils sont totalement recouverts (fig. VIII.C.5b). À ce stade, il est très important de repositionner tous les otolithes qui ont pu bouger par rapport à leur position initiale. La résine est ajoutée dans tous les espaces restant vides sur la plaque pour atteindre un niveau unique de résine, recouvrant ainsi la totalité des otolithes de la plaque. Une lamelle de microscopie, de taille adaptée (54 mm x 54 mm x 0,5 mm d'épaisseur), est alors déposée sur la résine (fig. VIII.C.5c) et laissée jusqu'à polymérisation complète sous une hotte aspirante (fig. VIII.C.5d). Cette fine lamelle de verre peut cependant se déformer au niveau de chaque cavité et se fissurer à cause de la rétraction de la résine lors de sa polymérisation. La résine va durcir en quelques heures mais il n'est pas conseillé de commencer les observations avant qu'elle ne soit totalement polymérisée et qu'il n'y ait plus de risque d'absorption de styrène à travers la peau. Les plaques en Perspex™ sont onéreuses et il existe d'autres types de plaque tout aussi adaptés. Des lames de mousse injectée, avec des numéros gravés, sont maintenant disponibles dans le commerce. Lorsque des plaques de plastique usinées sont utilisées, il est nécessaire de s'assurer de la bonne dimension et de la finition de chacune des cavités servant à contenir les otolithes. Si la base de ces dernières est trop abrupte ou si la résine n'adhère pas suffisamment au plastique, des petits paquets de bulles peuvent se former dans la résine lors de la polymérisation : il sera alors très difficile d'observer les PC à l'interface de ces bulles d'air qui auront un effet réfléchissant, comme un miroir.

2.2.4. Enrobage multiple d'otolithes pour section ultérieure

Les otolithes doivent être enrobés dans un produit de support avant d'être coupés et sectionnés en lame mince : les résines polyester sont fréquemment utilisées comme support (souvent colorées en noir).

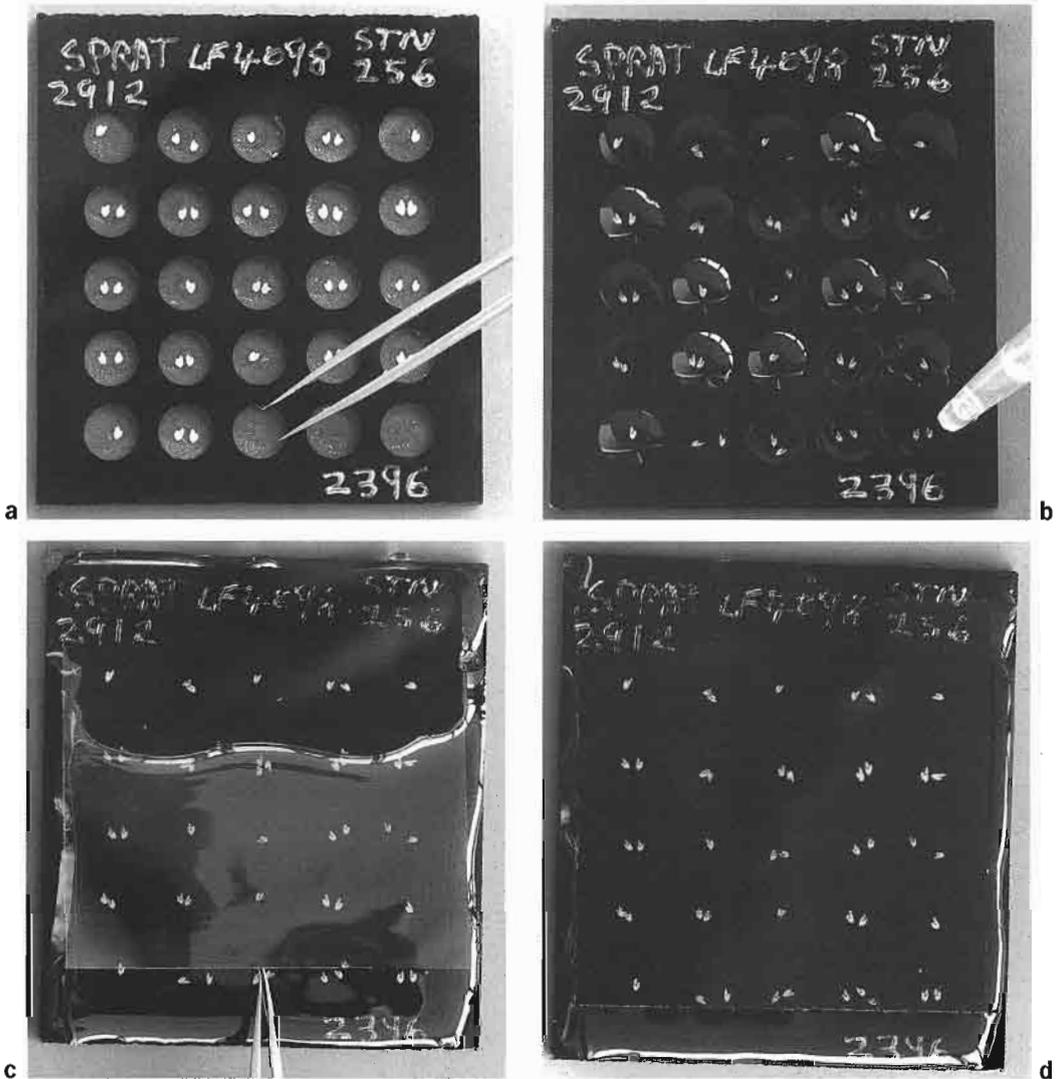


Figure VIII.C.5 - Enrobage d'otolithes entiers sur des plaques en plastique noir. a) Positionnement des otolithes dans les cavités des plaques spécialement préparées. b) Remplissage des cavités avec de la résine et son catalyseur. c) Positionnement de la lamelle couvre-objet sur la plaque. d) Vue de la plaque complète terminée (photos R. Rosell).

Dans ce but, des moules spéciaux, fabriqués en matériau composite souple ou assemblés à partir de blocs en aluminium, peuvent être utilisés (fig. VIII.C.6a). Les moules en aluminium sont normalement utilisés lorsqu'un grand nombre d'otolithes doit être traité, par exemple ceux d'espèces démersales pour la gestion des stocks. Ces moules peuvent être partiellement démontés pour faciliter le démoulage, après polymérisation, des blocs de résine contenant les otolithes. Une variante de cette étape consiste à utiliser un levier d'éjection qui permet un démoulage rapide des blocs de résine sans avoir à démonter les

moules (Van Beek *et al.*, 1997). Les moules en aluminium sont toujours pourvus de lignes de guide (rainures) sur les parois latérales ; elles permettent d'aligner les otolithes pour réaliser une coupe à un niveau précis (fig. VIII.C.6a). Un filament de nylon placé dans ces rainures (Bedford, 1983) ou une table de positionnement XY couplée à une caméra vidéo (fig. VIII.C.6b) et un moniteur (Van Beek *et al.*, 1997) sont utilisés pour réduire les effets de parallaxe lors de l'alignement des otolithes dans les moules. Dans le cas de l'assistance vidéo, une ligne traversant le centre du moniteur assure un confort de travail pour l'opérateur qui positionne les otolithes.

Le principe de préparation pour l'enrobage est le même pour tous les types de moule en aluminium. Le moule est vaporisé ou badigeonné avec un produit lustrant, facilitant le démoulage, avant que la première couche de résine polyester noire soit versée. Une fois que la résine a atteint un état de gel assez solide, les otolithes sont placés et alignés sur cette couche (fig. VIII.C.6c). Une autre couche de résine noire est versée pour recouvrir complètement tous les otolithes et elle est laissée à



Figure VIII.C.6 - Enrobage d'otolithes en série dans des moules en aluminium. a) Vue des moules en aluminium. b) Système de contrôle d'alignement dans les moules avec l'aide d'un système vidéo (photos Bennett Ltd.). c) Rangées d'otolithes (flèche rouge) déposées sur un fond de résine polyester préalablement colorée en noire et laissée à polymériser. La seconde couche de résine polyester noire (flèche jaune) est versée dans le moule (photo © Ifremer O. Dugornay).

durcir (les moules peuvent être placés sur une table à niveau pour s'assurer que toutes les couches de résine aient une épaisseur régulière). Les blocs de résine contenant les otolithes sont démoulés lorsque la résine a complètement polymérisé. Il est très important de noter au préalable les références individuelles de tous les otolithes placés dans chacune des parties du moule. Ces informations seront ensuite utilisées pour référencer les coupes terminées contenant les otolithes.

Une variante consiste à attendre une polymérisation complète de la première couche de résine avant de positionner les otolithes avec une petite quantité de résine non durcie que l'on laisse à polymériser; on recouvre ensuite complètement les otolithes avec une dernière couche de résine. La première méthode est plus rapide, mais il est important de vérifier que la bonne quantité de catalyseur a été ajoutée à la résine. Si une trop grande quantité de catalyseur est utilisée, la couche de résine ne restera pas au stade de « gel » suffisamment longtemps pour que les otolithes adhèrent complètement à la surface. Cette méthode est également plus subjective car les otolithes concaves doivent être positionnés à l'avance sous le filament de nylon ou grâce au guidage de la caméra, et ensuite retournés (*sulcus acusticus* vers le haut) pour éviter la formation de bulles d'air.

Des repères (par exemple, un morceau de spaghetti sec) sont placés sur le côté gauche de chaque moule et sur la première couche de résine à l'état de gel pour indiquer le début de chaque rangée d'otolithes. Un type de moule possède un bord biseauté sur le côté gauche qui fait office de repère (Van Beek *et al.*, 1997).

D'autres procédures utilisent d'autres types de résine, comme celle qui est employée avec de la fibre de verre (« lay-up ») dans la fabrication des bateaux (Bedford, 1983). Une autre méthode d'inclusion utilise un mélange de résine pour fibre de verre et de résine d'inclusion plus souple (« flex ») pour la première couche au fond du moule, puis un mélange de résine du type « gel-coat » et de résine « flex » pour la deuxième couche. La résine du type « gel-coat » est utilisée en général pour la fabrication des coques de bateau et assure une surface de contact parfaitement lisse. Du talc en poudre ou un produit similaire peut être utilisé pour sécher la surface dans le cas où la couche supérieure est constituée de résine pour fibre de verre (McCurdy, 1985). L'ajout de petites quantités de résine de type « flex » (tab. VIII.C.3) permet de s'assurer que les blocs sont assez souples une fois terminés (ils peuvent être légèrement cintrés) : cela supprime le risque que les otolithes se brisent sous l'action de la scie à vitesse rapide lorsqu'ils sont découpés. Si des petits otolithes doivent être inclus, l'ajout au mélange de résines d'un peu de poudre de craie empêche la lame diamantée de la scie de s'encrasser avec de la résine et améliore la vitesse de la coupe.

Tableau VIII.C.3 - Table de mélanges de la résine polyester utilisée pour la préparation de type « Otolin ».

	Poids de matériel (g)										
Couche de fond											
Poids total de la couche (g)	5	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Résine pour fibre de verre	4,5	9	18	27	36	45	54	63	72	81	90
Résine « flex » (5 %)	0,25	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0
Pigment noir (5 %)	0,25	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0
Durcisseur (MEKP) (1 %)	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Couche supérieure											
Poids total de la couche (g)	5	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Résine de type « gel-coat »	4,5	9	18	27	36	45	54	63	72	81	90
Résine « flex » (5 %)	0,25	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0
Pigment noir (5 %)	0,25	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0
Durcisseur (MEKP) (0,6 %)	0,03	0,06	0,12	0,18	0,24	0,30	0,36	0,42	0,48	0,54	0,60

2.2.5. Imprégnation des tissus osseux

La plupart des os sont constitués de tissu osseux vascularisé et, lorsque les trabécules osseux sont relativement fins et entourés de grandes cavités, la pièce entière est relativement fragile. Pour cette raison, il est nécessaire de consolider les structures osseuses pour éviter une cassure ou une rupture pendant la découpe. L'inclusion doit alors suivre un processus précis d'imprégnation avec de la résine polyester, de façon à s'assurer que cette résine pénètre bien dans toutes les cavités de l'os et qu'elle polymérise de la même façon que la résine entourant l'os. Ce processus d'imprégnation est décrit ci-après pour de la résine polyester (stratyl).

La PC, i.e. un os, est déshydratée dans des bains successifs d'alcool à 70 %, 95 % et 100 %, en utilisant au moins un bain de 24 h pour chacune des concentrations. Deux bains de chaque concentration sont préconisés pour les pièces les plus larges. La PC est ensuite immergée dans deux bains successifs d'acétone d'une durée de 24 à 48 h avant d'être finalement placée dans le solvant du monomère (styrène) puis dans le monomère de la résine (i.e. résine sans catalyseur) pendant 24 h. En fonction du type de polyester utilisé, des bains supplémentaires peuvent être nécessaires avant l'étape d'inclusion. Pour cette dernière étape, la PC est immergée dans de la résine pré-polymérisée (monomère + catalyseur à 1-2 %) dans un moule (en élastomère souple) contenant déjà un fond de base polymérisé. Il est souvent recommandé de placer le moule avec la résine et la PC pendant quelques minutes dans une chambre à vide de façon à supprimer les dernières bulles d'air et à améliorer l'imprégnation. Lorsque le bloc a polymérisé et durci (par exemple, pour le stratyl après 1 à 2 jours dans une pièce à température ambiante et une semaine dans une étuve à 60°C), il peut être sectionné avec une scie rotative à vitesse lente (chap. VIII.C.2.3.1).

2.3. Section

La section des pièces est souvent une étape préliminaire à de nombreuses autres voies de préparation, comme l'attaque acide, la coloration et la préparation de lames minces, mais elle est aussi souvent nécessaire pour révéler les structures internes des PC. Par exemple, lorsque les *sagittae* sont extrêmement opaques ou trop épaisses pour que leurs marques de croissance soient clairement identifiables par transparence, l'observation de sections transversales minces, passant à travers le noyau, améliore significativement la lisibilité de ces marques. Il n'existe pas de méthode standard universelle pour sectionner les PC, et les procédures ainsi que le matériel utilisé pour fabriquer des coupes simples et/ou fines varient en fonction de la nature de l'application souhaitée (Mosegaard *et al.*, 1998).

2.3.1. Section de pièces individuelles (fig. VIII.C.7)

Le principal problème lorsque l'on effectue une section est de s'assurer qu'elle inclut le meilleur plan de coupe (e.g. le centre de la PC, etc.) (chap. III.C). La coupe est réalisée par simple ponçage (chap. VIII.C.2.5) ou, le plus souvent, avec l'aide d'une scie à vitesse lente ou rapide. L'une des scies les plus fréquemment employées est la scie rotative à vitesse lente Isomet[®] (Buehler Ltd) équipée d'un disque diamanté. Toutes les scies de ce type utilisent différents liquides de coupe : nous recommandons l'eau pour les structures pratiquement hydrophobes comme les otolithes et l'alcool dilué (70 à 95 %) pour les tissus hydrophiles comme les os. En fonction d'une évaporation possible, la quantité d'alcool utilisée doit être vérifiée fréquemment. La préparation et la section d'une PC durent en général de une à cinq minutes.

Une PC est généralement enrobée (chap. VIII.C.2.2) avant d'être coupée : elle est ainsi plus facilement manipulable. Ceci devient indispensable dans le cas de PC de petite taille comme certains otolithes. Le niveau de section, ajusté à l'aide d'un micromètre présent sur la scie, doit être fixé en premier (fig. VIII.C.7a), en traçant un repère sur la résine avec un stylo indélébile ou un outil tranchant. Si deux niveaux de section sont nécessaires pour la suite des opérations, e.g. dans le cas de la préparation de lames minces, ils doivent être tracés en premier (fig. VIII.C.7a). Lorsque qu'une coupe très précise doit être réalisée (par exemple pour les très petits otolithes), l'épaisseur de l'outil de coupe doit être prise en compte : un disque diamanté classique a une épaisseur d'environ 300 µm. Avec une scie Isomet[®] classique, l'échantillon est coupé simplement en exerçant une pression sur le disque diamanté en rotation (fig. VIII.C.7b, c). Certaines PC assez larges, comme les épines (épines de poissons-chats, par exemple), peuvent être coupées sans avoir recours à une inclusion dans de la résine (fig. VIII.C.7d).

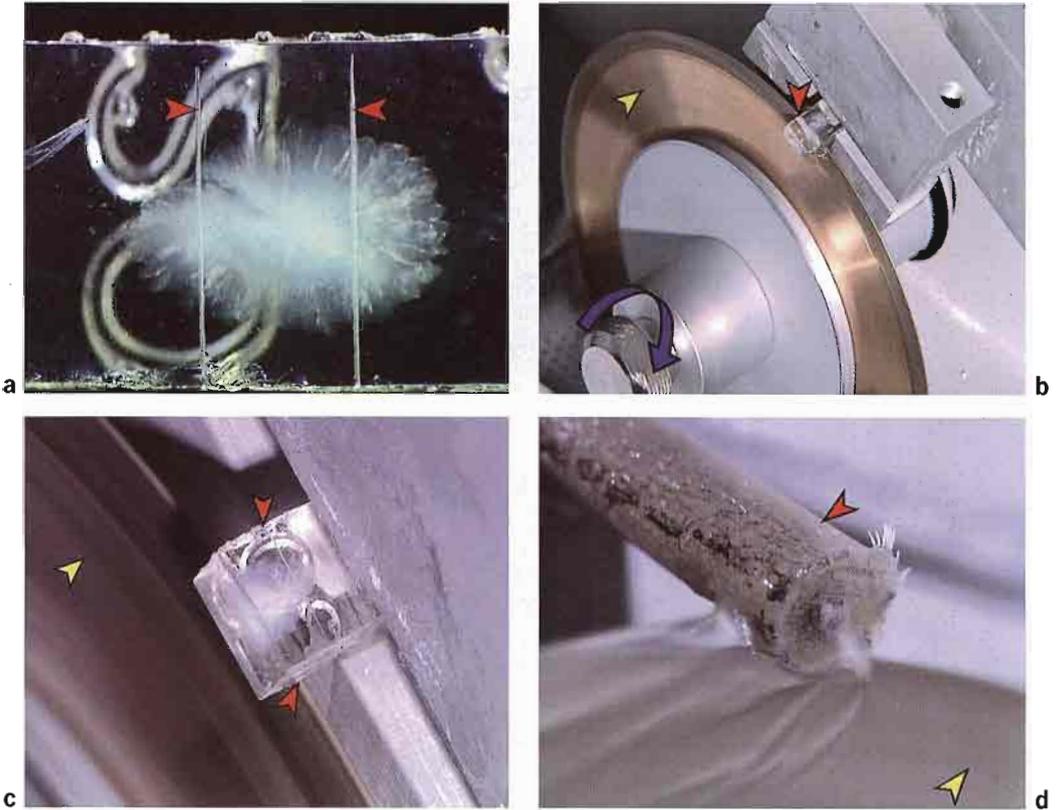


Figure VIII.C.7 - Section des pièces calcifiées : exemples de coupe d'un otolithe enrobé dans de la résine et de coupe d'une épine dorsale entière dans le but d'obtenir des tranches. a) Localisation des niveaux de coupe (flèches rouges) pour obtenir une tranche d'otolithe contenant le noyau. b) Découpe à l'aide d'une scie rotative à vitesse lente (Isomet®, Buehler Ltd). Le bloc de résine contenant l'otolithe (flèche rouge) est coupé par un disque diamanté (flèche jaune) en rotation (flèche bleue). Le disque est humidifié en permanence. c) Détail de la figure précédente. Le disque diamanté (flèche jaune) tourne pendant que le bloc de résine est appuyé directement dessus en pression. Le niveau de section est indiqué par les flèches rouges. d) Section d'une tranche dans une épine dorsale entière. Le courant d'eau est visible à l'interface entre l'épine (flèche rouge) et le disque diamanté (flèche jaune) (photos © Ifremer O. Dugornay).

Des doubles sections peuvent être parfois opérées avec les scies rotatives à vitesse lente en utilisant une paire de lames séparées par un espace correspondant approximativement à l'épaisseur de coupe désirée. Cette dernière peut varier de 150 à 500 μm , en fonction des marques de croissance qui doivent être mises en évidence.

2.3.2. Section multiple (fig. VIII.C.8)

Même si les scies à vitesse lente ont pu être utilisées pour réaliser des sections multiples d'otolithes enrobés dans des blocs de résine polyester (McCurdy, 1985), les scies à vitesse rapide sont beaucoup plus efficaces pour ce type d'opération et lorsqu'il est nécessaire de préparer un grand nombre d'otolithes. Ces scies à vitesse rapide sont habituellement adaptées à partir de machines du type fraiseuse (Bedford, 1983) ou de machines de précision de géologie pour les coupes ou le ponçage

(Van Beek *et al.*, 1997). Des scies spécialement destinées aux otolithes sont également disponibles. Le choix d'une scie à vitesse rapide dépend à la fois de la quantité d'otolithes à traiter et du budget disponible pour l'achat de ce genre d'équipement. La nécessité ou non d'étapes complémentaires dans la préparation des otolithes doit aussi être prise en considération.

Les sections multiples transversales sont préparées en routine, pour les *sagittae* des espèces démersales, dans les laboratoires fournissant des données d'âge individuel pour la gestion des stocks. Dans les laboratoires européens, la technique décrite par Williams & Bedford (1974) et ses variantes ont tendance à être privilégiées : elles produisent des tranches fines de résine polyester contenant les otolithes (fig. VIII.C.8a-c). Par ailleurs, les variantes de la méthode de Nichy (1977), donnant également des tranches transversales d'otolithes, sont utilisées en routine pour la gestion des stocks. Le système Otolin développé par Van Beek *et al.* (1997) a été la première étape de développement d'un prototype de production en ligne de coupes d'otolithes, pour effectuer des lectures d'âge en routine pour les espèces démersales.

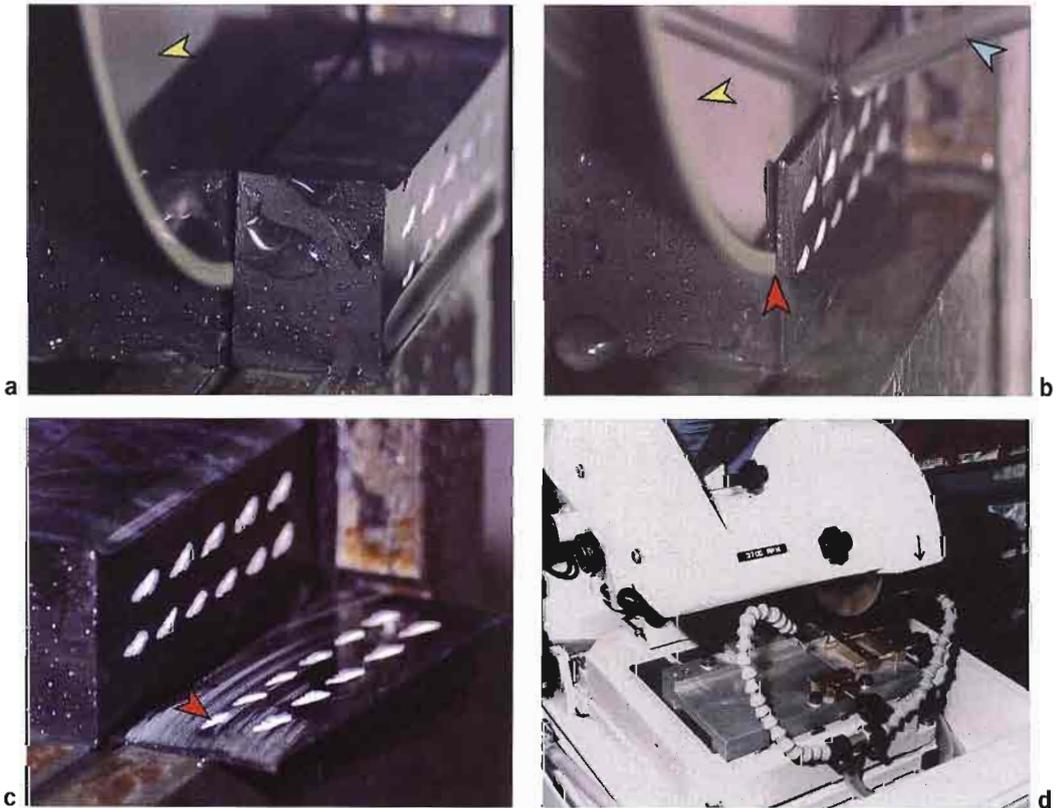


Figure VIII.C.8 - Section d'otolithes en série avec une scie diamantée (flèche jaune) à grande vitesse. a) La première section transverse les otolithes. Le niveau de section a été localisé au préalable directement sur la résine colorée en noir. b) La deuxième section permet d'obtenir la tranche contenant les otolithes (flèche rouge). Le courant d'eau (flèche bleue) arrive directement sur le disque diamanté (flèche jaune). c) Résultat final de la lame contenant les otolithes en série (photos © Ifremer O. Dugonay). d) Vue de la scie diamantée à grande vitesse du système Otolin (photo Bennett Ltd.).

Un certain nombre de variations de la méthode de Bedford ont pu être mises au point (tab. VIII.C.4). Certaines d'entre elles n'affectent pas la lisibilité des marques de croissance des otolithes (par rapport à leur vitesse de coupe et au nombre de coupes effectuées), mais des variations dans l'épaisseur des coupes peuvent affecter cette lisibilité. Toutes les lames de scies circulaires travaillent avec une épaisseur de coupe minimale et font perdre une certaine quantité de matériel lors de la coupe à cause de la lame : il est nécessaire de tenir compte de la perte de ce matériel. Les facteurs qui influencent cette perte sont l'épaisseur de la lame elle-même et la grosseur des grains de diamant qui la composent. En essayant d'obtenir de très fines sections, on peut aboutir à une fragilisation ou à une cassure des coupes réalisées. Ceci est particulièrement évident dans le cas de l'utilisation de deux lames juxtaposées pour réaliser directement des doubles sections : des lames plus fines permettent d'optimiser l'épaisseur de la coupe désirée. Pour tous les types de scie, la section doit être suffisamment épaisse pour que la résine soutienne les otolithes pendant la découpe, mais aussi suffisamment fine pour que le niveau de transparence permette d'observer les marques de croissance.

Tableau VIII.C.4 - Préparations des lames minces d'otolithes utilisées pour l'estimation de l'âge de *Merlangus merlangius* L. dans différents instituts de recherche européens (ICES, 1998).

Institut de recherche	Épaisseur de la section	Couleur de la résine d'enrobage	Sections non montées	Sections montées sur des lames de microscopie		
				Montage avec lamelle	Pas d'enrobage	Enrobage de protection
RIVO-DLO Hollande	0,8 mm	Noire	Non	Non	Oui	Non
FRC Irlande	0,4 - 0,5 mm	Noire	Non	Non	Non	Oui
CEFAS UK	0,6 - 0,7 mm	Noire	Non	Oui	Non	Non
AESD Irlande du Nord	0,3 - 0,4 mm	Noire	Non	Oui	Non	Non
Ifremer France	0,3 mm	Claire	Oui	Non	Non	Non

2.3.3. Section au cryotome (Fig. VIII.C.9)

L'utilisation de l'hématoxyline d'Ehrlich pour colorer les os impose de travailler sur du matériel décalcifié (chap. VIII.C.2.6.2). Les sections sont alors réalisées sur du matériel congelé, avec un cryotome, par exemple le modèle Cryomat™ de chez Leica Ltd (un microtome avec à la fois la lame et la platine réfrigérées). Les os décalcifiés sont congelés soit dans de la glace asséchée, soit directement sur le porte-échantillon réfrigéré au méthanol du Cryomat™. Les échantillons congelés sont coupés par la lame du microtome (fig. VIII.C.9a) et les coupes sont récupérées dans une boîte de Pétri remplie d'eau distillée

(fig. III.C.9b). Ces coupes font environ 15-20 μm d'épaisseur, en fonction du matériel traité. Elles peuvent alors être conservées dans de l'alcool 70 % avant d'être colorées (chap. VIII.C.2.8.2).

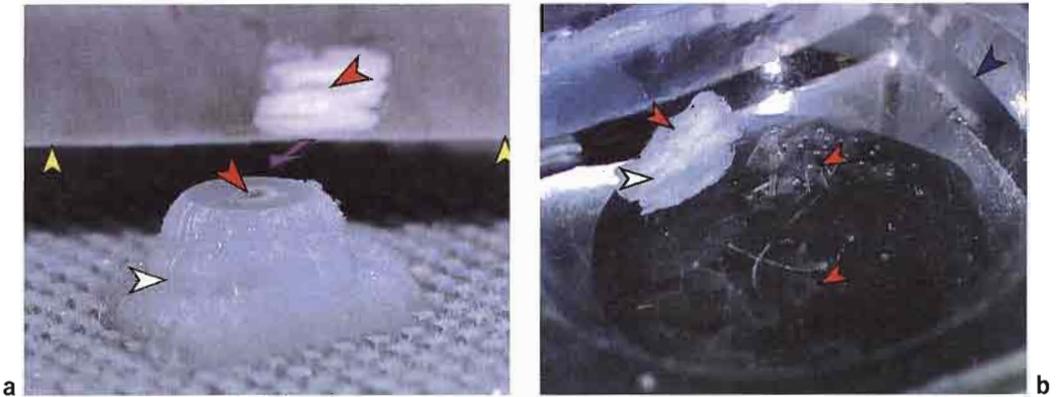


Figure VIII.C.9 - Section d'épine avec l'aide d'un cryotome. a) Une épine décalcifiée (flèche rouge) est enrobée dans de la glace (flèche blanche). La lame du cryotome (flèche jaune) se déplace vers l'avant (flèche rose) et vient couper de très fines tranches de l'épine congelée (flèche rouge sur la lame). b) Les coupes minces (flèche rouge), encore enrobées de glace (flèche blanche), sont déposées à la surface de l'eau (flèche bleue). Après décongélation, les coupes flottent à la surface (flèche rouge) et peuvent ainsi être récupérées (photos © Ifremer O. Dugornay).

2.4. Montage

2.4.1. Montage des sections préalable aux étapes suivantes des préparations (fig. VIII.C.10)

Quand des lames minces transversales d'otolithes (ou d'autres structures calcifiées) doivent être préparées, la coupe épaisse avec le noyau de l'otolithe est collée sur une lame de verre avec une colle thermostable (e.g. Crystal BondTM) avant d'être poncée puis polie (fig. VIII.C.10a, b). Le bloc peut être retourné, puis à nouveau fixé sur une lame par sa face polie, pour poncer puis polir ensuite la deuxième face (fig. VIII.C.10c, d).

2.4.2. Montage des otolithes de petits poissons (fig. VIII.C.11a)

Les petits otolithes sont souvent montés directement dans le produit d'inclusion (chap. VIII.C.2.2.1). Après extraction, l'otolithe est plongé dans une goutte du produit d'inclusion et posé directement sur une lamelle. On peut utiliser une résine polyester qui permet la manipulation de l'otolithe avant la polymérisation. L'otolithe ainsi monté peut être observé directement quelques heures seulement après sa préparation et conservé tel quel pendant une longue période. La précaution la plus importante est de contrôler l'épaisseur de résine au-dessus de l'otolithe, car la distance frontale de l'objectif du microscope peut être très faible aux forts grossissements. Il est souvent nécessaire d'enlever une certaine quantité du produit d'inclusion avant l'observation : un excès de résine peut être retiré de la lamelle avec un simple scalpel; dans d'autres cas, il sera nécessaire de poncer et/ou de polir la pièce avant l'observation.

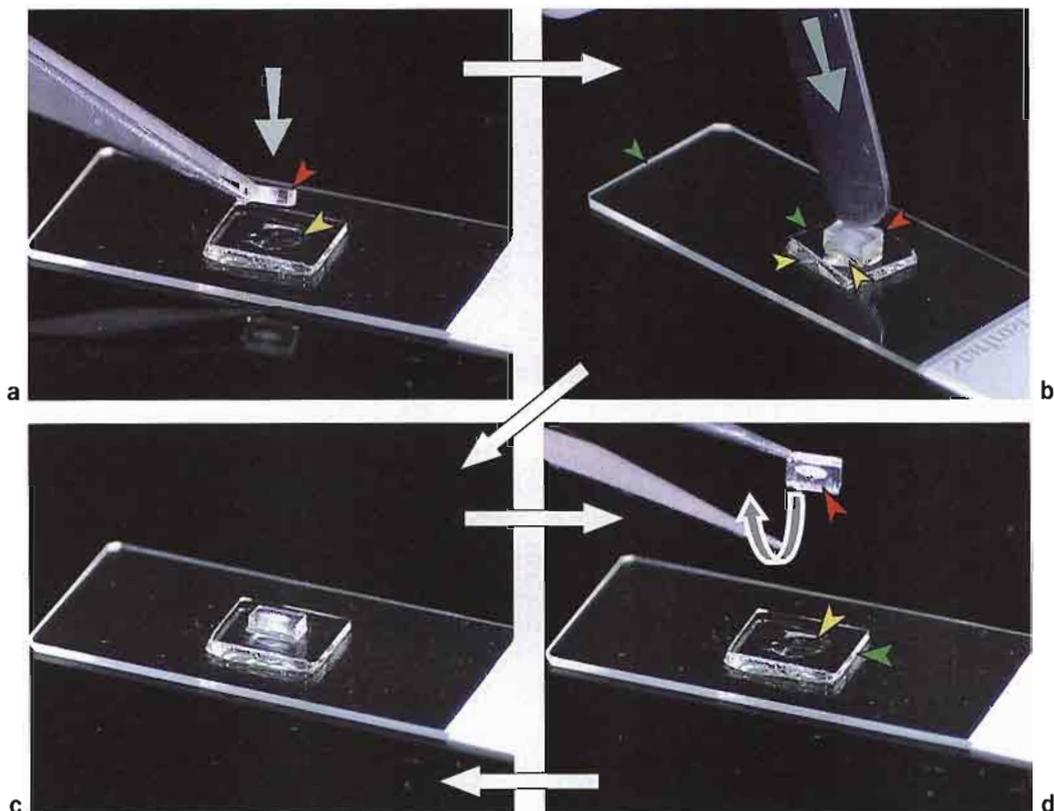


Figure VIII.C.10 - Montage de préparation : exemple de collage d'une tranche d'otolithe avec de la colle thermofusible et retournement sur une plaque chauffante. a) Collage de l'otolithe avec la colle thermofusible (e.g. Crystal Bond™). Le bloc contenant la tranche (flèche rouge) est amené (flèche grise) sur la colle thermofusible encore à l'état visqueux (flèche jaune). b) La tranche est poussée en pression (flèche grise) sur la colle (flèche jaune). Cette pression chasse les bulles d'air captives dans la colle sous la préparation. La tranche d'otolithe (flèche rouge) est en fait collée (flèche jaune) sur un morceau de lame de verre lui-même collé sur une lame de microscopie (flèches vertes). c) Vue de la préparation terminée et enlevée de la plaque chauffante. d) Retournement du bloc de résine. Lorsque la colle thermofusible est suffisamment liquide à haute température (flèche jaune), la tranche est retirée, retournée (flèche grise), et re-déposée sur la colle sur le morceau de lame de verre (flèche verte). La préparation alors terminée est retirée de la plaque chauffante (photos © Ifremer O. Dugornay).

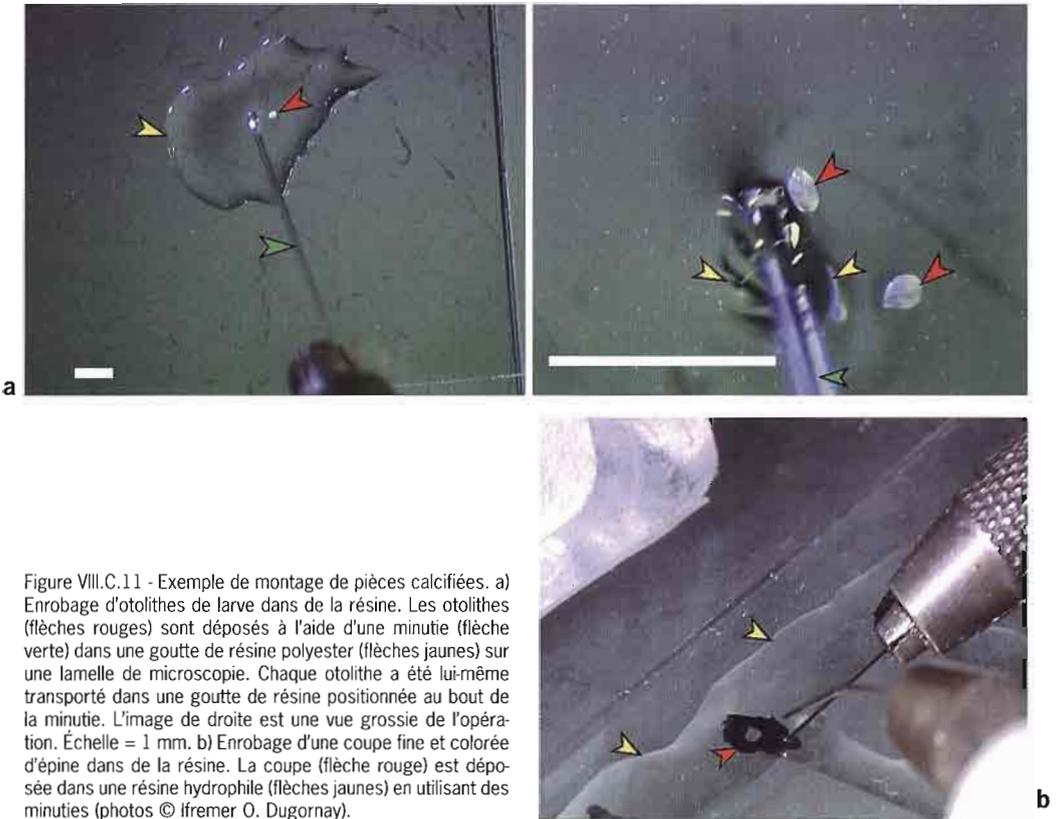
2.4.3. Montage sur lame de plusieurs coupes d'otolithes

La lame de résine noire contenant les coupes transversales passant par le centre de croissance des otolithes (fig. VIII.C.8c) est fixée sur une lame porte-objet (76mm x 50mm) de microscope, recouverte par une résine pré-polymérisée (i.e. avec catalyseur) et protégée par une lamelle de verre. Le numéro d'identification de chaque section est gravé sur chaque lame de microscopie.

Une pipette jetable en plastique souple est utilisée pour déposer la résine de montage sur la lame de microscopie, ce qui permet ainsi de coller les coupes sur la lame de verre. La résine peut alors polymériser. De la résine pré-polymérisée est déposée sur la lame de verre dans les espaces, entre et sur les coupes, pour former une couche uniforme au-dessus de la lame. Il est nécessaire d'agiter doucement le mélange pour

éviter la formation de bulles dans la résine qui gêneraient l'observation des *annuli* sur les otolithes. Après environ 20 minutes, la résine commence sa polymérisation et une lamelle est délicatement posée par-dessus. La préparation est placée sous une hotte jusqu'à complète polymérisation de la résine. L'excès de résine sur la préparation microscopique peut être retiré avec un scalpel dès que la résine a la consistance d'un gel et toute trace de résine peut être enlevée à l'aide d'un morceau de papier absorbant imbibé d'une goutte d'acétone.

Les sections d'os coloré (par exemple des sections d'épines colorées à l'hématoxyline) sont montées sur des lames histologiques dans un milieu hydrophile (Permount[®], Aquamount[®]) et recouvertes d'une lamelle (fig. VIII.C.11b).



2.5. Ponçage progressif et polissage (fig. VIII.C.12)

Il n'y a pas une grande différence de sens entre « ponçage » et « polissage ». Ce dernier terme correspond mieux à la dernière étape du procédé de ponçage-polissage. Les pièces calcifiées peuvent être poncées directement ou après un enrobage, ou encore à partir d'une section.

Comme pour les coupes, le ponçage d'une PC est fait pour : (1) améliorer sa lisibilité, (2) distinguer les marques qui ne sont pas visibles sur la PC entière, (3) effectuer une étape préalable à diverses autres techniques de préparation (e.g. brûlage, coloration, MEB, empreinte d'acétate, microradiographie). Comme pour les coupes, le procédé de ponçage progressif nécessite une orientation soignée du plan de coupe de la PC (transversal, sagittal ou frontal).

Les étapes de ponçage et de polissage sont souvent réalisées à la main à l'aide de papiers abrasifs mouillables, avec ou sans pâte abrasive. Le ponçage utilise des papiers abrasifs à l'eau, de grain compris entre 120 et 1200. Le polissage utilise des tissus avec différentes grosseurs de poudre d'alumine (de 3 μm à 1/3 μm) ou des poudres de diamant. Lors des préparations manuelles, les mouvements d'usure ou de polissage doivent être faits sans direction définie de façon à éviter des distorsions systématiques du plan de la préparation et à conserver une épaisseur régulière de l'objet à observer (fig. VIII.C.12).

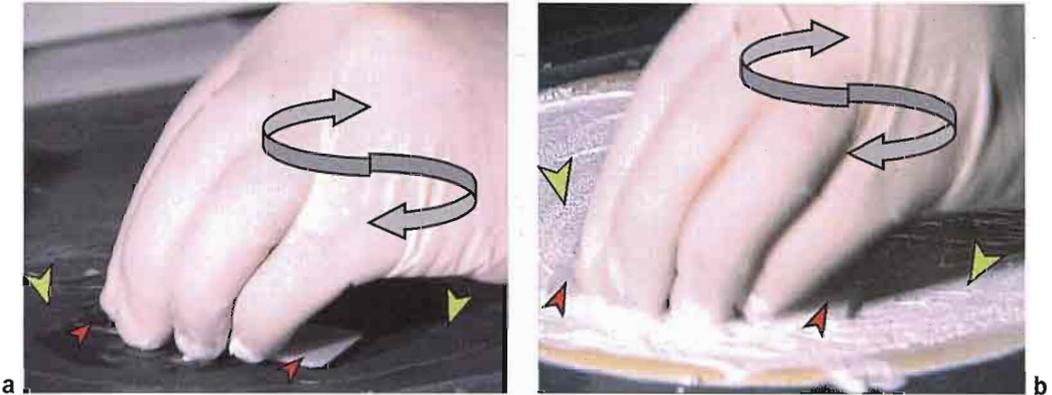


Figure VIII.C.12 - Ponçage et polissage de préparations. a) Ponçage. La préparation, une tranche d'otolithe montée sur une lame de microscopie (flèches rouges), est poncée à la main sur un papier abrasif à l'eau (flèches jaunes). Le mouvement de la main est irrégulier (flèches grises doubles) pour éviter un rodage unidirectionnel et des rayures systématiques. b) Polissage. La préparation, une tranche d'otolithe montée sur une lame de microscopie (flèches rouges), est polie sur un disque de feutre (flèches jaunes) avec de la poudre d'alumine (poudre blanche) et de l'eau. Le mouvement de la main est irrégulier (flèches grises doubles) pour éviter un polissage unidirectionnel et des rayures systématiques (photos © Ifremer O. Dugornay).

Des machines spéciales (rodeuses et polisseuses) peuvent être utilisées à la fois pour des préparations d'otolithes en série et pour des applications spécifiques pour lesquelles un état parfait de la surface (surface parfaitement plane sans aucun relief) doit être obtenu comme, par exemple, pour les coupes fines nécessaires à des analyses microchimiques (tout particulièrement avec des outils analytiques comme les WDS, EDS ou PIXE). Certaines machines permettent de spécifier la quantité de matériel à enlever (par exemple l'épaisseur finale des sections). L'abrasif est un carbure de silicium (SiC) en poudre. Il est utilisé pour :

- user les lames de verre de façon à standardiser leur épaisseur et pour obtenir une surface dépolie qui augmente l'adhérence de la résine quand les otolithes sont montés sur les lames ;

- poncer les préparations pour enlever le maximum d'épaisseur de la résine recouvrant les otolithes enrobés.

Après ponçage, les lames ou les préparations sont soigneusement nettoyées dans un bain à ultrasons (un bain d'eau Milli Q est nécessaire pour la microchimie). Les préparations sont alors traitées avec une polisseuse automatique en plusieurs étapes :

- ponçage fin ou pré-polissage à l'aide de papiers abrasifs au carbure de silicium de grain décroissant (grain de 800 à 1200), avec de l'eau comme lubrifiant (eau Milli Q pour la microchimie) et avec un contrôle optique permanent du plan à atteindre ;
- polissage pour enlever les rayures et les irrégularités introduites par les étapes préalables du ponçage. Il est réalisé progressivement à l'aide de différentes suspensions de pâtes diamantées (ou de sprays) en milieu aqueux (e.g. grains décroissants de 9 μm - 3 μm - 1 μm - 0,25 μm). Le choix des étapes terminales du polissage dépend de la qualité requise (voir plus haut). Le polissage se fait sur des tissus dont les caractéristiques dépendent de la taille des grains de la poudre de diamant.

Pendant le polissage, les préparations sont régulièrement contrôlées au microscope en lumière réfléchie, car c'est le seul moyen de vérifier la bonne qualité de la surface (fissures, rayures, etc.). Pour faciliter cette procédure, des porte-objets en Plexiglass® peuvent être utilisés d'autant plus qu'ils sont avantageux en termes de risque de contamination, notamment pour les analyses microchimiques.

2.6. Attaque acide, décalcification

2.6.1. Attaque acide de l'otolithe

L'action de l'acide sur l'otolithe entier ou sur une section est une destruction superficielle d'une partie du calcium minéral. Plusieurs acides dilués ont été proposés dans la littérature : acide nitrique à la concentration de 0,2 N (Albrechtsen, 1968); acide chlorhydrique à une concentration comprise entre 0,1 et 1 % (nombreux auteurs); acide acétique à 1 % (Richter & McDermott, 1990); acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) à 5 % (nombreux auteurs). L'EDTA semble préférable car l'attaque de la surface est ménagée et la dégradation de l'otolithe est moins rapide qu'avec les autres agents réactifs (Campana & Neilson, 1985). La durée d'action de l'acide est très variable et dépend des espèces et de la taille de l'otolithe : quelques minutes sont suffisantes pour obtenir de bonnes préparations mais un test préliminaire doit être fait pour chaque type de matériel.

Après l'attaque acide, la préparation doit être rincée plusieurs minutes dans de l'eau distillée. Elle est ensuite séchée avant les étapes suivantes du traitement (coloration, MEB).

2.6.2. Décalcification des tissus osseux

La préparation des coupes à la congélation, pour la coloration à l'héματοxyline (chap. VIII.C.2.8.2), nécessite une décalcification préalable des os. Pour les études squelettochronologiques, l'agent décalcifiant

usuel est l'acide nitrique à la concentration de 5-10 %, selon le volume de l'échantillon. La durée de la décalcification varie aussi en fonction du volume et du degré de minéralisation de l'os. Dans certains cas, le processus de décalcification doit être strictement contrôlé car, lorsque l'os est totalement débarrassé de sa composante minérale, la trame collagénique peut être attaquée rapidement par l'acide et devenir particulièrement fragile à la coupe, d'une part, les marques de croissance ne pouvant plus être distinguées par la coloration, d'autre part.

La décalcification est stoppée par un lavage de plusieurs heures à l'eau du robinet. Les échantillons sont alors conservés, éventuellement plusieurs jours, dans l'alcool 70 % avant de procéder aux coupes. L'étape de la coupe est toujours précédée par un lavage soigné (12 à 24 h) dans l'eau courante pour enlever toute trace d'acide nitrique qui pourrait perturber le bon contraste de la coloration.

2.7. Chauffage et brûlage (fig. VIII.C.13)

Dans certains cas (par exemple pour les poissons plats), la qualité des observations peut être améliorée par un chauffage de l'otolithe jusqu'à la dénaturation des protéines qui prennent une couleur brune, rendant ainsi les zones de croissance hivernales (translucides) mieux visibles.

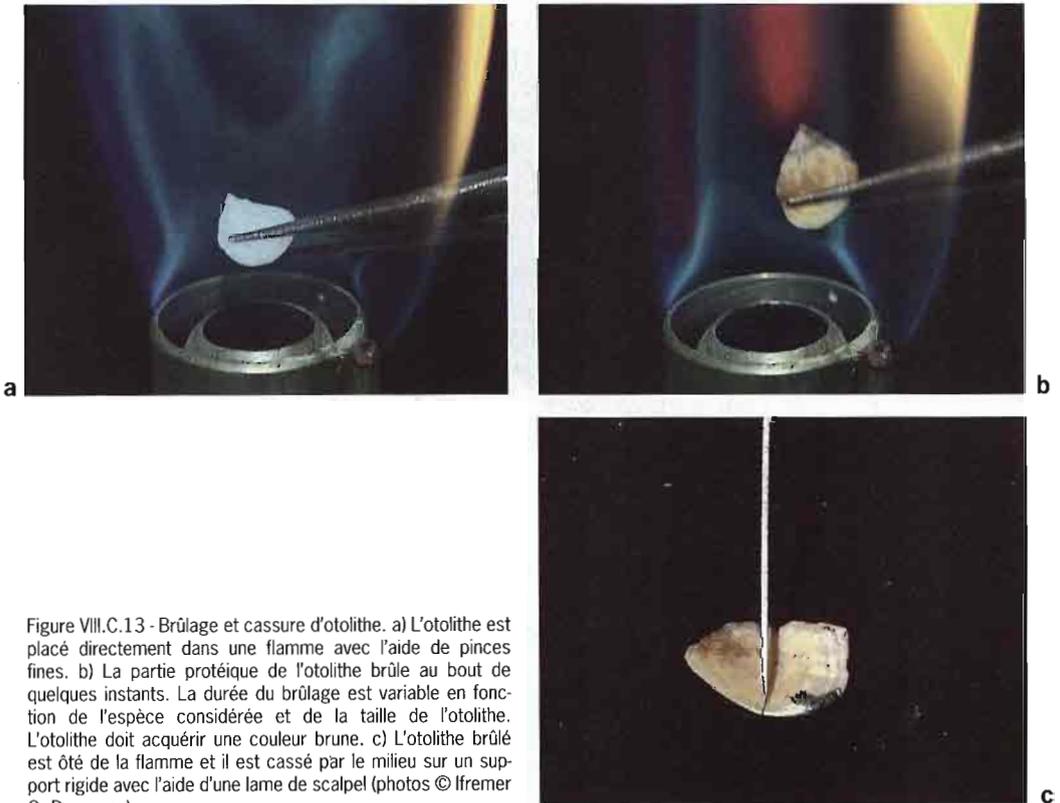


Figure VIII.C.13 - Brûlage et cassure d'otolithe. a) L'otolithe est placé directement dans une flamme avec l'aide de pinces fines. b) La partie protéique de l'otolithe brûle au bout de quelques instants. La durée du brûlage est variable en fonction de l'espèce considérée et de la taille de l'otolithe. L'otolithe doit acquérir une couleur brune. c) L'otolithe brûlé est ôté de la flamme et il est cassé par le milieu sur un support rigide avec l'aide d'une lame de scalpel (photos © Ifremer O. Dugornay).

Le brûlage est pratiqué de quelques secondes à quelques minutes, selon l'espèce et la taille de l'otolithe. Après cette opération, l'otolithe est délicatement cassé à l'aide d'une lame de scalpel ou d'un autre outil dur (fig. VIII.C.13c). Plusieurs méthodes de brûlage ont été testées au laboratoire du National Marine Fisheries Service de Wood's Hole, mais finalement seuls les otolithes de la morue (*Gadus morhua*) sont chauffés dans un four irradiant à 275 °C pendant trois à six minutes (Almeida & Sheehan, 1997). Dans certains cas, les otolithes cassés ou les otolithes qui ont été coupés en deux avec une scie diamantée sont brûlés pour augmenter le contraste et donc la lisibilité des *annuli*. La stabilité des surfaces brûlées peut être conservée en incluant les otolithes ainsi préparés dans des moules en polyéthylène remplis d'une résine parfaitement transparente.

2.8. Coloration (fig. VIII.C.14)

2.8.1. Coloration des otolithes (fig. VIII.C.14a-b)

La coloration est une méthode de préparation qui révèle de fines lignes d'accroissement chromophiles, comparables, quelques fois, à celles obtenues après brûlage. Développée pour la première fois par Albrechtsen (1968), cette technique consiste, après section, polissage et attaque ménagée de la surface à l'acide, à placer celle-ci au contact d'un colorant histologique. Le colorant utilisé par Albrechtsen était le violet de méthyle (à 15 %), un colorant spécifique des noyaux cellulaires, mais toute une série d'autres colorants peuvent également être utilisés. D'après Richter & McDermott (1990), qui ont testé plusieurs colorants, ce sont le bleu d'aniline à 1 % (aussi appelé « bleu brillant ») et le bleu de toluidine (1 %) qui donnent les meilleurs résultats. En histologie classique, ces deux produits colorent respectivement le collagène, le cartilage et les noyaux cellulaires en bleu. En revanche, les propriétés spécifiques de ces colorants dans l'otolithe ne sont pas très bien connues, puisqu'il ne contient ni collagène, ni noyaux cellulaires. Il est possible que ces colorants soient attirés par des protéines spécifiques de la composante organique des otolithes. Gaudie (1990) a suggéré que ces colorants agissent physiquement en se localisant dans les discontinuités mises en évidence par l'attaque acide de surface plutôt que par une réaction chimique sélective avec les protéines. Quoi qu'il en soit, nous recommandons l'utilisation du bleu de toluidine à 1 % pendant quelques minutes, après attaque acide superficielle, comme colorant universel des otolithes.

Bouain & Siau (1988) ont proposé une autre méthode de coloration après fracture préalable de l'otolithe : immersion pendant 12-14 h dans la fuchsine acide, puis passage pendant plusieurs minutes dans du noir solide à 5 %; les accroissements apparaissent alors bleu foncé sur un fond rose. Il semble qu'une action physique de cette coloration ne soit pas complètement exclue. Une autre méthode de traitement consiste à passer l'otolithe dans un bain d'acide et à le colorer avant d'effectuer les sections (Richter & McDermott, 1990), mais cette technique est peu utilisée.

Comme dans l'attaque acide ménagée, le temps d'action du colorant est très variable, dépendant des espèces et de la taille des otolithes : quelques minutes sont suffisantes pour obtenir de bonnes préparations, mais des essais préliminaires sont nécessaires dans chaque cas. Après coloration, la préparation doit être soigneusement rincée à l'eau claire pendant quelques secondes pour protéger la coloration.

2.8.2. Coloration des tissus osseux (fig. VIII.C.14c)

Le colorant spécifique pour les marques de croissance des os est l'hématoxyline qui colore les lignes cimentantes à cause de leur richesse en protéoglycans. Cette technique est tout à fait favorable pour la détection des LAC.

Avant la coloration, les sections d'os décalcifiées sont réhydratées si nécessaire, prélevées avec l'extrémité d'un pinceau fin, essorées et plongées dans une goutte d'hématoxyline. Après 10 à 12 minutes (le temps nécessaire varie avec le matériel à colorer et avec la qualité de l'hématoxyline), les sections sont récupérées et rincées à l'eau du robinet jusqu'à ce que la coloration vire au bleu. Les LAC et les lignes cimentantes de réversion apparaissent en bleu foncé à violet sur un

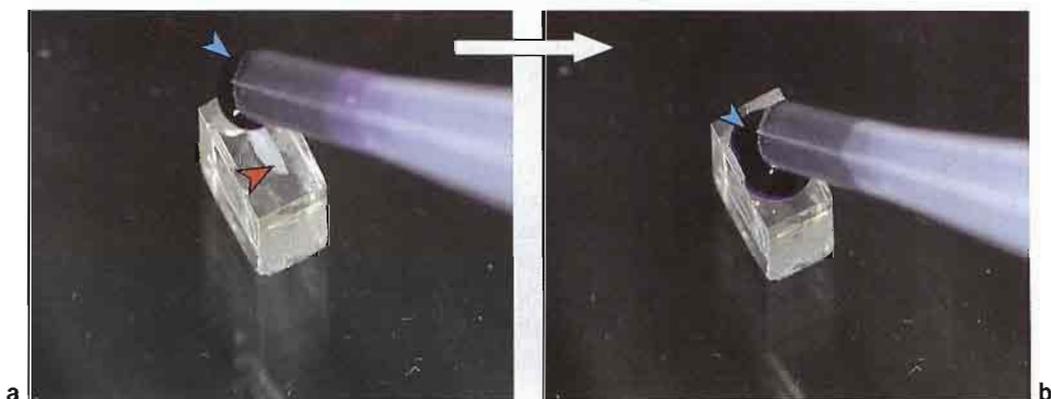


Figure VIII.C.14 - Coloration. a) b) Coloration d'otolithe. Une coupe transversale d'un otolithe enrobé dans de la résine et attaqué à l'acide (flèche rouge) est colorée par dépôt d'une solution de bleu de toluidine. La préparation doit ensuite être abondamment rincée pendant quelques temps avec de l'eau distillée. c) Coloration de coupes d'épine décalcifiées. Les coupes d'épine, flottant dans de l'eau distillée, sont recouvertes d'une solution colorante (hématoxyline d'Ehrlich). La préparation doit ensuite être abondamment rincée pendant plusieurs minutes avec de l'eau distillée (photos © Ifremer O. Dugornay).

fond bleu clair à mauve clair. Les sections sont alors délicatement prélevées avec un pinceau pour être montées dans une résine hydrophile (Aquamount®) (chap. VIII.C.2.4.3 et fig. VIII.C.11b).

L'hématoxyline d'Ehrlich (Ganter & Jolles, 1969) est préparée de la façon suivante :

- hématoxyline	4 g
- éthanol 95 %	200 ml
- eau distillée	200 ml
- glycérol	200 ml
- alun de potassium	6 g
- acide acétique	20 ml

Il faut dissoudre l'hématoxyline dans l'éthanol, puis ajouter les autres produits, et laisser le mélange vieillir doucement à l'air et à la lumière, au moins deux semaines à la température du laboratoire. L'hématoxyline d'Ehrlich se garde pendant plusieurs années.

Remarque : Plus la solution colorante est vieille, meilleure est la qualité de l'hématoxyline d'Ehrlich. C'est pour cette raison que l'on a tout intérêt à conserver, en permanence, un flacon d'hématoxyline d'Ehrlich mais il est indispensable, alors, de filtrer la solution régulièrement ou, tout au moins, juste avant l'emploi pour éviter les précipités sur la préparation.

2.9. Quelques considérations particulières pour les études de microchimie

La microchimie est l'analyse de la composition des pièces calcifiées. Dans la plupart des cas, les techniques de préparation des échantillons sont les mêmes que celles utilisées pour l'observation des accroissements. Cependant, il existe toujours un risque de contaminer les échantillons pendant la manipulation et le traitement, et certaines des techniques analytiques présentent, en outre, des contraintes spécifiques concernant la qualité de la surface des préparations. Pour réduire les difficultés analytiques, plusieurs considérations dans le choix du matériel et des techniques de préparation des échantillons devraient être prises en compte.

Une directive générale concerne le matériel utilisé pour la manipulation et le stockage : il doit être chimiquement inerte, nettoyé avec de l'acide HNO₃ ultra-pur dilué et rincé avec de l'eau ultra-pure (18-MΩ).

Les techniques de surface mesurent la composition chimique ponctuellement à la surface d'échantillons préparés en coupe. Les PC sont enrobées dans de la résine et sectionnées avec une scie ou par ponçage. La résine doit être soigneusement choisie en considérant les deux aspects suivants :

- la pureté de la résine. Il est essentiel que la résine utilisée soit inerte de sorte qu'elle n'introduise aucune contamination pendant l'imprégnation. La plupart des résines époxy ne contiennent pas, en concentration détectable, les éléments habituellement recherchés dans les

otolithes. En revanche, les colles à base de cyanoacrylate et les résines thermofusibles peuvent contenir des teneurs élevées en S, Si, et parfois Pb. Les résines polyester devraient également être évitées parce qu'elles peuvent contenir des contaminants susceptibles d'affecter la mesure de la composition des otolithes ;

- la viscosité de la résine. Lors de l'analyse des échantillons par la technique ICP-MS à ablation laser (LA-ICP-MS), l'énergie du laser peut être très destructive. Si l'échantillon est tenu de manière trop lâche dans la résine, l'énergie peut le faire vibrer, se briser et l'éjecter hors de la résine. Les résines à faible viscosité telles que la Spurr ou l'araldite sont les plus appropriées pour les préparations en microchimie. Il est particulièrement important de s'assurer de la pureté des résines à faible viscosité, précisément du fait de leur capacité à s'infiltrer dans l'échantillon.

Les réactifs et les matériaux de ponçage et de polissage doivent être choisis afin de réduire le risque de contamination. Les consommables utilisés pour la microchimie peuvent être, en conséquence, différents de ceux utilisés pour les études classiques d'observation. Les disques abrasifs et les poudres d'alumine (AlO_2) sont une source évidente de contamination par les métaux. L'utilisation de sprays ou de suspensions diamantées en phase aqueuse est donc recommandée. Les liquides de lubrification utilisés avec les scies (l'eau Milli Q est recommandée) et lors du polissage peuvent constituer des sources moins évidentes de contamination.

Quelques techniques analytiques (EDS, WDS, PIXE) requièrent l'obtention d'une surface finale de préparation parfaitement polie avec une très bonne planéité, conditions difficiles à obtenir par un polissage manuel. Un ponçage et un polissage automatiques sont recommandés (chap. VIII.C.2.5). Des contrôles relatifs à la progression de la préparation (plan de coupe et état de surface) doivent être fréquemment réalisés au microscope en lumière réfléchie.

Le nettoyage final avec de l'eau Milli Q dans un bain à ultrasons a été souvent suggéré dans les protocoles de préparation.

Il est également important que les récipients servant à conserver les préparations soient exempts de contaminants. Certaines méthodes analytiques étant très sensibles à l'humidité, il convient de stocker les préparations dans une armoire à dessiccation jusqu'à l'analyse. Divers procédés de décontamination ont été suggérés avant l'analyse des échantillons :

- pré-ablation quand les préparations sont analysées avec la technique LA-ICP-MS (Campana *et al.*, 1995) ;
- nettoyage de la préparation avec un tissu imbibé de HNO_3 ultra-pur pendant 15 secondes (Milton *et al.*, 1997). Ce procédé n'est pas recommandé quand la technique analytique est sensible à la rugosité de la surface de la préparation.

En microchimie, les analyses globales permettent d'obtenir des mesures de composition à partir d'échantillons de PC dissous. L'échantillon est habituellement dissous dans un acide et introduit dans l'instrument de mesure sous forme liquide.

Les manipulations entraînent toujours un risque de contamination des échantillons. En conséquence, les étapes d'extraction, de nettoyage et de séchage des préparations pour l'analyse globale devraient être effectuées en conditions propres, sous une hotte à flux laminaire classe 100. La pesée des échantillons doit être soigneuse et précise. Du fait que les résultats des analyses globales sont généralement exprimés relativement à la quantité de matériel analysé, l'incertitude liée à la pesée peut en affecter la fiabilité.

La pureté de l'acide utilisé pour la digestion est extrêmement importante pour éviter la contamination des échantillons et, également, parce que des impuretés présentes dans l'acide utilisé pour fabriquer les blancs et les standard entraîneront l'obtention de moins bonnes limites de détection (LODs) et donc une diminution de la sensibilité. L'utilisation d'acide nitrique re-distillé (sub-boiling) dilué avec de l'eau ultra-pure est recommandée. Diverses méthodes sont employées pour dissoudre les échantillons de PC pour l'analyse globale. La plupart d'entre elles utilisent l'acide nitrique du fait de son excellent pouvoir d'attaque du CaCO_3 . L'échantillon peut être dissous à la température ambiante mais la digestion peut être alors incomplète. Dans le cas des otolithes, la digestion à température ambiante peut laisser un « fantôme » résiduel composé de protéines qui résistent à la digestion acide. La digestion à chaud dans l'acide nitrique permet une décomposition complète de la matrice protéique mais entraîne des manipulations supplémentaires qui risquent d'engendrer une contamination des échantillons. Pour obtenir une digestion complète, le chauffage de l'échantillon dans l'acide effectué dans un four à micro-ondes peut être un bon compromis. Dans les études de microchimie, il est important de prendre la matrice protéique en considération parce qu'il existe très peu d'informations relatives aux éléments associés aux protéines (par rapport à la composante minéralisée). Alors qu'il pourrait paraître souhaitable de développer un protocole de digestion qui laisse intacte la matrice protéique, il est, en pratique, probablement préférable d'obtenir une digestion complète de l'échantillon pour éviter l'introduction d'une variabilité associée à une destruction partielle des protéines. Campana *et al.* (2000) ont rapporté le résultat d'une expérience de décontamination comparant les résultats de cinq protocoles de préparation. Des quatre éléments examinés (Mg, Ba, Li et Sr), Mg est le seul qui ait présenté des différences significatives de concentration en fonction du traitement appliqué.

D. Observation

B. Morales-Nin, J. Panfili

Il existe pratiquement autant de techniques d'observation des PC que de techniques de préparation, allant des plus simples jusqu'aux plus complexes. Le chercheur devra donc en sélectionner une parmi toute cette gamme en fonction de l'aptitude de la technique à répondre aux objectifs de l'étude. Comme pour le choix d'une technique de préparation, le choix d'une méthode d'observation dépend du temps requis et disponible pour obtenir les résultats escomptés, mais aussi des coûts expérimentaux. Par exemple, la standardisation des conditions d'éclairage des échantillons devient obligatoire pour l'utilisation de l'analyse d'images (Mosegaard *et al.*, 1998) : une description précise de ces conditions est absolument indispensable lorsque l'on désire par la suite comparer les propriétés optiques des PC. Les marques de croissance peuvent être révélées de façon variable en fonction de la source de lumière utilisée.

Dans ce chapitre, nous présentons quelques-unes des techniques d'observation les plus couramment employées dans le cadre des études de sclérochronologie.

1. Microscopie photonique

1.1. Faible grossissement (loupe binoculaire)

Les grandes pièces du squelette, comme les *cleithra* des Esocidae, peuvent être observées et mesurées sans avoir recours à un quelconque grossissement. L'âge peut être estimé à l'œil nu, même sur le terrain, et pour des individus ayant jusqu'à 30 ans (Casselman, 1974). Cependant, les marques de croissance sont rarement assez larges pour être observées avec exactitude à l'œil nu et il est assez fréquent de les regarder à un faible grossissement. À cette échelle, seules les marques saisonnières et annuelles sont visibles. Cette méthode d'observation est certainement la moins coûteuse et la plus rapide, permettant en outre d'observer un grand nombre d'échantillons dans un minimum de temps. La gamme habituelle de grossissements s'étend de 1× à environ 100×.

1.1.1. Pièce entière

L'observation de la PC entière est particulièrement adaptée pour les structures relativement fines et translucides comme les écailles, les os operculaires, les *cleithra* et certains otolithes. Pour les poissons possédant des PC épaisses qui sont trop denses pour que les marques de croissance les plus internes soient visualisées, il est nécessaire de les préparer en coupes (chap. VIII.C.2.3).

1.1.2. Milieu éclaircissant

L'utilisation d'un milieu éclaircissant est recommandée pour tous les types d'observation, avec ou sans préparation préalable des PC. Un tel milieu est un liquide ou un produit durcissant (résine) qui permet d'améliorer le contraste et la visualisation des marques de croissance. Il possède souvent la même densité optique que celle de la PC, ou une densité proche, permettant ainsi à la lumière de pénétrer plus facilement, dans le but de révéler les structures les plus internes. Plusieurs liquides éclaircissants sont disponibles : le plus fréquemment utilisé est probablement l'eau, puis viennent les solutions salines (plus isotoniques), suivies par l'alcool, les mélanges eau-alcool (à différentes proportions), la glycérine, le mélange glycérine-alcool (30:70) et les huiles d'immersion. Les huiles essentielles (clou de girofle, romarin, pin, cèdre, camomille, etc.) offrent également de très bons résultats. D'autres liquides, comme le créosote, le xylène, le benzoate de méthyl, sont désormais moins utilisés car ils s'avèrent dangereux pour la santé. De plus, une attention particulière doit être portée, au préalable, pour s'assurer que les marques de croissance ne sont pas endommagées et/ou rendues illisibles par un effet secondaire de ces liquides. Après une observation dans un liquide visqueux et/ou gras, la PC doit être nettoyée avec un tissu imprégné d'une solution d'éther-alcool (50:50). Pour les otolithes par exemple, le choix d'un liquide éclaircissant dépend de l'espèce considérée : pour les otolithes petits et/ou fins, l'eau ou le sérum physiologique peut être recommandé tandis que, pour les otolithes plus épais, les huiles sont préconisées (e.g. huile essentielle de romarin). La plupart des produits de fixation (e.g. résine) améliore en général la lisibilité des PC.

1.1.3. Produits de montage

Le terme « produit de montage » regroupe tous les produits qui permettent simplement de fixer la PC, la plupart du temps sur une lame de microscopie (Secor *et al.*, 1992). En outre, certains de ces produits permettent à la fois de conserver les préparations des PC et d'améliorer la lisibilité de leurs marques de croissance. Ils agissent également à travers leurs propriétés de densité optique. Ces produits sont la plupart du temps des résines synthétiques : polyester, Protexx[®], Flo-texx[®], colle cyanoacrylate, colle thermofusible, Permout[®], etc. Des problèmes liés à certains produits de montage spécifiques peuvent cependant survenir ultérieurement, à cause de leur opacité et de leur couleur, de leur dureté et/ou de leur faible qualité après une longue conservation : c'est le cas par exemple pour l'Eukitt[®], le cyanoacrylate, le baume du Canada et l'époxy. Les produits permanents irréversibles peuvent limiter la manipulation ultérieure des PC si un autre type d'observation est requis : c'est le cas par exemple du montage des otolithes de poissons pélagiques dans de la résine polyester sur des lames Perspex[®] en plastique noir. Nous recommandons de monter les PC plus hydrophobes avec de la colle thermofusible à basse température

(40-60° C) ou avec de la résine polyester, et les PC hydrophiles (e.g. coupes fines d'épines) avec du Permout®.

1.1.4. Éclairage

Deux voies peuvent être employées pour éclairer les surfaces à observer. La lumière passe soit directement à travers la PC (lumière transmise) ou elle est projetée sur la surface par le dessus (lumière réfléchie). La lumière réfléchie est souvent utilisée pour observer les marques de croissance saisonnières tandis que, pour l'observation des microstructures (e.g. journalières) des otolithes, la lumière transmise est préférée. Quoiqu'il en soit, des essais préalables de comparaison des sources de lumière, transmise et réfléchie, doivent être effectués avant d'utiliser l'une ou l'autre en routine pour lire les marques de croissance saisonnières (e.g. pour les os). L'aspect de ces accroissements saisonniers va dépendre du type d'éclairage employé (fig. VIII.D.1) : sous une lumière transmise, les marques translucides sont lumineuses et les marques opaques sont sombres tandis que, sous une lumière réfléchie, les marques translucides sont sombres et les opaques lumineuses. Le fait que les marques de croissance soient décrites comme « lumineuses » ou « sombres », en fonction du type d'éclairage, peut conduire à une certaine confusion et, pour cette raison, les termes « opaque » et « translucide » devraient toujours être utilisés (Casselmann, 1974, 1983 ; Williams & Bedford, 1974).

1.1.4.1. Lumière transmise (fig. VIII.D.1a, b)

Avec une lumière transmise, il est nécessaire d'employer un récipient transparent si la PC observée doit être immergée dans un liquide éclaircissant. Deux types d'éclairage sont également disponibles et doivent être testés : un éclairage transmis direct (fig. VIII.D.1a) ou un éclairage en diascopie (fig. VIII.D.1b). Lorsque des coupes épaisses de PC sont observées, la meilleure image est obtenue lorsque la base de la PC est illuminée par le côté avec un éclairage à fibres optiques et que la surface est cachée de la lumière. L'ombre en surface oblige la lumière à passer par le niveau inférieur de la coupe et à ressortir sous la surface observée, augmentant de la sorte le contraste entre les zones opaques et translucides. La luminosité et le contraste à la surface d'une PC peuvent être contrôlés en faisant varier la position des fibres optiques (Estep *et al.*, 1995).

1.1.4.2. Lumière réfléchie (fig. VIII.D.1c)

La qualité de l'observation est améliorée en utilisant un récipient possédant un fond noir. La source de lumière incidente doit être soit latérale, soit en provenance du dessus de la préparation examinée. L'utilisation d'une lumière réfléchie nécessite l'emploi d'un milieu éclaircissant pour éviter une distorsion de la lumière en surface. Une bonne orientation de la source lumineuse est particulièrement importante et doit être réglée pour obtenir le meilleur contraste entre les

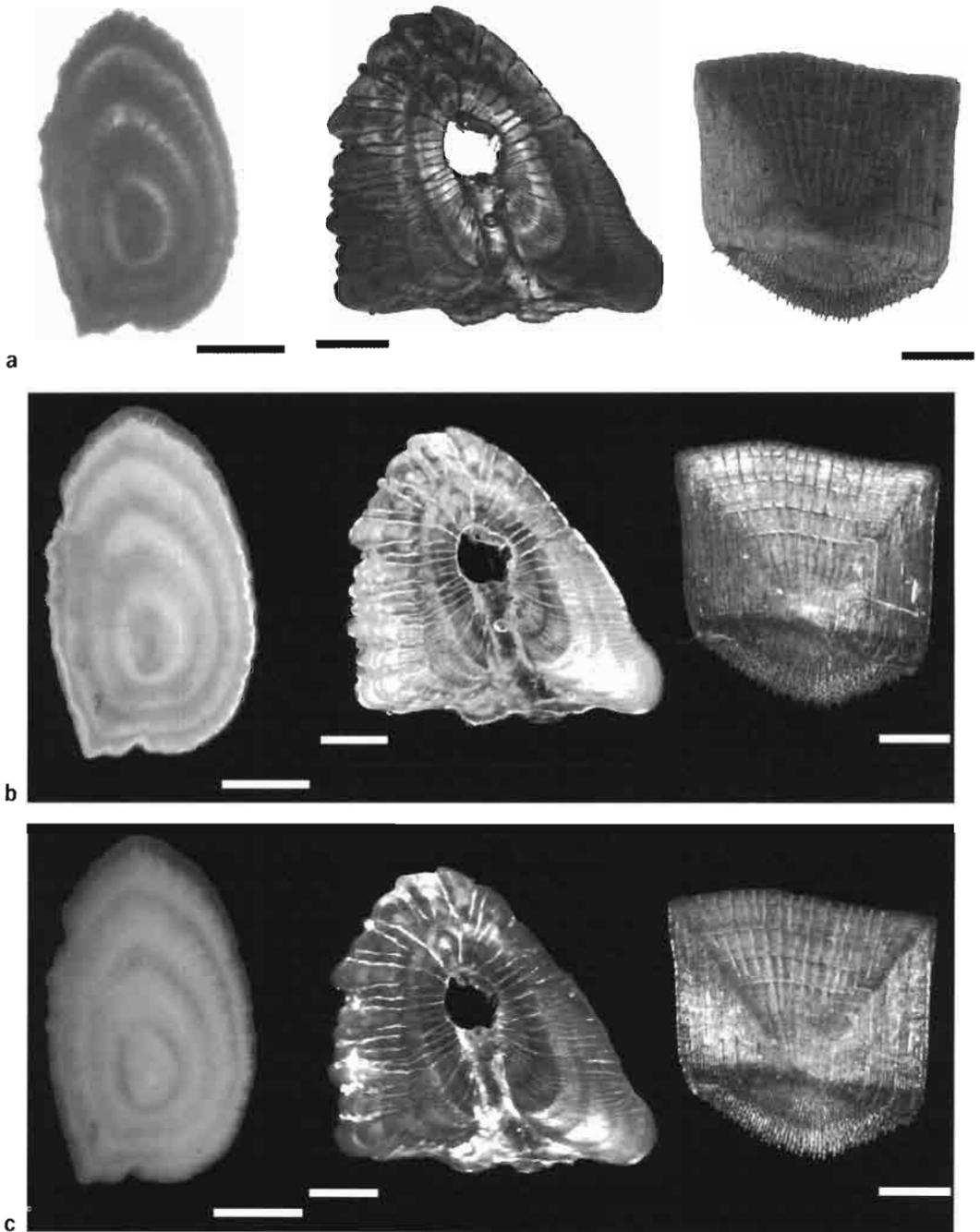


Figure VIII.D.1 - De gauche à droite, otolithe entier de *Pleuronectes platessa*, coupe d'épine de *Pangassius hypophthalmus* et écaille de *Dicentrarchus labrax*, observés en lumière transmise directe (a), en lumière transmise en diascope (b) et en lumière réfléchie sur fond noir (c). Échelle = 200 μm (photos J. Panfil).

marques de croissance. Il est toutefois préférable d'utiliser une source de lumière froide pour les observations en lumière incidente afin de minimiser l'évaporation du liquide éclaircissant : les fibres optiques sur support souple couplées à une lampe de forte puissance sont certainement le meilleur moyen.

1.1.4.3. Projecteur de profil

Le projecteur de profil est surtout utilisé pour la lecture des écailles. Au début des années vingt, le projecteur de profil a été développé pour projeter des images grossies des écailles sur un verre dépoli. Ceci a ensuite été copié dans de nombreux laboratoires et était disponible dans le commerce (Carlander, 1987). Ce genre d'appareil permet d'effectuer des mesures manuelles des distances sur le verre dépoli. De nos jours, les systèmes informatiques d'analyse d'images sont employés dans le même but dans les laboratoires à haute technologie les plus récents mais avec de meilleures performances et un plus grand rendement.

1.2. Fort grossissement (microscope photonique)

Le fort grossissement au microscope photonique est utilisé principalement pour examiner les microstructures des otolithes, pour interpréter les micro-accroissements primaires et, quelques fois, pour observer la structure interne des autres PC (e.g. constituants cellulaires et extracellulaires des os). Comme pour la loupe binoculaire, différentes sources de lumière peuvent être employées : même si la lumière transmise est la plus couramment utilisée, d'autres types d'éclairage existent, comme la lumière réfléchie, la lumière polarisée, le contraste de phase et la fluorescence. À ce niveau, l'observateur doit faire un choix après des essais comparatifs de ces différents éclairages. Les observations microstructurales sont meilleures avec un microscope photonique doté d'un équipement minimal (Campana, 1992) : deux oculaires dont l'un au moins est réglable à la vue, des objectifs avec des grossissements de 20×, 40× et 100× (plus d'autres, par exemple 10× et 60×), une platine de déplacement d'objets (ou mieux une platine motorisée déplacée à l'aide d'un joystick), un condensateur de lumière, un diaphragme d'ouverture et un variateur d'intensité lumineuse avec son propre condensateur. Un microscope avec des caractéristiques inférieures peut induire un biais pour l'interprétation des micro-accroissements. La visualisation des images peut être facilitée par l'utilisation d'une caméra vidéo liée à un moniteur.

1.2.1. Résolution

La limite de résolution correspond à la plus petite distance séparant deux structures contiguës visibles. La résolution en microscopie photonique dépend principalement du matériel et, plus particulièrement, des objectifs disponibles. Les lentilles corrigées pour les aberrations chromatiques et sphériques, et possédant de faibles ouvertures numériques sont plus indiquées. Campana (1992) donne un tableau inté-

ressant qui illustre les limites des caractéristiques des principaux types d'objectif : l'ouverture numérique de l'objectif contrôle finalement à la fois le grossissement et la résolution obtenus, et cette dernière augmente lorsque l'ouverture diminue. Cependant, la limite de résolution réelle d'un microscope photonique parfaitement au point est inférieure à la limite théorique (autour de $0,3 \mu\text{m}$) et empêche souvent, de ce fait, l'observation des plus petites structures, i.e. les micro-accroissements des otolithes inférieurs à $1 \mu\text{m}$ (Campana, 1987 ; Morales-Nin, 1988; Campana, 1992). Dans ce cas, l'utilisation du MEB devient obligatoire. Les possibilités de grossissement sont limitées par le matériel disponible. L'objectif maximal qui peut être utilisé est normalement $100\times$ (avec ou sans huile d'immersion) et, avec une bonne combinaison d'oculaires et de bagues intermédiaires, le grossissement maximal utile atteint $1000\times$ - $1250\times$ (Campana, 1992).

1.2.2. Objectifs à immersion vs objectifs à sec

Les objectifs de faible puissance sont des objectifs à sec (jusqu'à $60\times$) tandis que les objectifs à immersion sont utilisés pour les forts grossissements. En biologie, la plupart des utilisateurs pensent que le grossissement maximal peut être seulement obtenu avec un objectif à immersion de $100\times$. Cependant, il existe des objectifs à sec $100\times$ qui sont utilisés en géologie et qui sont donc particulièrement appropriés pour les études de sclérochronologie. L'un de leurs principaux avantages est de pouvoir préserver l'état original de la préparation de la PC (e.g. lames minces) car il n'est pas nécessaire de la nettoyer à la suite de l'observation. Lorsque l'on utilise des objectifs à immersion et de l'huile d'immersion, la préparation doit ensuite être nettoyée avec une solution d'éther-alcool (50:50). Nous recommandons donc dans l'absolu l'utilisation d'objectifs à sec, quel que soit le type de grossissement employé.

1.2.3. Éclairage

Une source d'éclairage optimisée a une influence très importante sur la qualité de l'image visualisée (Campana, 1992), quels que soient les oculaires et les objectifs employés. Toutes les étapes de mise au point de l'éclairage en microscopie photonique sont identiques à chaque fois : elles incluent le centrage de la source lumineuse, la focalisation de la lumière sur le plan d'observation avec le condensateur, et l'ajustement des diaphragmes de champ et d'ouverture. Un diaphragme d'ouverture ajusté correctement va augmenter les contrastes, la profondeur de champ et la résolution. Tous ces paramètres doivent être vérifiés au début de l'examen d'une série d'échantillons, mais les mêmes paramètres doivent être utilisés entre les différentes séries d'échantillons dans le but de standardiser le processus.

1.2.3.1. Filtres

Les lentilles achromatiques tendent à améliorer la qualité des images lorsque le diaphragme d'ouverture est fermé et lorsqu'une lumière monochromatique est utilisée. Le changement de la qualité d'une image peut être attribué au fait que les lentilles ne sont pas totalement corrigées pour toutes les longueurs d'onde de la lumière artificielle ou pour la totalité du champ de vision. La lumière verte est la plus fréquemment utilisée. Un filtre de couleur faisant écran à la source de lumière peut augmenter la limite de résolution de 15 à 20 % (Campana, 1992). Les filtres de polarisation améliorent l'observation des marques de croissance et sont aussi recommandés (chap. VIII.D.1.3).

1.2.3.2. Microscopie confocale

La microscopie confocale, également appelée microscopie laser à balayage (MLB), permet l'observation de sections confocales (simple plan focal d'épaisseur avoisinant 0,5 μm) dans les couches internes d'échantillons épais. Cette technique est utilisée pour examiner la morphologie des PC, principalement des otolithes, et les microcroissements chez les larves et les juvéniles, dans le but d'évaluer la croissance et le choix d'un plan de coupe (Lagardère *et al.*, 1995). Comparée à la microscopie photonique conventionnelle, les avantages de la MLB incluent simultanément les mesures en 3D et l'augmentation du contraste et du niveau de résolution pour certaines applications. La MLB peut opérer en mode d'épi-illumination (confocale) et en mode de transmission. Les observations faites en mode épi-illuminé dépendent de l'autofluorescence de l'otolithe. Cette technique peut aussi être utilisée pour détecter les marques de fluorescence sous la surface d'un otolithe. Cette technique confocale ne peut cependant pas permettre de délimiter le dépôt des marques de croissance dans les otolithes car elle dépend de la fluorescence des spécimens étudiés. L'examen des microcroissements des otolithes en MLB nécessite l'utilisation d'un mode transmis.

1.2.3.3. Lumière transmise vs lumière réfléchie

En microscopie photonique, il existe deux possibilités d'éclairage : la plus fréquemment utilisée est la lumière transmise, qui permet une observation à travers une faible profondeur de champ, et la moins utilisée est la lumière réfléchie (également appelée épi-réfléchie), qui ne permet que l'observation de surface. Ce dernier type d'éclairage a été développé à l'origine pour les études de géologie et nécessite un équipement spécial sur un microscope standard. Ceci permet au faisceau de lumière de passer à travers les lentilles des objectifs, de se réfléchir sur la surface et de retraverser les lentilles pour générer une image. Cette technique est particulièrement utile pour observer les surfaces après des préparations spéciales, comme le ponçage et/ou le polissage, de façon à contrôler leur qualité. Une application possible est le contrôle

de l'attaque acide des surfaces des PC avant un passage au MEB. Néanmoins, le contrôle de cette attaque acide peut être fait directement sous le microscope (chap. VIII.C.2.6). Il est également possible de combiner les deux sources de lumière, transmise et réfléchie, lorsque cela est nécessaire.

1.3. Lumière polarisée

La lumière polarisée est obtenue au moyen de deux filtres de polarisation et de lumière transmise. Le premier filtre (le polariseur) est placé entre la source de lumière et la préparation, et le deuxième (l'analyseur) entre la préparation et les oculaires. La position relative de ces deux filtres peut être ajustée et offre la possibilité de détecter les différents états de polarisation de la lumière à travers la PC préparée. Ceci peut révéler certaines structures qui ne sont pas visibles sous une lumière normale. Les otolithes ou les os ont eux-mêmes des propriétés de polarisation. Les otolithes sont réfringents à la lumière polarisée et cette caractéristique permet de les visualiser même chez les très petits individus, comme les larves de quelques millimètres de longueur (chap. VIII.B.3.2). La lumière polarisée est nécessaire pour observer certaines marques de croissance des otolithes, et particulièrement les microstructures situées près du bord (Mosegaard *et al.*, 1998). Pour l'examen structural des os, la lumière polarisée est utile pour révéler l'orientation des fibres de collagène, par exemple : la matrice osseuse à fibres enchevêtrées ou la matrice osseuse à fibres parallèles ou, encore, l'os lamellaire (Francillon-Vieillot *et al.*, 1990) (chap. II.C.1.1.2).

1.4. Lumière ultraviolette

La lumière ultraviolette (UV) est seulement utilisée pour révéler les marques de fluorescences incorporées dans les PC (chap. IV.A.1.2.1). L'équipement nécessaire à la production de lumière UV est en général spécialement adapté pour les microscopes photoniques, ce qui malheureusement limite son utilisation à l'observation de petites préparations. Le chemin emprunté par le faisceau de lumière est le même que celui de la lumière réfléchie (chap. VIII.D.1.2.3.3), arrivant par le dessus et passant à travers l'objectif. Le nom de « lumière épifluorescente » est aussi donné à ce type d'éclairage. L'utilisateur doit vérifier la compatibilité de la source d'UV et des objectifs du microscope. En fonction de la substance fluorescente révélée, des filtres spécifiques peuvent être nécessaires. Le tableau IV.A.1 résume les caractéristiques des marqueurs fluorescents, leurs longueurs d'onde d'excitation et de fluorescence, leur lumière d'excitation et les filtres requis. Dans le but de visualiser à la fois les marques de fluorescence et les marques de croissance des PC, il est possible d'utiliser simultanément l'épifluorescence et la lumière transmise (fig. IV.A.2).

2. Microscopie électronique

Comme son nom l'indique, la microscopie électronique utilise les électrons à la place des photons de la microscopie photonique et offre ainsi la possibilité de grossissements et de résolutions nettement plus élevés. Deux principaux types de microscope sont disponibles : le microscope électronique à balayage (MEB) et le microscope électronique à transmission (MET). La plupart des études de sclérochronologie utilisent seulement le MEB. Pour cette raison, nous ne décrivons ici que l'utilisation et les diverses recommandations pour le MEB, et le lecteur pourra se référer aux nombreux ouvrages et articles spécialisés décrivant l'utilisation du MET en cas de nécessité. Le MEB se situe à une position intermédiaire entre le microscope photonique et le MET en termes de résolution et d'information sur l'image observée. Son utilisation peut également être rapprochée de la microscopie épi-réfléchie (chap. VIII.D.1.2.3.3).

2.1. MEB

Le MEB est un outil d'observation de la topographie de surface, très répandu dans les études sur les otolithes. Ce type d'instrument offre la possibilité d'augmenter la profondeur de champ d'au moins 300 fois par rapport au meilleur microscope photonique, comme le montre la plupart des superbes images 3D qu'il fournit. De plus, les interactions entre le faisceau d'électrons et les échantillons sous le MEB peuvent donner des informations utiles sur la composition chimique de leur surface, tout comme sur leurs caractéristiques cristallographiques, magnétiques et électriques. Pour les analyses microchimiques, le MEB est couplé à une microsonde électronique à énergie dispersive (chap. VII.G.1).

2.1.1. Caractéristiques du MEB

Le faisceau d'électrons utilisé pour bombarder l'échantillon analysé est accéléré avec un voltage de 1 à 30 kilovolts. Les interactions entre ce faisceau et l'échantillon créent des micro-courants qui sont utilisés pour générer une image qui peut donner trois types de résultat :

- certains électrons primaires, dépendant du voltage d'accélération employé, pénètrent dans un corps solide jusqu'à une profondeur de 10 micromètres. Leur trajectoire varie et ils perdent d'autant plus d'énergie qu'ils pénètrent profondément dans l'échantillon ;
- certains électrons primaires interagissent avec les atomes des couches les plus superficielles et il existe un échange momentané (mais pas un échange d'énergie) provoquant une rétrodiffusion des électrons avec un angle très large ; ces derniers sont ensuite effectivement réfléchis à la surface de l'échantillon. Ces électrons primaires réfléchis de façon élastique sont encore appelés « électrons rétrodiffusés » ;
- certains électrons primaires interagissent avec les atomes hôtes et le résultat de ces collisions entraîne l'apparition « d'électrons secondaires » qui naissent au fur et à mesure de la pénétration du faisceau.

Certains de ces électrons qui sont situés dans les couches les plus superficielles diffusent sur la surface de l'échantillon et perdent graduellement de l'énergie au cours de ce processus. Cependant, ils peuvent s'échapper s'ils accumulent assez d'énergie : ce processus est connu comme une « émission d'électrons secondaires » ;

- les interactions faisceau-échantillon, tout en produisant des électrons rétrodiffusés et secondaires, produisent aussi des protons, des courants dans l'échantillon, les électrons Auger et des rayons X, qui sont caractéristiques de l'échantillon traversé. Si, en principe, tout signal généré est susceptible de pouvoir fournir une image, dans la pratique ce sont les électrons secondaires peu énergétiques, émis par l'échantillon, qui sont le plus fréquemment utilisés pour produire une image. En utilisant les électrons émis en surface plutôt que ceux qui passent à travers l'échantillon comme en MET, on obtient des images de surface avec une qualité tridimensionnelle.

L'impression de visualiser une surface 3D sur l'image est le résultat de la distribution de zones de lumières sombres et claires. Cette distribution est principalement due au fait que le faisceau incident génère plus d'électrons secondaires récupérables par unité de surface lorsqu'il touche des bords abrupts ou des surfaces inclinées que lorsqu'il frappe une surface plane. Les échantillons biologiques, dont les bords sont bien dessinés, facilitent l'induction de tels effets différentiels. Lorsque la surface est lisse, l'inclinaison de l'échantillon par rapport à la sonde augmentera le contraste et le nombre d'électrons secondaires collectés. Des effets plus subtils interviennent également dans ce processus en fonction de la manière dont une structure déposée sur une surface primaire va dévier ou absorber le faisceau d'électrons. Dans tous les cas, les « ombres » visualisées sont une représentation réelle de l'image 3D de la surface de l'échantillon étudié.

En fonction du potentiel d'accélération utilisé, qui se situe en général autour de 15 kV pour l'observation des otolithes, le rapport entre les électrons secondaires peu énergétiques et les électrons rétrodiffusés très énergétiques variera. Des voltages plus élevés, même s'ils pénètrent encore plus en profondeur la surface des échantillons, produisent des charges électroniques à cause de la faible conductivité de l'aragonite.

2.1.2. Préparation des échantillons

Les techniques de préparation qui sont mises en œuvre pour le MEB dépendent des objectifs de l'étude : (1) observation ultrastructurale ou (2) morphologie.

Par exemple, pour révéler la structure interne d'un otolithe, il est nécessaire de le couper le long d'un plan de coupe principal (chap.VIII.C.2.3). À cause du faible pouvoir de pénétration du MEB, le niveau de section doit être fait précisément dans la zone de l'otolithe choisie. Lorsque ce plan a été atteint et vérifié, la surface doit être polie (chap. VIII.C.2.5). Une lumière réfléchie montrant la surface de l'échantillon permet de vérifier la qualité de la préparation durant

cette étape (chap. VIII.D.1.1.4.2). Dans le but d'éliminer tout matériel étranger accroché à l'otolithe, la préparation doit être ensuite nettoyée dans un bain à ultrasons dans de l'eau déionisée pendant 15 à 30 secondes. Après nettoyage, la coupe doit être attaquée pour révéler son ultrastructure. Les agents chimiques les plus fréquemment utilisés pour une attaque acide sont le HCl dilué (2 %, pH 2,0-5,0) et l'EDTA (pH= 7,2-7,6) (chap. VIII.C.2.6). Le temps d'attaque (1 à 10 min) dépend de l'espèce étudiée ainsi que de la température de la pièce. Des essais préalables doivent donc être réalisés pour déterminer le temps requis pour obtenir de bons résultats (chap. VIII.C.2.6).

Pour les études de morphologie, la PC entière est observée et seul un nettoyage préalable est nécessaire avant les prochaines étapes de préparation pour le MEB.

Les échantillons doivent être ensuite séchés à 30 °C pendant 6 à 8 heures et laissés à l'abri de la poussière. Ils sont alors attachés à des plots porte-objet, spéciaux pour le MEB, avec de la peinture au carborundum, de la colle thermofusible ou du ruban adhésif double-face. Un pont de colle argentée doit être déposé entre la surface de la préparation et le plot métallique pour éviter la création de charges électrostatiques à la surface de la préparation pendant l'observation. La surface de la section est alors métallisée avec de l'or (100 angströms pour une observation topographique) ou du carbone (10-50 angströms pour une analyse microchimique) avant l'observation finale au MEB.

3. Microradiographie (F.J. Meunier)

Dans certains cas, la meilleure technique pour visualiser les marques de croissance des os est la microradiographie de sections polies (fig. VIII.D.2) (Cailliet *et al.*, 1983 ; Casselman, 1983 ; Gruber & Stout, 1983 ; Yudin & Cailliet, 1990 ; Boujard & Meunier, 1991 ; Francis & Mulligan, 1998). Le principe de cette technique est le même que celui utilisé pour la radiographie médicale, mais nécessite bien sûr un appareil adapté à l'observation de petits objets calcifiés, comme par exemple les coupes poncées (Boivin & Baud, 1984, *inter alia*). Les coupes (chap. VIII.C.2.3.1) sont délicatement déposées sur des films radiographiques à haute résolution (Kodak SO643 ou équivalent) (fig. VIII.D.2a) puis exposées alors dans un générateur à rayons X qui produit des rayons de 10-30 kV à 10-15 milliampères, en fonction des différents réglages. Les films sont développés avec un révélateur spécial pour films de type HRP, lavés et fixés. Ils sont alors observés directement avec une loupe binoculaire ou un microscope après un simple montage entre deux lames de microscopie (fig. VIII.D.2b).

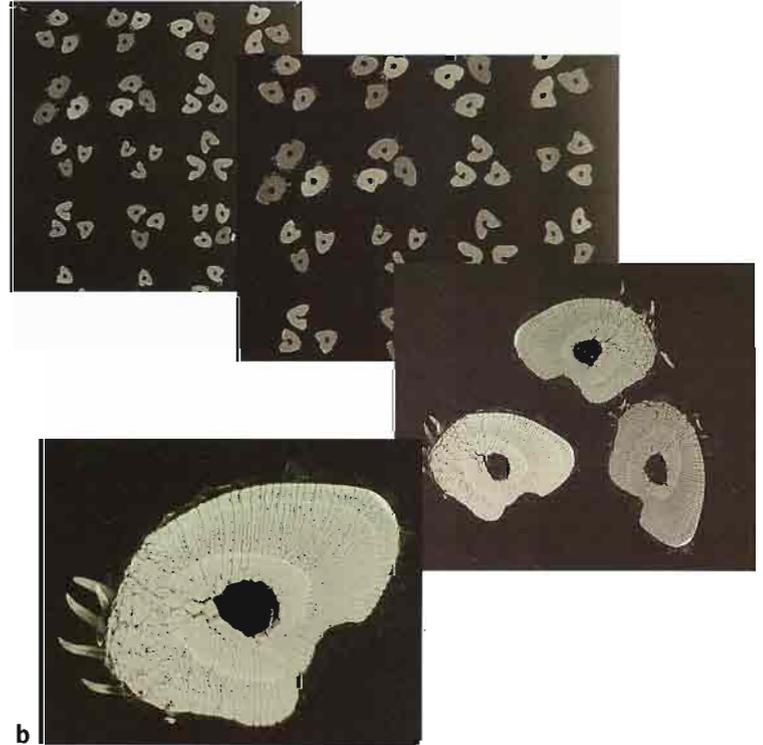
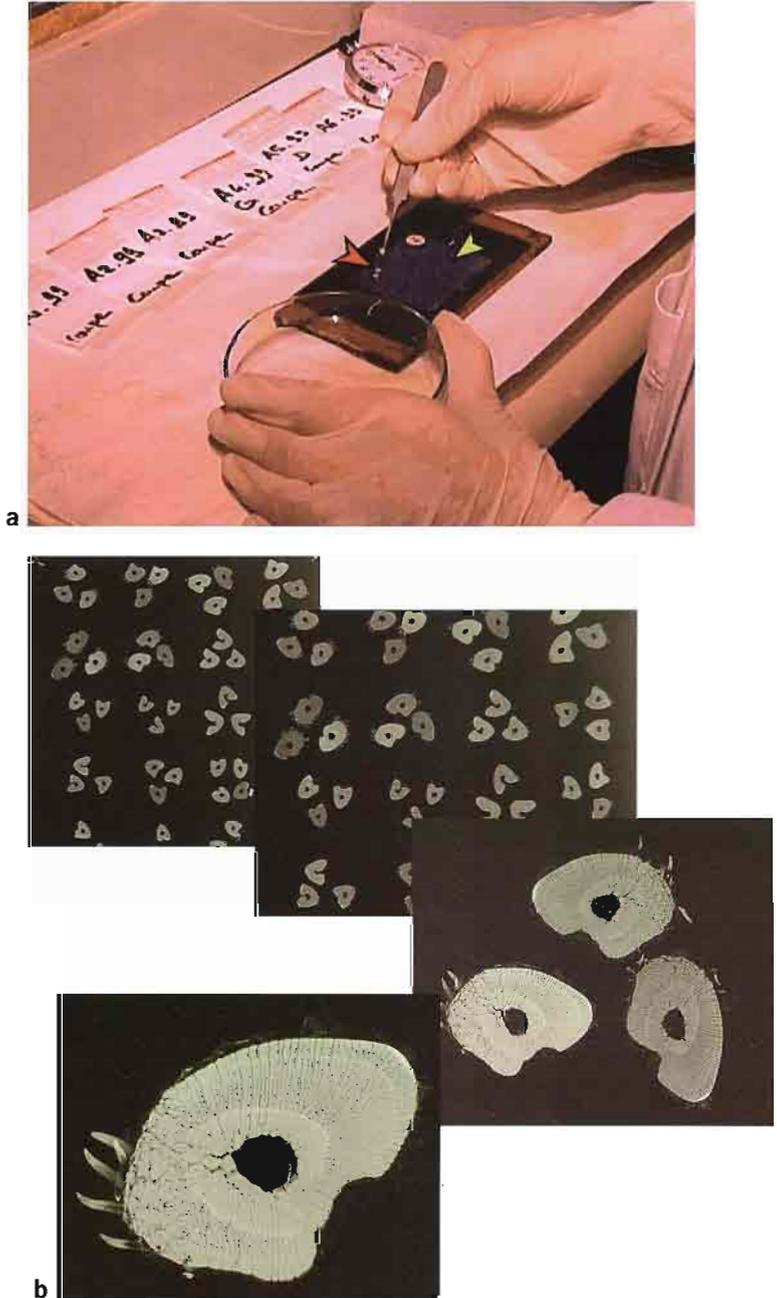


Figure VIII.D.2 - Microradiographie de coupes de rayons de nageoire (*Hoplosternum littorale*).
 a) Dans une chambre noire, les coupes de rayons de nageoire (flèche rouge) sont déposées sur un film photographique (flèche jaune) avant d'être soumises aux rayons X. b) Résultat de la microradiographie à différents grossissements (photos © Ifremer O. Dugornay).

E. Conservation des préparations

W.J. McCurdy

1. Conservation des préparations de pièces calcifiées

Un lieu de stockage frais et à l'obscurité est certainement le meilleur endroit pour conserver la plupart des préparations de PC. La méthode de conservation sélectionnée devra protéger les PC d'une détérioration ultérieure mais aussi d'une perte ou de dommages mécaniques. Toutes les PC conservées doivent être référencées de façon appropriée et une copie de ces références doit être mise à l'abri dans un endroit sûr. Le tableau VIII.E liste les principales méthodes de conservation pour les préparations de pièces calcifiées.

Tableau VIII.E - Méthodes de conservation pour différentes préparations de pièces calcifiées.

Préparation de PC	Conservation	Récipients de stockage
Écailles non montées	À sec	Microtubes, enveloppes de papier ou sachets en plastique
Écailles montées sur des lames de microscopie	À sec	Boîtes de lames de microscopie ou autres boîtes
Impressions d'écailles sur acétate de cellulose	À sec	Boîtes de stockage
Petits otolithes non montés	1. À sec 2. $\geq 95\%$ alcool	1. Microtubes ou lames en plastique 2. Microtubes
Grands otolithes non montés (entiers et cassés)	À sec	Récipients isolés ou enveloppes de papier
Otolithes de larves directement enrobés	Milieu de montage	Boîtes de lames de microscopie et autres boîtes de stockage
Lames de plastique avec nombreux otolithes	Milieu de montage	Boîtes de lames spécialement adaptées et autres boîtes de stockage
Lames minces d'otolithes montés	Milieu de montage	Boîtes de lames de microscopie et autres boîtes de stockage
Plusieurs lames minces d'otolithes montés sur des lames de microscopie	Milieu de montage	Boîtes de lames spécialement adaptées et autres boîtes de stockage
Pièces du squelette entières	À sec à l'abri des insectes et des champignons	Enveloppes de papier, conteneurs individuels ou subdivisés
Lames minces de pièces du squelette montées	Milieu de montage	Boîtes de lames de microscopie et autres boîtes de stockage
Pièces du squelette préparées pour une section	Milieu d'enrobage	Conteneurs individuels ou subdivisés

2. Écailles

2.1. Écailles non montées

Les écailles sont habituellement conservées à sec (chap. VIII.B.2). Des enveloppes en papier pré-imprimées et des pochettes en plastique spéciales sont souvent utilisées lorsque de grands nombres d'écailles doivent être stockés, e.g. pour le saumon de l'Atlantique nord, *Salmo salar*, et pour d'autres espèces de Salmonidés. Les enveloppes et sachets

contenant les écailles doivent être rangés dans des boîtes rigides référencées pour éviter le risque de perte ou de détérioration. Des microtubes référencés peuvent être également utilisés pour conserver à la fois les écailles et les otolithes. Ces microtubes peuvent être stockés sur des supports spéciaux (chap. VIII.B.3.3.2).

2.2. Écailles montées et impressions d'écailles

Les méthodes de préparation pour le montage des écailles sur des lames de microscopie et les empreintes d'acétate de cellulose sont décrites dans le chapitre VIII.C.1.2 et le chapitre VIII.C.1.3. Les lames de microscopie peuvent être conservées dans des boîtes de lames spécialement destinées à cet effet et les impressions sur acétate dans des boîtes adaptées, dans un endroit frais.

3. Otolithes

3.1. Collections d'otolithes

Les otolithes sont souvent prélevés par paire, même si un seul otolithe est utile pour les analyses. Ceci est fait pour de multiples raisons mais c'est presque toujours une pratique routinière lorsque l'on échantillonne les *sagittae* chez les poissons adultes. Parfois, un seul otolithe est systématiquement utilisé pour les analyses (par exemple, pour certains poissons plats comme la plie, *Pleuronectes platessa*) mais souvent l'otolithe est sélectionné au hasard. Dans tous les cas, l'otolithe non utilisé doit être préservé car il peut être utile pour d'autres informations sclérochronologiques. Le manque d'otolithes pour les individus les plus âgés dans certains biotopes et les avancées dans le domaine de la microchimie des otolithes ont souligné l'importance du stockage de ces otolithes. Les collections d'otolithes existantes ont encore besoin d'être évaluées, cataloguées et conservées, avec les références correspondant aux otolithes et à l'histoire de vie des poissons qui les possédaient, et elles devraient aussi être plus accessibles à l'ensemble de la communauté scientifique.

3.2. Otolithes entiers et cassés

De nombreux otolithes ont une forme concavo-convexe et les otolithes les plus petits sont fins et fragiles. S'ils sont stockés dans des enveloppes en papier, comme il avait pu être recommandé auparavant (Williams & Bedford, 1974), il existe un risque important pour qu'ils soient endommagés chaque fois qu'ils seront manipulés. Les otolithes non montés peuvent être stockés dans des microtubes référencés (chap. VIII.B.3.3.2) ou dans des portoirs ou des cuvettes avec capuchon. Quelques auteurs recommandent une conservation dans de l'alcool >95 %, ce qui peut être utile pour les otolithes petits et fragiles (chap. VIII.B.3.3.2). Les grands otolithes de Gadidés sont fréquemment conservés dans des plaques de stockage avec des puits, qui sont des plaques en plastique transparent (avec par exemple 25 puits de 2 cm) possédant un couvercle qui est fixé grâce à du ruban adhésif.

Lorsque de l'eau ou de l'alcool a été utilisé comme liquide éclaircissant pour l'observation, les otolithes, qu'ils soient entiers ou cassés, sont essuyés avec un tissu papier sec assez souple et sont conservés à nouveau dans leur emballage d'origine (chap. VIII.B.3.3.2). Si des huiles essentielles (chap. VIII.D.1.1.2) ont été utilisées pour améliorer la qualité de l'observation, elles doivent également être essuyées avant de remettre les otolithes dans leur récipient de stockage. Les otolithes des petits pélagiques (par exemple ceux du sprat, *Sprattus sprattus*) sont souvent stockés et observés sur des lames de plastique spécialement moulées et contenant des cupules. Chaque fois qu'un produit, comme l'eau ou l'alcool, est utilisé pour observer ce genre d'otolithes, il doit être laissé à évaporer avant de repositionner le verre ou le plastique de protection couvrant l'ensemble. Les lames sont alors conservées dans des boîtes spécialement adaptées.

3.3. Otolithes enrobés et en lames minces

Les otolithes individuels, par exemple ceux des larves, peuvent être conservés directement dans un produit de montage (chap. VIII.C.2.4.2). Les otolithes, entiers ou en lames minces, montés sur des lames de microscopie ou sur des plaques de plastique contenant plusieurs paires d'otolithes (chap. VIII.C.2.2.3), peuvent être stockés sur des plateaux en plastique ou en métal. Ces derniers doivent être conservés dans des récipients adaptés les protégeant. Il est très important de standardiser le plus possible ces processus. Les lamelles couvre-objet recouvrant les préparations peuvent se briser facilement si la quantité de produit de montage n'est pas suffisante. Un excès de ce genre de produit peut également conduire au collage des préparations pendant le stockage. Nous recommandons l'emploi de lamelles couvre-objet spécialement découpées et ayant une épaisseur de 0,5 mm lorsque l'on utilise de la résine polyester comme produit enrobant de nombreux otolithes (chap. VIII.C.2.3.2, chap. VIII.C.2.4.3). Des lamelles plus fines peuvent se craqueler ou se briser pendant la manipulation et l'observation.

4. Autres éléments du squelette

La conservation est très simple et se fait généralement à sec. Les os sont mieux conservés en les replaçant dans leurs enveloppes d'origine. Des précautions doivent être prises pour éviter le développement de champignons ou les attaques par des insectes spécialisés (chap. VIII.B.4.2). Pour les échantillons les plus fragiles, l'éthanol entre 70 et 90 % peut être utilisé comme fixateur-conservateur (Meunier, 1988), (chap. VIII.B.4.2). Si l'alcool est utilisé, le matériel calcifié doit être conservé dans des récipients référencés spécifiques. Les coupes de tissus montées sur des lames de microscopie peuvent être stockées dans des boîtes de rangement de lames adaptées. Les échantillons les plus gros et le matériel inclus pour une section ultérieure doivent être conservés individuellement dans des récipients adaptés.

Glossaire

J. Panfili, F.J. Meunier, H. Mosegaard, H. Troadec,
P.J. Wright, A.J. Geffen

D'après Francillon-Vieillot *et al.*, 1990; Kalish *et al.*, 1995.

Légende : (O), terminologie réservée pour les otolithes; (E), terminologie réservée pour les écailles; (Sq), terminologie réservée pour le squelette.

Accroissement : référence à une région de structure similaire utilisée pour l'estimation de l'âge. Le terme se rapporte à une structure mais il peut également être utilisé pour décrire une portion de la pièce calcifiée formée pendant un intervalle de temps donné (e.g. accroissement sub-journalier, journalier, annuel). En fonction de la région de la pièce calcifiée considérée, les dimensions, la chimie et la période de formation de l'accroissement peuvent varier considérablement. Un « accroissement primaire » correspond à la succession d'une zone-D et d'une zone-L tandis qu'un « accroissement annuel » correspond à la succession d'une zone opaque et d'une zone translucide. Il peut également apparaître d'autres structures, telles que les accroissements sub-journaliers ou les marques doubles, au sein des accroissements annuels.

Accroissement journalier (O) : marque de croissance formée sur une période de 24 heures. Généralement, l'accroissement journalier est formé d'une zone-D et d'une zone-L. Le terme est synonyme de « micro-accroissement journalier », « microstructure journalière » ou parfois de « anneau quotidien ». Ce dernier terme est cependant à éviter et le terme « accroissement journalier » est préféré. Voir Accroissement et la figure II.A.5.

Accroissement marginal : région située au-delà de la dernière marque identifiable sur le bord de la pièce calcifiée utilisée pour l'estimation de l'âge. Quantitativement, cet accroissement est généralement exprimé en valeur relative, comme une fraction ou une proportion du dernier accroissement complet qui le précède (annuel ou journalier).

Accroissement sub-journalier (O) : accroissement formé pendant une période inférieure à 24 heures. Voir Accroissement.

Anneau : voir Zone.

Anneau coloré (ou ligne colorée) : anneau ou zone chromophile ou colorable par des colorants histologiques et avec une intensité variable.

Annulus (pl. annuli) : série de structures concentriques sur une pièce calcifiée formant une marque pouvant être interprétée en termes d'âge. Dans certain cas, un *annulus* peut ne pas être continu ou nécessairement concentrique. L'apparence optique de cette marque dépend de la pièce calcifiée étudiée et de l'espèce à laquelle elle appartient. L'*annulus* doit être précisément décrit pour le caractériser. Ce terme a classiquement été utilisé pour désigner des marques annuelles même s'il dérive du nom latin « *anus* », qui signifie « anneau », et non de « *annus* » qui signifie « année ». Pour les otolithes, les variations micro-structurales qui conduisent à caractériser l'*annulus* comme une zone

différente des autres ne sont pas encore très bien comprises. Voir les figures II.A.9, II.A.10 et II.C.9.

Anterostrum (O) : voir *Antirostrum*.

Antirostrum (O) : excroissance dorsale et antérieure de la *sagitta*. Généralement plus courte que le *rostrum*. Voir la figure II.A.4.

Asteriscus (pl. asterisci) (O) : une des trois paires d'otolithes trouvée dans le labyrinthe membraneux des poissons Ostéichthyens. Il est contenu dans la *lagna* (chambre) de la *pars inferior*. Chez les non-Ostariophyses, l'*asteriscus* est petit, en forme d'hémisphère aplati ou de quart de lune. Chez les Ostariophyses, l'*asteriscus* est grossièrement circulaire et comprimé latéralement et il est considérablement plus gros que la *sagitta*. Voir la figure II.A.1.

Axe de mesure : ligne le long de laquelle les marques de croissance sont dénombrées et mesurées.

Bande : voir *Zone*.

Calcification : processus de dépôt des cristaux de carbonate de calcium dans les otolithes et des cristaux de phosphate de calcium dans l'os et les écailles.

Canaliculus (pl. canaliculi) (Sq) : espace étroit dans le tissu osseux incluant les extensions cytoplasmiques des ostéocytes et des ostéoblastes. Voir la figure II.C.2.

Cavité médullaire (Sq) : la première cavité vasculaire en position médiane dans les os longs, par exemple pour les épines des poissons-chats. Voir la figure II.C.6.

Centre de croissance accessoire (O) : centre de croissance formé à l'extérieur du noyau de l'otolithe qui conduit à de nouveaux plans de croissance et à partir duquel de nouvelles séries d'accroissements apparaissent. La formation de cette structure est souvent liée à des périodes de transition dans le cycle de vie, comme par exemple une métamorphose. Les centres de croissance accessoires sont souvent nommés « *primordia* accessoires » mais le terme « centre de croissance accessoire » doit être préféré car leur structure est différente de celle des *primordia* (e.g. ils ne contiennent pas de granules primordiaux). Le terme « centre de croissance secondaire » est aussi utilisé. Voir la figure II.A.8.

Champ : région d'une pièce calcifiée, définie sur une face ou une section, délimitée par au moins le centre de la pièce et l'un de ses bords (e.g. les champs antérieur, postérieur, dorsal, ventral). Le champ est nommé parfois « région ».

Circulus (*pl. circuli*) (*E*) : crête concentrique sur la face externe des écailles élasmoïdes, causée par une élévation de la couche superficielle de l'écaille.

Classe journalière : cohorte d'individus pondue ou éclos à une date donnée (e.g. la classe du 22 septembre 1990). La référence à la ponte ou à l'éclosion doit être spécifiée.

Cohorte : groupe d'individus d'âge identique qui sont nés après la même période de frai. Terme utilisé avec d'autres termes réservés comme « groupe d'âge » et « classe d'âge ».

Corps vertébral (*Sq*) : partie centrale cylindrique de la vertèbre.

Corroboration : mesure de la cohérence ou de la répétabilité d'une méthode d'estimation d'âge. Par exemple, si deux lecteurs différents sont d'accord sur le nombre de marques présentes sur une pièce calcifiée ou si deux pièces calcifiées interprétées conduisent au même nombre de marques, la corroboration (mais non validation) est réalisée. Le terme « vérification » a été utilisé dans un sens similaire mais celui de « corroboration » lui est préféré car la vérification implique que les âges estimés aient été confirmés comme exacts.

Ctenius (*pl. ctenii*) (*E*) : excroissance (épine) sur la face externe des écailles cténoïdes, la plupart du temps déposée dans le champ postérieur et, plus particulièrement, sur le bord postérieur. Voir la figure II.B.2.

Date d'éclosion (*O*) : date à laquelle le poisson a éclos, estimée classiquement en comptant les micro-accroissements journaliers depuis la marque d'éclosion typique (voir Discontinuité) jusqu'au bord de l'otolithe.

Discontinuité (*O*) : discontinuité structurale (e.g. une marque induite par un stress) qui apparaît au sein d'une zone donnée de l'otolithe, opaque et/ou translucide, ou au sein des microstructures. Les discontinuités microstructurales (e.g. marque d'éclosion) apparaissent souvent comme des microstructures très contrastées avec une zone-D marquée et profonde créant une rupture franche dans l'arrangement des microstructures. Si le terme est utilisé, il demande une définition très précise. Le terme réservé en anglais est « check ». Voir la figure II.A.11.

Double zone (ou marque ou anneau) : deux zones ou anneaux qui sont relativement proches par rapport à la taille de la pièce calcifiée considérée et à la distance entre deux *annuli*, et qui sont considérés comme un seul *annulus*. Une telle double marque inclut souvent une marque secondaire et un *annulus*.

Écaille macrocentrique (ou écaille régénérée) (*E*) : voir Écaille régénérée.

Écaille microcentrique (E) : écaille présente depuis le début de la vie de l'individu et n'ayant jamais été résorbée.

Écaille régénérée (ou écaille macrocentrique) (E) : écaille rapidement formée après la perte de l'écaille originelle (microcentrique) et dont le centre est plus ou moins dépourvu d'ornementations.

Estimation d'âge : expression utilisée lorsque l'on évoque le processus d'assignation d'un âge à un poisson. Le terme « âgeage » (anglicisme) doit être évité. Le terme « estimation de l'âge » doit être préféré à « détermination de l'âge » car il existe toujours des incertitudes sur les valeurs d'âge données.

Exactitude : proximité d'une estimation quantitative (valeur mesurée ou calculée) par rapport à sa vraie valeur.

Excisura major (O) : fente séparant le *rostrum* et l'*antirostrum*.

Excisura minor (O) : fente séparant le *postrostrum* et le *parastrostrum*.

Focus (pl. foci) (E) : centre d'origine et partie plus ou moins centrale d'une écaille.

Granule primordial (O) : composant primaire ou initial du *primordium*. Il peut exister un ou plusieurs granules primordiaux dans chaque *primordium*. Dans la *sagitta*, les granules peuvent être composés de vaterite alors que le reste du *primordium* est composé d'aragonite typique.

Groupe d'âge : cohorte des poissons d'un âge donné (e.g. le groupe d'âge 5 ans). Ce terme n'est pas synonyme de classe d'âge.

Initium (Sq) : centre d'origine de la croissance des rayons de nageoire.

Interruption de croissance microstructurale (O) : discontinuité dans la croissance cristalline marquée par le dépôt d'une zone organique. Elle peut être localisée ou correspondre à une structure concentrique complète. Voir Discontinuité.

Lapillus (pl. lapilli) (O) : une des trois paires d'otolithes trouvées dans le labyrinthe membraneux des poissons Ostéichthyens. Le plus dorsal parmi les otolithes, il est contenu dans l'*utricle* (chambre) de la *pars superior*. Chez la plupart des poissons, cet otolithe a la forme d'une sphère aplatie et il est plus petit que la *sagitta*. Voir la figure II.A.1.

Lecture, lecteur : terme spécial du jargon des sclérochronologistes. La lecture d'une pièce calcifiée consiste à interpréter ses marques de croissance. Le lecteur est une personne qui tente d'interpréter les marques enregistrées dans une pièce calcifiée donnée.

Ligne cimentante (Sq) : une ligne cimentante se présente sous la forme d'une fine ligne chromophile avec un degré de minéralisation plus

élevé que le tissu osseux environnant. Il existe deux sortes de lignes cimentantes : les lignes de résorption (= lignes de réversion) et les lignes d'arrêt de croissance (LAC).

Ligne cimentante de résorption (Sq) : les lignes de résorption (lignes de réversion) apparaissent sur les surfaces résorbées irrégulières et sont donc discordantes par rapport à la trame osseuse. La ligne de résorption sépare l'os secondaire de l'os primaire. Voir la figure II.C.4.

Ligne d'arrêt de croissance (ou LAC) (Sq) : les lignes d'arrêt de croissance apparaissent sur les surfaces non résorbées et sont donc concordantes avec les dépôts osseux successifs. La ligne d'arrêt de croissance est une discontinuité à l'intérieur du tissu osseux qui correspond à une interruption de croissance totale mais temporaire. Voir la figure II.C.9.

Lobes (O) : protubérances mineures et arrondies de la *sagitta* le long des bords dorsal et ventral.

Macro-accroissement (ou macrostructure) : accroissement qui possède une largeur de plus de 50 micromètres. Le préfixe « macro » sert à indiquer que la structure en question est relativement grande et qu'elle peut être observée sous la loupe binoculaire. Terme souvent utilisé pour décrire des accroissements saisonniers. Voir Accroissement.

Marque : expression générale désignant un ensemble de structures histomorphologiques semblables ou ayant une densité optique comparable, et formées dans les tissus durs en cours de croissance. Voir Zone.

Marque de croissance (ou anneau ou zone) : voir Marque ou Zone.

Micro-accroissement (ou microstructure) (O) : accroissement de moins de 50 µm de largeur, plus généralement compris entre un et 20 micromètres. Le préfixe « micro » indique que la structure considérée est d'une taille relativement réduite et qu'elle ne peut être observée qu'avec l'aide de la microscopie photonique et/ou électronique. Terme souvent utilisé pour décrire les marques de croissance sub-journalières et journalières des otolithes. Voir Accroissement.

Minéralisation : processus biologique de dépôt des cristaux ou de matériel minéral amorphe dans ou sur une matrice organique.

Noyau (O) : zone ou zones entourant un ou plusieurs *primordia* et délimitée(s) par la première zone-D nette. Voir la figure II.A.5. Certains poissons (e.g. Salmonidés) possèdent de multiples *primordia* et de multiples noyaux.

Nucleus, Kernel (O) : termes collectifs utilisés à l'origine pour indiquer les *primordia* et le noyau de l'otolithe. Néanmoins, ces termes sont ambigus et ne devraient pas être utilisés dans la description des micro-

structures. Les termes préconisés sont « *primordium* » et « noyau » (voir définitions). Lors d'une observation macroscopique, le terme « *nucleus* » a pu être utilisé pour décrire une région autour du noyau, même si les limites de cette région ne sont pas très claires. Si le terme est utilisé pour décrire des macrostructures, il demande cependant une définition précise.

Os compact (Sq) : os dont l'architecture présente un volume de tissu osseux largement supérieur à celui des cavités vasculaires. L'os compact peut être avasculaire.

Os primaire (Sq) : tissu osseux déposé en premier, sans qu'il y ait eu de dépôt antérieur à cet endroit.

Os secondaire (Sq) : tissu osseux déposé dans une région où l'os primaire a été résorbé (substitution de tissu osseux).

Os spongieux (Sq) : os dont le tissu est très vascularisé. Le volume des cavités vasculaires est beaucoup plus grand que celui du tissu osseux.

Ossification (Sq) : ensemble des processus impliqués dans la formation de l'os.

Ostéoblaste (Sq) : cellule spécifique du tissu osseux qui synthétise la matrice osseuse et qui est localisée sur les surfaces interne (endoste) ou externe (périoste) de ce tissu.

Ostéoclaste (Sq) : cellule spécifique du tissu osseux qui est impliquée dans la résorption de l'os. Elle est généralement plurinucléée chez les Vertébrés supérieurs mais peut être mononucléée chez les poissons.

Ostéocyte (Sq) : cellule spécifique du tissu osseux qui est incluse au sein du tissu et qui transporte les éléments nutritifs dont l'os a besoin. C'est un ostéoblaste incorporé dans le tissu.

Ostéogenèse (Sq) : processus de la formation du tissu osseux par les cellules spécialisées (ostéoblastes).

Ostéone primaire (Sq) : canal vasculaire entouré de lamelles d'os concentriques qui sont déposées de façon centrifuge et qui ne dépend pas d'une résorption préalable.

Ostéone secondaire (ou système de Havers ou système haversien) (Sq) : cavité d'érosion formée à partir d'un canal vasculaire issu de l'activité ostéoclastique et remplie secondairement avec des lamelles concentriques d'os secondaire déposées de façon centripète.

Otolithométrie (O) : estimation de l'âge à partir des marques de croissance enregistrées et conservées dans les otolithes des poissons Téléostéens.

Pararostrum (*O*) : excroissance postérieure et dorsale de la *sagitta*. Généralement plus courte que le *postrostrum*. Terme utilisé dans la description morphologique des otolithes de Clupeidae.

Patron de croissance : notion de croissance relative des structures pendant une période donnée de la vie de la pièce calcifiée (e.g. *annuli* ou accroissement journalier).

Plan de focalisation optique (*O*) : plan dans la structure 3D de l'otolithe dans lequel les microstructures sont distinguables en microscopie photonique. Dans le plan de focalisation, l'orientation de l'axe de croissance est perpendiculaire à la direction de l'observation.

Postrostrum (*O*) : excroissance postérieure et ventrale de la *sagitta*. Généralement plus grande que le *pararostrum*. Terme utilisé dans la description morphologique des otolithes de Clupeidae.

Précision : proximité de mesures répétées de la même quantité. Pour des mesures techniques sans biais, la précision implique aussi de l'exactitude mais les deux termes ne sont pas équivalents.

Primordium (*pl. primordia*) (*O*) : structure initiale complexe de l'otolithe. Constitué de matériel granulaire et fibrillaire entourant un ou plusieurs *nuclei* denses de 0,5 à 1,0 μm de diamètre. Dans les premiers stades de la croissance de l'otolithe, si plusieurs *primordia* sont présents, ils fusionnent généralement pour former le noyau de l'otolithe.

Radius (*pl. radii*) (*E*) : sillon radiaire et orienté, prenant généralement naissance à partir du focus de l'écaille et correspondant à une absence de couche superficielle (externe) de l'écaille. Voir la figure II.B.1.

Remaniement osseux (*Sq*) : processus de reconstruction du tissu osseux qui intervient à l'intérieur ou en bordure de l'os. Il peut affecter l'os primaire ou secondaire et n'importe quel type de tissu. Il est lié à la morphogenèse de l'os durant les premiers stades de vie, à une demande physiologique ou à des contraintes mécaniques.

Résorption : perte de matériel originel d'une pièce calcifiée à cause d'un processus physiologique (e.g. matériel extrait de sa place d'origine).

Résorption osseuse (*Sq*) : action de l'érosion de la surface de l'os par les ostéoclastes (ostéoclasie) ou les ostéocytes à leur propre périphérie (ostéolyse périostéocytaire).

Rostrum (*O*) : excroissance antérieure et ventrale de la *sagitta*. Généralement plus grande que l'*antirostrum*. Voir la figure II.A.4.

Sagitta (*pl. sagittae*) (*O*) : une des trois paires d'otolithes trouvées dans le labyrinthe membraneux des poissons Ostéichthyens. Elle est contenue dans le *sacculus* (chambre) de la *pars inferior*. Elle est généralement

compressée latéralement et de forme elliptique. Cependant, la forme de la *sagitta* varie considérablement entre les espèces. Chez les non-Ostariophyses, la *sagitta* est beaucoup plus volumineuse que l'*asteriscus* et le *lapillus*. La *sagitta* est l'otolithe le plus fréquemment utilisé dans les études qui utilisent les otolithes. Voir la figure II.A.1.

Scalimétrie (E) : estimation de l'âge à partir des marques de croissance enregistrées et conservées dans les écailles des poissons Téléostéens.

Sclérochronologie : méthode d'estimation de l'âge et de la durée de traits d'histoire de vie à partir des marques de croissance enregistrées et conservées dans les pièces calcifiées des poissons Téléostéens.

Squelettechronologie (Sq) : estimation de l'âge à partir des marques de croissance enregistrées et conservées dans les os du squelette non écailleux des poissons Téléostéens.

Structure secondaire : terme utilisé pour toutes les macrostructures qui ne semblent pas identiques aux zones opaque et translucide d'un *annulus*. L'exemple le plus courant est celui des faux ou doubles anneaux.

Sulcus acusticus (ou sulcus) (O) : sillon médian marqué le long de la surface de la *sagitta*. Une large portion de l'otosac vient se loger à l'intérieur du *sulcus*. Il est souvent mentionné dans les études sur les otolithes à cause de la clarté des accroissements dans sa région sur la coupe transversale de la *sagitta*. Voir la figure II.A.4.

Système de Havers (ou système haversien) (Sq) : voir Ostéone secondaire.

Tissu osseux pseudo-lamellaire (ou tissu osseux à fibres parallèles) (Sq) : tissu osseux composé d'une matrice incluant des fibres de collagène parallèles d'une couche de tissu à l'autre.

Ultrastructure : structure d'un tissu observée à un grossissement très élevé (en particulier avec la microscopie électronique).

Validation : processus d'évaluation de l'exactitude d'une méthode d'estimation de l'âge. Le terme de validation regroupe un ensemble de processus et ne doit pas être considéré dans l'absolu. Si la méthode utilisée implique un décompte de zones, alors une partie de la validation implique de confirmer la signification temporelle de ces zones. La validation d'une procédure d'estimation de l'âge démontre si la méthode est solide et basée sur des faits étayés.

Vérification : processus de démonstration qu'un fait est vrai. Les estimations d'âge individuel peuvent être vérifiées si une méthode de validation a été employée. La vérification implique de tester les hypothèses et de déterminer dans l'absolu si elles sont vraies ou fausses. Voir Corroboration.

Zone : région d'une pièce calcifiée de structure identique ou de densité optique comparable. Synonyme de « marque » ou « anneau », ou encore de « bande ». L'utilisation de ce terme doit être illustrée.

Zone de transition (O) : zone de changement dans la structure de l'otolithe entre deux régions semblables ou dissemblables. Dans certains cas, la zone de transition est reconnue par un manque de structure ou d'accroissement, ou par un changement brutal de la forme (en largeur ou en contraste) des accroissements. Des zones de transition sont souvent formées pendant la métamorphose du stade larvaire vers le stade juvénile, ou pendant des changements d'habitats significatifs comme les passages d'un habitat pélagique à un habitat démersal, ou d'un milieu marin à un milieu dulçaquicole. Si le terme est utilisé, il demande une définition précise.

Zone hyaline : zone qui permet le passage d'une quantité de lumière plus grande qu'une zone opaque. Ce terme doit être évité et remplacé par « zone translucide ». Voir Zone translucide.

Zone multiple (ou anneau ou marque) : ensemble de zones de croissance rapprochées comparées à la taille de la pièce calcifiée considérée et à la distance entre les *annuli*, et qui peuvent être considérées comme un seul *annulus*.

Zone opaque : zone qui empêche le passage de la lumière comparée à une zone translucide. Ce terme est toujours relatif puisqu'une zone est estimée opaque par rapport à l'apparence des autres zones qui l'entourent. Pour les otolithes non préparés et sous une lumière transmise, la zone opaque apparaît sombre et la zone translucide apparaît lumineuse. Sous une lumière réfléchie, la zone opaque apparaît lumineuse et la zone translucide est sombre. Il est difficile de donner une valeur absolue pour la densité optique de telles zones. Voir Zone translucide.

Zone surnuméraire (ou anneau ou marque) : marque qui n'est pas retenue pour l'estimation de l'âge ou qui n'est pas considérée comme un *annulus*. Cette marque est en général aperiodique.

Zone translucide : zone qui permet le passage d'une quantité de lumière plus importante qu'une zone opaque. Ce terme est toujours relatif puisqu'une zone est estimée translucide par rapport à l'apparence des autres zones qui l'entourent (voir Zone opaque). Il est difficile de donner une valeur absolue pour la densité optique de telles zones. Pour les otolithes non préparés et sous une lumière transmise, la zone translucide apparaît lumineuse et la zone opaque apparaît sombre. Sous une lumière réfléchie, la zone translucide apparaît sombre et la zone opaque est lumineuse. Le terme « hyalin » a pu être utilisé mais le terme « translucide » est préférable.

Zone-D (O) : portion d'un micro-accroissement d'un otolithe qui apparaît sombre sous une lumière photonique transmise et comme une dépression après une attaque acide et une observation en microscopie électronique à balayage. Cette partie du micro-accroissement contient une grande quantité de matrice organique et une quantité moindre de carbonate de calcium par rapport à la zone-L. Elle était nommée « zone discontinue » ou « zone riche en matrice » dans les premiers travaux descriptifs mais le terme désormais utilisé est « zone-D ». Voir Zone-L et la figure II.A.5.

Zone-L (O) : portion d'un micro-accroissement d'un otolithe qui apparaît lumineuse sous une lumière photonique transmise et comme un relief élevé après une attaque acide et une observation en microscopie électronique à balayage. C'est la partie du micro-accroissement qui contient une faible quantité de matrice organique et une plus grande proportion de carbonate de calcium par rapport à la zone-D. Elle était nommée « zone d'accrétion » dans les premiers travaux descriptifs mais le terme désormais utilisé est « zone-L ». Voir Zone-D et la figure II.A.5.

Références bibliographiques

- Adams, L.A. 1940. Some characteristic otoliths of American Ostario-physi. *Journal of Morphology* **66**, 497-527.
- Agassiz, L. 1833-1844. *Recherches sur les poissons fossiles*. Neuchâtel, Switzerland: PetitPierre.
- Ahrenholz, D.W., Fitzhugh, G.R., Rice, J.A., Nixon, S.W. & Pritchard, W.C. 1995. Confidence of otolith ageing through the juvenile stage for Atlantic menhaden, *Brevoortia tyrannus*. *Fisbery Bulletin* **93**, 209-216.
- Aksu, A.E., Yasar, D., Mundie, P.J. & Gillespie, H. 1995. Late glacial-Holocene paleoclimatic and paleoceanographic evolution of the Aegean Sea: micropaleontological and stable isotopic evidence. *Marine Micropaleontology* **25**, 1-28.
- Al-Absy, A.H. & Carlander, K.D. 1988. Criteria for selection of scale-sampling sites in growth studies of yellow perch. *Transactions of the American Fisheries Society* **117**, 209-212.
- Albrechtsen, K. 1968. A dyeing technique for otolith age reading. *Journal du Conseil permanent international pour l'exploration de la mer* **32**, 278-280.
- Alcobendas, M., Lecomte, F., Castanet, J., Meunier, F.J., Maire, P. & Holl, M. 1991. Technique de marquage en masse de civelles (*Anguilla anguilla* L.) par baignade rapide dans le fluorochrome : application au marquage à la tétracycline de 500 kg de civelles. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* **321**, 43-54.
- Al-Hossaini, M. & Pitcher, T.J. 1988. The relation between daily growth rings, body growth and environmental factors in plaice *Pleuronectes platessa* L., juvenile otoliths. *Journal of Fish Biology* **33**, 409-418.
- Al-Hossaini, M., Liu, Q. & Pitcher, T.J. 1989. Otolith microstructure indicating growth and mortality among plaice, *Pleuronectes platessa* L., post-larval sub-cohorts. *Journal of Fish Biology* **35**, 81-90.
- Allen, P.M. & McGlade, J.M. 1986. Dynamics of discovery and exploitation: the case of the Scotian shelf groundfish fisheries. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **43**, 1187-1200.
- Almeida, F.P. & Sheehan, T.F. 1997. Age determination methods for Northwest Atlantic species. *NOAA Technical Report NMFS* **72**, 85 p.
- Alonso, M.K., Pedraza, S.N., Schiavini, A.C.M., Goodall, R.N.P. & Crespo, E.A. 1999. Stomach contents of false killer whales (*Pseudorca crassidens*) stranded on the coasts of the Strait of Magellan, Tierra del Fuego. *Marine Mammal Science* **15**, 712-724.
- Amprino, R. & Engström, A. 1952. Studies on X-ray absorption and diffraction of bone tissue. *Acta Anatomica* **15**, 1-22.
- Amprino, R. & Godina, G. 1956. Osservazioni sul rinnovamento strutturale dell'osso in Pesci Teleostei. *Publicazioni della Stazione della Zoologia di Napoli* **28**, 62-71.

- Anderson, C.S. 1995. Calculating size-dependent relative survival from samples taken before and after selection. In *Recent developments in fish otolith research* (Secor, D.H., Dean, J.M. & Campana, S.E., ed.), pp. 455-466. Columbia, SC, USA: University of South Carolina Press.
- Anderson, J.T. 1988. A review of size dependent survival during pre-recruit stages of fishes in relation to recruitment. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science* 8, 55-66.
- Anderson, T.F. 1990. Temperature from oxygen isotope ratios. In *Palaeontology: A synthesis* (Crowther, B., ed.), pp. 403-406. Oxford, UK: Blackwell.
- Andrews, A.H., Cailliet, G.M. & Coale, K.H. 1999a. Age and growth of the Pacific grenadier (*Coryphaenoides acrolepis*) with age estimate validation using an improved radiometric ageing technique. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56, 1339-1350.
- Andrews, A.H., Coale, K.H., Nowicki, J.L., Lundstrom, C., Palacz, Z., Burton, E.J. & Cailliet, G.M. 1999b. Application of an ion-exchange separation technique and thermal ionization mass spectrometry to Ra-226 determination in otoliths for radiometric age determination of long-lived fishes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56, 1329-1338.
- Anon. 1998. Report of the Workshop on otolith ageing of North Sea Whiting. ICES, CM 1998/G:14, 66 p.
- Antunes, C. & Tesch, F.W. 1997. A critical consideration of the metamorphosis zone when identifying daily rings in otoliths of European eel, *Anguilla anguilla* (L). *Ecology of Freshwater Fish* 6, 102-107.
- Arai, N., Sakamoto, W. & Maeda, K. 1995. Analysis of trace elements in otoliths of red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Science* 61, 43-47.
- Arai, T., Otake, T. & Tsukamoto, K. 1997. Drastic changes in otolith microstructure and microchemistry accompanying the onset of metamorphosis in the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Marine Ecology Progress Series* 161, 17-22.
- Arai, T., Otake, T. & Tsukamoto, K. 2000. Timing of metamorphosis and larval segregation of the Atlantic eels *Anguilla rostrata* and *A. anguilla*, as revealed by otolith microstructure and microchemistry. *Marine Biology* 137, 39-45.
- Archibald, C.P., Fournier, D. & Leaman, B.M. 1983. A user's guide to Fournier's catch-at-age model. *Canadian Manuscript Report of Fisheries and Aquatic Sciences* 1688, 84 p.
- Arneri, E., Mosegaard, H., Wright, P.J. & Morales-Nin, B. 1998. Microstructural validation of annual increments. In *The present status of otolith research and applications* (Wright, P.J., ed.), EFAN Report 1/98. <http://www.efan.no/>, pp. 54-59.
- Asano, M. & Mugiya, Y. 1993. Biochemical and calcium-binding properties of water-soluble proteins isolated from otoliths of the tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 104B, 201-205.

- Babaluk, J.A. & Campbell, J.S. 1987. Preliminary results of tetracycline labelling for validating annual growth increments in opercula of walleyes. *North American Journal of Fisheries Management* 7, 138-141.
- Babaluk, J.A. & Craig, J.F. 1990. Tetracycline marking studies with pike, *Esox lucius* L. *Aquaculture and Fisheries Management* 21, 307-315.
- Babaluk, J.A., Halden, N.M., Reist, J.D., Kristofferson, A.H., Campbell, J.L. & Teesdale, W.J. 1997. Evidence for non-anadromous behaviour of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) from Lake Hazen, Ellesmere Island, northwest Territories, Canada, based on scanning proton microprobe analysis of otolith strontium distribution. *Arctic* 50, 224-233.
- Bagenal, T.B. 1974. *The ageing of fish*. Old Woking, Surrey, UK: Unwin Brothers Ltd.
- Bagenal, T.B. & Tesch, F.W. 1978. Age and growth. In *Methods for assessment of fish production in fresh waters* (Bagenal, T., ed.), pp. 101-136. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications.
- Baglinière, J.L. & Le Louarn, H. 1987. Caractéristiques scalimétriques des principales espèces de poissons d'eau douce de France. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 306, 1-39.
- Baglinière, J.L., Castanet, J., Conand, F. & Meunier, F.J. 1992. *Tissus durs et âge individuel des Vertébrés*. Paris, France: ORSTOM/INRA Éditions.
- Bailey, K.M., Brown, A.L., Nishimura, A. & Reilly, M.T. 1995. Three-dimensional imaging of walleye pollock otoliths: Reconstruction from serial sections and fluorescent laser cytometry. *Journal of Fish Biology* 47, 671-678.
- Baskin, S.J., Clearwater, S.J., Wood, C.M. & McDonald, D.G. 1999. A comparison of the intestinal metal bioavailability of Cd and Zn in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In *Fish response to toxic environments* (Kennedy, C. & MacKinlay, D., ed.), pp. 77-80. Baltimore, MD, USA: International Congress on the Biology of Fish, July 26-30, 1998.
- Bath, G.E., Thorrold, S.R., Jones, C.M., Campana, S.E., McLaren, J.W. & Lam, J.W.H. 2000. Strontium and barium uptake in aragonitic otoliths of marine fish. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 64, 1705-1714.
- Batts, B.S. 1972. Age and growth of the skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis* (L.), in North Carolina waters. *Chesapeake Science* 13, 237-244.
- Baud, C.A. 1978. Ultrastructure and function of mineral substance in Teleost fish bone. In *Symposium de recherche sur les tissus calcifiés des poissons* (Kerebel, B., ed.), CNEXO-COB, pp. 3.
- Baudelot, M.E. 1873. Recherches sur la structure et le développement des écailles des poissons osseux. *Archives de Zoologie Générale et Expérimentale* 2, 87-244; 429-480.

- Beall, E. & Davaine, P. 1988. Analyse scalimétrique de la truite de mer (*Salmo trutta* L.) : formation des anneaux et critères d'identification chez les individus sédentaires et migrateurs d'une même population acclimatée aux îles Kerguelen (TAAF). *Aquatic Living Resources* 1, 3-16.
- Beamish, R.J. & Fournier, D.A. 1981. A method for comparing the precision of a set of age determination. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 38, 982-983.
- Beamish, R.J. & McFarlane, G.A. 1983. The forgotten requirement for age validation in fisheries biology. *Transactions of the American Fisheries Society* 112, 735-743.
- Beamish, R.J. & McFarlane, G.A. 1987. Current trends in age determination methodology. In *Age and growth of fish* (Summerfelt, R.C. & Hall, G.E., ed.), pp. 15-42. Ames, Iowa, USA: The Iowa State University Press.
- Beamish, R.J. & McFarlane, G.A. 2000. Reevaluation of the interpretation of annuli from otoliths of a long-lived fish, *Anoplopoma fimbria*. *Fisheries Research* 46, 105-111.
- Beckman, D.W., Wilson, C.A., Lorica, F. & Dean, J.M. 1990. Variability in incorporation of calcein as a fluorescent marker in fish otoliths. *American Fisheries Society Symposium* 7, 547-549.
- Bedford, B.C. 1983. A method for preparing sections of large numbers of otoliths embedded in black polyester resin. *Journal du Conseil permanent international pour l'exploration de la mer* 41, 4-12.
- Bennett, J.T., Boehlert, G.W. & Turekian, K.K. 1982. Confirmation of longevity in *Sebastes diploproa* (Pisces: Scorpaenidae) from Pb-210/Ra-226 measurements in otoliths. *Marine Biology* 71, 209-215.
- Benzinou, A., Troadec, H., Le Bihan, J., Rodin, V., Pontual, H (de) & Tisseau, J. 1997. The locally deformable B-Bubble model: an application to growth ring detection on fish otoliths. In *The Scandinavian Conference on Image Analysis* (SCIA'97, ed.), SCIA'97, pp. 181-187.
- Benzinou, A. 2000. Vers un système de vision par ordinateur pour la reconnaissance de structures sur des pièces calcifiées (otolithes et statolithes). Application à la détermination de l'âge et de paramètres de croissance de poissons et de céphalopodes. Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, 287 p.
- Bereiter-Hahn, J. & Zylberberg, L. 1993. Regeneration of Teleost fish scale. *Comparative Biochemistry and Physiology* 105A, 625-641.
- Berghahn, R. & Karakiri, M. 1990. Experimental induction of biological tags in otoliths of 0-group plaice *Pleuronectes platessa* by starvation, temperature, and UV-B radiation. *Marine Ecology Progress Series* 67, 227-233.
- Bergstedt, R.A., Eshenroder, R.L., Bowen, C.I., Seelye, J.G. & Locke, J.C. 1990. Mass-marking of otoliths of lake trout sac fry by temperature manipulation. *American Fisheries Society Symposium* 7, 216-223.

- Bertin, L. 1944. Modifications proposées dans la nomenclature des écailles et des nageoires. *Bulletin de la Société Zoologique de France* 69, 198-202.
- Bertin, L. 1958. Écailles et sclérifications dermiques. In *Traité de Zoologie* (Grassé, P.P., ed.), pp. 482-504. Paris, France: Masson.
- Beverton, R.J.H. & Holt, S.J. 1957. *On the dynamics of exploited fish populations*. London, UK: Chapman & Hall, 1993.
- Bhattacharya, C.G. 1967. A simple method of resolution of a distribution into Gaussian components. *Biometrics* 23, 115-135.
- Bijvelds, M.J.C., Van der Velden, J.A., Kolar, Z.I. & Flik, G. 1998. Magnesium transport in freshwater teleosts. *Journal of Experimental Biology* 201, 1981-1990.
- Blacker, R.W. 1974. Recent advances in otolith studies. In *Sea fisheries research* (Jones, R.R.H., ed.), pp. 67-90. New York, USA: Wiley.
- Blake, C. & Blake, B.F. 1978. The use of opercular bones in the study of age and growth in *Labeo senegalensis* from Lake Kainji, Nigeria. *Journal of Fish Biology* 13, 287-295.
- Blanc, M. 1953. Contribution à l'étude de l'ostéogenèse chez les Poissons Téléostéens. Thèse, Université de Paris, 145 p.
- Blom, G., Nordeide, J.T., Svaasand, T. & Borge, A. 1994. Application of two fluorescent chemicals, alizarin complex one and alizarin red S, to mark otoliths of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Aquaculture and Fisheries Management* 25 (Suppl. 1), 229-243.
- Bloss, F.D. 1971. *Crystallography and crystal chemistry*. New York, USA: Holt, Rinehart & Winston.
- Boët, P. 1981. Eléments d'écologie du poisson-chat, *Ictalurus melas* (Rafinesque, 1820), du lac de Créteil. Structure et dynamique de la population, exploitation des ressources alimentaires et production. PhD Thesis, Université Paris 6, 123 p.
- Boivin, G. & Baud, C.A. 1984. Microradiographic methods for calcified tissues. In *Methods of calcified tissue preparation* (Dickson, G.R., ed.), pp. 391-411. Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
- Bolz, G.R. & Lough, R.G. 1983. Growth of larval Atlantic cod, *Gadus morhua*, and haddock, *Melanogrammus aeglefinus*, on Georges Bank, spring 1981. *Fishery Bulletin* 81, 827-836.
- Bonham, K., Sanford, F.B., Clegg, W. & Bucher, G.C. 1949. Biological and vitamin A studies of dogfish landed in the state of Washington (*Squalus suckleyi*). *Biological Report of the Department of Fisheries. Station of Washington* 49A, 83-114.
- Bouain, A. & Siau, Y. 1988. A new technique for staining fish otoliths for age determination. *Journal of Fish Biology* 32, 977-978.
- Boujard, T., Sabatier, D., Rojas-Beltran, R., Prévost, M.F. & Renno, J.F. 1990. The food habits of three allochthonous feeding characoids in French Guiana. *Revue d'Écologie (La Terre et la Vie)* 45, 247-258.

- Boujard, T., Lecomte, F., Renno, J.F., Meunier, F. & Neveu, P. 1991. Growth in four populations of *Leporinus friderici* (Bloch, 1794) (Anostomidae, Teleostei) in French Guiana. *Journal of Fish Biology* 38, 387-397.
- Boujard, T. & Meunier, F.J. 1991. Croissance de l'épine pectorale, histologie osseuse et dimorphisme sexuel chez l'atipa, *Hoplosternum littorale* Hancox, 1828 (Callichthyidae, Siluriforme). *Cybiurn* 15, 55-68.
- Bradford, M.J. & Geen, G.H. 1992. Growth estimates from otolith increment widths of juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) reared in changing environments. *Journal of Fish Biology* 41, 825-832.
- Branstetter, S. & Stiles, R. 1987. Age and growth estimates of the bull shark, *Carcharhinus leucas*, from the northern Gulf of Mexico. *Environmental Biology of Fishes* 20, 169-181.
- Brennan, J.S. & Cailliet, G.M. 1989. Comparative age-determination techniques for white sturgeon in California. *Transactions of the American Fisheries Society* 118, 296-310.
- Broecker, W.S., Peng, T.H., Ostlund, H.G. & Stuiver, M. 1985. The distribution of bomb radiocarbon in the ocean. *Journal of Geophysical Research* 90, 6953-6970, copyright© (1985) by the American Geophysical Union.
- Brothers, E.B., Mathews, C.P. & Lasker, R. 1976. Daily growth increments in otoliths from larval and adult fishes. *Fishery Bulletin* 74, 1-8.
- Brothers, E.B. 1981. What can otolith microstructure tell us about daily and subdaily events in the early life history of fish? *Rapports et Procès-verbaux des réunions du Conseil international pour l'exploration de la mer* 178, 393-394.
- Brothers, E.B. 1987. Methodological approaches to the examination of otoliths in aging studies. In *The age and growth of fish* (Summerfelt, R. C. & Hall, G. E., ed.), pp. 319-330. Ames, Iowa, USA: The Iowa State University Press.
- Brothers, E.B. 1990. Otolith marking. *American Fisheries Society Symposium* 7, 183-202.
- Brown, A.W. 1903. Some observations on the young scales of the cod, haddock, and whiting before shedding. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* 24, 437-438.
- Brown, M.E. 1957. Experimental studies on growth. In *The physiology of fishes* (Brown, M.E., ed.), pp. 361-400. New York, USA: Academic Press.
- Brown, R. & Severin, K.P. 1999. Elemental distribution within polymorphic inconnu (*Stenodus leucichthys*) otoliths is affected by crystal structure. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56, 1898-1903.

- Bruton, M.N. & Allanson, B.R. 1974. Growth of *Tilapia mossambica* Peters (Pisces, Cichlidae) in Lake Sibaya, South Africa. *Journal of Fish Biology* 6, 701-715.
- Bumguardner, B.W. 1991. Marking subadult red drums with oxytetracycline. *Transactions of the American Fisheries Society* 120, 537-540.
- Burdak, V.D. 1979. Morphologie fonctionnelle du tégument écailleux des poissons. *Cybiurn* 10 (suppl.), 1-147.
- Caillet, G.M., Harvey, J., Kusher, D., Martin, L. & Welden, B. 1983. Age and growth of shortfin mako, *Isurus oxyrinchus*, thresher, *Alopias vulpinus*, and blue shark, *Prionace glauca*, from California waters. In *Proceedings of the international workshop on age determination of oceanic pelagic fishes: Tunas, Billfishes, and Sharks* (Prince, E.D. & Pulos, L.M., ed.), pp. 179-188, NOAA Technical Report NMFS 8.
- Cailliet, G.M. & Tanaka, S. 1990. Recommendations for research needed to better understand the age and growth of Elasmobranchs. In *Elasmobranchs as living resources: advances in the biology, ecology, systematics, and the status of the fisheries* (Pratt, H., Gruber, S.H. & Taniuchi, T., ed.), pp. 505-507. NOAA Technical Report, NMFS, 90.
- Cailliet, G.M., Botsford, L.W., Brittnacher, J.G., Ford, G., Matsubayashi, M., King, A., Watters, D.L. & Kope, R.G. 1996. Development of a computer-aided age determination system: Evaluation based on otoliths of bank rockfish off California. *Transactions of the American Fishery Society* 125, 874-888.
- Calaprice, J.R. 1971. X-ray spectrometric and multivariate analysis of Sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) from different geographic regions. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 28, 369-377.
- Calaprice, J.R. 1983. X-ray vision: a new method of examining an old problem. *International commission for the conservation of Atlantic tunas. ICCAT Collective volume of scientific papers* 18, 792-793.
- Campana, S.E. 1983. Feeding periodicity and the production of daily growth increments in otoliths of steelhead trout (*Salmo gairdneri*) and starry flounder (*Platichthys stellatus*). *Canadian Journal of Zoology* 61, 1591-1597.
- Campana, S.E. 1984. Interactive effects of age and environmental modifiers on the production of daily growth increments in otoliths of plainfin midshipman, *Porichthys notatus*. *Fishery Bulletin* 82, 165-177.
- Campana, S.E. & Neilson, J.D. 1985. Microstructure of fish otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 42, 1014-1032.
- Campana, S.E. 1987. Image analysis for microscope based observations: an inexpensive configuration. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences* 1569, 20 p.
- Campana, S.E., Gagné, J.A. & Munro, J. 1987. Otolith microstructure of larval herring (*Clupea harengus*): image or reality? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 44, 1922-1929.

- Campana, S.E. 1989. Otolith microstructure of three larval gadids in the Gulf of Maine, with inferences on early life history. *Canadian Journal of Zoology* 67, 1401-1410.
- Campana, S.E. 1990. How reliable are growth back-calculations based on otoliths? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 47, 2219-2227.
- Campana, S.E., Zwanenburg, K.C.T. & Smith, J.N. 1990. Super(210)Pb/ super(226)Ra determination of longevity in red-fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 47, 163-165.
- Campana, S.E. & Moksness, E. 1991. Accuracy and precision of age and hatch date estimates from otolith microstructure examination. *International Council for the Exploration of the Sea. Journal of Marine Sciences* 48, 303-316.
- Campana, S.E. 1992. Measurement and interpretation of the microstructure of fish otoliths. In *Otolith microstructure examination and analysis* (Stevenson, D.K. & Campana, S.E., ed.), pp. 59-71. Ottawa, Canada: Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences.
- Campana, S.E. & Jones, C.M. 1992. Analysis of otolith microstructure data. In *Otolith microstructure examination and analysis* (Stevenson, D.K. & Campana, S.E., ed.), pp. 73-100. Ottawa, Canada: Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences.
- Campana, S.E. & Casselman, J.M. 1993. Stock discrimination using otolith shape analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50, 1062-1083.
- Campana, S.E., Oxenford, H.A. & Smith, J.N. 1993. Radiochemical determination of longevity in flyingfish *Hirundichthys affinis* using Th-228/Ra-228. *Marine Ecology Progress Series* 100, 211-219.
- Campana, S.E., Gagne, J.A. & McLaren, J.W. 1995. Elemental fingerprinting of fish otoliths using ID-ICP-MS. *Marine Ecology Progress Series* 122, 115-120.
- Campana, S.E. 1996. Year-class strength and growth rate in young Atlantic cod *Gadus morhua*. *Marine Ecology Progress Series* 135, 21-26.
- Campana, S.E. 1997. Use of radiocarbon from nuclear fallout as a dated marker in the otoliths of haddock *Melanogrammus aeglefinus*. *Marine Ecology Progress Series* 150, 49-56.
- Campana, S.E., Thorrold, S.R., Jones, C.M., Gunther, D., Tubrett, M., Longerich, H., Jackson, S., Halden, N.M., Kalish, J.M., Piccoli, P., Pontual, H. (de), Troadec, H., Panfili, J., Secor, D.H., Severin, K.P., Sie, S.H., Thresher, R., Teesdale, W.J. & Campbell, J.L. 1997. Comparison of accuracy, precision, and sensitivity in elemental assays of fish otoliths using the electron microprobe, proton-induced X-ray emission, and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54, 2068-2079.

- Campana, S.E. & Jones, C.M. 1998. Radiocarbon from nuclear testing applied to age validation of black drum, *Pogonias cromis*. *Fishery Bulletin* 96, 185-192.
- Campana, S.E. 1999. Chemistry and composition of fish otoliths: pathways, mechanisms and applications. *Marine Ecology Progress Series* 188, 263-297.
- Campana, S.E., Chouinard, G.A., Hanson, J.M., Frechet, A. & Bratley, J. 2000. Otolith elemental fingerprints as biological tracers of fish stocks. *Fisheries Research* 46, 343-357.
- Carlander, K.D. 1987. A history of scale age and growth studies of North American freshwater fish. In *The age and growth of fish* (Summerfelt, R.C. & Hall, G.E., ed.), pp. 3-14. Ames, Iowa, USA: The Iowa State University Press.
- Carlström, D. 1963. A crystallographic study of vertebrate otoliths. *Biological Bulletin* 124, 441-463.
- Casadevall, M., Casinos, A., Viladiu, C. & Ontanon, M. 1990. Scaling of skeletal mass and mineral content in Teleosts. *Zoologischer Anzeiger* 225, 144-150.
- Casselman, J.M. 1974. Analysis of hard tissue of pike *Esox lucius* L. with special reference to age and growth. In *The ageing of fish* (Bagenal, T.B., ed.), pp. 13-27. Old Woking, UK: Unwin Brother's Limited.
- Casselman, J.M. 1982. Chemical analyses of the optically different zones in eel otoliths. In *Proceedings of the 1980 North American Eel Conference. Ontario Fishery Technical Report Series. 4* (Loftus, K.H., ed.), pp. 74-82.
- Casselman, J.M. 1983. Age and growth assessment of fish from their calcified structures: techniques and tools. In *Proceedings of the international workshop on age determination of oceanic pelagic fishes: Tunas, Billfishes, and Sharks* (Prince, E.D. & Pulos, L.M., ed.), pp. 1-17, NOAA Technical Report NMFS 8.
- Casselman, J.M. 1987. Determination of age and growth. In *The biology of fish growth* (Weatherley, A.H. & Gill, H.S., ed.), pp. 209-242. Orlando, USA: Academic Press.
- Casselman, J.M. 1990. Growth and relative size of calcified structures of fish. *Transactions of the American Fisheries Society* 119, 673-688.
- Casselman, J.M. 1996. Age, growth and environmental requirements of pike, *Esox lucius*. In *Pike: biology and exploitation* (Craig, J., ed.), pp. 69-101. London, UK: Chapman and Hall.
- Casselman, J.M. & Scott, K.A. 2000. A general procedures manual for CSAGES-Calcified Structure Age-Growth data Extraction Software (Version 5.2). *Special Publication of the Glenora Fisheries Station*. OMNR, Picton, Ontario, Canada, 90 p.

- Cassie, R.M. 1954. Some use of probability paper in the analysis of size frequency distributions. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 5, 513-522.
- Castanet, J., Gasc, J.P., Meunier, F. & Ricqlès, A. (de) 1970. Calcium et nature des zones de croissance cycliques dans l'os des Vertébrés poïkilothermes. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 270(D), 2853-2856.
- Castanet, J., Meunier, F., Bergot, C. & François, Y. 1975. Données préliminaires sur les structures histologiques du squelette de *Latimeria chalumnae*. I- Dents, écailles, rayons de nageoires. In *Coll. Inter. CNRS, « Problèmes actuels de Paléontologie. Évolution des Vertébrés », Paris, 4-9 Juin 1973, 1* (CNRS, ed.), pp. 159-168. Paris, France: CNRS.
- Castanet, J., Meunier, F. & Ricqlès, A. (de) 1977. L'enregistrement de la croissance cyclique par le tissu osseux chez les Vertébrés poïkilothermes : données comparatives et essai de synthèse. *Bulletin Biologique de France et de Belgique* 111, 183-202.
- Castanet, J. 1981. Nouvelles données sur les lignes cimentantes de l'os. *Archives de Biologie* 92, 1-24.
- Castanet, J. & Naulleau, J. 1985. La squelettechronologie chez les Reptiles. II. Résultats expérimentaux sur la signification des marques de croissance squelettiques chez les Serpents. Remarques sur la croissance et la longévités de la vipère aspic. *Annales Scientifiques Nationales de Zoologie* 7, 41-62.
- Castanet, J., Francillon-Vieillot, H. & Meunier, F.J. 1992. Squelettechronologie à partir des os et des dents chez les Vertébrés. In *Tissus durs et Âge individuel des Vertébrés* (Baglinière, J.L., Castanet, J., Conand, F. & Meunier, F.J., ed.), pp. 257-280. Paris, France: Collection Colloques et Séminaires ORSTOM/INRA.
- Castanet, J., Francillon-Vieillot, H., Meunier, F.J. & Ricqlès, A. (de) 1993. Bone and individual aging. In *Bone* (Hall, B.K., ed.), pp. 245-283. New York, USA: C.R.C. Press.
- Casteels, R.W. 1974. Growth rate of *Ptychocheilus grandis* (Ayres) in central California, 4000-1600 years ago. *Wasmann Journal of Biology* 32, 281-296.
- Castonguay, M., Simard, P. & Gagnon, P. 1991. Usefulness of Fourier analysis of otolith shape for Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) stock discrimination. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48, 296-302.
- Cayré, P. & Diouf, T. 1980. Croissance de la thonine *Euthynnus alletteratus* (Rafinesque, 1810), établie à partir de coupes transversales du premier rayon de la nageoire dorsale. *Centre de Recherches Océanographiques, Dakar-Thiaroye, Sénégal, Documents Scientifiques* 75, 1-18.

- Cayré, P.M. & Diouf, T. 1983. Estimating age and growth of little tunny, *Euthynnus alletteratus*, off the coast of Senegal, using dorsal fin spine sections. In *Proceedings of the international workshop on age determination of oceanic pelagic fishes: Tunas, Billfishes, and Sharks* (Prince, E.D. & Pulos, L.M., ed.), pp. 105-110, NOAA Technical Report NMFS 8.
- CEC, 1987. Assessment of technical interactions in mixed fisheries. *Commission of the European Communities, Internal Information on Fisheries* 15, 75.
- Chambers, R.C. & Leggett, W.C. 1987. Size and age at metamorphosis in marine fishes: an analysis of laboratory-reared winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) with a review of variation in other species. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 44, 1936-1947.
- Chambers, R.C. & Miller, T.J. 1995. Evaluating fish growth by means of otolith increment analysis: special properties of individual-level longitudinal data. In *Recent developments in fish otolith research* (Secor, D.H., Dean, J.M. & Campana, S.E., ed.), pp. 155-174. Columbia, SC, USA: University of South Carolina Press.
- Chang, N.Y.B. 1982. A statistical method for evaluating the reproductibility of age determination. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 39, 1208-1210.
- Charlesworth, B. 1994. *Evolution in age-structured populations*. Cambridge, UK: University Press.
- Chesney, E.J., McKee, B.M., Blanchard, T. & Chan, L.H. 1998. Chemistry of otoliths from juvenile menhaden *Brevoortia patronus*: evaluating strontium, strontium:calcium and strontium isotope ratios as environmental indicators. *Marine Ecology Progress Series* 171, 261-273.
- Choat, J.H. & Axe, L.M. 1996. Growth and longevity in acanthurid fishes: an analysis of otolith increments. *Marine Ecology Progress Series* 134, 15-26.
- Chung, K.C. & Woo, N.Y.S. 1999. Age and growth by scale analysis of *Pomacanthus imperator* (Teleostei : Pomacanthidae) from Dongsha Islands, southern China. *Environmental Biology of Fishes* 55, 399-412.
- Clear, N.P., Gunn, J.S. & Rees, A.J. 2000. Direct validation of annual increments in the otoliths of juvenile southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii*, by means of a large-scale mark-recapture experiment with strontium chloride. *Fishery Bulletin* 98, 25-40.
- Clerc, W. 1927. Étude de la périodicité de croissance d'après les plans isodynamiques des os. *Revue Suisse de Zoologie* 34, 477-496.
- Cocquerez, J.P. & Philipp, S. 1995. *Analyse d'images : filtrage et segmentation*. Paris, France: Masson.
- Compean Jiménez, G. & Bard, F.X. 1980. Utilisation de la squelettochronologie chez les Thunidés. *Bulletin de la Société Zoologique de France* 105, 329-336.

- Conser, R.J. 1994. Stock assessment methods designed to support fishery management in data-limited environments: development and application. Ph.D. Dissertation, University of Washington, Seattle WA, 292 p.
- Cook, E.R. & Kairiukstis, L.A. 1990. *Methods of dendrochronology: applications in the environmental sciences*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Cook, R.C. & Guthrie, I. 1987. In-season stock identification of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) using scale pattern recognition. In *International Sockeye Salmon Symposium - Sockeye '85* (Smith, H.D., Margolis, L. & Wood, C.C., ed.), pp. 327-334, Department of Fisheries and Oceans, Ottawa, Ontario (Canada).
- Cooley, H.M. & Klaverkamp, J.F. 2000. Accumulation and distribution of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquatic Toxicology* 48, 477-494.
- Coster, M. & Chermant, J.L. 1989. *Précis d'analyse d'image*. Paris, France: Presse du CNRS.
- Coutant, C.C. & Chen, C.H. 1993. Strontium microstructure in scales of freshwater and estuarine striped bass (*Morone saxatilis*) detected by laser ablation mass spectrometry. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50, 1318-1323.
- Coyne, R., Hiney, M., O'Connor, B., Kerry, J., Cazabon, D. & Smith, P. 1994. Concentration and persistence of oxytetracycline in sediments under a marine salmon farm. *Aquaculture* 123, 31-42.
- Crabtree, R.E., Cyr, E.C. & Dean, J.M. 1995. Age and growth of tarpon, *Megalops atlanticus*, from south Florida waters. *Fishery Bulletin* 93, 619-628.
- Craig, H. 1957. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 12, 133-149.
- Craig, H. 1965. The measurement of oxygen isotope paleotemperatures. In *Conference on stable isotopes in oceanographic studies and paleotemperatures* ed.), pp. 3-24, Proceedings of the Spoleto Conference on Stable Isotopes in Oceanographic Studies of Paleotemperatures.
- Crawford, S., Coleman, W.S. & Porak, W.F. 1989. Time of annulus formation in otoliths of Florida largemouth bass. *North American Journal of Fisheries Management* 9, 231-233.
- Crecco, V. & Savoy, T. 1987. Effects of climatic and density-dependent factors on intra-annual mortality of larval American shad. In *American Fisheries Society Symposium Series 10th Annual Larval Fish Conference. Proceedings of a conference held in Miami, Florida, USA, May 18-23, 1986* (Hoyt, R.D., ed.), pp. 69-81, American Fisheries Society.
- Crenshaw, M.A. 1982. Mechanisms of normal biological mineralization of calcium carbonates. In *Biological mineralization and demineralization* (Nancollas, G.H., ed.), pp. 243-257. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.

- Crichton, M.I. 1935. Scale-absorption in salmon and sea trout. *Annual Report of the Fishery Board of Scotland* 4, 1-8.
- Cunningham, M.A. 1905. Zones of growth in the skeletal structures of Gadidae and Pleuronectidae. *Annual Report of the Fishery Board of Scotland* 23, 125-140.
- Daan, N. 1987. Multispecies versus single-species assessment of North Sea fish stocks. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 44 (Suppl. 2), 360-370.
- Daan, N. & Sissenwine, M.P. 1991. *Multispecies models relevant to management of living resources*. Academic Press, London, UK: ICES Marine Science Symposia, 193.
- Dabrowski, K. & Tsukamoto, K. 1986. Tetracycline tagging in coregonid embryos and larvae. *Journal of Fish Biology* 29, 691-698.
- Daget, J. & Le Guen, J.C. 1975. Les critères d'âge chez les Poissons. In *Problèmes d'Écologie : la démographie des populations de Vertébrés* (Lamotte, M. & Bourlière, F., ed.), pp. 253-289. Paris, France: Masson.
- Dahl, K. 1907. The scales of the herring as a mean of determining age growth and migration. *Report of Norwegian Fisheries and Marine Investigations. Bergen* 2, 1-36.
- Dahl, K. 1911. *Age and growth of the salmon and trout in Norway*. London, UK.
- Dale, T. 1976. The labyrinthine mechanoreceptor organs of the cod *Gadus morhua* L. (Teleostei: Gadidae). A scanning electron microscopical study with special reference to the morphological polarization of the macular sensory cells. *Norwegian Journal of Zoology* 24, 85-128.
- Dannevig, E.H. 1956. Chemical composition of the zones in cod otoliths. *Journal du Conseil permanent international pour l'exploration de la mer* 21, 156-159.
- Das, M. 1994. Age determination and longevity in Fishes. *Gerontology* 40, 70-96.
- Davey, R.J., Maginn, S.J., Andrews, S.S., Buckley, A.M., Cottier, D., Demsey, P., Rout, J.E., Stanley, D.R. & Taylor, A. 1993. Stabilization of a merasable crystalline phase by twinning. *Nature* 366, 248-250.
- Davies, E.R. 2000. *Machine vision: theory, algorithms, practicalities (3rd edition)*. London, UK: Academic Press.
- Davis, T.L.O. & Kirkwood, G.P. 1984. Age and growth studies on barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), in northern Australia. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 35, 673-689.
- De Bont, A.F. 1967. Some aspects of age and growth of fish in temperate and tropical waters. In *The biological basis of freshwater fish production* (Gerking, S.D., ed.), pp. 67-88. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications.

- Deelder, C.L. & Willemse, J.J. 1973. Age determination in freshwater Teleosts, based on annular structures in fin-rays. *Aquaculture* 1, 365-371.
- Degens, E.T., Deuser, W.G. & Haedrich, R.L. 1969. Molecular structure and composition of fish otoliths. *Marine Biology* 2, 105-113.
- Desaunay, Y., Guérault, D. & Lecomte-Finiger, R. 1996. Variation of the oceanic larval migration of *Anguilla anguilla* (L.) glass eels from a two-year study in the Vilaine Estuary (France). *Archives for Polar Fisheries* 4, 195-210.
- Desse, G., Meunier, F.J., Peron, M. & Laroche, J. 1981. Hyperostose vertébrale chez l'animal. *Rhumatologie* 33, 105-119.
- Desse, G. & Desse, J. 1983. L'identification des vertèbres de poissons; applications au matériel issu de sites archéologiques et paléontologiques. *Archives des Sciences* 36, 291-296.
- Devereux, I. 1967. Temperature measurements from oxygen isotopes ratios of fish otoliths. *Science* 155, 1684-1685.
- Doering, P. 1991. Population Dynamics of Bream *Abramis-Brama* L. and Eel *Anguilla-Anguilla* L. in Lake Tegel of Berlin growth and population density. *Zoologischer Beiträge* 34, 185-239.
- Dove, S.G., Gillanders, B.M. & Kingsford, M.J. 1996. An investigation of chronological differences in the deposition of trace metals in the otoliths of two temperate reef fishes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 205, 15-33.
- Dove, S.G. & Kingsford, M.J. 1998. Use of otoliths and eye lenses for measuring trace-metal incorporation in fishes: a biogeographic study. *Marine Biology* 130, 377-387.
- Driesch, A.V.D. 1994. Hyperostoses in fish. In *Fish exploitation in the past* (Van Neer, W., ed.), pp. 47-53. Tervuren, Belgique: Annales du Musée Royal de l'Afrique Centrale, Sciences Zoologiques.
- Druffel, E.M. & Linick, T.W. 1978. Radiocarbon in annual coral rings of Florida. *Geophysical Research Letters* 5, 913-916.
- Dunkelberger, D.G., Dean, J.M. & Watabe, N. 1980. The ultrastructure of the otolithic membrane and otolith in the juvenile mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Morphology* 163, 367-377.
- Dutta, H. 1994. Growth in Fishes. *Gerontology* 40, 97-112.
- Eales, J.G., Hughes, M. & Vin, L. 1981. Effect of food intake on diel variation in plasma thyroid levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *General and Comparative Endocrinology* 45, 167-174.
- Eckmann, R. & Rey, P. 1987. Daily increments on the otoliths of larval and juvenile *Coregonus* spp., and their modification by environmental factors. *Hydrobiologia* 148, 137-143.

- Edeyer, A., Pontual, H. (de), Payan, P., Troadec, H., Severe, A. & Mayer Gostan, N. 2000. Daily variations of the saccular endolymph and plasma compositions in the turbot *Psetta maxima*: relationship with the diurnal rhythm in otolith formation. *Marine Ecology Progress Series* 192, 287-294.
- Edmonds, J.S., Moran, M.J., Caputi, N. & Morita, M. 1989. Trace element analysis of fish sagittae as an aid to stock identification: Pink snapper (*Chrysopterygion auratus*) in Western Australian waters. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 46, 50-54.
- Edmonds, J.S., Caputi, N. & Morita, M. 1991. Stock discrimination by trace-element analysis of otoliths of orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*), a deep-water marine Teleost. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 42, 383-389.
- Edmonds, J.S., Lenanton, R.C.J., Caputi, N. & Morita, M. 1992. Trace elements in the otoliths of yellow-eye mullet (*Aldrichetta forsterii*) as an aid to stock identification. *Fisheries Research* 13, 39-51.
- Edmonds, J.S., Caputi, N., Moran, M.J., Fletcher, W.J. & Morita, M. 1995. Population discrimination by variation in concentrations of minor and trace elements in sagittae of two western Australia teleosts. In *Recent developments in fish otolith research* (Secor, D.H., Dean, J.M. & Campana, S.E., ed.), pp. 655-670. Columbia, SC, USA: University of South Carolina Press.
- Edmonds, J.S., Steckis, R.A., Moran, M.J., Caputi, N. & Morita, M. 1999. Stock delineation of pink snapper and tailor from Western Australia by analysis of stable isotope and strontium/calcium ratios in otolith carbonate. *Journal of Fish Biology*. 55, 243-259.
- EFAN. 1998. Establishment of a digital image reference database. In *EFAN Report 3/1998* (Troadec, H., ed.), EFAN, pp. 1-42.
- EFAN. 1999. Computer-assisted age reading. In *EFAN Report 2/1999* (Troadec, H. & Lordan, C., ed.), EFAN, pp. 1-32.
- EFAN. 2000. Use of digital tools for exchanging annotated images of calcified structures. In *EFAN Report 8/2000* (Troadec, H., ed.), EFAN, pp. 1-11.
- Elfman, M., Limburg, K.E., Kristiansson, P., Malmqvist, K. & Pallon, J. 1999. Application of micro-PIXE to fish life history analyses: trace element analysis of otoliths. *Nuclear instruments & methods in physics research. Section B: Beam interactions with materials and atoms* 150 (1-4), 272-276.
- Ellison, S.L.R., Rosslein, M., Williams, A. & coll. 2000. *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. EURACHEM/CITAC Guide.
- Eltink, A. & Kuiter, C.J. 1989. Validation of ageing techniques on otoliths of horse mackerel (*Trachurus trachurus* L.). ICES CM 1989/H:43, 15 p.
- Eltink, A.T.G.W., Newton, A.W., Morgado, C., Santamaria, M.T.G. & Modin, J. 2000. Guidelines and tools for age reading comparisons. *EFAN Report 3*, 56 p.

- Eltink, G. 1994. Comparison of otolith readings. Working document for the workshop on sampling strategies for age at maturity. ICES, Copenhagen, Denmark, 36 p.
- Eltink, G. 1997. Horse-mackerel otolith exchange in 1996. ICES C.M., 1997/H:24, 30 p.
- English, T.S. 1952. Growth studies of carp *Cyprinus carpio* L. in Clear Lake, Iowa. *Iowa State Journal of Sciences* 24, 527-540.
- Enlow, D.H. 1963. *Principles of bone remodelling*. Springfield, Illinois, USA: Charles C. Thomas.
- Ennevor, B.C. & Beames, R.M. 1993. Use of lanthanide elements to mass mark juvenile salmonids. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50, 1039-1044.
- Ennevor, B.C. 1994. Mass marking coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, fry with lanthanum and cerium. *Fishery Bulletin* 92, 471-473.
- Epstein, S., Buchsbaum, R., Lowenstam, H.A. & Urey, H.C. 1951. Carbonate-water isotopic temperature scale. *Geological Society of America Bulletin* 62, 417-425.
- Epstein, S., Buchsbaum, R., Lowenstam, H.A. & Urey, H.C. 1953. Revised carbonate-water isotopic temperature scale. *Bulletin of the Geological Society of America* 64, 1315-1326.
- Esdaille, P.C. 1912. Intensive study of the scales of three specimens of *Salmo salar*. *Memoirs and Proceedings, Manchester Literary and Philosophical Society* 56, 3.
- Estep, K.W., Nedreaas, K.H. & MacIntyre, F. 1995. Computer image enhancement and presentation of otoliths. In *Recent developments in fish otolith research* (Secor, D.H., Dean, J.M. & Campana, S.E., ed.), pp. 303-318. Columbia, SC, USA: University of South Carolina Press.
- Estep, M.L.F. & Vigg, S. 1985. Stable carbon and nitrogen isotope tracers of trophic dynamics in natural populations and fisheries of the Lahontan Lake system, Nevada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 42, 1712-1719.
- Fabre, N.N. & Saint-Paul, U. 1998. Annulus formation on scales and seasonal growth of the Central Amazonian anostomid *Schizodon fasciatus*. *Journal of Fish Biology* 53, 1-11.
- Fallon-Cousins, P. 1999. Relationships between otolith accretion, metabolism and somatic growth in three species of Teleosts: Atlantic salmon, haddock, pike. PhD Thesis, Aberdeen University, 175 p.
- Farrell, J. & Campana, S.E. 1996. Regulation of calcium and strontium deposition on the otoliths of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 115A, 103-109.
- Fawel, J.K. 1974. The use of image analysis in the ageing of fish. In *The ageing of Fish* (Bagenal, T.B., ed.), pp. 103-107. London, UK: Unwin Brothers Ltd.

- Fay, R.R. 1980. The goldfish ear codes the axis of acoustic particle motion in three dimension. *Science* 225, 951-963.
- Fenton, G.E., Ritz, D.A. & Short, S.A. 1990. Super(210)Pb/super(226)Ra disequilibria in otoliths of blue grenadier, *Macrurus novaezelandiae*; Problems associated with radiometric ageing. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 41, 467-473.
- Fenton, G.E., Ritz, D.A. & Short, S.A. 1992. Ageing fish using radio-nuclide analysis. In *The measurement of age and growth in fish and shellfish* (Hancock, D.A., ed.), pp. 113-115, Canberra, -A.C.T.-Australia Bureau of Rural Resources.
- Ferron, A. & Leggett, W.C. 1994. An appraisal of condition measures for marine fish larvae. *Advances in Marine Biology* 30, 217-303.
- Fiksen, Ø. & Folkvord, A. 1999. Modelling growth and ingestion processes in herring larvae (*Clupea harengus* L.). *Marine Ecology Progress Series* 184, 273-289.
- Fletcher, W.J. 1991. A test of the relationship between otolith weight and age for the pilchard *Sardinops neopilchardus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48, 35-38.
- Folkvord, A. 1997. Ontogeny of cannibalism in larval and juvenile fish with special emphasis on Atlantic cod, *Gadus morhua* L. In *Early life history and recruitment in fish populations* (Chambers, R.C. & Trippel, E.A., ed.), pp. 335-366. London, UK: Chapman and Hall Ltd.
- Folkvord, A., Blom, G., Johannessen, A. & Moksness, E. 2000. Growth-dependent age estimation in herring (*Clupea harengus* L.) larvae. *Fisheries Research* 46, 91-103.
- Fossum, P., Kalish, J. & Moksness, E. 2000. Special issue: 2nd International Symposium on Fish Otolith Research and Application, Bergen, Norway, 20-25 June 1998. *Fisheries Research* 46, 373 p.
- Fouda, M.M. 1979. Studies on scale structure in the common goby *Pomatoschistus microps* Kroyer. *Journal of Fish Biology* 15, 173-183.
- Fowler, A.J. 1990. Validation of annual growth increments in the otoliths of a small, tropical coral reef fish. *Marine Ecology Progress Series* 64, 25-38.
- Fowler, A.J. & Doherty, P.J. 1992. Validation of annual growth increments in the otoliths of two species of damselfish from the southern Great Barrier Reef. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 43, 1057-1068.
- Fowler, A.J., Campana, S.E., Jones, C.M. & Thorrold, S.R. 1995. Experimental assessment of the effect of temperature and salinity on elemental composition of otoliths using laser ablation ICP-MS. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52, 1431-1441.

- Francillon-Vieillot, H., de Buffrénil, V., Castanet, J., Géraudie, J., Meunier, F.J., Sire, J.Y., Zylberberg, L. & Ricqlès, A. (de) 1990. Microstructure and mineralization of the Vertebrate skeletal tissues. In *Skeletal biomineralization: patterns, processes and evolutionary trends* (Carter, J.G., ed.), pp. 471-530. New York, USA: Van Nostrand Reinhold.
- Francis, M.P. & Mulligan, K.P. 1998. Age and growth of New Zealand school shark, *Galeorhinus galens*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 32, 427-440.
- Francis, R.I.C.C. 1990. Back-calculation of fish length: a critical review. *Journal of Fish Biology* 36, 883-902.
- Francis, R.I.C.C. 1995a. The analysis of otolith data: a mathematician's perspective (What, precisely, is your model?). In *Recent developments in fish otolith research* (Secor, D.H., Dean, J.M. & Campana, S.E., ed.), pp. 81-95. Columbia, SC, USA: University of South Carolina Press.
- Francis, R.I.C.C. 1995b. The problem of specifying otolith-mass growth parameters in the radiometric estimation of fish age using whole otoliths. *Marine Biology* 124, 169-176.
- Francis, R.I.C.C. & Horn, P.L. 1997. Transition zone in otoliths of orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*) and its relationship to the onset of maturity. *Marine Biology* 129, 681-687.
- Francis, R.I.C.C. & Shotton, R. 1997. "Risk" in fisheries management: a review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54, 1699-1715.
- Friedland, K.D. & Reddin, D.G. 1994. Use of otolith morphology in stock discriminations of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 51, 91-98.
- Friedland, K.D., Reddin, D.G., Shimizu, N., Haas, R.E. & Youngson, A.F. 1998. Strontium:calcium ratios in Atlantic salmon (*Salmo salar*) otoliths and observations on growth and maturation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55, 1158-1168.
- Friedman, I. & O'Neill, J.R. 1977. Compilation of stable isotope fractionation factors of geochemical interest. In *Data of Geochemistry* (Fleischer, M., ed.), pp. 12. United States Geological Survey Professional Paper.
- Fuiman, L.A. & Hoff, G.R. 1995. Natural variation in elemental composition of sagittae from red drum. *Journal of Fish Biology* 47, 940-955.
- Gallahar, N.K. & Kingsford, M.J. 1996. Factors influencing Sr/Ca ratios in otoliths of *Girella elevata*: an experimental investigation. *Journal of Fish Biology* 48, 174-186.
- Gallego, A., Heath, M.R., Basford, D.J. & MacKenzie, B.R. 1999. Variability in growth rates of larval haddock in the northern North Sea. *Fisheries Oceanography* 8, 77-92.

- Ganter, P. & Jolles, G. 1969. *Histochimie normale et pathologie*. Paris, France: Gauthiers-Villars.
- Gao, Y.W. & Beamish, R.J. 1999. Isotopic composition of otoliths as a chemical tracer in population identification of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56, 2062-2068.
- Garrod, D.J. 1959. The growth of *Tilapia esculenta* Graham in Lake Victoria. *Hydrobiologia* 12, 268-298.
- Gartner, J.V. (Jr.) 1991. Life histories of three species of lanternfishes (Pisces: Myctophidae) from the eastern Gulf of Mexico. 1. Morphological and microstructural analysis of sagittal otoliths. *Marine Biology* 111, 11-20.
- Gauldie, R.W. 1986. Vaterite otoliths from chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 20, 209-217.
- Gauldie, R.W. 1987. The fine structure of check rings in the otolith of the New Zealand orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 21, 267-274.
- Gauldie, R.W. & Nelson, D.G.A. 1988. Aragonite twinning and neuroprotein secretion are the cause of daily growth rings in fish otoliths. *Comparative Biochemistry and Physiology* 90A, 501-509.
- Gauldie, R.W. 1990. Phase differences between check ring locations in the orange roughy otolith (*Hoplostethus atlanticus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 47, 760-765.
- Gauldie, R.W. & Nelson, D.G.A. 1990a. Interactions between crystal ultrastructure and microincrement layers in fish otoliths. *Comparative Biochemistry and Physiology* 97A, 449-459.
- Gauldie, R.W. & Nelson, D.G.A. 1990b. Otolith growth in fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 97A, 119-135.
- Gauldie, R.W. 1991. The morphology and periodic structures of the otolith of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*), and temperature-dependent variation in otolith microscopic growth increment width. *Acta Zoologica* 72, 159-179.
- Gauldie, R.W. 1993. Continuous and discontinuous growth in the otolith of *Macruronus novaezelandiae* (Merlucciidae: Teleostei). *Journal of Morphology* 216, 271-294.
- Gauldie, R.W., Kellermann, A., Radtke, R. & Sharma, S. 1993. On the evolution of the crystalline structure of catfish otoliths. *Cybium* 17, 299-326.
- Gauldie, R.W., Thacker, C.E. & Merrett, N.R. 1994. Oxygen and carbon isotope variations in the otoliths of *Beryx splendens* and *Coryphaenoides profundicolus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 108A, 153-159.

- Gauldie, R.W. & Xhie, J. 1995. Atomic force microscopy of the morphology of the matrix and mineral components of the otolith of *Hyperoglyphe antarctica*. *Journal of Morphology* **223**, 203-214.
- Gauldie, R.W. 1996. Biological factors controlling the carbon-isotope record in fish otoliths. Principles and evidence. *Comparative Biochemistry and Physiology* **115B**, 201-208.
- Gauldie, R.W. & Coote, G.E. 1997. Diffusion of the cacodylate (dimethylarsinic acid) ion into the otolith of *Hoplostethus atlanticus*. *Fisheries Science* **63**, 486-487.
- Gauldie, R.W., Sharma, S.K. & Volk, E. 1997. Micro-Raman spectral study of vaterite and aragonite otoliths of the coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **118A**, 753-757.
- Gauldie, R.W. & Cremer, M.D. 1998. Loss of super(222)Rn from otoliths of orange roughy, *Hoplostethus atlanticus*, invalidates old ages. *Fisheries Science* **64**, 543-546.
- Geffen, A.J. 1982. Otolith ring deposition in relation to growth rate in herring (*Clupea harengus*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae. *Marine Biology* **71**, 317-326.
- Geffen, A.J. 1983. The deposition of otolith rings in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., embryos. *Journal of Fish Biology* **23**, 467-474.
- Geffen, A.J. 1987. Methods of validating daily increment deposition in otoliths of larval fish. In *The age and growth of fish* (Summerfelt, R.C. & Hall, G.E., ed.), pp. 223-240. Ames, Iowa, USA: The Iowa State University Press.
- Geffen, A.J. 1992. Validation of otolith increment deposition rate. In *Otolith microstructure examination and analysis* (Stevenson, D. K. & Campana, S. E., ed.), pp. 101-113. Ottawa, Canada: Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences.
- Geffen, A.J. & Nash, R.D.M. 1995. Periodicity of otolith check formation in juvenile plaice, *Pleuronectes platessa* L. In *Recent developments in fish otolith research* (Secor, D.H., Dean, J. M. & Campana, S.E., ed.), pp. 65-73. Columbia, SC, USA: University of South Carolina Press.
- Geffen, A.J., Pearce, N.J.G. & Perkins, W.T. 1998. Metal concentrations in fish otoliths in relation to body composition after laboratory exposure to mercury and lead. *Marine Ecology Progress Series* **165**, 235-245.
- Giardina, F.P. & Kuhl, C.R. 1977. Elliptic Fourier features of a closed contour. *Computer Graphics and Image Processing* **18**, 236-248.
- Giraud, M.M., Castanet, J., Meunier, F.J. & Bouligand, Y. 1978. The fibrous structure of coelacanth scales: a twisted "plywood". *Tissue and Cell* **10**, 671-686.
- Giraud-Guille, M.M. 1988. Twisted plywood architecture of collagen fibrils in human compact bone osteons. *Calcified Tissue International* **42**, 167-180.

- Gjosaeter, J., Dayaratne, P., Bergstad, O.A., Gjosaeter, H., Sousa, M.I. & Beck, I.M. 1984. *Ageing tropical fish by growth rings in the otoliths*. Rome, Italy: FAO Fisheries Circular 776.
- Glimcher, M.J. 1998. The nature of the mineral phase in bone: biological and clinical implications. In *Metabolic bone disease and clinically related disorders* (Avioli, L.A. & Krane, S.M., ed.), pp. 23-50. New York, USA: Academic Press.
- Glowacki, J., Cox, K.A., O'Sullivan, J., Wilkie, D. & Deftos, L.J. 1986. Osteoclasts can be induced in fish having an acellular bony skeleton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **83**, 4104-4107.
- González, R.C. & Wintz, P. 1987. *Digital image processing (2nd Edition)*. Addison-Wesley, USA.
- Goodrich, E.S. 1907. On the scales of fish living and extinct, and their importance in classification. *Proceedings of the Zoological Society of London* **2**, 751-774.
- Gordon, J.D.M. & Swan, S.C. 1996. Validation of age readings from otoliths of juvenile roundnose grenadier, *Coryphaenoides rupestris*, a deep-water macrourid fish. *Journal of Fish Biology* **49(Suppl. A)**, 289-297.
- Goss, R.J. 1994. Why study ageing in cold-vertebrates? *Gerontology* **40**, 65-69.
- Goulding, M. 1980. *The fishes and the forest*. Berkeley, USA: University of California Press.
- Grady, J.R., Johnson, A.G. & Sanders, M. 1989. Heavy metal content in otoliths of King Mackerel (*Scomberomorus cavalla*) in relation to body length and age. *Contributions in Marine Science* **31**, 17-23.
- Graham, C.M., Valley, J.W. & Winter, B.L. 1996. Ion microprobe analysis of O-18/O-16 in authigenic and detrital quartz in the St Peter Sandstone, Michigan Basin and Wisconsin Arch, USA: Contrasting diagenetic histories. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **60**, 5101-5116.
- Graham, M. 1929. Studies of age-determination in fish. Part II - A survey of the literature. *Fishery Investigations XI (1928), Series II*, 1-50.
- Grassé, P.P. 1958. L'oreille et ses annexes. In *Traité de Zoologie. Anatomie, systématique, biologie. Tome XIII (1). Agnathes et Poissons : anatomie, éthologie, systématique* (Grassé, P.P., ed.), pp. 1061-1098. Paris, France: Masson.
- Gronkjaer, P. & Schytte, M. 1999. Non-random mortality of Baltic cod larvae inferred from otolith hatch-check sizes. *Marine Ecology Progress Series* **181**, 53-59.
- Grossman, E.L. & Ku, T. 1986. Oxygen and carbon isotope fractionation in biogenic aragonite: temperature effects. *Chemical Geology* **59**, 59-74.

- Gruber, S.H. & Stout, R.G. 1983. Biological materials for the study of age and growth in a tropical Elasmobranch, the lemon shark, *Negaprion brevirostris* (Poey). In *Proceedings of the international workshop on age determination of oceanic pelagic fishes: Tunas, Billfishes, and Sharks* (Prince, E.D. & Pulos, L.M., ed.), pp. 193-205, NOAA Technical Report NMFS 8.
- Guénette, S., Lauck, T. & Clark, C. 1998. Marine reserves: from Beverton and Holt to the present. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 8, 251-272.
- Guillou, A. & de-la-Nouée, J. 1987. Use of strontium as a nutritional marker for farm-reared brook trout. *Progressive Fish Culturist* 49, 34-39.
- Gunn, J.S., Harrowfield, I.R., Proctor, C.H. & Thresher, R.E. 1992. Electron probe microanalysis of fish otoliths: evaluation of techniques for studying age and stock discrimination. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 158, 1-36.
- Gutiérrez, E. & Morales-Nin, B. 1986. Time series analysis of daily growth in *Dicentrarchus labrax* L. otoliths. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 103, 163-179.
- Halden, N.M., Babaluk, J.A., Campbell, J.L. & Teesdale, W.J. 1995. Scanning proton microprobe analysis of strontium in an Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, otolith: implications for the interpretation of anadromy. *Environmental Biology of Fishes* 43, 333-339.
- Halden, N.M., Mejia, S.R., Babaluk, J.A., Reist, J.D., Kristofferson, A.H., Campbell, J.L. & Teesdale, W.J. 2000. Oscillatory zinc distribution in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) otoliths: the result of biology or environment. *Fisheries Research* 46, 289-298.
- Hales, L.S. & Hurley, D.H. 1991. Validation of daily increment formation in the otoliths of juvenile silver perch, *Bairdiella chrysoura*. *Estuaries* 14, 199-206.
- Hall, D.L. 1991. Age validation and aging methods for stunted brook trout. *Transactions of the American Fisheries Society* 120, 644-649.
- Hamrin, S.F., Arneri, E., Doering Arjes, P., Mosegaard, H., Patwardhan, A., Sasov, A., Schatz, M., van Dyck, D., Wickstrom, H. & van Heel, M. 1999. A new method for three-dimensional otolith analysis. *Journal of Fish Biology* 54, 223-225.
- Haralick, R.M. & Shapiro, L.G. 1992. *Computer and robot vision*. Reading, MA: Addison-Wesley, USA.
- Hare, J.A. & Cowen, R.K. 1995. Effect of age, growth rate, and ontogeny on the otolith size - fish size relationship in bluefish, *Pomatomus saltatrix*, and the implications for back-calculation of size in fish early life history stages. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52, 1909-1922.
- Hare, J.A. & Cowen, R.K. 1997. Size, growth, development, and survival of the planktonic larvae of *Pomatomus saltatrix* (Pisces: Pomatomidae). *Ecology* 78, 2415-2431.

- Haskell, W.L. 1949. An investigation of the possibility of determining the age of sharks through annuli as shown in cross sections of vertebrae. *Annual Report of the Marine Laboratory Texas Game Fish Commission*, 212-217.
- Hasselblad, V. 1966. Estimation of parameters for a mixture of normal distributions. *Technometrics* 8, 434-444.
- Heath, M.R. 1992. Field investigations of the early life stages of marine fish. *Advances in Marine Biology* 28, 1-133.
- Hecht, T. 1979. The value of otoliths in fresh water fisheries biology and taxonomy. *Publications of the University of the North, Series A*, 19, 17 p.
- Hederström, H. 1759. Rön an Fiskars Älder. *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar, (Stockholm)* 20, 222-229.
- Heincke, F. 1904. Das Vorkommen und die Verbreitung der Eier der Larven und der verschiedenen Alterstufen der Nutzfische in der Nordsee. *Rapports et Procès-verbaux des réunions du Conseil international pour l'exploration de la mer* 3, 1-41.
- Heincke, F. 1908. Die Alterbestimmung der Fische. *Beteiligung Deutschlands an der internationalen Meeresforschung, Berlin* 4-5, 66-155.
- Hendricks, M.L., Bender, T.R.J. & Mudrak, V.A. 1991. Multiple marking of American shad otoliths with tetracycline antibiotics. *North American Journal of Fisheries Management* 11, 212-219.
- Herring, G.M. 1972. The organic matrix of bone structure. In *The biochemistry and physiology of bone. Vol. 1: Structure* (Bourne, G.H., ed.), pp. 128-189. New York, USA: Academic Press.
- Hettler, W.F. 1984. Marking otoliths by immersion of marine fish larvae in tetracycline. *Transactions of the American Fisheries Society* 113, 370-373.
- Hilborn, R. & Walters, C.J. 1992. *Quantitative fisheries stock assessment: choice, dynamics and uncertainty*. New York, USA: Chapman & Hall, Inc.
- Hilborn, R., Pikitch, E.K. & Francis, R.C. 1993. Current trends in including risk and uncertainty in stock assessment and harvest decisions. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50, 847-880.
- Hjort, J. 1914. Fluctuations in the great fisheries of northern Europe viewed in light of biological research. *Rapports et Procès-verbaux des réunions du Conseil international pour l'exploration de la mer* 19, 1-228.
- Hobson, K.A. 1999. Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: a review. *Oecologia* 120, 314-326.
- Hoedt, F.E. 1992. Validation of daily growth increments in otoliths from *Thryssa aestuaria* (Ogilby), a tropical anchovy from Northern Australia. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 43, 1043-1050.
- Hoei, H.I. 1997. Maternal, parental and temperature effects on otolith size of young herrings (*Clupea harengus* L.) larvae: an experimental study. PhD Thesis, University of Bergen, 83 p.

- Hoening, J.M. & Walsh, A.H. 1982. The occurrence of cartilage canals in shark vertebrae. *Canadian Journal of Zoology* **60**, 483-485.
- Hoening, J.M., Morgan, M.J. & Brown, C.A. 1995. Analysing differences between two age determination methods by test of symmetry. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **56**, 364-368.
- Hoff, G.R. & Fuiman, L.A. 1993. Morphometry and composition of red drum otoliths: changes associated with temperature, somatic growth rate, and age. *Comparative Biochemistry and Physiology* **106A**, 209-219.
- Hoff, G.R. & Fuiman, L.A. 1995. Environmentally induced variation in elemental composition of red drum (*Sciaenops ocellatus*) otoliths. *Bulletin of Marine Science* **56**, 578-591.
- Hoffbauer, C. 1898. Die Alterbestimmung des Karpfen an seiner Schuppe. *Allgemeine Fischerei-Zeitung* **23**, 341-343.
- Hoffbauer, C. 1900. Die Alterbestimmung des Karpfen an seiner Schuppe. *Allgemeine Fischerei-Zeitung* **25**, 135-139; 150-156; 297.
- Hoffbauer, C. 1905. Weitere Beiträge zur Alter- und Wachstumsbestimmung der Fische, spez. des Karpfens. *Zeitschrift für Fischerei* **12**, 111-142.
- Holden, M.J. & Meadows, P.S. 1962. The structure of the spine of the spurdog fish (*Squalus acanthias* L.) and its use for age determination. *Journal of the Marine Biology Association, UK* **42**, 179-197.
- Holden, M.J. & Vince, M.R. 1973. Age validation studies on the centra of *Raja clavata* using tetracycline. *Rapports et Procès-verbaux des réunions du Conseil international pour l'exploration de la mer* **35**, 13-17.
- Hopkins, C.C.E., Nyholmen, O. & Solheim, L. 1986. Qualitative and quantitative models relating otolith zone deposition to growth and condition in sexually mature male and female capelin (*Mallo- tus villosus*). *Polar Biology* **6**, 25-36.
- Houde, E.D. 1987. Fish early life dynamics and recruitment variability. In *American Fisheries Society Symposium Series, 10th Annual Larval Fish Conference. Proceedings of a conference held in Miami, Florida, USA, May 18-23, 1986* (Hoyt, R.D., ed.), pp. 17-29, American Fisheries Society.
- Hovenkamp, F. 1992. Growth-dependent mortality of larval plaice *Pleuronectes platessa* in the North Sea. *Marine Ecology Progress Series* **82**, 95-101.
- Hughes, D.R., Bassett, J.R. & Moffat, L.A. 1994. Histological identification of osteocytes in the allegedly acellular bone of the sea breams *Acanthopagrus australis*, *Pagrus auratus* and *Rhabdosargus sarba* (Sparidae, Perciformes, Teleostei). *Anatomy and Embryology* **190**, 163-179.
- Hureau, J.C. & Ozouf, C. 1977. Détermination de l'âge par scalimétrie et croissance du coelacanthé *Latimeria chalumnae* Smith, 1939 (Poisson, Crossoptérygien, Coelacanthidé). *Cybiurn* **2**, 129-137.

- Hyndes, G.A., Loneragan, N.R. & Potter, I.C. 1992. Influence of sectioning otoliths on marginal increment trends and age and growth estimates for the flathead *Platycephalus speculator*. *Fishery Bulletin* 90, 276-284.
- Iacumin, P., Bianucci, G. & Longinelli, A. 1992. Oxygen and carbon isotopic composition of fish otoliths. *Marine Biology* 113, 537-542.
- ICES. 1998. Report of the workshop on otolith ageing of North Sea whiting. ICES CM 1998/G:14, 66 p.
- ICES. 1999. Report of the Horse Mackerel otolith workshop. ICES CM 1999/G:16, 8 p.
- Ichiara, T. 1963. Photometric method for counting laminae in earplug of baleen whale. *Scientific Reports of Whales Res. Institute* 17, 37-48.
- Imsland, A.K., Nilsen, T. & Folkvord, A. 1998. Stochastic simulation of size variation in turbot: possible causes analysed with an individual-based model. *Journal of Fish Biology* 53, 237-258.
- Ingram, B.L. & Weber, P.K. 1999. Salmon origin in California's Sacramento-San Joaquin river system as determined by otolith strontium isotopic composition. *Geology* 27, 851-854.
- Ishiyama, R. 1951. Studies on the rays and skates belonging to the family Rajidae, found in Japan and adjacent regions. 2. On the age determination of Japanese black skate *Raja fusca* Garman (preliminary report). *Bulletin of the Japanese Society of Sciences and Fisheries* 16, 112-118.
- Itoh, T. & Tsuji, S. 1996. Age and growth of juvenile southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii* based on otolith microstructure. *Fishery Sciences* 62, 892-896.
- Jacobson, L.D., Lo, N.C.H. & Barnes, J.T. 1994. A biomass-based assessment model for northern anchovy, *Engraulis mordax*. *Fishery Bulletin* 92, 711-724.
- Janvier, P. 1996. *Early Vertebrates*. Oxford, UK: Clarendon Press.
- Jearld, A. 1995. Clinic overview: Image analysis systems. In *Recent developments in fish otolith research* (Secor, D.H., Dean, J.M. & Campana, S.E., ed.), pp. 721-722. Columbia, SC, USA: University of South Carolina Press.
- Jearld, A. (Jr.), Sass, S.L. & Davis, M.F. 1993. Early growth, behavior, and otolith development of the winter flounder *Pleuronectes americanus*. *Fishery Bulletin* 91, 65-75.
- Johnson, A.G. 1983. Age and growth of yellowtail snapper from South Florida. *Transactions of the American Fisheries Society* 112, 173-177.
- Johnson, A.G. & Saloman, C.H. 1984. Age, growth, and mortality of gray triggerfish, *Balistes capriscus*, from the northeastern Gulf of Mexico. *Fishery Bulletin* 82, 485-492.
- Johnston, H.W. 1905. Scales of the Tay salmon as indicative of age, growth and spawning habit. *Annual Report of the Fisheries Board of Scotland* 23, 1-63.

- Johnston, H.W. 1907. The scales of salmon. *Annual Report of the Fishery Board of Scotland* 25, 54-65.
- Johnston, H.W. 1908. The scales of salmon. *Annual Report of the Fishery Board of Scotland* 26, 62-64.
- Johnston, H.W. 1910. The scales of salmon. *Annual Report of the Fishery Board of Scotland* 28, 21-24.
- Jones, C.M. 2000. Fitting growth curves to retrospective size-at-age data. *Fisheries Research* 46, 123-129.
- June, F.C. & Roithmayr, C.M. 1960. Determining age of Atlantic menhaden from their scales. *Fishery Bulletin* 60, 323-342.
- Junk, W.J. 1985. Temporary fat storage, an adaptation of some fish species to the water level fluctuations and related environmental changes of the Amazon river. *Amazoniana* 9, 315-351.
- Kacem, A., Gustafsson, S. & Meunier, F.J. 2000. Demineralization of the vertebral skeleton in Atlantic salmon *Salmo salar* L., during spawning migration. *Comparative Biochemistry and Physiology* 125, 479-484.
- Kacem, A. & Meunier, F.J. 2000. Mise en évidence de l'ostéolyse péri-ostéocytaire vertébrale chez le saumon atlantique *Salmo salar* L. (Salmonidae, Teleostei), au cours de sa migration anadrome. *Cybiurn* 24 (3 suppl.), 105-112.
- Kaganovskaia, S.M. 1933. Methods for ascertaining the age and composition of the catch of *Squalus acanthias* L. *Vestnik Dal'nevostochnogo Filiala, Akademya Nauk, SSSR (Vladivostock)* 1-3, 139-141.
- Kalish, J.M. 1989. Otolith microchemistry: validation of the effects of physiology, age and environment on otolith composition. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 132, 151-178.
- Kalish, J.M. 1990. Use of otolith microchemistry to distinguish the progeny of sympatric anadromous and non-anadromous salmonids. *Fishery Bulletin* 88, 657-666.
- Kalish, J.M. 1991a. Determinants of otolith chemistry: seasonal variation in the composition of blood plasma, endolymph, and otoliths of bearded rock cod, *Pseudophycis barbattus*. *Marine Ecology Progress Series* 74, 137-159.
- Kalish, J.M. 1991b. Super(13)C and super(18)O isotopic disequilibria in fish otoliths: metabolic and kinetic effects. *Marine Ecology Progress Series* 75, 191-203.
- Kalish, J.M. 1991c. Oxygen and carbon stable isotopes in the otoliths of wild and laboratory-reared Australian salmon (*Arripis trutta*). *Marine Biology* 110, 37-47.
- Kalish, J.M. 1993. Pre- and post-bomb radiocarbon in fish otoliths. *Earth and Planetary Science Letters* 114, 549-554.

- Kalish, J.M. 1995. Radiocarbon and fish biology. In *Recent developments in fish otolith research* (Secor, D.H., Dean, J.M. & Campana, S.E., ed.), pp. 637-651. Columbia, SC, USA: University of South Carolina Press.
- Kalish, J.M., Beamish, R.J., Brothers, E.B., Casselman, J.M., Francis, C., Mosegaard, H., Panfili, J., Prince, E.D., Thresher, R.E., Wilson, C.A. & Wright, P.J. 1995. Glossary. In *Recent developments in fish otolith research* (Secor, D.H., Dean, J.M. & Campana, S.E., ed.), pp. 723-729. Columbia, SC, USA: University of South Carolina Press.
- Kalish, J.M., Livingston, M.E. & Schofield, K.A. 1996. Trace elements in the otoliths of New Zealand blue grenadier (*Macruronus novaezelandiae*) as an aid to stock discrimination. *Marine and Freshwater Research* 47, 537-542.
- Kalish, J.M., Johnston, J.M., Smith, D.C., Morison, A.K. & Robertson, S.G. 1997. Use of the bomb radiocarbon chronometer for age validation in the blue grenadier *Macruronus novaezelandiae*. *Marine Biology* 128, 557-563.
- Karakiri, M. & Westernhagen, H. 1989. Daily growth patterns in otoliths of larval and post-larval plaice (*Pleuronectes platessa*): influence of temperature, salinity and light conditions. *Rapports et Procès-verbaux des réunions du Conseil international pour l'exploration de la mer* 191, 376-382.
- Karlou Riga, C. 2000. Otolith morphology and age and growth of *Trachurus mediterraneus* (Steindachner) in the Eastern Mediterranean. *Fisheries Research* 46, 69-82.
- Kastelle, C.R., Kimura, D.K., Nevissi, A.E. & Gunderson, D.R. 1994. Using Pb-210/Ra-226 disequilibria for sablefish, *Anoplopoma fimbria*, age validation. *Fishery Bulletin* 92, 292-301.
- Kastelle, C.R., Kimura, D.K. & Jay, S.R. 2000. Using Pb-210/Ra-226 disequilibrium to validate conventional ages in Scorpaenids (genera *Sebastes* and *Sebastolobus*). *Fisheries Research* 46, 299-312.
- Kaufmann, K.W. 1981. Fitting and using growth curves. *Oecologia (Berlin)* 49, 293-299.
- Kennedy, B.P., Folt, C.L., Blum, J.D. & Chamberlain, C.P. 1997. Natural isotope markers in salmon. *Nature* 387, 766-767.
- Kennedy, B.P., Blum, J.D., Folt, C.L. & Nislow, K.H. 2000. Using natural strontium isotopic signatures as fish markers: methodology and application. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57, 2280-2292.
- Kerr, T. 1952. The scales of primitive living Actinopterygians. *Proceedings of the Zoological Society of London* 122, 55-78.
- Kerr, T. 1955. The scales of modern lungfish. *Proceedings of the Zoological Society of London* 125, 335-345.

- Kerry, J., Hiney, M., Coyne, R., Cazabon, D., NicGabhainn, S. & Smith, P. 1994. Frequency and distribution of resistance to oxytetracycline in micro-organisms isolated from marine fish farm sediments following therapeutic use of oxytetracycline. *Aquaculture* 123, 43-54.
- Key, R.M. 1997. Changes in the Pacific Ocean distribution of radiocarbon. *US WOCE Report 1997. US WOCE Implementation, US WOCE Office, College Station, TX, Report Number 9*, 5-8.
- Kimura, D.K. 1977. Statistical assessment of the age-length key. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 34, 317-324.
- Kimura, D.K. & Lyons, J.J. 1991. Between-reader bias and variability in the age-determination process. *Fishery Bulletin* 89, 53-60.
- Kimura, D.K. & Kestelle, C.R. 1995. Perspectives on the relationship between otolith growth and the conversion of isotope activity ratios to fish ages. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52, 2296-2303.
- Kingsford, M.J. & Atkinson, M.H. 1994. Increments in otoliths and scales: How they relate to the age and early development of reared and wild larval and juvenile *Pagrus auratus* (Sparidae). *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 45, 1007-1021.
- Kishiro, T. & Nakazono, A. 1991. Seasonal patterns of larval settlement and daily otolith increments in the temperate wrasse *Haliboeres tenuispinis*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57, 409-415.
- Klaatsch, H. 1890. Zur Morphologie der Fischechuppen und zur Geschichte der Hartsubstanzgewebe. *Gegenbaurs morphologisches Jahrbuch* 16, 209-258.
- Klevezal, G.A. & Kleinenberg, S.E. 1967. *Age determination of mammals from annual layers in teeth and bones*. Jerusalem, Israel: Translated from Russian by Israel Progr. Scientific Translat., 1969.
- Koeck, G., Noggler, M. & Hofer, R. 1996. Pb in otoliths and opercula of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) from oligotrophic lakes. *Water Research* 30, 1919-1923.
- Kohn, M.J., Schoeninger, M.J. & Valley, J.W. 1996. Herbivore tooth oxygen isotope compositions: effects of diet and physiology. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 60, 3889-3896.
- Kölliker, A. 1859. On the different types in the microscopic structure of the skeleton of osseous fish. *Proceedings of the Royal Society of London* 9, 656-688.
- Kolodny, Y., Luz, B. & Navon, O. 1983. Oxygen isotope variations in phosphate of biogenic apatites. I. Fish bone apatite: rechecking the rules of the game. *Earth and Planetary Science Letters* 64, 398-404.
- Kuntzman. 1824. Bemerkungen über die Schuppen der Fische. *Verhandlungen Lung. Gesellschaft Naturforschung Freunde, Berlin*, 269-284.

- La Roche, G., Woodall, A.N., Johnson, C.L. & Halver, J.E. 1966. Thyroid function in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) II. Effects of thyroidectomy on the development of young fish. *General and Comparative Endocrinology*, 249-266.
- Laerm, J. 1976. The development, function, and design of amphicoelus vertebrae in Teleost fishes. *Zoological Journal of the Linnean Society* 58, 237-254.
- Lagardère, F. 1989. Influence of feeding conditions and temperature on the growth rate and otolith-increment deposition of larval Dover sole (*Solea solea* (L.)). *Rapports et Procès-verbaux des réunions du Conseil international pour l'exploration de la mer* 191, 390-399.
- Lagardère, F., Chaumillon, G., Amara, R., Heineman, G. & Lago, J. M. 1995. Examination of otolith morphology and microstructure using laser scanning microscopy. In *Recent developments in fish otolith research* (Secor, D.H., Dean, J.M. & Campana, S.E., ed.), pp. 7-26. Columbia, SC, USA: University of South Carolina Press.
- Lagardère, F. & Troadec, H. 1997. Age estimation in common sole *Solea solea* larvae: validation of daily increments and evaluation of a pattern recognition technique. *Marine Ecology Progress Series* 155, 223-237.
- Lai, H.L. 1993. Optimal sampling design for using the age-length key to estimate age composition of a fish population. *Fishery Bulletin* 92, 382-388.
- Laine, A.O., Momot, W.T. & Ryan, P.A. 1991. Accuracy of using scales and cleithra for aging northern pike from an oligotrophic Ontario lake. *North American Journal of Fisheries Management* 11, 220-225.
- Lapi, L.A. & Mulligan, T.J. 1981. Salmon stock identification using a microanalytical technique to measure elements present in the freshwater growth region of scales. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 38, 744-751.
- Laurec, A., Biseau, A. & Charuau, A. 1991. Modelling technical interactions. *ICES Marine Science Symposia* 193, 225-236.
- Lea, E. 1911. A study in the growth of herrings. *Rapports et Procès-verbaux des réunions du Conseil international pour l'exploration de la mer* 61, 35-64.
- Lecomte, F., Meunier, F.J. & Rojas-Beltran, R. 1985. Mise en évidence d'un double cycle de croissance annuel chez un silure de Guyane, *Arius couma* (Val, 1839) (Teleostei, Siluriforme, Ariidae) à partir de l'étude squelettochronologique des épines des nageoires. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Paris*, Série III, 300, 181-184.
- Lecomte, F., Meunier, F.J. & Rojas-Beltran, R. 1986. Données préliminaires sur la croissance de deux Téléostéens de Guyane, *Arius proops* (Ariidae, Siluriformes) et *Leporinus friderici* (Anostomidae, Characoidei). *Cybium* 10, 121-134.

- Lecomte, F., Meunier, F.J. & Rojas-Beltran, R. 1989. Some data on the growth of *Arius proops* (Ariidae, Siluriforme) in the estuaries of French Guiana. *Aquatic Living Resources* 2, 63-68.
- Lecomte, F., Boujard, T., Meunier, F.J., Renno, J.F. & Rojas-Beltran, R. 1993. The growth of *Myleus rhomboidalis* (Cuvier, 1817) (Characiforme, Serrasalminidae) in two rivers of French Guiana. *Revue d'Écologie (La Terre et la Vie)* 48, 431-444.
- Lecomte-Finiger, R. 1992. Growth history and age at recruitment of European glass eels (*Anguilla anguilla*) as revealed by otolith microstructure. *Marine Biology* 114, 205-210.
- Leeuwenhoek, A. 1696. Opera omnia, Lugduni Batavorum. *Epistola* 107, 191-192.
- Leggett, W.C. & DeBlois, E. 1994. Recruitment in marine fishes: is it regulated by starvation and predation in the egg and larval stages? *Netherlands Journal of Sea Research* 32, 119-134.
- Lehtonen, H., Nyberg, K., Vuorinen, P.J. & Leskela, A. 1992. Radioactive strontium (super(85)Sr) in marking whitefish (*Coregonus lavaretus* (L.)) larvae and the dispersal of larvae from river to sea. *Journal of Fish Biology* 41, 417-423.
- Lessa, R., Santana, F.M. & Paglerani, R. 1999. Age, growth and stock structure of the oceanic whitetip shark, *Carcharhinus longimanus*, from the southwestern equatorial Atlantic. *Fisberies Research* 42, 21-30.
- Liew, P.K.L. 1974. Age determination of American eels based on the structure of their otoliths. In *The ageing of fish* (Bagenal, T.B., ed.), pp. 124-136. London, UK: Unwin Brothers Ltd.
- Limburg, K.E. 1995. Otolith strontium traces environmental history of subyearling American shad *Alosa sapidissima*. *Marine Ecology Progress Series* 119, 25-35.
- Limburg, K.E. 1998. Anomalous migrations of anadromous herrings revealed with natural chemical tracers. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55, 431-437.
- Linkowski, T.B. 1991. Otolith microstructure and growth patterns during the early life history of lanternfishes (family Myctophidae). *Canadian Journal of Zoology* 69, 1777-1792.
- Linkowski, T.B. 1996. Lunar rhythms of vertical migrations coded in otolith microstructure of North Atlantic lanternfishes, genus *Hygophum* (Myctophidae). *Marine Biology* 124, 495-508.
- Lombarte, A. & Morales-Nin, B. 1989. Growth of *Nezumia aequalis* and *Coelorhynchus fasciatus* (Pisces: Macruridae) in Namibian waters. *Collection of Scientific Papers of ICSEAF* 16, 191-198.
- Lombarte, A. & Leonart, J. 1993. Otolith size changes related with body growth, habitat depth and temperature. *Environmental Biology of Fishes* 37, 297-306.

- López, E. 1973. Étude morphologique et physiologique de l'os cellulaire des poissons Téléostéens. *Mémoires du Museum National d'Histoire Naturelle* 80, 1-90.
- Lorson, R.D. & Mudrak, V.A. 1987. Use of tetracycline to mark otoliths of American shad fry. *North American Journal of Fisheries Management* 7, 453-455.
- Loubens, G. 1978. Biologie de quelques espèces de Poissons du lagon néo-calédonien. I. Détermination de l'âge (otolithométrie). *Cahiers ORSTOM, série Océanographie* 16, 263-283.
- Loubens, G. & Panfili, J. 1992. Estimation de l'âge individuel de *Prochilodus nigricans* (Teleostei, Prochilodidae) dans le Béni (Bolivie) : protocole d'étude et application. *Aquatic Living Resources* 5, 41-56.
- Loubens, G. & Panfili, J. 1997. Biologie de *Colossoma macropomum* (Teleostei, Serrasalmidae) dans le bassin du Mamoré (Amazonie bolivienne). *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 8, 1-22.
- Loubens, G. & Panfili, J. 2000. Biologie de *Pseudoplatystoma fasciatum* et *P. tigrinum* (Teleostei, Pimelodidae) du bassin du Mamoré (Amazonie bolivienne). *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 11, 13-34.
- Lowe-McConnell, R.H. 1964. The Fishes of the Rupununi savanna district of British Guiana, South America. Part 1. Ecological groupings of fish species and effects of the seasonal cycle on the fish. *Journal of the Linnean Society (Zoology)* 45, 103-144.
- Lowe-McConnell, R.H. 1979. Ecological aspects of seasonality in fishes of tropical waters. *Symposium of the Zoological Society, London* 44, 219-241.
- Lowenstein, O. 1971. The labyrinth. In *Fish physiology* (Hoar, W.S. & Randall, D.J., ed.), pp. 207-240. New York, USA: Academic Press.
- Lychakov, D.V., Boyadzhieva Mikhailova, A., Christov, I. & Evdokimov, I.I. 2000. Otolithic apparatus in Black Sea Elasmobranchs. *Fisheries Research* 46, 27-38.
- Machias, A., Tsimenides, N., Kokokiris, L. & Divanach, P. 1998. Ring formation on otoliths and scales of *Pagrus pagrus*: a comparative study. *Journal of Fish Biology* 52, 350-361.
- Macy, W.K. 1995. The application of image processing to the aging of long-finned squid, *Loligo pealei*, using the statolith. In *Recent developments in fish otolith research* (Secor, D.H., Dean, J.M. & Campana, S.E., ed.), pp. 283-302. Columbia, SC, USA: University of South Carolina Press.
- Magnin, E. 1962. Recherches sur la systématique et la biologie des Acipenséridés (*Acipenser sturio* L., *A. oxyrinchus* Mitchill et *A. fulvescens* Raf.). *Annales de la Station Centrale d'Hydrobiologie Appliquée* 9, 9-242.
- Magnusson, K.G. 1995. An overview of the multispecies VPA, theory and applications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 5, 195-212.

- Mahon, R. 1985. Towards the inclusion of fishery interactions in management advice. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences* 1347.
- Maisey, J.G. 1979. Finspine morphogenesis in squalid and heterodontid sharks. *Zoological Journal of the Linnean Society* 66, 161-183.
- Mann, R.H.K. & Beaumont, W.R.C. 1990. Fast- and slow-growing pike, *Esox lucius* L., and problems of age-determinations from scales. *Aquaculture and Fisheries Management* 21, 471-478.
- Mann, S., Parker, S.B., Ross, M.D., Skarnulis, A.J. & Williams, R.J.P. 1983. The ultrastructure of the calcium carbonate balance organs of the inner ear: an ultra-high resolution electron microscopy study. *Proceedings of the Research Society of London* 218, 415-424.
- Markert, F. 1896. Die Flossenstocheln von *Acanthias*. Ein Beitrag zur Kenntnis der Hartsubstanzgebilde der Elasmobranchier. *Zoologische Jahrbücher der Abteilung für Anatomie* 9, 722.
- Marr, D. & Hildreth, E. 1980. Theory of edge detection. *Proceedings of the Royal Society of London* 207B, 187-217.
- Marr, D. 1982. *Vision: a computational investigation into the human representation and processing of visual information*. San Francisco, USA: Freeman, W.H. and Company.
- Marshall, S.L. & Parker, S.S. 1982. Pattern identification in the microstructure of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 39, 542-547.
- Marzolf, R.C. 1955. Use of pectoral spines and vertebra for determining age and rate of growth of the channel catfish. *Journal of Wildlife Management* 19, 243-249.
- Mason, J.E. 1974. A semi-automatic machine for counting and measuring circuli on fish scales. In *The ageing of fish* (Bagenal, T.B., ed.), pp. 87-102, London, UK: Unwin Brothers Ltd.
- Massuti, E., Morales-Nin, B. & Stefanescu, C. 1995. Distribution and biology of five grenadier fish (Pisces, Macrouridae) from the upper and middle slope of the northwestern Mediterranean. *Deep Sea Research* 42, 307-330.
- Masterman, A.T. 1913. Report on investigations upon the salmon with special reference to age-determination by the study of scales. *Fishery Investigation* 1, 1-3.
- Matheron, G. 1975. *Random sets and integral geometry*. New York, USA: Wiley.
- Matlock, G.C., Colura, R.L., Maciorowski, A.F. & McEachron, L.W. 1987. Use of on-going tagging programs to validate scale readings. In *The age and growth of fish* (Summerfelt, R.C. & Hall, G.E., ed.), pp. 279-286. Ames, Iowa, USA: The Iowa State University Press.
- Matrajt, H., Laval-Jeantet, M. & Juster, M. 1964. Étude histochimique et microradiographique de l'os non déminéralisé. In *L'ostéoporose* (Hioco, D.J., ed.), pp. 7-24. Paris, France: Masson.

- Matty, A.J. 1985. *Fish endocrinology*. London, UK & Sydney, Australia: Croom Helm.
- May, A.W. 1965. The validity of otolith ages of southern Grand Bank cod. *ICNAF Research Bulletin* 2, 19-24.
- May, H.M.A. & Jenkins, G.P. 1992. Patterns of settlement and growth of juvenile flounder *Rhombosolea tapirina* determined from otolith microstructure. *Marine Ecology Progress Series* 79, 203-214.
- McCart, P. 1967. Scale regeneration in the bluespot goby, *Coryphopterus nicholsi*. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* 24, 433-434.
- McCurdy, W.J. 1985. A low-speed alternative method for cutting otolith sections. *Journal du Conseil permanent international pour l'exploration de la mer* 42, 186-187.
- McCurdy, W.J., Appelberg, M., Ayers, R., Belcari, P., Bolle, L., Cendrero, O., Easey, M.W., Fossum, P., Hammer, C., Hansen, F.I. & Raitaniemi, J. 2000. Guidelines for the quality assurance of fish age determinations. *EFAN Report* 5/2000, 9p.
- McDonald, P.D.M. & Pitcher, T.J. 1979. Age groups from size-frequency data: a versatile and efficient method of analyzing distribution mixtures. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* 36, 987-1001.
- McFarlane, G.A. & Beamish, R.J. 1987. Selection of dosages of oxytetracycline for age validation studies. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 44, 905-909.
- McFarlane, G.A., Wydoski, R.S. & Prince, E.D. 1990. Historical review of the development of external tags and marks. *American Fisheries Society Symposium* 7, 9-29.
- McGowan, M.F., Prince, E.D. & Lee, D.W. 1987. An inexpensive microcomputer-based system for making rapid and precise counts and measurements of zonation in video displayed skeletal structures of fish. In *Age and Growth of Fish* (Summerfelt, R.C. & Hall, G.E., ed.), pp. 385-395. Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press.
- McGurk, M.D. 1984. Effects of delayed feeding and temperature on the age of irreversible starvation and on the rates of growth and mortality of Pacific herring larvae. *Marine Biology* 84, 13-26.
- Meekan, M.G. & Fortier, L. 1996. Selection for fast growth during the larval life of atlantic cod *Gadus morhua* on the Scotian shelf. *Marine Ecology Progress Series* 137, 25-37.
- Megrey, B.A. 1989. Review and comparison of age-structured stock assessment models from theoretical and applied points of view. *American Fisheries Society Symposium* 6, 8-48.
- Menon, M.D. 1950. The use of bones other than otoliths in determining the age and growth rate of fishes. *Journal du Conseil permanent international pour l'exploration de la mer* 16, 311-335.

- Messieh, S.N., MacDougall, C. & Claytor, R. 1989. Separation of Atlantic herring (*Clupea harengus*) stocks in the southern Gulf of St. Lawrence using digitized otolith morphometrics and discriminant function analysis. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences* 1647.
- Metcalfe, N.B., Wright, P.J. & Thorpe, J.E. 1992. Relationships between social status, otolith size at first feeding and subsequent growth in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Animal Ecology* 61, 585-589.
- Methot, R.D. 1981. Growth rates and age distributions of larval and juvenile northern anchovy, *Engraulis mordax*, with inferences on larval survival. PhD Thesis, University of California, San Diego, USA, 209 p.
- Meunier, F.J. 1974. La technique de marquage vital des tissus squelettiques des poissons. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 255, 51-57.
- Meunier, F.J. & Boivin, G. 1974. Divers aspects de la fixation du chlorhydrate de tétracycline sur les tissus squelettiques de quelques Téléostéens. *Bulletin de la Société Zoologique de France* 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. *Annales de Biologie Animale, de Biochimie Biophysique* 18, 1293-1308.
- Meunier, F.J., Pascal, M. & Loubens, G. 1979. Comparaison de méthodes squelettechronologiques et considérations fonctionnelles sur le tissu osseux acellulaire d'un Ostéichthyen du lagon néo-calédonien. *Aquaculture* 17, 137-157.
- Meunier, F.J. 1980. Recherches histologiques sur le squelette dermique des Polypteridae. *Archives de Zoologie Générale et Expérimentale* 121, 279-295.
- Meunier, F.J. & François, Y. 1980. L'organisation spatiale des fibres collagènes et la minéralisation des écailles des Dipneustes actuels. *Bulletin de la Société Zoologique de France* 105, 215-226.
- Meunier, F.J. & Pascal, M. 1981. Étude expérimentale de la croissance cyclique des rayons de nageoire de la carpe (*Cyprinus carpio* L.) : résultats préliminaires. *Aquaculture* 26, 23-40.
- Meunier, F.J. & Castanet, J. 1982. Organisation spatiale des fibres de collagène de la plaque basale des écailles des Téléostéens. *Zoologica Scripta* 11, 141-153.
- Meunier, F.J. 1983. *Les tissus osseux des Ostéichthyens. Structure, genèse, croissance et évolution*. Paris, France: Muséum National d'Histoire Naturelle, SN 82-600-328.

- Meunier, F.J. 1984a. Structure et minéralisation des écailles de quelques Osteoglossidae (Ostéichthyens, Téléostéens). *Annales de Sciences Naturelles, Zoologie, 13^e série* 6, 11-124.
- Meunier, F.J. 1984b. Spatial organisation and mineralisation of the basal plate of elasmoid scales in Osteichthyans. *American Zoologist* 24, 953-964.
- Meunier, F.J. 1987. Os cellulaire, os acellulaire et tissus dérivés chez les Ostéichthyens : les phénomènes de l'acellularisation et de la perte de la minéralisation. *L'Année Biologique* 26, 201-233.
- Meunier, F.J., Gayet, M., Géraudie, J., Sire, J.Y. & Zylbelberg, L. 1987. Données ultrastructurales sur la ganoïne du dermosquelette des Actinoptérygiens primitifs. In *Proceedings of the VIIIth international symposium of Dental Morphology* (Russell, D.E., Santoro, J.P. & Sigogneau-Russel, D., ed.), pp. 77-83, Mémoires du Museum National d'Histoire Naturelle (Sér. C).
- Meunier, F.J. 1987-1988. Nouvelles données sur l'organisation spatiale des fibres de collagène de la plaque basale des écailles des Téléostéens. *Annales de Sciences Naturelles, Zoologie, 13^e série* 9, 113-121.
- Meunier, F.J. 1988. Détermination de l'âge individuel chez les Ostéichthyens à l'aide de la squelettochronologie : historique et méthodologie. *Acta Oecologica, Oecologia Generalis* 9, 299-329.
- Meunier, F.J. & François, Y. 1992a. Croissance du squelette chez les Téléostéens. I. Squelette, os, tissus squelettiques. *L'Année Biologique* 31, 169-184.
- Meunier, F.J. & François, Y. 1992b. Croissance du squelette chez les Téléostéens. II. La croissance du squelette. *L'Année Biologique* 31, 185-219.
- Meunier, F.J. & Huysseune, A. 1992. The concept of bone tissue in Osteichthyes. *Netherlands Journal of Zoology* 42, 445-458.
- Meunier, F.J. 1994. Données sur la croissance de l'anguille (*Anguilla anguilla* L.) dans le cours moyen du Rhin, région alsacienne. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 335, 133-144.
- Meunier, F.J. & Desse, J. 1994. Histological structure of hyperostotic cranial remains of *Pomadasys basta* (Osteichthyes, Perciformes, Haemulidae) from archeological sites of the Arabian Gulf and the Indian Ocean. In *Fish exploitation in the past* (Van Neer, W., ed.), pp. 47-53. Tervuren, Belgique: Annales du Musée Royal de l'Afrique Centrale, Sciences Zoologiques.
- Meunier, F.J. 1997. Structure et minéralisation des écailles de quelques Characiformes de Guyane française. *Revue d'Hydrobiologie Tropicale* 27, 407-422.
- Meunier, F.J., Rojas-Beltran, R., Boujard, T. & Lecomte, F. 1997. Rythmes saisonniers de la croissance chez quelques Téléostéens de Guyane française. *Revue d'Hydrobiologie Tropicale* 27, 423-440.

- Meunier, F.J. & Zylberberg, L. 1998. The structure of the external layer and of the odontodes of scales in *Latimeria chalumnae* (Sarcopterygii, Actinistia, Coelacanthidae) revisited using scanning and transmission electron microscopy. In *Proceedings of the 5th Indo-Pacific Fish Conference, Nouméa, 1997* (Séret, B. & Sire, J.Y., ed.), pp. 109-116, Société Française d'Ichtyologie.
- Meyer-Rochow, V.B., Cook, I. & Hendy, C.H. 1992. How to obtain clues from the otoliths of an adult fish about the aquatic environment it has been in as a larva. *Comparative Biochemistry and Physiology* 103A, 333-335.
- Miller, T.J. 1997. The use of field studies to investigate selective processes in fish early life history. In *Early Life History and Recruitment in Fish Populations* (Chambers, C. & Trippel, E.A., ed.), pp. 197-223. London, UK: Chapman and Hall.
- Milton, D.A., Short, S.A., O' Neill, M.F. & Blaber, S.J.M. 1995. Ageing of three species of tropical snapper (Lutjanidae) from the Gulf of Carpentaria, Australia, using radiometry and otolith ring counts. *Fishery Bulletin* 93, 103-115.
- Milton, D.A., Chenery, S.R., Farmer, M.J. & Blaber, S.J.M. 1997. Identifying the spawning estuaries of the tropical shad, terubok *Tenuulosa toli*, using otolith microchemistry. *Marine Ecology Progress Series* 153, 283-291.
- Milton, D.A. & Chenery, S.R. 1998. The effect of otolith storage methods on the concentrations of elements detected by laser-ablation ICP-MS. *Journal of Fish Biology* 53, 785-794.
- Modin, J., Fagerholm, B., Gunnarsson, B. & Pihl, L. 1996. Changes in otolith microstructure at metamorphosis of plaice, *Pleuronectes platessa* L. *ICES Journal of Marine Science* 53, 745-748.
- Moksness, E. & Fossum, P. 1991. Distinguishing spring- and autumn-spawned herring larvae (*Clupea harengus* L.) by otolith microstructure. *ICES Journal of Marine Science* 48, 61-66.
- Moksness, E. 1992. Differences in otolith microstructure and body growth rate of North Sea herring (*Clupea harengus* L.) larvae in the period 1987-1989. *ICES Journal of Marine Science* 49, 223-230.
- Molony, B.W. & Choat, J.H. 1990. Otolith increment widths and somatic growth rate: the presence of a time-lag. *Journal of Fish Biology* 37, 541-551.
- Molony, B.W. 1996. Episodes of starvation are recorded in the otoliths of juvenile *Ambassis vacbelli* (Chandidae), a tropical estuarine fish. *Marine Biology* 125, 439-446.
- Montaigne, M. 1580-1581. *Journal de voyage*. Paris, France: Gallimard 1983, Folio N°1473.
- Morales-Nin, B. 1985. Características de los otolitos cristalinos de *Genypterus capensis*. *Investigación Pesquera* 49, 379-386.

- Morales-Nin, B. 1986a. Chemical composition of the otoliths of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* Linnaeus, 1758) (Pisces, Serranidae). *Cybium* 10, 115-120.
- Morales-Nin, B. 1986b. Structure and composition of *Merluccius capensis* otoliths. *South African Journal of Marine Sciences* 4, 3-10.
- Morales-Nin, B. 1987a. Ultrastructure of the organic and inorganic constituents of the otolith of the sea bass. In *Age and growth of fish* (Summerfelt, R.C. & Hall, G.E., ed.), pp. 331-343. Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press.
- Morales-Nin, B. 1987b. The influence of environmental factors on microstructure of otoliths of three demersal fish species caught off Namibia. In *The Benguela and comparable frontal systems* (Payne, A.I.L., Gulland, J.A. & Brink, K.H., ed.), pp. 255-262. *South African Journal of Marine Sciences* 5.
- Morales-Nin, B. 1988. Caution in the use of daily increments for ageing tropical fishes. *Fishbyte* 6, 5-6.
- Morales-Nin, B. & Ralston, S. 1990. Age and growth of *Lutjanus kasmira* (Forsk.) in Hawaiian waters. *Journal of Fish Biology* 36, 191-203.
- Morales-Nin, B. 1992. Determination of growth in bony fishes from otolith microstructure. *FAO Fisheries Technical Paper* 322.
- Morales-Nin, B., Massuttí, E. & Stefanescu, C. 1996a. Bathymetric distribution and growth patterns of *Bathypterois mediterraneus* from the north-western Mediterranean Sea. *Journal of Fish Biology* 49 (Suppl. A), 276-288.
- Morales-Nin, B., Massuttí, E. & Stefanescu, C. 1996b. Life history of *Alepocephalus rostratus* Risso, 1810 (Osteichthyes: Alepocephalidae) a main component of the Mediterranean deep-sea fish communities. *Journal of Fish Biology* 48, 1097-1112.
- Morales-Nin, B. & Aldebert, Y. 1997. Assessment of growth and hatchdate distribution of juvenile *Merluccius merluccius* in the Gulf of Lions (NW Mediterranean) determined by otolith microstructure and length frequency distribution. *Fisheries Research* 30, 77-85.
- Morales-Nin, B., Lombarte, A. & Japon, B. 1998. Approaches to otolith age determination: image signal treatment and age attribution. *Scientia Marina* 62, 247-256.
- Morales-Nin, B., Di Stefano, M., Potoschi, A., Massuti, E., Rizzo, P. & Gancitano, S. 1999. Differences between the sagitta, lapillus and vertebra in estimating age and growth in juvenile Mediterranean dolphinfish (*Coryphaena hippurus*). *Scientia Marina* 63, 327-336.
- Morison, A.K., Robertson, S.G. & Smith, D.C. 1998. An integrated system for production fish aging: image analysis and quality insurance. *North American Journal of Fisheries Management* 18, 587-598.

- Mortensen, D.G. & Carls, M.G. 1995. Effect of crude oil ingestion on growth and microstructure of juvenile pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) otoliths. In *Recent developments in fish otolith research* (Secor, D.H., Dean, J.M. & Campana, S.E., ed.), pp. 197-209. Columbia, SC, USA: University of South Carolina Press.
- Mosegaard, H., Steffner, N.G. & Ragnarsson, B. 1987. Manipulation of otolith microstructures as a mean of mass-marking salmonid yolk sac fry. In *Proceedings of the Fifth Congress of European Ichthyologists*. (Kullander, S.O. & Fernholm, B., ed.), pp. 213-220, Swedish Museum of Natural History, Stockholm.
- Mosegaard, H., Svedäng, H. & Taberman, K. 1988. Uncoupling of somatic and otolith growth rates in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) as an effect of differences in temperature response. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45, 1514-1524.
- Mosegaard, H., Appelberg, M. & Aangström-Klevbom, C. 1989. Differences in age determination of roach using scales and otoliths. (in Swedish, English summary). *Information från Sötvattenlaboratoriet, Drottningholm* 3, 19-27.
- Mosegaard, H. 1990. What is reflected by otolith size at emergence? A reevaluation of the results in West and Larkin (1987). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 47, 225-228.
- Mosegaard, H., Morales-Nin, B., Weidman, C.R., Geffen, A.J., Arneri, E., Millner, R., Panfili, J. & Folkvord, A. 1998. Otolith thin-section preparation: some problems and new developments. In *Otolith preparation and analysis* (Wright, P.J., ed.), *EFAN Report* 2/1998, pp. 11-22.
- Moss, M.L. 1961a. Osteogenesis of acellular Teleost fish bone. *American Journal of Anatomy* 108, 99-110.
- Moss, M.L. 1961b. Studies of the acellular bone of teleost fish. I. Morphological and systematic variation. *Acta Anatomica* 46, 343-362.
- Moss, M.L. 1963. The biology of acellular Teleost bone. *Annals of the New York Academy of Sciences* 109, 337-350.
- Moss, M.L. 1965. Studies of the acellular bone of Teleost fish. V. Histology and mineral homeostasis of freshwater species. *Acta Anatomica* 60, 262-276.
- Moss, M.L. & Freilich, M. 1963. Studies of acellular bone of Teleost fish. IV. Inorganic content of calcified tissues. *Acta Anatomica* 55, 1-8.
- Moss, M.L. 1977. Skeletal tissues in sharks. *American Zoologist* 17, 335-342.
- Mugiya, Y. 1966. Calcification on fish and shellfish. VI. Seasonal changes in calcium and magnesium concentration of the otolith fluid in some fish, with special reference to the zone formation of their otoliths. *Bulletin of the Japanese Society of Sciences and Fisheries* 32, 549-557.

- Mugiya, Y. & Watabe, N. 1977. Studies on fish scales formation and resorption. II. Effect of estradiol on calcium homeostasis and skeletal tissue resorption in the gold fish, *Carassius auratus*, and the killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 57A, 197-202.
- Mugiya, Y., Watabe, N., Yamada, S., Dean, J.M., Dunkelberger, D.G. & Shimizu, M. 1981. Diurnal rhythm in otolith formation in the goldfish, *Carassius auratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 68A, 659-662.
- Mugiya, Y. 1984. Diurnal rhythm in otolith formation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*: seasonal reversal of the rhythm in relation to plasma calcium concentration. *Comparative Biochemistry and Physiology* 78A, 289-293.
- Mugiya, Y., Hirabayashi, S. & Ohsawa, T. 1985. Microradiography of otoliths and vertebral centra in the flatfish *Limanda herzensteini*: hypermineralization in the hyaline zone. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 51, 219-225.
- Mugiya, Y. & Takahashi, K. 1985. Chemical properties of the saccular endolymph in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Bulletin of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University* 36, 57-63.
- Mugiya, Y. 1986. Effects of calmodulin inhibitors and other metabolic modulators on in vitro otolith formation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 84A, 57-60.
- Mugiya, Y. 1987. Phase difference between calcification and organic matrix formation in the diurnal growth of otoliths in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Fishery Bulletin* 85, 395-401.
- Mugiya, Y. & Uchimura, T. 1989. Otolith resorption induced by anaerobic stress in the goldfish, *Carassius auratus*. *Journal of Fish Biology* 35, 813-818.
- Mugiya, Y. 1990. Long-term effects of hypophysectomy on the growth and calcification of otoliths and scales in the goldfish, *Carassius auratus*. *Zoological Science* 7, 273-279.
- Mugiya, Y. & Tanaka, S. 1992. Otolith development, increment formation, and an uncoupling of otolith to somatic growth-rates in larval and juvenile goldfish. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58, 845-851.
- Mugiya, Y. & Yoshida, M. 1995. Effects of calcium antagonists and other metabolic modulators on in vitro calcium deposition on otoliths in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fisheries Science* 61, 1026-1030.
- Mulcahy, S.A., Killingley, J.S., Phleger, C.F. & Berger, W.H. 1979. Isotopic composition of otoliths from a benthopelagic fish, *Coryphaenoides acrolepis* (Macrouridae, Gadiformes). *Oceanologica Acta* 2, 423-427.

- Mulligan, T.J. 1997. Change of elemental composition of marked salmon scales with growth: Retrospective of wild salmon stock identification problems. In *Proceedings of the International Symposium on Skeletal Microanalysis of Marine Fish Stocks* (Thresher, R.E., Mills, D.J., Proctor, C.H. & Ianelli, J.N., ed.), pp. 51-54, Report CSIRO Marine Laboratories.
- Munk, K.M. & Smoker, W.W. 1993. A hatchery water-heating system and its application to 100% thermal marking of incubating salmon. *The Progressive Fish Culturist* 55, 284-288.
- Murphy, M.D. & Taylor, R.G. 1991. Direct validation of ages determined for adult red drums from otolith sections. *Transactions of the American Fisheries Society* 120, 267-269.
- Muth, R.T. & Bestgen, K.R. 1991. Effects of sunlight on tetracycline marks in otoliths of Colorado squawfish larvae. *Transactions of the American Fisheries Society* 120, 666-668.
- Nagiec, N., Dabrowski, K., Nagiec, C. & Murawska, E. 1988. Mass-marking of coregonid larvae and fry by tetracycline tagging of otoliths. *Aquaculture and Fisheries Management* 19, 171-178.
- Neave, F.M. 1940. On the histology and regeneration of teleost scale. *Quarterly Journal of Microscopical Sciences* 81, 541-568.
- Neilson, J.D. & Geen, G.H. 1981. Method for preparing otoliths for microstructure examination. *The Progressive Fish Culturist* 43, 90-91.
- Neilson, J.D. & Geen, G.H. 1982. Otoliths of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*): daily growth increments and factors influencing their production. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 39, 1340-1347.
- Neilson, J.D. & Geen, G.H. 1985. Effects of feeding regimes and diel temperature cycles on otolith increment formation in juvenile chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Fishery Bulletin* 83, 91-101.
- Nelson, B.K., DeNiro, M.J., Schoeninger, M.J. & De Paolo, D.J. 1986. Effects of diagenesis on strontium, carbon, nitrogen and oxygen concentration and isotopic composition of bone. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 50, 1941-1949.
- Nelson, C.S., Northcote, T.G. & Hendy, C.H. 1989. Potential use of oxygen and carbon isotopic composition of otoliths to identify migratory and non-migratory stocks of the New Zealand common smelt: A pilot study. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 23, 337-344.
- Nelson, J. 1994. *Fishes of the World*. New York, USA: J. Wiley and sons Inc.
- Nichy, F.E. 1977. Thin sectioning fish ear bones. *Sea Technology* 2, 27.
- Nishimura, A. 1993. Occurrence of a check in otoliths of reared and sea-caught larval walleye pollock *Theragra chalcogramma* (Pallas) and its relationship to events in early-life history. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 166, 175-183.

- Nolf, D. 1995. Studies on fossil otoliths: the state of the art. In *Recent developments in fish otolith research* (Secor, D.H., Dean, J.M. & Campana, S.E., ed.), pp. 513-544. Columbia, SC, USA: University of South Carolina Press.
- Nordeide, J.T., Holm, J.C., Otteraa, H., Blom, G. & Borge, A. 1992. The use of oxytetracycline as a marker for juvenile cod (*Gadus morhua* L.). *Journal of Fish Biology* 41, 21-30.
- Northcote, T.G., Hendy, C.H., Nelson, C.S. & Boubee, J.A.T. 1992. Tests for migratory history of the New Zealand common smelt (*Retropinna retropinna* (Richardson)) using otolith isotopic composition. *Ecology of Freshwater Fish* 1, 61-72.
- NRC 1998. *Improving fish stock assessments*. Washington DC, USA: National Academy Press.
- Officer, R.A., Day, R.W., Clement, J.G. & Brown, L.P. 1997. Captive gummy sharks, *Mustelus antarcticus*, form hypermineralised bands in their vertebrae during winter. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54, 2677-2683.
- Ogle, D.H., Pruitt, R.C., Spangler, G.R. & Cyterski, M.J. 1996. A Bayesian approach to assigning probabilities to fish ages determined from temporal signatures in growth increments. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53, 1788-1794.
- Okedi, J. 1969. Observations on the breeding and growth of certain mormyrid fishes of Lake Victoria Basin (Pisces, Mormyridae). *Revue de Zoologie et de Botanique Africaine* 79, 34-64.
- Olatunde, A.A. 1979. Age determination, length-weight relationship and growth of *Eutropius niloticus* and *Schilbe mystus* in Lake Kainji, Nigeria. *Archiv für Hydrobiologie* 87, 49-83.
- Olsson, O. & North, A.W. 1997. Diet of the King Penguin *Aptenodytes patagonicus* during three summers at South Georgia. *Ibis* 139, 504-512.
- Ombredane, D. & Baglinière, J.L. 1992. Les écailles et leurs utilisations en écologie. In *Tissus durs et âge individuel des Vertébrés* (Baglinière, J.L., Castanet, J., Conand, F. & Meunier, F., ed.), pp. 151-192. Paris, France: Collection Colloques et Séminaires ORSTOM/INRA.
- Ørvig, T. 1968. The dermal skeleton; general considerations. In *Current problem of lower vertebrate phylogeny. Proceedings of the 4th Nobel Symposium* (Ørvig, T., ed.), pp. 373-397, Stockholm, Sweden: Almqvist and Wiksell.
- Otake, T., Ishii, T., Nakahara, M. & Nakamura, R. 1994. Drastic changes in otolith strontium/calcium ratios in leptocephali and glass eels of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Marine Ecology Progress Series* 112, 189-193.
- Otake, T., Ishii, T., Nakahara, M. & Nakamura, R. 1997. Changes in otolith strontium/calcium ratios in metamorphosing *Conger myriaster* leptocephali. *Marine Biology* 128, 565-572.

- Palomera, I., Morales-Nin, B. & Lleonart, J. 1988. Larval growth of anchovy, *Engraulis encrasicolus*, in the Western Mediterranean sea. *Marine Biology* 99, 283-291.
- Panfili, J. & Ximénès, M.C. 1992. Measurements on ground or sectioned otoliths: possibilities of bias. *Journal of Fish Biology* 41, 201-207.
- Panfili, J. 1993. *Estimation de l'âge individuel des poissons : méthodologies et applications à des populations tropicales et tempérées*. Paris, France: Collection Travaux et Documents, ORSTOM.
- Pannella, G. 1971. Fish otoliths: daily growth layers and periodical patterns. *Science* 173, 1124-1127.
- Pannella, G. 1974. Otoliths growth patterns: an aid in age determination in temperate and tropical fishes. In *The ageing of fish* (Bagenal, T.B., ed.), pp. 28-39. London, UK: Unwin Brothers Ltd.
- Pannella, G. 1980. Growth pattern in fish sagittae. In *Skeletal growth of aquatic organisms. Biological records of environmental change* (Rhoads, D.C. & Lutz, R.A., ed.), pp. 519-560. New York, USA and London, UK: Plenum Press.
- Papadopoulou, C. & Moraitopoulou-Kassimati, E. 1977. Stable elements in skeletal formations of fish species from Greek waters. *Thalassia Jugoslavica* 13, 187-192.
- Papadopoulou, C., Kaniyas, G.D. & Kassimati, E.M. 1978. Zinc content in otoliths of mackerel from the Aegean. *Marine Pollution Bulletin* 9, 106-108.
- Parker, H.W. & Stott, F.C. 1965. Age, size and vertebral calcification in the basking shark, *Cetorhinus maximus* (Gunnerus). *Zool. Meded. (Leiden)* 40, 305-319.
- Parker, N.C., Giorgi, A.E., Heidinger, R.C., Jester, D.B., Prince, E.D. & Winans, G.A. 1990. *Fish-marking techniques*. American Fisheries Society Symposium 7.
- Parrish, B.B. & Sharman, D.B. 1959. Otolith types amongst summer-autumn spawning herring in the southern North Sea. *Journal du Conseil permanent international pour l'exploration de la mer* 25, 81-92.
- Pascal, M. & Castanet, J. 1978. Méthodes de détermination de l'âge chez le chat haret des îles Kerguelen. *Revue d'Écologie (La Terre et la Vie)* 32, 529-555.
- Patterson, W.P., Smith, G.R. & Lohmann, K.C. 1993. Continental paleothermometry and seasonality using the isotopic composition of aragonitic otoliths of freshwater fishes. In *Climate change in continental isotopic records*. (Swart, P.K., Lohmann, K.C., McKenzie, J. & Savin, A., ed.), pp. 191-202. Washington, DC, USA: American Geophysical Union.
- Paul, L.J. 1968. Early scale growth characteristics of the New Zealand snapper, *Chrysophrys auratus* (Forster), with reference to selection of a scale-sampling site. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 2, 273-292.

- Pauly, D. & David, N. 1981. ELEFAN I, a BASIC program for the objective extraction of growth parameters from length-frequency data. *Meeresforschung* 28, 205-211.
- Pavlidis, T. 1992. Why progress in machine vision is so slow? *Pattern Recognition Letters* 13, 221-225.
- Payan, P., Kossmann, H., Watrin, A., Mayer Gostan, N. & Boeuf, G. 1997. Ionic composition of endolymph in Teleosts: origin and importance of endolymph alkalinity. *Journal of Experimental Biology* 200, 1905-1912.
- Payan, P., Borelli, G., Boeuf, G. & Mayer Gostan, N. 1998. Relationship between otolith and somatic growth: consequence of starvation on acid-base balance in plasma and endolymph in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiology and Biochemistry* 19, 35-41.
- Payan, P., Edeyer, A., Pontual, H. (de), Borelli, G., Boeuf, G. & Mayer Gostan, N. 1999. Chemical composition of saccular endolymph and otolith in fish inner ear: lack of spatial uniformity. *American Journal of Physiology. Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 46, R123-R131.
- Pearce, N.J.G., Perkins, W.T. & Fuge, R. 1992. Developments in the analysis of carbonates by laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Proceedings* 29, 280-281.
- Pearson, D.E. 1996. Timing of hyaline-zone formation as related to sex, location, and year of capture in otoliths of the widow rockfish, *Sebastes entomelas*. *Fishery Bulletin* 94, 190-197.
- Pedersen, S.A., Lewy, P. & Wright, P. 1999. Assessments of the lesser sandeel (*Ammodytes marinus*) in the North Sea based on revised stock divisions. *Fisheries Research* 41, 221-241.
- Perkins, W.T., Fuge, R. & Pearce, N.J.G. 1991. Quantitative analysis of trace elements in carbonates using laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 6, 445-449.
- Peronnet, I., Dupouy, H., Rivoalen, J.J. & Kergoat, B. 1992. Techniques de lecture d'âge à partir des rayons épineux de la nageoire caudale pour la cardine *Lepidorhombus wiffiagonis* et à partir des sections d'illicium pour les baudroies, *Lophius piscatorius* et *L. budegassa*. In *Tissus durs et âge individuel des Vertébrés* (Baglinière, J.L., Castanet, J., Conand, F. & Meunier, F.J., ed.), pp. 307-324. Paris, France: Collection Colloques et Séminaires ORSTOM/INRA.
- Persson, P. 1997. Calcium regulation during sexual maturation of female salmonids: Estradiol 17 β and calcified tissues. PhD Thesis, Göteborg University, 146 p.
- Persson, P., Sundell, K., Bjoernsson, B.T. & Lundqvist, H. 1998. Calcium metabolism and osmoregulation during sexual maturation of river running Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology* 52, 334-349.

- Peters, W.C.H. 1841. *Bericht über den mikroskopischen Bau der Fischschuppen*. Jahrg: Müller's Archiv für Anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medizin.
- Petersen, C.G. 1891. Eine Methode zur Bestimmung des Alters und Wuchses der Fische. *Mitteilungen des deutschen Seefischerei-Vereins* 11, 226-235.
- Petersen, H. 1930. Die Organe des Skelettsystems. In *Handb. Mikr. Anat. Menschen* (Mollendorff, W., ed.), pp. 521-678. Berlin, Germany.
- Peyer, B. 1957. Über die morphologische Deutung der Flossenstacheln einiger Haifische. *Mitteil. Naturforsch. Gesell., Bern* 14, 159-176.
- Phillips, D.J.H. & Rainbow, P.S. 1994. *Biomonitoring of trace aquatic contaminants*. London, UK: Chapman & Hall.
- Pisam, M., Payan, P., Le Moal, C., Edeyer, A., Boeuf, G. & Mayer-Gostan, N. 1998. Ultrastructural study of the saccular epithelium of the inner ear of two Teleosts, *Oncorhynchus mykiss* and *Psetta maxima*. *Cell and Tissue Research* 294, 261-270.
- Planes, S. & Laval, P. 1990. Adjustment of a method for reading otoliths by image analysis and a study on the growth of larvae and juveniles of sea-bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal de Recherche Océanographique* 15, 42-45.
- Platt, C. & Popper, A.N. 1981. Structure and function in the ear. In *Hearing and sound communication in Fishes* (Tavolga, W.N., Popper, A.N. & Fay, R.R., ed.), pp. 3-38. New York, USA: Springer.
- Poinsard, F. & Troadec, J.P. 1966. Détermination de l'âge par la lecture des otolithes chez deux espèces de Sciaenidae ouest-africains (*Pseudolithus senegalensis* C.V. et *Pseudolithus typus* Blkr.). *Rapports et Procès-verbaux des réunions du Conseil international pour l'exploration de la mer* 30, 291-307.
- Pollard, M.J., Kingsford, M.J. & Battaglene, S.C. 1999. Chemical marking of juvenile snapper, *Pagrus auratus* (Sparidae), by incorporation of strontium into dorsal spines. *Fishery Bulletin* 97, 118-131.
- Ponton, D., Mol, J.H. & Panfili, J. 2001. Use of otolith microincrements for estimating the age and growth rate of young armoured catfish *Hoplosternum littorale*. *Journal of Fish Biology* 58, 1274-1285.
- Pontual, H. (de) & Prouzet, P. 1987. Atlantic salmon, *Salmo salar* L., stock discrimination by scale-shape analysis. *Aquaculture and Fisheries Management* 18, 277-289.
- Pontual, H. (de), Lagardère, F., Troadec, H., Batel, A., Desaunay, Y. & Koutsikopoulos, C. 2000. Otoliths imprinting of sole (*Solea solea*) from the Bay of Biscay: a tool to discriminate individuals from nursery origins. *Oceanologica Acta* 23, 497-513.
- Poplin, C., Poplin, F. & Ricqlès, A. (de) 1976. Quelques particularités anatomiques et histologiques du rostre de l'espadon (*Xiphias gladius* L.). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 282D, 1105-1108.

- Popper, A.N. & Hoxter, B. 1981. The fine structure of the sacculus and lagena of a Teleost fish. *Hearing Research* 5, 245-263.
- Popper, A.N. & Fay, R.R. 1993. Sound detection and processing by fish: critical review and major research questions. *Brain Behavior and Evolution* 50, 13-221.
- Popper, A.N. & Lu, Z.M. 2000. Structure-function relationships in fish otolith organs. *Fisberies Research* 46, 15-25.
- Prince, E.D. & Pulos, L.M. 1983. *Proceedings of the international workshop on age determination of oceanic pelagic fishes: Tunas, Billfishes, and Sharks*. Miami, Florida, USA, February 15-18, 1982: NOAA Technical Report NMFS 8.
- Proctor, C.H., Thresher, R.E., Gunn, J.S., Mills, D.J., Harrowfield, I.R. & Sie, S.H. 1995. Stock structure of the southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii*: an investigation based on probe microanalysis of otolith composition. *Marine Biology* 122, 511-526.
- Proctor, C.H. & Thresher, R.E. 1998. Effects of specimen handling and otolith preparation on concentration of elements in fish otoliths. *Marine Biology* 131, 681-694.
- Protasowicki, M. & Kosior, M. 1988. Long-term observations of selected heavy metals contained in otoliths of cod from the Southern Baltic. *Kieler Meeresforschung* 6, 424-431.
- Quick, A.J.R. & Bruton, M.N. 1984. Age and growth of *Clarias gariepinus* (Pisces, Clariidae) in the P.K. le Roux Dam, South Africa. *South African Journal of Zoology* 19, 37-45.
- Quinn, T.J. & Deriso, R.B. 1999. *Quantitative fish dynamics*. New York: Oxford University Press.
- Radtke, R.L. & Dean, J.M. 1982. Increment formation in the otoliths of embryos, larvae, and juveniles of the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *Fishery Bulletin* 80, 201-215.
- Radtke, R.L. 1984. Formation and structural composition of larval striped mullet otoliths. *Transactions of the American Fisheries Society* 113, 186-191.
- Radtke, R.L. & Targett, T.E. 1984. Rhythmic structural and chemical patterns in otoliths of the Antarctic fish *Notothenia larseni*: their application to age determination. *Polar biology* 3, 203-210.
- Radtke, R.L. & Morales-Nin, B. 1989. Mediterranean juvenile bluefin tuna: life history patterns. *Journal of Fish Biology* 35, 485-496.
- Radtke, R.L., Townsend, D.W., Folsom, S.D. & Morrison, M.A. 1990. Strontium/calcium concentration ratios in otoliths of herring larvae as indicators of environmental histories. *Environmental Biology of Fishes* 27, 51-61.
- Radtke, R.L., Showers, W., Moksness, E. & Lenz, P. 1996. Environmental information stored in otoliths: insights from stable isotopes. *Marine Biology* 127, 161-170.

- Radtke, R.L., Showers, W., Moksness, E. & Lenz, P. 1998. Environmental information stored in otoliths: insights from stable isotopes. *Marine Biology* 132, 347-348.
- Raitt, D.F.S. 1961. Otolith studies of southern North Sea herring. *Journal du Conseil permanent international pour l'exploration de la mer* 26, 312-328.
- Ralston, S. & Howard, D.F. 1995. On the development of year-class strength and cohort variability in two northern California rockfishes. *Fishery Bulletin* 93, 710-720.
- Ralston, S., Brothers, E.B., Roberts, D.A. & Sakuma, K.M. 1996. Accuracy of age estimates for larval *Sebastes jordani*. *Fishery Bulletin* 94, 89-97.
- Ré, P., Rosa, H.C. & Dinis, M.T. 1985. Diel rhythms in *Dicentrarchus labrax* (L., 1758) larvae under controlled conditions: swim bladder inflation, feeding and otolith growth. *Investigación Pesquera* 49, 411-418.
- Réaumur. 1716. *Observation sur la matière qui colore les perles fausses et sur quelques autres matières animales d'une autre couleur, à l'occasion de quoi on essaie d'expliquer la formation des écailles des poissons*. Paris, Histoire de l'Académie Royale des Sciences, 1718.
- Reddin, D. & Pontual, H. (de) 1992. A comparison of two techniques to discriminate continental origin of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) off West Greenland. *Aquatic Living Resources* 5, 81-88.
- Reibisch, J. 1899. Ueber die Einzahl bei *Pleuronectes platessa* und die Altersbestimmung dieser Form aus den Otolithen. *Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen (Kiel)* 4, 233-248.
- Reinert, T.R., Wallin, J., Griffin, M.C., Conroy, M.J. & Vanden Avyle, M.J. 1998. Long-term retention and detection of oxytetracycline marks applied to hatchery-reared larval striped bass, *Morone saxatilis*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55, 539-543.
- Reznick, D., Lindbeck, E. & Bryga, H. 1989. Slower growth results in larger otoliths: an experimental test with guppies (*Poecilia reticulata*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 46, 108-112.
- Rice, J.A., Crowder, L.B. & Holey, M.E. 1987. Exploration of mechanisms regulating larval survival in Lake Michigan bloater: a recruitment analysis based on characteristics of individual larvae. *Transactions of the American Fisheries Society* 116, 703-718.
- Richard, A. & Baglinière, J.L. 1990. Description et interprétation des écailles de truites de mer (*Salmo trutta* L.) de deux rivières de Basse-Normandie : l'Orne et la Touques. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 319, 239-257.
- Richards, R.A. & Esteves, C. 1997. Stock-specific variation in scale morphology of Atlantic striped bass. *Transactions of the American Fisheries Society* 126, 908-918.

- Richter, H. & McDermott, J.G. 1990. The staining of fish otoliths for age determination. *Journal of Fish Biology* 36, 773-779.
- Ricker, W.E. 1958. Handbook of computations for biological statistics of fish populations. *Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada* 119.
- Ricker, W.E. 1975. Computation and interpretation of biological statistics of fish populations. *Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada* 191, 1-382.
- Ricker, W.E. 1992. Back-calculation of fish lengths based on proportionality between scale and length increments. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49, 1018-1026.
- Ricqlès, A. (de), Meunier, F.J., Castanet, J. & Francillon-Vieillot, H. 1991. Comparative microstructure of bone. In *Bone* (Hall, B.K., ed.), pp. 1-78. CRC Press.
- Ridewood, W.G. 1921. On the calcification of the vertebral centra in sharks and rays. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 210, 311-407.
- Rijnsdorp, A.D. & Storbeck, F. 1991. A method to determine the onset of sexual maturity from back-calculated growth curves from otoliths of individual female North Sea plaice, *Pleuronectes platessa* L. In *Demersal Fish Comm. Counc.* (ICES, ed.), pp. 1-21, ICES Council Meeting, Copenhagen, Denmark, ICES 1991.
- Robben, J. & Thys van den Audenaerde, D.K. 1984. A preliminary study of age and growth of a Cyprinid fish *Barilius moori* (Blgr.) in lake Kivu. *Hydrobiologia* 108, 153-162.
- Robert, F. & Vianet, R. 1988. Age and growth of *Psetta maxima* (Linne, 1758) and *Scophthalmus rhombus* (Linne, 1758) in the Gulf of Lion (Mediterranean). *Journal of Applied Ichthyology* 4, 111-120.
- Roberts, C.D. 1993. Comparative morphology of spined scales and their phylogenetic significance in the Teleostei. *Bulletin of Marine Science* 52, 60-113.
- Rochard, E. & Jatteau, P. 1991. Amélioration de la méthode de détermination de l'âge de l'esturgeon commun *Acipenser sturio* et premières applications. In *Acipenser* (Williot, P., ed.), pp. 193-208. Paris, France: CEMAGREF Publications.
- Roelke, L.A. & Cifuentes, L.A. 1997. Use of stable isotopes to assess groups of king mackerel, *Scomberomorus cavalla*, in the Gulf of Mexico and southeastern Florida. *Fishery Bulletin* 95, 540-551.
- Rojas-Beltran, R. & Vincent, G. 1993. Use of trypsin to extract and examine larval fish otoliths. *Cybium* 17, 77-78.
- Rojas-Beltran, R., Champigneulle, A. & Vincent, G. 1995. Mass-marking of bone tissue of *Coregonus lavaretus* L. and its potential application to monitoring the spatio-temporal distribution of larvae, fry and juveniles of lacustrine fishes. *Hydrobiologia* 300/301, 399-407.

- Rollefsen, G. 1933. The otoliths of the cod. *Fiskeridirektoratets Skrifter, Serie Havundersokelser* 4, 1-14.
- Ross, M.D. & Pote, K.G. 1984. Some properties of otoconia. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 304B, 445-452.
- Ross, W.R. & Picard, A. 1990. Use of scale patterns and shape as discriminators between wild and hatchery striped bass stocks in California. *American Fisheries Society Symposium* 7, 71-77.
- Ruhlé, C. & Grieder, C. 1989. Nouvelle méthode de marquage vital d'œufs de Salmonidés par incorporation osmotique de tétracycline à la fécondation : expériences préliminaires sur des œufs de truite fario (*Salmo trutta fario*) et de truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 315, 181-188.
- Sadovy, Y. & Severin, K.P. 1992. Trace elements in biogenic aragonite: correlation of body growth rate and strontium levels in the otoliths of the white grunt, *Haemulon plumieri* (Pisces, Haemulidae). *Bulletin of Marine Science* 50, 237-257.
- Sadovy, Y. & Severin, K.P. 1994. Elemental patterns in red hind (*Epinephelus guttatus*) otoliths from Bermuda and Puerto Rico reflect growth rate, not temperature. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 51, 133-141.
- Saitoh, S. & Yamada, J. 1989. Ultrastructure of the saccular epithelium in the otolithic membrane in relation to otolith growth in tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Transactions of the American Microscopy Society* 108, 223-238.
- Sauer, G.R. & Watabe, N. 1989. Temporal and metal-specific patterns in the accumulation of heavy metals by the scales of *Fundulus heteroclitus*. *Aquatic Toxicology* 14, 233-248.
- Schaefer, M.B. 1954. Some aspects of the dynamics of populations important to the management of commercial marine fisheries. *Bulletin of the Inter-American Tropical Tuna Commission* 1, 27-56.
- Schluter, D.S. 1988. Estimating the form of natural selection on a quantitative trait. *Evolution* 42, 849-861.
- Schmitz, B., Ingram, S.L., Dockery, D.T. & Aberg, G. 1997. Testing Sr-87/Sr-86 as a paleosalinity indicator on mixed marine, brackish-water and terrestrial vertebrate skeletal apatite in late Paleocene early Eocene near-coastal sediments, Mississippi. *Chemical Geology* 140, 275-287.
- Schnute, J. & Fournier, D. 1980. A new approach to length-frequency analysis: growth structure. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 37, 1337-1351.
- Schönbörner, A.A., Boivin, G. & Baud, C.A. 1979. The mineralization process in Teleost fish scales. *Cell and Tissue Research* 202, 203-212.
- Schönbörner, A.A., Meunier, F.J. & Castanet, J. 1981. The fine structure of calcified Mandl's corpuscles in Teleost fish scales. *Tissue and Cell* 13, 589-597.

- Schramm, H.L., Jr. 1989. Formation of annuli on otoliths of bluegills. *Transactions of the American Fisheries Society* 118, 546-555.
- Schroder, S.L., Knudsen, C.M. & Volk, E.C. 1995. Marking salmon fry with strontium chloride solutions. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52, 1141-1149.
- Schultz, E.T. 1993. The effect of birth date on fitness of female dwarf perch, *Micrometrus minimus* (Perciformes, Embiotocidae). *Evolution* 47, 520-539.
- Schultz, E.T. & Cowen, R.K. 1994. Recruitment of coral-reef fishes to Bermuda: local retention or long-distance transport? *Marine Ecology Progress Series* 109, 15-28.
- Secor, D.H. & Dean, J.M. 1989. Somatic growth effects on the otolith: fish size relationship in young pond-reared striped bass, *Morone saxatilis*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 46, 113-121.
- Secor, D.H., White, M.G. & Dean, J.M. 1991. Immersion marking of larval and juvenile hatchery-produced striped bass with oxytetracycline. *Transactions of the American Fisheries Society* 120, 261-266.
- Secor, D.H., Dean, J.M. & Laban, E.H. 1992. Otolith removal and preparation for microstructural examination. In *Otolith microstructure examination and analysis* (Stevenson, D.K. & Campana, S.E., ed.), pp. 19-57. Ottawa, Canada: Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences 117.
- Secor, D.H., Dean, J.M. & Campana, S.E. 1995a. *Recent developments in fish otolith research*. Columbia, SC, USA: University of South Carolina Press.
- Secor, D.H., Henderson-Arzapalo, A. & Piccoli, P.M. 1995b. Can otolith microchemistry chart patterns of migration and habitat utilization in anadromous fishes? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 192, 15-33.
- Secor, D.H. & Piccoli, P.M. 1996. Age- and sex-dependent migrations of striped bass in the Hudson River as determined by chemical microanalysis of otoliths. *Estuaries* 19, 778-793.
- Secor, D.H. & Zdanowicz, V.S. 1998. Otolith microconstituent analysis of juvenile bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) from the Mediterranean Sea and Pacific Ocean. *Fisheries Research* 36, 251-256.
- Secor, D.H. & Rooker, J.R. 2000. Is otolith strontium a useful scalar of life cycles in estuarine fishes? *Fisheries Research* 46, 359-371.
- Seki, T., Taniuchi, T., Nakano, H. & Shimizu, M. 1998. Age, growth and reproduction of the oceanic Whitetip shark from the Pacific Ocean. *Fisheries Science* 64, 14-20.
- Serra, J. 1982. *Image analysis and mathematical morphology*. London, UK: Academic Press Ltd.
- Serra, J. 1988. *Image analysis and mathematical morphology. II. Theoretical advances*. London, UK: Academic Press Ltd.

- Shackleton, L.Y. 1988. Scale shedding: an important factor in fossil fish scale studies. *Rapports et Procès-verbaux des réunions du Conseil international pour l'exploration de la mer* 44, 259-263.
- Shemesh, A., Charles, C.D. & Fairbanks, R.G. 1992. Oxygen isotopes in biogenic silica: global changes in ocean temperature and isotopic composition. *Science* 256, 1434-1436.
- Shepherd, J.G. & Cushing, D.H. 1980. A mechanism for density-dependent survival of larval fish as the basis of a stock-recruitment relationship. *Journal du Conseil permanent international pour l'exploration de la mer* 39, 160-167.
- Siegfried, R.C. & Weinstein, M.P. 1989. Validation of daily increment deposition in the otolith of spot (*Leiostomus xanthurus*). *Estuaries* 12, 180-185.
- Sigler, W.F. 1958. The ecology and use of carp in Utah. *Utah Agricultural Experiment Station Bulletin* 405, 1-62.
- Simkiss, K. 1974. Calcium metabolism of fish in relation to ageing. In *The ageing of fish* (Bagenal, T.B., ed.), pp. 1-12. Old Woking, Surrey, UK: Unwin Brothers Ltd.
- Simmons, D.J., Simmons, N.B. & Marshall, J.H. 1970. The uptake of calcium-45 in the acellular-boned toadfish. *Calcified Tissue Research* 5, 206-221.
- Simoneaux, L.F. & Warlen, S.M. 1987. Occurrence of daily growth increments in otoliths of juvenile Atlantic menhaden. In *Age and growth of fish* (Summerfelt, R.C. & Hall, G.E., ed.), pp. 443-451. Ames, Iowa, USA: The Iowa State University Press.
- Simpson, T.H. 1978. An interpretation of some endocrine rhythms in fishes. In *Rhythmic activity of fishes* (Thorpe, J.E., ed.), pp. 55-68. New York, USA: Academic Press.
- Sinclair, M. & Tremblay, M.J. 1984. Timing of spawning of Atlantic herring (*Clupea harengus harengus*) populations and the match-mismatch theory. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 41, 1055-1065.
- Sire, J.Y. & Meunier, F.J. 1981. Structure et minéralisation de l'écaille d'*Hemichromis bimaculatus* (Téléostéen, Perciforme, Cichlidé). *Archives de Zoologie expérimentale et générale* 122, 133-150.
- Sire, J.Y. 1985. Fibres d'ancrage et couche limitante externe à la surface des écailles des Cichlidae *Hemichromis bimaculatus* (Téléostéen, Perciforme): données ultrastructurales. *Annales des Sciences Naturelles, Zoologie. Paris* 7, 163-180.
- Sire, J.Y. 1987. *Structure, formation et régénération des écailles d'un poisson Téléostéen, Hemichromis bimaculatus (Perciforme, Cichlidé)*. Paris, France: Archives et Documents, Micro-Édition, Institut d'Ethnologie, Muséum National d'Histoire Naturelle, SN87-600449.

- Sire, J.Y., Géraudie, J., Meunier, F.J. & Zylberberg, L. 1987. On the origin of ganoine: histological and ultrastructural data on the experimental regeneration of the scales of *Calamoichthys calabaricus* (Osteichthyes, Brachyopterygii, Polypteridae). *American Journal of Anatomy* 180, 391-402.
- Sire, J.Y. 1988. Evidence that mineralized spherules are involved in the formation of the superficial layer of the elasmoid scale in the cichlids *Hemichromis bimaculatus* and *Cichlasoma octofasciatum* (Pisces, Teleosts): an epidermal active participation. *Cell and Tissue Research* 237, 537-547.
- Sire, J.Y., Huysseune, A. & Meunier, F.J. 1990. Osteoclasts in Teleost fish: light- and electron-microscopical observations. *Cell and Tissue Research* 260, 85-94.
- Small, G.J. & Hirschhorn, G. 1987. Computer-assisted age and growth pattern recognition of fish scales using a digitizing tablet. In *Age and growth of Fish* (Summerfelt, R.C. & Hall, G.E., ed.), pp. 397-410. Ames, Iowa, USA: The Iowa State University Press.
- Smirina, E.M. 1974. Prospects of age determination by bone layers in reptilia. *Zoologiceskij Zhurnal* 53, 111-117.
- Smith, J.V. 1974. *Feldspar minerals*. New York, USA: Springer.
- Smith, S.V., Buddemeier, R.W., Redalje, R.C. & Houck, J.E. 1979. Strontium-calcium thermometry in coral skeletons. *Science* 204, 404-407.
- Smith, S.E. 1984. Timing of vertebral-band deposition in tetracycline injected leopard sharks. *Transactions of the American Fisheries Society* 113, 308-313.
- Smith, J.N., Nelson, R. & Campana, S.E. 1991. The use of Pb-210/Ra-226 and Th-228/Ra-228 disequilibria in the ageing of otoliths of marine fish. In *Radionuclides in the study of marine processes* (Kershaw, P.J. & Woodhead, D.S., ed.), pp. 350-359. New York: Elsevier Applied Science.
- Smith, D.C. 1992. *Age determination and growth in fish and other aquatic animals*. Hobart, Australia: CSIRO Publications.
- Smith, S.J., Hunt, J.J. & Rivard, D. 1993. Risk evaluation and biological reference points for fisheries management. *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences* 120.
- Smith, G.R. & Patterson, W.P. 1994. Mio-Pliocene seasonality on the Snake River plain: comparison of faunal and oxygen isotopic evidence. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* 107, 291-302.
- Smith, D.C., Fenton, G.E., Robertson, S.G. & Short, S.A. 1995. Age determination and growth of orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*): a comparison of annulus counts with radiometric ageing. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52, 391-401.
- Smith, P. 1995. What do changes in the frequency of resistance to oxytetracycline in the sediments under salmon farms mean? *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada* 954, 21-25.

- Sneed, K.E. 1951. A method for calculating the growth of channel catfish *Ictalurus lacustris punctatus*. *Transactions of the American Fisheries Society* 80, 174-183.
- Snyder, R.J., McKeown, B.A., Colbow, K. & Brown, R. 1992. Use of dissolved strontium in scale marking of juvenile salmonids: effects of concentration and exposure time. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49, 780-782.
- Sogard, S.M. 1991. Interpretation of otolith microstructure in juvenile winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*): ontogenic development, daily increment validation, and somatic growth relationships. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48, 1862-1871.
- Sosa-Nishizaki, O., Shimizu, M. & Nose, Y. 1989. The potential use of the second dorsal fin rays of skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* as an aging character. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55, 1559-1564.
- Sparre, P. 1991. Introduction to multispecies virtual population analysis. *ICES Marine Science Symposia* 193, 225-236.
- Steenstrup, J. 1861. Sur la différence entre les poissons osseux et les poissons cartilagineux au point de vue de la formation des écailles. *Annales des Sciences Naturelles, Zoologie, Paris, 4^e sér.* 15, 368.
- Stefansson, G. & Palsson, O.K. 1998. A framework for multispecies modelling of Arcto-boreal systems. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 8, 101-104.
- Stephan, P. 1900. Recherches histologiques sur la structure du tissu osseux des poissons. *Bulletin Scientifique de la France et de la Belgique* 33, 281-429.
- Stéquert, B., Panfili, J. & Dean, J.M. 1995. Age and growth of yellowfin tuna, *Thunnus albacares*, from the western Indian Ocean, based on otolith microstructure. *Fishery Bulletin* 94, 124-134.
- Stevenson, D.K. & Campana, S.E. 1992. Otolith microstructure examination and analysis. Ottawa, Canada: *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences* 117.
- Stewart, B.D., Fenton, G.E., Smith, D.C. & Short, S.A. 1995. Validation of otolith-increment age estimates for a deepwater fish species, the warty oreo *Alloctytus verrucosus*, by radiometric analysis. *Marine Biology* 123, 29-38.
- Stuiver, M. & Polach, H.A. 1977. Discussion: reporting of C-14 data. *Radiocarbon* 19, 355-363.
- Summerfelt, R.C. & Hall, G.E. 1987. *Age and Growth of Fish*. Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press.
- Suter, W. & Morel, P. 1996. Pellet analysis in the assessment of Great Cormorant *Phalacrocorax carbo* diet: reducing biases from otolith wear when reconstructing fish length. *Colonial Waterbirds* 19, 280-284.

- Suthers, I.M. & Sundby, S. 1993. Dispersal and growth of pelagic juvenile Arcto-Norwegian cod (*Gadus morhua*), inferred from otolith microstructure and water temperature. *ICES Journal of Marine Science* 50, 261-270.
- Sych, R. 1974. The sources of errors in ageing fish and considerations of the proofs of reliability. In *The ageing of fish* (Bagenal, T.B., ed.), pp. 78-86. London, UK: Unwin Brothers Ltd.
- Szedlmayer, S.T., Szedlmayer, M.M. & Sieracki, M.E. 1991. Automated enumeration by computer digitization of age-0 weakfish *Cynoscion regalis* scale circuli. *Fishery Bulletin* 89, 337-340.
- Szedlmayer, S.T. & Howe, J.C. 1995. An evaluation of six marking methods for age-0 red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Fishery Bulletin* 93, 191-195.
- Szedlmayer, S.T. & Conti, J. 1999. Nursery habitats, growth rates, and seasonality of age-0 red snapper, *Lutjanus campechanus*, in the northeast Gulf of Mexico. *Fishery Bulletin* 97, 626-635.
- Takagi, Y., Hirano, T. & Yamada, J. 1989. In vitro measurements of calcium influx into isolated goldfish scales in reference to the effects of putative fish calcemic hormones. *Zoological Sciences* 6, 83-89.
- Takagi, Y. 1997. Meshwork arrangement of mitochondria-rich, Na⁺, K⁺-ATPase-rich cells in the saccular epithelium of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) inner ear. *Anatomical Record* 248, 483-489.
- Tanaka, K., Mugiya, Y. & Yamada, J. 1981. Effects of photoperiod and feeding on daily growth patterns in otoliths of juvenile *Tilapia nilotica*. *Fishery Bulletin* 79, 459-466.
- Tanaka, S. 1990. Age and growth studies on the calcified structures of newborn sharks in laboratory aquaria using tetracycline. In *Elasmobranchs as living resources: advances in the biology, ecology, systematics, and the status of the fisheries* (Pratt, H., Gruber, S.H. & Taniuchi, T., ed.), pp. 189-202, NOAA Tech. Rep., NMFS, 90.
- Taubert, B.D. & Coble, D.W. 1977. Daily rings in otoliths of three species of *Lepomis* and *Tilapia mossambica*. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* 34, 332-340.
- Templeman, W. & Squires, H.J. 1956. Relationship of otolith lengths and weights in the haddock *Melanogrammus aeglefinus* (L.) to the rate of growth of the fish. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* 13, 467-487.
- Termine, J.D. 1972. Mineral chemistry and skeletal biology. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 85, 207-241.
- Thomas, L.M., Holt, S.A. & Arnold, C.R. 1995. Chemical marking techniques for larval and juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*) otoliths using different fluorescent markers. In *Recent developments in fish otolith research* (Secor, D.H., Dean, J.M. & Campana, S.E., ed.), pp. 703-717. Columbia, SC, USA: University of South Carolina Press.

- Thomson, J.S. 1904. The periodic growth of scales in Gadidae as an index of age. *Journal of the Marine Biological Association of the United-Kingdom, Plymouth* 7, 1-109.
- Thomson, K.S. & McCune, A.R. 1984. Scale structure as evidence of growth patterns in fossil semionotid fishes. *Journal of Vertebrate Paleontology* 4, 422-429.
- Thorogood, J. 1986. New technique for sampling otoliths of sashimi-grade scombrid fishes. *Transactions of the American Fisheries Society* 115, 913-914.
- Thorrold, S.R. & Milicich, M.J. 1990. Comparison of larval duration and pre- and post-settlement growth in two species of damselfish, *Chromis atripectoralis* and *Pomacentrus coelestis* (Pisces, Pomacentridae), from the Great Barrier Reef. *Marine Biology* 105, 375-384.
- Thorrold, S.R., Campana, S.E., Jones, C.M. & Swart, P.K. 1997. Factors determining delta C-13 and delta O-18 fractionation in aragonitic otoliths of marine fish. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 61, 2909-2919.
- Thorrold, S.R., Jones, C.M., Campana, S.E., McLaren, J.W. & Lam, J.W.H. 1998a. Trace element signatures in otoliths record natal river of juvenile American shad (*Alosa sapidissima*). *Limnology and Oceanography* 43, 1826-1835.
- Thorrold, S.R., Jones, C.M., Swart, P.K. & Targett, T.E. 1998b. Accurate classification of juvenile weakfish *Cynoscion regalis* to estuarine nursery areas based on chemical signatures in otoliths. *Marine Ecology Progress Series* 173, 253-265.
- Thorrold, S.R. & Shuttleworth, S. 2000. In situ analysis of trace elements and isotope ratios in fish otoliths using laser ablation sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57, 1232-1242.
- Thresher, R.E., Proctor, C.H., Gunn, J.S. & Harrowfield, I.R. 1994. An evaluation of electron-probe microanalysis of otoliths for stock delineation and identification of nursery areas in a southern temperate groundfish, *Nemadactylus macropterus* (Cheilodactylidae). *Fishery Bulletin* 92, 817-840.
- Thresher, R.E. 1999. Elemental composition of otoliths as a stock delineator in fishes. *Fisheries Research* 43, 165-204.
- Tims, H.W.M. 1906. The development, structure and morphology of the scales in some teleostean fish. *Quarterly Journal of Microscopical Sciences* 49, 39-68.
- Titus, R.G. & Mosegaard, H. 1991. Selection for growth potential among migratory brown trout (*Salmo trutta*) fry competing for territories: evidence from otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48, 19-27.
- Tochon-Danguy, H.J. & Schönböerner, A.A. 1981. Étude biophysique de la substance minérale osseuse des poissons. *Ichthyophysiological Acta* 5, 63-74.

- Tomás, J. & Panfili, J. 2000. Otolith microstructure examination and growth patterns of *Vinciguerria nimbaria* (Photichthyidae) in the tropical Atlantic Ocean. *Fisheries Research* 46, 131-145.
- Toole, C.L. & Nielsen, R.L. 1992. Effects of microprobe precision on hypotheses related to otolith Sr/Ca ratios. *Fishery Bulletin* 90, 421-427.
- Toole, C.L., Markle, D.F. & Harris, P.M. 1993. Relationships between otolith microstructure, microchemistry, and early life history events in Dover sole, *Microstomus pacificus*. *Fishery Bulletin* 91, 732-753.
- Torres, G.J., Lombarte, A. & Morales-Nin, B. 2000. Sagittal otolith size and shape variability to identify geographical intraspecific differences in three species of the genus *Merluccius*. *Journal of the Marine Biological Association of the United-Kingdom, Plymouth* 80, 333-342.
- Townsend, D.W., Radtke, R.L., Corwin, S. & Libby, D.A. 1992. Strontium/calcium ratios in juvenile Atlantic herring *Clupea harengus* L. otoliths as a function of water temperature. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 160, 131-140.
- Townsend, D.W., Radtke, R.L., Malone, D.P. & Wallinga, J.P. 1995. Use of otolith strontium/calcium ratios for hindcasting larval cod *Gadus morhua* distributions relative to water masses on Georges Bank. *Marine Ecology Progress Series* 119, 37-44.
- Trébaol, L., Francillon-Vieillot, H. & Meunier, F. J. 1991. Étude de la croissance des mâchoires pharyngiennes chez *Trachinotus teraia* (Carangidae, Perciforme) à l'aide de la technique du marquage vital. *Cybium* 15, 263-270.
- Trichet, J. & Defarge, C. 1995. Non-biologically supported organomineralization. In *Biom mineralization 93. 7th International Symposium on Biom mineralization, Monaco, 17- 20 November 1993: 2 Physiological Process in Biom mineralization; 3 Free Organic Compounds* (Allemamd, D. & Cuif, J. P., ed.), pp. 265-271. Monaco: Bulletin de l'Institut Océanographique de Monaco, n° spécial 14, 2.
- Troadec, H. 1991. Frequency demodulation on otolith numerical images for the automation of fish age estimation. *Aquatic Living Resources* 4, 207-219.
- Troadec, H. 1992. Reconnaissance de structures sur des pièces calcifiées par imagerie numérique dans un but de suivi d'un stock halieutique. Thèse de Doctorat, Université Paris VII, 257 p.
- Troadec, H., Benzinou, A., Rodin, V. & Le Bihan, J. 2000. Use of deformable template for two-dimensional growth ring detection of otoliths by digital image processing: application to plaice (*Pleuronectes platessa*) otoliths. *Fisheries Research* 46, 155-163.
- Tserpes, G. & Tsimenides, N. 1995. Determination of age and growth of swordfish, *Xiphias gladius* L., 1758, in the eastern Mediterranean using anal-fin spines. *Fishery Bulletin* 93, 594-602.

- Tsukamoto, K. 1985. Mass-marking of ayu eggs and larvae by tetracycline-tagging of otoliths. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 51, 903-911.
- Tsukamoto, K. 1988. Otolith tagging of ayu with fluorescent substances. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54, 1289-1295.
- Tsukamoto, K., Kuwada, H., Hirokawa, J., Oya, M., Sekiya, S., Fujimoto, H. & Imaizumi, K. 1989a. Size-dependent mortality of red sea bream, *Pagrus major*, juveniles released with fluorescent otolith-tags in News Bay, Japan. *Journal of Fish Biology* 35(Suppl. A), 59-70.
- Tsukamoto, K., Seki, Y., Oba, T., Oya, M. & Iwahashi, M. 1989b. Application of otolith to migration study of salmonids. *Physiological Ecology of Japan* 1, 119-140.
- Tuljapurkar, S. & Caswell, H. 1996. *Structured-population models in marine, terrestrial and freshwater systems*. New York, USA, Chapman & Hall, Inc.
- Tzeng, W.N. & Yu, S.Y. 1989. Validation of daily growth increments in otoliths of milkfish larvae by oxytetracycline labelling. *Transactions of the American Fisheries Society* 118, 168-174.
- Tzeng, W.N., Severin, K.P. & Wickstroem, H. 1997. Use of otolith microchemistry to investigate the environmental history of European eel *Anguilla anguilla*. *Marine Ecology Progress Series* 149, 73-81.
- Umezawa, A. & Tsukamoto, K. 1991. Factors influencing otolith increment formation in Japanese eel, *Anguilla japonica* T. & S., elvers. *Journal of Fish Biology* 39, 211-223.
- Van Beek, F., Vingerhoed, B. & Schelvis, D. 1997. Development of a prototype Otolith Line for routine age reading of demersal species (OTOLIN). RIVO-DLO Final Report CO27/97, DG XIV-Directorate General Fisheries of the European Commission, 48 p.
- Van der Veer, H.W., Geffen, A. J. & Witte, J.I.J. 2000. Exceptionally strong year classes in plaice *Pleuronectes platessa*: are they generated during the pelagic stage only, or also in the juvenile stage? *Marine Ecology Progress Series* 199, 255-262.
- Van der Waal, B.C.W. & Schoonbee, H.J. 1975. Age and growth studies of *Clarias gariepinus* (Burchell) (Clariidae) in the Transvaal, South Africa. *Journal of Fish Biology* 7, 227-233.
- Van Neer, W. 1993a. Limits of incremental growth in seasonality studies: the example of the clariid pectoral spines from the Byzantino-Islamic site of Apamea (Syria; sixth to seventh century AD). *International Journal of Osteoarchaeology* 3, 119-127.
- Van Neer, W. 1993b. Daily growth increments on fish otoliths as seasonality indicators on archaeological sites: the tilapia from Late Palaeolithic Makhadma in Egypt. *International Journal of Osteoarchaeology* 3, 214-248.

- Van Neer, W., Lougas, L. & Rijnsdorp, A. 1999. Reconstructing age distribution, season of capture and growth rate of fish from archaeological sites based on otoliths and vertebrae. *International Journal of Osteoarchaeology* 9, 116-130.
- Van Oosten, J. 1957. The skin and scales. In *The physiology of fishes* (Brown, M.E., ed.), pp. 207-244. New York, USA: Academy Press.
- Van Someren, V.D. 1937. A preliminary investigation into the causes of scale absorption in Salmon (*Salmo salar* L.). *Fisbery Board of Scotland. Salmon Fisheries* 11, 1-11.
- Van Utrecht, W.L. & Schenkkan, E.J. 1972. On the analysis of the periodicity in the growth of scales, vertebrae and other hard structures in a Teleost. *Aquaculture* 1, 293-316.
- Vas, P., Stevens, J.D., Bonwick, G.A. & Tizini, O.A. 1990. Cadmium, manganese, and zinc concentrations in vertebrae of blue shark and shortfin mako in Australian coastal waters. *Marine Pollution Bulletin* 21, 203-206.
- Vasil'kov, V.P. 1977. The information-recording properties of the scales of the New Zealand jackassfish (*Cheilodactylus macropterus*) and their use to obtain information on growth rhythms. *Journal of Ichthyology* 17, 375-381.
- Vasil'kov, V.P. 1979. The significance, nature and possible causes of growth rhythms in fish. *Journal of Ichthyology* 19, 56-63.
- Vaughan, S. & Smith, P. 1996. Estimation of the influence of a river sediment on the biological activity of oxytetracycline hydrochloride. *Aquaculture* 141, 67-76.
- Veinott, G., Northcote, T., Rosenau, M. & Evans, R.D. 1999. Concentrations of strontium in the pectoral fin rays of the white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) by laser ablation sampling-inductively coupled plasma-mass spectrometry as an indicator of marine migrations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56, 1981-1990.
- Veinott, G.I. & Evans, R.D. 1999. An examination of elemental stability in the fin ray of the white sturgeon with laser ablation sampling-inductively coupled plasma-mass spectrometry (LAS-ICP-MS). *Transactions of the American Fisheries Society* 128, 352-361.
- Vianet, R., Quignard, J.P. & Tomasini, J.A. 1989. Âge et croissance de quatre poissons pleuronectiformes (flet, turbot, barbu, sole) dans le Golfe du Lion. Évolution de la structure de la sagitta. *Cybium* 13, 247-258.
- Vibert, R. & Lagler, K.F. 1961. *Pêches continentales. Biologie et aménagement*. Paris, France: Dunod.
- Victor, B.C. & Brothers, E.D. 1982. Age and growth of the fallfish *Semotilus corporalis* with daily otolith increments as a method of annulus verification. *Canadian Journal of Zoology* 60, 2543.

- Vilizzi, L. & Walker, K.F. 1999. Age and growth of the common carp, *Cyprinus carpio*, in the River Murray, Australia: validation, consistency of age interpretation, and growth models. *Environmental Biology of Fishes* 54, 77-106.
- Villiers S. (de), 1999. Seawater strontium and Sr/Ca variability in the Atlantic and Pacific oceans. *Earth and Planetary Science Letters* 171, 623-634.
- Volk, E.C., Wissmar, R.C., Simenstad, C.A. & Eggers, D.M. 1984. Relationship between otolith microstructure and the growth of juvenile chum salmon (*Oncorhynchus keta*) under different prey rations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 41, 126-133.
- Volk, E.C., Schroder, S.L. & Fresh, K.L. 1990. Inducement of unique otolith banding patterns as a practical means to mass-marking juvenile Pacific salmon. *American Fisheries Society Symposium* 7, 203-215.
- Volk, E.C., Schroder, S.L. & Grimm, J.J. 1994. Use of a bar code symbology to produce multiple thermally-induced otolith marks. *Transactions of the American Fisheries Society* 123, 811-816.
- Volk, E.C., Mortensen, D.G. & Wertheimer, A.C. 1995. Non-daily otolith increments and seasonal changes in growth of a pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) population in Auke Bay, Alaska. In *Recent developments in fish otolith research* (Secor, D.H., Dean, J.M. & Campana, S.E., ed.), pp. 211-225. Columbia, SC, USA: University of South Carolina Press.
- Volk, E.C., Schroder, S.L. & Grimm, J.J. 1999. Otolith thermal marking. *Fisheries Research* 43, 205-219.
- Wainright, S.C., Fuller, C.M., Michener, R.H. & Richards, R.A. 1996. Spatial variation of trophic position and growth rate of juvenile striped bass (*Morone saxatilis*) in the Delaware River. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53, 685-692.
- Walter, E. 1901. Die Alterbestimmung des Karpfens nach der Schuppe. In *Die Karpfenzucht* ed.), pp. 88-132. Neudamm.
- Warburton, K. 1978. Age and growth determination in marine catfish using an otolith check technique. *Journal of Fish Biology* 13, 429-434.
- Ware, D.M. 1975. Growth, metabolism and optimal swimming speed of a pelagic fish. *Journal of Fisheries Research Board Canada* 32, 33-41.
- Watabe, N., Tanaka, K., Yamada, J. & Dean, J.M. 1982. Scanning electron microscope observations of the organic matrix in the otolith of the Teleost fish *Fundulus heteroclitus* (Linnaeus) and *Tilapia nilotica* (Linnaeus). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 58, 127-134.
- Watanabe, Y. & Saito, H. 1998. Feeding and growth of early juvenile Japanese sardines in the Pacific waters off central Japan. *Journal of Fish Biology* 52, 519-533.

- Watarai, O. & Igarashi, M. 1990. An optical pattern reader and analyzer for scale of chum salmon. In *Proceedings of an IEEE Ocean Engineering Society* (OCEAN'90, ed.), OCEAN'90, pp. 321-326.
- Watarai, O. & Igarashi, M. 1992. A chum scale pattern analyzer and stock identification based on scale patterns by discriminant function and power spectrum analysis. *IEEE Journal of Oceanographic Engineering* 17, 280-287.
- Watson, J.E. 1965. A technique for mounting and storing herring otoliths. *Transaction of the American Fisheries Society* 94, 267-268.
- Weber, D. & Rigway, G.J. 1967. Marking Pacific salmon with tetracycline antibiotics. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* 24, 849-865.
- Weidman, C.R. & Jones, G.A. 1993. A shell-derived time history of bomb (super 14) C on Georges Bank and its Labrador Sea implications. *Journal of Geophysical Research* 98, 14,577-14,588.
- Weidman, C.R. & Millner, R. 2000. High-resolution stable isotope records from North Atlantic cod. *Fisheries Research* 199, 327-342.
- Weiss, R.E. & Watabe, N. 1979. Studies on the biology of fish bone. III. Ultrastructure of osteogenesis and resorption in osteocytic (cellular) and anosteocytic (acellular) bones. *Calcified Tissue International* 28, 43-56.
- Welleman, H.C. & Storbeck, F. 1995. Automatic aging of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) otoliths by means of image analysis. In *Recent developments in fish otolith research* (Secor, D.H., Dean, J.M. & Campana, S.E., ed.), pp. 271-282. Columbia, SC, USA: University of South Carolina Press.
- Wellington, G.M. & Dunbar, R.B. 1995. Stable isotopic signature of El Nino-Southern Oscillation events in eastern tropical Pacific reef corals. *Coral Reefs* 14, 5-25.
- Werder, U. & Soares, G.M. 1984. Age determination by sclerite numbers, and scale variations in six fish species from the Central Amazon (Osteichthyes, Characoidei). *Amazoniana* 8, 395-420.
- West, C.J. & Larkin, P.A. 1987. Evidence for size-selective mortality of juvenile sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) in Babine Lake, British Columbia. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 44, 712-721.
- West, I.F. & Gauldie, R.W. 1994. Determination of fish age using super(210)Pb: super(226)Ra disequilibrium methods. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 51, 2333-2340.
- Wheeler, A.P., George, J.W. & Evans, C.A. 1981. Control of calcium carbonate nucleation and crystal growth by soluble matrix of oyster shell. *Science* 212, 1397-1398.
- Whitear, M., Mittal, A.K. & Lane, E.B. 1980. Endothelial layers in fish skin. *Journal of Fish Biology* 17, 43-65.

- Whitear, M. 1986. The skin of the fishes including the cyclostomes. Epidermis. Dermis. In *Biology of the Integument. II. Vertebrates* (Bereiter-Hahn, J., Matoltsy, A.G. & Richards, K.S., ed.), pp. 8-64. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer Verlag.
- Wilbur, K.M. 1980. Cells, crystals and skeleton. In *The mechanisms of biomineralization in animals and plants* (Omori, M. & Watabe, N., ed.), pp. 3-10. Tokyo, Japan: Tokai University Press.
- Wilbur, K.M. & Saleuddin, A.S.M. 1983. Shell formation. In *The Mollusca. IV. Physiology (Part 1)* (Saleuddin, A.S.M. & Wilbur, K.M., ed.), pp. 235-287.
- Williams, T. & Bedford, B.C. 1974. The use of otoliths for age determination. In *The ageing of fish* (Bagenal, T.B., ed.), pp. 114-123. London, UK: Unwin Brothers Ltd.
- Wilson, C.A., Brothers, E.B., Casselman, J.M., Smith, C.L. & Wild, A. 1983. Glossary. In *Proceedings of the international workshop on age determination of oceanic pelagic fishes: Tunas, Billfishes, and Sharks* (Prince, E.D. & Pulos, L.M., ed.), pp. 207-208, NOAA Technical Report NMFS 8.
- Wilson, C.A., Beckman, D.W. & Dean, J.M. 1987. Calcein as a fluorescent marker of otoliths of larval and juvenile fish. *Transactions of the American Fisheries Society* 116, 668-670.
- Wilson, K.H. & Larkin, P.A. 1982. Relationship between thickness of daily growth increments in sagittae and change in body weight in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) fry. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 39, 1335-1339.
- Winemiller, K.O. 1987. Feeding and reproductive biology of the currito, *Hoplosternum littorale*, in the Venezuelan llanos with comments on the possible function of the enlarged male pectoral spines. *Environmental Biology of Fishes* 20, 219-227.
- Winge, Ö. 1915. On the value of the rings in the scales of the cod as a means of age determination. Illustrated by marking experiments. *Medd. Komm. Havund, ser. Fisk* 4, 1-20.
- Wintner, S.P. & Cliff, G. 1999. Age and growth determination of the white shark, *Carcharodon carcharias*, from the east coast of South Africa. *Fishery Bulletin* 97, 153-169.
- Wright, P.J. 1990. The periodicity and formation of otolith increments in *Salmo salar* and *Gasterosteus aculeatus*. PhD Thesis, University of Glasgow, 268 p.
- Wright, P.J., Metcalfe, N.B. & Thorpe, J.E. 1990. Otolith and somatic growth rates in Atlantic salmon parr, *Salmo salar* L.: evidence against coupling. *Journal of Fish Biology* 36, 241-249.
- Wright, P.J. 1991a. The influence of metabolic rate on otolith increment width in Atlantic salmon parr, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Biology* 38, 929-933.

- Wright, P.J. 1991b. Calcium binding by soluble matrix of the otoliths of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Biology* 38, 625-627.
- Wright, P.J., Rowe, D. & Thorpe, J.E. 1991. Daily growth increments in the otoliths of Atlantic salmon parr, *Salmo salar* L., and the influence of environmental factors on their periodicity. *Journal of Fish Biology* 39, 103-113.
- Wright, P.J., Thalbot, C. & Thorpe, J.E. 1992. Otolith calcification in Atlantic salmon parr, *Salmo salar* L., and its relation to photoperiod and calcium metabolism. *Journal of Fish Biology* 40, 779-790.
- Wright, P.J. 1993. Otolith microstructure of the lesser sandeel, *Ammodytes marinus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United-Kingdom, Plymouth* 73, 245-248.
- Wright, P.J. & Bailey, M.C. 1996. Timing of hatching in *Ammodytes marinus* from Shetland waters and its significance to early growth and survivorship. *Marine Biology* 126, 143-152.
- Wright, P.J., Geffen, A.J., Gordon, J., Morales-Nin, B., Palomeres, J.I. & Rebelo, J. 1998. Interpreting otolith microstructure. In *Otolith preparation and analysis* (Wright, P.J., ed.), EFAN Report 2/1998.
- Wright, P.J., Fallon-Cousins, P. & Armstrong, J.D. 2001. The relationship between otolith accretion and resting metabolic rate in juvenile Atlantic salmon during a change in temperature. *Journal of Fish Biology* 59, 657-666.
- Wurster, C.M., Patterson, W.P. & Cheatham, M.M. 1999. Advances in micromilling techniques: a new apparatus for acquiring high-resolution oxygen and carbon stable isotope values and major/minor elemental ratios from accretionary carbonate. *Computers & Geosciences* 46, 1159.
- Xiao, Y. 1996. How does somatic growth rate affect otolith size in fishes? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53, 1675-1682.
- Yamada, S.B., Mulligan, T.J. & Fournier, D. 1987. Role of environment and stock on the elemental composition of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) vertebrae. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 44, 1206-1212.
- Yamamoto, T., Ueda, H. & Higashi, S. 1998. Correlation among dominance status, metabolic rate and otolith size in masu salmon. *Journal of Fish Biology* 52, 281-290.
- Yoneda, M., Tokimura, M., Fujita, H., Takeshita, N., Takeshita, K., Matsuyama, M. & Matsuura, S. 1997. Age and growth of anglerfish *Lophius litulon* in the East China Sea and the Yellow Sea. *Fisheries Science* 63, 887-892.
- Yosef, T.G. & Casselman, J.M. 1995. A procedure for increasing the precision of otolith age determination of tropical fish by differentiating biannual recruitment. In *Recent developments in fish otolith research* (Secor, D.H., Dean, J.M. & Campana, S.E., ed.), pp. 247-269. Columbia, SC, USA: University of South Carolina Press.

- Yoshinaga, J., Nakama, A., Morita, M. & Edmonds, J.S. 2000. Fish otolith reference material for quality assurance of chemical analyses. *Marine Chemistry* 69, 91-97.
- Yoshioka, S., Ohde, S., Oomori, T. & Kitano, Y. 1985. Dissolution of magnesium and strontium during the transformation of coral aragonite to calcite in aqueous solution. *Galaxea* 4, 99-111.
- Yunker, J.L. & Ehrlich, R. 1977. Fourier biometrics: harmonic amplitudes as multivariate shape descriptors. *Systematic Zoology* 26, 336-342.
- Yudin, K.G. & Cailliet, G.M. 1990. Age and growth of the gray smoothhound, *Mustelus californicus* and the brown smoothhound, *M. henlei*, sharks from Central California. *Copeia* 1, 191-204.
- Zhang, Z. & Runham, N.W. 1992a. Otolith microstructure pattern in *Oreochromis niloticus* (L.). *Journal of Fish Biology* 40, 325-332.
- Zhang, Z. & Runham, N.W. 1992b. Temporal deposition of incremental and discontinuous zones in the otoliths of *Oreochromis niloticus* (L.). *Journal of Fish Biology* 40, 333-339.
- Zhang, Z. & Beamish, R.J. 2000. Use of otolith microstructure to study life history of juvenile chinook salmon in the Strait of Georgia in 1995 and 1996. *Fisheries Research* 46, 239-250.
- Zivkov, M. 1996. Critique of proportional hypotheses and methods for back-calculation of fish growth. *Environmental Biology of Fishes* 46, 309-320.
- Zylberberg, L. & Meunier, F.J. 1981. Evidence of denticles and attachment fibres in the superficial layer of scales in two fishes: *Carassius auratus* and *Cyprinus carpio* (Cyprinidae, Teleostei). *Journal of Zoology (London)* 195, 459-471.
- Zylberberg, L. & Nicolas, G. 1982. Ultrastructure of scales in a teleost (*Carassius auratus* L.) after use of rapid freeze-fixation. *Cell and Tissue Research* 223, 349-367.
- Zylberberg, L., Géraudie, J., Meunier, F.J. & Sire, J.Y. 1992. Biomineralization in the integumental skeleton of the living lower Vertebrates. In *Bone* (Hall, B.K., ed.), pp. 171-224. CRC Press.
- Zylberberg, L. & Meunier, F.J. 1996. Ultrastructural data on the melanophores associated with the cellular elasmoid scales in *Leporinus friderici* (Teleostei, Ostariophysi, Anostomidae): their putative participation in scale matrix formation. *Journal of Morphology* 228, 155-164.
- Zylstra, U., Boer, H.H. & Sminia, T. 1978. Ultrastructure, histology, and innervation of the mantle edge of the freshwater pulmonate snails *Lymnaea stagnalis* and *Biomphalaria pfeifferi*. *Calcareous Tissue Research* 26, 271-282.

Acronymes et symboles chimiques

2D	vue en 2 dimensions
3D	vue en 3 dimensions
A	âge
AAS	atomic absorption spectrometry (spectrométrie d'absorption atomique)
ACP	analyse en composantes principales
AES	atomic emission spectrometry (spectrométrie d'émission atomique)
Al	aluminium
AMD	distance marginale absolue
AMS	accelerator mass spectrometry (spectrométrie de masse par accélérateur)
ANOVA	analyse de variance
APS	acide périodique de Schiff
APV	analyse de population virtuelle, analyse de cohortes
ASP	analyse séquentielle de population
Ba	baryum
C	carbone
Ca	calcium
CaCO ₃	carbonate de calcium
CAD	convertisseur analogique-digital
Caméra CCD	charge-coupled device camera (caméra à transfert de charge)
CCIR	Comité consultatif international des radio-communications
Cd	cadmium
CDA	convertisseur digital-analogique
Ce	cérium
CIEM	Conseil international pour l'exploration de la mer
Cl	chlore
CO ₂	dioxyde de carbone
CRM	Certified reference materials (matériel de référence certifié)
CTA	clé taille-âge
Cu	cuivre
CV	coefficient de variation
EACAO	estimation de l'âge et de la croissance assistée par ordinateur
EDS	energy dispersive spectrometry (spectrométrie à énergie dispersive)
EFAN	European fish ageing network
ETC	effet du taux de croissance
FCVB	fonction de croissance de von Bertalanffy
Fe	fer
FFT	transformée de Fourier
FRC	formule de rétrocalcul
g	taux de croissance instantané
GAG	glycosaminoglycan
H	hydrogène
HR-ICP-MS	high resolution-inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS haute résolution)

HTCP	hypothèse avec taille corporelle proportionnelle (pour le rétrocalcul)
HTEP	hypothèse avec taille de l'écaille proportionnelle (pour le rétrocalcul)
ICES	International council for the exploration of the sea (CIEM, Conseil international pour l'exploration de la mer)
ICP-AES	inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (spectrométrie d'émission atomique couplée à une torche à plasma)
ICP-MS	inductively coupled plasma-mass spectrometry (spectrométrie de masse à torche à plasma inductif)
ID-ICP-MS	isotope-dilution inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS par dilution isotopique)
IRMS	isotope ratio mass spectrometry (spectrométrie de masse des rapports isotopiques)
JPEG	Joint photographic experts group
K	potassium
LAC	ligne d'arrêt de croissance
LA-ICP-MS	laser ablation - inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS à ablation laser)
Li	lithium
LOD	limite de détection
LS	longueur standard
MANOVA	analyse de variance multivariée
MCO	microchimie de l'otolithe
MEB	microscope électronique à balayage
MET	microscope électronique à transmission
Mg	magnésium
Mn	manganèse
N	azote
Na	sodium
Ni	nickel
O	oxygène
OES	optical emission spectrometry (spectrométrie d'émission optique)
P	phosphore
PA	pourcentage d'accord
Pb	plomb
PC	pièce calcifiée
PDB	Peedee belemnite
PIXE	particle-induced X-ray emission (émission X induite par bombardement de protons)
PME	pourcentage moyen d'erreur
Ra	radium
RAM	random access memory
Rb	rubidium
RMD	distance marginale relative
Rn	radon
S	soufre
Si	silicium

SIMS	secondary ion mass spectrometry (spectrométrie d'émission ionique secondaire)
SLAP	standard light Antarctic precipitation
Sm	samarium
SMOW	standard mean ocean water
Sr	strontium
Sr/Ca	strontium/calcium
SRM	Standard reference materials (matériel standard de référence)
TAC	totaux autorisés de capture
TC	fibres transversales de collagène
TCA	taux de croissance absolu
TCJ	taux de croissance journalière
TCR	taux de croissance relative
TCS	taux de croissance spécifique
Th	thorium
TIFF	tagged image file format
TIMS	thermal ionisation mass spectrometry (spectrométrie de masse à ionisation thermique)
Tl	thallium
U	uranium
VPDB	Vienna-Peedee belemnite
VSMOW	Vienna standard mean ocean water
WDS	wavelength dispersive spectrometry (spectrométrie à longueur d'onde dispersive)
WIP	water-insoluble protein (protéine insoluble dans l'eau)
WSP	water-soluble protein (protéine soluble dans l'eau)
Zn	zinc

Adresses des auteurs

Abdesslam Benzinou

ENIB, laboratoire RESO, Technopole Brest-Iroise, Site de la Pointe du Diable, BP 30815, 29608 Brest Cedex, France
Tél. : +33 2 98 05 66 92 - Fax : +33 2 98 05 66 89
E-mail : benzinou@enib.fr

Arild Folkvord

University of Bergen, Department of Fisheries and Marine Biology
Bergen High Technology Center, 5020 Bergen, Norway
Tél. : +47 55584456 - Fax : +47 55584450
E-mail : arild.folkvord@ifm.uib.no

Audrey J. Geffen

School of Biological Sciences, University of Liverpool, Port Erin
Marine Laboratory, Port Erin, Isle of Man IM9 6JA GB, UK
Tél. : +44 1624 83 10 16 - Fax : +44 1624 83 10 01
E-mail : geffen@liv.ac.uk

Willie McCurdy

Department of Agriculture and Rural Development for Northern
Ireland, Aquatic Systems Group,
18a Newforge Lane, Belfast BT9 5PX, Northern Ireland, UK
Tél. : +44 2890255513 - Fax : +44 2890382244
E-mail : willie.mccurdy@dardni.gov.uk

Benoît Mesnil

Ifremer, centre de Nantes, laboratoire MAERHA
BP 21105, 44311 Nantes Cedex 3, France
Tél. : +33 2 40 37 40 09 - Fax : +33 2 40 37 40 75
E-mail : Benoit.Mesnil@ifremer.fr

François J. Meunier

MNHN, FR CNRS 1451, laboratoire d'Ichtyologie générale
et appliquée, 43 rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, France
Tél. : +33 1 40 79 37 61 - Fax : +33 1 40 79 37 71
ou,
Université Denis Diderot-Paris 7, UMR CNRS 8570, 2 place Jussieu,
75251 Paris Cedex 05, France
E-mail : meunier@mnhn.fr

Beatriz Morales-Nin

GOI-IMEDEA (UIB/CSIC)

Miguel Marqués 21, 07190 Esporles, Spain

Tél : +34 971611721 - Fax : +34 971611761

E-mail : ieabmn@clust.uib.es

Henrik Mosegaard

Danish Institute for Fisheries Research, Charlottenlund Castle,
2920 Charlottenlund, Denmark

Tél : +45 33 96 34 61 - Fax : +45 33 96 33 33

E-mail : hm@dfu.min.dk

Jacques Panfili

IRD, centre de recherche halieutique méditerranéenne et tropicale,
BP 171, 34203 Sète Cedex, France

E-mail : panfili@ird.fr

Hélène de Pontual

Ifremer, centre de Brest, Drv/rh/LASAA,

BP 70, 29280 Plouzané, France

Tél : +33 2 98 22 46 92 - Fax : +33 2 98 22 46 53

E-mail : pontual@ifremer.fr

Peter J. Wright

Fisheries Research Services Marine Laboratory,

PO Box 101, Victoria Road, Aberdeen, AB11 9DB, Scotland, UK

Tel. : +44 1224 295436 - Fax. : +44 1224 295511

E-mail : wrightp@marlab.ac.uk

Index

	Page		
AAS	287, 290	¹⁴ C	274
Accroissement annuel	36, 93	¹³ C/ ¹² C	247
Accroissement journalier	36, 93	Ca	55, 99, 251
Accroissement primaire	36, 47	CaCO ₃	251, 252
Accroissement sub-journalier	37, 38	Calcite	54, 252
Activité métabolique	52, 87, 176	Calcium	86, 257
ACP	279	Canal vasculaire	73
AES	287, 290	Canal vasculaire circulaire	74
Âge de la première maturité	99, 175	Canal vasculaire longitudinal	74
Al	254, 296	Canal vasculaire primaire	74
Alcool	317, 342, 359	Canal vasculaire radiaire	74
Alizarine	117	Canal vasculaire secondaire	74
Allométrie	100, 149	<i>Canaliculus</i> (pl. <i>canaliculi</i>)	66
AMS (SMA)	276, 293	Carbonate	281
Anadrome	104, 260	Carbonate de calcium	34, 44, 251
Analyse de cohortes	184	Cartilage	27, 353
Anneau dédoublé	48	Catalyseur	334
APV	184	Cavité médullaire	66, 75
Aquaculture	125	Cavité vasculaire	66, 73
Aquamount®	349, 355	CCD	203
Aragonite	35, 252	Cd	254, 258
Archéologie	88	Ce	281
ASP	184	Centre de croissance accessoire	42
<i>Asteriscus</i> (pl. <i>asterisci</i>)	31	Centre de croissance secondaire	42
Attaque acide	351	<i>Circulus</i> (pl. <i>circuli</i>)	58
Attaque acide - temps	351	Citrate	70
Audition	35	Cl	252
Automatisation	201	Classe annuelle	191
Axe de lecture standardisé	108	Classe d'âge	96, 132, 167
Axe de mesure	110, 131	Clé taille-âge	136, 190
Ba	70, 254, 258	<i>Cleithrum</i> (pl. <i>cleithra</i>)	20, 79
Bain à ultrasons	351, 356, 358	CO ₂	57, 252, 265
Baltique	173	Coefficient de distribution	258
Bande chromophile	133	Coefficient de variation	139
Baume du Canada	359	Cohorte	98, 137, 181
Benzoate de méthyl	359	Collagène	60, 284
Biais externe	95	Colle cyanoacrylate, Cyanoacrylate	334
Biais interne	95	Colle thermofusible (résine)	334, 348
Biominéralisation	53, 255	Colonisation	101
Bleu de toluidine	45, 353	Coloration	353
Bootstrap	165, 176, 280	Composition élémentaire	252, 286
Bord de la PC	95, 129, 228	Conservation	294, 317, 370
Brûlage	352	Conservation dans l'alcool	317, 328

Contamination	296, 317, 355	Denticules	28
Contenu ionique	256	Dentine	28, 72
Continuité des marques	108	Dérive instrumentale	298
Contre-plaqué	60	Derme	58
Contrôle métabolique du taux d'accrétion		Déséquilibre radioactif	249
de l'otolithe	173	Désintégration radioactive	248
Convolution	211, 214	Développement des gonades	178
Corail	264, 275	Développement embryonnaire	174
Corpuscules de Mandl	61	Diadrome	100, 260
Corrélation de rang	173	Discontinuité	36
Couche externe	60	Discrimination de stock	227, 277
Couche superficielle	58, 60	Dissolution	263, 290
Créosote	333	Distal(e)	34
Crêtes	24, 58, 332	Distance marginale absolue	131
Cristal	53, 257	Distance marginale relative	131
Critères d'interprétation	95, 201	Distribution de fréquence cumulée	175
Croissance - axes	108, 134, 149	Distribution des dates de naissance	174
Croissance - effet du taux		Écaille	58, 318, 331
de croissance	151, 168	Écaille cténoïde	58
Croissance - hypothèse de mortalité	167	Écaille cycloïde	58
Croissance individuelle	153	Écaille élasmoïde	58
Croissance - isométrie	149	Écaille ganoïde	58
Croissance - marques	41, 62, 80	Écaille régénérée	62
Croissance - mécanisme du taux		Échantillonnage	178, 294
de croissance	168	Échantillonnage - effets d'évitement	178
Croissance - patrons	140	Échantillonnage - stratégie	
Croissance - taux	146	d'échantillonnage	165, 190, 294
Croissance - trajectoires	148	Échantillonnage mensuel	86, 88
Cryomat™	346	Échantillonnage répété	169, 175
Cryotome	346	Échelle de temps	93, 250
Crystal Bond™	347	Éclairage	206, 360
Cristallites	65, 70	Éclosion	40, 174
Cu	254, 258, 303	Éclosion - discontinuité, marque	
Datation radiométrique	249, 271	d'éclosion	40, 177
Date de naissance	96, 137, 174	Éclosion - distribution des dates	
Débuter une étude	91, 246, 307	d'éclosion	175
Décalcification	351	Écotoxicologie	256, 284
Décontamination	356	EDS	287, 289, 302
Découpe	228, 320, 343	Élasmoblaste	59, 62
Dégradation	317	Électron primaire	366
Degré de minéralisation	71, 352	Électron rétrodiffusé	366
Démodulation (signal)	223	Électron secondaire	366
Demi-vie	249	Élément trace	44, 252, 256
Dendrochronologie	19, 23, 154	Élément mineur	252, 254, 278
Densité optique	101, 233, 359	Élevage	125
Dent	27, 281	Email	28, 58

Embryon	120, 326	Front de minéralisation	62, 70
Empreinte élémentaire	280	Fuchsine acide	353
Endolymph	31, 251	GAG	269
Endoste	66	Ganoïne	58, 72
Enrobage	333	Gestion des stocks	137, 180, 345
Épiderme	60	Glycérine	296, 359
Épine	108	Grossissement	358, 362
Érosion	63	Groupe d'âge	98, 135, 180
Éther-alcool	359	H	55, 247, 258
Éthylène diamine tétra-acétate (EDTA)	351	Habitat	280
Eukitt®	334, 359	Hématoxyline (d'Ehrlich)	71, 346, 354
Évaluation de stock	180, 239	Hierarchies de dominance	173
Événement spatio-temporel	79	Histoire environnementale	260
Événements de l'histoire individuelle	99, 174	Histologie osseuse	68
Évitement de l'engin	178	Histophysiologie	65
Exactitude	141, 237	Homéostasie	36, 284
Examen topographique	366	HR-ICP-MS	290
Facteur endogène	105, 263	Huile d'immersion	363
Facteur épigénétique	79	Huile éclaircissante	333, 359
Facteur exogène	48, 263	Huiles essentielles	333, 359
Facteur génétique	79	Hydroxyapatite	66, 284
Fe	254, 258	Hypercalcémie	86
Fibres de collagène	60, 365	Hyperminéralisation	86
Fibres de Sharpey	68	Hyperostose	77
Fibres extrinsèques	68	Hypothèse de taille corporelle proportionnelle (pour le rétrocalcul)	160
Fibres TC	60	Hypothèse avec taille de l'écaille proportionnelle (pour le rétrocalcul)	160
Fibrilles intrinsèques	68	ICP-AES	287, 290
Filtre gaussien	216	ICP-MS	287, 290, 298
Filtre gradient	219	Identification de stock	278
Filtre laplacien	219	ID-ICP-MS	290
Filtre médian	211	Image - 3D	228, 366
Filtre moyenneur	216	Image - acquisition	202, 206
Filtre passe-bas	214	Image - anamorphose	211
Filtre passe-haut	214	Image - contraste	205, 210
Filtrage spatial	211	Image - format	206, 208, 240
Filtrage spectral	214, 216	Image - intégration	206, 220
Fitness	176	Image - mosaïque	208
Flo-texx®	359	Image - profil	213, 224
Fonction de croissance de Gompertz	153	Image - qualité	205
Fonction de croissance de von Bertalanffy	136, 153, 224	Image - résolution	204, 238
Foraminifère	264	Image - système d'analyse d'images	202
Forme	105, 227	Impression sur acétate	332
Fossile	281	Incinération	71
Fractionnement de masse	247	Incorporation d'élément	255

Inotropique	66	Marquage vital	76, 114, 116
Interactions biologiques	187	Marque surnuméraire	83
Interactions techniques (ou technologiques)	185	Marque d'émergence	42
Intercalibration	91, 303	Marque de naissance	83, 95
Interférence	257, 290, 300	Marque de reproduction	24, 83, 100
Interprétation-problèmes	47, 105, 133	Matériel de référence (CRM, SRM)	286, 297, 303
IRMS	277, 287, 291	Maturité sexuelle	87, 99, 269
Isomet®	343	Maximum de vraisemblance	135, 176, 280
Isopédine	60	MEB	366
Isotope	246, 290	Mécanisme « mieux vaut être plus grand »	167, 171
Isotope stable	247, 261, 290	Mécanisme de « durée du stade de vie »	168
Jeûne	53, 163, 254	Mécanisme du « taux de croissance »	168
Justesse	237, 302	Mésocosme	125, 169
K	252	Métabolisme	267
Labyrinthe	31, 323	Métabolisme du calcium	86, 178
<i>Lagena</i>	31	Métamorphose	41, 101, 269
LA-ICP-MS	289, 298, 356	Mg	70, 254
Lame (montage)	331, 348, 372	Micro-accroissement	36
Lame (disque) diamantée	343	Microchimie	245
Lamelle de microscopie	328, 338, 349	Micro-fraiseuse	291
<i>Lapillus</i> (pl. <i>lapilli</i>)	31	Microradiographie	368
Laplacien d'une gaussienne	219, 220	Microscopie photonique	358
Laser	289, 301, 364	Microstructure	36
Lentilles achromatiques	364	Microtubule	328, 370
Li	254, 257, 357	Migration	104, 177, 260
Ligne cimentante	71	Milieu tempéré	14
Ligne d'arrêt de croissance	72	Milieu tropical	14
Ligne de repos	72	Milli Q (eau)	351, 356
Ligne de réversion	72	Minéralisation	53, 61, 70
Ligne latérale	318	Minuties	325, 349
Lignes d'accroissement	353	Mn	70, 254, 258
Limites de détection (LOD)	252, 287, 299	Modèle d'évaluation de stocks	180
Liquide d'immersion	325, 363	Modèle de pêcherie composite	186
Longévité	100	Modèle linéaire généralisé (voir aussi régression de Ricker)	161
Longueur-âge	151, 191	Modèle « oignon »	105
Lumière polarisée	69, 206, 365	Modèle structuré en âge	181
Mâchoire	83	Montage (préparation)	331, 347
Macrostructure	314	Morphogenèse osseuse	82
<i>Macula</i>	31	Morphologie mathématique	220
Manipulation	327	Mortalité	167, 182
Marge - accroissement marginal	131, 133	Mortalité cumulée	174
Marge - zone marginale	97, 129, 208	Mortalité dépendante de la taille	175
Marquage	114, 280	Moule	336
Marquage au strontium	125, 281		
Marquage de la peau	116		

N	258, 287, 291	Paléophysiologie	88
Na	252, 254, 278	Paléotempérature	248, 281
Nageoire	20, 328	Papier abrasif	350
Nageoire dorsale	84, 92, 328	Patron de largeur des accroissements	170
Nageoire pectorale	26	Pb	254, 271, 303
Nettoyage	296, 318, 327	Perception visuelle	232
Nettoyage - bain à ultrasons	318, 351, 356	Périoste	66, 76, 84
Nettoyage - bain de nettoyage	329, 331	Permout®	349, 359
Ni	254, 258	Phosphate de calcium	70, 318
Noyau	36	Photopériode	50, 123
¹⁸ O/ ¹⁶ O	247	Pièce calcifiée - forme	105, 227
O	252, 258, 291	Pièce calcifiée - interprétation	105, 202
Objectivité	237	Pièce calcifiée - lecture	95, 138, 230
Observation	331, 358	PIXE	289, 302, 356
OES	287, 290	Plan de focalisation	105
Ontogénique	177, 267	Plan de section	106
Operculaire	20, 65, 79	Plan d'extraction	317
Orangé de xylénol	117	Plan d'orientation	34, 106, 317
Oreille interne	31	Plan frontal	34
Organe de Weber	35	Plaque basale	58
Os	65	Plaque en plastique noir	337, 339, 359
Os à fibres parallèles	68, 80, 365	Plasma sanguin	54, 99, 255
Os acellulaire	66, 84	Plexiglas™ - support d'échantillon	351
Os anostéocytaire	66	Poïkilotherme	82, 85
Os avasculaire	73, 84	Pollution	282
Os compact	74	Polymérisation	334
Os fibreux	68, 79	Ponçage et polissage - machines	350
Os hypervascularisé	75, 83	Ponçage fin	351
Os lamellaire	68, 79, 365	Population	277
Os long	78	Poudre d'alumine	350, 356
Os operculaire	20, 332, 358	Poudre de diamant	351
Os plat	78	Pourcentage d'accord	138
Os primaire	68, 76, 80	Pourcentage moyen d'erreur	139
Os secondaire	68, 74, 76	Pouvoir de résolution	133
Os spongieux	73	Précision	141, 237, 302
Os vasculaire	73	Première maturité	82, 99, 178
Ostéoblaste	66, 74, 76	<i>Primordium</i> (pl. <i>primordia</i>)	38
Ostéoclaste	66, 68, 76	<i>Primordium</i> secondaire	101
Ostéocyte	66, 75, 80	Productivité	239
Ostéone secondaire	74	Propriété optique	217, 358
Otoconies	35	Protéine	35, 251, 352
Otoline	35, 251	Protéoglycan	66, 284, 354
P	252, 258	Protexx®	359
Paléobiologie	88	Proximal	34, 57, 105
Paléoclimat	88, 281	Qualité des données	21, 181, 293
Paléontologie	106	Ra	252, 271, 292

Radiocarbone	274	Saisonnalité	85
Radioisotope	280	Salinité	260, 285
Radionucléide	272, 292	Scléroblaste	59, 62, 66
<i>Radius</i> (pl. <i>radii</i>)	58	Section de pièces calcifiées	343
Rapport isotopique	247	Section - plan de section	106
Rapport strontium-calcium (Sr/Ca)	260, 263, 288	Sélection de pièces calcifiées	92
Rayon de nageoire	20, 328	Sélection phénotypique directionnelle	176
Rayon épineux	65, 83	Sélection phénotypique stabilisante	176
Rayons X	289, 367, 368	Si	70, 284, 296
Rb	252	SIMS	287, 291
Régime alimentaire	117, 263, 267	SLAP	247
Régression non paramétrique basée sur des splines	176	Sm	281
Relais physiologiques	87	SMA (AMS)	276, 293
Remaniement osseux	76	Source d'erreur	138, 298
Répétabilité	95	Spectrométrie de masse	276, 289, 290
Reproductibilité	237	Splines cubiques	176
Reproduction	87, 178, 270	Sr	125, 254, 261
Résine - enrobage	333	Sr/Ca	260, 263
Résine - inclusion	333	Stade vitellin	172, 177
Résine - pureté	355	Standardisation	108, 237
Résine - viscosité	356	Statolithe	209
Résine époxy	334, 355	Stockage des pièces calcifiées	317, 327
Résine polyester	333	<i>Stratum compactum</i>	58
Résine thermofusible (colle)	334, 356, 359	Stratyl	342
Résorption	20, 72, 95	Styrène	335, 338, 342
Rétrocalcul	154	Subjectivité	108, 138, 201
Rétrocalcul - hypothèse avec taille corporelle proportionnelle	160	<i>Sulcus acusticus</i>	34, 110
Rétrocalcul - méthode du point d'intersection biologique	157	Supra-occipital	20, 67
Risque de contamination	296, 351, 356	Surface (analyse)	289
Routine	135, 192, 241	Surface - rugosité	289, 356
S	247, 252, 258	Survie avant recrutement	167
Sac otique	31	Suspension diamantée	351, 356
Sac vitellin	40, 42	Taille-âge	147, 191
<i>Sacculus</i>	31, 55	Taux d'accrétion	52, 177, 251
<i>Sagitta</i> (pl. <i>sagittae</i>)	31	Taux métabolique	53, 268
Sagittale	34, 323	Température	85, 123, 263
Saison - accroissement saisonnier	44	Test de Kolmogorov-Smirnov	140, 175
Saison - froide	79	Test de symétrie	140
Saison - humide	79, 85	Tétracycline	117
Saison - ralentissement métabolique saisonnier	63	Th	252, 271
Saison - sèche	79, 85	TIMS	287, 292
Saison - variation saisonnière	51, 164, 256	Tissu osseux	66, 316
		Tl	252
		Transition ontogénique	48, 177
		Transversal	34, 322
		U	247, 271, 280

Uniformité	138
<i>Utriculus</i>	31
Validation (méthodes de)	111
Variations diurnes	57
Variations climatiques	85, 154, 264
Vatérite	38, 54, 252
Vérification (méthodes de)	138
Vertèbre	26
Vessie natatoire	32, 35
Vitellogenèse	270
VPDB	247
VSMOW	247
WDS	287, 289, 302
WIP	251
WSP	251
Xylène	325, 359
Zn	254, 259, 303
Zone-D	36, 57
Zone-L	36, 57

Noms d'espèces, taxa et noms communs

	Page		
Acanthuridae	52	Coelacanthidae	58
<i>Acipenser</i> spp.	84	<i>Colossoma macropomum</i>	43, 45, 131
<i>Acipenser transmontanus</i>	285	<i>Coregonus lavaretus</i>	59, 125, 280
Actinoptérygiens	70	<i>Coryphaena hippurus</i>	39, 43
Aiguillat commun	138	<i>Coryphaenoides acrolepis</i>	274
<i>Allocyttus verrucosus</i>	274	Coryphène	35
<i>Alosa sapidissima</i>	256, 279	Coumarou	87
<i>Alosa</i> spp.	260	<i>Cynoscion regalis</i>	279
Amiidae	58	Cyprinidae	35, 43, 60
<i>Ammodytes marinus</i>	41, 101, 179	<i>Cyprinus carpio</i>	69, 73, 78
Amphibiens	26	<i>Dicentrarchus labrax</i>	47, 361
<i>Anguilla anguilla</i>	41, 45, 179	Dipneustes	58
<i>Anguilla japonica</i>	269	Drepanidae	77
<i>Anguilla rostrata</i>	269	Élasmobranches	92
<i>Anguilla</i> spp.	260	Empereur	178
Anguille	26, 101, 104	<i>Engraulis encrasicolus</i>	41
Anguilliformes	323	<i>Epinephelus guttatus</i>	264
<i>Anoplopoma fimbria</i>	123, 274	<i>Esox lucius</i>	61, 84, 285
Anostomidae	60, 86	Espadon	35, 92, 320
<i>Aphia minuta</i>	39	Espèces bathypélagiques	46
<i>Arius couma</i>	86	Espèces d'eau douce	86, 103, 254
<i>Arius proops</i>	67, 81, 86	Espèces démersales	177, 339, 345
<i>Arripis trutta</i>	264, 266, 271	Espèces épipélagiques	34
Atipa	83	Espèces pélagiques	34, 92, 333
<i>Balistes</i> spp.	84	Espèces profondes	33, 35, 50
Balistidae	92	Espèces tempérées	44, 103, 175
Baudroie	84	Espèces tropicales	44, 45, 86
Brème	26	Esturgeon	84, 87, 284
<i>Brevoortia patronus</i>	261, 285	<i>Fundulus heteroclitus</i>	50, 264, 285
<i>Brevoortia tyrannus</i>	173	Gadidae	77, 107, 371
Brochet	26, 84, 150	<i>Gadus morhua</i>	41, 51, 99
Callichthyidae	74, 83	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	124
Capelan	178	<i>Genypterus capensis</i>	47
Carangidae	67, 77	<i>Girella elevata</i>	256, 264
<i>Carassius auratus</i>	50, 257	Haemulidae	73
Carpe	24, 72, 83	<i>Haemulon plumieri</i>	264
Characiformes	60	<i>Halichoeres tenuispinis</i>	41
Chinchard commun	137	Hétérodontiformes	27, 28
Chondrichthyens	27, 319	<i>Hirundichthys affinis</i>	274
<i>Chromis atripectoralis</i>	41	<i>Hoplosternum littorale</i>	41, 74, 369
<i>Clupea harengus</i>	40, 41, 102	<i>Hoplostethus atlanticus</i>	100, 178, 207
Clupeidae	167	<i>Hygophum</i>	46
Coelacanthes	64	Istiophoridae	92

<i>Katsuwonus pelamis</i>	72, 84	<i>Pangassius hypophthalmus</i>	109, 361
Langon	101, 177	Perche	26, 66
<i>Latimeria</i>	74	Perciformes	67, 84, 106
<i>Lepomis macrochir</i>	49, 50	Photichthyidae	33, 37, 47
<i>Leporinus frederici</i>	60, 86, 87	<i>Plagioscion squamosissimus</i>	79
Leptocéphale	260, 269	<i>Platichthys stellatus</i>	49
<i>Lethrinus nebulosus</i>	67, 69, 81	<i>Pleuronectes platessa</i>	42, 44, 48
<i>Loligo pealei</i>	209	Plie	46, 101, 177
<i>Lophius</i> spp.	84	Podostemonaceae	87
<i>Lutjanus sebae</i>	303	<i>Poecilia reticulata</i>	271
<i>Lutjanus</i> spp.	274	<i>Pogonias cromis</i>	277
<i>Macruronus novaezelandiae</i>	274, 278	Poisson-chat	34, 83, 343
<i>Mallotus villosus</i>	178	Poissons plats	34, 46, 352
<i>Megalechis thoracata</i>	40, 41	<i>Pollachius pollachius</i>	219
<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	41, 151	<i>Pollachius virens</i>	42, 224
Merlan	49, 191, 207	Polyptère	58, 64
<i>Merlangius merlangus</i>	49, 98, 207	<i>Polypterus bichir</i>	72
Merlu commun	106	<i>Pomacentrus coelestis</i>	42
<i>Merluccius paradoxus</i>	47	<i>Pomadasyd basta</i>	73
<i>Merluccius capensis</i>	47	<i>Porichthys notatus</i>	50
<i>Merluccius merluccius</i>	41, 43, 107	Raie	27
<i>Micropogonias undulatus</i>	266	Reptiles	76
<i>Microstomus pacificus</i>	41, 101	Requin	27, 133
<i>Morone saxatilis</i>	260, 264, 285	<i>Salmo salar</i>	39, 49, 51
Morue	122, 277	<i>Salmo trutta</i>	124, 173, 178
Morue (juvéniles établis)	171	Salmonidae	42, 63, 104
Morue (juvéniles pélagiques)	171	<i>Salpa salpa</i>	140
Morue (larves)	171, 173	<i>Salvelinus alpinus</i>	259, 277, 285
Morue arcto-norvégienne	178	Sarcoptérygiens	70
Morue du Pacifique	138	<i>Sarotherodon melanotheron</i>	115, 119
<i>Mugil cephalus</i>	75	Saumon	24, 62, 63
Myctophidae	41, 48	Saumon atlantique	173
<i>Myleus rhomboidalis</i>	78, 86, 87	Saumon chinook	177
Non-Ostariophyses	319, 323	Saumon masu	173
<i>Oncorhynchus gorbushcha</i>	41	Sciaenidae	79
<i>Oncorhynchus keta</i>	41, 281	<i>Sciaenops ocellatus</i>	256, 264
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	125, 281	<i>Scomberomorus cavalla</i>	282, 285
<i>Oncorhynchus masu</i>	173	Scombridae	323, 329
<i>Oncorhynchus nerka</i>	41, 49, 159	<i>Scophthalmus maximus</i>	42
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	48, 177	<i>Sebastes entomelas</i>	52
<i>Oreochromis niloticus</i>	42, 86, 110	<i>Sebastes jordani</i>	42
Ostariophyses	32, 34, 35	<i>Sebastes rufus</i>	239
Ostéichthyens	25, 31, 58	<i>Sebastes</i> spp.	100, 274
<i>Pagrus auratus</i>	275, 281, 285	<i>Selar boops</i>	134
<i>Pagrus major</i>	264	Serrasalmidae	45, 86, 131

Siluriformes	41, 67, 323
<i>Solea solea</i>	40, 42, 224
Sprat	338, 372
<i>Sprattus sprattus</i>	338, 372
Squaliformes	27, 28
<i>Stizostedion lucioperca</i>	119
Tacaud	226
Téléostéens	31, 58, 66
<i>Tenualosa toli</i>	279
Tétrapodes	27, 65, 82
<i>Theragra chalcogramma</i>	42
Thon	35, 73, 77
Thunnidae	84, 72
<i>Thunnus alalunga</i>	224, 329
<i>Thunnus maccoyii</i>	281
<i>Thunnus thynnus</i>	285
<i>Tilapia nilotica</i>	50
<i>Trachurus mediterraneus</i>	48
<i>Trachurus trachurus</i>	67
<i>Trachurus trachurus capensis</i>	49
<i>Trachyrhynchus trachyrhynchus</i>	42
<i>Trisopterus luscus</i>	226, 321, 322
Truite	62, 124, 252
<i>Vinciguerria nimbaria</i>	33, 37, 39
Vipère	82

Réalisation, mise en page : XLC (02 98 30 50 07)

Achévé d'imprimer sur les presses de Calligraphy, 35000 Rennes

Dépôt légal 3^e trimestre 2002

Crédits photos : couverture Atlantide, Brest, France

Manuel de sclérochronologie des poissons

La sclérochronologie, discipline qui étudie les pièces calcifiées pour reconstruire l'histoire individuelle des organismes vivants, est essentielle pour la connaissance de la biologie des poissons et la gestion des pêches. Ce manuel présente une synthèse actualisée sur les aspects théoriques et pratiques des études de sclérochronologie. En donnant des informations sur la nature des pièces calcifiées (otolithe, écaille, squelette), leur utilisation dans les recherches en ichtologie et les méthodes de préparation et d'observation, ce manuel constitue un guide détaillé pour les chercheurs, techniciens et étudiants novices ou désirent étendre leurs domaines d'expertise. La version multimédia (DVD) incluse est enrichie de séquences vidéos et bénéficie d'un mode de navigation alternatif basé sur des arbres d'aide à la décision.

Mots-clés : otolithe, écaille, squelette, âge, croissance, analyse d'image, microchimie.

Manual of Fish Sclerochronology

Sclerochronology, the study of calcified structures to reconstruct the past history of living organisms, is central to fish biology and fisheries management. This manual aims to provide an overview of the current theoretical and practical aspects of sclerochronological studies. By providing information on the nature of calcified structures (otoliths, scales, skeleton), their uses in fish research and methods for preparation and examination, the manual constitutes a comprehensive guide for researchers, technicians and students either new to the field or interested in expanding their range of expertise. The enclosed multimedia version (DVD) is supplemented by videos illustrating the main technical procedures with an alternative navigation mode based on decision trees.

Keywords : otolith, scale, skeleton, age, growth, image analysis, microchemistry.

IRD Éditions

213, rue La Fayette
75480 Paris Cedex 10, France
Tél. +33 (0)1 48 03 76 06
Fax +33 (0)1 48 03 76 12
editions@paris.ird.fr

Diffusion

IRD
32, avenue Henri Varagnat
93143 Bondy Cedex, France
diffusion@bondy.ird.fr
Tél. +33 (0)1 48 02 56 49
Fax +33 (0)1 48 02 79 09

ISBN 2-7099-1486-7



9 782709 914864

Éditions Ifremer

BP 70, 29280 Plouzané, France
Tél. +33 (0)2 98 22 40 13
Fax +33 (0)2 98 22 45 86
editions@ifremer.fr

Diffusion

ALT Brest
Service Logistique
3, rue Édouard Belin - BP 23
29801 Brest Cedex 9, France
Tél. +33 (0)2 98 02 42 34
Fax +33 (0)2 98 02 05 84
alt.belin@wanadoo.fr

ISBN 2-84433-066-5



9 782844 330666

120 €

Ifremer

