

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

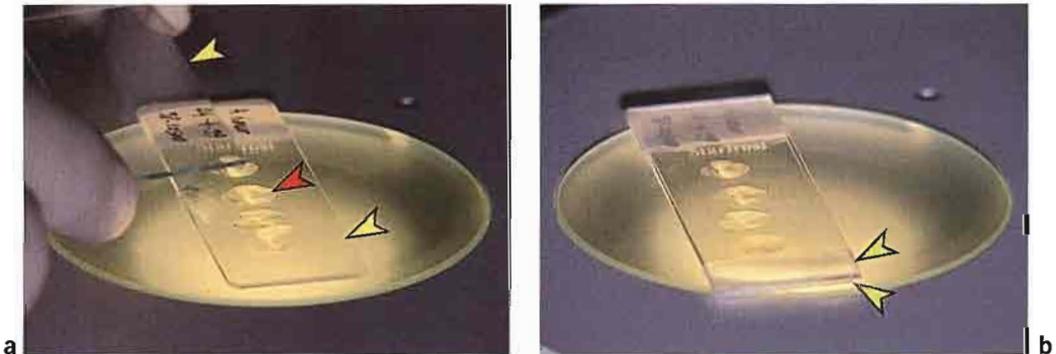


Figure VIII.C.1 - Montage d'écailles entre deux lames. a) Les écailles (flèche rouge) sont positionnées sur la lame référencée (flèche jaune). Il est préférable que les écailles soient humidifiées dans le but de pouvoir les déformer (compresser) plus facilement lors du montage. b) Une deuxième lame (flèche 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

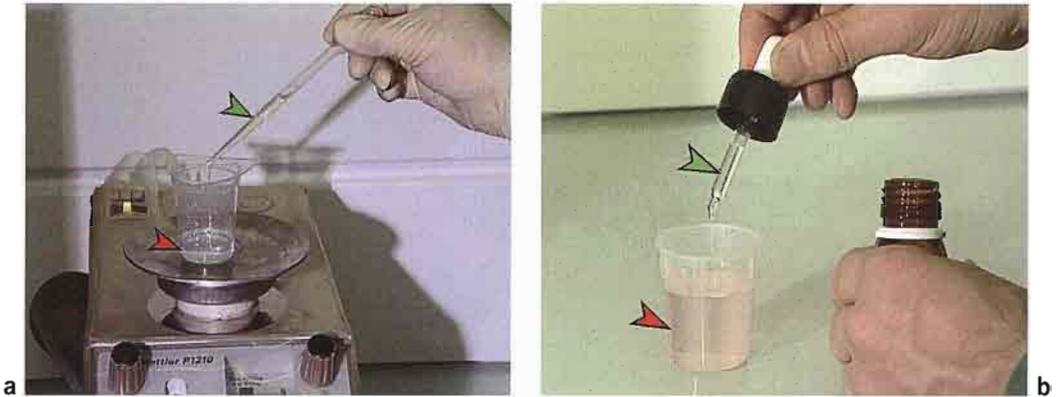


Figure VIII.C.3 - Préparation de la résine d'enrobage sous une hotte d'extraction. a) Exemple de mélange en fonction du poids (e.g. résine époxy). Le catalyseur (flèche verte) est ajouté à la résine (flèche rouge) dans un bocal en polypropylène posé directement sur une balance. Le mélange doit ensuite 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).

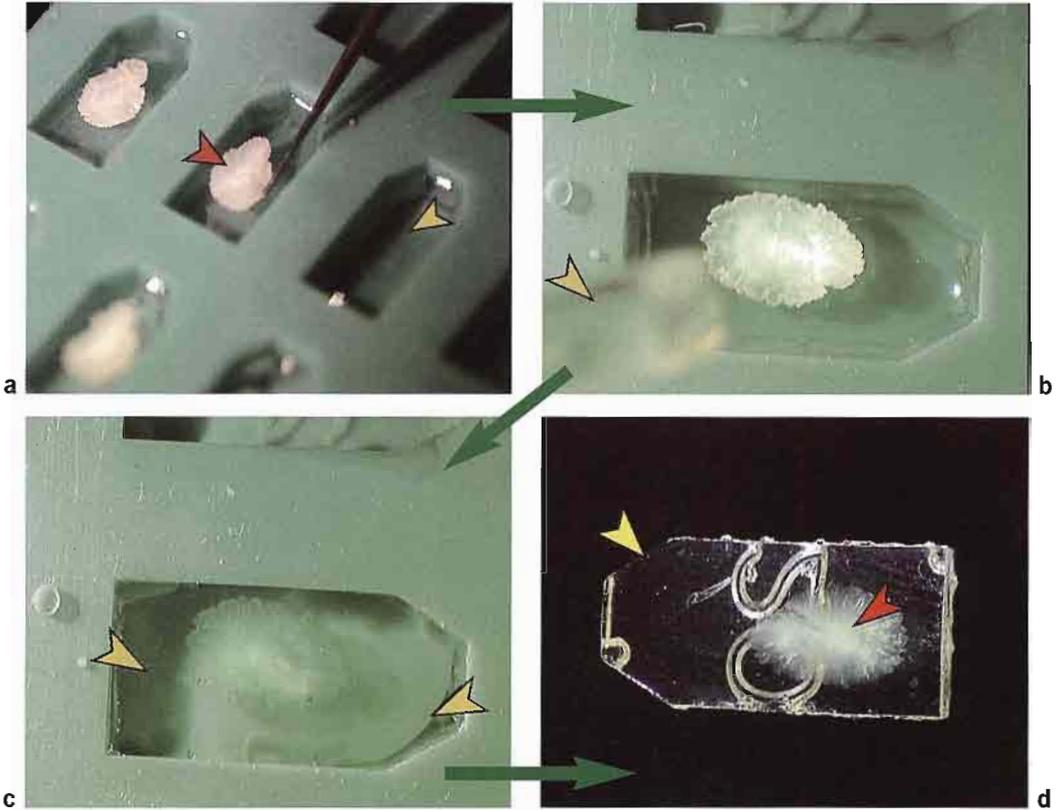


Figure VIII.C.4 - Exemple d'enrobage : otolithe enrobé à l'intérieur d'un moule en élastomère de silicone. a) Une couche de résine (flèche jaune) a été coulée au préalable dans le fond de chaque moule : après polymérisation, elle devient la base de support pour l'otolithe (flèche rouge). Chaque otolithe 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).

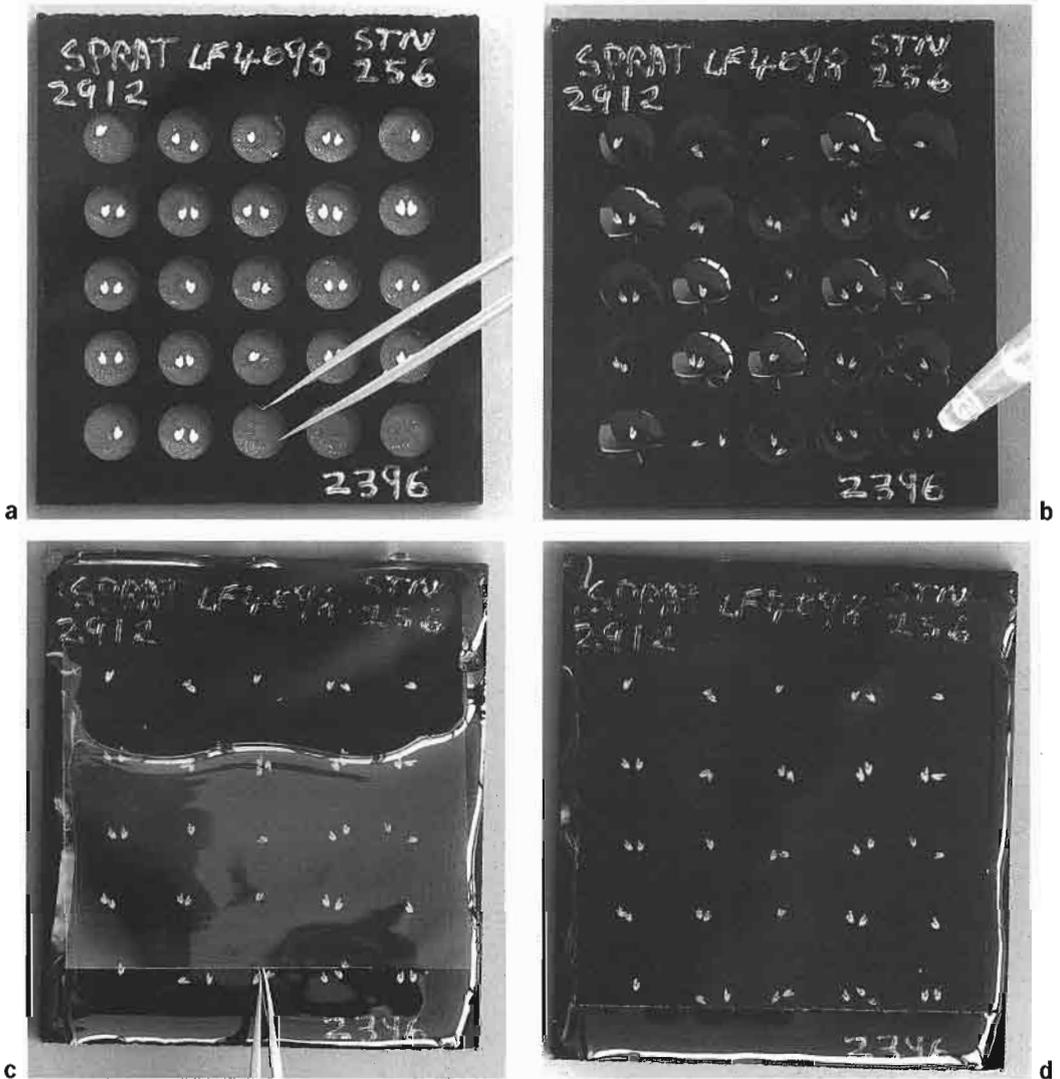


Figure VIII.C.5 - Enrobage d'otolithes entiers sur des plaques en plastique noir. a) Positionnement des otolithes dans les cavités des plaques spécialement préparées. b) Remplissage des cavités avec de la résine et son catalyseur. c) Positionnement de la lamelle couvre-objet sur la plaque. d) Vue de 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).

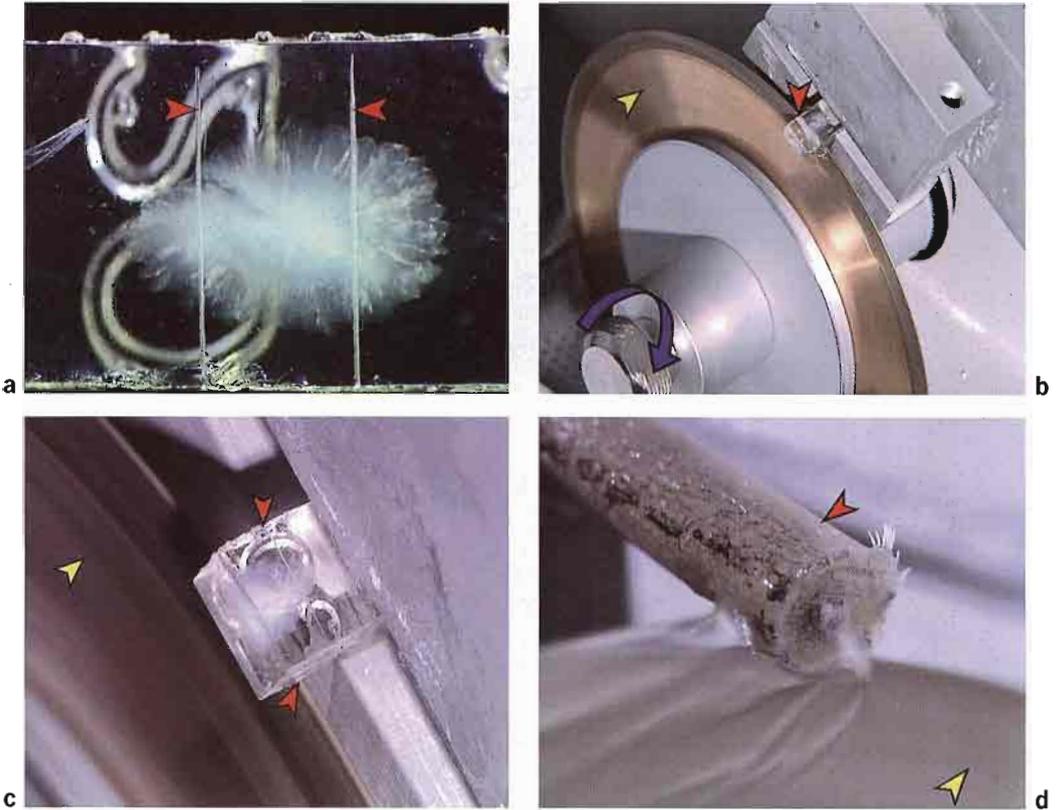


Figure VIII.C.7 - Section des pièces calcifiées : exemples de coupe d'un otolithe enrobé dans de la résine et de coupe d'une épine dorsale entière dans le but d'obtenir des tranches. a) Localisation des niveaux de coupe (flèches rouges) pour obtenir une tranche d'otolithe contenant le noyau. b) Découpe 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.

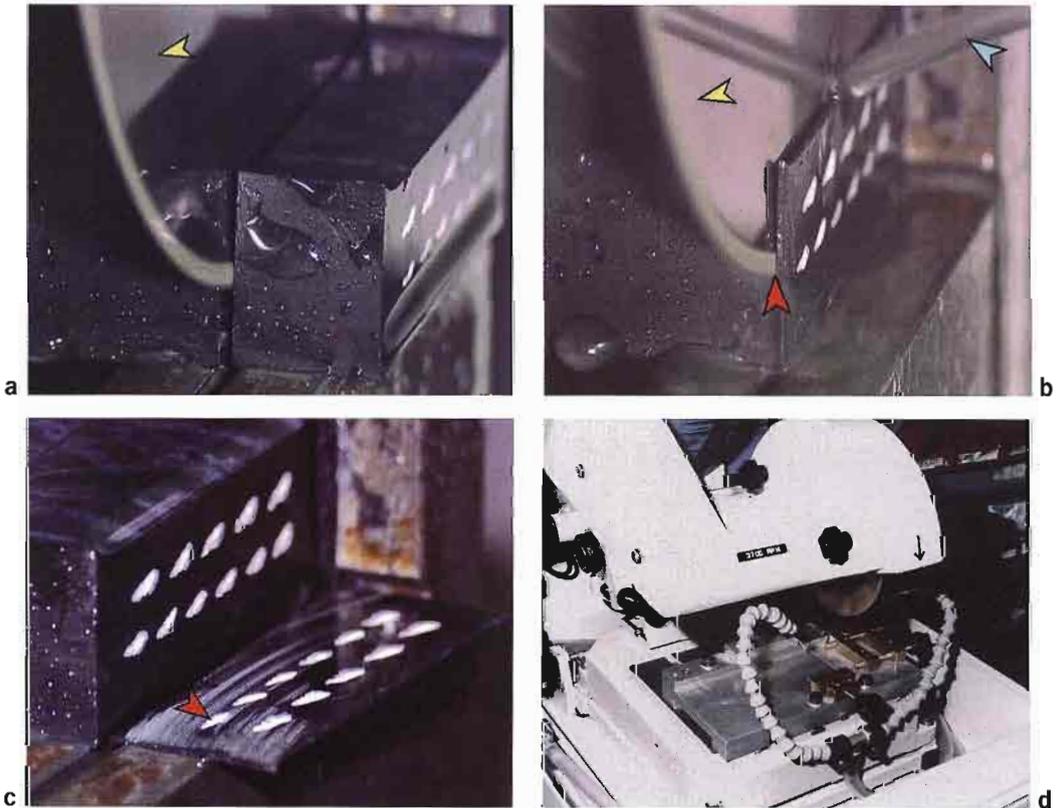


Figure VIII.C.8 - Section d'otolithes en série avec une scie diamantée (flèche jaune) à grande vitesse. a) La première section transverse les otolithes. Le niveau de section a été localisé au préalable directement sur la résine colorée en noir. b) La deuxième section permet d'obtenir la tranche contenant 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. Dugornay). 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	Fixation à la lame	Enrobage de protection
RIVO-DLO Hollande	0,8 mm	Noire	Non	Non	Pas d'enrobage 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).

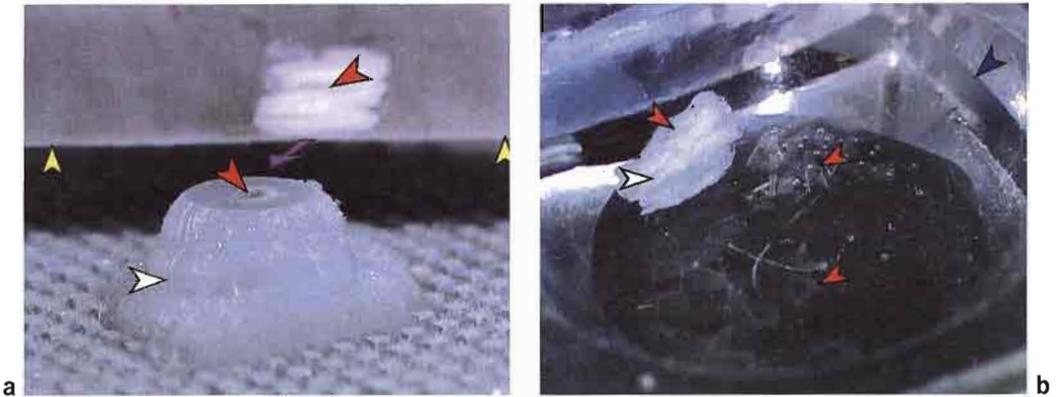


Figure VIII.C.9 - Section d'épine avec l'aide d'un cryotome. a) Une épine décalcifiée (flèche rouge) est enrobée dans de la glace (flèche blanche). La lame du cryotome (flèche jaune) se déplace vers l'avant (flèche rose) et vient couper de très fines tranches de l'épine congelée (flèche rouge sur la 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 Bond™) 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.

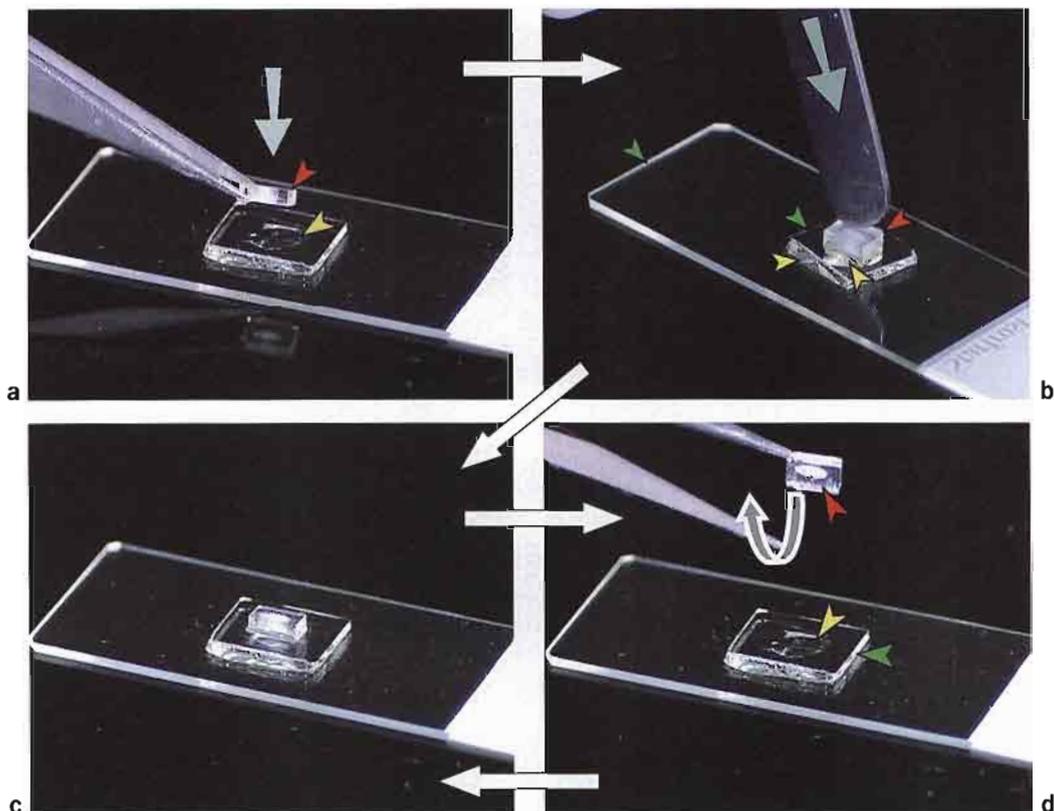


Figure VIII.C.10 - Montage de préparation : exemple de collage d'une tranche d'otolithe avec de la colle thermofusible et retournement sur une plaque chauffante. a) Collage de l'otolithe avec la colle thermofusible (e.g. Crystal Bond™). Le bloc contenant la tranche (flèche rouge) est amené (flèche grise) 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).

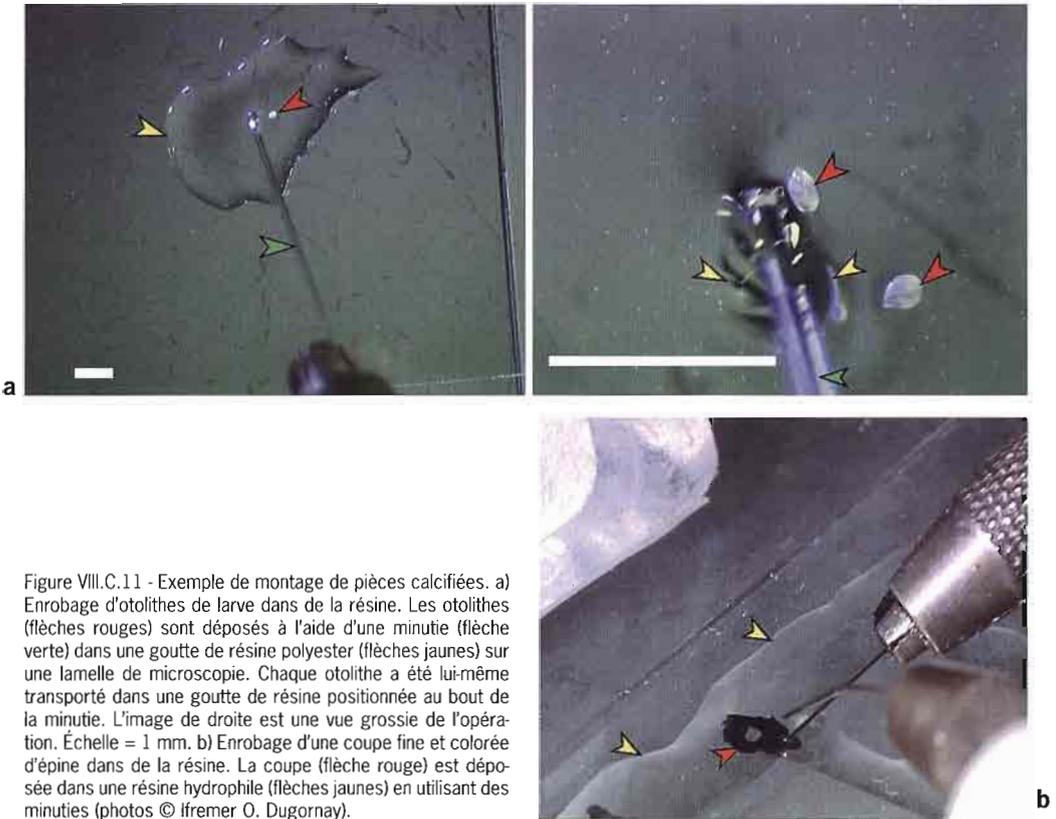
2.4.3. Montage sur lame de plusieurs coupes d'otolithes

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).

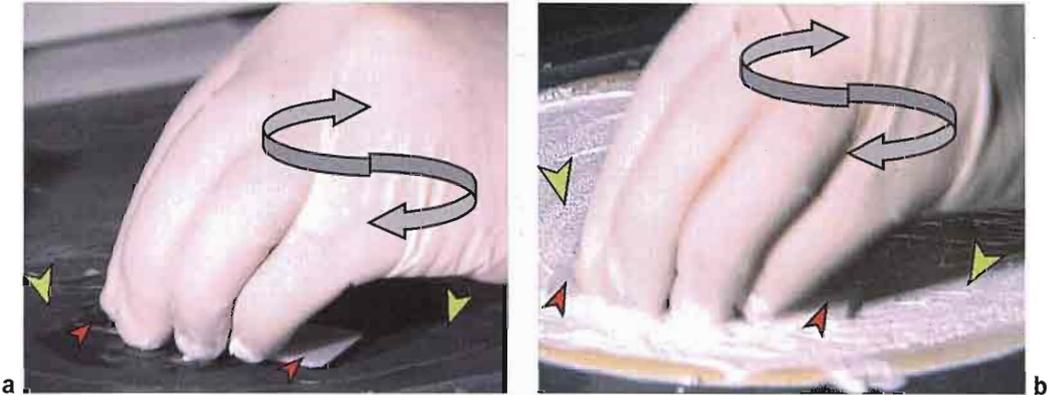


Figure VIII.C.12 - Ponçage et polissage de préparations. a) Ponçage. La préparation, une tranche d'otolithe montée sur une lame de microscopie (flèches rouges), est poncée à la main sur un papier abrasif à l'eau (flèches jaunes). Le mouvement de la main est irrégulier (flèches grises doubles) pour éviter 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

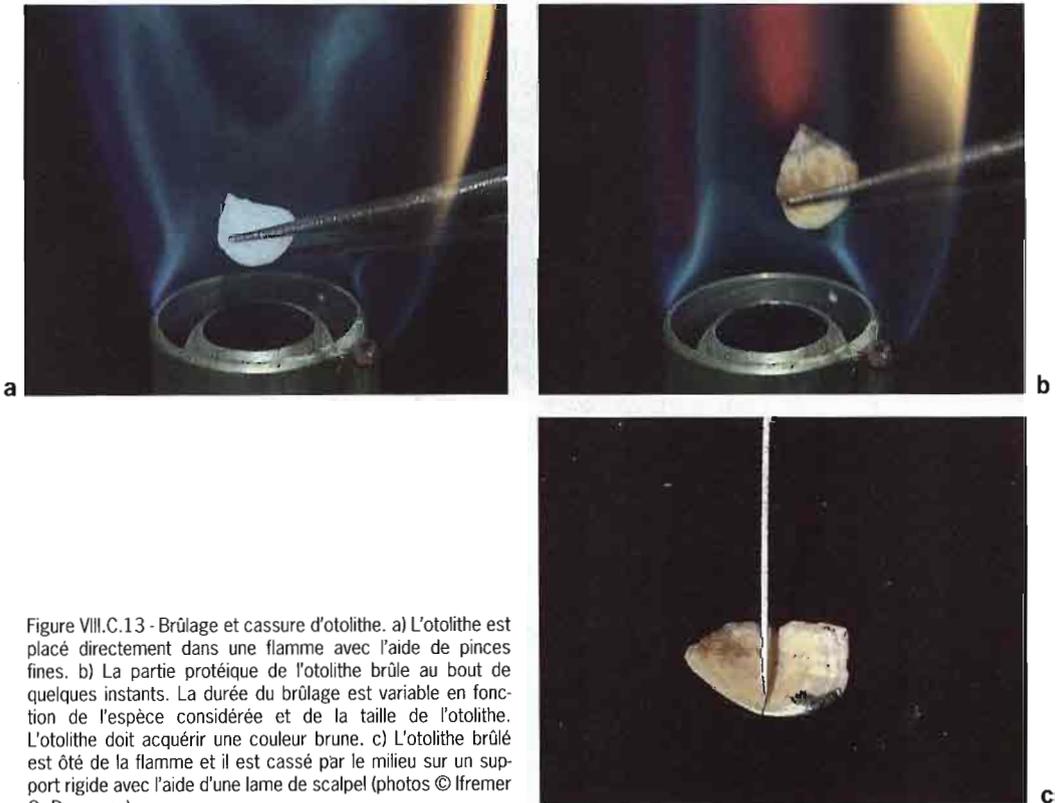
La préparation des coupes à la congélation, pour la coloration à l'héματοxyline (chap. VIII.C.2.8.2), nécessite une décalcification préalable des os. Pour les études squelettochronologiques, l'agent décalcifiant

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.



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. Gauldie (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

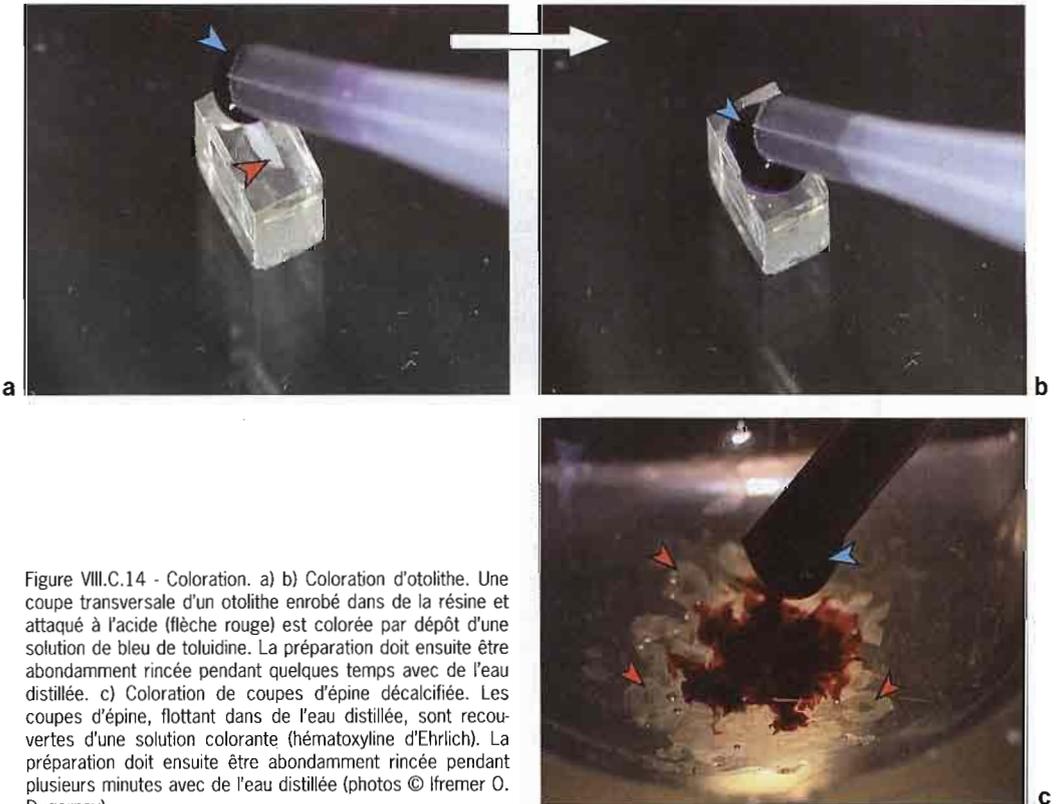


Figure VIII.C.14 - Coloration. a) b) Coloration d'otolithe. Une coupe transversale d'un otolithe enrobé dans de la résine et attaqué à l'acide (flèche rouge) est colorée par dépôt d'une solution de bleu de toluidine. La préparation doit ensuite être abondamment rincée pendant quelques temps avec de l'eau 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.