

**L'ESTIMATION DE L'AGE
DES LARVES DE POISSONS :
VERS UNE METHODE OBJECTIVE
PAR UTILISATION D'UNE TECHNIQUE
DE RECONNAISSANCE DE FORME**

Françoise LAGARDERE¹, Hervé TROADEC²

RESUME

L'utilisation des otolithes pour estimer l'âge des larves de poissons se heurte aux propriétés inhérentes à leur microstructure. Les principales difficultés viennent d'une définition insuffisante des premiers accroissements, dès que la croissance est lente, et des accroissements sub-journaliers. L'introduction d'une métrique au traitement numérique des images permet des lectures plus justes et apporte des informations complémentaires.

AGE ESTIMATE OF LARVAL FISH : TOWARDS AN OBJECTIVE METHOD BY USING A TECHNIQUE OF PATTERN RECOGNITION

ABSTRACT

The use of larval otoliths in order to obtain age estimates, although of an increasing interest, come up against difficulties which ensue from their microstructural properties. Thank to the French sole program and the ICES intercalibration exercise, comparisons were made between otoliths of known-age sole and herring larvae, and between reared and sea-sampled larval soles. In every case, the main difficulties were linked with low-contrast increments of the transition zone to active feeding, and with subdaily increments of the growth acceleration zone. The first were unsolved by light microscopy and the second not easily discriminated from the daily units when objective criteria were lacking, as growth rate for slow-growing larvae. Additional difficulties followed from the depth focus of unpolished otoliths and from radial microfractures.

¹ CREMA-L'Houmeau (CNRS-IFREMER), BP 5, 17137 L'HOUMEAU

² IFREMER, Centre de Brest, BP 70, 29280 PLOUZANE

adresse actuelle : ENST-Brest, BP 832, 29285 BREST Cedex

A technique of pattern recognition was developed and counts were automatically proceeded into a whole sector, considered as a synthetic radius. The originality of the method consists in the introduction of an a priori exponential growth pattern to demodulate the biological signal. Afterwards, linear treatments (Fourier transform) were used for age estimates. It only needs a knowledge of the otolith size at t_0 , but it allows a back-calculation of the growth parameter K .

Reared larval sole, whose otoliths had a simple shape, were convenient to test the assumption of the theoretical growth pattern adequacy. In the case of eventual growth "accidents", further numerical treatments would have to be introduced.

INTRODUCTION

L'estimation de l'âge des larves de poissons est l'une des composantes des programmes axés sur le déterminisme du recrutement. Dans le cadre d'un programme national (PNDR-Sole), la phase planctonique de la sole du Golfe de Gascogne a été étudiée de façon extensive. L'objectif était de mieux connaître les processus gouvernant la répartition et l'abondance des oeufs et larves afin, à terme, d'évaluer leur mortalité (Koutsikopoulos, 1991). L'âge des larves a été estimé par la méthode otolithométrique sur des sous-échantillons du matériel prélevé au cours des campagnes à la mer (Galois *et al.*, 1989). Les difficultés de lecture des otolithes de larves de sole prélevées en mer sont liées à la présence de séquences d'accroissements à faible définition et de marques (*checks*) dont la signification devait être établie. Aussi, dans le même temps et comme préalable à cette démarche, a-t-il fallu identifier les principales structures caractérisant le développement de ces otolithes et leur attribuer un sens biologique. C'est la phase d'interprétation (Troadeç, 1991) qui inclut la validation de l'hypothèse journalière du dépôt des accroissements unitaires.

Un accroissement journalier se définit par l'existence d'une zone discontinue et de la zone d'accrétion qui lui est contiguë (terminologie selon Tanaka *et al.*, 1981 ; Mugiya, 1987). Les zones discontinues se comptent dès lors que leur définition le permet. En cas de définition insuffisante des accroissements, l'épaisseur de matériel déposé chaque jour s'évalue à partir des différences de taille de l'otolithe. Sinon, elle s'obtient directement par mesure de la zone d'accrétion, technique déjà utilisée chez les juvéniles de sole (Koutsikopoulos *et al.*, 1989) bien que le rythme journalier du dépôt n'ait pas été vérifié pour cette espèce. Cela est aisé en conditions optimales d'élevage mais, sous des conditions extrêmes, la mise en pratique de la méthode otolithométrique est invalidée (Jones, 1986). La formation d'indices de stress a pu être provoquée par le jeûne. Il s'agit d'accroissements faiblement définis (Rice *et al.*, 1985) pouvant aller jusqu'à des dépôts hyalins lorsque prévalent les réactions cataboliques (Lagardère, 1989). Cela signifie que la formation des zones discontinues, riches en matrice protéique, est affectée. Ces accroissements à faible contraste, non résolus en microscopie optique, caractérisent aussi les otolithes des larves de hareng (Campana *et al.*, 1987). Pour Jones et Brothers (1987), seule une technique à haute résolution ne restreint pas l'observation des accroissements dès que la croissance est perturbée. C'est également l'une des conclusions d'un exercice d'intercalibration principalement centré sur le hareng. Les erreurs apparaissent non seulement liées à la qualité de l'otolithe (c'est à dire à la croissance de la larve dont il provient), mais aussi au degré de préparation des échantillons et à l'expérience du lecteur (Campana et Moksness, 1991). Compétence de l'observateur ou propriété intrinsèque de l'otolithe, l'observation reste le principal facteur limitant.

Dès lors, le moyen d'objectiver les lectures, et par conséquent l'interprétation à laquelle elles donnent lieu, devait être recherché. Aussi notre but est-il d'illustrer à partir de quels éléments biologiques cette méthode s'est construite et de montrer l'aide à la lecture qu'elle apporte. Pour cela, nous avons comparé deux espèces, la sole et le hareng, et deux types de résultats, des lectures où l'observateur fait lui-même le choix des accroissements à compter (lectures "expert") et celles qui sont automatisées après traitement par imagerie numérique.

MATERIELS ET METHODES

ORIGINE DES LARVES ET PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Les larves de hareng, élevées en mésocosme, proviennent de la station de Flødevigen (Norvège). Le protocole expérimental est détaillé *in* : Campana et Moksness (1991). Des larves entières, des fragments de tête et des préparations ont été adressées aux 18 participants à l'exercice d'intercalibration.

Les larves de sole ont été prélevées en mer (1987-1988), ou proviennent d'élevages expérimentaux réalisés au Centre IFREMER de Brest en mars-avril 1987 (pour informations détaillées sur les campagnes à la mer, voir Koutsikopoulos, 1991, et sur les expérimentations, Boulhic et Gabaudan, 1991 ; Bergeron *et al.*, 1991 ; Lagardère, 1989 ; Richard *et al.*, 1991). Le lot témoin de l'élevage à 12°C a été retenu pour la phase de validation parce que les otolithes sont analogues à ceux des larves prélevées en mer (figure 3 et 4). Les oeufs, incubés à 13°C pendant 4 jours, ont éclos sur une durée d'environ 24h. De ce fait, le jour 0 (50 % d'éclosion) peut varier de \pm 12h. Les larves à l'éclosion ont alors été transférées dans 2 incubateurs cylindro-coniques de 2.250 l, alimentés en eau circulante à la température de 11°C, stabilisée ensuite à 12°C (\pm 0.6). La photopériode est constante (LD 18-6). L'élevage n'est pas allé au-delà du 30ème jour. La croissance de ces otolithes a été suivie à partir de mesures du diamètre moyen et le niveau des deux marques les plus internes obtenu de la même façon ($15.6 \pm se 0.16\mu m$ et $26.7 \pm se 0.22\mu m$). Le suivi parallèle du développement et de la croissance larvaire a montré que la première de ces marques ontogéniques suit l'éclosion (jour 0) et que la seconde se forme en même temps que s'ouvre la bouche (jour 4), âge de la première distribution d'aliment (Lagardère, 1989).

EXAMEN DES LARVES ET DES OTOLITHES EN MICROSCOPIE OPTIQUE

Sous stéréomicroscope, la taille et le stade des larves ont été déterminés. Pour les deux espèces, l'âge moyen à l'épuisement du vitellus est de 9 jours. Les otolithes (sagittas, lapillus et astericus si présents) ont été montés *in toto* sur lamelle ultramince ($0,15 \mu m$) dans une goutte de PERMOUNT, leur surface plane au contact de la lamelle. Chaque lamelle, montée sur un support métallique en goutte pendante, était ensuite observée en lumière transmise et à l'immersion, avec un grossissement de 1.250x, soit un pouvoir de résolution évalué à 0,2-0,5 μm . Les préparations ont été mesurées et photographiées. Les accroissements ont été dénombrés (lectures "expert") d'après ces photographies et selon le meilleur secteur radial de chacune des sagittas.

TRAITEMENT DES OTOLITHES PAR IMAGERIE NUMERIQUE

Un sous-échantillon des otolithes de sole été lu en aveugle à la station de Flødevigen, à partir du système développé par Andersen et Moksness (1988), et au Centre IFREMER de Brest, par H. Troadec. En ce cas, la méthode repose sur une technique de reconnaissance de forme. Les images numériques sont analysées en coordonnées polaires selon le procédé décrit par Troadec (1991). Du fait de la qualité irrégulière de l'image, cette analyse ne s'est pas limitée à de simples radiales. S'appuyant sur la notion de continuité des structures, elle a été étendue à une région d'intérêt, sous la forme d'une radiale synthétique, R_s , intégrant les informations selon un radius fixe, r , couvrant les ièmes valeurs angulaires θ (i = nombre de radiales) :

$$[1] R_s = E[I(r, \theta_i)],$$

où I est l'image numérique.

L'originalité de cette méthode réside dans l'introduction d'un modèle de croissance (métrique), *a priori* exponentiel, pour démoduler le signal biologique (figure 1), c'est à dire pour soustraire la non linéarité de la largeur des accroissements. La croissance des otolithes est représentée par :

$$[2] L_t = L_0 * \exp(K*t),$$

où L_0 est la longueur de l'otolithe au temps 0 et K , un facteur de croissance. Dès lors, cette préanalyse permet de recourir à des traitements linéaires classiques, tels que les transformées de Fourier, pour estimer le nombre d'accroissements. La paramétrisation de l'équation de la croissance requiert seulement la valeur du L_0 qui est la taille de l'otolithe au temps 0. La radiale synthétique est assimilée à un modèle linéaire agrégé :

$$[3] R_s = A_t + G_t + P_t + \epsilon_t,$$

où A_t est une composante périodique (ici la période = 1 jour),

G_t est la composante de croissance, apparaissant comme une tendance fréquentielle,

P_t est une composante basse fréquence, liée à la technique de préparation, et ϵ_t , une composante résiduelle.

L'analyse du signal biologique consiste à extraire la composante A_t par un filtrage itératif (pour plus de détails, voir Troadec, 1991).

RESULTATS ET DISCUSSION

INTERPRETATION BIOLOGIQUE DES STRUCTURES - PRINCIPALES DIFFICULTES DE LECTURE

Les larves de poissons à l'éclosion ont deux paires d'otolithes (sagitta et lapillus). Chez la sole, des primordia multiples s'observent fréquemment (figure 3A et 4C). Ils donnent des contours souvent irréguliers au nucleus (N) délimité par l'anneau-témoin de l'éclosion (*hatch check*) et compliquent le choix d'un focus lorsque la mesure du radius est nécessaire. Le développement ultérieur du lapillus reste modeste chez la sole (figure 3D) et plus encore chez le hareng où il n'autorise aucune lecture. C'est donc à la sagitta que le terme otolithe s'applique dans ce qui suit.

Lorsqu'une particularité de structure différencie ces deux espèces, elle peut être du ressort des conditions d'élevage. Pour le hareng notamment, l'apparition d'un *check* (figure 2B-C-D, c) a été attribuée à l'introduction en mésocosme (jour 3).

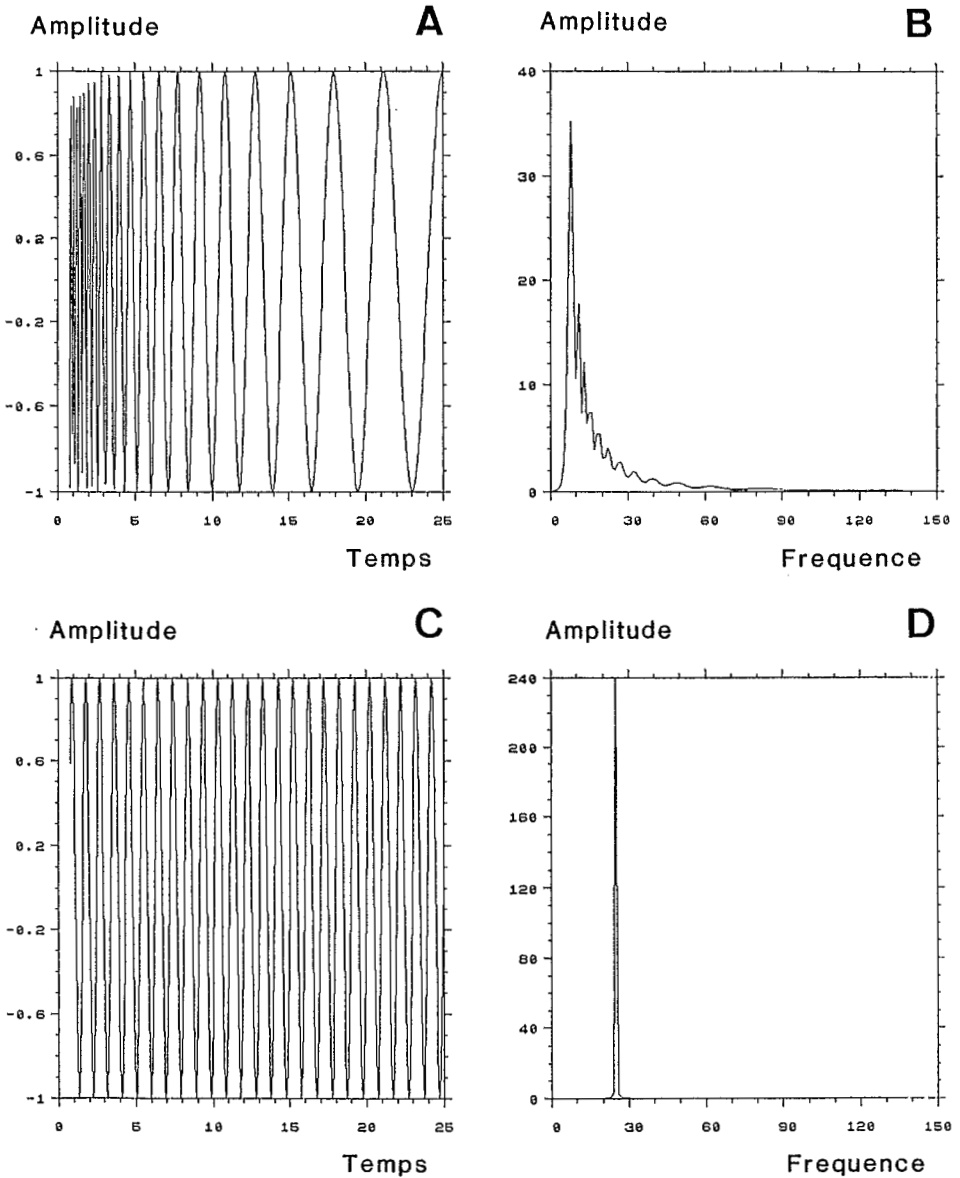


Figure 1. Démodulation d'une fonction périodique modulée par une loi exponentielle (A-B : fonction modulée, C-D : fonction démodulée).

Cependant, l'accroissement le plus interne, dont le diamètre est évalué à $\approx 20\text{-}22\ \mu\text{m}$ (Campana et Moksness, 1991) est utilisé comme anneau-témoin de l'éclosion, qu'il s'agisse d'un *check* ou non. Pour la majorité des lecteurs, il sert de premier accroissement dénombré. Cette démarche n'est pas possible pour la sole dont

les otolithes s'accroissent par dépôt de matériel hyalin, c'est à dire sans zones discontinues nettes, de l'éclosion à l'ouverture de la bouche, quelle que soit l'origine des larves (figure 3 et 4, dépôts de N à m). De plus, dans les conditions d'élevage qui ont été définies, l'épaisseur moyenne du matériel déposé, déduite de la courbe de croissance, décroît de 1,2 à 0,9 μm du jour 1 au jour 4, probablement à cause de modifications des températures d'incubation. C'est pourquoi l'anneau-témoin de l'ouverture de la bouche sert de premier accroissement dénombré, aussi bien pour les lectures "expert" que pour la numérisation des images. En ce cas, il représente le L0 de l'équation [2]. L'intérêt de cette marque tient à ce que l'âge à sa formation ne dépend que de la température (jour 4 à 12°C). L'âge estimé (en jours après éclosion) est donc égal au nombre moyen d'accroissements +3. Cela signifie que, pour les larves prélevées en mer, l'estimation de l'âge à ce niveau peut être faite à partir d'un modèle de croissance déjà existant, donnant la durée du développement à ce stade (Fonds, 1979, *first-feeding stage*). La précision de l'estimation dépendra alors de la température, souvent variable en mer.

Les difficultés de lecture, chez ces deux espèces, tiennent à des séquences d'accroissements où le contraste entre zones discontinues et d'accrétion est faible, ainsi qu'à l'existence d'accroissements sub-journaliers. La première de ces séquences se dépose pendant la période d'adaptation à l'alimentation active, c'est à dire entre le 4ème et les 6-8^{èmes} jours pour les otolithes de larves de sole élevées à 12°C (figure 3C, dépôts de m à i). En effet, la prise alimentaire n'est effective qu'à partir du jour 6 pour la majorité de ces larves et elle seule agit sur la production continue d'accroissements définis (Lagardère, 1989). D'où l'âge variable (jour 6±2) qui est associé au premier de ces accroissements (i). Ce type de dépôts s'observent aussi pour les otolithes de larves de sole prélevées en mer (figure 4) comme pour ceux des larves de hareng élevées en mésocosme (figure 2, dépôts de c à i). En ce cas, ils induisent une sous-estimation moyenne de l'âge de 10 jours (Campana et Moksness, 1991). Dès que les accroissements sont définis, leur dénombrement est aisé jusqu'à la zone d'accélération de croissance (AC, figure 2B et 3C-D) où ils perdent à nouveau en définition pour la sole, comme chez d'autres Pleuronectiformes (Jenkins, 1987). Cette zone se traduit par le dépôt d'accroissements de plus en plus larges. Il s'y distingue des accroissements sub-journaliers (sub, figure 2B) qui, chez le hareng notamment, peuvent avoir le même aspect que ceux qui sont considérés comme unitaires et traités comme tels en l'absence de critères permettant de distinguer les unités journalières des sub-journalières. Par critères, on fait souvent référence à l'expérience du lecteur, ce qui admet implicitement une connaissance préalable des modalités de la croissance et une plus ou moins grande aptitude à préparer les échantillons. Dans le cas des otolithes de larves, le microscope électronique à balayage ne s'utilise pas en routine (Radtke, 1989). Sur les 18 participants à l'exercice d'intercalibration, un seul a utilisé le scanning et 9 ont poli tout ou partie seulement du matériel examiné.

Le polissage réduit la profondeur de champ et s'avère nécessaire pour les larves à croissance lente (figure 2D, voir à titre de comparaison, Figure 4A, montage *in toto*).

Enfin, des micro-fractures radiales réduisent le nombre de secteurs utiles pour la lecture et la numérisation (f, figure 2B et 3C-D). Or le dépôt des nuclei accessoires (an, figure 3D) se produit à l'extrémité de ces micro-fractures et indique par là même une reprise de croissance postérieure à ces altérations.

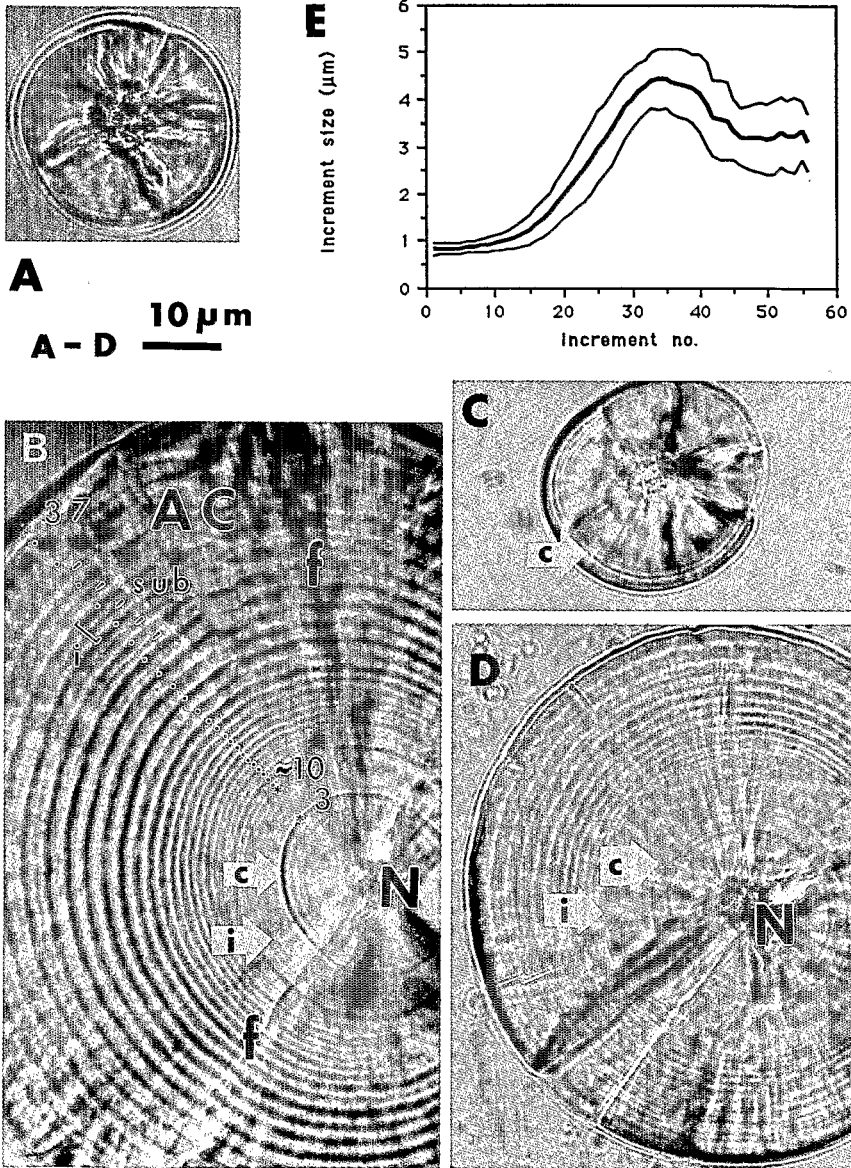


Figure 2. Sagittas de larves de hareng. A : larve à l'éclosion ; B : 37 jours ; C : 12 jours ; D : 37 jours (préparation S. Campana) ; E : graphe de la largeur moyenne des accroissements journaliers ($\mu\text{m} \pm \text{écart-type}$, $N = 248$; in : Moksness et Campana, 1990) ; AC : zone d'accélération de croissance, c : check du 3^{ème} jour, f : microfracture radiale, i : 1^{er} accroissement défini, accroissement journalier, N : nucleus, sub : accroissement sub-journalier

TRAITEMENT DES IMAGES

Pour les élevages de larves de sole à 12°C, les lectures "expert" des otolithes donnent l'âge avec une précision de ± 2 jours pour un risque de 5% (N = 154). Toutefois, l'âge au t0 est sous-estimé (-0,5 jours, Lagardère et Troadec, données non publiées). Une interprétation similaire de ce matériel ressort de l'analyse réalisée à la station de Flødevigen (Moksness et Campana, 1990). La comparaison des résultats obtenus pour la sole et le hareng montre que le dépôt consécutif d'accroissements définis intervient une fois acquise l'alimentation active (jours 6 et 10 respectivement). Il apparait en outre que le faible contraste des accroissements péri-nucléaires, plus que leur largeur ($>0,5 \mu\text{m}$, figure 2E et 3E), représente le facteur limitant la précision des lectures dans cette zone. Leurs résultats mettent également en évidence que les erreurs sur l'interprétation des accroissements sub-journaliers dépendent de la taille de l'échantillon traité et de l'homogénéité de la croissance dans le lot considéré (voir larves à croissance lente, figure 2D et 4A).

S'il y a une perte d'informations dans les zones à faible contraste, cela ne signifie pas nécessairement qu'il faille y voir une modification sensible du *pattern* de croissance. Seul un stress durable, critique pour la survie, la provoquera (Lagardère, 1989). Sur ces notions, vérifiées chez les larves, de propriétés conservatives des otolithes et de non-linéarité de la croissance, repose la seconde procédure d'analyse d'image utilisée pour la sole. Pour tendre vers une méthode objective, une digitalisation manuelle a été évitée. La fiabilité de la méthode a été établie statistiquement par un intervalle de confiance de ± 3 jours pour un risque de 5% (N = 26, Lagardère et Troadec, données non publiées). Ce résultat, obtenu par une méthode de traitement global, est acceptable à ce stade de l'élaboration du logiciel. Il montre qu'en dépit de la barrière représentée par la faible définition des premiers accroissements, l'utilisation d'une technique de reconnaissance de forme qui intègre la loi de croissance se révèle estimer correctement la durée qu'ils représentent.

En outre, le logiciel se comporte de manière satisfaisante en présence de marques sub-journalières (cas des individus de plus de 24 jours), dans la mesure où ces marques restent accidentelles et où le rythme de croissance n'est pas pour autant modifié.

En contre-partie, la lecture est réalisée sous l'hypothèse de l'adéquation du "gabarit" choisi à la croissance de l'otolithe, mais sans nul besoin d'une connaissance exacte de la loi de croissance. Il s'agit en l'occurrence d'un modèle exponentiel et monophasé, contrainte faible puisque se limitant à définir le L0, sans aucune supposition de la valeur du paramètre K.

Celui-ci peut d'ailleurs être rétrocalculé individuellement (figure 5), une fois l'âge estimé, par :

$$[4] K = \ln [(L_t/L_0)]/t.$$

La perception des formes est classiquement décrite en deux niveaux, le niveau global où l'objet est perçu dans sa totalité, et le niveau local où l'objet est perçu à partir de ses composantes primitives, ce qui rend difficile la perception d'un phénomène plus général le structurant. La lecture des pièces calcifiées est un exercice qui nécessite de passer alternativement d'un mode de perception à l'autre, bien que les difficultés à distinguer des accroissements sub-journaliers, même accidentels, tendent à montrer que le lecteur privilégie l'approche locale.

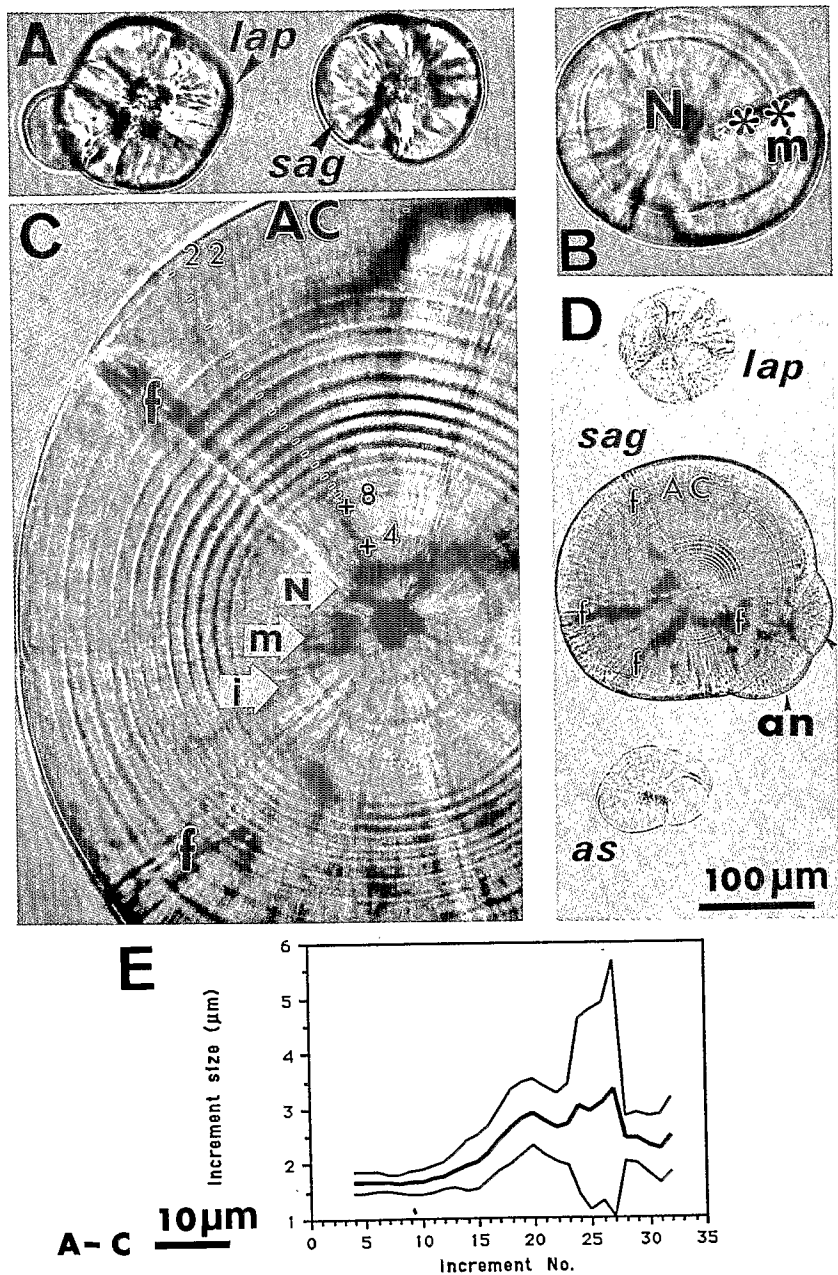


Figure 3. Otoliths de larves de sole élevées à 12°C. (lap : lapillus, sag : sagitta, as : asteriscus). A : 2 jours ; B : 8 jours ; C : 22 jours ; D : 30 jours ; E : graphe de la largeur moyenne des accroissements journaliers ($\mu\text{m} \pm$ écart-type, $N = 26$; *in* : Mokness et Campana, 1990), *m* : anneau-témoin de l'ouverture de la bouche (autres abréviations comme figure 1)

L'amélioration de la méthode demandera d'introduire un traitement particulier des accroissements périnucléaires ou marginaux et donc d'élaborer un traitement hybride mêlant les informations locales et globales. Quoiqu'il en soit, la forme des otolithes de larves de poissons, parce qu'elle est simple, se prête bien à l'utilisation de radiales telle que réalisée ici. La notion de *pattern* de croissance s'impose dès que des critères objectifs de choix doivent être trouvés. C'est ce qu'ont fait Campana *et al.* (1987), en utilisant un modèle construit *a posteriori*, et Hirschhorn et Small (1987), en ajustant la lecture des anneaux saisonniers à une loi de croissance de Von Bertalanffy. Cependant, l'introduction *a priori* d'une métrique non linéaire dans le processus de lecture et l'utilisation qui en est faite ici est novatrice pour l'analyse d'image des pièces calcifiées. Elle constitue le "chaînon manquant" de la méthode dite "otolithométrique" (Troade, 1991).

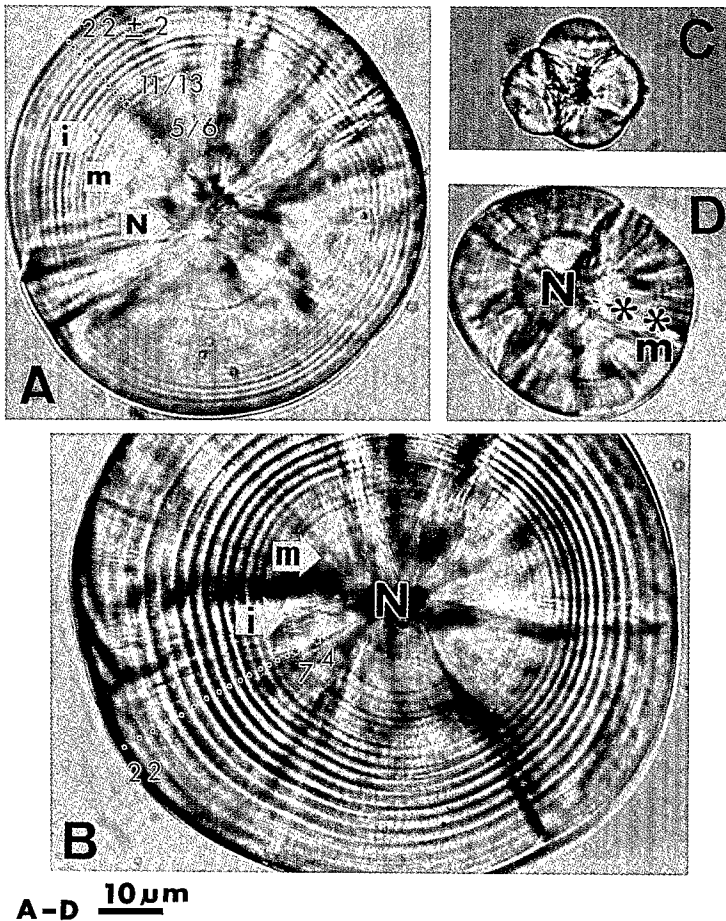


Figure 4. Sagittas de larves de sole prélevées en mer. A : 22 jours (1987) ; B : 22 jours (1988) ; C : stade de l'éclosion ; D : stade de la première alimentation (abréviations comme figures 1 et 2)

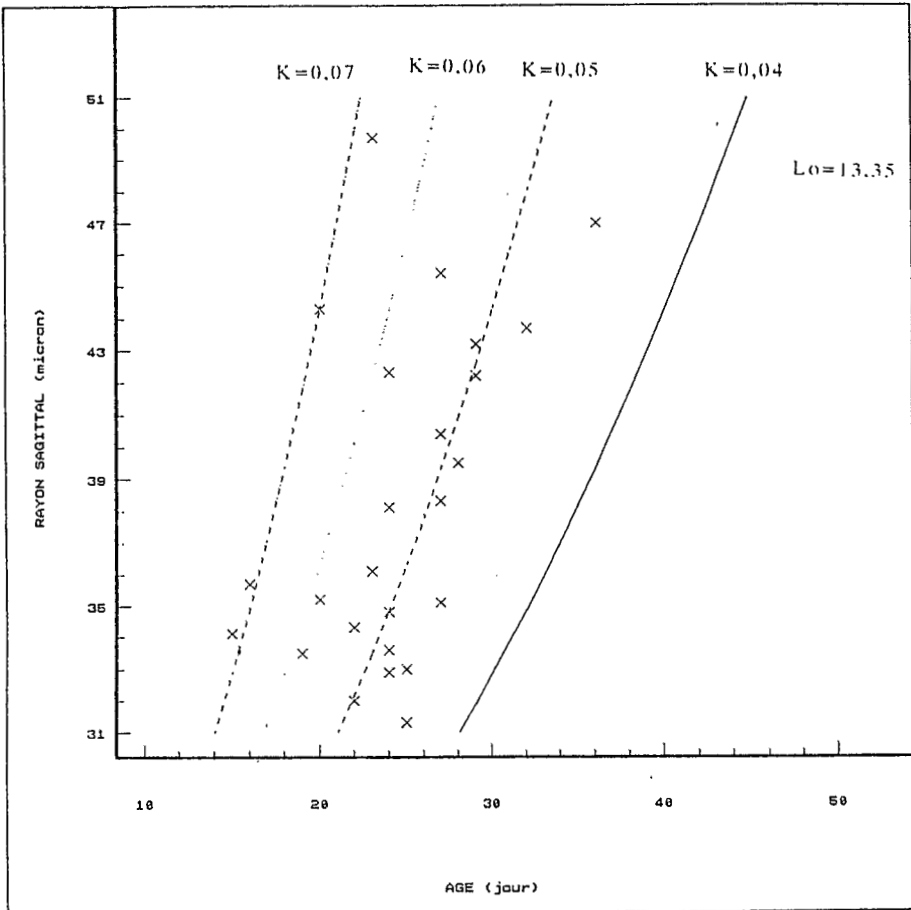


Figure 5. Rétrocalcul du paramètre de croissance K sur un échantillon de larves prélevées en mer ($K = 0,07$, valeur du paramètre pour les larves élevées à 12°C)

REMERCIEMENTS

Merci à J.C. Alexandre, M. Boulhic et J. Person-Le Ruyet, qui ont réalisés les élevages expérimentaux au Centre IFREMER de Brest. M.J. Garet a participé à la préparation des échantillons. Nous tenons à remercier E. Moksness et S. Campana grâce à qui cette étude s'est enrichie.

REFERENCES

BERGERON J.P., BOULHIC M., R. GALOIS, 1991. Effet de la privation de nourriture sur la teneur en ADN de la larve de sole (*Solea solea* (L)). *I.C.E.S. J. mar. Sci.*, 48 (1) : 127-134.

- BOULHIC M., GABAUDAN J., 1991. Histological study of the organogenesis of the digestive system and gas bladder of the Dover sole *Solea solea* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, (sous-presses).
- CAMPANA S.E., GAGNE J.A., MUNRO J., 1987. Otolith microstructure of larval herring (*Clupea harengus*) : image or reality ? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 44 : 1922-1929.
- CAMPANA S.E., MOKSNESS E., 1991. Accuracy and precision of age and hatch date estimates from otolith microstructure examination. *I.C.E.S. J. mar. Sci.*, in presse.
- FONDS M., 1979. Laboratory observations on the influence of temperature and salinity on development of the eggs and growth of the larvae of *Solea solea* (Pisces). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1 : 91-99.
- GALOIS R., LAGARDERE F., RICHARD P., 1989. Effets du jeûne et de la température sur la croissance et la survie larvaire de la sole, *Solea solea* (L.). PNDR-Sole, *Rapport de contrat universitaire*, sept. 1987-sept. 1989, n° 87.5.51.1010. L'Houmeau : CREMA-L'Houmeau : 107 p.
- HIRSCHHORN G., SMALL G.J., 1987. Variability in growth parameter estimates from scales of Pacific cod based on scale and area measurements. In: The age and growth of fish (Summerfelt R.C. et G.E. Hall, eds.). *The Iowa State Univ. Press*, Ames, Iowa 50010 : 147-157.
- JENKINS G.P., 1987. Age and growth of co-occurring larvae of two flounder species, *Rhombosolea tapirina* and *Ammotretis rostratus*. *Mar. Biol.*, 95 : 157-166.
- JONES C., 1986. Determining age of larval fish with otolith increment technique. *Fish. Bull., U.S.*, 84 (1) : 91-103.
- JONES C., BROTHERS E.B., 1987. Validation of the otolith increment aging technique for striped bass, *Morone saxatilis*, larvae reared under suboptimal feeding conditions. *Fish. Bull., U.S.*, 85 (2) : 171-178.
- KOUTSIKOPOULOS C., 1991. Recrutement de la sole (*Solea solea*, L.) du golfe de Gascogne : Influence de l'hydrologie et de l'hydrodynamisme. *Thèse Doctorat Univ. Bretagne Occidentale, Océanogr. Biol.* : 215 p.
- KOUTSIKOPOULOS C., KARAKIRI M., DESAUNAY Y., DOREL D., 1989. Response of juvenile sole (*Solea solea*, L.) to environmental changes investigated by otolith microstructure analysis. *Rapp. P.-v. Réun. Cons. int. Explor. Mer*, 191 : 281-286.
- LAGARDERE F., 1989. Influence of feeding conditions and temperature on the growth rate and otolith-increment deposition of larval Dover sole, (*Solea solea* (L.)). *Rapp. P.-v. Réun. Cons. int. Explor. Mer*, 191 : 390-399.
- MOKSNESS E., CAMPANA S.E., 1990. The intercalibration exercise on otolith microstructure. Report to the *ICES Recruitment Processes Working Group*, 26-28 June 1990, Nantes : France : 22 p.
- MUGIYA Y., 1987. Phase difference between calcification and organic matrix formation in the diurnal growth of otoliths in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Fish. Bull., U.S.*, 85 (3) : 395-401.

- RADTKE R.L., 1989. Larval fish age, growth, and body shrinkage : information available from otoliths. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 46 : 1884-1894.
- RICE J.A., CROWDER L.B. , BINKOWSKI F.P., 1985. Evaluating otolith analysis for Bloater *Coregonus hoyi* : do otoliths ring true ? *Trans Am. Fish. Soc.*, 114 (4) : 532-539.
- RICHARD P., BOULHIC M., BERGERON J.P., GALOIS R., PERSON-LE RUYET J. , 1991. Effect of starvation on RNA, DNA and protein content of laboratory-reared larvae and juveniles of *Solea solea* (L.). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*.
- TANAKA K., MUGIYA Y. , YAMADA J., 1981. Effect of photoperiod and feeding on daily growth patterns in otoliths of juvenile *Tilapia nilotica*. *Fish. Bull., U.S.*, 79 (3) : 459-465.
- TROADEC H., 1991. Reconnaissance de structures sur des pièces califiées par imagerie numérique dans un but de suivi d'un stock halieutique. *Thèse Doctorat de Biomathématiques*, Univ. Paris VII : 185 p. + annexes (soutenance prévue pour 1991).