

SQUELETTOCHRONOLOGIE A PARTIR DES OS ET DES DENTS CHEZ LES VERTEBRES

Jacques CASTANET¹, François J. MEUNIER¹,
Hélène FRANCILLON-VIEILLOT¹

RESUME

Après un bref rappel historique, les aspects fondamentaux de la squelettochronologie sont abordés. Cette méthode, principalement utilisée pour estimer l'âge individuel des vertébrés, est fondée sur l'observation de marques naturelles répétitives inscrites dans le tissu osseux en croissance. La localisation de ces marques de croissance squelettiques (MCS) est étudiée soit sur des os plats observés *in toto* en lumière transmise ou en lumière réfléchie, soit sur des coupes histologiques d'os longs (de préférence), d'os plats, de vertèbres ou de côtes, chez les Poissons comme chez les Tétrapodes. On distingue trois types de MCS d'après leurs caractères histologiques spécifiques : (1) les "zones" ou couches larges à croissance rapide, alternant avec (2) des annuli qui correspondent à des dépôts osseux relativement lents. Quant aux (3) lignes d'arrêt de croissance (LAC) elles témoignent d'un arrêt momentané de l'ostéogenèse. Plusieurs techniques expérimentales ont permis de valider la méthode en montrant que l'ensemble d'une zone plus un annulus (et/ou une LAC) représente bien un cycle annuel de croissance dans la majorité des cas. Pour une espèce donnée, l'élément squelettique optimal à utiliser est généralement celui où les MCS sont les plus nettes, les plus régulières et les plus nombreuses. Les principales difficultés rencontrées lors d'une étude squelettochronologique sont analysées. Elles montrent qu'avec une bonne connaissance de l'histologie osseuse, il est souvent possible de lever la plupart d'entre elles et de conserver toute sa valeur à cette méthode qui intéresse des domaines de recherche variés concernant la biologie des vertébrés et leur environnement.

¹ URA CNRS 1137, Equipe de Recherche "Formations squelettiques", Laboratoire d'Anatomie comparée, Université Paris 7, 2 Place Jussieu, 75251 PARIS Cedex 05.

SKELETOCHRONOLOGY AMONG VERTEBRATES FROM BONES AND TEETH

ABSTRACT

Following a short historical overview, the fundamental aspects of skeletochronology are dealt with. This method, principally used for age estimation of wild vertebrates, is based on the observation of natural repetitive marks recorded by the growing osseous tissue. The localization of these skeletal growth marks (SGM) is investigated either with transmitted or reflected light on flat bones or in histological sections of long bones (preferably), flat bones, vertebrae or ribs among fishes as among tetrapods. Three kinds of SGM are distinguished according to their specific histological characteristics, namely : (1) the "zones", broad fast growing layers alternating with (2) "annuli" corresponding to relatively slow osseous depositions. The (3) lines of arrested growth (LAG) show a temporary arrest of osteogenesis. The validation of the method requires various experimental technics which allow one to demonstrate that, in most cases, one zone and one annulus correspond together with one annual growth cycle. For a given species the skeletal element likely to be selected for study would be the one carrying the most distinct, regular and numerous SGM. The main difficulties encountered during a skeletochronological study are analysed ; most of them can be resolved with a good knowledge of osseous histology. Accordingly skeletochronology retains all its value in various research fields dealing with the biology and environment of vertebrates.

RAPPELS HISTORIQUES ET PRINCIPES

Si l'on exclut ici les travaux initiaux des précurseurs et des pionniers qui débutent au XVIII^{ème} siècle et se poursuivent jusqu'à la fin de la première guerre mondiale (voir in Meunier, 1988), c'est sans doute dans la publication de Clerc (1927) que l'on peut voir la première tentative de synthèse concernant l'estimation de l'âge des vertébrés (en l'occurrence principalement des ostéichthyens) à partir de marques naturelles répétitives inscrites dans les tissus osseux en croissance. Cependant l'utilisation de ces marques osseuses, tout comme celle des dents, reste très occasionnelle et soumise à controverse pendant plusieurs décennies (figure 1). Jusqu'en 1950, à part le travail peu évoqué de Harris (1927) sur les mammifères et ceux de quelques autres pionniers (voir in Castanet et Smirina, 1990) on ne cite classiquement pour les tétrapodes que ceux de Mattox (1935) chez les tortues, de Bryuzgin (1939) chez les serpents et de Senning (1940) chez les amphibiens. Pour les poissons les travaux fondés sur l'étude des os sont un peu plus nombreux comme le montre la liste dressée par Menon (1950). Entre 1950 et 1970, les observations sur la présence des marques de croissance dans les os des vertébrés, oiseaux exceptés, et dans les dents des mammifères, se multiplient (e.g. Klevezal, 1973 ; voir in Perrin et Myrick, 1980). A la même époque Peabody (1958, 1961) et Warren (1963) fournissent les premières descriptions comparatives sur la structure histologique des marques de croissance osseuses, y compris sur du matériel paléontologique. A partir de 1970, les recherches systématiques sur l'organisation spatio-temporelle des marques de croissance, en particulier sur leur périodicité, apportent, au moins en théorie, la preuve que ces marques constituent un critère d'âge individuel fiable.

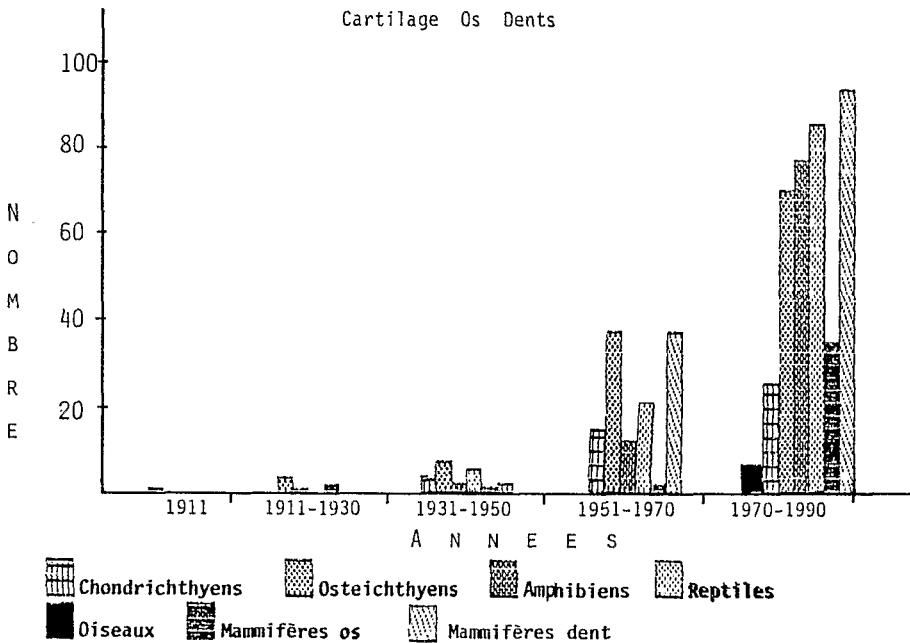


Figure 1. Evolution du nombre de publications en squelettochronologie (Cartilage, os et dents).

Simultanément, l'utilisation pratique de ces marques histologiques se développe rapidement, notamment en écodémographie, et le nom de "squelettochronologie" proposé en 1977 (Castanet *et al.*) vient désigner ce qui apparaît désormais comme une véritable méthode générale d'estimation du temps en biologie des organismes et des populations. Des mises au point sont présentées régulièrement (Castanet, 1980 ; Meunier et Pascal, 1981 ; Castanet, 1988 ; Halliday et Verrell, 1988 ; Meunier, 1988 ; Castanet et Smirina, 1990) discutant sa mise en oeuvre technique, ses possibilités et ses limites, ses domaines d'application, etc...

En fait si la squelettochronologie constitue aujourd'hui l'une des méthodes d'estimation de l'âge individuel les plus fiables et les plus attrayantes dans de nombreux domaines de recherches en biologie animale, elle le doit principalement à une double spécificité :

a - Il s'agit fondamentalement d'une méthode directe et individuelle c'est à dire ne nécessitant pas, dans son principe, de recourir à des valeurs étalons établies sur une ou plusieurs populations de référence, comme c'est le cas pour les techniques morphométriques *sensu lato*. En effet, les variables morphométriques ne peuvent être employées qu'à l'occasion de démarches comparatives et ne peuvent fournir un âge absolu. En outre, ces variables sont soumises à des fluctuations d'une population à une autre et nécessitent donc la constitution de banques de données de référence. Au contraire, la mise en place de marques de croissance étant étroitement liée aux variations saisonnières de l'environnement, celles-ci peuvent, en principe, apparaître découplées de

certaines particularités biologiques des organismes qui les expriment. En théorie, la périodicité (annuelle) des marques de croissance étant connue, leur nombre pourra alors constituer l'expression directe de l'âge individuel réel.

b - Les os et les dents sont des tissus doués de pérennité c'est à dire qu'ils se conservent et peuvent garder leurs structures intactes *post mortem*, y compris bien souvent à l'échelle des temps géologiques. De ce fait, la squelettochronologie pourra être pratiquée sur du matériel fossile - en archéologie et en paléontologie - au prix toutefois d'une multitude d'ajustements méthodologiques spécifiques à ces disciplines (e.g. Casteel, 1972, 1976).

L'OS ET LA DENT COMME "CHRONOMETRES ENREGISTREURS" : ASPECTS FONDAMENTAUX

LOCALISATION DES MARQUES DE CROISSANCE

- **Sur pièces squelettiques *in toto*.** Les marques de croissance ont été décrites à la surface de la couronne des dents de nombreux mammifères marins (cf. articles *in* Perrin et Myrick, 1980). Le plus souvent elles apparaissent également sous forme d'une succession de couches opaques et larges alternant avec des couches translucides et étroites à la surface de nombreux os et régions aplaties du squelette des poissons (Menon, 1950 ; Hsiao-Wei, 1951 ; Galtsoff, 1952 ; Casselman, 1974), amphibiens (Senning, 1940 ; Schroeder et Baskett, 1968 ; Castanet, 1975 ; Bruneau et Magnin, 1980) et reptiles (Petter-Rousseau, 1953 ; Saint-Girons, 1957 ; Castanet, 1974). L'observation se fait en lumière transmise ou en lumière réfléchie ; un léger éclaircissement par l'eau, la glycérine ou divers solvants organiques (ex. xylène), facilite l'observation des marques des pièces squelettiques un peu épaisses.

- **Sur coupes.** Les marques de croissance apparaissent également sur préparations histologiques - le plus souvent des coupes transversales - au sein des corticales osseuses primaires de nombreux os du crâne, des os longs des membres, des vertèbres et des côtes chez la plupart des tétrapodes. On les rencontre aussi dans les vertèbres et les rayons des nageoires des poissons osseux (e.g. Cuerrier, 1951 ; Sneed, 1951 ; Marzolf, 1955 ; Deelder et Willemse, 1973 ; Van der Waal et Schoonbee, 1975 ; Meunier *et al.*, 1979 ; Olatunde, 1979 ; Compean-Jimenez et Bard, 1980 ; Mills et Beamish, 1980 ; Meunier et Pascal, 1981 ; Meunier, 1988) ainsi que dans la dentine et le ciment dentaire des mammifères. Observées sur coupes non déminéralisées en lumière ordinaire transmise, les marques ont sensiblement le même aspect que sur les pièces entières. La lumière polarisée fait généralement apparaître une succession de couches alternativement éclairées et éteintes lorsque l'on fait tourner la platine du microscope, certaines d'entre elles apparaissant plus biréfringentes que d'autres. En général, la coloration par une laque d'hématoxyline sur préparations déminéralisées, révèle bien les lignes d'arrêt de croissance (cf. ci-après).

TERMINOLOGIE ET ORGANISATION SPATIALE DES MARQUES DE CROISSANCE (figure 2)

- **Remarque.** La terminologie variant selon les auteurs, nous adopterons ici les expressions et termes français discutés et retenus dans le cadre de ce colloque.

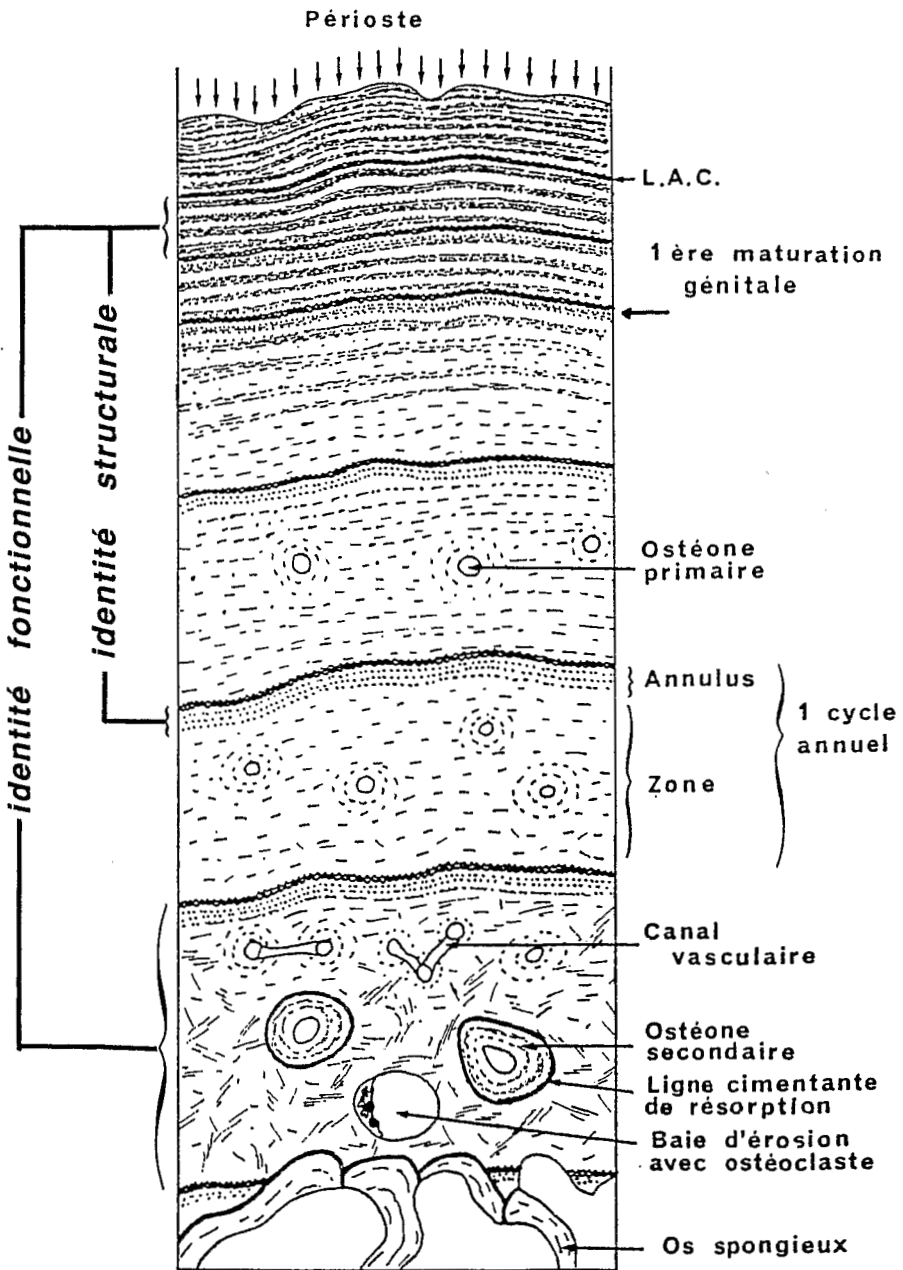


Figure 2. Organisation générale de l'os : détail d'une coupe transversale d'un os long au niveau d'une corticale diaphysaire.

La justification de leur choix ainsi que leurs équivalents anglais sont exposés en fin d'ouvrage. Le lecteur voudra bien s'y reporter pour plus de détails. Pour la terminologie concernant la dentine on se reportera également à l'ouvrage de Perrin et Myrick (1980).

- **Marques de croissance squelettiques.** Terme général pour désigner les formations définies ci-dessous. Fonctionnellement les marques de croissance squelettiques sont l'expression de variations momentanées de vitesses de l'ostéogenèse et de l'odontogenèse locale quel qu'en soit le déterminisme. Elles regroupent trois grandes catégories structuro-fonctionnelles.

- **Couches à croissance rapide ou zones.** Elles correspondent à des périodes de dépôt (osseux) relativement les plus rapides dans la région considérée et apparaissent comme les couches les plus larges et les plus opaques en lumière transmise. Dans l'os, en particulier, elles sont constituées par un tissu à matrice spatialement peu organisée, souvent riche en cellules et en canaux vasculaires.

- **Annuli.** Alternant avec les couches à croissance rapide, les annuli correspondent à des dépôts osseux relativement lents dans la région considérée. Ils sont généralement plus translucides et plus étroits que les couches à croissance rapide. La matrice osseuse des annuli est généralement très structurée spatialement (os lamellaire souvent) et relativement pauvre en cellules ainsi que peu vascularisée.

- **Lignes d'arrêt de croissance (LAC).** Comme leur nom l'indique elles témoignent d'une pose temporaire (quelques semaines au minimum, Smirina *et al.*, 1986) de l'ostéogenèse (ou de la cémentogenèse). Elles apparaissent comme de fines lignes chromophiles, très biréfringentes en lumière polarisée, souvent légèrement hyperminéralisées et enrichies en substances organiques non collagéniques (Castanet, 1979, 1981). Elles sont opaques en microscopie électronique à transmission.

Les LAC peuvent se situer au sein d'un annulus ou sur sa bordure. En l'absence d'annulus, elles peuvent alterner directement avec les couches à croissance localement les plus rapides.

Parfois des LAC apparaissent plus ou moins dédoublées et bifurquées localement. La signification de ce phénomène est mal connue. On peut penser à des reprises et arrêts très momentanés de la croissance pendant une même période générale de faible activité ostéogénique. Cette disposition histologique peut constituer une transition avec un annulus typique. En pratique une telle LAC complexe ne sera généralement comptée que pour un cycle de croissance.

Ensemble, une zone et un annulus - ou un LAC - représentent un cycle complet de croissance.

PERIODICITE DES MARQUES DE CROISSANCE. VALIDATION DE LA SQUELETTOCHRONOLOGIE

La connaissance précise de la périodicité des marques de croissance est le point capital sur lequel repose toute la valeur de la squelettochronologie. Trois techniques expérimentales ont jusqu'ici permis d'étudier la périodicité des marques de croissance.

- **L'observation d'animaux d'âge connu.** Le fait de disposer d'un tel matériel est relativement rare, voire exceptionnel pour les espèces sauvages. La correspondance numérique entre l'âge calendaire connu et le nombre de LAC, par exemple, constitue une forte présomption en faveur de la fiabilité de la méthode. Cependant, il ne peut être exclu que ce résultat puisse être le fait du hasard, et, en toute rigueur, il ne démontre pas véritablement la périodicité annuelle (ou autre) des

marques. Par ailleurs, l'enregistrement par l'os des marques de croissance peut s'interrompre bien avant la fin de la vie et dès lors la correspondance entre l'âge et le nombre de marques n'est plus respectée, même si celles-ci se déposent pendant la première partie de la vie de l'animal selon un rythme défini.

- **Les amputations successives d'éléments squelettiques.** Ce procédé pratiqué à l'occasion de captures - marquages et recaptures multiples permet de suivre le rythme de l'augmentation du nombre de marques de croissance. Le meilleur exemple en est sans doute l'étude d'Hemelaar (1986) qui, ayant coupé une phalange à des crapauds commun, *Bufo bufo*, (ce procédé servant simultanément au repérage individuel des animaux sur le terrain) pendant deux ou trois années consécutives, a pu constater l'augmentation du nombre de lignes d'arrêt de croissance d'une unité chaque année. Ce résultat atteste clairement la périodicité annuelle des marques de croissance dans ce cas et pour les différentes populations étudiées. Chez les poissons le suivi mensuel des individus a aussi été pratiqué (Lecomte *et al.*, 1985, 1986).

- **Marquage vital des tissus squelettiques.** Cette technique consiste en injections *in vivo*, uniques ou répétées selon une chronologie définie, de substances fluorescentes qui se fixent de façon pérenne sur les tissus squelettiques en croissance (e.g. Meunier, 1974 ; Meunier et Boivin, 1978). Après sacrifice, ou sur biopsies, s'il n'y a pas eu remaniement osseux, il suffit alors de repérer ces marques fluorescentes par rapport aux marques de croissance naturelles et, connaissant la position spatio-temporelle des unes, en déduire celle des autres (Francillon, 1979 ; Castanet, 1985 ; Castanet et Naulleau, 1985 ; Francillon et Castanet, 1985 ; Caetano et Castanet, 1987). La périodicité éventuelle des marques de croissance, l'époque exacte de leur dépôt ainsi que la vitesse à laquelle elles se forment, peuvent ainsi être déterminées avec rigueur. Cette technique, combinée à celle des captures - recaptures, conduit à une validation rigoureuse des rythmes de croissance du squelette et donc de l'estimation de l'âge (Beamish et McFarlane, 1983).

De l'utilisation, seule ou conjointe, de ces différentes techniques dans un nombre croissant d'espèces des diverses classes de vertébrés, il ressort que la majorité des marques de croissance observées dans le tissu squelettique présentent une périodicité qui est, dans la plupart des cas, annuelle. Le bien fondé des bases de l'analyse squelettochronologique comme critère d'âge est donc maintenant démontré expérimentalement chez d'assez nombreuses espèces de vertébrés. En général, une couche à croissance rapide plus un annulus et/ou une LAC représentent un cycle annuel de croissance. Les annuli et/ou les LAC correspondent soit à des périodes d'hibernation soit à des périodes d'estivation, les couches à croissance rapide au reste de l'année. Dans le cas d'espèces tropicales, le facteur saisonnier responsable de la formation de LAC ou d'annuli n'étant plus la température, on parle alors "d'hiver physiologique" (Lowe-McConnell, 1964) pour les périodes de croissance ralentie ou nulle.

Des doubles cycles annuels de croissance (deux couches à croissance rapide et deux annuli par an) ont été mis en évidence occasionnellement chez des poissons osseux (Poinsard et Troadec, 1966 ; Blake et Blake, 1978 ; Warburton, 1978 ; Compean-Jimenez et Bard, 1980 ; Robben et Thys Van den Audenarde, 1984 ; Lecomte *et al.*, 1985, 1986 ; Meunier *et al.*, 1985) ou chez certaines populations d'amphibiens urodèles (Caetano *et al.*, 1985). Dans la dentine des mammifères, marins en particulier, la présence de deux annuli - et deux couches à croissance rapide - par an, semble plus fréquente (Cf. différents articles *in* Perrin et Myrick, 1980). Des recherches systématiques sur l'existence de doubles cycles de croissance annuels -

dont la signification biologique peut être importante - restent à réaliser chez les vertébrés. De même, jusqu'ici, aucun rythme de croissance à périodicité inférieure à 1/2 année ne semble avoir été mis en évidence dans l'os contrairement au cas, par exemple, des otolithes des poissons où l'on décrit des marques de croissance à rythme journalier voire lunaire (Pannella, 1971, 1980 ; Campana et Neilson, 1985 ; Baillon, présent ouvrage). De tels rythmes journaliers auraient également été décelés dans le cément dentaire (e.g. Grue et Jensen, 1979 ; Grosskopf, 1990), ainsi que dans la dentine chez quelques mammifères marins (articles *in* Perrin et Myrick, 1980) mais cela reste à confirmer.

SIGNIFICATION FONCTIONNELLE ET DETERMINISME DES MARQUES DE CROISSANCE

Il est actuellement possible de proposer une interprétation générale du déterminisme (tableau 1) et de la signification fonctionnelle des marques de croissance (tableau 2), en particulier pour les tissus osseux. On se fonde pour cela sur la connaissance comparative de la structure histologique des trois catégories de marques de croissance et de leurs variations au sein d'un même os, d'un os à l'autre pour un même individu à des âges différents et enfin entre différents individus, populations et espèces proches. De plus, des données expérimentales concernant la séquence de formation des marques de croissance dans les différentes situations analysées sont prises en considération. Ces marques sont caractérisées par les transformations graduelles ou brutales de leur structure en fonction de la croissance générale de l'organisme, du cycle saisonnier, de l'os et/ou de la région qui les recèle (figure 2). Elles peuvent différer d'une pièce squelettique à l'autre au sein d'un même individu, voire d'une région à l'autre d'un même os. Le modèle général est à la base de l'analyse et de l'interprétation structuro-fonctionnelle de ces marques en squelettochronologie appliquée. En ce qui concerne leur déterminisme, on note que les relais physiologiques (notamment hormonaux) entre les facteurs internes (génétiques) et externes, modulant la croissance de l'organisme et de son squelette demanderaient à être analysés avec précision.

SQUELETTOCHRONOLOGIE APPLIQUEE

MATERIEL

Le choix de l'os, de la dent et de la région qui donnera le résultat le plus en accord avec l'âge réel de l'animal est fondamental. En conséquence, tout travail intensif sur une espèce nouvellement étudiée doit être précédé d'une étude exploratoire comparative entre différents éléments squelettiques chez quelques individus. Cette démarche permet de choisir l'élément squelettique sur lequel les marques de croissance sont les plus nettes, les plus régulières, les plus nombreuses. Certains os plats du crâne examinés *in toto* (ectoptérygoïde, parasphénoïde, supraangulaire) fournissent, selon les espèces, des résultats acceptables (Senning, 1940 ; Saint-Girons, 1952 ; Petter-Rousseau, 1953 ; Castanet, 1974 ; Bruneau et Magnin, 1980) de même que les centrums vertébraux de serpents (Minakami, 1979) et de poissons cartilagineux (voir revue *in* Meunier, cet ouvrage) et osseux (Meunier, 1988). Chez ces derniers l'opercule ou le cleithrum conviennent également (Menon, 1950 ; Meunier, 1988).

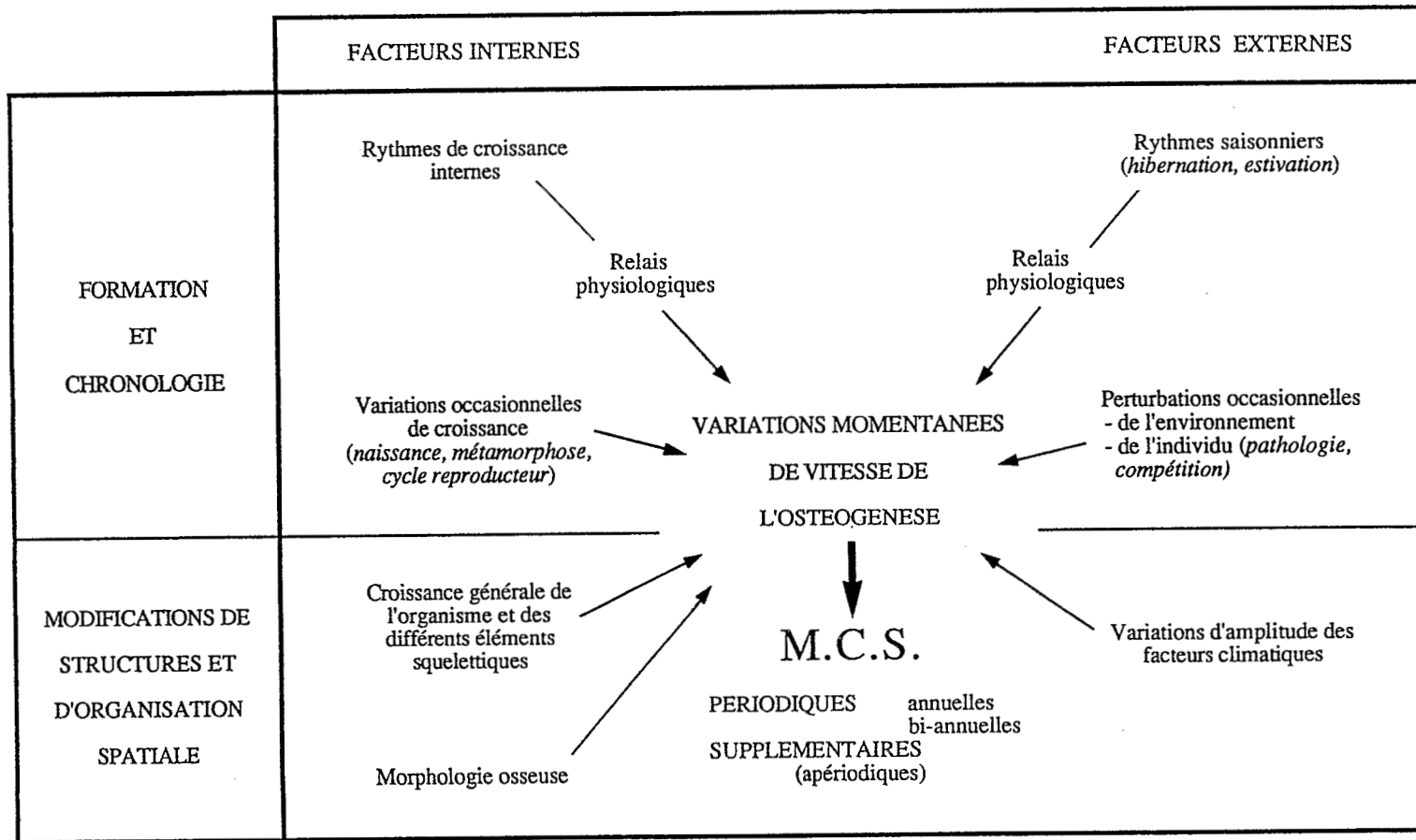


Tableau I: Déterminisme de la formation et de l'organisation spatio-temporelle des marques de croissance squelettiques.

	PERIODES A METABOLISME ELEVE (Ex. printemps - été)			PERIODES A METABOLISME RALENTI (Ex. hiver)			PERIODES A METABOLISME TRES RALENTI (Ex. hiver)
	ZONES			ANNULI - LAC			
	jeune	adulte	âgé	jeune	adulte	âgé	
OS ET REGIONS OSSEUSES A CROISSANCE RAPIDE <i>Ex: Os plats dans leur direction de plus forte croissance</i>	os à fibres enchevêtrées	os à fibres parallèles	os à fibres parallèles	os à fibres parallèles	os lamellaire	os lamellaire	LAC
OS ET REGIONS OSSEUSES A CROISSANCE INTERMEDIAIRE <i>Ex: - Croissance en épaisseur de nombreux os cylindriques (os longs des membres) - Os plats: régions transitoires entre directions à croissance élevée et faible</i>	os à fibres enchevêtrées	os à fibres parallèles	os à fibres parallèles	ANNULI os lamellaire	LAC	LAC	LAC
OS ET REGIONS OSSEUSES A CROISSANCE LENTE <i>Ex: - Os plats dans leur direction de plus faible croissance - Croissance en épaisseur de certains os cylindriques (côtes..)</i>	os à fibres parallèles	os lamellaire	os lamellaire	LAC	LAC	LAC	LAC

Tableau II: Localisation, structure et signification fonctionnelle des marques de croissance.

L'analyse des marques de croissance sur préparations histologiques donne souvent de meilleurs résultats que sur les os plats *in toto*. Chez les poissons on utilise généralement des coupes transversales de rayons de nageoires (Meunier, 1988). Chez les tétrapodes "inférieurs" à os peu ou pas vascularisé, les os longs des membres (humérus, fémur, tibia-péroné, phalanges) utilisés au niveau diaphysaire (l'indice cortico-diaphysaire y est le plus élevé et, en conséquence, l'enregistrement et la conservation des marques y sont meilleurs) sont, en général les plus adéquats. Chez les mammifères les coupes transversales de la mandibule peuvent convenir (e.g. Klevezal et Kleinenberg, 1967 ; Morris, 1970 ; Frylestam et Schantz, 1977 ; Pascal et Castanet, 1978 ; Buffrénil, 1982 ; Buffrénil et Collet, 1983 ; Buffrénil et Pascal, 1984) mais, le plus souvent, le ciment dentaire pour les formes terrestres (e. g. Mitchell, 1969 ; Miller, 1974 ; Kasuya, 1976 ; Grue et Jensen, 1979) y compris les Primates (Wada *et al.*, 1978 ; Stott *et al.*, 1980 ; Kay *et al.*, 1984 ; Charles *et al.*, 1986 ; Grosskopf, 1990) et la dentine pour les espèces marines (cétacés, pinnipèdes et siréniens - cf. articles *in* Perrin et Myrick, 1980), fournissent les meilleurs résultats. On note que l'utilisation des rayons des nageoires des ostéichthyens et des phalanges chez les amphibiens et les reptiles tétrapodes, présentent le double avantage de pouvoir estimer l'âge et simultanément de marquer individuellement sauf pour les ostéichthyens dont les rayons régénèrent les animaux sans avoir à les sacrifier.

TECHNIQUES

- **Observations.** Celles-ci sont généralement effectuées à la loupe binoculaire en lumière transmise ou réfléchie pour les os *in toto*. Ces derniers, selon leur degré de transparence seront préalablement éclaircis dans l'eau, ou dans un milieu organique (e.g. xylène). Les préparations histologiques d'os et de dents déminéralisés, de 10 à 20 μm d'épaisseur, sont généralement colorées par une laque d'hématoxyline qui révèle particulièrement bien les LAC, les coupes à congélation donnant de meilleurs résultats que les coupes incluses en paraffine. Pour le matériel fossile et les os non déminéralisés, l'inclusion en résine polyester et la confection de lames minces sont nécessaires. Les marques de croissance seront observées au microscope en lumière ordinaire et polarisée.

- **Analyse qualitative et quantitative.** L'examen successif des préparations squelettiques ne permet pas d'appréhender aisément le modèle général de croissance et ses variantes pour tous les individus de l'échantillon étudié. La comparaison simultanée sur photographies au même grandissement des coupes homologues, facilite l'analyse squelettochronologique et fournit souvent d'emblée le "squelettogramme" (Augère, cet ouvrage et terminologie). Les photographies serviront également pour les mesures de longueurs des lignes d'arrêt de croissance (au curvimètre ou par analyse d'image) et finalement permettront d'estimer le taux de la croissance osseuse.

Par soucis d'objectivité, l'analyse des préparations sera faite en "aveugle", c'est à dire sans aucune information sur la biologie de l'espèce, son mode et lieu de vie, l'époque du prélèvement squelettique. Ce n'est qu'en second lieu que ces informations seront prises en compte pour voir comment elle s'accordent avec les interprétations tirées des résultats squelettochronologiques bruts.

Par ailleurs, compte tenu de la diversité d'aspect des marques de croissance dans les tissus osseux et dentaires, la lecture automatique standardisée de ces marques est

difficile et de fait ne semble pas encore avoir été tentée jusqu'ici comme c'est le cas avec les otolithes ou les écailles (Voir les différents articles sur ce sujet dans cet ouvrage).

- **Estimation de l'erreur** (Dapson, 1980). Comme pour toute méthode biologique, l'erreur dépend de la nature et de la variabilité du phénomène analysé mais aussi de la précision du système d'analyse c'est à dire, ici, de la technique utilisée et de l'observateur.

En ce qui concerne les sources d'erreur d'interprétation humaine (strictement techniques), la meilleure façon de les minimiser consiste à réaliser des lectures multiples des préparations par deux ou trois personnes ayant sensiblement la même expérience en squelettochronologie. Dans un second temps les résultats seront confrontés et les pourcentages de désaccords évalués (Francillon et Pascal, 1985). Arbitrairement on pourra distinguer :

a - les individus pour lesquels l'âge ne peut être raisonnablement évalué (e.g. marques de croissance illisibles, présentant une organisation aberrante relativement à celles des autres animaux de l'échantillon). Ces animaux seront éliminés des calculs. Un trop fort % de tels cas (de l'ordre de 25 %) pourrait conduire à remettre en cause l'emploi de la squelettochronologie pour la population ou l'espèce étudiée.

b- les individus pour lesquels l'âge sera estimé avec une erreur de plus ou moins un an.

c- ceux pour lesquels les observateurs arrivent d'emblée au même âge.

Cependant la cohérence des résultats obtenus ne garantit nullement l'exactitude de l'âge annoncé. Des difficultés inhérentes au matériel étudié peuvent conduire à sous-estimer ou surestimer l'âge de façon égale par tous les observateurs. Finalement la valeur du résultat dépendra de l'identification et de l'interprétation correcte de ces difficultés que nous allons maintenant envisager. Cela justifie également la nécessité d'une validation expérimentale des hypothèses formulées sur le modèle de croissance de l'espèce étudiée (Casselmann, 1983, 1987 ; Beamish et McFarlane, 1987).

DIFFICULTES ET LIMITES DE LA METHODE : INTERPRETATION ET VALEUR INFORMATIVE

Selon les taxons, l'analyse squelettochronologique est plus ou moins facile ; elle se révèle parfois même impossible (e.g. Klevezal et Fedyk, 1978 ; Phillips *et al.*, 1982). Des difficultés variées, que nous allons maintenant analyser, peuvent se présenter. Cependant, et c'est là un des intérêts majeurs de la méthode, certaines de ces difficultés, une fois leur origine déterminée, peuvent en retour présenter une grande valeur informative pour toute espèce ou population nouvellement étudiée.

Expression histologique des marques de croissance

De façon générale, les variations dans l'expression des marques de croissance peuvent aller de structures très nettes jusqu'à l'absence totale de marques. Les variations éventuelles entre les os d'un même squelette témoignent simplement de caractéristiques morphogénétiques et structurales propres à chaque os.

Dans une espèce donnée et pour un os donné, les marques de croissance apparaissent souvent mieux exprimées chez les animaux vivant en régime climatique contrasté (latitudes ou altitudes élevées) qu'en milieu sans saisons marquées. Il s'ensuit que de telles différences constatées entre des populations de provenance

inconnue conduiront à penser que ces populations vivaient dans des conditions climatiques différentes.

Des différences d'aspect des marques existent naturellement entre espèces. Si ces dernières sont taxonomiquement voisines et vivent sous des régimes climatiques variés la signification de ces différences n'est guère évidente. En revanche pour des espèces proches, sympatriques, voire syntopiques, ces différences histologiques relèvent précisément de caractères spécifiques (génétiques). De telles différences pourront alors servir de critère taxonomique, en particulier dans le cas d'ossements fossiles d'espèces trouvées dans le même gisement, ainsi que cela a récemment été montré pour des petits lézards insulaires (Castanet et Baez, 1991).

L'absence de marques de croissance chez quelques individus d'une même population conduira généralement à les éliminer de l'étude, dans la mesure où il s'agit de cas atypiques. Au contraire l'absence de marques de croissance dans une population, surtout en régime climatique contrasté, suggérera que la longévité des animaux est courte et n'excède guère une année (surtout pour des espèces de très petite taille). Un tel cas vient de nous être rapporté pour une espèce de grenouille d'Amérique centrale (Perez-Santos, Com. pers.).

Distribution spatiale et resserrement des lignes d'arrêt de croissance

Sur des coupes transversales de diaphyses, mais aussi à la surface des os plats, la distribution spatiale des LAC et/ou des annuli traduit, en général, directement l'évolution de la courbe de croissance au cours de la vie. Relativement espacées chez les juvéniles, les LAC et/ou les annuli se resserrent chez les adultes et au cours du vieillissement. L'inflexion de la courbe de croissance est souvent associée à l'apparition de la première maturité sexuelle. Par suite, le passage entre LAC espacées et LAC resserrées, lorsqu'il est clairement défini, témoigne de cette inflexion et permet d'estimer l'âge d'acquisition de la maturité sexuelle, avec tout l'intérêt que cela présente pour la biologie *sensu lato* des populations animales.

Des variations individuelles et/ou accidentelles de croissance, quelle qu'en soit l'origine, peuvent perturber le modèle précédent. En général ces séquences "anormales" de croissance n'affectent qu'un petit nombre d'individus. Ceci permet justement de soupçonner qu'il s'agit de lignes de croissance "supplémentaires" ou aperiodiques, à ne pas considérer dans le décompte de l'âge individuel au sein de l'échantillon (voir ci-dessous)

Marques de croissance supplémentaires, marques dédoublées, bifurquées

Ces formations, souvent rencontrées tant dans les tissus osseux et dentaires que dans les otolithes ou sur les écailles des poissons osseux, posent toujours de délicats problèmes d'interprétation. Par définition, les marques de croissance supplémentaires sont aperiodiques. Leur détection est toujours difficile. Leur aspect histologique ne diffère pas systématiquement de celui des autres, du moins cela n'a encore jamais été montré. Une LAC (et/ou un annulus) particulièrement proche d'une autre dans un endroit ou normalement elle devrait être plus éloignée (relativement aux LAC et/ou annuli situés de part et d'autre), fera penser à une LAC supplémentaire d'origine pathologique par exemple. Si une telle perturbation se rencontre chez de nombreux individus d'une même population, il sera légitime de lui attribuer une origine exogène, tel un accident climatique, une diminution temporaire des ressources trophiques, un changement de milieu ou encore une épidémie. Pour les femelles

l'époque de reproduction pourrait également induire de façon plus ou moins régulière de telles LAC supplémentaires (Saint-Girons, comm. pers.). Quoiqu'il en soit, l'origine, donc la signification de ces formations, reste largement hypothétique. Une partie de l'erreur commise dans l'estimation de l'âge provient de l'hésitation sur le caractère périodique ou occasionnel à attribuer à telle ou telle LAC d'aspect ou en situation anormale et à la prendre en compte ou non.

Deux types de LAC apériodiques ont cependant un déterminisme connu. Il s'agit des LAC (et/ou annuli) consécutives à la naissance (à l'éclosion) connues aussi bien dans l'os des poissons (Boet, 1981 ; Lecomte *et al.*, 1985) et des reptiles (Smirina, 1974 ; Castanet, 1978), que dans la dentine des mammifères (cf. articles *in* Perrin et Myrick, 1980), ainsi que les LAC consécutives de la métamorphose chez les amphibiens (Hemelaar, 1985). Lorsqu'elles existent, ces dernières sont situées juste avant ou juste après la première LAC hivernale (Montori, 1988 ; Houck et Francillon-Vieillot, 1988 ; Castanet et Bruce, obs. non publiées chez des amphibiens Pléthodontidés). La distance qui sépare la LAC d'éclosion de la première LAC annuelle (généralement hivernale) fournira une indication sur l'époque d'éclosion. C'est ainsi que dans une population donnée si ces deux LAC sont bien séparées pour un lot notable d'animaux et rapprochées pour un autre lot, on pourra en déduire l'hypothèse de l'existence de deux époques principales d'éclosion, soit deux sous-cohortes par an dans la population étudiée (Pilorge et Castanet, 1981 ; Nouira *et al.*, 1982). On en déduira aussi que les animaux à LAC d'éclosion et LAC de première année bien séparées seront nés plus tôt en saison que les autres. Des interprétations similaires pourront être proposées à partir de la LAC de métamorphose chez les amphibiens qui en présentent. Finalement un des intérêts majeurs des LAC d'éclosion ou de métamorphose est que leur présence garantit que les LAC de premières années n'ont pas été détruites (cf. : "Destruction des marques de croissance par remaniement" ; § ci-dessous) et qu'aucune erreur dans l'estimation de l'âge n'est donc à redouter de ce point de vue .

Cycles ultra-annuels

Lorsqu'une majorité de LAC se présentent en doublets successifs chez la plupart des individus d'une même population on suspectera l'existence d'un double cycle annuel d'activité. Un doublet de LAC sera alors compté pour un an. Cependant si les deux périodes de croissance rapide ont la même durée, il y aura équidistance entre les LAC et l'aspect en doublet ne sera plus apparent. Le danger est alors de compter de façon habituelle une LAC (un annulus) pour un an et donc de surestimer ici considérablement (en fait, de doubler) l'âge individuel. Dans ce cas, seul le marquage expérimental par fluorochromes ou les captures - recaptures multiples (cf. ci-dessus) permettront de déceler ce double cycle d'activité et d'éviter une erreur d'estimation de l'âge. Jusqu'ici un exemple de ce phénomène a été clairement mis en évidence - et vérifié sur le terrain - dans des populations portugaises de l'amphibien urodèle *Triturus marmoratus* (Caetano *et al.*, 1985). Chez l'une, vivant en altitude, la plupart des individus présentent des LAC en doublets. Une de ces deux LAC correspond à la période de repos hivernal l'autre à un repos estival, avec reprise d'activité au printemps et en début d'automne. Chez d'autres populations de plaine, il ne se forme qu'une seule LAC par an, soit en hiver, soit en été, selon les conditions écologiques locales (Caetano et Castanet, à paraître).

Destruction des marques de croissance par remaniement.

Des remaniements à deux niveaux seront considérés ici.

- **Remaniement intra-cortical.** Il est lié à la présence d'une vascularisation osseuse initiale, d'autant plus dense que l'on a affaire à des espèces de grande taille et/ou à vitesse de croissance plus élevée. Lors de l'élargissement des canaux vasculaires primaires par résorption osseuse, il y a destruction plus ou moins totale des LAC (et/ou annuli) primitivement déposés. C'est ce phénomène en particulier, lié au remaniement haversien, qui empêche toute estimation sérieuse de l'âge chez les oiseaux (Van Soest et Van Utrecht, 1971 ; Klevezal, 1972 ; Nelson et Bookhout, 1980) et limite l'efficacité de la méthode chez les tortues, surtout les formes marines (Zug *et al.*, 1986 ; Castanet, 1989), les crocodiliens (Buffrénil, 1980a et b ; Castanet, obs. non publiées), certains amphibiens anoures et certains ostéichthyens (Meunier *et al.*, 1979), et d'une façon générale chez les mammifères. Chez ces derniers c'est surtout la mandibule qui, conservant de l'os primaire peu vascularisé, en particulier chez les espèces de petite taille, pourra servir pour l'estimation de l'âge (Klevezal et Kleinenberg, 1967 ; Castanet, 1980). Cependant chez les mammifères c'est le ciment dentaire, presque avasculaire et en général peu ou pas remanié qui est le plus fréquemment utilisé (Quéré et Pascal, 1983).

On notera que la vascularisation dans l'os est fonctionnellement associée aux couches à croissance rapide. Une vascularisation primaire modérée peut, de ce fait, faciliter la distinction entre les couches à croissance rapide et les annuli (ou LAC). Récemment il a été montré chez un poisson tropical d'eau douce que la première maturation sexuelle s'accompagnait d'une couche à croissance rapide très vascularisée chez les mâles (Boujard et Meunier, 1991), constituant ainsi un intéressant caractère diagnostique du dimorphisme sexuel dans cette espèce.

- **Remaniement périmédullaire.**

La destruction d'os en périphérie des cavités médullaires, appelée aussi résorption endostéale, tend à détruire les premières marques de croissance déposées. Ce phénomène est bien connu au niveau des os longs. On le rencontre chez les amphibiens, en particulier les anoures, chez les reptiles et dans les épines des nageoires des ostéichthyens. De son intensité dépendra le nombre de marques détruites et donc l'erreur commise sur l'estimation de l'âge. En fait, à l'aide d'un système de rétrocalcul désormais classique, on arrive assez facilement à retrouver le nombre des premières LAC détruites par résorption endostéale (e.g. Castanet et Cheylan, 1979 ; Meunier *et al.*, 1979 ; Leclair et Castanet, 1987). Pour éviter autant que possible cette difficulté, ce sont les préparations au niveau des corticales diaphysaires des os longs, offrant l'indice cortico-médullaire le plus élevé (e.g. les corticales les plus épaisses), qui seront retenues pour la lecture d'âge. En tout état de cause, du fait de la morphogenèse des os longs, ce sont les seules régions de ceux-ci susceptibles d'enregistrer la totalité de l'ontogenèse.

La résorption endostéale peut cependant présenter une grande valeur informative. En effet plusieurs travaux récents, en particulier chez les amphibiens, ont montré qu'il pouvait exister un dimorphisme sexuel (Smirina, 1983), une variabilité interpopulationnelle (Hemelaar, 1986 ; Esteban-Ruiz, 1990) et à plus forte raison interspécifique en rapport avec l'intensité de cette résorption endostéale. On mesure ainsi l'intérêt potentiel de ce caractère dans les recherches sur l'adaptation et l'évolution des populations animales ou en systématique.

Os endostéal

La résorption endostéale précédemment évoquée est souvent associée à un dépôt centripète de tissu osseux, appelé os endostéal. Elle tend à combler progressivement la cavité médullaire. Cet os déposé secondairement enregistre également des marques de croissance et celles-ci seront donc chronologiquement équivalentes de certaines des marques déposées dans la corticale osseuse périostique. Il est clair que les marques de l'os endostéal ne devront pas être prises en compte pour l'estimation de l'âge sous peine de surestimer à tort celui-ci, comme cela a été le cas à plusieurs reprises. La reconnaissance des différents types de tissus osseux et la compréhension de leur signification "fonctionnelle" (envisagée ici dans un sens histo-morphogénétique), est donc un préalable indispensable à leur utilisation en squeletteochronologie.

Marque de croissance périphérique

En théorie la position de la dernière LAC (du dernier annulus) formée, relativement au bord externe de la structure osseuse, autrement dit la largeur de la dernière couche de croissance rapide, permet en théorie, comparativement à l'écartement des LAC ou annuli immédiatement précédents, d'estimer l'époque du cycle de croissance à laquelle se trouve l'animal au moment de sa mort (ou du prélèvement de l'élément squelettique étudié). Ce type d'information, très recherché en archéozoologie et en préhistoire, a été recueilli chez les ostéichthyens pour la première fois par Casteel (1976). Dans un autre ordre d'idées, l'existence de deux "pics" annuels d'annuli en bordure, au sein d'une même population de poissons tropicaux (Siluriformes et Characiformes) suivis mensuellement, a permis à Lecomte *et al.* (1985, 1986) de mettre en évidence l'existence d'un double cycle annuel d'activité chez ces animaux.

On notera toutefois que la reconnaissance du type de marque périphérique n'est pas toujours aisée et que son interprétation demande beaucoup de précautions. Ce sera le cas principalement chez les individus âgés pour lesquels les dernières marques déposées sont souvent très resserrées. De plus, on devra s'assurer que l'élément squelettique était encore en croissance lors du décès de l'animal (du prélèvement de l'os ou de la dent), car dans le cas contraire qui peut se produire chez les animaux âgés (voir ci-dessous), il est clair que la dernière marque, quelle qu'elle soit, n'a plus de rapport avec l'époque du décès (ou du prélèvement de l'échantillon). Enfin, sur préparation histologique, surtout après coloration on prendra garde de ne pas confondre une éventuelle dernière LAC avec le front de minéralisation séparant l'ostéoïde (matrice organique non encore minéralisée) de l'os sous-jacent. Cette remarque vaut également pour le ciment dentaire.

Arrêt définitif anticipé de la croissance

L'enregistrement des marques de croissance en tant que phénomène dynamique, ne s'effectue évidemment que tant que l'organisme et son squelette sont en croissance. Cependant, l'arrêt définitif de croissance ne signifie pas nécessairement l'arrêt du vieillissement. Cette situation est la règle chez les mammifères, mais elle se rencontre aussi chez les animaux pourtant dits à "croissance indéfinie". En fait chez les poissons comme chez les amphibiens et les reptiles, selon les taxons considérés, la croissance est plus ou moins prolongée mais il est rare qu'elle se poursuive jusqu'aux âges les plus avancés de la longévité potentielle de l'organisme. En bref, pour des individus âgés le nombre de marques de croissance risque d'être inférieur à l'âge individuel réel. Actuellement ce phénomène a surtout été mis en évidence chez

les reptiles (e.g. Castanet *et al.*, 1988 ; Castanet, 1989). Chez de nombreux amphibiens urodèles cependant, la croissance semble effectivement continue pendant toute la vie ; elle le serait moins chez les anoues (Francillon, 1981 ; Castanet, obs. non publiées).

La limitation de la croissance n'affecte pas de la même façon tous les os d'un même squelette, ce qui en soi peut être intéressant pour des recherches sur les allométries et les hétérochronies de croissance. Cependant, compte tenu de ce phénomène, le choix de l'élément utilisé pour l'estimation de l'âge est important. Chez le reptile *Sphenodon punctatus*, un arrêt de croissance en épaisseur des phalanges bien avant celle du fémur, respectivement vers 22 ans contre 36-38 ans, a clairement été mis en évidence (Castanet *et al.*, 1988). Ce dernier chiffre correspondait d'ailleurs au maximum de LAC observé chez quelques uns des plus grands individus. Cependant, selon toute évidence ce chiffre ne représente qu'un âge minimum assez éloigné par défaut de la longévité potentielle spécifique, puisque des expériences de suivi à très long terme dans la nature ont montré que la longévité du *Sphénodon* dépassait 60 ans (Dawbin, 1982). L'exemple, probablement extrême, choisi ici montre l'attention qu'il faut porter à la signification réelle du nombre de marques de croissance chez les individus âgés des espèces longévives. Heureusement ces individus ne représentent souvent qu'un faible pourcentage dans une population naturelle, ce qui minimise l'erreur éventuelle commise dans l'estimation de la structure d'âge globale de la population.

CONCLUSIONS

Les tissus osseux et dentaires des vertébrés constituent de fait un instrument d'investigation de "haute performance". En effet, l'analyse squeletteochronologique, même si elle n'est pas exempte de difficultés, est souvent la meilleure - sinon la moins mauvaise - méthode permettant de reconstituer la chronologie du déroulement des grandes étapes de la vie individuelle d'un animal, ainsi que certaines conditions du milieu dans lequel il évolue. Cette valeur informative de la squeletteochronologie intéresse divers domaines de la recherche théorique et fondamentale : biologie de la croissance, écodémographie, microévolution, physiologie métabolique, paléoclimatologie, archéologie, ... Cette méthode doit pouvoir être encore améliorée par des travaux fondamentaux qui permettraient de mieux comprendre l'ensemble des relais physiologiques intervenant entre le phénomène synchroniseur du milieu et la croissance des tissus squelettiques, soit de permettre une meilleure interprétation de la signification histophysiologique et fonctionnelle de ces tissus.

REFERENCES

- BEAMISH R.J., MACFARLANE G.A., 1983. The forgotten requirement for age validation in fisheries biology. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 112 : 735-743.
- BLAKE C., BLAKE B.F., 1978. The use of opercular bones in the study of age and growth in *Labeo senegalensis* from Lake Kainji, Nigeria. *J. Fish Biol.*, 13 : 287-295.
- BOET P., 1981. Eléments d'écologie du poisson-chat *Ictalurus melas* (Rafinesque, 1820), du lac de Créteil. *Thèse 3ème Cycle*, Paris.

- BOUJARD T., MEUNIER F.J., 1991. Croissance de l'épine pectorale, histologie osseuse et dimorphisme sexuel chez l'atipa, *Hoplosternum littorale* Hancox, 1828 (Callichthyidae, Siluriforme). *Cybium*, 15 : 55-68.
- BRUNEAU M., MAGNIN E., 1980. Croissance, nutrition et reproduction des Ouauarons, *Rana catesbeiana* Shaw (Amphibia, Anura) des Laurentides au nord de Montréal. *Can. J. Zool.*, 58 : 175-183.
- BRYUZGIN V.L., 1939. A procedure for investigating age and growth in Reptilia. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 23 : 403-405.
- BUFFRENIL V. de, 1980a. Données préliminaires sur la structure des marques de croissance squelettiques chez les crocodyliens actuels et fossiles. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 105 : 355-361.
- BUFFRENIL V. de, 1980b. Mise en évidence de l'incidence des conditions de milieu sur la croissance de *Crocodylus siamensis* (Schneider, 1801) et valeur des marques de croissance squelettiques comme indicateur de l'âge individuel. *Arch. Zool. exp. gén.*, 121 : 63-76.
- BUFFRENIL V. de, 1982. Données préliminaires sur la présence de lignes d'arrêt de croissance périostiques dans la mandibule du marsouin commun, *Phocoena phocoena* (L.), et leur utilisation comme indicateur de l'âge. *Can. J. Zool.*, 60 : 2557-2567.
- BUFFRENIL V. de, COLLET A., 1983. Données méthodologiques sur l'emploi de la méthode squelettochronologique chez le Dauphin commun (*Delphinus delphis* L.). *Ann. Sci. Nat., Zool.*, 5 : 269-285.
- BUFFRENIL V. de, PASCAL M., 1984. Croissance et morphogenèse postnatales de la mandibule du vison (*Mustela vison*, Schreiber) : données sur la dynamique et l'interprétation fonctionnelle des dépôts osseux mandibulaires. *Can. J. Zool.*, 62 : 2026-2037.
- CAETANO M.H., CASTANET J., FRANCILLON H., 1985. Détermination de l'âge de *Triturus marmoratus* (Latreille 1800) du Parc National de Peneda Gerês (Portugal) par squelettochronologie. *Amphibia-Reptilia*, 6 : 117-132.
- CAETANO M.H., CASTANET J., 1987. Experimental data on bone growth and age in *Triturus marmoratus* (Amphibia, Urodela). 4th Meeting of the European Society of Herpetology. Nijmegen (NL) Août 1987 : 87-90.
- CAMPANA S.E., NEILSON J.D., 1985. Microstructure of fish otoliths. *Can. J. Fish. Aqu. Sci.*, 42 : 1014-1032.
- CASSELMAN J.M., 1974. Analysis of hard tissue of pike *Esox lucius* with special reference to age and growth. In : Bagenal (ed), *The Ageing of Fish.*, Old Woking, Surrey, U.K. : 13-27.
- CASSELMAN J.M., 1983. Age and growth assessment of fish from their calcified structures. In : *Techniques and tools. U.S. Dep.Commer.*, NOAA. *Tech.Rep.*, NMFS, 8 : 1-17.
- CASSELMAN J.M., 1987. Determination of age and growth. In : *The biology of fish growth*, A.H. Weatherley and H.S. Gill (ed), Acad. Press, London : 209-242.

- CASTANET J., 1974. Etude histologique des marques squelettiques de croissance chez *Vipera aspis* L. (Ophidia, Viperidae). *Zool. Scripta*, 3 : 137-151.
- CASTANET J., 1975. Quelques observations sur la présence et la structure des marques squelettiques de croissance chez les Amphibiens. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 100 : 603-620.
- CASTANET J., 1978. Les marques de croissance osseuse comme indicateur de l'âge chez les lézards. *Acta Zool.*, 59 : 35-48.
- CASTANET J., 1979. Données comparatives sur la minéralisation des marques de croissance squelettique chez les Vertébrés. Etude par microradiographie quantitative. *C. R. Acad. Sci.*, 289 : 405-408.
- CASTANET J., 1980. La squelettochronologie chez les vertébrés supérieurs (Mammifères et Oiseaux). *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 105 : 347-354.
- CASTANET J., 1981. Nouvelles données sur les lignes cimentantes de l'os. *Arch. Biol.*, 92 : 1-24.
- CASTANET J., 1985. La squelettochronologie chez les Reptiles. I. Résultats expérimentaux sur la signification des marques de croissance squelettiques chez les Lézards et les Tortues. *Ann. Sci. Nat., Zool., 13ème sér.*, 7 : 3-40.
- CASTANET J., 1988. Les méthodes d'estimation de l'âge chez les chéloniens. *Mésogée*, 48 : 21-28.
- CASTANET J., M. BAEZ, 1991. Adaptation and evolution in *Gallotia* lizards from the Canary Islands : age, growth, maturity and longevity. *Amphibia-Reptilia*, 12 : 81-102.
- CASTANET J., M. CHEYLAN, 1979. - Les marques de croissance des os et des écailles comme indicateur de l'âge chez *Testudo hermanni* et *Testudo graeca* (Reptilia, Chelonia, Testudinidae). *Can. J. Zool.*, 57 : 1649-1665.
- CASTANET J., MEUNIER F., RICQLES A. de, 1977. L'enregistrement de la croissance cyclique par le tissu osseux chez les Vertébrés poikilothermes : données comparatives et essai de synthèse. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 111 : 183-202.
- CASTANET J., NAULLEAU J., 1985. La squelettochronologie chez les Reptiles. II. Résultats expérimentaux sur la signification des marques de croissance squelettiques chez les Serpents. Remarques sur la croissance et la longévité de la Vipère Aspique. *Ann. Sci. Nat., Zool., 13ème sér.*, 7 : 41-62.
- CASTANET J., NEWMAN D., SAINT-GIRONS H., 1988. Skeletochronological data on the growth, age and population structures of the Tuatara, *Sphenodon punctatus*, on Stephens and Lady Alice islands, New Zealand. *Herpetologica*, 44 : 25-37.
- CASTANET J., SMIRINA E., 1990. - Introduction to the skeletochronological method in amphibians and reptiles. *Ann. Sci. Nat. Zool.*, 11 : 191-196.
- CASTEEL R.W., 1972. Some archaeological uses of fish remains. *Am. Antiquity*, 37 : 404-419.

- CASTEEL R.W., 1976. Fish remains in Archaeology and paleo-environmental studies. *Academic Press*, London.
- CHARLES D.K., CONDON K., CHEVERUD J.M., BUIKSTRA J.E., 1986. Cementum Annulation and Age Determination in *Homo sapiens*. I. Tooth Variability and Observer Error. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 71 : 311-320.
- CLERC W., 1927. Etude de la périodicité de la croissance d'après les plans isodynamiques des os. *Rev. Suisse Zool.*, 34 : 477-496.
- COMPEAN-JIMENEZ G., BARD F.X., 1980. - Utilisation de la squelettochronologie chez les Thunnidés. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 105 : 329-336.
- CUERRIER J.P., 1951. The use of pectoral fin rays for determining age of sturgeons and other species of fish. *Can. Fish Cult.*, 11 : 1-9.
- DAPSON R.W., 1980. - Guidelines for statistical usage in age-estimation technics. *J. Wildl. Manage.*, 44 : 541-548.
- DAWBIN W.H., 1982. The tuatara *Sphenodon punctatus* : aspects of life history, growth and longevity. : 237-250. In D.G. Newman (ed.), *New Zealand Herpetology*. New Zealand Wildl. Serv., Dept. Intern. Aff., *Occas. Publ. No. 2*.
- DEELDER C.L., WILLEMSE J.J., 1973. Age determination in fresh-water teleosts, based on annular structures in fin-rays. *Aquaculture*, 1 : 365-371.
- ESTEBAN-RUIZ M.L., 1990. Evolucion del género *Rana* en la península ibérica : estudio de la variabilidad morfológica y genética del complejo *Rana temporaria* L. Tesis, Univ. Madrid.
- FRANCILLON H., 1979. Etude expérimentale des marques de croissance sur les humérus et les fémurs de Tritons crêtés (*Triturus cristatus cristatus* Laurenti) en relation avec la détermination de l'âge individuel. *Acta Zool.*, 60 : 223-232.
- FRANCILLON H., 1981. Contribution à l'étude des structures et du fonctionnement des épiphyses fémorales chez les Amphibiens Anoures. *Arch. Zool. exp. gen.*, 122 : 289-316.
- FRANCILLON H., CASTANET J., 1985. Mise en évidence expérimentale du caractère annuel des lignes d'arrêt de croissance squelettique chez *Rana esculenta* (Amphibia, Anura). *C. R. Acad. Sc. Paris*, 300 : 327-332.
- FRANCILLON H., PASCAL M., 1985. Présence de lignes d'arrêt de croissance dans les os longs de *Pleurodeles poireti* Gervais. Leur éventuelle utilisation comme indicateur de l'âge individuel. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 110 : 223-240.
- FRYLESTAM B., SCHANTZ T., 1977. Age determination of European hares based on periosteal growth lines. *Mammal. Rev.*, 7 : 151-154.
- GALTSOFF P.S., 1952. Staining of growth rings in the vertebrae of tuna (*Thunnus thynnus*). *Copeia*, 2 : 103-105.
- GROSSKOPF B., 1990. Individualaltersbestimmung mit Hilfe von Zuwachsringen im Zement bodengelagerter menschlicher Zähne. *Z. Rechtsmed.*, 103 : 351-359.

- GRUE H., JENSEN B., 1979. Review of the formation of incremental lines in tooth cementum of terrestrial Mammals. *Dan. Rev. Game Biol.*, 11 : 1-48.
- HALLIDAY T.R., VERRELL P.A., 1988. Body Size and Age in Amphibians and Reptiles. *J. Herpetol.*, 22 : 253-265.
- HARRIS H.A., 1927. Bony striation of the metaphysis as an indication of cessation of growth in the long bones. *Comp. Rend. Assoc. Anat.* : 266 p.
- HEMELAAR A., 1985. An improved method to estimate the number of year rings resorbed in phalanges of *Bufo bufo* (L.) and its application to populations from different latitudes and altitudes. *Amphibia-Reptilia*, 6 : 323-343.
- HEMELAAR A., 1986. Demographic study on *Bufo bufo* L. (Anura, Amphibia) from different climates, by means of skeletochronology. *Thèse PhD*, Université de Nijmegen : 135 p.
- HOUCK L.D., FRANCILLON-VIEILLOT H., 1988. Tests for age and size effects on male mating success in a plethodontid salamander. *Amphibia-Reptilia*, 9 : 135-144.
- HSIAO-WEI C., 1951. - Age and growth of *Callionymus lyra* L. *Journ. mar. Biol. Ass.*, 30 : 281-296.
- KASUYA T., 1976. Reconsideration of life history parameters of the spotted and striped dolphins based on cemental layers. *Sci. Rep. Whales Res. Inst.*, 31 : 4 5-67.
- KAY R.F., RASMUSSEN D.T., BEARD K.C., 1984. Cementum annulus counts provide a means for age determination in *Macaca mulatta* (Primates, Anthroipoidea). *Folia Primatol.*, 42 : 85-95.
- KLEVEZAL G.A., 1972. Determination of age in birds by layers in the periosteal zone. *Zool. Zh.*, 57 : 917-922.
- KLEVEZAL G.A., 1973. Some limitations and new possibilities of using layers in tooth and bone tissues for age determination in mammals. *Zool. Zh.*, 52 : 757-765.
- KLEVEZAL G.A., FEDYK A., 1978. Adhesion lines Pattern as an Indicator of age in Voles. *Acta Theriologica*, 23 : 413-422.
- KLEVEZAL G.A., KLEINENBERG S.E., 1967. Age determination of mammals from annual layers in teeth and bones. *Transl. Rus., Israel Progr. Sci. Transl.*, Jerusalem, 1969, IPST Cat. N°5433 : 128 p.
- LECLAIR R., CASTANET J., 1987. A skeletochronological assessment of age and growth in the frog *Rana pipiens* Schreber (Amphibia, Anura) from Southwestern Quebec. *Copeia*, 2 : 361-369.
- LECOMTE F., MEUNIER F.J., ROJAS-BELTRAN R., 1985. Mise en évidence d'un double-cycle de croissance annuel chez un Silure de Guyane, *Arius couma* (Val., 1839) (Teleostei, Siluriforme, Ariidae) à partir de l'étude squelettochronologique des épines des nageoires. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 300 : 181-184.

- LECOMTE F., MEUNIER F.J., ROJAS-BELTRAN R., 1986. Données préliminaires sur la croissance de deux téléostéens de Guyane, *Arius proops* (Ariidae, Siluriformes) et *Leporinus friderici* (Anostomidae, Characoidei). *Cybiurn*, 10 : 121-134.
- LOWE-McCONNELL R.H., 1964. The fishes of the Rupununi savanna district of British Guiana, South America. Part 1. Ecological groupings of fish species and effects of the seasonal cycle on the fish. *J. Linn. Soc., Zool.*, 45 : 103-144.
- MARZOLF R.C., 1955. Use of pectoral spines and vertebra for determining the age and rate of growth of the channel catfish. *J. Wildl. Manage.*, 19 : 243-249.
- MATTOX N.T., 1935. Annular rings in the long bones of turtles and their correlation with size. *Trans. Ill. St. Acad. Sci.*, 28 : 255-256.
- MENON M.D., 1950. The use of bones, other than otoliths in determining the age and growth-rate of fishes. *J. Cons. Ferm. Inter. Expl. Mer.*, 16 : 311-340.
- MEUNIER F.J., 1974. La technique de marquage vital des tissus squelettiques des Poissons. *Bull. Fr. Pisc.*, 255 : 51-57.
- MEUNIER F.J., 1988 Détermination de l'âge individuel chez les Ostéichthyens à l'aide de la squeletteochronologie : historique et méthodologie. *Acta Oecologica, Oecol. Gener.*, 9 : 299-329.
- MEUNIER F.J., BOIVIN G., 1978. Action de la fluorescéine, de l'alizarine, du bleu de calcéine et de diverses doses de tétracycline sur la croissance de la truite et de la carpe. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 18 : 1293-1308.
- MEUNIER F.J., LECOMTE F., ROJAS-BELTRAN R., 1985. Mise en évidence de doubles cycles annuels de croissance sur le squelette de quelques téléostéens de Guyane. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 110 : 285-289.
- MEUNIER F.J., PASCAL M., 1981. Etude expérimentale de la croissance cyclique des rayons de nageoire de la carpe (*Cyprinus carpio* L.). Résultats préliminaires. *Aquaculture*, 26 : 23-40.
- MEUNIER F.J., PASCAL M., LOUBENS G., 1979. Comparaison de méthodes squeletteochronologiques et considérations fonctionnelles sur le tissu osseux acellulaire d'un Ostéichthyen du Lagon NéoCalédonien. *Aquaculture*, 17 : 137-157.
- MILLER F.L., 1974. Biology of the Kaminuriak population of barrenground caribou. Part 2 : dentition as an indicator of age and sex ; composition and socialization of the population. *Can. Wildl. Serv. Report Ser.*, 31 : 1-87.
- MILLS K.H., BEAMISH R.J., 1980. Comparison of fin-ray and scale age determinations for lake white fish (*Coregonus clupeaformis*) and their implications for estimates of growth and annual survival. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 37 : 534-544.
- MINAKAMI K., 1979. An estimation of the age and life-span of the genus *Trimeresurus* (Reptilia, Serpentes, Viperidae) on Amami Oshima Island, Japan. *J. Herpetol.*, 13 : 147-152.
- MITCHELL B., 1969. Growth layers in dental cement for determining the age of red deer (*Cervus elaphus* L.). *J. Anim. Ecol.*, 36 : 279-293.

- MONTORI A., 1988. Estudio sobre la biología y ecología del triton pirenaico *Euproctus asper* (Dugès, 1852) en la Cerdanya. *Tesis 3° ciclo*. Univ. de Barcelona.
- MORRIS P., 1970. A method for determining absolute age in the hedgehog. *J. Zool. Lond.*, 161 : 277-281.
- NELSON R.C., BOOKHOUT T.A., 1980. Counts of periosteal layers invalid for aging Canada geese. *J. Wildl. Manage.*, 44 : 518-521.
- NOUIRA S., MAURY M.E., BARBAULT R., 1982. Détermination squelettochronologique de l'âge dans une population de *Cophosaurus texanus* (Sauria, Iguanidae). *Amphibia-Reptilia*, 3 : 213-219.
- OLATUNDE A.A., 1979. Age determination, length-weight relationship and growth of *Eutropius niloticus* and *Schilbe mystus* in lake Kainji, Nigeria. *Arch. Hydrobiol.*, 87 : 49-83.
- PANNELLA G., 1971. Fish otoliths : daily growth layers and periodical patterns. *Science*, 173 : 1124-1127.
- PANNELLA G., 1980. Methods of preparing fish sagittae for the study of growth patterns. In : Skeletal growth of aquatic organisms : biological records of environmental change, 619-624. D.C. Rhoads and R.A. Lutz (Eds). *Plenum Press*, New York.
- PASCAL M., CASTANET J., 1978. Méthodes de détermination de l'âge chez le chat haret des îles Kerguelen. *Terre et Vie*, 32 : 529-555.
- PEABODY F.E., 1958. - A Kansas drought recorded in growth zones of a bullsnake. *Copeia*, 2 : 91-94.
- PEABODY F.E., 1961. - Annual growth zones in vertebrates (living and fossil). *J. Morph.*, 108 : 11-62.
- PERRIN W.F., MYRICK A.C., 1980. Age determination of toothed whales and sirenians. In : Intern. Whaling Commis., Rep. of the I.W.C., Spec. Issue 3, W.F. Perrin and A.C. Myrick (eds), La Jolla, Calif. : 229 p.
- PETTER-ROUSSEAU A., 1953. Recherches sur la croissance et le cycle d'activité testiculaires de *Natrix natrix helvetica* (Lacépède). *Terre et Vie*, 4 : 175-223.
- PILORGE T., CASTANET J., 1981. Détermination de l'âge dans une population naturelle du lézard vivipare *Lacerta vivipara*. *Acta Oecologica, Oecol. Gener.*, 2 : 387-397.
- PHILLIPS C.J., STEINBERG B., KUNZ T.H., 1982. Dentin, cementum and age determination in bats : a critical evaluation. *J. Mammal.*, 63 : 197-207.
- POINSARD F., TROADEC J.P., 1966. Détermination de l'âge par la lecture des otolithes chez deux espèces de Scianidae Ouest-Africains (*Pseudolithus senegalensis* C.V. et *Pseudolithus typus* Blkr.). *J. Cons. perm. int. Explor. Mer.*, 30 : 291-307.
- QUERE J.P., PASCAL M., 1983. Comparaison de divers critères de détermination de l'âge individuel chez le Cerf élaphe (*Cervus elaphus*) de France. *Ann. Sc. Nat. Zool.*, 13 : 235-252.

- ROBBEN J., THYS VAN DEN AUDENAERDE D.K., 1984. A preliminary study of age and growth of a Cyprinid fish *Barilius moori* (Blgr) in lake Kivu. *Hydrobiologia*, 108 : 153-162.
- SAINT-GIRONS H., 1952. Ecologie et éthologie des vipères de France. *Ann. Sci. Nat., Zool., 2ème série*, 14 : 263-343.
- SAINT-GIRONS H., 1957. Croissance et fécondité de *Vipera aspis*. *Vie Milieu*, 8 : 265-286.
- SCHROEDER E.E., BASKETT T., 1968. Age estimation, growth rates and population structures in Missouri bullfrogs. *Copeia*, 3 : 583-592.
- SENNING W.G., 1940. A study of age determination and growth of *Necturus maculosus*, based on the parasphenoid bone. *Am. J. Anat.*, 66 : 483-494.
- SMIRINA E.M., 1974. Prospects of age determination by bone layers in Reptilia. *Zool. Zh.*, 53 : 111-117.
- SMIRINA E.M., 1983. Age determination and retrospective body size evaluation in the live common toads, *Bufo bufo*. *Zool. Zh.*, 62 : 437-444.
- SMIRINA E.M., KLEVEZAL G.A., BERGER L., 1986. Experimental investigation of the annual layer formation in bones of Amphibians. *Zool. Zh.*, 65 : 1526-1534.
- SNEED K.E., 1951. A method for calculating the growth of channel catfish *Ictalurus lacustris punctatus*. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 80 : 174-183.
- STOTT G.G., SIS R.F., LEVY B.M., 1980. Cemental Annulation as an Age Criterion in the Common Marmoset (*Callithrix jacchus*). *J. Medic. Primat.*, 9 : 274-285.
- VAN DER WAAL B.C.W., SCHOONBEE H.J., 1975. Age and growth studies of *Clarias gariepinus* (Burchell)(Clariidae) in the Transwaal, South Africa. *J. Fish Biol.*, 7 : 227-233.
- VAN SOEST R.W.M., VAN UTRECHT W.L., 1971. The layered structure of bones of birds as a possible indication of age. *Bijdragen tot de Dierkunde*, 41 : 61-66.
- WADA K., OHTAISHI N., HACHIYA N., 1978. Determination of age in the Japanese Monkey from Growth Layers in the Dental Cementum. *Primates*, 19 : 775-784.
- WARREN J.W., 1963. Growth zones in the skeleton of recent and fossil Vertebrates. *PhD Thesis, Univ. of Calif.*, Los Angeles : 136 p.
- WARBURTON K., 1978. Age and growth determination in a marine catfish using an otolith check technique. *J. Fish Biol.*, 13 : 429-434.
- ZUG G., WYNN, A.H., RUCKDESCHEL C., 1986. Age determination of loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*, by incremental growth marks in the skeleton. *Smiths Contrib. Zool.*, 427 : 1-34.