

A. Validation directe

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

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

1. Marquage

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

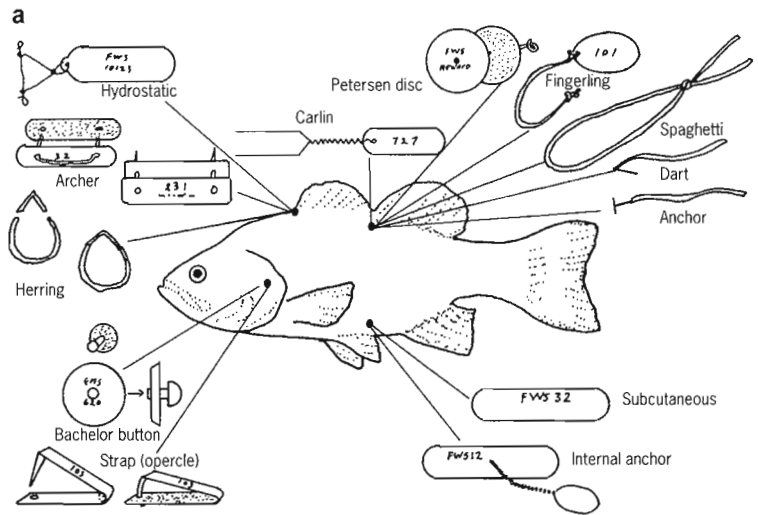
1.1. Marquage des poissons

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

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

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

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



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

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

1.2. Marquages des pièces calcifiées

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

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

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

1.2.1. Marqueurs fluorescents

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2.1.1. Injection

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

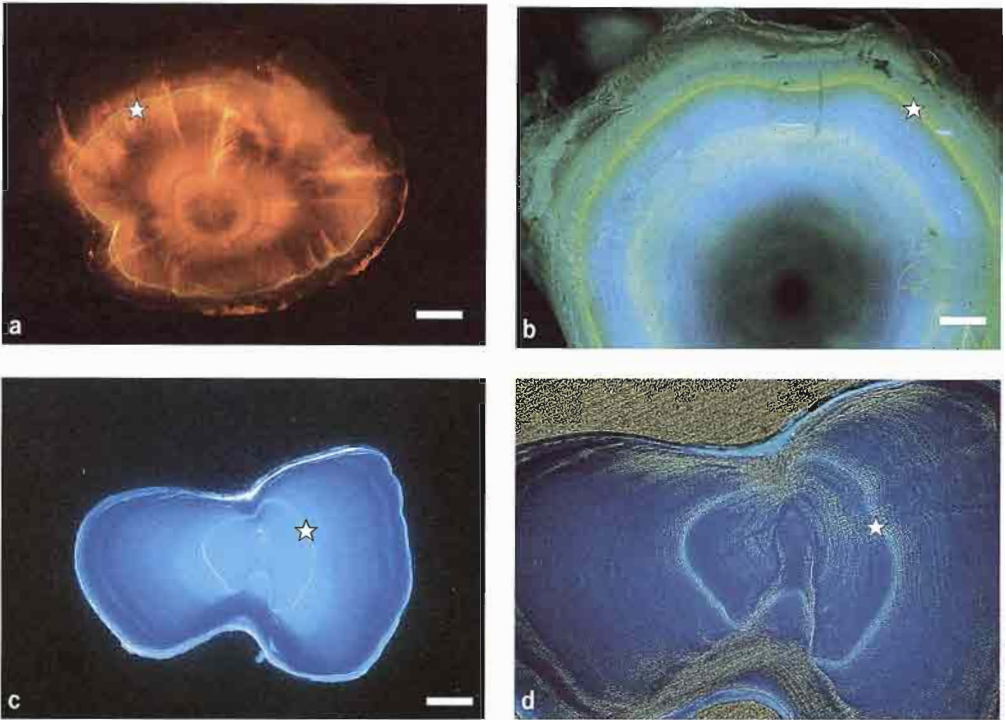


Figure IV.A.2 - Marques de tétracycline (☆) observées sur différentes pièces calcifiées. Toutes les images sont prises sous une lumière ultraviolette en épifluorescence en microscopie photonique (photos J. Panfil).

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

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

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



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

1.2.1.2. Balnéation

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

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

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

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

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

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

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

1.2.1.3. Incorporation dans la nourriture

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

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

1.2.1.4. Marqueurs fluorescents

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

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

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

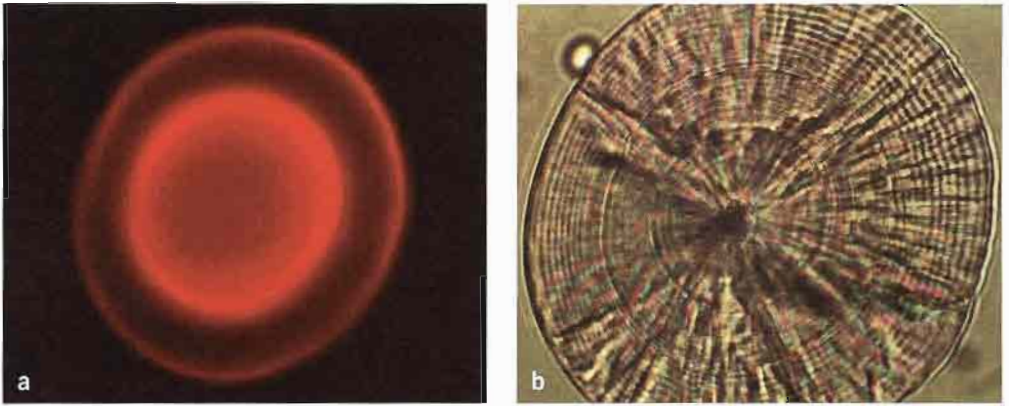


Figure IV.A.4
Exemple de marquage double avec l'alizarine complexone sur une *sagitta* de larve de hareng (*Clupea harengus*) observée sous une lumière ultraviolette (a) et même otolithe observé sous une lumière transmise (b). Échelle = 20 μm (photos A. Folkvord).

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

1.2.2. Marques induites par la température sur les otolithes

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

1.2.3. Marques induites par un cycle lumineux sur les otolithes

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

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

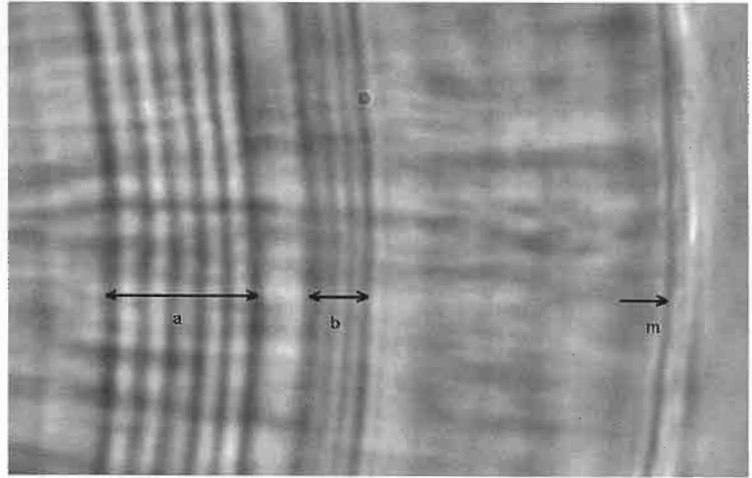


Figure IV.A.6
Exemple de marque induite par une période de 3 jours de cycle de photopériode de 6h jour-6h nuit chez un *Salmo salar* juvénile (photo P.J. Wright).

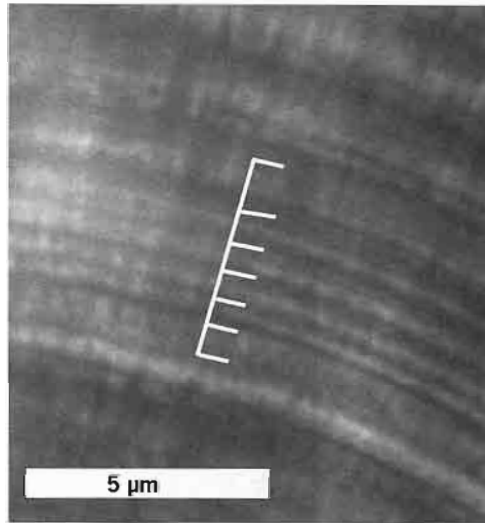
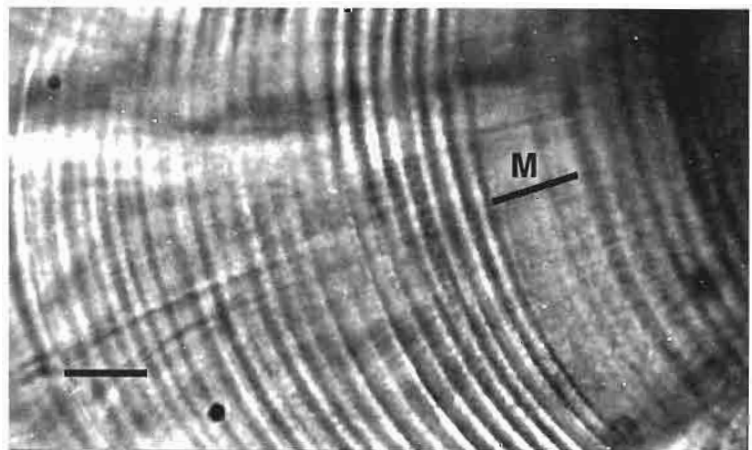


Figure IV.A.7
Exemple de marque (M) induite par la combinaison d'un cycle de photopériode de 6h jour-6h nuit avec une augmentation de la température de 3 °C pendant la phase lumineuse chez *Gasterosteus aculeatus*. Échelle = 10 µm (photo P.J. Wright).



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

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

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

2. Élevage et aquaculture

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

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



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

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

3. Traitement des données

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

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

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

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

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

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