

NOTE

UNE TECHNIQUE DE LECTURE D'ÂGE DES RAIES

M.-H. DU BUIT et F. MAHEUX

C.N.R.S., Collège de France.

Laboratoire de Biologie marine - 29110 Concarneau, France.

Abstract. — AN AGE READING TECHNIC FOR RAYS.

Description of a technic for including and preparing small cross sections of ray vertebra. The observation of the rings growth is performed after staining with cobalt nitrate and safranine. This method is applied to the observation of the growth rings in the vertebra of *Raja naevus*.

Résumé. — Il s'agit de la description d'une technique d'inclusion et de préparation réalisée sur des coupes transversales de vertèbres de raies. L'observation des anneaux de croissance est améliorée après coloration au nitrate de cobalt et safranine. Cette méthode est utilisée pour l'observation des anneaux de croissance des vertèbres de *Raja naevus*.

Les captures de raies françaises en mer Celtique et mer d'Irlande ont atteint 8 450 tonnes en 1980. Elles occupent ainsi la 3^e place, en poids dans les débarquements de poissons provenant de cette zone. Mais le déclin des apports au cours des 20 dernières années est inquiétant pour l'avenir de ces stocks et a déterminé la mise en place d'un programme d'observation pour recueillir les données nécessaires à l'élaboration d'un modèle de gestion. Le premier point qui a retenu l'attention concerne la croissance.

La détermination de l'âge des Sélaciens est basée classiquement sur la lecture des stries d'accroissement inscrites dans les pièces squelettiques en général et plus particulièrement dans les corps vertébraux. Cette méthode a été utilisée avec succès sur différentes espèces de requins (AASEN, 1963 ; HOLDEN et MEADOWS, 1962 ; STEVENS, 1975 ; ROSSOUM, 1984) et de raies (ISHIYAMA, 1951 ; DAIBER, 1960 ; DU BUIT, 1977 ; RYLAND et AJAYI, 1984). De plus, HOLDEN et VINCE (1973) ont démontré la validité de la méthode en prouvant, par marquage à la tétracycline, la formation d'un seul anneau de croissance par an dans les vertèbres de *Raja clavata* des côtes méridionales de l'Angleterre.

La plupart des techniques utilisées font appel à des procédés d'imprégnation et de coloration successifs ; leur principal inconvénient tient à la longueur des manipulations qui nécessitent plusieurs jours de traitement ; elles sont donc inapplicables dans le cadre d'un programme d'échantillonnage routinier. La pratique décrite ici permet de raccourcir sensiblement la durée des manipulations. Elle a été mise au point sur *Raja naevus* qui est la plus abondante des dix espèces de raies débarquées à Concarneau.

Matériel et méthode.

Un prélèvement de 4 à 5 vertèbres est effectué dans la région abdominale, zone classiquement reconnue comme étant la plus favorable à l'examen des anneaux de croissance (ISHIYAMA, 1951 ; DAIBER, 1960). Les vertèbres sont lavées et soigneusement débarrassées des tissus adhérents (chairs, ligaments intervertébraux, vaisseaux sanguins). Un bon nettoyage est important pour la bonne tenue du matériel lors de l'inclusion et de la coupe, il est facilité par un passage dans l'eau bouillante durant quelques minutes.

Les vertèbres sont ensuite fixées à l'alcool à 70 % pendant une heure, puis séchées à la température ambiante. Les pièces, ainsi préparées peuvent être conservées à sec sans inconvénient. Les vertèbres sont incluses dans une résine polyester selon la technique mise au point pour les otolithes (SOUPLET et DUFOUR, 1983) (voir en annexe les renseignements concernant la résine et le matériel de coupe utilisés).

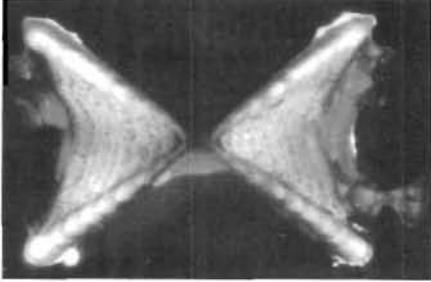


FIG. 1. — Vertèbre de *Raja naevus* (LT = 65 cm) traitée au nitrate de cobalt-safranine.

Une première couche de support est coulée dans le moule (5 mn environ). Après 20 minutes de séchage à la température ambiante, une deuxième couche plus mince (2 à 3 mm) est ajoutée. On place les vertèbres dans cette couche encore visqueuse, à plat (axe vertical) reposant sur la couche déjà durcie ; le cône inférieur et les anfractuosités doivent être noyés dans la résine. Il faut veiller à aligner soigneusement les centra dans le futur plan de coupe et éviter les bulles. La résine doit adhérer aux vertèbres pour permettre l'obtention de lames minces solides. On modifiera la quantité d'accélérateur en fonction du temps nécessaire à la mise en place de la série de vertèbres. Enfin, on recouvre le tout d'une troisième couche de résine de 6 mm environ.

Après polymérisation (12 heures environ), les blocs sont débités transversalement en lames de 0,5 mm d'épaisseur à l'aide d'un disque diamanté. Il peut être nécessaire de poncer les coupes à l'eau sur papier abrasif fin pour éliminer les traces de scie nuisibles à une bonne coloration et de les laver ensuite pour les débarrasser de tout dépôt de sciure.

La coloration des coupes est réalisée suivant une méthode dite de substitution. Cette méthode est basée sur les différences existant entre les constantes de solubilité du calcium présent dans les vertèbres et celles des constituants du réactif. En présence de nitrate d'argent, de chlorure ou de nitrate de cobalt, le calcium des vertèbres (carbonate ou phosphate) passe en solution sous forme de nitrate ou de chlorure : il est remplacé par un cation du réactif qui est révélé dans un deuxième temps.

La méthode utilisée ici a été décrite par STOELZNER (in GABE, 1968). Les coupes sont :

- traitées par une solution de nitrate de cobalt à 4 % pendant 5 mn et rincées à l'eau distillée ;
- traitées par une solution aqueuse de sulfure d'ammonium (1 % de la solution commerciale à 20 %) pendant quelques secondes, jusqu'à l'apparition d'une coloration grisâtre puis rincées à l'eau distillée ;
- colorées par une solution hydroalcoolique de safranine (1 g safranine, 10 ml alcool 100 %, 5 ml eau), ou de thionine puis rincées à l'eau courante.

Remarques.

Les techniques d'observation et de coloration essayées sur les vertèbres de *Raja naevus* sont résumées dans le tableau 1. Celle de la lame mince est la plus simple et permet une lecture relativement aisée. Son principal inconvénient tient à la longueur des opérations de polissage. Les lames obtenues à l'aide de la scie diamantée sont généralement trop épaisses pour être lues directement en transparence, il convient de les amincir. Le deuxième inconvénient est lié à la petite taille des vertèbres des spécimens de moins de 40 cm de LT, dont il est difficile d'obtenir des coupes en bon état.

La méthode de STOELZNER s'est avérée la plus simple et la plus efficace ; elle permet d'obtenir un contraste suffisant pour dénombrer les anneaux (fig. 1), encore faut-il remarquer qu'une forte proportion de vertèbres (environ 50 %) reste inutilisable, soit parce que tous les anneaux n'apparaissent pas, soit parce qu'ils n'apparaissent pas du tout. Ce phénomène se manifeste aussi bien chez le même individu que chez des individus différents et n'a pas été expliqué jusqu'à présent. Malgré sa relative rapidité par rapport aux autres méthodes, la durée des manipulations reste importante, de l'ordre de 45 mn par individu. L'inclusion, l'alignement et la coupe des vertèbres de petite taille sont très délicats.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AASEN (O.), 1963. — Length of the porbeagle (*Lamna nasus* Bonnaterre), in the Northwest Atlantic. — *Fiskeridir. Skr. Havundersok.*, Bergen, **13** (6) : 20-37.
- DAIBER (F.C.), 1960. — A technic for age determination in the skate *Raja eglanteria*. — *Copeia* : 258-260.
- DU BUIT (M.H.), 1977. — Age et croissance de *Raja batis* et *Raja naevus* en mer Celtique. — *J. Cons. int. Explor. Mer*, **37** : 261-265.
- GABE (M.), 1968. — Techniques histologiques. Masson et C^{ie} ed. Paris.
- HOLDEN (M.J.) and MEADOWS (P.S.), 1962. — The structure of the spine of the spur dogfish (*Squalus acanthias* L.) and its use for age determination. — *J. mar. biol. Ass. U.K.*, **42** : 179-197.
- HOLDEN (M.J.) et VINCE (M.R.), 1973. — Age validation studies on the centra of *Raja clavata* using tetracycline. — *J. Cons. int. Explor. Mer*, **35** : 13-17.

- ISHIYAMA (R.), 1951. — Studies on the rays and skates belonging to the family Rajidae, found in Japan and adjacent region — 2 — on the age — determination of Japanese black-skate, *Raja fusca*, Garman (preliminary report). — *Bull. Jap. Soc. sci. Fish.*, **16** : 112-118.
- ROSSOUM (G.S.), 1984. — Age and growth of the shark, *Rhinobatos annulatus*, in Algoa Bay, South Africa. — *J. Fish Biol.*, **25** : 213-222.
- RYLAND (G.S.) and AJAYI (T.O.), 1984. — Growth and population dynamics of three *Raja* species (Batoidei) in Carmathan Bay, British Isles. — *J. Cons. int. Explor. Mer*, **41** : 111-120.
- SOUPLET (A.) et DUFOUR (J.-L.), 1983. — Developpement des techniques de lecture des otholithes en coupes fines. — *Rapp. techn. I.S.T.P.M.*, n° 5, 1983.
- STEVENS (J.O.), 1975. — Vertebral rings as a method of age determination in the blue shark (*Prionace glauca*). — *J. mar. biol. Ass. U.K.*, **55** : 657-665.
- WILLIAMS (T.W.), 1941. — Alizarine red S and toluidine blue for differentiating adult or embryonic bone and cartilage. — *Stain Techn.*, **16** : 23-25.

Manuscrit soumis le 3-2-1986, accepté le 12-5-1986.

ANNEXE

OPÉRATIONS - COLORATION	RÉSULTATS - OBSERVATIONS
Séchage étuve 35 °C Décalcification acide nitrique 5 % 20 à 30 mn Brûlage doux dans glycérine à 180 °C Eclaircissement par la créosote Hématoxyline 6 % à 1 h, rinçage Rouge congo 0,3 % 10 mn, rinçage	Modification importante de la structure vertébrale. Gonflement du tissu osseux — lecture impossible. Pas d'anneaux visibles. Pas d'amélioration. Coloration uniforme.
Alizarine (Williams, 1941) Potasse 5 à 10 % 20 mn Alizarine + Potasse 2 % 6 h Potasse 2 % + glycérine 12 h Alizarine sulfonate de sodium Potasse 10 % 15 mn Alizarine sulfonique 2 % 6 h Potasse 2 % + glycérine 24 h	Premiers anneaux visibles, dénombrement incomplet. idem
Purpurine 1 % — 3 % 1 h, rinçage Eclaircissements au benzène, eau oxygénée ou toluène.	Pas de contraste — coloration uniforme.
Murexide 4 % 30 mn	Contraste faible.
Bleu alcian 8GS 5 % 1 à 2 h	Bon contraste — qualité et temps. Imprégnation très variable.
Nitrate d'argent (Von Kossa) 0,5 % à 10 % de 1 à 15 mn	Dénombrement des anneaux possible. Méthode longue et révélation délicate.
Révélation : lumière du jour + hydroquinone 0,5 % 1 mn Rinçage, U.V., thiosulfate de sodium 5 % 1 mn, rinçage, coloration de fond à la safranine 2 % ou thionine 3 %, ou bleu alcian 5 % ou bleu polychrome.	

TABLE 1. — Méthodes de préparation et de coloration des anneaux de croissance testées sur *R. naevus*, résultats et observations. Summary of the tested methods to prepare and to stain the growth rings in *Raja naevus*; results and comments.