# UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Faculté des Sciences de Brest

Diplôme d'Etudes Approfondies en

# Océanographie Biologique

Option "Gestion des Ecosystèmes Côtiers en terme de Ressources"

# ETUDE DE LA CROISSANCE DU JUVENILE DE SAUMON ATLANTIQUE (<u>Salmo salar</u>) PAR OTOLITHOMETRIE

Aspects méthodologiques et premiers résultats

par Hélène Larvor

Septembre 1992

réalisé aux

Laboratoire Poissons Direction des Ressources Vivantes Chef de laboraroire J. L. Gaignon IFREMER

CREMA L'Houmeau sous la direction de F. Lagardère Ce travail a été réalisé à l'Institut Francais de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), sous la direction de Monsieur J. L. GAIGNON, en collaboration étroite avec Madame F. LAGARDERE du CREMA à L'Houmeau. Je les remercie très sincèrement de m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire. Leurs conseils et leurs critiques avisés m'ont été d'un précieux secours pour la conduite de ce travail.

J'exprime aussi ma profonde reconnaissance à tout ceux qui, de près ou de loin, m'ont aidée tout au long de mon stage:

Messieurs L. QUEMENER et B. PETTON qui m'ont fait découvrir la station d'élevage et m'ont été d'une aide précieuse sur le terrain,

Monsieur G. BOEUF qui grace à sa parfaite connaissance du développement du saumon atlantique a su me guider pour la présentation de ce mémoire,

Messieurs H. TROADEC et A. OGOR qui m'ont accueilie au Laboratoire de Lecture d'Age et m'ont aidée à mener à bien le travail de préparation et de lecture des otoltithes,

Madame N. ROSSIGNOL pour ses conseils lors de la rédaction de ce rapport,

Monsieur Y. HARACHE qui a bien voulu m'accueillir en tant que stagiaire à la Station Pêche et Aquaculture de Brest.

Mes remerciements vont également à l'ensemble du personnel du laboratoire pour son soutien et ses encouragements pendant mon séjour à l'IFREMER, et à tous mes amis, pour leur sympathie et leur bonne humeur tout au long de ces huits mois de stage. Le saumon atlantique - Salmo salar - est actuellement l'une des espèces aquacoles les mieux connues et les plus exploitées de part le monde. Depuis une vingtaine d'années, de nombreuses études sur le développement de ce poisson ont permis de résoudre les différents problèmes liés à son l'élevage. L'amélioration des performances pour réduire les coûts nécessite cependant un constant approfondissement des connaissances.

\* \*

Le saumon atlantique présente une particularité de croissance non encore résolue. Dans une population dont la structure est normalement unimodale, on voit apparaître, environ au septième mois, deux sous populations de poissons différenciés par leur taille : une sous population regroupant les plus gros individus qui smoltifieront au bout de leur 15<sup>e</sup> mois (la smoltification est l'ensemble des processus se déroulant en eau douce qui permettent l'adaptation des saumons à l'eau de mer) et une sous population constituée des poissons de plus petite taille qui passent un an de plus en eau douce avant de migrer vers la mer. Par extension, on appelle "Mode Haut" la sous population dont le mode est le plus élevé et "Mode Bas" l'autre sous population. Ce phénomène se produit aussi bien en milieu naturel qu'en élevage où pourtant les conditions de développement sont optimisées.

L'apparition de ces deux modes est le résultat d'une variation de croissance individuelle à un moment donné et dans des conditions pour le moment non déterminées. Wright et coll. (1990) situent la divergence de croissance entre les deux modes au 100<sup>e</sup> jour après la première prise d'aliment et avancent l'hypothèse d'un changement physiologique endogène chez ces poisson qui font alors 55 mm environ. Pour Metcalfe et coll. (1986 ; 1988) la différence de taille serait le résultat d'une perte d'appétit et d'un arrêt de croissance aux mois de juillet et août chez les poissons intégrant le mode bas, alors que les poissons intégrant le mode haut maintiennent voire augmentent leur appétit et leur croissance.

Toute les études de ce processus ont été pendant longtemps réalisées sur des critères a posteriori (structure de la population) en fonction de la présence des deux modes et des paramètres liés (date, importance,...) et non à partir de la croissance individuelle. L'utilisation de marqueurs individuels est peu aisée à mettre en oeuvre sur un grand nombre de poissons de si petite taille (marquage externe limitant par rapport à la taille et au nombre des individus). De nouvelles méthodologies sont donc nécessaires pour chercher à résoudre ce problème et parmi celles-ci une semble intéressante : l'otolithométrie.

Les <u>otolithes</u> sont les 6 petites pièces calcifiées du système auditif du poisson. Ils sont groupés par 3 - un *lapillus*, une *sagitta* et un *astericus* -chacun logé dans un otosac contenu dans les capsules otiques, elles-mêmes situées de chaque côté de la tête. Des 3 piéces, les sagittae sont souvent les plus grandes, et pour cela les plus étudiées. Chez l'alevin de saumon, elles ont une forme subelliptique, compressée latéralement, légèrement concave face externe. Le grand axe est orienté de façon antéro-postérieure : à chacune de ses extrémités se dégagent un rostre et un post-rostre. Face interne, elles présentent une dépression où se fait "l'insertion" de l'épithélium sensoriel (macula) de ses terminaisons nerveuses : c'est le *sulcus acusticus* (fig 1).

Fig 1 : Face interne et face externe d'un otolithe type (Panella, 1980).



Chez les Téléostéens, les otolithes se constituent par des dépots alternés, en couches concentriques - les accroissements (ou microaccroissements), de carbonate de calcium sous forme d'aragonite et d'une protéine, l'otoline . Pour beaucoup d'espéces, ces couches sont déposées avec une périodicité journalière. Leur structure dépend étroitement des paramètres de croissance, qu'ils soient endogènes ou environnementaux. Ce mode de croissance particulier fait des otolithes des marqueurs fins de la croissance individuelle. Pour cette raison, l'étude de la croissance de l'otolithe est souvent associée à une étude de la croissance somatique, de façon à mettre en évidence les relations de corrélation pouvant exister entre ces deux types de croissance. Ceci a été fait chez de nombreuses espèces.

Kenneth et coll. (1982) démontrent chez le saumon nerka (Oncorhyncus nerka) qu'il existe une relation entre l'épaisseur moyenne d'un accroissement journalier dans les sagittae et l'évolution moyenne de poids par jour. Pour Volk et coll. (1984) il y a une relation directe entre la largeur moyenne des accroissements journaliers et le rythme de croissance des jeunes saumons keta (Oncorhyncus keta). Chez les larves et les juvéniles de plie (Pleuronectes platessa) Karakiri & von Vesternhagen (1989) étudient l'influence de la température, de la salinité et de la photopériode sur le dépot des accroissements sur les sagittae. Ils démontrent que la croissance de l'otolithe est reliée à la croissance somatique pour toutes les conditions expérimentales testées. Sogard (1991) constate chez la plie rouge (Pseudopleuronectes americanus) une correspondance significative entre le développement des otolithes et la croissance somatique en longueur et en poids et conclut que les largeurs d'accroissements sur le rayon rostral de la sagitta gauche sont des facteurs d'estimation fiable du taux de croissance antérieure.

D'autre auteurs, au contraire, signalent une divergence entre les deux types de croissance. Reznick et coll. (1989) démontrent que les guppys (*Poecilia reticulata*) à croissance lente présentent de plus gros otolithes que les guppys à croissance rapide de même taille. Il en est de même pour les juvéniles de Bar rayé (*Morone saxatilis*) (Secor & Dean, 1989), cependant, la corrélation entre la taille des otolithes et celle des poissons est très élevée au sein des mêmes groupes de croissance. Ces auteurs émettent l'hypothèse que la croissance des otolithes a pour origine deux processus interactifs. L'otolithe s'accroit chaque jour, indépendamment de la croissance somatique,grâce à la formation d'une couche calcifiée, mais au sein de chaque cycle journalier, le dépot qui détermine l'épaisseur de la couche formée est sans doute proportionnel à la croissance somatique journalière et au métabolisme général. Wright et coll. (1991) ont étudié les phénomènes de croissance chez le saumon atlantique. Ils montrent sur un cycle complet qu'il existe une divergence entre le taux de croissance somatique et le taux de croissance de la sagitta chez les parrs du mode bas alors que pour ceux du mode haut la corrélation existe. Ils situent cette divergence au niveau du 100<sup>e</sup> jour après l'émergence et sont alors les premiers à mettre en évidence la différenciation des deux modes de façon si précoce. Ces conclusions découlent de l'étude de la croissance globale de l'otolithe, rétrocalculée sur des individus de 211 jours (après la première prise d'aliment), et non pas de l'observation précise de la microstrusture fine.

Nous avons eu recours à différentes approches afin d'utiliser l'otolithométrie comme moyen d'étude plus analytique de l'apparition du bimodalisme en élevage - c'est à dire de déterminer dans quelle mesure les otolithes de saumon atlantique peuvent enregistrer les variations fines de croissance engendrant l'apparition ultérieure des deux modes dans la population. Pour cela, il faut pouvoir discriminer au niveau microstructural à partir de quel âge apparaît cette possible rupture de rythme de croissance. Cette approche nécessite une technique de marquage de l'otolithe fiable et précise (le moins d'étalement possible dans le temps) afin de pouvoir servir de référence temporelle à une étude fine de l'accroissement. Mais avant tout il a fallu établir un descriptif complet des otolithes pour cerner les problèmes de méthodologie. De plus l'existance d'"anomalies" de cristallisation, constatée en 1991 dans des otolithes de saumons issus d'élevage intensif et dans une proportion bien supérieure à celle citée habituellement dans la littérature (par exemple Morales-Nin (1985) enregistre la présence de 3% d'otolithes cristallins dans la population de *Genypterus capensis*), ont amené à suivre la genèse de leur apparition et à rechercher leur lien possible avec des différences de croissance.

Aussi les aspects suivants seront-ils développés dans ce qui suit :

\* <u>Aspects morphogénétiques</u> des otolithes de l'oeuf au septième mois. Ceci nous a permis de connaître l'évolution structurale des otolithes, de l'oeuf au septième mois et de mettre en évidence les différents paramètres que nous retiendrons pour l'étude de la croissance.

\* <u>Anomalies de cristallisation</u>. Elles se caractérisent ici par une différence d'aspect de la structure cristalline de la sagitta; alors que l'otolithe normal est à peine translucide et blanchâtre, l'otolithe anormal présente des zones très transparentes à la lumière ressemblant à du verre. Afin de déterminer leur moment d'apparition, de décrire les modifications morphologiques qu'elles engendrent et d'en étudier les proportions exactes, on se propose d'étudier ces anomalies sur un autre lot élevé de manière intensive. Comme l'apparition de ce phénomène pourrait être reliée au stress engendré par l'élevage, on comparera ce lot à un lot d'élevage traditionnel et à quelques individus sauvages.

\* <u>Marquage vital</u>. Les marqueurs les plus couramment utilisés sont les fluorochromes, dont les antibiotiques (la tétracycline par exemple). Leur incorporation dans les pièces calcifiées des poissons - notamment

les otolithes - est un phénomène connu depuis les années 60, et utilisé depuis chez de nombreuses espèces pour des marquages en masse (Tsukamoto 1985 - Nagiec et coll. 1988 - Nordeide et coll. 1992). Différentes méthodes permettent d'introduire l'antibiotique généralement utilisé dans l'organisme : l'injection, l'assimilation par l'aliment ou la balnéation (bain de durée déterminée dans des solutions de concentration définie).

Les deux premières méthodes sont couramment utilisées pour marquer juvéniles et adultes. L'injection permet de définir très précisement la dose optimale qu'il faut administrer au poisson pour obtenir de bonnes marques, mais elle se limite au poissons de bonne taille (Caillart & Morize, 1989 - Tsukamoto & Kajihara, 1987). L'assimilation par l'aliment (Odense & Logan, 1974 - Nordeide et coll., 1992) peut se faire sur des poissons de toute taille mais elle est moins précise : le contrôle du dosage du marqueur est difficile et le marquage reste irrégulier car l'incorporation de fluorochrome à la nourriture ainsi que la prise de nourriture est variable.

La balnéation dans le fluorochrome reste plus prometteuse même s'il est difficile là aussi d'évaluer la quantité de substance active effectivement absorbée par l'individu. Il est possible en effet, en utilisant des concentrations variées de déterminer les doses et les durées d'action optimales permettant un bon marquage des pièces squelettiques, dans des conditions biologiquement satisfaisantes pour les alevins. C'est une technique très simple à appliquer qui a l'avantage de permettre le marquage de petits individus - larves et alevins, ou même oeufs et embryons. Ruhlé & Grieder (1989) l'utilisent pour marquer des oeufs de Truite arc en ciel et de Truite fario à la fécondation : ils plongent les oeufs pendant une heure dans des bains de tétracycline dosés à 2g/l. Tsukamoto (1985) et Dabrowski & Tsukamoto (1986) marquent des oeufs embryonnés et des larves d'Ayu (*Plecoglossus altivelis*) et de Corégones (*Coregonus peled*) avec différentes doses de chlorhydrate de tétracycline. L'alizarine est également utilisée (Tsukamoto, 1988); ce fluorochrome donne de meilleurs résultats que la tétracycline mais son prix de revient est environ 50 fois plus élevé. En utilisant la balnéation, il est également possible de marquer des alevins à l'émergence ou plus tard, par exemple chez le Corégone (Dabrowski & Tsukamoto, 1986), l'Alose (Hendricks et coll., 1991), l'Anguille - civelles - (Umezawa & Tsukamoto, 1991) ou différentes espèces de Salmonidés (Tsukamoto et coll., 1989).

C'est la méthode que nous retiendrons dans cette étude, pour marquer les otolithe de Salmo salar juste après l'émergence et deux mois plus tard. On se propose de définir les doses optimales pour un bon marquage à ce stade, sans qu'il soit un facteur de stress pour les poissons, et de vérifier si les marques engendrées sont suffisamment précises pour servir de référence temporelle dans une étude fine de l'accroissement de l'otolithe.

\* <u>Analyse microstructurale et croissance fine de l'otolithe</u>. Parallèlement à la mise en place de ces techniques, nous essaierons de déterminer grace à des observations périodiques de l'otolithe, à partir de l'émergence, les structures pouvant signaler l'apparition de modifications de croissance. Sur les poissons les plus âgés, nous vérifierons si ces différences de structure peuvent être reliées à la différenciation des deux modes dans la population.

QUESTION POSEE	OBJECTIF	MATERIEL ANIMAL	TRAITEMENT	PREPARATION ET ANALYSE	
morphogénèse de croissance	. établir un descriptif de la morphogénèse des otolithes de saumon atlantique au niveau macro et microstructural	. 1 lot d'oeufs d'origine ADOUR <sup>(1)</sup> . 1 lot de 2.000 alevins d'origine SEMII.NW en élevage intensif	prélèvement séquentiel , du stade oeillé à l'alevin alimenté (émergence) , de l'émergence au 7ème mois	<ul> <li>prélèvement des otolithes</li> <li>polissage ou non</li> <li>observation au microscope</li> <li>photonique et au microscop</li> <li>électronique à balayage</li> </ul>	
anomalies de cristallisation	. description (macro et microstructure - composition chimique) et quantification (genèse - comparaison de différents lots) des anomalies de cristallisation chez le saumon atlantique	. 1 lot de 2.000 alevins d'origine SEMII.NW en élevage intensif <sup>(2)</sup> . 1 lot de 100 parrs <sup>(3)</sup> provenant de la pisciculture du Quinquis . 1 lot de 12 parrs <sup>(4)</sup> sauvages de la rivière Lapitchuri (Pays Basque)	. prélèvement séquentiel		
marquage vital	. établir une marque lisible et suffisamment fine sur les otolithes d'alevins de saumon atlantique, qui puisse servir de référence temporelle pour l'étude de l'accroissement de l'otolithe	. 1 lot de 2.000 alevins <sup>(5)</sup> d'origine SEMII.NW	. balnéation simple dans une solution de fluorochrome	. marquage des pièces calcifiées du poissons, en le baignant dans différentes solution de fluorochromes pendant différents laps de temps (1/2h à 24 h)	
bimodalisme . établir dans quelle mesure les otolithes de saumon atlantique peuvent enregistrer l'apparition ultérieure de deux modes dans la population		. 1 lot de 2.000 alevins <sup>(2)</sup> d'origine SEMII.NW en élevage intensif	. prélèvement séquentiel	<ul> <li>suivi de la croissance de l'otolithe, en corrélation avec celle du poisson</li> <li>étude fine des microstructures de l'otolithe</li> </ul>	

1

Tableau 1 : Shéma directeur de l'ensemble du travail réalisé pour l'étude de la croissance du juvénile de saumon atlantique par otolithométrie.

# 1 - MORPHOGENESE ET CROISSANCE DES OTOLITHES.

Les techniques d'étude sont différentes selon le stade de développement de l'individu (tableau 1). Les otolithes des embryons et des alevins en cours de résorption peuvent être observés in toto, du fait de leur petite taille et de leur bonne transparence à la lumière. Les otolithes des plus gros poissons exigent un traitement plus délicat et beaucoup plus long afin d'affiner les observations

Le développement de l'otolithe est suivi sur deux lots d'individus: un lot d'oeufs d'origine ADOUR et un lot d'alevins d'origine "SEMII-NW" (oeufs de souche norvégienne (NW) obtenu à la salmoniculture expérimentale marine INRA-IFREMER).

#### 1.1 Premier lot

#### Elevage et prélèvements

Le lot d'oeufs est issu de géniteurs sauvages (11 femelles et 4 mâles castillon 89) de souche ADOUR (1). L'incubation a lieu tout d'abord à la pisciculture du Conquet (IFREMER) dans des conditions de température ambiante. Les oeufs sont ensuite installés à la station IFREMER du Môle Sainte Anne, le 17 mars 1992, quelques jours avant le stade oeillé. Le développement est suivi jusqu'à la prenière prise d'aliment (le 24 avril 1992).L'incubation et la résorption se déroulent à 12°C (+/- 1°C) à l'obscurité.

Les prélèvements sont échelonnés pendant cette période de façon à cerner les grandes étapes du développement : stade oeillé, éclosion, émergence: tous les jours du 17 au 20 mars puis tous les 3 jours du 20 mars au 27 avril et tous les 7 jours du 27 avril au 11 mai. Les oeufs sont prélevés par 20 et conservés dans de l'éthanol à 95%. Après l'éclosion les alevins sont mesurés et conservés individuellement dans de l'alcool jusqu'à l'extraction des otolithes.

#### Extraction des otolithes et observation

Les oeufs sont disséqués sous une loupe binoculaire équipée d'un polariseur. On prélève la tête de l'embryon que l'on place sur lame dans une goutte d'eau. Les otolithes sont biréfringents, ce qui permet de les repérer dans la préparation en croisant polariseur et analyseur. On débarasse grossièrement le matériel organique qui entoure les pièces puis on place la préparation isolée sur une lamelle extrafine fixée sur une lame avec du papier adhésif. Les otolithes sont alors finement nettoyés, séchés et montés dans une goutte de Permount que l'on dépose sur la préparation. On essaie d'éliminer au maximum les bulles d'air emprisonnées dans la goutte de milieu de montage. Avant de l'observer, on laisse sécher la préparation pendant une journée à l'abri de la poussière.

Fig 2 : Représentation shématique de la sagitta chez un jeune parr à l'émergence (Tsukamoto et coll., 1989). Aaxe longitudinal, B- axe transverse, C- "check", N- nucleus.



Pour l'observation, on retourne la lamelle sur une lame métallique percée en son milieu d'un trou de 1.5 cm de diamètre et on l'y fixe à l'aide de ruban adhésif. Les observations se font au microscope en lumière transmise, avec ou sans huile à immersion suivant la taille des pièces observées. On relève la taille des otolithes (longueur, largeur), la structure du nucleus, le nombre d'accroissements visibles et on situe les accroissements plus marqués ("checks") (fig2 et planche 1).

4

## 1.2 Deuxième lot

#### Elevage et prélèvements

Le suivi de croissance des otolithes a été effectué sur un lot de 2000 alevins d'origine SEMII-NW (2), élevés avec des méthodes d'environnement contrôlé (température élevée : 14°C ; photopériode artificielle : 16H/8H) permettant d'accélérer la croissance et le développement, à la station IFREMER du Môle Sainte Anne.

11 prélèvements ont été effectués de l'émergence au septième mois, tous les 15 à 20 jours. Les poissons sont anesthésiés au phénoxy-éthanol (à une dose létale), mesurés (longueur standard), pesés et conservés individuellement dans de l'éthanol à 95% jusqu'à ce qu'à extraction des otolithes.

#### Extraction des otolithes

On sépare la tête du corps du poisson et on enlève la mâchoire inférieure et les branchies. On pratique une incision de la lèvre supérieure à l'arrière du crâne, selon le plan sagittal. L'extraction des otolithes se fait dans l'eau, sous une loupe binoculaire, après avoir débarassé la boite crânienne du tissus cérébral. On prélève les trois paires d'otolithes dans leur capsule otique et on les place sur lame, dans une goutte d'eau afin de les nettoyer. On mesure l'axe longitudinal et le plus grand axe transverse. Une fois séchés, les otolithes sont montés sur lame dans un ciment thermoplastique (Crystal Bond) ou conservés dans des gellules - pour les plus grosses pièces - en vue d'une observation ultérieure.

Suivant l'observation que l'on veut en faire, le traitement de l'otolithe diffère comme indiqué ci-après.

Traitement des pièces pour l'observation au microscope électronique à balayage

<u>Examen de la morphologie externe</u> : les otolithes parfaitement nettoyés et séchés sont montés sur stub (supports d'aluminium pour la microscopie électronique) - côté sulcus ou antisulcus - sur une goutte de colle à l'argent ou sur Scotch double face. On monte également des morceaux de sagittae fracturées pour observer les plans de cristallisation des pièces. Les préparations sont mises à sécher pendant 12 heures minimum à l'étuve à 50°C, puis métallisées à l'or.

Examen de la microstructure : les sagittae et les lapilli sont montés sur stub, face du sulcus vers le haut, dans une micro-goutte de ciment thermoplastique (Lake Side ou Crystal Bond). Ils sont ensuite polis mécaniquement ("polisseuse") jusqu'au nucleus dans une suspension de poudre abrasive (poudre de Carbure de Silicium 1200 - 1  $\mu$ m - ESCIL). Le niveau de polissage doit être constamment surveillé de façon à ne pas dépasser le plan sagittal de la pièce. Les préparations sont nettoyées à l'eau sous pression pour éliminer les grains d'abrasif. Une fois sèches, elles sont attaquées par différentes substances gravantes de façon à mettre à relief les accroissements en surface :

- \* HCl 0.2 M pendant 1 à 7 minutes
- \* Acide acétique à 5% pendant 2 à 5 minutes
- \* EDTA pendant 3 à 7 mintes
- \* EDTA-GA pendant 1 à 7 minutes.

Elles sont ensuite rincées à l'eau du robinet et à l'eau distillée sous pression et sechées à l'air comprimé puis placées à l'étuve à 50°C pour parfaire le séchage et métallisées à l'or après refroidissement.

#### Traitement des pièces pour l'observation au microscope photonique

Afin de permettre l'observation des microaccroissements, chaque sagitta est polie sur ses deux faces face externe et face interne -selon le plan sagittal. L'otolithe est inclus dans une microgoutte de ciment thermoplastique (Crystal Bond) face antisulcus vers le haut, puis poli délicatement avec une série de papiers abrasifs (10, 3, 1,  $1/4 \mu m$ ) afin d'applanir légèrement la surface en regard. Tous les polissage se font à la main, sous une loupe binoculaire au plus fort grossissement en faisant attention à ne pas exercer une pression sur la pièce pour éviter qu'elle ne casse. La sagitta est ensuite retournée, après réchauffement du ciment, et polie du côté du sulcus. Le polissage peut ici être plus prononcé car l'applanissement de la surface externe offre une plus grande stabilité à la pièce. On polit l'otolithe jusqu'à atteindre le plan passant par le nucleus et les marges (plan sagittal : Fig 3). Le dégrossissement de la surface peut être fait avec un papier abrasif à gros grain afin de diminuer le temps de préparation; on réduira ensuite la taille du grain du papier de façon à obtenir un polissage plus fin et éviter toute rayure sur de la surface à observer. Il est souvent difficile d'avoir dans le même plan de polissage à la fois le nucleus, les marges dorsale et ventrale et le rostre. Ceci tient au mode de croissance de l'otolithe : le rostre tend à plonger vers la face externe et la pièce prend une forme concave face antisulcus. Fig 3 : Représentation symbolique des plans de coupe ou de polissage (Panella, 1980).



Les pièces polies sont observées au microscope photonique en lumière transmise, d'abord à un faible grossissement de façon à faire les mesures des radii choisis, puis à plus fort grossissement pour lire et mesurer les microaccroissements.

On relève à chaque observation la structure du nucleus, la longueur de l'axe antérieur, mesuré depuis le primordium central le plus antérieur jusqu'au bout du rostre (Fig 4, A) ainsi que celle de l'axe postéro-dorsal, mesuré depuis le primordium central le plus postérieur jusqu'à la marge dans une direction située à 45° de l'axe antéro-postérieur (Fig 4, B).

Le décompte des microaccroissements ainsi que les mesures des distances interaccroissements se font dans la partie postéro-dorsale de la sagittae. Pour cela, on place directement sur la préparation une goutte d'huile à immersion, pour accentuer les contrastes. Les observations se font à fort grossissement, en contraste maximum avec un minimum de lumière.

Fig 4 : Représentation des différents axes de mesure sur la sagitta.(r : rostre - pr : post-rostre)



Dans le dernier prélèvement où les deux modes commencent à se distinguer (166 jours après l'émergence) ,les otolithes de 20 parrs ont été examinés -10 du mode haut et 10 du mode bas-. Les deux sagittae sont prélevées et polies puis observées au microscope. Un décompte et une mesure systématique des microaccroissements dans la zone postéro-dorsale ont pu être effectués sur 11 d'entre elles. Etant donnés le grossissement et la taille du réticule utilisé, les mesures ne peuvent être que des mesures moyennes sur quelques accroissements : le principe consiste à mesurer la longueur d'une section d'otolithe comprise entre deux accroissements bien lisibles et coincidant avec les divisions du réticule et à dénombrer les accroissements inclus dans cette zone. En divisant la longueur de la portion par le nombre d'accroissements, on obtient la largeur moyenne d'un accroissement dans la zone observée. Ces mesures peuvent être faites sur 1 à 20 accroissements.

En cumulant progressivement les mesures on peut obtenir une courbe de croissance (rétrocalculée d'après le nombre d'accroissements décomptés) de la zone postéro-dorsale de la sagittae après l'émergence, pour des poissons du mode haut et du mode bas.

## 2 - ETUDE DES ANOMALIES DE CRISTALLISATION DES OTOLITHES.

## 2.1 Matériel animal

Le lot suivi pour l'étude des anomalies de cristallisation en élevage intensif est le même que celui utilisé pour l'étude de la croissance fine de l'otolithe(cf 1.2 (2)).

Les poissons d'élevage traditionnel proviennent de la pisciculture du Quinquis située sur l'Elorn (3). L'élevage se fait en extérieur et les jeunes parrs sont soumis aux variations thermiques et photopériodiques naturelles; ils subissent très peu de facteurs de stress. On prélève un lot de 20 poissons du mode bas et deux lots de 25 poissons du mode haut, à un mois d'intervalle.

Les quelques individus sauvages étudiés -12- proviennent de la Lapitchuri (Saint Pee sur Nivelle) (4). Les individus des deux derniers lots ont tous plus d'un an  $(1^+)$ .

#### 2.2 Examen des otolithes

Sur les premiers poissons examinés, parmis le mode bas du Quinquis, les trois paires d'otolithes sont extraites. L'anomalie de cristallisation, du moins telle telle qu'elle a été discriminée par ses aspects morphologiques, ne touchant que les sagittae nous ne retiendrons que cette paire.

Lors d'une première observation à la loupe binoculaire, les otolithes sont mesurés et classés suivant un gradient d'anomalie avant d'être encapsulés :



0- "normal"

1- début d'anomalie

2- l'anomalie commence à gagner les marges dorsales et ventrales de la sagitta

3- l'anomalie atteint la partie antérieure de la sagitta et plus.

Afin de synthétiser les observations pour l'ensemble des deux sagittae, le classement est repris de façon suivante :

2-	-	*	•	•	•		-		2
3-	•					-			3
4- le	s deux	sagitt	ae sor	t de t	ype 1				
5- ui	ne des	sagitta	e est	de typ	e 1 et	l'autre	e de ty	pe 2	
6- le	s deux	sagitt	ae sor	t de ty	pe 2				
7- u	ne des	sagitta	e est	de typ	e 1 et	l'autre	e de ty	pe 3	
8-					2 .			3	
0.10	e deux	sanitt	ae sor	t de t	vne 3				

Une partie des sagittae anormales est examinée au microscope électronique à balayage. Les pièces sont montées in toto, côté sulcus et antisulcus pour un examen de la morphologie externe ou polies puis traitées avec une solution gravante pour l'observation de la microstructure des parties anormalement crystallisées (voir plus haut pour le traitement approprié). Quelques unes des pièces sont également polies pour un examen microstructural au microscope photonique.

### 3 - MARQUAGE VITAL

#### 3.1 Premier marquage

#### 3.1.1 Matériel animal

Les expériences sont réalisées sur des alevins d'origine "SEMII-NW" (5). Les oeufs sont installés à la station IFREMER du Môle Sainte Anne -début mars- juste avant l'éclosion. Toute la phase de résorption se

déroule à 12°C (+/-1°C), trois semaines plus tard les alevins en fin de résorption sont transférés en bassin dans une eau à 14°C (+/-1°c)pour leur première prise d'aliment.

Le marquage a lieu trois jours plus tard.

#### 3.1.2 Conditions de marquage

Deux types de marqueurs sont utilisés : le CHLORHYDRATE DE TETRACYCLINE  $(C_{22}H_{24}N_2O_8HCl - SYGMA$ - Fluorescence UV à 390 nm) en poudre et le FUROXONE (Furazolidone. Fluorescence UV à 400 nm). Le chlorhydrate de tétracycline (TC) a déjà été utilisé par de nombreux auteurs et se revèle être un bon marqueur. La furazolidone est ici testée pour vérifier une observation faite sur des individus prélevés en 1991. Ces poissons avaient en effet subi un traitement antibactérien classique au furoxome (bains à 20 mg/l pendant 30 minutes). Les otolithes observés in toto au microscope confocal présentaient une fluorescence (autofluorescence ou non?) sous éclairage laser vert.

#### Différentes conditions de marquage sont choisies :

\* pour le furoxone un traitement classique - bain à 20mg/l pendant 30 minutes - et un traitement plus fort - bain à 200mg/l pendant 4 heures.

\* les bains de TC sont dosés à 200mg/l et à 400mg/l. Du fait de la très grande baisse de pH engendrée par le fluorochrome (pH=2-3), les bains sont tamponnés avec un tampon phosphate (Hendricks 1991) : 256mg/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et 536mg/l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O pour 400mg/l de TC, et 128mg/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et 268mg/l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O pour 200mg/l de TC. Pour chacune des solutions, les poissons sont traités pendant 8, 16 ou 24 heures.

Les différents types de traitement seront comparés à un témoin vrai non manipulé.

Pour chacune de ces conditions on réalise deux réplicats.

#### 3.1.3 Protocole

Les poissons sont répartis dans 18 bassins jaugés à 9 litres : 150 alevins par bassin. Le circuit d'eau est coupé le temps du marquage. Chaque bassin contient 9 litres d'eau et est équipé d'un système de bullage d'air comprimé pour entretenir le renouvellement d'oxygène dans le milieu. La répartition des différentes conditions dans chacun des bassins est faite de façon alléatoire par tirage au sort. Les 16 solutions de fluorochromes sont préparées séparément : les différents marqueurs et solutions tampon sont dilués dans un litre d'eau d'élevage pour chaque bassin. Les préparations sont ensuite déversées dans les bassins qui leur ont été attribués. L'ensemble du marquage commence en fin d'après midi vers 17 H. Il se déroule en lumière très atténuée de façon à pouvoir effectuer une surveillance des bassins sans dénaturer le fluorochrome. A la fin de chaque période de marquage, on rétablit le circuit d'eau pour le bassin concerné. On vidange le bac des 3/4 de son volume pour évacuer le maximum de solution marquante. On répète cette opération deux fois de suite, puis une heure plus tard, pour évacuer les traces de marqueur pouvant subsister dans le milieu. On laisse ensuite le bassin se<sup>°</sup> remplir à son niveau normal (40 l). Pendant toute la durée du marquage (1 jour), les poissons ne sont pas nourris. L'élevage se poursuit ensuite à 12°C (+/- 1°C) pendant un mois en lumière très atténuée en photopériode 12/12.

#### 3.1.4 Prélèvements

On effectue cinq séries de prélèvements : un prélèvement initial de 25 poissons juste avant le marquage, puis quatre prélèvements de 12 individus par bassin - au bout de 3, 7, 14 et 28 jours après le marquage. Chacun des alevins prélevé est pesé (poids frais) puis conservé individuellement dans de l'alcool à 95%, à l'abris de la lumière.

\* Après cette première expérience, les parts sont regroupés en deux lots : un premier lot comprenant les témoins et les alevins marqués à la tétracycline (400mg/l) pendant 8 et 24 heures, et un deuxième lot regroupant le reste des alevins.

#### 3.2 Deuxième marquage

Compte tenu des premiers résultats, on réalise une autre expérience le premier juin pour tester la validité du marquage sur des poissons plus gros (poids moyen=1.210g -age : 65 jours après l'émergence). De plus, cela nous permettra de confirmer ou non la notion d'accroissement journalier. Parmi le lot à remarquer, certains individus ont déjà été marqués une première fois. Dans la mesure où le second marquage peut donner des résultats, on pourra dénombrer les microaccroissements intermarque et vérifier si leur nombre coincide avec le nombre de jours écoulés depuis le premier traitement. Pour cela, on marque à nouveau le premier lot : on ne retient qu'une seule des conditions initiales : bain de 24 heures à 12°C dans une solution de tétracycline dosée à 400mg/l. l' exérimentation est la même mais on a réduit le nombre de poissons à 100 individus par bassin et augmenté le volume d'eau à 20 l, compte tenu de la taille des jeunes parrs. Au bout de 24 heures, on rince et on transfère les alevins dans leur bassin d'origine. On effectue un seul prélèvement 15 jours plus tard. Les poissons sont pesés puis conservés dans de l'alcool à 95% à l'abris de la lumière.

#### 3.3 Traitement des otolithes

On prélève un lapillus et une sagitta côté droit ou gauche, indifféremment, et on les nettoie sous une loupe binoculaire. Quelques pièces sont montées in toto dans différents milieux pour l'observation au microscope à épifluorescence : Permount, Euparal, Eukitt, eau, glycérine ou Cristal Bond, ceci afin de déterminer le produit donnant le meilleur résultat. les préparations sont examinées au microscope à épifluorescence équipé d'une combinaison de filtres D (pour l'excitation dans l' ultra violet et le violet -355nm à 425nm- avec un filtre d'arrêt à 460nm - WILD LEITZ).

Les autres piéces sont montées dans le Cristal Bond. Elles sont examinées et classées suivant la qualité de la marque fluorescente qu'elles présentent : (0 : pas de marque, 1 : marque très faible, 2 : marque faible, 3 : assez bonne marque, 4 : bonne marque, 5 : très bonne marque).

En fonction du résultat, elles sont polies et examinées plus finement de façon à mettre en évidence les microstructures correspondant à la marque fluorescente et à dénombrer les accroissements post-marque. La position de la marque est déterminée sous UV, puis on surimpose une lumiére blanche en transmission : en déplaçant progressivement le cache obturant le système d'éclairage en transmission, on peut repérer exactement les microaccroissements correspondant à la marque fluorescente.

Parmi les poissons marqués à 60 jours, certains ont déjà été marqués une première fois (TC 400mg/l pendant 8 ou 24 H). En situant finement les deux marques fluorescentes on peut dénombrer le nombre de microaccroissements intermarques.

Entre chacune des manipulations, les préparations et les poissons sont conservés à l'abris de la lumière.

### 4 - TRAITEMENT STATISTIQUE

La périodicité de l'accroissement sur la période allant du dépot du premier accroissement au 14<sup>e</sup> jour après l'émergence a été déterminée par une régression linéaire du nombre d'acroissements décomptés au nombre de jours depuis l'installation au Môle Ste Anne. Un test sur la pente de la droite de régression a permis de la comparer à 1.

La corrélation entre les anomalies de cristallisation (distribution non paramétrique) et le poids des individus a été étudiée à l'aide d'un test de corrélation de rang de Spearman (in Applied Statistics, p 396).

Les résultats du marquage ont été classés et comparés entre eux à l'aide d'un test H de Kruskal & Wallis (in Applied Statistics, p 303).

Les différences de croissance au bout de 28 jours d'élevage après le marquage ont été-testées par une ANOVA à deux facteurs hiérarchisés : traitements et bassins (réplicats).

La croissance en longueur de la sagtta a été étudiée en fonction du poids (ou de la longueur standard) et de l'âge du poisson, sur l'ensemble des prélèvements, grace à une double régression : L = f(poids, âge) ou L = f'(LS, âge)

La croissance de la zone postéro-dorsale des sagittae des poissons de 166 jours (mode haut et mode bas) a été déterminée par des régressions simples de la taille du radius au nombre d'accroissements décomptés depuis l'émergence. Nous avons ensuite comparé la croissance des sagittae des poissons prélevés dans les deux modes, de l'émergence au 55<sup>e</sup> jour, en testant les pentes des deux droites de régression (obtenues avant le 55<sup>e</sup> jour) l'une par rapport à l'autre.

## RESULTATS

#### 1 - MORPHOGENESE DE L'OTOLITHE

## 1.1 Développement de l'otolithe chez l'embryon et l'alevin en cours de résorption

Jusqu'à 270°C. Jour les primordia constituant le futur nucleus ne sont pas soudés. On peut observer sur certains d'entre eux le dépot de 3 ou 4 accroissements. Ils sont cependant regroupés en deux amas dans la capsule otique - amas qui constitueront sans doute les futurs sagitta et lapillus. Les asteriscus ne se développent que beaucoup plus tard, après l'émergence.

La soudure des primordia commence à 270°C. Jour et se poursuit sur plusieurs jours, leur nombre varie beaucoup d'un embryon à un autre - de 1 à 12 -, les derniers ne se soudent parfois qu'après l'éclosion. Cette date (270°. J) correspond au dépot d'un premier accroissement continu englobant tous les primordia déjà soudés et formant un large anneau plus sombre délimitant une zone centrale elle aussi plus sombre. Ce premier accroissement se remarque aussi sur les primordia non encore soudés. Il s'observe encore plus nettement sur les otolithes d'individus plus âgés (Pl 1A). A ce stade les yeux de l'embryon apparaissent très nettement noirs à travers la coque de l'oeuf. L'embryon commence à bouger. Le stade oeillé, tel qu'on l'entend chez les Salmonidés s'observe 4 jours avant, à 220°C. Jour : les yeux commencent juste à se distinguer à travers la coque de l'oeuf. Le deuxième accroissement continu observé sur des individus plus âgés, à différentes dates, est lui aussi plus sombre

L'éclosion a lieu le 6 avril, à 420°C. Jour, soit 14 jours après le début de la fusion du nucleus. Sur les otolithes - sagitta ou lapillus - des alevins juste éclos on peut dénombrer 12 ou 13 acroissements nets, bien contrastés, depuis la marque centrale plus foncée du centre, jusqu'au bord de l'otolithe (Pl 1A). Ceci correspond au nombre de jours séparant la date de dépôt des 2 accroissements centraux plus sombres de la date de l'éclosion, ce qui valide l' hypothèse de l'accroissement journalier pendant cette période. La sagitta mesure 121.8 $\mu$ m (+/-11 $\mu$ m) de large et 162.2 $\mu$ m (+/- 19.2 $\mu$ m) de long en moyenne à cette date.

Sur les otolithes des individus prélevés après l'éclosion, on observe 1 ou 2 marques plus sombres correspondant en moyenne au 12<sup>e</sup> et 13<sup>e</sup> accroissements déposés après la fusion des primordia (Pl 1B). Ces accroissements constituent les accroissements déposés à l'éclosion. La marque d'éclosion peut se situer sur 1 ou 2 accroissements, du 12<sup>e</sup> au 14<sup>e</sup>. Les variations individuelles rencontrées sont dues au fait que l'éclosion s'étale sur 3 jours sur l'ensemble de la population.

Les otolithes des alevins prélevés à l'émergence présentent 20 à 21 accroissements depuis la marque de l'éclosion, ce qui correspond au nombre de jours séparant ces deux étapes du développement. Les sagittae font alors  $255.4\mu m$  (+/-  $11.2\mu m$ ) de large et  $369.2\mu m$  (+/-  $19.6\mu m$ ) de long. Sur les sagittae d'individus prélevés après l'émergence, on observe après polissage, une marque sombre correspondant en moyenne au  $21^e$ accroissement décompté après la marque d'éclosion. C'est l'accroissement déposé à l'émergence - c'est à dire, en élevage, au moment où l'on place les poissons en bassin, à  $14^{\circ}$ C, en photopériode 16/8, pour leur donner leur première ration d'aliment (Pl 1C).

La régression du nombre d'accroissements déposés au nombre de jours depuis l'installation des oeufs au Môle Ste Anne confirme le dépôt d'accroissements journaliers, depuis le premier accroissement continu formé :

$$y = 0.984343 x - 7.00240$$

$$R^2 = 0.996505$$
  $P < 0.00001$   $n = 115$ 

Un test sur la pente permet de l'assimiler à 1 avec un intervalle de confiance de 0.05 ( fig 7).

10

# PLANCHE 1

....

Fig A, B et C : Observations au microscope photonique

A : Sagitta à l'éclosion

B : Sagitta 8 jours après l'éclosion

C : Zone postéro- dorsale d'une sagitta polie, chez un alevin de 71 jours (après l'émergence)

3

(• : premier accroissement déposé; → : "check" de l'éclosion; \_ : "check" de l'émergence

Fig D, E et F : Sagitta 30 jours après l'émergence (observations au microscope électronique)

D : Face interne

E : Détail de la zone antérieure du sulcus

F : Détail de la région du rostre face externe

(S: sulcus; E: excisure; P: pore)

Fig G : Lapillus (56 jours après l'émergence) traité à l'EDTA pendant 5 min pour l'observation des accroissements.



Fig 7 : Régression du nombre d'accroissements décomptés au nombre de jours depuis l'installation des oeufs à la station IFREMER du Môle Ste Anne.



#### 1.2 Evolution de l'otolithe après l'émergence

#### 1.2.1 Morphologie

A l'émergence la sagitta a une forme ovoïde, aplatie sur son bord ventral, le sulcus commence à se creuser face interne. Le rostre et le post-rostre ne se dégagent pas encore. La pièce est suffisamment fine pour être observée in toto, montée dans du Permount. Les accroissements sont bien visibles. Le lapillus a une forme circulaire, bombée sur ces deux faces. La cristallisation semble se faire de façon radiale à partir du centre des pièces. L'asteriscus n'est pas encore formé.

Sur les sagittae plus âgées, le rostre et le post-rostre se dégagent progressivement et semblent dévier vers la face externe, engendrant une légère convexité face du sulcus. La zone ventrale reste plus ou moins rectiligne et irrégulière en surface. Le bord dorsal est plus large et plus régulier, arrondi jusqu'à l'arrière de l'otolithe. La zone de l'excisure présente un fond plat, bordé de deux rangées de petits "pores" (pl 1D E).

#### 1.2.2 Microstructure

Après polissage, il apparaît que seule la zone postero-dorsale présente des accroissements bien distincts. La zone ventrale est absolument illisible, le rostre de même. L'orientation des plans de cristallisation semble être responsable de ce résultat : dans le rostre les aiguilles d'aragonite sont disposées en oblique par rapport au plan de polissage, elles semblent plonger vers la face externe de la pièce, surtout chez les stades les plus jeunes. Dans la partie ventrale, elles ne semblent pas avoir d'orientation régulière. A partir du 5<sup>e</sup> mois, les accroissements deviennent visibles sur le bord du rostre, du côté excisure, mais toute la zone plus interne reste floue. Nous avons donc été contraints à dénombrer les accroissements dans la zone postéro-dorsale de l'otolithe.

La zone centrale délimitée par la marque de l'émergence est souvant trop sombre pour permettre le dénombrement des accroissements. Seuls le nucleus et les marques les plus nettes peuvent être mis en évidence. C'est pourquoi on choisira de ne dénombrer les accroissements qu'après l'émergence.

Les lapilli présentent eux aussi des microaccroissements mais ils sont beaucoup plus fins que sur la sagittae. Ils sont souvent plus difficiles à compter et les variations individuelles de morphologie ne facilitent pas le choix d'un radius fixe pour l'étude de la croissance.

Les différents traitements utilisés après polissage pour l'observation de la microstructure au microscope électronique à balayage, ne donnent aucun résultat sur les sagittae. L'EDTA, l'EDTA-GA et l'acide acétique mettent en relief les aiguilles d'aragonite affleurant en surface, mais ne font pas apparaître les microaccroissements. Seuls le nucleus et les accroissements centraux les plus marqués peuvent apparaître après la gravure. L'acide chlorhydrique attaque la surface de façon plus émoussée, sans mettre en relief les aiguilles d'aragonite. Mais là encore aucun microaccroissement n'apparaît sur les sagittae. Sur tout le lot traité une seule des sagittae, anormale, (prélevée 86 jours après l'émergence), traitée à l'EDTA 0.2M pendant 7 minutes, présente une zone correctement gravée : la zone postéro dorsale anormale (Pl 2J). Curieusement, les lapilli traités à l'EDTA de la même façon que les sagittae présentent une assez bonne gravure (Pl 1G : lapillus traité à l'EDTA pendant 5 minutes).

#### 2 - ANOMALIES DE CRISTALLISATION

## 2.1 Manifestation de l'anomalie

#### 2.1.1 Macrostructure

Lorsqu'on observe l'otolithe en lumière transmise, à la loupe binoculaire ou au microscope, l'anomalie se caractérise par une différence de transparence à la lumière : les zones "normales" sont translucides et ont un éclat un peu laiteux alors que les zones présentant des anomalies de cristallisation sont transparentes comme du verre (Pl 2A I).

Ce phénomène ne touche que les sagittae et indifféremment la droite, la gauche ou les deux. Il entraine une modification de la forme générale de l'otolithe. Les zones anormales sont plus plates et plus étalées ce qui donne à la pièce une forme plus large et plus longue, avec un épatement du rostre par élargissement de l'excisure.Quand l'anomalie englobe tout l'otolithe, la partie "normale" fait saillie sur la face externe comme si l'accumulation de carbonate de calcium ne se faisait que sur les marges et non pas sur la surface entière. Sur la face interne, le sulcus est conservé dans ses caractéristiques générales.

L'observation au microscope électronique à balayage, nous permet d'obtenir une image fine de la surface des pièces (Pl 2D E F G H). Les otolithes "normaux" présentent une surface relativement lisse avec seulement quelques aiguilles d'aragonite affleurantes (Pl 2B). Les pièces anormales ont une surface beaucoup plus "boursoufflée", "moutonnante". Sur la face externe d'une sagitta complètement anormale (Pl 2D G H) on observe au centre les aiguilles d'aragonite qui ressortent très nettement en surface et autour toute une zone irrégulière aux formes beaucoup plus émoussées, arrondies. Le type de croissance paraît vraiment anarchique. Par endroits (bord postéro-dorsal externe) elle semble être lamellaire avec affleurement des lamelles en surface (Pl H). L'excisure, plus large, a un aspect bosselé, en coussins agglomérés (un peu comme des "pillow lava"). On y observe les mêmes structures que sur la face externe : glomérules à croissance lamellaire, orientés de façon anarchique et soudés les uns aux autres (Pl 2E F). Le sulcus semble conservé, bien qu'un peu plus large (Pl 2C).

#### 2.1.2 Microstructure

Des microaccroissements existent aussi dans les zones anormalement cristallisées, mais ils ne se déposent pas de façon régulière comme sur une sagitta normale. Ils forment des "vagues", des moutonnements, avec des discontinuités (Pl 2I J). La lecture d'âge n'est plus possible. Il semblerait que ce phénomène résulte d'une cristallisation sur des centres d'accrétion secondaires, ce qui donne un aspect de croissance en évantails. Par contre les microaccroissements sont beaucoup plus contrastés que dans la partie normale de l'otolithe. Peut-être est-ce dû à la plus grande transparence de la pièce à cet endroit. Les parties normales et anormales de la pièce sont séparées par une grosse discontinuité qui empêche toute lecture : même si les accroissements sont visibles dans la zone anormale, on ne parvient pas à les faire coincider avec ceux de la zone aragonitique.

Après gravure à L'EDTA d'un otolithe poli suivant le plan sagittal, on peut observer des microstries dans la zone anormale, alors qu'elles sont invisibles dans la zone aragonitique. Les deux formes de cristallisation sont donc différemment sensibles à l'attaque acide.

#### 2.2 - Genèse des anomalies

L'anomalie apparaît généralement dans la zone postérieure de l'otolithe. Elle s'étend peu à peu vers les marges dorsale et ventrale au fur et à mesure de l'accroissement de la pièce. Sur les sagittae très atteintes elle englobe toutes les marges, isolant un noyau "normal" au centre. Elle ne se manifeste pas de façon continue sur toute la pièce, par un changement d'aspect de tout un accroissement. Elle est très localisée au départ, puis progresse vers l'avant de l'otolithe, créant de fortes discontinuités entre la zone centrale normale et la partie anormale. Le dépot "des deux types de cristaux" se fait de façon simultanée dans les différentes parties de l'otolithe. Une fois en place, elle persiste et ne semble pas subir de remaniement. Sur aucune des sagittae observées on ne constate de rétro-évolution : l'anomalie tend à gagner irrémédiablement toute la pièce.

#### 2.2.1 Evolution au cours du temps en élevage intensif

En élevage intensif, l'anomalie apparaît dès l'émergence (fig 8). Elle semble évoluer très rapidement : à partir du 42<sup>e</sup> jour (après l'émergence), elle tend à enserrer tout l'otolithe. Elle peut apparemment se manifester tout au long de la première année de l'animal : dans tous les prélèvements examinés, on retrouve des sagittae présentant seulement un début d'anomalie. Il n'existe donc pas de date "top" déclanchant l'apparition d'une seconde forme de cristallisation.

La fréquence totale des anomalies (anomalie globale pour les deux sagittae) évolue rapidement vers un plateau équivalent à 45% d'individus présentant un otolithe anormal : dès 50 jours après l'émergence ce palier est

# PLANCHE 2

Fig A, B, C et D : Comparaison des sagittae normalement et anormalement cristallisées

A : sagittae face externe, droite normale et gauche anormale (observation à La loupe binoculaire en épiréflexion)

....

B : sagittae normale face du sulcus (S : sulcus)

C: " anormale " " "

D: " " anti-sulcus

Fig E, F, G et H : Détails de la surface des sagittae anormales

E et F : zone de l'excisure

G et H : détails de la face externe de la sagittae D

Fig I et J : Microstructure de la région postérieure de sagittae anormalement cristallisées (normale à gauche, anormale à droite)

I : observée au microscope photonique

J : observée au microscope électronique















atteint (fig 8). En élevage de type très intensif, l'anomalie ne semble pas toucher la sagitta gauche plus que la droite (fig 9 et 10).



Une étude de la corrélation (coefficient de corrélation de rang de Spearman) à chaque prélèvement, entre le poids du poisson et le degré d'anomalie de cristallisation des sagittae - droite, gauche ou les deux - nous amène à conclure qu'il n'existe en général pas de relation entre ces deux variables (tableau 2).

Anomali	e	D-E+. 28	E+ 42	E+ 56	E+ 71	E+ 85	E+106-	E+126	E+141
Droit	Cc	-0.0364	0.0419	0.0616	-0.1181	0.1771	0.4425	-0.0305	-0.1394
	Ct	0.8738	0.8552	0.7939	0.5248	0.3576	0.0478	0.8717	0.5541
	Résultat	NS	NS	NS	NS	NS	S	NS	NS
Gauche	Cc	-0.1847	0.4183	-0.1963	0.2304	0.1772	0.3571	-0.1090	-0.0471
	Ct	0.4207	0.0683	0.4050	0.2146	0.3572	0.1103	0.5640	0.8415
	Résultat	NS	S	NS	S	NS	S	NS	NS
D et G	Cc	-0.0726	0.2674	-0.1548	0.0915	0.1960	0.4915	-0.0304	-0.1808
	Ct	0.7516	0.2437	0.5112	0.6222	0.3086	0.0280	0.8721	0.4429
	Résultat	NS	S	NS	NS	NS	S	NS	NS

Tableau 2 : Corrélation entre les anomalies de cristallisation et le poids du poisson (coefficient de corrélation de rang de Spearman). Les tests ont été réalisés pour les sagittae droite et gauche independamment, puis sur l'ensemble des deux otolithes (C c : coefficient calculé, C t : coefficient de la table)

#### 2.2.2 Comparaison avec les autres lots

Les individus du Quinquis et les individus sauvages présentent les mêmes anomalies que les individus issus de l'élevage intensif. Les caractères macro et microstructuraux sont identiques. A partir du 50e jour après l'émergence, la fréquence totale des anomalies en élevage intensif est comparable à celles observées sur les lots d'élevage traditionnel du Quinquis et sur le lot de poissons sauvages (tableau 3) : 45% pour le lot en 0<sup>+</sup>, 42.1, 60, et 56.5% pour les lots du Quinquis, 41.6% pour le lot sauvage.

Anomalie	Emergence	E+ 28	E+ 42	E+ 56	E+ 71	E+ 85	E+106	E+126	E+141	E+166
Droit	5	10	10	25	26.7	16.7	9.5	24.2	10.5	25
Gauche	0	15	20	10	13.3	6.6	14.3	10.3	26.4	10
D.et G.	0	0	10	10	3.3	16.7	14.3	10.3	10.5	10
Total	5	25	40	45	43.3	40	38.1	44.8	47.4	45

Anomalie	Q 1	Q 2	Q 3	Sauvage	
Droit	31.6	25	39.1	25	
Gauche	0	10	8.7	8.3	
D.et G.	10.5	25	8.7	8.3	
Total	42.1	60	56.5	41.5	

Tableau 3 :Fréquences cumulées des anomalies de cristallisation pour chacun des prélèvements de poissons issus d'un élevage traditionnel (Q), et pour les poissons sauvages (anomalie touchant seulement la sagitta droite : D, la sagitta gauche : G, ou les deux sagittae : D. et G.).

Sur les lots du Quinquis, l'anomalie touche nettement plus la sagittae gauche que la droite (fig 11).



Fig 11 : Représentation des différents types d'anomalies de cristallisation pour la sagitta gauche et la sagitta droite, chez les poissons prélevés au Quinquis (Q1 : mode bas ; Q2 et Q3 : mode haut) et chez les poissons sauvages.

#### 3 - MARQUAGE AUX FLUOROCHROMES

#### PREMIER MARQUAGE

#### 3.1 Qualité du marquage

Les premières observations ont été faites dans différents milieux de montage. On constate alors que ces milieux influent beaucoup sur le résultat : le Permount et l'Euparal présentent une très forte autofluorescence verte qui masque tous les phénomènes de fluorescence de la pièces marquée, le Crystal Bond, l'eau et la glycérine donnent de bons résultats, sans autofluorescence, mais l'eau et la glycérine ne permettent ni la conservation ni le polissage des préparations.

Seuls les marquages à la tétracycline donnent des résultats visibles (PI 3G). Les individus traités à la furazolidone ne présentent aucune marque dans les conditions d'observation choisies. Les meilleurs résultats sont obtenus après les bains de 24 heures dosés à 400mg/l de chlorhydrate de tétracycline (tableau 4).

# PLANCHE 3

Fig A, B, et C : Lapilli 28 jours après le marquage

A : non marqué (observation sous UV en érifluorescence)

B et C : marqué à la tétracycline (400mg/l pendant 24H)

B : observation sous UV en épifluorescence

C : observation en lumiére blanche en transmission

Fig D, E et f : Mêmes observations sur les sagittae

Fig G : Poudre de tétracycline observée sous UV en épifluorescence

Fig G et H : Détails de la marque fluorescente, respectivement sur un lapillus et sur une sagitta

# PLANCHE 3



In toto, on observe un anneau jaune fluorescent à l'intérieur de l'otolithe (Pl 3). La marque est plus ou moins nette selon les régions de la pièce : elle est parfois partiellement masquée par des phénomènes d'autofluorescence bleutée sur le bord ou dans les zones discontinues (amorces de fractures, irrégularités de surface). Elle ne se distingue nettement du bord de l'otolithe qu'au bout de 15 jours et elle est encore plus distincte à 1 mois. Dans les pièces anormalement cristallisées, on la distingue à peine : elle est beaucoup plus diffuse et plus claire.

Après polissage, la fluorescence apparaît bien plus nettement, surtout dans la zone postéro-dorsale (Pl 4). La marque se limite à 2 accroissements bien distincts, légèrement plus foncés, situés à 3 accroissements de l'anneau d'émergence, ce qui correspond au nombre de jours séparant les 2 dates. le dépot est donc quasi instantanné. Les phénomènes d'autofluorescence sont très atténués, ils se limitent au bord de la pièce et à la zone nucléaire. Sur certaines préparations, on distingue très bien le nucleus et l'anneau d'éclosion (Pl 4).

Les alevins traités à des doses de 400mg/l de TC pendant 16H et à 200mg/l pendant 24H présentent euxaussi des marques jaunes sur leurs otolithes, lors de l'observation in toto, mais elles sont plus claires. Pour les autres traitements on ne peut pas distinguer de marque dans l'épaisseur de l'otolithe. Seul le polissage, dans certains cas (400mg/l pendant 8H), peut les faire apparaître

La qualité de la marque in toto dépend aussi de l'otolithe. Les lapilli apparaissent mieux marqués que les sagittae (tableau 5) pour un même traitement. Les meilleurs résultats sont obtenus sur les lapilli traités à 400mg/l pendant 24H (tableau 6). Pour les autres traitements ce sont encore les lapilli qui sont le mieux marqués, et la marque est bonne :

75% d'assez bonnes marques pour les bains à 200mg/l pendant 24h,

58.33% de bonnes marques et 33.34% d'assez bonnes marques pour les bains à 400mg/l pendant 16H.

Tableau 4 : Comparaison de la qualité du marquage en fonction des différents types de traitements (Test H de Kruskal & Wallis).

Traitement	Rang boyen	Homogénéité		
200mg/1 24H	9.50	*		
400mg/1 16H	15.83	*		
400mg/1 24h	32.25			

Tableau 5 : Résultats du marquage (en %)des sagittae et des lapilli pour les différents traitements à la tétracycline.

Qualité	2ccmg/1	24H	400mg/1	16H	400mg/1 24H		
	sagitta	lapillus	sagitta	lapillus	sagitta	lapillus	
0	83.33	0	8.33	0	0,	0	
1	16.67	0	8.33	0	0	0	
2	1 0	16.67	33.34	8.33	0	0	
3	1 0	75	50	33.34	6.25	0	
4	1 0	8.33	0	58.33	87.5	6.25	
5	1 о	0	0	0	6.25	93.75	

Tableau 6 : Comparaison de la qualité du marquage en fonction de l'otolithe et du type de traitement (Test H de Kruskal & Wallis).

Traiteme:	nt	Otolithe	Rang moyen	Ho	nog	éné	ité
200mg/1 2	24H	Sagitta	7.33	*			
400mg/1 1	16H	Sagitta	23.75	*	ş		
200mg/1 2	24H	Lapillus	30.37	*	S		
400mg/1 1	16H	Lapillus	43.00		s	+	
400mg/1 2	24H	Sagitta	52.87			+	\$
400mg/1 2	24H	Lapillus	71.28				£

Tableau 7 : Croissance après le marquage. Comparaison des différents lots traités aux lots témoins, (ANOVA à deux facteurs hiérarchisés).

	Dispersion	dl	Variance	FC	Ft	Résultat
Traitement	4151.698	3	1383.9	1.83828	6.59	NS
Bassin	3011.292	4	752.823	0.53434	2.48	NS
Residu	123981.8	88	1408.88			

# PLANCHE 4

Fig A et B : Région postéro-dorsale d'une sagitta (28 jours après le premier marquage) polie et observée en épifluorescence (A) et en lumière transmise (B)

Fig C, D, E et F : Région postéro-dorsale de sagittae (15 jours après le second marquage) polies et observées en épifluorescence (C et E) et en lumière transmise (D et F). La première sagitta (C et D) présente deux marques : la plus interne résultant du premier marquage et la plus externe du second. La deuxième (E et F) ne présente qu'une seule marque résultant du second marquage.

÷."'



20







PLANCHE 4

## 3.2 Influence du traitement sur la mortalité et sur la croissance de l'alevin marqué

Les différents traitements efficaces n'ont pas d'influence sur la mortalité après le marquage. La mortalité totale sur 28 jours varie entre 0.67% et 1.33% pour les lots traités (0.67% pour les témoins). Il semble qu'elle soit due surtout aux manipulations lors des prélèvements (blessures des alevins lors du nettoyage des bassins ou des prélèvements à l'épuisette).

La comparaison des différents lots traités et des lots témoins au bout de 28 jours d'élevage révèle qu'il n'existe pas de différence de poids significative entre ces différents lots (Tableau 7).

## DEUXIEME MARQUAGE

Pour le deuxième marquage où l'on n'a retenu que les conditions optimales du premier traitement (400mg/l de TC pendant 24H) les résultats obtenus sont bons (95.65% de marques de type 4). Après polissage, la marque apparaît toute aussi nette que celle du premier marquage (Pl 4). Sur une partie des préparations on retrouve l'anneau jaune du premier traitement : la marque se conserve donc bien pendant toute la durée de l'élevage. Les accroissements inclus entre ces deux anneaux fluorescents pendant cette période ont pu être dénombrés : on compte en moyenne 60 à 61 (60.38) accroissements du bord externe de la première marque au bord interne de la deuxième alors que 61 jours séparent les deux traitements.

## 4 - CROISSANCE FINE ET BIMODALISME

#### 4.1 Périodicité des accroissements

Les résultats du marquage nous permettent de valider pour cette période, l'hypothèse du dépôt journalier des accroissements chez les jeunes parts étudiés ici, complétant par là les données déjà acquises de l'éclosion à l'émergence (cf 1.2). Ceci vient confirmer les résultats obtenus par Wright et coll. (1991) sur du saumon atlantique d'Ecosse. Ce résultat est important car il permet de faire du rétrocalcul à différentes dates.

#### 4.2 Relation entre croissance somatique et croissance de l'otolithe

Une première étude a été faite sur la croissance en longueur de la sagittae. Sur l'ensemble des prélèvements, une régression multiple de la longueur de la sagittae par rapport à l'âge et au poids ou à la taille de l'individu démontre que l'otolithe a une croissance positivement corrélée à l'un et à l'autre de ces paramètres :

pour les deux sagittae :

\* 
$$L = 0.034426 \text{ poids} + 6.887379 \, \hat{a}ge + 463.142421$$

- $R^2 = 0.9553$  n = 372
- L = 9.938484 L standard + 4.676503 âge + 160.34326
  - $R^2 = 0.9698$  n = 372

Le poids étant en mg, la longueur standard en mm et l'âge en jours (fig 13).



Fig 13 : Evolution de la longueur de la sagitta en fonction de l'âge et du poids (ou de la longueur standard) du poisson.

Les suivis de croissance selon l'axe antérieur et l'axe postéro-dorsal pour les plus gros et les plus petits poissons de chaque prélèvement tendent vers les mêmes résultats. Les plus gros poissons ont, à la date des prélèvements, des radii légèrement plus grands que les petits (fig 14 et 15).



Fig 14 : Evolution de la taille du radius antérieur pour les petits et les gros poissons de chacun des prélèvements effectués après le 70<sup>e</sup> jour.

Fig 15 : Evolution de la taille du radius postéro-dorsal pour les petits et les gros individus de chacun des prélèvements effectués après le 70<sup>e</sup> jour.

Pour un même poids, la longueur du radius dépend de l'âge de l'individu : plus l'âge est grand plus le radius sera grand (fig 16). Ce phénomène entraine des différences de longueur du radius plus importantes que celles constatées entre les sagittae prélevées sur des poissons de même âge, mais de poids différents : par exemple, si l'on prend un poisson d'environ 3 g, la taille du radius antérieur peut varier de 430 $\mu$ m (71 jours après l'émergence) à 870 $\mu$ m environ (126 jours après l'émergence) soit 450 $\mu$ m sur 55 jours. A 71 jours ou à 126 jours, la divergence de taille entre un gros et un petit poisson est au maximum de 250 $\mu$ m.

Fig 16 : Evolution de la longueur du radius antérieur en fonction du poids (en g) de l'individu. Chacun des différents signes représente une date de prélèvement (cf légende).



De façon générale les différences de taille entrainées par les deux paramètres de croissance augmentent en fonction du temps.

#### 4.3 Croissance fine de l'otolithe et bimodalisme

Les premières observations ont été réalisées sur les otolithes de jeunes parts prélevés dans des populations unimodales à partir du 70<sup>e</sup> jour (après l'émergence). Elles ont permis de mettre en évidence sur les otolithes des plus petits parts de chaque prélèvement, un changement net de microstructure, se situant entre le 45e et le 55e accroissement : la distance inter-accroissement diminue brutalement de  $2.5\mu m$  à  $1.5\mu m$  environ (Pl 5A B).

# PLANCHE 5

....

Fig A : Zone postéro-dorsale d'une sagitta chez un petit alevin de 85 jours (après l'émergence). Changement de microstructure (C) au niveau du 45<sup>e</sup> accroissement.

Fig B : Détail du changement de microstructure.

Fig C : Zone postéro-dorsale d'une sagitta chez un gros poisson de 141 jours (après l'émergence). On n'observe pas de changement de microstructure dans la zone du  $45^e$  au  $55^e$  accroissement (50 :  $50^e$  accroissement décompté).

100



Les otolithes des plus gros alevins prélevés aux mêmes dates sont un peu plus gros et ne présentent pas un tel changement de microstructure : la distance inter-accroissement se situe toujours autour de  $2.5\mu$ m, de la marque d'émergence au bord de l'otolithe (Pl 5C).

Les résultats obtenus sur les otolithes des poissons prélevés 166 jours après l'émergence viennent confirmer les observations précédentes. Ils ont été obtenus pour des poissons prélevés dans le mode haut et dans le mode bas de la population (fig 17).

Fig 17 : Histogramme de fréquence par classe de taille, 166 jours après l'émergence. Les deux gammes de taille où ont été prélevés les poissons sont les suivantes : "mode haut", de 105 à 140 mm et mode bas, de 65 à 85 mm.



Le rétrocalcul de la taille du radius postéro-dorsal à différentes dates après l'émergence permet de mettre en évidence les divergences de croissance existant entre les deux modes (fig 18). Le mode haut a une croissance quasi-linéaire de l'émergence au 166<sup>e</sup> jour alors que pour le mode bas il existe une rupture au niveau du 55<sup>e</sup> accroissement décompté - soit au 55<sup>e</sup> jour.

Une régression linéaire faite avant et après le 55<sup>e</sup> jour pour les poissons prélevés dans le mode bas donne les résultats suivants :

B1 r = 2.38791 n - 0.267636 $R^2 = 0.9826 (p < 0.00001)$ 

(r : radius postéro dorsal - n : nombre d'accroissements décomptés)

B2 r = 1.48184 n + 48.6796 $R^2 = 0.9671 (p < 0.00001)$ 

Pour les poissons prélevés dans le mode haut, la régression est réalisée pour l'ensemble des données allant de l'émergence au 166<sup>e</sup> jour.

H r = 2.35823 n + 12.8322 $R^2 = 0.9863 (p < 0.00001)$  Afin de comparer la croissance des deux lots de poissons étudiés (prélevés dans le mode haut et dans le mode bas) de l'émergence à la date du changement de microstructure survenant sur les otolithes des poissons du mode bas, nous avons repris les données entre ces deux dates. Un test sur les pentes des deux droites de régression -mode haut et mode bas- permet de démontrer que les deux lots de poissons étudiés ont une croissance différentes dès l'émergence.

pente de la droite pour le mode haut :  $a_{MH} = 2.68322$ " " " :  $a_{MB} = 2.38791$ 

# $(a_{MH}a_{MB}) / Sda = 3.02266$

La valeur de la table est inférieure à cette valeur calculée, les deux pentes sont donc différentes.



Fig 18 : Rétrocalcul de la taille du radius postéro-dorsal depuis la marque de l'émergence, en fonction du nombre d'accroissements décomptés.

L'observation plus fine des microaccroissements dans la zone du  $50^{e}$  accroissement révèle que la rupture de pente sur la courbe de croissance globale du radius postéro-dorsal du mode bas coincide avec un changement net de la microstructure des accroissements (cf fig 19). La distance interaccroissement passe brutalement, sur l'ensemble des individus observés, de  $2.5\mu$ m en moyenne à moins de  $2\mu$ m (entre 1.3 et  $2\mu$ m). Le niveau de rupture varie individuellement du  $45^{e}$  au  $55^{e}$  accroissement après l'émergence, mais il est toujours très net. Les distances interaccroissement se maintiennent à ce niveau du  $55^{e}$  au dernier accroissement, dans cette zone de la sagittae.

Fig 19 : Evolution de la distance intercaccroissements dans la zone postéro-dorsale de la sagitta, sur un individu prélevé dans le mode haut et dans le mode bas.



--- Mode Eas --+-- Mode Haut

Les techniques mises en oeuvre pour l'étude de l'accroissement des otolithes de saumon atlantique nécessitent des manipulations relativement lourdes et délicates. L'extraction, le montage et surtout le polissage des pièces nécessitent une attention particulière et une bonne maîtrise de la technique de préparation de façon à obtenir une section correctement lisible. Il arrive très souvent que l'on perde ou que l'on casse les pièces lors des différentes manipulations. Le polissage ne peut pas être contrôlé de façon suffisamment fine et les résultats au niveau de la préparation à analyser sont un peu aléatoires : il arrive par exemple que l'on dépasse le nucleus ou que l'on érode les marges lors du polissage (Secor et coll. 1991). Toutes les préparations qui présentent de tels défauts doivent alors être rejetées lors de l'analyse.

Cependant, même si ces techniques sont relativement difficiles à mettre en oeuvre, ce sont actuellement les seules qui permettent d'étudier la croissance individuelle de l'alevin de saumon atlantique.

La première étape dans ce travail a été l'étude du développement des otolithes au niveau macro et microstructural. Cette étape était nécessaire afin de bien connaître le matériel que l'on voulait exploiter. Elle a permis d'assurer les techniques à entreprendre et de déterminer de façon précise les paramètres que l'on allait utiliser pour l'analyse. Or plusieurs de ces paramètres sont conditionnés par la morphogenèse de l'otolithe.

Le poisson forme sur ses otolithes des marques distinctes correspondant aux grands événements du développement ou aux brusques changements de milieu. Dans cette étude, on observe une étroite corrélation entre la formation des marques et le développement. Le dépôt du <u>premier accroissement continu</u> intervient pendant l'achèvement de la pigmentation de l'oeil. Cette observation correspond à celles faites par Geffen (1983) sur la même espèce et par Tsukamoto et coll. (1989) sur le Saumon masu et l'Omble-chevalier. Le dépôt de ce premier accroissement continu ne coincide pas souvent avec la soudure complète de tous les primordia du nucleus. Des primordia supplémentaires viennent se souder ultérieurement (même après l'éclosion) ce qui engendre une grande variabilité de structure du nucleus. Cette observation est importante pour la détermination de l'origine des axes de mesure choisis ici. Elle doit être fixée de façon précise. Certains auteurs se réferrent au primordium le plus antérieur ou le plus postérieur (en fonction des axes), or ici, l'ensemble des primordia ne se soude généralement qu'après le stade oeillé, voire après l'éclosion. Ceci entraîne des variabilités au niveau de la mesure de la longueur des radii (surtout sur les petits otolithes) si l'on prend ces primordia "supplémentaires" comme origine. Il a donc été choisi de baser les mesures sur la partie centrale du nucleus (soudée au stade oeillé) en choisissant dans cette zone le primordium le plus antérieur ou le plus antérieur ou le primordium le plus postérieur (ou le primordium le plus postérieur comme origine des axes de mesure définis.

L'éclosion coincide également avec la formation d'une marque nette (simple ou double), observée sur les sagittae et les lapilli des jeunes alevins. Il en est de même à l'émergence, mais ce n'est plus une marque de développement au sens propre. Si en milieu naturel l'émergence correspond à un changement précis de mode de vie (l'alevin quitte la gravière pour commencer à chasser), en élevage, il s'agit plutôt d'un brusque changement de milieu : pendant toute la phase de résorption, les alevins vivent à l'obscurité, à 12°C, dans une auge où le courant est très faible; pour leur première prise d'aliment, ils sont transférés dans un bassin profond, à 14°C, où le courant est relativement fort, et soumis à une photopériode 16H/8H. Est-ce alors une de ces modification de milieu qui engendre la formation de la <u>marque de l'émergence</u> ou l'ensemble? Les auteurs (Wright et coll. 1991) parlent souvent de marque de première prise d'aliment (first feeding mark) engendrée par la prise du premier repas. La marque formée est nette sur tous les poissons observés. C'est pourquoi on l'a choisie comme point de référence pour le décompte des accroissements déposés ultérieurement.

Pour les classes d'âge que nous avons étudiées, la <u>lecture</u> des accroissements peut seulement se faire <u>dans</u> <u>la partie postéro-dorsale de l'otolithe</u>. Le rostre, qui a pourtant été utilisé par Wright et coll.(1991) chez la même espèce, est illisible dans notre cas. Pour le matériel analysé ici, les accroissements n'apparaissent sur le bord du rostre qu'à partir du cinquième mois environ. C'est un inconvénient car c'est la zone de l'otolithe qui présente le plus fort taux de croissance et donc les accroissements les plus larges et les plus faciles à mesurer. Les différences de microstructure que l'on a pu observer au niveau du 50<sup>e</sup> jour devraient y être plus nettes que dans la partie postéro-dorsale où nous avons fait nos mesures. Ce problème, nous l'avons vu, semble tenir au mode et au plan de cristallisation dans cette zone. L'obliquité des aiguilles d'aragonite par rapport au plan de polissage rend impossible la détermination des accroissements aussi bien lors de l'observation au microscope électronique à balayage ou lors de l'observation au microscope photonique.

Nous n'avons pas pu vérifier les observations faites au microscope photonique sur les préparations passées au microscope électronique à balayage. La gravure n'a donné aucun résultat. Nous avons pourtant appliqué les méthodes et les traitements gravants habituellement utilisés (Secor et coll. 1991). Cette absence de résultat peut venir du traitement, non approprié et des investigations ultérieures sont nécessaires. Il est cependant très curieux que les lapilli traités de la même façon présentent une bonne gravure. Le problème viendrait alors non plus du traitement mais de la préparation : mauvais polissage des sagittae, par exemple dans un plan oblique par rapport au plan de cristallisation. La différence de microstructure entre les sagittae et les lapilli peut elle aussi engendrer une réponse différente à la gravure : sur les lapilli, les accroissements sont plus serrés, plus fins que sur les sagittae.

Depuis la formation du premier accroissement continu, <u>le dépôt des accroissements est journalier</u>. Ceci s'oppose aux observations faites par Geffen (1983) : l'étude de la périodicité du dépôt l'amenait à conclure qu'à 8, 10 ou 15°C il est inférieur à 1 accroissement par jour. Ici malgré un séjour à l'obscurité jusqu'à l'émergence, le poisson dépose un accroissement chaque jour. Tsukamoto et coll. (1989) obtiennent les mêmes résultats pour le Saumon masu et L'Omble-chevalier. Wright et coll.(1991) montrent eux-aussi que la périodicité des accroissements après l'émergence est journalière. Cette étude était nécessaire avant d'aborder les problèmes de croissance fine de l'otolithe : elle permet d'assimiler "nombre d'accroissements" et "temps écoulé en jours".

L'étude de la croissance fine de la sagitta ne peut pas être réalisée sur toutes les pièces prélevées en raison de l'apparition d'anomalies de cristallisation sur une partie d'entre elles. Dans les parties anormalement cristallisées, la lecture est impossible : soit l'accroissement est irrégulier dans la zone anormale, soit la discontinuité zone normale - zone anormale est trop forte pour permettre de faire une lecture suivie des accroissements.

Par ailleurs, ces anomalies constituent en elles-mêmes un sujet tout à fait intéressant à étudier. Elles apparaissent très tôt, on peut même en retrouver avant l'émergence. Elles sont très localisées au départ et une fois en place, elles persistent et évoluent en englobant peu à peu tout l'otolithe. Les deux modes de cristallisation se font simultanément en différents endroits. Ces anomalies entrainent des modifications morphologiques de surface, surtout sur la face externe, qui peuvent mettre en doute la fonctionnalité des ces otolithes. La forme de cristallisation anormale conserve-t-elle les propriétés piezzoélectriques de la sagittae? Le sulcus est apparemment conservé et les poissons n'ont pas l'air de souffrir de ces anomalies. On n'observe <u>aucune relation entre ces anomalies et les paramètres de croissance somatique</u> : l'anomalie touche indifféremment les gros comme les petits poissons (les quelques résultats significatifs obtenus à 42, 71 et 106 jours doivent sans doute être considérés comme des accidents).

Il serait intéressant ici de faire une analyse des autres pièces calcifiées du poisson (vertèbres, opercules, épines...) pour vérifier si elles-aussi peuvent subir de telles anomalies. Il n'est pas du tout assuré que l'on décèle quoi que ce soit car déjà au niveau des trois paires d'otolithes, l'examen morphologique démontre que seule la sagitta est touchée.

Ces problèmes de cristallisation englobent <u>une grande partie de la population</u>, <u>quelle que soit son origine</u> : on a les mêmes proportions en élevage intensif ou traditionnel en Finistère nord, ou sur des poissons sauvages du Pays Basque. Il ne semble donc pas que ce soit un facteur de stress lié à l'élevage qui engendre ces défauts de cristallisation. L'anomalie touche indifféremment la sagitta droite, la gauche, ou les deux. Peut-on y voir alors une manifestation pathologique ou comme l'avance Gauldie (1986) un phénomène génétique. L'hypothèse des variations thermiques pendant l'élevage est également invoquée (Gauldie, 1986); il semble difficile de l'appliquer ici car les différents lots comparés ont tous subi des températures différentes au cours de l'élevage et pourtant ils donnent les mêmes résultats.

De nombreux auteurs se sont déjà intéressés aux otolithes de Saumon atlantique (Odense & Logan, 1974 - Geffen, 1983 - Mosegaard et coll., 1987 - Wright et coll., 1991). Pourtant aucun d'entre eux n'évoque une telle proportion de pièces anormales. Gauldie (1986) est le seul auteur à avoir constaté ce type d'anomalies dans des proportions également très importantes (environ 30%) sur le saumon chinook. Faut-il alors penser que les autres auteurs n'en ont pas rencontrées ou qu'il n'en font pas état dans leurs travaux.

Le type d'anomalie rencontré ici ressemble beaucoup à celui décrit chez le saumon chinook (Gauldie, 1986) : dans les parties anormales de la sagitta de cette espèce, le carbonate de calcium est cristallisé sous forme de vatérite au lieu d'aragonite.

Le Saumon, nous l'avons vu plus haut, forme sur ses otolithe des marques discontinues ("checks") engendrées par le stress lié au développement ou aux variations des paramètres environnementaux. Ces marques peuvent servir de références temporelles pour l'étude de l'accroissement de l'otolithe, pendant les premiers mois d'élevage; c'est ce que nous avons fait ici. Cependant, il semble plus utile de créer à date fixe des marques artificielles, distinctes des marques naturelles liées aux différents stress, qui permettront de déterminer de façon sûre la correspondance entre les accroissements marqués et la date auquels ils se rapportent. La position de ces marques peut être choisie de façon tout à fait précise suivant la zone de l'otolithe que l'on veut étudier.

Les travaux effectués ici sur le Saumon atlantique confirment que la <u>balnéation dans le chlrorhydrate de</u> <u>tétracycline</u> peut être utilisée pour marquer de façon fine les otolithes de cette espèce à l'émergence, ou un peu plus tard. Les meilleurs résultats sont obtenus pour des bains de 24H dans une solution dosée à 400mg/l.

La marque engendrée est suffisamment <u>nette et précise</u> pour servir de <u>référence temporelle</u> à un décompte des accroissements de l'otolithe. La tétracycline se dépose quasi instantannément après le début du traitement, parallèlement à la formation de deux accroissements. Le marquage dure 24H et débute en fin d'après midi, à 17H : la zone discontinue du premier accroissement se forme à la mise à l'obscurité (Mugiya 1987), c'est à dire au tiers du temps de marquage. On comprend alors que la fluorescence s'étende sur 2 accroissements, l'un précédant la zone discontinue et l'autre la suivant. Dabrowski & Tsukamoto (1986) et Tzeng & Yu (1989) constatent également que l'incorporation du fluorochrome commence dès l'immersion dans le bain.

Etant donnée la précision de la marque, le poisson peut être traité plusieurs fois de suite de façon à pratiquer une zonation nette et précise de l'otolithe. La conservation de la fluorescence sur une longue période n'a pas été étudiée ici. Il semble tout de même qu'elle soit suffisamment bonne pour permettre des observations répétées des préparations, à condition qu'on les conserve à l'abri de la lumière. Tant que le poisson est vivant, les otolithes sont protégés de la lumière, à l'intérieur de la boîte cranienne; étant donné leur mode d'accrétion, la marque fluorescente est enfouie peu à peu sous plusieurs couches de carbonate de calcium et ainsi protégée. L'otolithe subit très peu de remaniement et la marque à donc peu de chance de disparaître.

Si l'on veut étudier la croissance du poisson et/ou celle de l'otolithe à partir d'une marque de référence laissée par une substance fluorescente sur les pièces calcifiées, il est nécessaire de savoir si cette substance ou les manipulations lors du traitement ne perturbent pas la croissance de l'animal. Ici, le traitement ne semble <u>pas</u> avoir <u>d'effet sur la mortalité ou sur la croissance des alevins</u> : les poissons marqués et les témoins ne présentent pas de différences significatives de poids au bout d'un mois d'élevage.

La méthode est très <u>simple</u> à réaliser et n'exige pas un temps de manipulation très long. <u>Elle est efficace</u> <u>même après l'émergence sur des alevins relativement agés</u> (60 jours, 50mm). Ceci nous permet d'éviter l'utilisation de l'injection ou de l'assimilation par l'aliment qui sont des méthodes plus lourdes et plus stressantes surtout sur des alevins de cette taille. Dabrowski & Tsukamoto (1986) obtiennent également de bons résultats pour un traitement à 300mg/l de tétracycline pendant 35H, sur des juvéniles de Corégone - *Coregonus peled* - de 40 jours, élevés à 10.5°C. Un traitement identique sur des juvéniles d'une espèce proche - *Coregonus lavaretus* L. - (Niagec et coll., 1988),mais à 17°C, donne de bons résultats seulement après une heure d'immersion. Les basses températures jouent donc un rôle inhibiteur dans l'absorption et le dépôt de la tétracycline.

Ce type de technique n'a pas pu être utilisé ici pour l'étude de la croissance fine de l'otolithe, en raison de contraintes temporelles. L'étude directe de la croissance à partir de la marque de l'émergence est possible, mais il serait intéressant de pouvoir confirmer le décompte des accroissements par un marquage périodique de l'otolithe afin d'avoir plusieurs références temporelles. Il serait nécessaire également d'appliquer la méthode afin de vérifier les résultats obtenus ici sur la différenciation de deux types de croissance au niveau des otolithes par un marquage une dizaine de jours après la date du changement de microstructure, par exemple.

Les premières études de la croissance fine de la sagitta nous premettent déjà d'établir quelques résultats :

L'analyse de la croissance de la sagitta nous permet de retrouver les <u>deux processus</u> déjà évoqués (Nielson & Geen, 1982 ; Secor & Dean, 1989 ; Molony & Choat, 1990). Ils sont <u>l'un lié à l'âge de l'individu</u> <u>et l'autre lié aux paramètres de croissance somatique</u>. Le premier processus est conservatif et réside dans la formation des accroissements journaliers. Ce phénomène est indépendant de la croissance somatique du poisson, sauf en cas de jeûne prolongé. Ce processus s'accompagne d'un autre phénomène proportionnel à la croissance en poids ou en longueur de l'individu, phénomène relatif à la largeur des accroissements. De ce fait, à un même âge, un poisson à croissance lente a des otolithes plus petits que ceux d'un poisson à croissance rapide, malgré le dépôt d'accroissements journaliers dans les deux cas. Le métabolisme conditionne sans doute la largeur des accroissements et par là-même, la taille de l'otolithe.

Lorsqu'on observe des poissons de même poids mais d'âge différent, on constate que plus ils sont âgés plus leurs otolithes sont gros. Ces différences de taille sont plus grandes que celles rencontrées sur des poissons de même âge mais de poids différent. Le processus conservatif lié au dépot d'accroissements journaliers l'emporte donc ici sur le processus de croissance lié à la croissance somatique. Pour des poissons à croissance lente, la croissance de l'otolithe est maintenue en grande partie même si la croissance somatique est ralentie.

Une étude plus fine de la microstructure de la sagitta nous permet ici de définir également un point de divergence de croissance entre les deux modes qui a l'avantage d'être le résultat d'une observation directe, réalisable à tout âge (post 50 jours). La diminution de la distance inter-accroissement entre le 45<sup>e</sup> et le 50<sup>e</sup> accroissement chez les poissons intégrant le mode bas traduit sans doute une diminution de la croissance générale du poisson, non décelable avant que les deux modes n'apparaissent dans la population. Ce frein dans la croissance de l'otolithe est le résultat le plus immédiatement tangible des variations des paramètres conditionnant la croissance du poisson.

Sur cette base on peut avancer différentes hypothèses sur l'origine de ces variations de croissance. Il convient tout d'abord de faire un rappel des évènements qui précèdent la date du changement de microstructure enregistré :

\* Le premier repas a lieu suivant les individus, 45 à 55 jours avant la date critique.

\* La résorption du vitellus se poursuit environ pendant trois semaines après l'émergence.

Si la première prise d'aliment se fait mal pour certains individus, elle peut entraîner un retard de croissance somatique qui ne se répercuterait que beaucoup plus tard au niveau de l'otolithe. La poursuite de la résorption du vitellus contribuerait à entretenir l'accroissement dans les premières semaines suivant l'émergence; la manifestation microstructurale du retard de croissance ne se ferait alors qu'un certain temps après l'épuisement des réserves vitellines. Le fait que l'on rencontre ces changements de structure chez les plus petits poissons des prélèvements réalisés après le 55<sup>e</sup> jour corroborerait l'hypothèse d'un retard de croissance datant des quelques jours suivant l'émergence.

Il semble cependant que le délai séparant la fin de la résorption vitelline et la date du changement de microstructure (une vingtaine de jours) soit un peu long. De plus, pourquoi aurait-on alors une diminution aussi brusque de la distance inter-accroissement et non pas une transition progressive d'un type de microstructurse à l'autre?

On pourrait également évoquer un changement physiologique endogène intervenant juste au moment ou quelques jours avant la modification de microstructure. Il conditionnerait alors le développement du poisson suivant un mode de croissance lente.

L'ensemble de ces premiers résultats mériteraient d'être approfondis par une étude plus poussée du mode d'accroissement et des phénomènes comportementaux dès l'émergence, afin de vérifier si la première prise d'alimentation peut être ou non un facteur déterminant dans l'appartenance ultérieure d'un poisson, au mode haut ou au mode bas.

## BIBLIOGRAPHIE

Caillart B.& E. Morize, 1989. Etude du rythme de dépot des microstries sur les otolithes d'un Serranidé tropical, *Epinephelus microdon* (Bleeker), à l'aide d'un marqueur fluorescent : L'oxytétracycline. Aquat. Living Ressour., 2, 255-261.

Dabrowski K. & K. Tsukamoto, 1986. Tetracycline tagging in coregonid embryos and larvae. J., Fish Biol., 29, 691-698.

Gauldie R. W., 1986. Vaterite otoliths from chinook salmon (Oncorhynchus tshawytscha). New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 20, 209-217.

Geffen A. J., 1983. The deposition of otolith ring in atlantic salmon, Salmo salar L., embryos. J. Fish Biol., 23, 467-474.

Hendricks M. L., T. R. Bender, JR., & V. A. Mudrak, 1991. Multiple marking of american shad otoliths with tetracycline antibiotics. North American Journal of Fisheries Management, 11, 212-219.

Karakiri M. & H. von Westernhagen 1989. Daily growth patterns in otoliths of larval and juvenile plaice (*Pleuronectes platessa* L.): influence of temperature, salinity, and light conditions. *Rapp. P.-v. Réun. Cons. int. Explor. Mer*, 191, 376-382.

Metcalfe N. B., F. A. Huntingford & J. E. Thorpe, 1986. Seasonal changes in feeding motivation of juvenile Atlantic salmon (Salmo salar). Can. J. Fish. Aquat. Sci., 64, 2439-2446.

Metcalfe N. B., F. A. Huntingford & J. E. Thorpe, 1988. Feeding intensity, growth rates, and the establishment of life-history patterns in juvenile Atlantic salmon. J. Anim. Eol., 57, 463-474.

Molony B. W. & J. H. Choat, 1990. Otolith increment width and somatic growth rate: the presence of a time-lag. J. Fish Biol., 37, 541-551.

Morales- Nin B., 1985. Caractericas de los otolithos cristalinos de Genypterus capensis (Smith, 1847). Inv. Pesq., 49 (3), 379-386.

Mosegaard H., N. G. Steffner & B. Ragnarsson, 1987. Manipulation of otolith microstructures as mean of mass-marking salmonid yolk sac fry. Proc. V Congr. europ. Ichthyol., Stockholm 1985, pp. 213-220.

Mugiya, Y., 1987. Effects of photoperiods on the formation of otoliths increments in the embryonic and larval rainbow trout Salmo gairdneri. Nippon suisan gakkaishi, 53, 1979-1984.

Nagiec M., K. Dabrowski, C. Nagiec & E. Murawska, 1988. Mass-marking of coregonid larvae and fry by tetracycline tagging of otoliths. Aquaculture and fisheries management, 19, 171-178.

Nielson J. D. & G. H. Geen, 1982. Otoliths of chinook salmon (Oncorhyncus tshawytscha): daily growth increments and factors influencing their production. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 39, 1340-1347.

Nordeide J. T., J. C. Holm, H. Ottera, G. Blom & A. Borge, 1992. The use of oxytetracycline as a marker for juvenile cod (Gadus morhua L.). J. Fish Biol., 41, 21-30.

Odense P. H. & V. H. Logan, 1974. Marking Atlantic salmon (Salmo salar) with oxytetracycline. J. Fish. Board Can., 31 (3), 348-350.

Panella G., 1980. Growth patterns in fish sagittae. In "Skelettal Growth of Aquatic Organisms", ed. Rhoads D. C. & R. A. Lutz, pp. 519-556.

Reznick D., E. Lindbeck & H. Bryga, 1989. Slower growth results in largeur otoliths: an experimental test with Guppies (*Poecilia reticulata*). Can. J. Fish. Aquat. Sci., 46, 108-112.

Ruhlé C. & C. Grieder, 1989. Nouvelle méthode de marquage vital d'oeufs de Salmonidés par incorporation de tétracycline à la fécondation : expériences préliminaires sur des oeufs de truite fario (Salmo trutta fario) et de truite arc-en-ciel (Oncorhyncus mykiss). Bull. Fr. Pêche Piscic., 315, 181-188.

Secor D. H. & J. M. Dean, 1989. Somatic growth effects on the otolith-fish size relationship in yong pond-reared striped bass, Morone saxatilis. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 46, 113-121.

Secor D. H., J. M. Dean & E. H. Laban, 1991. Manual for otolith removal and preparation for microstructural examination. Technical publication (01) of the Belle W. Baruch Institute for Marine Biologie and Coastal Research.

Sogard S. M., 1991. Interpretation of otolth microstructure in juvenile winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*): onthogenic development, daily increment validation, and somatic groth relationships. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48, 1862-1871.

Tsukamoto K., 1985. Mass-marking of ayu eggs and larvae by tetracycline-tagging of otoliths. Bull. of the Japanese Society of Scientific fisheries, 51 (6), 903-911.

Tsukamoto K., 1988. Otolith tagging of ayu embryo with fluorescent substances. Nippon Suisan Gakkaishi, 54 (8), 1289-1295.

Tsukamoto K. & T Kajihara, 1987. Age determination of ayu with otolith. Nippon Suisan Gakkaishi, 53 (11), 1985-1997.

Tsukamoto K., Y. Seki, T. Oba, M. Oya & M. Iwahashi, 1989. Application of otolith to migration study of Salmonids. *Physiol. Ecol. Japan*, Spec. Vol. 1, 119-140.

Tzeng W.-N. & S.-Y. Yu, 1989. Validation of daily growth increments in otoliths of milkfish larvae by oxytetracycline labelling. Transactions of the American Fisheries Society, 118, 168-174.

Umezawa A. & K. Tsukamoto, 1991. Factors influencing otoliths increment formation in Japanese eel, Anguilla japonica T. & S., elvers. J. Fish Biol., 39, 211-223.

Volk E. C., R. C. Wissmar, C. A. Simenstad & D. M. eggers, 1984. Relationship between otolith microstructure and the growth of juvenile chum salmon (*Onchorhyncus keta*) under different prey rations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 41, 126-133.

Wilson K. H. & P. A. Larkin, 1982. Relatioship between thickness of daily growth increments in sagittae and change in body weight of sockeye salmon (Oncorhyncus nerka) fry. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 39, 1335-1339.

Wright P. J., N. B. Metcalfe & J. E. Thorpe, 1990. Otolith and somatic growth rates in Atlantic salmon parr, Salmo salar L. : evidence against coupling. J. Fish Biol., 36, 241-249.

Wright P. J., D. Rowe & J. E. Thorpe, 1991. Daily growth increments in the otoliths of Atlantic salmon parr, *Salmo salar* L., and the influence of environmental factors on their periodicity. J. Fish Biol., 39, 103-113.