

Résultats préliminaires d'études sur des méthodes de détermination de l'âge individuel par l'histologie chez quelques Téléostéens

Dédié à Wolfgang Geiger

Par C. Grieder-Kuhn et Ch. Ruhlé

Manuscrit reçu le 17 avril 1986

ABSTRACT

Preliminary observations on the use of histological methods for ageing teleost fish

The study discusses the potential of various histological methods for enhancing the readability of the lines of arrested growth (LAC, annuli) in different bony elements, particularly fin rays, of some freshwater fish species.

1. Introduction

La détermination de l'âge individuel des poissons se fait en général par l'observation des structures minéralisées montrant des zones annuelles de croissance (zones et annuli). Les éléments squelettiques les plus utilisés sont les écailles, les otolithes et les opercules. Quoique utilisée souvent sans validation [5], l'observation de ces éléments pose souvent des problèmes menant à des déterminations d'âge erronées. Pour éliminer ces difficultés, plusieurs auteurs ont cherché d'autres formations squelettiques montrant des marques annuelles de croissance plus adéquates pour la détermination de l'âge individuel.

C'est ainsi que par exemple, l'âge a été déterminé par les vertèbres chez le thon *Thunnus thynnus* [36], le poisson chat *Ictalurus lacustris punctatus* [26], l'anchois *Coilia ectenes* [41]. Certains os plats, autres que l'opercule, ont été observés par transparence, comme le cleithrum du brochet *Esox lucius* L. [11] et les rayons branchiostèges de la truite de lac *Salvelinus namaycush* [9]. Parmi ces autres formations squelettiques, ce sont les rayons des différentes nageoires qui ont été le plus utilisés. Le rayon épineux dorsal ou anal de la carpe *Cyprinus carpio* [31], dorsal ou pectoral du poisson chat *Ictalurus* sp. [1, 7, 24, 26, 39], dorsal de la perche *Perca fluviatilis* [20], du bec de canne *Lethrinus nebulosus* [32], de la bonite *Katsuwonus pelamis* [2], du sandre *Stizostedion vitreum* [6, 25], se prêtent particulièrement bien à l'évaluation de l'âge, car ces structures sont bien calcifiées.

Lorsque le poisson étudié ne possède pas d'épine proprement dite, les auteurs ont observé la nageoire dorsale, pectorale, pelvienne ou anale, comme chez l'anchois *Coilia ectenes* [41], le corégone *Coregonus clupeaformis* [33], la truite *Salmo trutta* [10, 37], l'ombre

Thymallus arcticus [38], le rotengle *Scardinius erythrophthalmus*, le chevaine *Leuciscus cephalus*, le vengeron *Rutilus rutilus*, la brème *Abramis brama*, l'ide *Leuciscus idus* [17], l'esturgeon *Acipenser sturio* [15], les morues *Theragra chalcogramma* et *Gadus macrocephalus* [3], la morue-lingue *Ophiodon elongatus* [4].

Les écailles et les os plats, nettoyés peuvent être lus par transparence sans préparation particulière. L'observation des otolithes peut se faire soit directement pour les jeunes poissons, du moins s'ils se sont développés dans des conditions favorables, soit avec diverses préparations pour les poissons plus âgés: c'est-à-dire surface ou section polie, brûlée, empreinte sur feuille d'acétate, microscope électronique à balayage, coloration. La détermination de l'âge individuel basée sur l'observation des rayons de nageoire nécessite des coupes transversales. Selon beaucoup d'auteurs, les rayons sont enrobés en résine polyester et coupés à la scie, au disque diamanté ou autre équipement, en tranches de 200 μm à 1,5 mm suivant les espèces [16, 25, 40]. Le comptage des zones de croissance se fait en lumière transmise ou réfléchie.

2. But

Le présent travail a été mis en œuvre à cause des difficultés rencontrées lors de la détermination de l'âge chez la lotte (*Lota lota*) où la lecture des otolithes de grands poissons suscite certains problèmes et où les méthodes s'offrant comme alternative, c'est-à-dire, ici, les rayons de nageoires coupés épais, polis et observés par transparence, n'ont pas été applicables a priori, vu les dimensions restreintes des rayons de nageoires chez cette espèce (p.ex. rayon de pectorale n'ayant que 80 μm pour des lottes de 9 cm (fig. 1) contre 430 μm pour une épine dorsale de perche de même grandeur).

Nous avons donc été amenés à chercher une méthode plus fine, histologique, capable de reconnaître des structures squelettiques cycliques sur des éléments de petite taille.

De nombreux auteurs on été entraînés à trouver des variations structurales correspondant à des cycles saisonniers comme indicateur de l'âge chez les mammifères [22, 23], les amphibiens [35], les reptiles [8]. C'est ainsi que les zones de croissance et les lignes d'arrêt

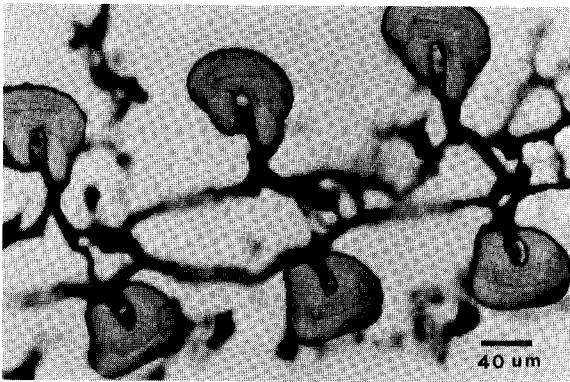


Figure 1. Coupe transversale (15 μm) de nageoire pectorale de lotte (90 mm), hématoxyline.

Figure 1. Cross section (15 μm) of pectoral fin from burbot (90 mm), hematoxylin.

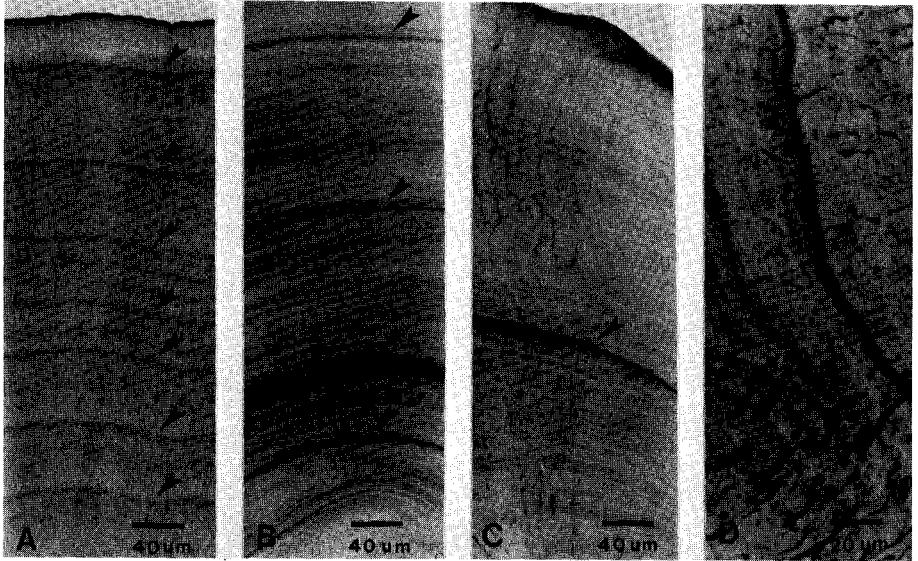


Figure 2. Détail des L.A.C. (flèches). Coupes transversales (15 µm), hématoxyline. Epine dorsale de a: carpe, b: perche, c: sandre. d: rayon branchiostège de lotte.

Figure 2. Detail of L.A.C. (arrows). Cross sections (15 µm), hematoxylin. Dorsal spine from a: carp, b: perch, c: pike perch. d: branchiostegal ray of burbot.

de croissance hématoxylinophiles dans les os [12, 13] ont été mises en rapport avec des cycles biologiques annuels. Cette méthode a été appliquée également pour les poissons, entre autre par Castanet [15], Meunier et coll. [30–32].

Les lignes d'arrêt de croissance (L.A.C.) consistent, chez la carpe (*Cyprinus carpio*) en une ligne cimentante hématoxylinophile bordant une à trois lamelles osseuses biréfringentes, le tout formant l'annulus [15]. Pour ces lignes cimentantes, différentes natures structurales et fonctionnelles ont été découvertes au microscope électronique à transmission MET, ce qui n'influence pas leur utilité dans le but d'une détermination de l'âge par la microscopie photonique puisque en histologie classique «on admettra que toute ligne brillante, biréfringente, très chromophile et a fortiori crênelée, ou marquant une discordance structurale, est une ligne cimentante sensu lato» [14]. Les aspects différents des lignes hématoxylinophiles (L.H.) dus à ces variabilités se manifestent clairement sur les figures 2 de coupes de rayons de nageoire de divers poissons et de branchiostège de lotte. Dans ce travail, nous avons cherché à adapter, en vue de la détermination de l'âge individuel de quelques Téléostéens d'eau douce, différentes méthodes histologiques déjà appliquées par certains auteurs sur des poissons, amphibiens et reptiles.

3. Matériel et méthodes

Diverses structures calcifiées de quelques Téléostéens d'eau douce ont été utilisées pour ce travail:

Pour la lotte *Lota lota*, nous avons pris les nageoires dorsales et pectorales, les rayons branchiostèges, les côtes, les vertèbres et les radiaux;

Pour la truite *Salmo trutta*, les nageoires dorsales, pectorales, pelviennes et anales;
 Pour le coregone *Coregonus* sp., les vertèbres, ainsi que les nageoires dorsales, pectorales et pelviennes;
 Pour la perche, *Perca fluviatilis*, l'épine dorsale, les vertèbres;
 pour le sandre *Lucioperca lucioperca*, et la carpe *Cyprinus carpio*, le rayon épineux dorsal.

Seuls les corégones et quelques truites étaient d'âge connu, car ils avaient été marqués. La nageoire la plus appropriée pour chaque espèce est disséquée avec sa base, puis plongée dans l'eau frémissante. Une cuisson trop forte déforme les rayons peu calcifiés (lotte, truite, corégone). Débarrassés des chairs, les rayons nettoyés sont fixés au formol neutre à 10% de 2 à 12 heures ou plus suivant leur grosseur. Pour les lottes de moins de 15 cm et d'autres petits poissons sans épine dorsale, la nageoire pectorale est fixée entière pendant 1 heure dans le formol, puis la peau et les chairs sont détachées des rayons à partir de la base, comme un gant. La fixation est poursuivie une à deux heures. Les nageoires entières ou les épines dorsales ainsi préparées sont lavées à l'eau, puis décalcifiées à l'acide nitrique 5% pour les grands poissons et les épines dorsales, 2,5% pour les autres. Le temps de décalcification se situe par exemple de 1 à 6 heures pour la pectorale de lotte, et de 3 à 24 heures ou plus pour l'épine dorsale de perche. Suit un lavage très soigné à l'eau courante. Les nageoires qui ne sont pas débitées de suite à la congélation peuvent être conservées à l'alcool 70%, mais dans ce cas elles devront être bien rehydratées avant la coupe. Tous les rayons de nageoire sont coupés juste au-dessus de leur base selon la figure 3 [16]. Pour les petits poissons (p.ex. lotte de 10 cm), la nageoire entière sera coupée dans toute sa largeur au-dessus de la base, tandis que pour les poissons plus grands, on choisira le centre de la nageoire. Pour les poissons possédant des rayons épineux, on prendra une ou deux épines que l'on débitera selon la figure 3. Pour une éventuelle rétromesure, il est nécessaire de choisir toujours les mêmes rayons, coupés au même emplacement chacun ayant une autre forme et un autre diamètre.

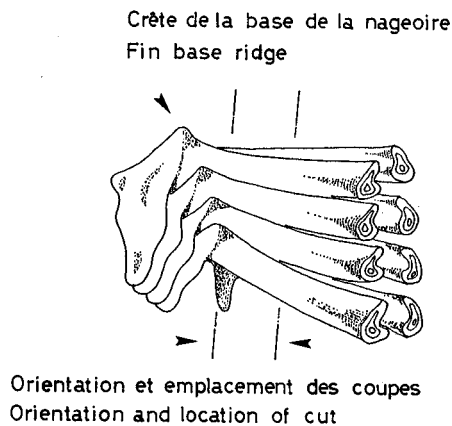


Figure 3. Schéma de rayons de nageoire (d'après Chilton et Beamish [16]).
 Figure 3. Schematic drawing of fin rays (after Chilton and Beamish [16]).

3.1 Coupes à la congélation

Le bloc préparé est congelé dans le milieu d'enrobage de Jung pour cryostat. Les coupes, de 15 μm d'épaisseur sont prises directement sur le couteau à sec par une lame porte-objet préparée à la gélatine chromée (0,5 g gélatine dans 100 ml aq. dest. tiède + 0,05 g alun de chrome + 1 grain de thymol. Le porte-objet est trempé dans cette solution, égoutté et séché à 60 °C). Il est possible de déplier les coupes s'il y a lieu, lorsqu'elles sont encore humides, avant de les faire sécher sur une platine chauffante à 60 °C. Un collodionage n'est pas nécessaire.

3.2 Coupes à la paraffine

Les rayons de nageoires préparés ont été enrobés au «Paraplast Plus» et coupés à 10 μm .

3.3 Coupes au méthacrylate

Des rayons de nageoires décalcifiés et non décalcifiés ont été enrobés dans l'Historesin 500 de LKB qui est à base de méthacrylate. Le matériel décalcifié a été coupé de 4 à 10 μm avec un microtome Sorvall JB-4 équipé d'un couteau de verre, tandis que le matériel non décalcifié a été coupé à 10 μm avec un microtome 2050 Supercut de Reichert-Jung équipé d'un rasoir en métal dur 16 cm, de profil C.

3.4 Colorations utilisées

- Hématoxylines d'Ehrlich, de Hansen, de Boehmer et en particulier celle de Delafield non diluée
- APS ordinaire selon McManus [34]
- APS avec acide périodique alcoolique et bain réducteur selon Hotchkiss [34]
- Le bleu alcian à pH 3,5
- Argent hexaméthylènetétramine de Gomori [19]
- Réaction métachromatique par le bleu de toluidine pH 2,5 et par le violet de crésyle phéniqué appliqué à chaud
- Une lame porte-objet de chaque bloc a été montée non colorée pour l'étudier au microscope à contraste de phase simple ou interférentiel

4. Résultats

L'application de certaines méthodes décrites sous chapitre 3 a posé quelques problèmes nous amenant à ne plus les prendre en considération pour les examens de routine.

- Les coupes à la paraffine donnent de bons résultats quant aux colorations mais leur qualité laisse à désirer car, surtout chez la lotte, le collagène contenu dans les rayons de nageoire durcit énormément à la déshydratation, ce qui rend les coupes très cassantes. Les techniques usuelles de ramollissement n'ont pas été satisfaisantes pour notre matériel.
- Pour pallier à cet inconvénient, nous avons enrobé des rayons décalcifiés dans une matière plus dure, ne nécessitant pas une déshydratation aussi poussée: le méthacry-

late. Les rayons décalcifiés, enrobés dans l'Historésine 500 se coupent bien avec un couteau de verre à des épaisseurs réduites ($< 5 \mu\text{m}$) ce qui est insuffisant pour avoir une bonne image des lignes hématoxylinophiles à faible ou moyen grossissement. La résolution de celles-ci est la meilleure entre 10 et 20 μm , pour plusieurs espèces. Par contre, pour la perche, les L.H. se voient bien à toutes les épaisseurs, même en dessous de 5 μm . Pour observer un détail des lignes cimentantes, à fort grossissement, on peut même aller jusqu'aux semi-fines.

Nous ne considérerons pas non plus, dans ce contexte, les coupes de nageoire non décalcifiées, enrobées au méthacrylate. Dans nos travaux effectués jusqu'à présent sur cette méthode, nous nous sommes inspirés des publications de Juster [21] et de celles de Matrajt [27], en essayant d'utiliser non pas la résine polyester type Stratyl, mais de nouveaux milieux d'enrobages tels que l'Historésine 500 LKB ou le Technovit 7001 de Kulzer. Nous avons, en outre, dû constater que les temps d'infiltration sont sensiblement plus longs que ceux conseillés par le fabricant. Cette méthode devra être perfectionnée, vu l'importance des coupes de nageoires non décalcifiées, dans l'application de marquages par des fluorochromes pour la validation de la détermination de l'âge par coupes histologiques de rayons de nageoires. Une étude à ce sujet est en cours et fera l'objet d'une prochaine publication.

Dans le présent travail, nous ne prendrons donc en considération que les coupes à la congélation, qui ont donné les meilleurs résultats. Elles ne posent aucun problème en ce qui concerne la qualité et la préparation. C'est aussi la méthode la plus rapide et la plus rationnelle pour le matériel décalcifié ou le matériel provenant d'éléments jeunes peu calcifiés.

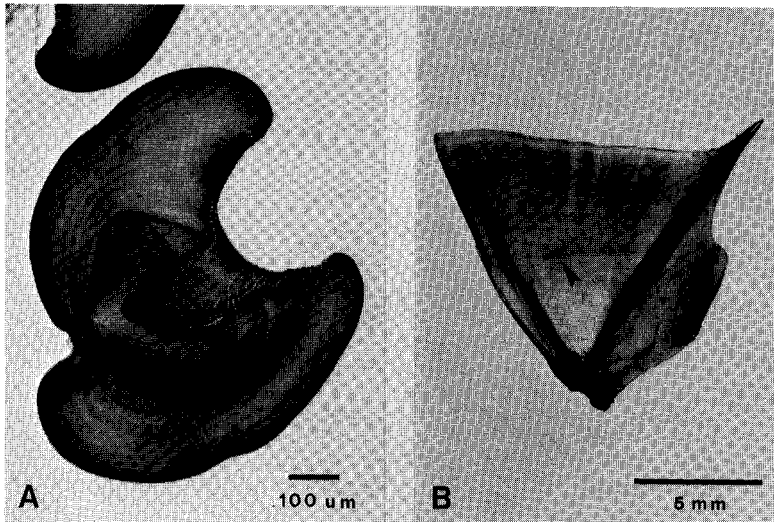


Figure 4. a: Coupe transversale d'épine dorsale de perche (166 mm, 2⁺), hématoxyline, 15 μm . b: Opercule du même spécimen.

Figure 4. a: Cross section of dorsal spine from perch (166 mm, 2⁺), hematoxylin, 15 μm . b: Operculum from the same specimen.

Ce sont les laques d'hématoxyline qui donnent les meilleurs résultats sur toutes les espèces étudiées. Les L.A.C. des rayons épineux dorsaux de carpe, de sandre et de perche (fig. 2 a, b, c, 4 a) sont si bien visibles, d'un bleu si intense, qu'une autre coloration nous a paru superflue. Chez la truite et le corégone les nombreux ostéocytes et fibres de Sharpey se colorent aussi par l'hématoxyline et gênent un peu l'observation des L.A.C. Chez la lotte (fig. 1, 5), les L.A.C. des rayons de nageoires pectorales se colorent d'une intensité très différente selon les individus et selon l'emplacement dans la coupe. Les 2e et/ou 3e L.A.C. sont souvent beaucoup plus intensément colorées que les autres. Ce phénomène, observé également chez le triton crêté *Triturus cristatus* par Francillon [18], et son rapport éventuel avec le début de la maturité ou avec un changement dans les milieux occupés par la lotte sera sujet d'expériences de marquage (voir chap. 5).

La coloration à l'APS ne donne pas toujours les résultats décrits par les divers auteurs [2, 14]. Nos coupes étant décalcifiées, la réaction peut être légèrement modifiée. Chez la lotte, le centre du rayon, la zone représentant la première année (vérifiée sur du matériel d'élevage) ainsi que quelques L.A.C. sont APS-positives (fig. 6 a). La combinaison de l'APS et de l'hématoxyline renforce les L.A.C. et rend plus visible celles qui sont le moins positives (fig. 6 b). La première année est peu visible sur la coupe à l'hématoxyline (fig. 6 c). Les résultats obtenus chez la truite et le corégone sont semblables à ceux de la lotte. La substance fondamentale, chez la perche et le sandre étant assez APS-positif, le contraste de celle-ci avec les L.A.C. est minime.

La réaction à l'APS comprenant de l'acide périodique alcoolique donne un meilleur contraste, la substance fondamentale étant moins positive. La réaction au bleu alcian à pH 3,5 a été négative sur toutes les préparations, ce qui confirme les résultats de Castanet [14]. La réaction à l'argent hexaméthylènetétramine de Gomori, conformément aux résultats de Juster [21] et Castanet [14], sur les imprégnations argentiques ne semble pas colorer les L.A.C., mais les fait apparaître claires sur un fond plus ou moins foncé (fig. 6 d). Ceci peut aider à la localisation des L.A.C. dont la détermination n'est pas claire avec les autres colorations. Du fait qu'elles ne sont pas colorées, les L.A.C. se décèlent par leur brillance. La réaction métachromatique au bleu de toluidine montre chez la lotte des zones roses à violettes, tandis que les L.H. sont incolores comme le constate Castanet

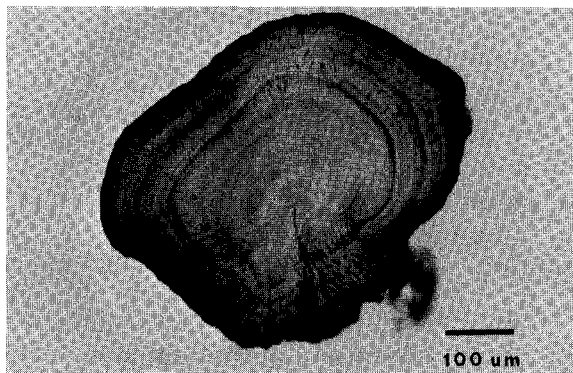


Figure 5. Coupe transversale (15 µm) de rayon de nageoire dorsale de lotte (650 mm), hématoxyline.

Figure 5. Cross section (15 µm) of dorsal spine from burbot (650 mm), hematoxylin.

[14]. Le violet de crésyle colore fortement en pourpre le centre du rayon de la nageoire pectorale de la lotte. Des observations analogues ont été faites sur les rayons branchiostèges de cette espèce. Pour les autres poissons étudiés, la réaction métachromatique n'offre pas d'intérêt particulier, ce qui est dû aussi au fait que cette réaction semble colorer à différentes intensités les diverses structures des zones de croissance, ce qui peut mener à des surestimations de l'âge.

Les coupes non colorées observées au contraste de phase n'ont pas donné de résultats satisfaisants pour l'indication de l'âge car la nature du tissu osseux empêche la mise en évidence des L.A.C. qui sont difficiles à discerner parmi toutes les structures également circulaires. Le contraste de phase interférentiel élimine un peu cet inconvénient, mais la qualité reste toutefois insuffisante pour remplacer les coupes colorées. Par contre, les coupes colorées à l'hématoxyline et observées au contraste de phase simple ou interférentiel (fig. 7) peuvent être, grâce à la biréfringence des L.A.C., intéressantes pour affirmer le résultat d'une localisation éventuellement douteuse de L.H.

En règle générale, dans le matériel à notre disposition, les marques squelettiques de croissance hématoxylinophiles étaient moins visibles dans les coupes de vertèbres que

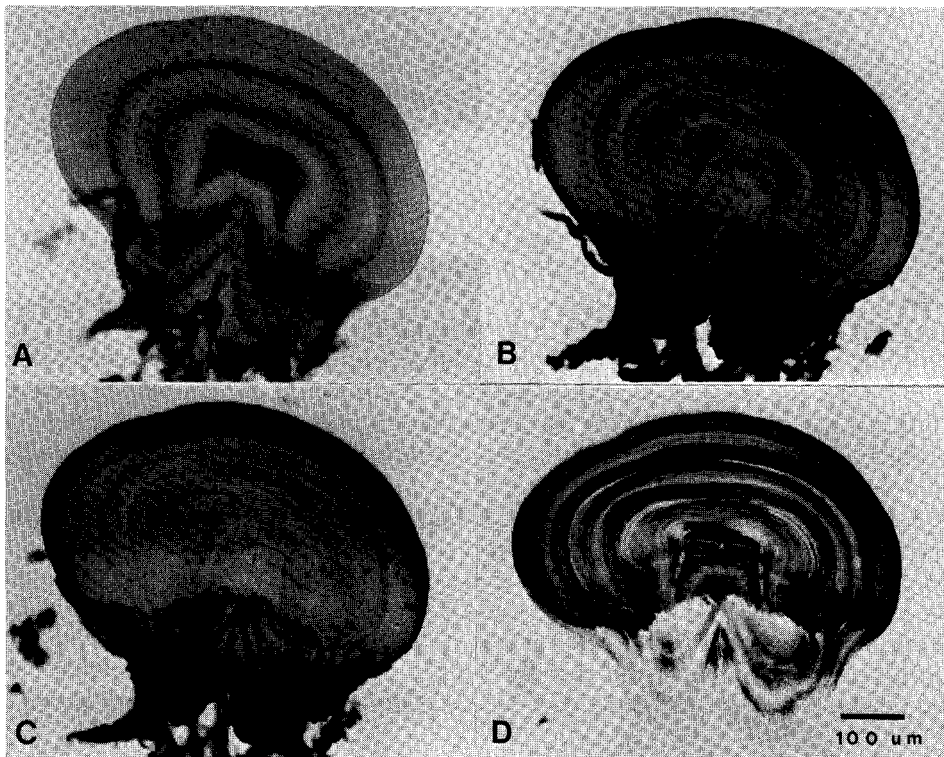


Figure 6. Coupes transversales (15 µm) de rayon de nageoire pectorale de lotte (490 mm). a: APS, b: APS + hématoxyline, c: hématoxyline, d: argent-héxaméthylènetétramine.

Figure 6. Cross sections (15 µm) of pectoral fin ray from burbot (490 mm). a: PAS, b: PAS + hematoxylin, c: hematoxylin, d: methenamine silver.

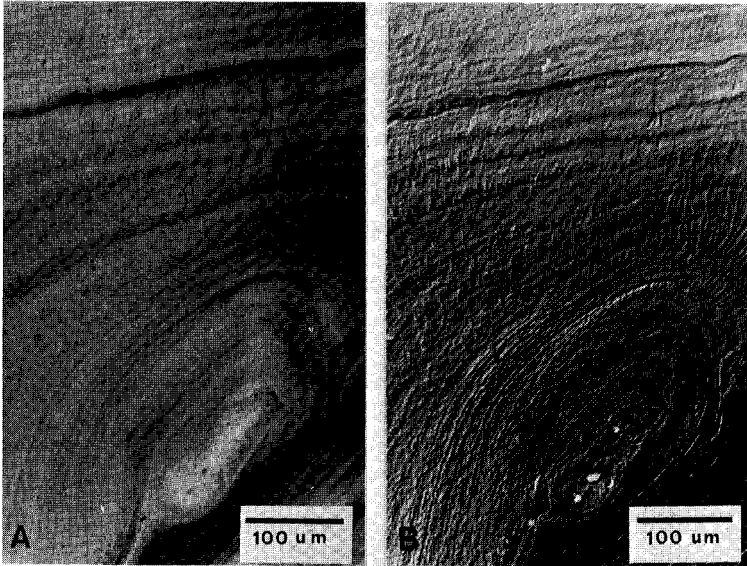


Figure 7. Coupe transversale (15 µm) du 7ème rayon branchiostège de lotte (426 mm). a: hématoxyline, b: hématoxyline et contraste de phase interférentiel.

Figure 7. Cross section (15 µm) of the seventh branchiostegal ray from burbot (426 mm). a: hematoxylin, b: hematoxylin and interference phase contrast.

dans les coupes de rayons de nageoires. D'autre part, les rayons de nageoires donnent la possibilité éventuelle de faire une estimation de l'âge sans sacrifier le poisson, en ne disséquant qu'un seul rayon.

Les côtes se sont révélées impropres à la détermination de l'âge car, chez la perche par exemple, les L.H. paraissent moins nettes du fait de la structure du tissu qui est légèrement striée. Chez la lotte, la structure de la substance fondamentale cache en grande partie les L.H. Les radiaux de lotte donnent de bonnes lignes hématoxylinophiles mais le remaniement osseux central peut, par la disparition des premières L.H., causer une sous-estimation de l'âge.

Chez la lotte, les rayons branchiostèges, au nombre de sept, se sont révélés intéressants pour la détermination de l'âge car leur diamètre est nettement supérieur à celui des rayons de nageoires. Néanmoins, leur centre est moins bien déterminé. L'orientation et l'emplacement de la coupe transversale est plus délicate à trouver. Les cinquième à septième rayons branchiostèges (fig. 7) semblent être jusqu'à présent les meilleurs. C'est le marquage aux fluorochromes (voir chapitre 5) qui nous montrera lequel des deux éléments squelettiques est le mieux adapté, chez la lotte, pour la détermination de l'âge individuel.

5. Discussion

Les méthodes histologiques à disposition peuvent mettre en évidence des structures squelettiques correspondant à des cycles biologiques annuels, qui ne sont pas ou peu

visibles sur des pièces squelettiques observées par transparence. Ceci se manifeste par exemple dans la comparaison de l'opercule et de la coupe de l'épine dorsale colorée de la perche (fig. 4). Pour certains de ces poissons, une sous-estimation de l'âge est due à une mauvaise apparence du premier annulus sur l'opercule, tandis que le premier annulus est toujours bien visible sur les coupes à l'hématoxyline. Ce qui ne veut pas dire qu'il n'y ait jamais de fausses marques de croissance sur les coupes d'épine dorsale de perche. Cependant, ces «fausses lignes» nous semblent plus faciles à identifier sur les coupes histologiques que sur les opercules.

Ces considérations semblent également être valables pour les autres espèces de poissons possédant un rayon épineux, ce que nous avons pu mettre en évidence sur la carpe et le sandre.

Pour d'autres espèces, telles que la truite et le corégone, l'application de méthodes histologiques alternatives se restreint actuellement à des vérifications occasionnelles, puisque les techniques histologiques appliquées sur ces poissons ne sont pas encore assez poussées pour être supérieures à la lecture des écailles. Nous mentionnons, néanmoins, que des sous-estimations d'âge chez ces espèces sont connues surtout pour des individus âgés, forçant certains auteurs à développer une méthode autre que la lecture des écailles [33, 37]. De même pour ces espèces, l'objectif envisagé par la mise en pratique de méthodes histologiques se révèle donc être entièrement justifié.

En ce qui concerne la lotte, il n'existe à notre connaissance, aucun travail mettant en doute l'évaluation de l'âge par les otolithes. Seul, ce fait nous a poussé à approfondir les méthodes alternatives de détermination de l'âge chez cette espèce. Les méthodes histologiques sont probablement les mieux adaptées, vu les dimensions réduites des éléments squelettiques appropriés. La forme et la dimension du centre, aussi bien que l'emplacement du premier annulus étant décisifs pour la compréhension de la coupe transversale de rayon de nageoire, nous avons entrepris l'élevage des lottes en pisciculture. Celles-ci seront marquées aux fluorochromes, puis immergées dans des eaux naturelles, ce qui nous permettra de valider la méthode par des captures-recaptures de poissons d'âge connu. Dans ce même but, des lottes adultes de provenance naturelle ont été marquées par la tétracycline [28, 29].

6. Conclusion

Les expériences préliminaires de techniques histologiques pour la détermination de l'âge individuel paraissent offrir des possibilités importantes pour compléter les techniques utilisées traditionnellement. Les travaux à entreprendre dorénavant seront axés sur la validation de méthodes standards ainsi que sur l'élimination de certains problèmes méthodiques rencontrés au cours de ce travail.

7. Résumé

L'âge des poissons se détermine, en général, par les écailles ou les otolithes, mais ces méthodes sont de plus en plus complétées par des observations d'autres éléments squelettiques tels que les rayons de nageoires. Dans cette étude, nous essayons d'adapter des méthodes histologiques plus fines et plus fiables, surtout pour les poissons dépourvus d'écailles utilisables pour la détermination de l'âge, comme par exemple la lotte (*Lota*

lota). Les marques squelettiques de croissance représentant un cycle biologique annuel sont mises en évidence par des colorations histologiques. Ce sont les lignes hématoxylinophiles (L.H.) ou lignes d'arrêt de croissance (L.A.C.). Ce travail décrit différentes méthodes de préparation pour la meilleure démonstration possible des L.A.C. pour quelques Téléostéens d'eau douce.

SUMMARY

Ageing of fish is usually done by reading scales or otoliths. In addition, ageing procedures based on other skeletal structures like fin rays are utilized more and more nowadays. In the present study we tried to employ refined and more reliable histological methods for ageing fish without readable scales such as burbot (*Lota lota* L.). Growth marks in skeletal tissues representing annual biological cycles are made visible by histological staining. These growth marks appear as hematoxylinophilous lines (L.H.) or rest lines (here called L.A.C.). This paper outlines various preparation methods for attaining the best possible appearance of the L.A.C. for some freshwater Teleosts.

REMERCIEMENTS

Nous remercions M.D. Gerdeaux de l'INRA à Thonon-les-Bains, qui nous a initié à la technique histologique des coupes de rayon de nageoire, et MM. L. Amstalden, Wilen, H. Riget, Weesen, et O. Trunz, Rorschach, qui nous ont fourni le matériel.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Ashley, K.W., et Garling, D.L.: Improved method for preparing pectoral spine sections of channel catfish for age determinations. *Prog. Fish. Cult.* 42 (2), 80–81 (1980).
- 2 Batts, B.S.: Age and growth of the Skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis* L.) in north Carolina waters. *Chesapeake Sci.* 13, 237–244 (1972).
- 3 Beamish, R.J.: Use of fin-ray sections to age walleye pollock, pacific cod, and albacore, and the importance of this method. *Trans. Am. Fish. Soc.* 110, 287–299 (1981).
- 4 Beamish, R.J., et Chilton, D.: Age determination of Lingcod (*Ophiodon elongatus*) using dorsal fin rays and scales. *J. Fish. Res. Bd Canada* 34, 1305–1313 (1977).
- 5 Beamish, R.J., et McFarlane, G.A.: The forgotten requirement for age validation in fisheries biology. *Trans. Am. Fish. Soc.* 112 (6), 735–743 (1983).
- 6 Belanger, S.E., et Hogler, S.R.: Comparison of five ageing methodologies applied to walley (*Stizostedion vitreum*) in Burt Lake, Michigan. *J. Great Lakes Res.* 8 (4), 666–671 (1982).
- 7 Boet, Ph.: Éléments d'écologie du poisson-chat (*Ictalurus melas*), du lac de Crétéil. Structure et dynamique de la population, exploitation des ressources alimentaires et production. Thèse de doctorat, Biologie animale, Université Paris 6, 18 déc. 1981, p. 1–123.
- 8 Bryuzgin, W.L.: A procedure for investigating age and growth in Reptilia. *Dokl. Akad. Nauk SSSR [n.s.]* 23 (4), 403–405 (1939).
- 9 Bulkley, R.V.: Use of branchiostegal rays to determine age of Lake trout, *Salvelinus namaycush* (Walbaum). *Trans. Am. Fish. Soc.* 89, 344–350 (1960).
- 10 Burnet, A.M.R.: An examination of the use of scales and fin rays for age determination of brown trout (*Salmo trutta* L.). *N.Z. J. mar. Freshwat. Res.* 3, 147–151 (1969).
- 11 Casselman, J.M.: Analysis of hard tissue of pike *Esox lucius* L. with special reference to age and growth. In: Bagenal, T.B. (éd.): Ageing of fish, p. 13–27. Unwin brothers, Old Woking, Surrey, U.K. 1974.
- 12 Castanet, J.: Etude histologique des marques squelettiques de croissance chez *Vipera aspis* (L.) (Ophidia, Viperidae). *Zoologica Scripta* 3, 137–151 (1974).

- 13 Castanet, J.: Quelques observations sur la présence et la structure des marques squelettiques de croissance chez les Amphibiens. *Bull. Soc. zool. Fr.* 100, 603–620 (1975).
- 14 Castanet, J.: Nouvelles données sur les lignes cimentantes de l'os. *Arch. Biol.* 92, 1–24 (1981).
- 15 Castanet, J., Meunier, F.J., et de Ricqlès, A.: L'enregistrement de la croissance cyclique par le tissu osseux chez les vertébrés poikilothermes: données comparatives et essai de synthèse. *Bull. biol. Fr. Bel.* 111 (2), 183–202 (1977).
- 16 Chilton, D., et Beamish, R.J.: Méthodes de détermination de l'âge des poissons étudiés dans le cadre du programme sur le poisson de fond de la Station de biologie du Pacifique. *Publ. spéc. can. sci. halieut. aquat.* 60, 1–102 (1983).
- 17 Deelder, C.L., et Willemse, J.J.: Age determination in fresh-water teleosts, based on annular structures in fin-rays. *Aquaculture* 1, 365–371 (1973).
- 18 Francillon, H.: Etude expérimentale des marques de croissance sur les humérus et les fémurs de Tritons crêtés (*Triturus cristatus cristatus* Laurenti) en relation avec la détermination de l'âge individuel. *Acta zool. (Stockh.)* 60, 223–232 (1979).
- 19 Gabe, M.: Techniques histologiques. Masson, Paris 1968.
- 20 Gerdeaux, D., et Champigneulle, A.: Note sur la croissance et la maturité de la perche (*Perca fluviatilis* L.) dans le lac Léman. Rapport Institut de Limnologie I.L. 83-3, INRA, Thonon-les-Bains 1983.
- 21 Juster, M., Laval-Jeantet, M., et Oligo, N.: Coloration et microradiographie, une nouvelle technique d'étude de l'os non décalcifié. *J. Microsc.* 4, 461–484 (1965).
- 22 Klevezal, G.A.: On the relationship between the growth rate and formation of annual layers in mammal bone. *Zh. obshch. Biol.* 33, 166–175 (1972).
- 23 Klevezal, G.A., et Kleinenberg, S.E.: Age determination of mammals from annual layers in teeth and bones (1967). Traduit du russe par Israel Prog. Sci. Transl., Jerusalem 1969, p. 1–142.
- 24 Magnin, E., et Fradette, C.: Croissance de la barbue (*Ictalurus punctatus*) du fleuve Saint-Laurent près de Québec. *J. Fish. Res. Bd Canada* 32, 1867–1870 (1975).
- 25 Margenau, T.L.: Modified procedure for aging walleyes by using dorsal spine sections. *Prog. Fish-Cult.* 44 (4), 204 (1982).
- 26 Marzolf, R.C.: Use of pectoral spines and vertebrae for determining age and rate of growth of the channel catfish. *Wildl. Mgmt* 19, 243–249 (1955).
- 27 Matrajt, H., Bordier, Ph., Martin J., et Hioco, D.: Technique pour l'inclusion des biopsies osseuses non décalcifiées. *J. Microsc.* 6, 499–504 (1967).
- 28 Meunier, F.: La technique de marquage vital des tissus squelettiques des poissons. *Bull. fr. Piscic.* 225, 51–57 (1974).
- 29 Meunier, F., et Boivin G.: Divers aspects de la fixation du chlorhydrate de tétracycline sur les tissus squelettiques de quelques Téléostéens. *Bull. Soc. zool. Fr.* 99, 495–504 (1974).
- 30 Meunier, F.J., et Pascal, M.: Quelques données comparatives sur la croissance périodique des tissus squelettiques chez les osteichthyens. *Bull. Soc. zool. Fr.* 105 (2) (1980).
- 31 Meunier, F.J., et Pascal, M.: Etude expérimentale de la croissance cyclique des rayons de nageoire de la carpe (*Cyprinus carpio* L.). Résultats préliminaires. *Aquaculture* 26, 23–40 (1981).
- 32 Meunier, F.J., Pascal, M., et Loubens, G.: Comparaison de méthodes squelettochronologiques et considérations fonctionnelles sur le tissu osseux acellulaire d'un osteichthyen du lagon néocalédonien, *Lethrinus nebulosus* (Forsk., 1775). *Aquaculture* 17, 137–157 (1979).
- 33 Mills, K. H., et Beamish, R. J.: Comparison of fin-ray and scale age determination for lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) and their implications for estimates of growth and annual survival. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37, 534–544 (1980).
- 34 Pearse, A. G. E.: Histochemistry theoretical and applied, vol. 1, p. 1–759. Ed. J. A. Churchill (1968).
- 35 Peabody, F. E.: Annual growth zones in living and fossil vertebrates. *J. Morph.* 108, 11–62 (1961).
- 36 Prince, E. D., Lee, D. W., et Javech, J. C.: Internal zonations in sections of vertebrae from Atlantic bluefin tuna (*Thynnus thynnus*), and their potential use in age determination. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42, 938–946 (1985).
- 37 Shirvell, C. S.: Validity of fin-ray ageing for brown trout. *J. Fish Biol.* 18, 377–383 (1981).
- 38 Sikstrom, C. B.: Otolith, pectoral fin ray and scale age determinations for arctic grayling. *Prog. Fish-Cult.* 45 (4), 220–222 (1983).
- 39 Sneed, K. E.: A method for calculating the growth of channel carfish (*Ictalurus lacustris punctatus*). *Trans. Am. Fish. Soc.* 80, 174–183 (1950).

- 40 Witt, A.: An improved instrument to section bones for age and growth determinations of fish. *Prog. Fish-Cult.* 23, 94–96 (1961).
- 41 Yuen Chwan-fuh, Lin King-pang, Liu Jen-hua et Chin An-ling: On the age and growth of the chinese anchovy, *Coilia ectenes*, from the Yangtze river. *Acta hydrobiol. sinica* 6, 285–297 (1978).

Adresse des auteurs: Colette Grieder-Kuhn, Seenforschungslaboratorium der EAWAG/ETH, CH-6047 Kastanienbaum – Dr. Christian Rühlé, Fischerei- und Jagdverwaltung des Kantons St. Gallen, Burggraben 26, CH-9001 St. Gallen.