**TECHNIQUE DE MARQUAGE EN MASSE DE CIVELLES (*Anguilla Anguilla* L.) PAR BALNÉATION RAPIDE DANS LE FLUOROCHROME.
APPLICATION AU MARQUAGE A LA TÉTRACYCLINE
DE 500 KG DE CIVELLES**

**Marina ALCOBENDAS (1), Frédérique LECOMTE (1), J. CASTANET (1),
F.J. MEUNIER (1), P. MAIRE (2) ET M. HOLL (3)**

avec la collaboration technique de G. PANON (2)

(1) UA CNRS N° 1137, Équipe de Recherche "Formations squelettiques", Laboratoire d'Anatomie Comparée, Université Paris 7, 2 place Jussieu, 75251 PARIS Cedex 05.

(2) Conseil Supérieur de la Pêche, Délégation Régionale N° 3, 18 rue de Nomeny, 57158 MONTIGNY-LES-METZ.

(3) Conseil Supérieur de la Pêche, 134 avenue de Malakoff, 75016 PARIS.

Reçu le 3 octobre 1990

Accepté le 22 avril 1991

Received 3 October, 1990

Accepted 22 April, 1991

RÉSUMÉ

L'immersion des civelles (*Anguilla anguilla* L.) dans une solution hyperosmotique (5 % de chlorure de sodium) pendant 3'30 puis dans une solution contenant 1 % de chlorhydrate de tétracycline (CHTC) ou 2 % de fluorescéine (DCAF) pendant encore 3'30, entraîne une accélération de la vitesse d'entrée de ces deux marqueurs vitaux dans l'organisme des poissons et un marquage rapide des organes calcifiés (vertèbres et otolithes). Des résultats similaires sont obtenus en plaçant les civelles dans une solution contenant à la fois 5 % de chlorure de sodium et 1 % de CHTC ou 2 % de DCAF pendant 3'30. Le choc osmotique est proposé comme une avancée technique pour le marquage vital en masse des larves, des alevins et des stades juvéniles car il permet d'abaisser considérablement le temps de contact nécessaire entre les poissons et la solution de fluoromarqueur.

Nous présentons une application de cette technique pour le marquage de 500 kg de civelles avec de la tétracycline. La réalisation de cette manipulation a demandé une journée et demie de travail à 5 personnes. Les résultats obtenus sont de très bonne qualité puisque l'on obtient 100 % de spécimens marqués dont 70 % le sont fortement. Il est donc possible de marquer une grande quantité de civelles dans un laps de temps réduit. Le problème de la reconnaissance *in situ* des animaux ainsi marqués est discuté.

MASSAL LABELLING OF ELVERS WITH FAST BALNEATION IN FLUOROCHROMES. APPLICATION TO TETRACYCLINE LABELLING OF 500 KG OF ELVERS.

SUMMARY

Immersion of elvers (*Anguilla anguilla* L.) in an hyperosmotic solution (5 % sodium chloride) for about 3 and a half minutes, and then immersing them in another solution containing 1 % of tetracycline chlorhydrate (CHTC) or 2 % of calcein (DCAF) during 3 and a half minutes exposure, resulted in a fast uptake of these two vital fluorochroms into the fish and a labelling of calcified organs (vertebrae and otoliths). Similar results were also obtained by placing the fish in a solution containing both 5 % of sodium chloride and 1 % CHTC or 2 % DCAF for 3

and a half minutes. This osmotic shock is proposed as a practical technic for vital mass labelling of larvae or fry since the simultaneous osmotic shock and balneation is a significant improvement of the method by reducing considerably the time of contact between fishes and labelling solution.

We propose an application of this technic for labelling 500 kg of elvers with tetracycline. The experiment needed one and a half day for five persons to carry out the operation. The results are of very good quality, since we obtain 100 % of labelled specimens, 70 % of which are highly labelled. Then it is possible to label an important quantity of fishes in a reduced time. The problem of *in situ* recognition of the labelled animals is discussed.

1. INTRODUCTION

Les études écologiques chez les poissons (migration, croissance, structure et dynamique de population...) nécessitent des techniques de reconnaissance des animaux dans le milieu naturel. De nombreuses méthodes ont été mises au point, à cet effet, depuis de longues années. Citons par exemple celles relevant de la technique des "marquages-recaptures" : marques externes, tatouages, marques chimiques internes par injection sous-cutanée (voir JAKOBSON, 1970 ; LAIRD et STOTT, 1978 ; HERBINGER *et al.*, 1990) ; toutefois ce procédé ne s'applique, en général, qu'à des animaux de taille relativement importante, c'est-à-dire des subadultes et des adultes. En outre, les manipulations qu'elles entraînent sont souvent à la fois facteur de stress pour les animaux et consommatrices de temps pour les expérimentateurs.

Pour réduire la lourdeur des manipulations tout en permettant la préparation d'un plus grand nombre d'animaux, de nouvelles méthodes ont été proposées. Elles permettent, de plus, de diminuer les prix de revient et les stress, tout en travaillant sur des petits animaux, qu'il s'agisse d'espèces de petite taille, des juvéniles, voire des stades larvaires ou même embryonnaires. Ces méthodes sont :

- les implants magnétiques (LEARY et MURPHY, 1975 ; CHAMPIGNEULLE *et al.*, 1987) ;
- les techniques de choc thermique provoquant une strie caractéristique sur les otolithes (MOSEGAARD *et al.*, 1987).
- le marquage vital en masse (TSUKAMOTO, 1985 ; NAGIEC *et al.*, 1988 ; RUHLÉ et GRIEDER, 1989).

Cette dernière technique a donné lieu à diverses études expérimentales et semble la plus prometteuse des trois comme moyen de marquage en masse des animaux. Elle dérive des techniques de marquage vital mises au point chez les poissons (WEBER et RIDGWAY, 1962, 1967) essentiellement pour l'étude de la dynamique de la croissance du squelette. Le marquage vital est utilisé le plus souvent dans des études concernant le tissu osseux pour évaluer différents aspects de la dynamique de l'ostéogenèse et du remaniement (LOPEZ, 1970 ; SIMMONS *et al.*, 1970 ; BOIVIN et MEUNIER, 1978). Il est également fréquemment utilisé comme moyen de validation des lectures d'âge par la squeletteochronologie (pour les Ostéichthyens consulter VAN COILLIE, 1967 ; CAMPANA et NEILSON, 1982 ; NEILSON et GEEN, 1982 ; BEAMISH et McFARLANE, 1983 ; BEAMISH *et al.*, 1984 ; McFARLANE et BEAMISH, 1987).

Les marqueurs vitaux sont des substances qui se fixent sélectivement sur les surfaces squelettiques en voie de minéralisation (os, dents, cartilages calcifiés...) au moment de l'administration du produit. Cette fixation est pérenne. Les substances utilisées présentent, en outre, la propriété d'absorber les rayons UV pour émettre une fluorescence dans le spectre visible. Cette propriété est utilisée pour le repérage du marqueur à l'échelle microscopique (MILCH *et al.*, 1957 ; MEUNIER, 1972, 1974).

Les modalités d'utilisation des marqueurs, d'abord standardisées chez les Tétrapodes, ont été rapidement adaptées aux poissons osseux (KOBAYASHI *et al.*, 1964 ;

WEBER et RIDGWAY, 1967 ; MEUNIER, 1972, 1982 ; MEUNIER et BOIVIN, 1974, 1978 ; DEKKER, 1986 ; McFARLANE ET BEAMISH, 1987). Mais tous ces travaux reposent essentiellement sur l'administration des produits par injection, ce qui, en pratique, limite le nombre d'animaux que l'on peut traiter. D'autres modes d'administration permettent d'augmenter ce nombre de façon significative. C'est ce qu'on appelle le "marquage en masse". On fait alors appel soit à l'ingestion des fluorochromes avec les aliments (WEBER et RIDGWAY, 1967 ; JONES, 1969), soit à la technique de balnéation (présence du marqueur en solution dans le milieu) (WEBER et RIDGWAY, 1962 ; CHOATES, 1964 ; TSUKAMOTO, 1985, 1989 ; DABROWSKI et TSUKAMOTO, 1986 ; TSUKAMOTO *et al.*, 1989). Dans ces deux cas, la difficulté essentielle réside dans le contrôle de la quantité minimum de fluorochrome indispensable à un bon marquage. Ce seuil est beaucoup moins facile à maîtriser qu'avec des injections (MEUNIER et BOIVIN, 1978).

Chez les poissons, l'introduction du marqueur dans l'aliment risque de donner des résultats décevants si le produit diffuse trop rapidement dans le milieu avant que le poisson ne se nourrisse. En outre, l'épithélium intestinal est plus ou moins "perméable" aux molécules du marqueur ; ce qui influe directement sur les quantités à administrer pour obtenir un marquage efficace. Les meilleurs résultats ont en fait été obtenus chez des espèces planctonophages (Corégones) nourries de crustacés planctoniques préalablement marqués à la tétracycline (NAGIEC et NAGIEC, 1983 ; NAGIEC *et al.*, 1985).

La balnéation (bains de durée déterminée dans des solutions de concentration définie) dans le marqueur paraît plus prometteuse même s'il est difficile, là aussi, d'évaluer la quantité de substance active effectivement absorbée (par l'épithélium branchial et tégumentaire ?) par le poisson. 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 tissus squelettiques, dans des conditions biologiques satisfaisantes pour les alevins (WEBER et RIDGWAY, 1962 ; SCHMITT, 1984 ; TSUKAMOTO, 1985 ; DABROWSKI et TSUKAMOTO, 1986 ; KINGSFORD et MILICICH, 1987 ; WILSON *et al.*, 1987 ; TSUKAMOTO, 1988). Cette technique a même été utilisée sur des œufs embryonnés non éclos de corégone (DABROWSKI et TSUKAMOTO, 1986) ou encore, sur des œufs fraîchement pondus de truite (RUHLÉ et GRIEDER, 1989). Toutefois, même si ces techniques permettent d'augmenter nettement les quantités de poissons traités, elles sont encore trop lourdes pour préparer plusieurs centaines de kilos d'alevins puisque le temps de balnéation s'étale de 12 à 48 heures selon les espèces et les concentrations de marqueurs utilisées.

Nous proposons une amélioration de la technique de balnéation normale qui permet de réduire considérablement le temps d'action minimum des marqueurs chez les civelles, grâce à la réalisation d'un "choc osmotique". Cette méthode, mise au point sur des lots de 50 spécimens, est ensuite adaptée au traitement de plusieurs dizaines de kilos de civelles.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Mise au point de la technique de balnéation rapide

2.1.1. Matériel

Les expériences ont été faites sur des civelles capturées (fin de l'hiver-début du printemps) dans le cours inférieur de la Loire, au début de leur migration anadrome. Les animaux, d'une taille moyenne de 7 cm, sont au stade V_B à VI_{AO} selon la classification de ELIE *et al.*, (1982). Chaque lot est constitué de 50 civelles. Après traitement par balnéation, les lots sont maintenus dans un aquarium d'eau courante, dans un volume d'environ 20 litres, à une température de 12 ± 2 °C. Les animaux ne sont pas nourris pendant les 15 jours d'observation post-expérimentale.

2.1.2. Méthode de marquage

Le principe de la méthode de marquage est de faire pénétrer rapidement une quantité suffisante de fluoromarqueur dans l'organisme des poissons et ce, simultanément, pour un nombre important de spécimens.

Deux procédés de marquage en masse des civelles, par choc osmotique, ont été testés :

- choc osmotique (3,30 mn) suivi de la balnéation (3,30 mn) dans le fluorochrome ;
- choc osmotique et balnéation simultanés (durée : 3,30 mn).

Les lots de 50 civelles sont balnés dans un volume de 100 ml de solution de fluorochrome.

Le choc osmotique proprement dit a été réalisé avec du chlorure de sodium (NaCl) à 5 %.

Deux fluoromarqueurs classiques des tissus squelettiques ont été utilisés :

a) le chlorhydrate de tétracycline (=CHTC) à la concentration de 1 %.

b) la fluorescéine ou "2,7-Bis<-bis(carboxymethyl)-aminomethyl>-fluorescein" (=DCAF) à la concentration de 2 % dans du bicarbonate de soude à 2 % (ce dernier permettant d'obtenir une solubilisation complète du produit). Pour le choc osmotique et la balnéation simultanés avec la fluorescéine, le chlorure de sodium a été utilisé à 3 % afin de tenir compte de l'élévation de la pression osmotique induite par le bicarbonate de soude.

Deux séries de contrôles ont été réalisées parallèlement aux expériences décrites ci-dessus :

a) contrôles sans fluoromarqueur pour tester l'effet du seul choc osmotique sur la survie des civelles : un lot de civelles a été placé 3,30 mn dans une solution de NaCl à 5 %, un deuxième 10 mn dans une solution de NaCl à 5 %, un dernier 5 mn dans une solution de NaCl à 10 %.

b) contrôles pour disposer de données sur la mortalité des civelles en élevage, hors expérimentation : un lot témoin a été placé dans l'eau du robinet, un autre dans une solution de bicarbonate à 2 %.

2.1.3. Tests de mortalité et de marquage

La mortalité dans les différents lots a été suivie, sur une période de 15 jours après la fin du traitement, par le décompte quotidien des spécimens trouvés morts chaque matin.

La qualité du marquage a été analysée sur les otolithes et les vertèbres caudales. Quinze à vingt spécimens de chaque lot sont fixés dans l'alcool 70° au bout de 15 jours de surveillance. Les vertèbres caudales sont débarrassées à la pince de la musculature et montées entre lame et lamelle dans une résine hydrophobe (Eukitt), après une désydratation totale des pièces par l'éthanol. Les otolithes sont également montés entre lame et lamelle dans cette résine après extraction et séchage rapide. Les préparations obtenues sont observées avec un microscope à fluorescence en lumière bleue (filtre d'excitation BG 12 et filtre d'arrêt K 530). La qualité des marqueurs est classée en quatre catégories : négatif, faible, bon, très bon.

2.2. Réalisation de l'opération en "grand champ"

Afin de procéder à des alevinages dans le Rhin, 500 kg de civelles ont été préparés par balnéation avec choc osmotique, dans une solution de chlorhydrate de tétracycline. Les traitements ont été effectués dans les installations des Établissements BEAUR, fournisseur des civelles ; ainsi les stress dûs aux manipulations ont été réduits au maximum, ce qui a très probablement facilité le succès de l'opération de marquage. La balnéation a eu lieu les 10 et 11 mars 1989 et a demandé une journée et demie de travail à 5 personnes.

Les civelles, capturées dans l'estuaire de la Loire par des pêcheurs professionnels, dans les 4 à 5 jours précédant l'opération de marquage, ont été conservées en bonnes conditions physiologiques dans des bassins appropriés. La longueur totale moyenne des civelles était de 6,9 cm pour un poids de 256 mg chacune ; elles étaient au stade VI_{A1} selon la classification de ELIE *et al.*, (1982).

Les civelles ont été traitées par lots de 5 kg placés dans des sacs perméables, fabriqués avec du voilage de nylon d'une maille de 1 mm de côté. Dix sacs de 5 kg sont plongés successivement, deux par deux, dans un volume de 50 litres de solution colorante. Cette solution, renouvelée complètement tous les 50 kg de civelles, est préparée extemporanément par quantité de 100 l (100 litres d'eau, 1 kg de tétracycline et 5 kg de sel de mer, le tout agité pendant 45 minutes avec une hélice fixée en bout d'arbre d'un moteur électrique). Les six premiers sacs restent 3'30 dans la solution, les quatre derniers 4' à 5' pour compenser l'appauvrissement éventuel en tétracycline de celle-ci.

Après le marquage, les civelles sont remises dans un bassin de stockage jusqu'au moment de leur conditionnement pour le transport selon la technique mise au point par les Établissements BEAUR (lots de 1,5 kg, à sec en cassette de polystyrène avec un noyau de glace). Elles sont ensuite convoyées en camion isotherme sur les lieux de l'alevinage. Les civelles ont été déversées le 14 mars aux points de déversement habituels dans le Rhin.

3. RÉSULTATS-DISCUSSION

3.1. Mise au point de la technique de balnéation rapide

3.1.1. Incidence de la balnéation-choc osmotique sur la survie des civelles

Les lots soumis au seul choc osmotique ne présentent pas une mortalité supérieure à celle des deux lots témoins (eau, NaHCO₃ ; Tableau I). Le suivi post-expérimental des lots traités avec les fluoromarqueurs ne révèle pas non plus de mortalité supérieure à celle observée pour les lots témoins. On conclut à l'absence d'effet toxique de la balnéation-choc osmotique sur les civelles. Des civelles gardées en élevage pendant plusieurs mois après l'expérience présentent en effet une croissance normale.

Tableau I : Mortalité des civelles et qualité du marquage des otolithes et des vertèbres avec la tétracycline (CHTC) et la fluorescéine (DCAF) ; N = pourcentage de spécimens marqués ; Q = proportion des spécimens présentant un marquage bon ou très bon.

Table I : Mortality of the elvers and intensity of the fluorescent mark on the otoliths and the vertebrae with tetracycline (CHTC) and calcein (DCAF) ; N = percent of labelled specimens ; Q = proportion of specimens with good or very good labelling.

Marqueur	Cible		Choc puis balnéation	Choc + balnéation	Témoins	Mortalité
CHTC	Otolithe	mortalité	1/50	0	eau	0
		N	90 %	100 %	NaHCO ₃ 2 %	0
		Q		3/5		
	Vertèbre	N	50 %	100 %		
		Q		4/5	NaCl 5 %, 3'5	0
DCAF	Otolithe	mortalité	0	0	NaCl 5 %, 10'	0
		N	60 %	75 %	NaCl 10 %, 5'	1/30
		Q	2/5	2/3		
	Vertèbre	N	45 %	100 %		
		Q	1/6	4/5		

3.1.2. Analyse du marquage

Les deux marqueurs sont retrouvés sur les marges des otolithes et des vertèbres (fig. 1, 2) dans les différentes séries expérimentales. On obtient 100 % de spécimens marqués avec la tétracycline et la fluorescéine. On ne met pas en évidence de différence importante, pour les deux combinaisons (choc osmotique suivi de la balnéation ou choc osmotique et balnéation simultanés), dans la qualité des marquages pour les otolithes (Tableau I). En revanche, pour les vertèbres, les résultats sont meilleurs avec le procédé en un temps. Ce dernier sera donc préféré à celui en deux temps, d'autant plus qu'il diminue significativement la durée de la manipulation et réduit également le stress occasionné aux animaux.

Alors que la fluorescéine est couramment utilisée pour le marquage du squelette des poissons (MEUNIER, 1974 ; MEUNIER et BOIVIN, 1978 ; MEUNIER et PASCAL, 1981 ; BOUJARD et MEUNIER, 1991), un marquage des otolithes par ce fluorochrome n'a été signalé qu'une seule fois dans la littérature pour *Sciaenops ocellatus*, *Micropogonias undulatus* et *Leiostomus xanthurus* (WILSON *et al.*, 1987).

On note que pour un même type de pièce (otolithe ou vertèbre), la tétracycline donne toujours des résultats identiques ou meilleurs à ceux de la fluorescéine pour ce qui concerne l'intensité du marquage (fig. 1). Pour ces deux marqueurs l'otolithe fournit des résultats égaux ou inférieurs à ceux obtenus pour la vertèbre (Tableau I).

Les civelles sont un matériel résistant et favorable pour des expériences de marquage en masse de populations. Les conditions physiologiques particulières de ces animaux en cours de migration anadrome au moment de leur capture ne sont pas un obstacle à leur balnéation. Ceci n'est peut-être pas surprenant pour une espèce dont le cycle biologique se déroule à la fois en milieu marin et en eau douce. Toutefois, nous n'avons aucune base de comparaison avec d'autres téléostéens puisqu'à l'heure actuelle seule l'anguille a fait l'objet d'une expérimentation de marquage vital accompagné d'un choc osmotique.

La technique du choc osmotique déjà utilisée pour la vaccination en masse de populations de truites (AMEND et FENDER, 1976) est transposable pour le marquage en masse de civelles. Le gain de temps par rapport à la simple balnéation est considérable. En effet, chez les civelles un marquage en balnéation simple (solution de CHTC de 100 à 300 ppM ; DCAF de 100 à 300 ppM) est obtenu avec des bains de 12 à 48 h selon les concentrations (résultats non publiés). Ces valeurs sont du même ordre que celles données par les auteurs pour la balnéation simple chez divers autres Téléostéens (HETTLER, 1984 ; SCHMITT, 1984 ; TSUKAMOTO, 1985 ; DABROWSKI et TSUKAMOTO, 1986). Le choc osmotique entraîne donc une accélération, de 300 à 400 fois environ, des processus d'absorption des fluoromarqueurs et de dépôt sur les tissus minéralisés. C'est certainement un phénomène osmotique naturel équivalent qui intervient dans le cas de marquage d'œufs de truite au moment de la fécondation (RUHLÉ et GRIEDER, 1989).

Le lieu de passage des fluoromarqueurs ne peut pas être déterminé avec nos expériences. Dans le cas de la vaccination des truites (AMEND et FENDER, 1976), ce serait préférentiellement par le système de la ligne latérale et accessoirement par l'épithélium branchial que se ferait l'absorption des sérumalbumines. Des analyses restent à faire pour tester cette hypothèse dans le cas des fluorochromes chez la civelle. Quoi qu'il en soit, nos expériences confirment l'accessibilité rapide des marqueurs aux tissus minéralisés dès lors qu'ils sont entrés dans les liquides internes de l'organisme des poissons (MEUNIER, 1982).

Figure 1 : A) Otolithe d'une civelle marquée par la tétracycline (balnéation et choc osmotique simultanés).

B) Otolithe d'une civelle marquée par la fluorescéine (balnéation et choc osmotique simultanés).

C) Otolithe d'une civelle témoin (Barre = 100 μ m).

Figure 1 : A) Otolith of a tetracycline labelled elver (balneation and osmotic shock simultaneously).

B) Otolith of a calcein labelled elver (balneation and osmotic shock simultaneously).

C) Control otolith (Bar = 100 μ m).

Figure 2 : A) Extrémité caudale de la colonne vertébrale d'une civelle marquée par la tétracycline.

B) Vertèbres caudales d'une civelle marquée par la fluorescéine.

L'intensité du marquage est inférieure à celle obtenue avec la tétracycline (Barre = 100 μ m).

Figure 2 : A) Caudal extremity of the vertebral axis of an elver labelled with tetracycline.

B) Caudal vertebrae of an elver labelled with calcein.

The intensity of the labelling is weaker than with tetracycline (Bar = 100 μ m).

Figure 3 : Otolithe d'une anguillette marquée à la tétracycline (lors de l'alevinage en Mars 1989) et recapturée à Kembs en Avril 1990. On observe que le diamètre de l'anneau fluorescent est proche de celui des civelles de la figure 1 A au moment de l'alevinage (Barre = 100 μ m).

Figure 3 : Otolith of a young eel labelled with tetracycline (elvers labelled in March 1989) recaptured at Kembs in April 1990. The diameter of the fluorescent ring is close to the one of the labelled elver of figure 1 A (Bar= 100 μ m).

3.2. Opération en "grand champ"

Les opérations de balnéation se sont effectuées dans de bonnes conditions. Aucune augmentation de la mortalité par rapport à des témoins non traités et conservés dans les mêmes conditions de stockage, n'a été constatée dans les 48 h suivant l'opération. Ce résultat confirme donc ceux obtenus au laboratoire, d'une part sur des lots de 50 civelles, d'autre part sur des lots de 500 g (soit environ 1500 civelles), pour la mise au point de la présente manipulation et qui avaient montré l'absence de mortalité.

Pendant le traitement balnéation-choc osmotique, les civelles rejettent un abondant mucus. Au retour dans le bac de stockage, après le traitement, elles présentent un comportement de nage normal.

Un contrôle de l'efficacité du marquage a été fait sur un échantillon de civelles pris dans les deux bacs de stockage. L'étude des otolithes et des vertèbres caudales, au microscope à fluorescence, montre un succès total du marquage puisque nous avons 100 % de spécimens présentant des pièces marquées, dont seulement 30 % le sont faiblement. En outre, si l'on tient compte de la rapidité des opérations, notre méthode de marquage en masse s'avère d'un grand intérêt. Il est dès maintenant possible d'envisager d'utiliser une opération similaire avec d'autres espèces dès lors que les alevins supportent le choc osmotique et le marqueur fluorescent utilisé.

Le problème essentiel dans la méthodologie proposée concerne la reconnaissance, en milieu ouvert, des poissons marqués dès lors qu'ils se mélangent aux populations naturelles. En effet, le marquage chimique des tissus minéralisés du squelette par des fluorochromes ne laisse aucune marque externe visible, notamment dans le cas de la tétracycline. Il est donc indispensable de prélever l'un des organes cibles pour contrôler la présence effective du marqueur et reconnaître, ainsi, son caractère expérimental. Pour les études en milieu naturel, la plupart des poissons offrent la possibilité de prélèvement d'éléments du dermosquelette (écailles ou rayons de nageoires) sans sacrifier les animaux. Dans le cas des anguilles, les écailles ne semblent pas intéressantes. En effet, leur petite taille et leurs relations intimes avec le derme rendent délicat un prélèvement rapide non traumatisant. En outre, elles se développent assez tard et sont inexistantes sur les stades de développement de type "civelle" (JELLYMAN, 1979). Il semble préférable d'envisager le prélèvement de rayons de nageoire. Cependant, la tétracycline, sensible à la lumière, risque de disparaître des pièces squelettiques se trouvant en position superficielle dans les organismes, notamment les écailles (LAIRD et STOTT, 1978 ; MEUNIER et SIRE, observations non publiées) et les rayons de nageoire. Il faudra donc utiliser un organe plus profond, otolithe ou vertèbre par exemple, mais de ce fait, sacrifier l'animal. Le marquage du squelette par des fluorochromes, et notamment la tétracycline, a une forte rémanence

(WEBER et RIDGWAY, 1967 ; NAGIEC *et al.*, 1985) et ne disparaît qu'à partir du moment où la structure support est elle-même détruite par des phénomènes d'érosion-reconstruction. De fait, chez de nombreux Téléostéens, particulièrement chez l'anguille, les régions périchordales du corps vertébral ne sont pratiquement pas soumises à ces processus. Il est donc permis d'espérer retrouver le marqueur sur les vertèbres après un temps assez long. Il en va de même des otolithes qui sont des structures à croissance continue qui ne présentent pas ou peu (MUGIYA et UCHIMURA, 1989) de phénomènes de résorption. Dans les deux cas, il sera sans doute nécessaire de préparer des tranches de matériel non décalcifié pour avoir une meilleure qualité d'observation du marqueur. En revanche, en milieu fermé contrôlé, dès lors que l'on a la maîtrise des déversements d'animaux dans des bassins, les difficultés de reconnaissance des individus expérimentaux, exposées ci-dessus, sont considérablement diminuées.

En pratique, à la suite de l'expérimentation "grand champ" trois lots d'anguillettes capturés l'un à Kembs et les deux autres à Rhinau sur le Rhin, respectivement en Avril 1990 et en Juillet et Octobre 1990, ont révélé la présence de cinq spécimens avec des otolithes marqués par la tétracycline. La comparaison de ces otolithes avec ceux des civelles expérimentales montrent des marques fluorescentes identiques (fig. 1A et 3). Un résultat positif de capture d'anguillettes marquées, quinze mois après un alevinage de civelles traitées à la tétracycline par balnéation-choc osmotique, dans un étang de la Somme (milieu semi-fermé) vient confirmer la faisabilité et l'intérêt de cette méthode de marquage en masse pour des expériences de dynamique de populations ichtyennes même en milieu ouvert.

4. CONCLUSION

La technique du marquage vital en masse de jeunes stades de développement de poissons est à l'heure actuelle en plein développement comme le montre l'enrichissement régulier de la bibliographie par de nouveaux résultats de ce type. Cependant, il ressort de ces différentes études que les auteurs pratiquent ce que nous appellerons la "balnéation simple" faisant intervenir des doses optimales de marqueur (correspondant à celles établies dans les expériences d'administration par injection) avec des temps d'action moyens de l'ordre de 24 heures.

La mise au point d'une balnéation avec choc osmotique simultané constitue un apport conséquent à la méthode en permettant de réduire d'environ 3 à 400 fois la durée de la balnéation. Le succès sur le plan technique de la mise en œuvre de notre expérience en grand champ montre qu'il devient également possible de traiter un nombre élevé d'animaux juvéniles avec une main d'œuvre limitée dans un temps court. Les applications d'une telle technique, soit pour des travaux expérimentaux sur la croissance, soit pour des études écologiques, devraient être développées sur d'autres espèces.

Sans sous-estimer les difficultés inhérentes à la reconnaissance *in natura* des spécimens marqués par rapport aux non-marqués, notre technique de marquage vital en masse par balnéation rapide de jeunes alevins doit pouvoir contribuer, dans certaines situations, à l'amélioration des protocoles expérimentaux, soit en milieu ouvert, soit en milieu fermé. En tout état de cause elle présente un intérêt non négligeable dans les travaux de laboratoire.

5. REMERCIEMENTS

Nous exprimons notre gratitude à M. MABIT, Directeur des Établissements BEAUR (44400 REZÉ) pour les facilités qu'il a mises à notre disposition dans la réalisation du marquage des 500 kg de civelles.

Nous remercions les Établissements SANDOZ qui ont fourni gracieusement le chlorhydrate de tétracycline.

Notre travail a bénéficié d'une aide du Conseil Supérieur de la Pêche : contrat du 30 juin 1988.

6. BIBLIOGRAPHIE

- AMEND D.F., FENDER D.C., 1976. Uptake of bovine serum albumin by rainbow trout from hyperosmotic solutions : a model for vaccinating fish. *Science*, 192, 793-794.
- BEAMISH R.J., McFARLANE G.A., 1983. The forgotten requirement for age validation in fisheries biology. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 112, 735-743.
- BEAMISH R.J., McFARLANE G.A., DHILTON D.E., 1984. Use of oxytetracycline and other methods to validate a method of age determination for sablefish in Proc. Intern. Sablefish Sympos., Alaska Sea Grant Report, 83-3, 95-116.
- BOIVIN G., MEUNIER F.J., 1978. Bone formation and fluorescent labelling in teleost fishes. *Symp. "Tissus calcifiés des Poissons"*, Brest, 12-13 Mai 1978, 5p.
- BOUJARD T., MEUNIER F.J., 1991. Croissance de l'épine pectorale, histologie osseuse et dimorphisme sexuel chez l'atipa, *Hoplosternum littorale* Hancox, 1828 (Callichthyidae, Siluriforme). *Cybium*, 15, 55-68.
- CAMPANA S.E., NEILSON J.D., 1982. Daily growth increments in otoliths of starry flounder (*Platichthys stellatus*) and the influence of some environmental variables in their production. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39, 937-942.
- CHAMPIGNEULLE A., ESCOMEL J., LAURENT Ph., 1987. Marquage d'ombles chevalier (*Salvelinus alpinus*) de petite taille par injection de micromarques magnétisées. *Bull. Fr. Pêche Pisc.*, 304, 22-31.
- CHOATES J., 1964. Use of tetracycline drugs to mark advanced fry and fingerling brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 93, 309-311.
- DABROWSKI K., TSUKAMOTO K., 1986. Tetracycline tagging in coregonid embryos and larvae. *J. Fish Biol.*, 29, 691-698.
- DEKKER W., 1986. Age reading of european eels using tetracycline labelled otoliths. *Inter. Coun. Explor. Sea*, 16, 1-14.
- ELIE P., LECOMTE-FINIGER R., CANTRELLE I., CHARLON N., 1982. Définition des limites des différents stades pigmentaires durant la phase civelle d'*Anguilla anguilla* L. (Poisson téléostéen anguilliforme). *Vie Milieu*, 32, 149-157.
- HERBINGER C.M., NEWKIRK G.F., LANES S.T., 1990. Individual marking of atlantic salmon : evaluation of cold branding and jet injection of alcian blue in several fin locations. *J. Fish Biol.*, 36, 99-101.
- HETTLER W.F., 1984. Marking otoliths by immersion of marine fish larvae in tetracycline. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 113, 370-373.
- JAKOBSON J., 1970. On fish and tagging. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 8, 457-499.
- JELLYMAN D.J., 1979. Scale development and age determination in New Zealand freshwater eels (*Anguilla* spp.). *N. Z. J. Mar. Freshwater Res.*, 13, 23-30.
- JONES I.W., 1969. Notes on marking salmon fingerlings with tetracycline. *Ann. Progr. Rept. Oregon. Fish. Com.*, 6 p.
- KINGSFORD M.J., MILICICH M.J., 1987. Presettlement phase of *Parika scaber* (Pisces : Monacanthidae) : a temperate reef fish. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 36, 65-79.

- KOBAYASHI S., YUKI R., FURI T., KOSUGIYAMA T., 1964. Calcification in fish and shellfish. I - Tetracycline labelling patterns of scale, centrum and otolith in young goldfish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 30, 6-13.
- LAIRD L.M., STOTT B., 1978. Marking and tagging in T. Bagenal Edt., Methods for assessment of fish production in fresh waters, IBP Handbook N0 3, Oxford, 84-100.
- LEARY D.F., MURPHY G.I., 1975. A successful method for tagging the small, fragile engraulid (*Stolephorus purpureus*). *Trans. Am. Fish. Soc.*, 104, 53-55.
- LOPEZ E., 1970. L'os cellulaire d'un poisson téléostéen *Anguilla anguilla* L. I - Étude histocytologique et histophysique. *Z. Zell.*, 109, 552-565.
- McFARLANE G.A., BEAMISH R.J., 1987. Selection of dosages of oxytetracycline for age validation studies. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 44, 905-909.
- MEUNIER F., 1972. Marquages simples et marquages multiples du tissu osseux de quelques Téléostéens par des substances fluorescentes. *C. R. Acad. Sci.*, 275, 1685-1688.
- MEUNIER F., 1974. La technique de marquage vital des tissus squelettiques des poissons. *Bull. Fr. Pisc.*, 255, 51-57.
- MEUNIER F.J., 1982. Étude expérimentale de l'excrétion de la tétracycline chez la carpe. *Cyprinus carpio* L. (Cyprinidae, Téléostéen). Résultats préliminaires. *Cybium*, 6 (1), 53-64.
- MEUNIER F., BOIVIN G., 1974. Divers aspects de la fixation du chlorhydrate de tétracycline sur les tissus squelettiques de quelques Téléostéens. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 99, 495-504.
- MEUNIER F.J., BOIVIN G., 1978. Action de la fluorescéine, de l'alizarine, du bleu de calcéine et de diverses doses de tétracycline sur la croissance de la truite et de la carpe. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 18, 1293-1308.
- MEUNIER F.J., PASCAL M., 1981. Étude expérimentale de la croissance cyclique des rayons de nageoire de la carpe (*Cyprinus carpio* L.). Résultats préliminaires. *Aquaculture*, 26, 23-40.
- MILCH R.A., RALL D.P., TOBIE J.E., 1957. Bone localization of the tetracyclines. *J. Nat. Cancer Inst.*, 19, 87-91.
- MOSEGAARD H., STEFFNER N.G., RAGNARSSON B., 1987. Manipulation of otolith microstructures as a mean of mass-marking salmonid yolk sac fry. *Proc. 5th Congr. Europ. Ichthyol.*, Stockholm 1985, 213-220.
- MUGIYA Y., UCHIMURA T., 1989. Otolith resorption induced by anaerobic stress in the goldfish, *Carassius auratus*. *J. Fish Biol.*, 35, 813-818.
- NAGIEC M., DABROWSKI K., NAGIEC C., MURAWSKA E., 1988. Mass-marking of coregonid larvae and fry by tetracycline tagging of otoliths. *Aquac. Fish. Manag.*, 19, 171-178.
- NAGIEC M., NAGIEC C., 1983. Marking of juvenile whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) by tetracycline antibiotics. *Rocznik Nauk Rolniczych*, 100, 107-114.
- NAGIEC M., NAGIEC C., DABROWSKI K., MURAWSKA E., 1985. Marking of juvenile whitefish *Coregonus lavaretus* (L.) with tetracycline antibiotics. *Acta Ichthyol. Piscat.* 13, 47-57.
- NEILSON J.D., GEEN G.H., 1982. Daily growth increments in otoliths of starry flounder (*Platichthys stellatus*) and the influence of some environmental variables in their production. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39, 937-942.

- RUHLÉ C., GRIEDER C., 1989. Nouvelle méthode de marquage vital d'œufs de salmonidés par incorporation osmotique de tétracycline à la fécondation : expériences préliminaires sur des œufs de truite fario (*Salmo trutta fario*) et de truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, 315, 181-188.
- SCHMITT P.D., 1984. Marking growth increments in otoliths of larval and juvenile fish by immersion in tetracycline to examine the rate of increment formation. *Fish. Bull.* 82, 237-242.
- SIMMONS D.J., SIMMONS N.B., MARSHALL J.H., 1970. The uptake of calcium-45 in the acellular boned toadfish. *Calc. Tiss. Res.*, 5, 206-221.
- TSUKAMOTO K., 1985. Mass marking of ayu eggs and larvae by tetracycline-tagging of otoliths. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 51, 903-911.
- TSUKAMOTO K., 1988. Otolith tagging of ayu embryo with fluorescent substances. *Nip. Suisan Gak.*, 54, 1289-1295.
- TSUKAMOTO K., 1989. Otolith daily increments in the japanese eel. *Nip. Suisan Gak.*, 55, 1017-1021.
- TSUKAMOTO K., KUWADA H., HIROKAWA J., OYA M., SEKIYA S., FUJIMOTO H., IMAIZUMI K., 1989. Size-dependent mortality of red sea bream, *Pagrus major*, juveniles released with fluorescent otolith-tags in News Bay, Japan. *J. Fish Biol.*, 35 (suppl. A.), 59-69.
- VAN COILLIE R., 1967. Étude à l'aide de tétracycline de la croissance périodique des écailles de Téléostéens. *Nat. Can.*, 94, 29-58.
- WEBER D.D., RIDGWAY G.J., 1962. The deposition of tetracycline drugs in bone and scales of fish and its possible use for marking. *Progr. Fish. Cult.*, 24, 150-155.
- WEBER D.D., RIDGWAY G.J., 1967. Marking pacific salmon with tetracycline antibiotics. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 24, 849-865.
- WILSON C.A., BECKMAN D.W., DEAN J.M., 1987. Calcein as a fluorescent marker of otoliths of larval and juvenile fish. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 116, 668-670.