

Direction de l'expertise Faune-Forêts-Territoire

**PROCÉDURE DE PRÉPARATION ET DE MONTAGE DES
OTOLITHES D'ANGUILLE**

**par
Rémi Tardif**

**Ministère des Ressources naturelles et de la Faune
Direction générale du Bas-Saint-Laurent
Avril 2011**

Référence à citer :

Tardif, R. (2011) *Procédure de préparation et de montage des otolithes d'anguille*. Ministère des Ressources naturelles et de la Faune, Direction de l'expertise Faune-Forêts-Territoire, Direction générale du Bas-Saint-Laurent. 16 p.

Procédure de préparation et de montage des otolithes d'anguille

Ce document présente les différentes manipulations qui permettent d'obtenir l'image d'une coupe transversale de l'otolithe d'anguille, ce dernier étant enrobé dans un support cylindrique de résine époxy.

Version 2011-04

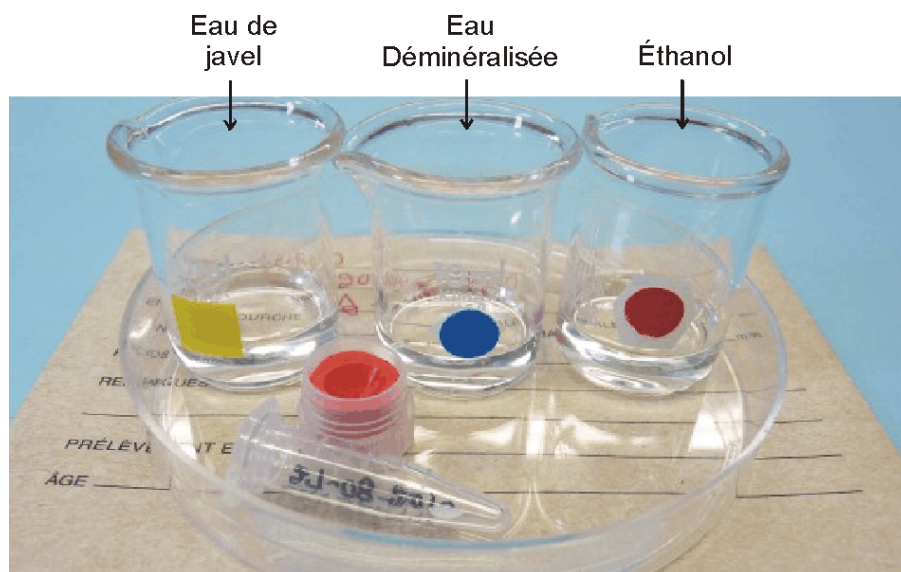
Aperçu des étapes :

- 1- Nettoyage des otolithes, rinçage, trempage dans l'éthanol, assèchement
- 2- Montage sur une petite équerre de plastique avec colle à prise rapide
- 3- Enrobage dans de la résine époxy et numérotation
- 4- Démoulage, coupe, ponçage, polissage
- 5- Décalcification à l'acide EDTA 5%
- 6- Coloration au bleu de toluidine 0,01%
- 7- Photographie des otolithes

Pour les deux premières étapes, soit les étapes qui précèdent l'enrobage dans la résine époxy, procéder par lot de 9 otolithes à la fois.

1- Nettoyage des otolithes, rinçage, trempage dans l'éthanol, assèchement

Pour chaque échantillon d'otolithe, déposer sur l'enveloppe, un plat de pétri de 100 mm qui sera destiné à recevoir le micro tube contenant les otolithes conservés à sec, 3 petits bécjers de 10 ml et un petit contenant destiné à recevoir l'otolithe lors du séchage.



- A. Déposer un otolithe des deux otolithes dans le premier bécher de 10 ml et conserver l'autre dans le micro tube en réserve. Utiliser des pinces à bouts en céramique pour les manipulations. Faire de même pour les 8 autres otolithes. Lorsque tous les otolithes sont placés dans les béchers, verser la solution d'eau de javel 50% de façon à recouvrir les otolithes pour une durée de 10 minutes.
- B. Transférer l'otolithe dans un bécher d'eau déminéralisée pour une durée minimale de 10 minutes.
- C. Transférer l'otolithe dans le 3^e bécher contenant l'éthanol 95%. Durée 10 minutes.
- D. Transférer les otolithes dans un petit contenant, laisser évaporer l'éthanol à l'air libre.

2- Montage sur une petite équerre de plastique avec colle à prise rapide

Les otolithes seront ensuite placés sur une lame de microscope. Trois otolithes peuvent être montés par lame.

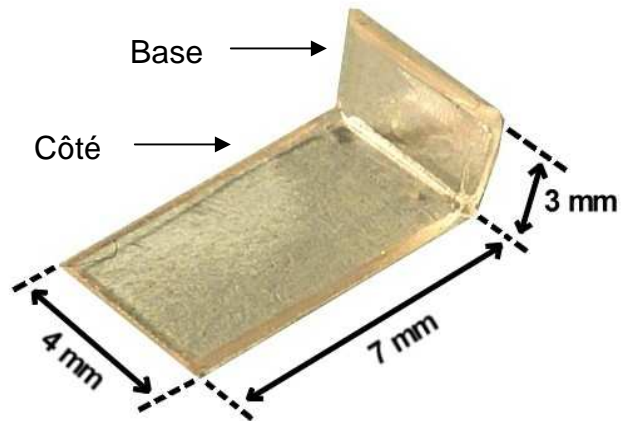
- A. Sur une lame, coller le ruban à transfert d'adhésif, Scotch 3M # 465, largeur ½ pouce.



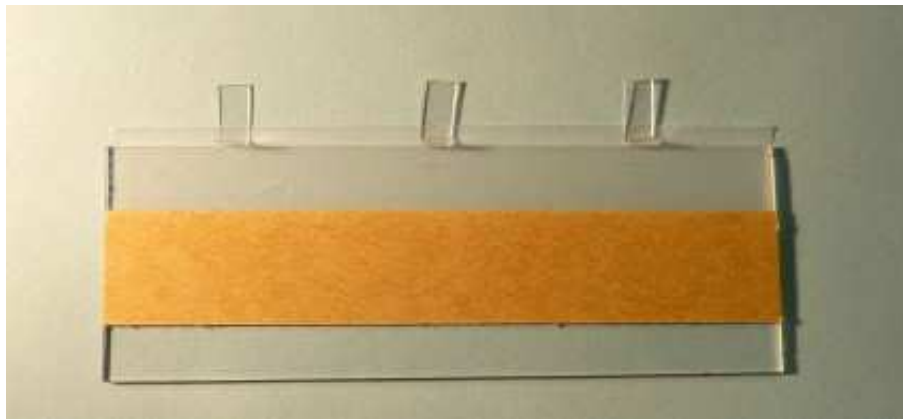
- B. À l'endos de la lame, coller un ruban « Scotch Tape » transparent 3M en le faisant dépasser d'environ 3 mm du bord de la lame.



- C. Préparer des petites équerres de plastique destinées à supporter les otolithes. Les équerres sont fabriquées dans du plastique clair récupéré sur des emballages « PETE 1 » Les dimensions présentées ci-dessous peuvent varier légèrement.

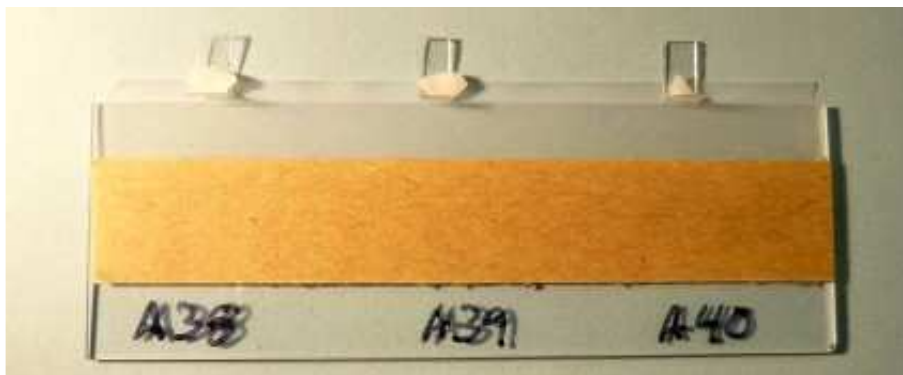


D. Coller les petites équerres, de façon temporaire, sur la partie du ruban « Scotch Tape » qui dépasse de la lame.

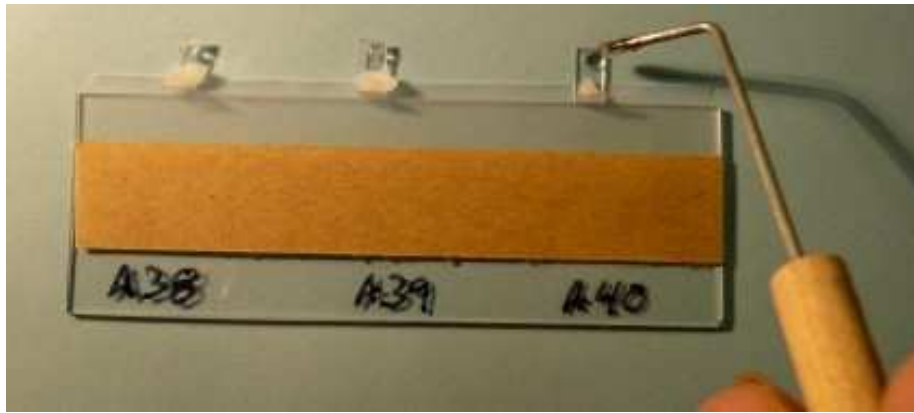


E. Incrire les numéros d'otolithes sur la lame.

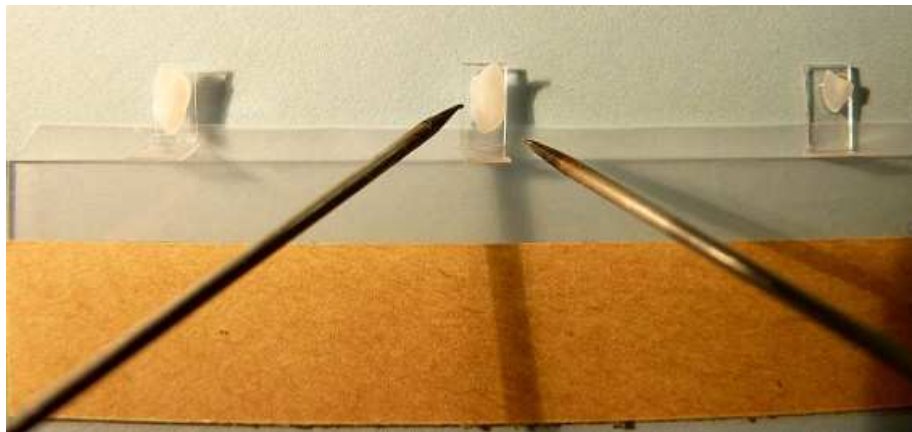
F. Déposer les otolithes sur les équerres près de l'angle entre la base et le côté.



G. Verser une grosse goutte de colle à prise rapide de marque Krazy Glue (tout usage) sur une surface jetable, tremper la pointe d'une aiguille montée dans la colle puis déposer une très petite goutte sur le côté de l'équerre de plastique où sera collé l'otolithe. Pour plus de facilité, utiliser une aiguille montée dont l'extrémité est déjà enduite de colle séchée. Au plus, enduire de colle trois équerres à la fois.

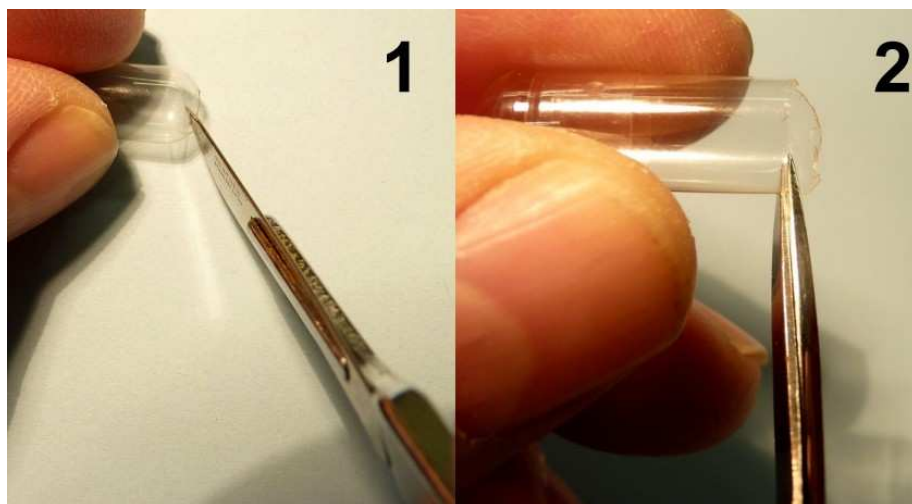


H. À l'aide de deux autres aiguilles montées dont la pointe est nette, pousser l'otolithe dans la petite goutte de colle et aligner celle-ci dans l'axe de la longueur de l'équerre.



I. Laisser sécher la colle Krazy Glue au moins une heure avant de poursuivre. Si la colle est abondante, laisser sécher plus longtemps.

J. Préparer les moules en coupant des gélules près de leur extrémité arrondie. Coupez-les de la plus grande taille possible.

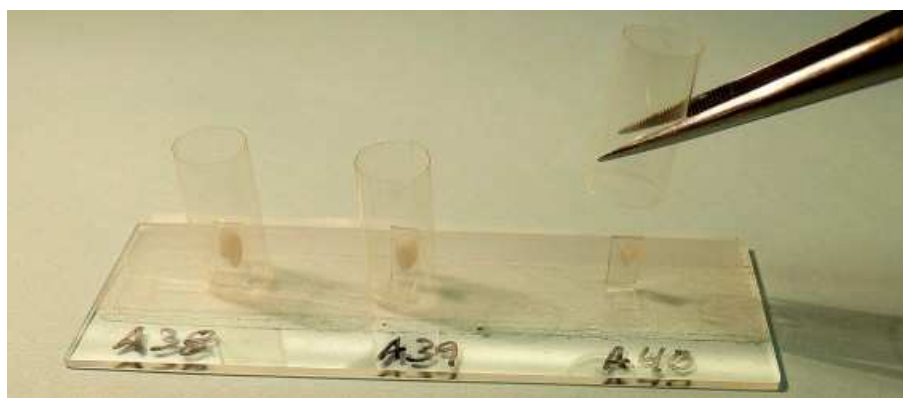


K. Enlever le papier protecteur qui recouvre le ruban à transfert d'adhésif.

- L. À l'aide de deux paires de pinces, décoller l'équerre et la coller sur la pellicule collante du ruban à transfert d'adhésif, otolithe placé en position verticale.



- M. Insérer un moule sur chacune des équerres en le centrant par rapport à l'équerre. La partie du moule non coupée est placée sur la base. Exercer une légère pression sur le moule de façon qu'il adhère bien à la pellicule collante.



- N. Préparer des rondelles de papier imperméable à l'aide d'une perforatrice dont le diamètre correspond à la dimension intérieure des moules en gélatine. Incrire les numéros sur les rondelles à l'aide d'un crayon marqueur indélébile à pointe super fine.



- O. Avant de préparer la résine époxy et d'enrober le tout, on peut préparer deux ou trois lots d'otolithes selon les étapes ci haut.

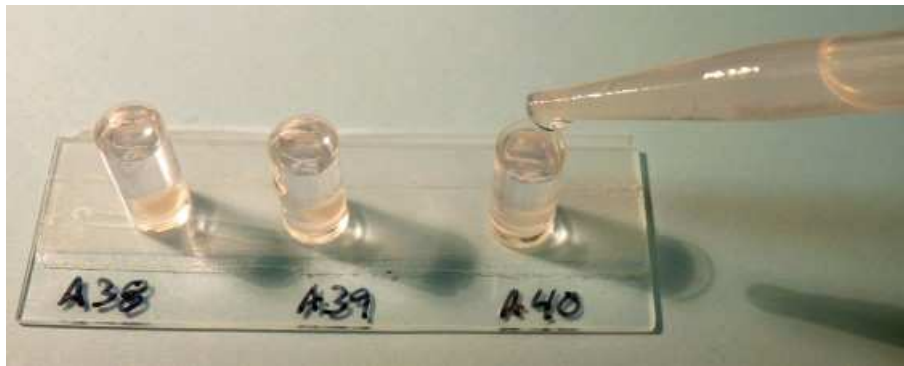
3- Enrobage dans de la résine époxy et numérotation

- A. Préparer la résine époxy. Recommandation : porter des gants et des lunettes. Effectuer les manipulations avec précision. La qualité de la résine sera meilleure et il y aura moins de

risques qu'une vive réaction exothermique se produise dans la résine. Dans un verre de plastique jetable, verser 18,0 g de résine MIA-100 et ajouter 5,0 g de durcisseur MIA-95. Utiliser une cuillère de plastique pour la résine et un compte-gouttes jetable pour manipuler le durcisseur. Placer le verre contenant le mélange dans un bécher d'eau à 50°C et mélanger délicatement avec un bâtonnet durant 5 minutes. Brasser lentement au début. Éviter d'incorporer des bulles d'air dans la résine en brassant. L'élévation de la température liquéfie la résine et aide les bulles à remonter à la surface. Si le taux d'humidité dans la pièce est plus élevé que 50 %, le durcissement peut se faire très rapidement. Une fois le brassage terminé, utiliser la résine sans délai. Après 12 minutes, la résine commence déjà à épaissir et n'est plus utilisable.

Note : La résine et le durcisseur peuvent normalement se conserver plusieurs années. Toutefois, après une période de quelques mois sans utilisation, faire un test avec la résine sans inclure d'otolithes. Laisser durcir la résine dans les moules de gélatine et vérifier la qualité de la résine.

B. Remplir les moules de résine jusqu'à environ 1 mm du bord.



C. Déposer les rondelles de papier imperméable numérotées sur la surface de la résine.



D. Laisser durcir la résine époxy pendant une nuit.

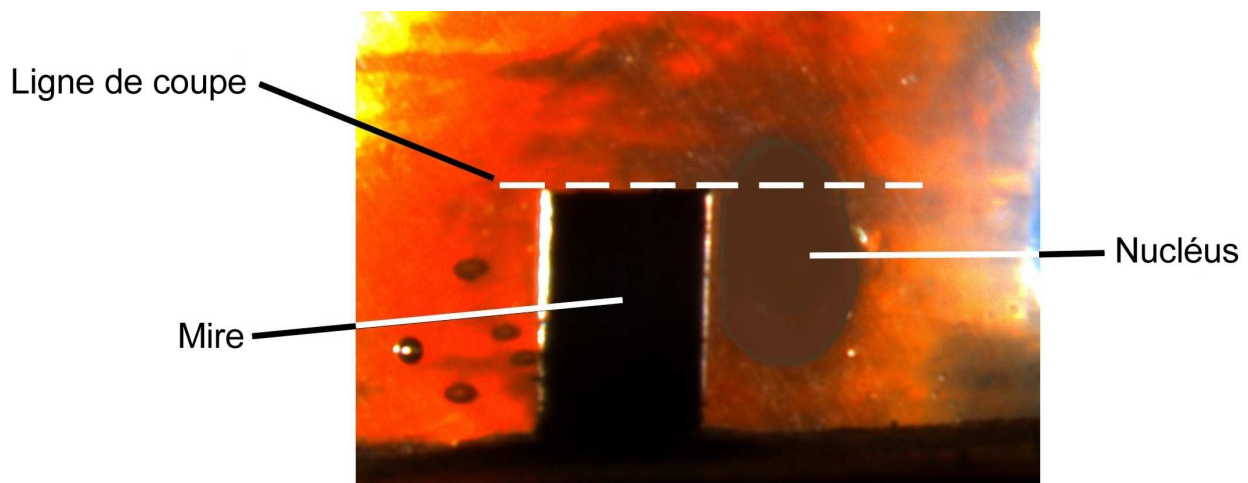
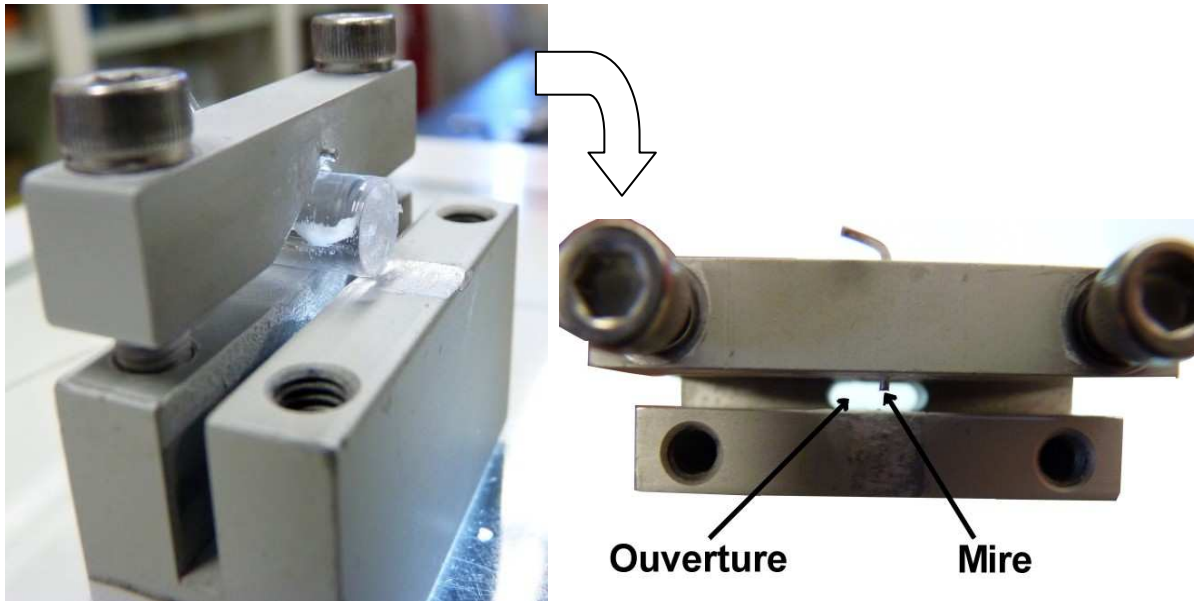
4- Démoulage, coupe, ponçage, polissage

A. Démoulage des enrobages. Placer les lames dans un plat d'eau tiède durant 30 minutes pour dissoudre les moules de gélatine. Remplacer l'eau à quelques reprises pour accélérer la dissolution de la gélatine. Retirer les lames une à la fois du plat d'eau et séparer l'enrobage de la lame de microscope. Si un bourrelet de résine est présent à la base des

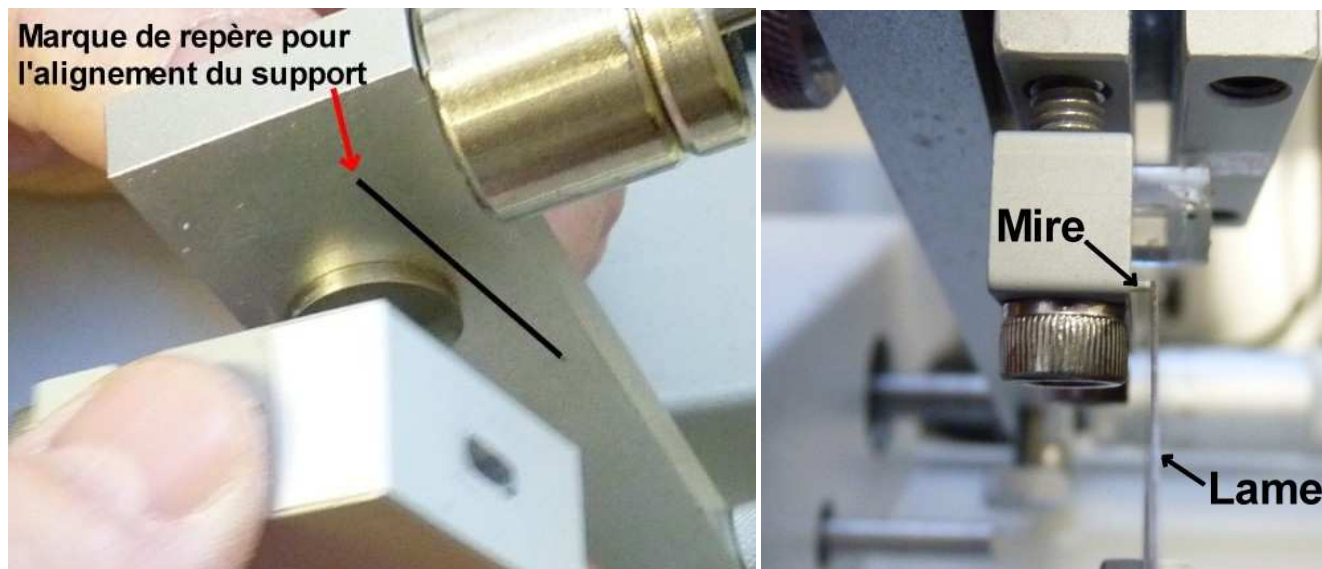
enrobages, l'enlever à l'aide d'un scalpel. Faire tremper à nouveau pour éliminer le reste de gélatine. Essuyer avec du papier essuie-tout brun pour enlever toute trace de gélatine.



B. Coupe des otolithes. Ajuster l'enrobage sur le support amovible de la scie Isomet en utilisant l'éclairage diascopique du binoculaire (éclairage par transparence provenant de la base du binoculaire). En déplaçant l'enrobage, amener le nucléus vis-à-vis l'extrémité de la mire à l'endroit visé pour la coupe. Serrer les deux vis hexagonales de retenue.



- C.** La lame de la scie Isomet doit tremper dans l'eau pendant la coupe des enrobages. Remplir le bac situé sous la scie avec de l'eau du robinet. Ne pas oublier de vider le bac à la fin des coupes pour éviter tous dépôts sur la lame diamantée.
- D.** Installer le support amovible sur le bras de la scie Isomet. Aligner le support sur la marque de repère tracée sur le bras de façon à ce que le mécanisme d'arrêt automatique de la scie fonctionne correctement. À l'aide de la vis d'ajustement micrométrique, aligner l'extrémité de la mire sur le bord de la lame. La mire doit toucher légèrement à la lame sans trop frotter.

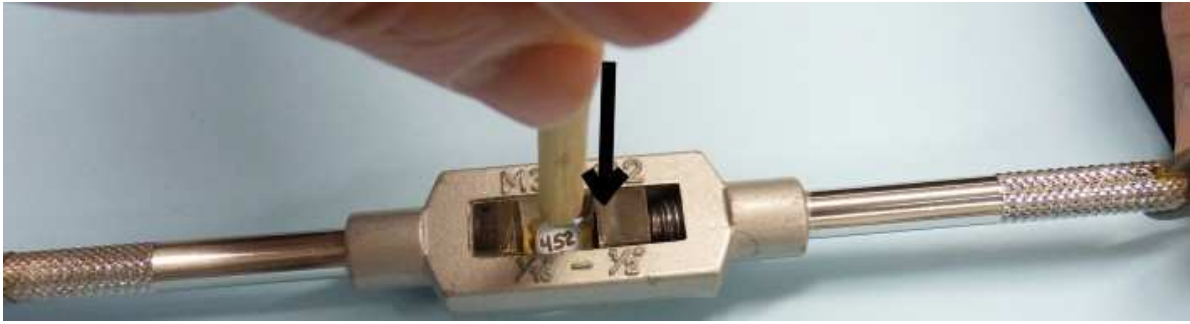


- E.** La vitesse de rotation de la scie doit être réglée à la position 6 et le poids sur le bras de la scie doit être de 100g. En retirant ce poids de 100g, le bras devrait se maintenir en équilibre avec le contrepoids arrière.

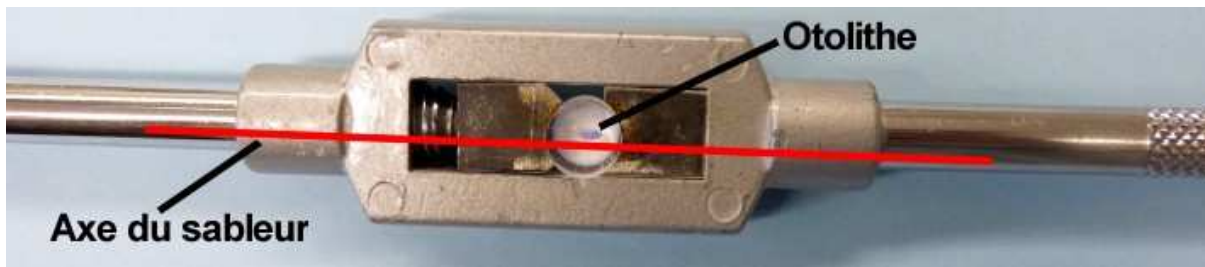


- F.** Ajuster l'enrobage (la partie la plus longue portant le numéro) sur le « Sableur » de façon à ce que la surface sciée soit bien à plat lorsque l'ensemble est déposé sur une surface

plane. Exercer une pression vers le bas sur l'enrobage pendant que l'on serre la vis du sableur.



G. Aligner la partie mince de l'otolithe dans l'axe du sableur.



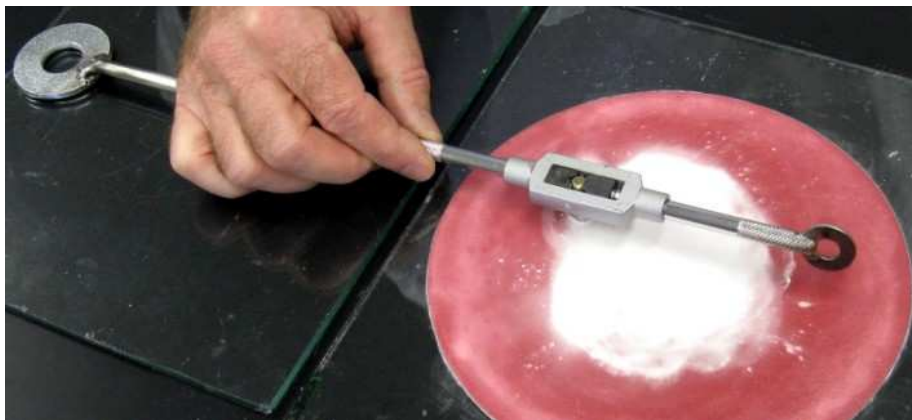
H. Poncer sur du papier abrasif 1200 grains légèrement mouillé. Le papier à sabler est maintenu sur une plaque de verre avec du ruban adhésif gris. Commencer par poncer légèrement puis observer la surface de l'otolithe au binoculaire. Si le nucléus n'est pas bien visible, on continue à poncer en alternant ponçage, observation, ponçage jusqu'à ce que le nucléus soit bien visible. Essuyer la surface de l'otolithe avec du papier essuie-tout ou avec l'index et vérifier à nouveau si le nucléus est encore visible.



I. En tournant le sableur de côté, avec l'éclairage diascopique du binoculaire, on peut évaluer où se situe la coupe par rapport au nucléus.



J. En laissant en place l'enrobage sur le sableur, polir dans un mouvement circulaire sur disque à polir avec de la poudre d'alumine (grain de 1 μm) détrempeée dans de l'eau déminéralisée. La consistance de la pâte doit être plutôt claire. Sous le binoculaire, vérifier si la surface de la résine est suffisamment polie et ne présente plus de stries de sablage. Une fois le polissage effectué, l'utilisation du papier essuie-tout est à éviter. Rincer à l'eau déminéralisée et vérifier au binoculaire s'il ne reste plus de particules d'alumine. Secouer énergiquement le sableur pour faire disparaître le plus possible d'eau à la surface de l'otolithe.



K. Laisser sécher l'otolithe à l'air une nuit, l'otolithe orienté vers le haut. Vérifier encore une fois, s'il reste des dépôts d'alumine à la surface de l'otolithe avant de décalcifier. L'alumine est incompatible avec l'acide utilisée pour la décalcification puisque l'alumine neutralise l'action de l'acide EDTA.

5- Décalcification à l'acide EDTA 5%

A. Agiter vigoureusement la bouteille d'acide EDTA avant de l'utiliser. Décalcifier à l'acide EDTA 5% pendant 3 minutes en déposant une grosse goutte directement sur la surface polie des otolithes. Remplacer la solution d'acide EDTA un mois après sa préparation, après ce délai, l'acide perd ses propriétés.

B. Arrêter l'action de l'acide par immersion des enrobages dans un b cher d'eau déminéralisée, puis rincer individuellement la surface de chacun des otolithes avec un jet d'eau déminéralisé.

C. Avant d'effectuer la coloration, laisser sécher la surface de l'otolithe à l'air au moins 2 heures, l'action du colorant sera plus efficace si la surface de l'otolithe est bien sèche.

6- Coloration au bleu de toluidine 0,01%

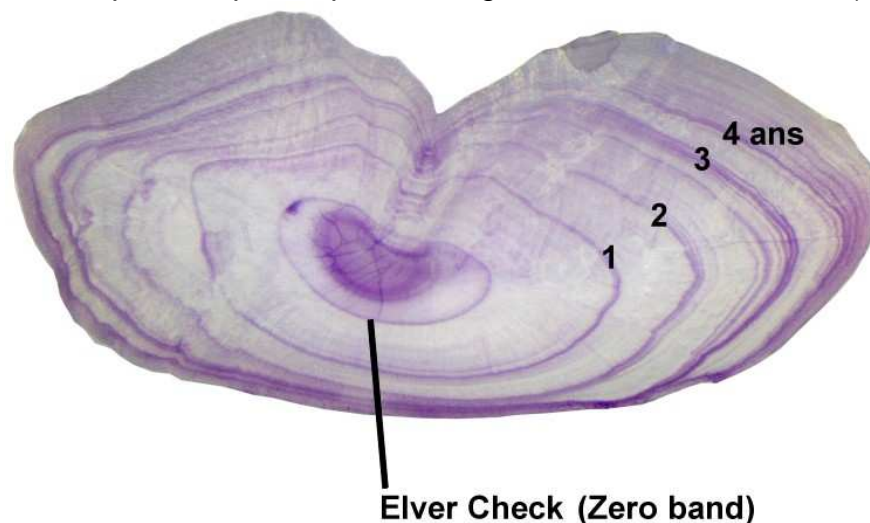
- A. Colorer au bleu de toluidine 0,01% durant 3 minutes. Déposer une grosse goutte de solution de colorant sur la surface de l'otolithe.
- B. Immerger l'ensemble des enrobages dans un b cher d'eau déminéralisée, puis rincer individuellement la surface des otolithes avec un jet d'eau.

7- Photographie des otolithes

- A. On peut procéder immédiatement à la photographie des otolithes tant que la surface des otolithes est encore humide. La présence d'une pellicule d'eau à la surface de l'otolithe améliore le contraste.
- B. Lorsque la surface de l'otolithe commence à sécher, recouvrir d'une goutte de bleu de toluidine 0,01% et attendre quelques secondes. Rincer à l'eau déminéralisée et secouer légèrement pour enlever le surplus d'eau. Si l'image est difficile à mettre au point parce que la surface de l'otolithe n'est pas horizontale, corriger en insérant une lame de scalpel sous l'enrobage. On peut aussi réduire légèrement l'ouverture du diaphragme sur le binoculaire pour augmenter la profondeur de champ.
- C. Conserver les enrobages à l'abri de la lumière dans une petite boîte à compartiments. Lorsque le deuxième otolithe est monté, ne classer dans cette boîte que l'otolithe le mieux réussi.
- D. Après un certain temps, si l'on doit faire de nouvelles observations, recolorer systématiquement tous les otolithes 3 minutes. Le contraste des lignes d'arrêt de croissance a tendance à s'estomper à la longue.

8- Estimation de l'âge

  partir des images numériques visualisées à l'écran, l'estimation de l'âge est faite par deux ou trois personnes. Ne pas compter la première ligne d'arrêt de croissance (Elver Check).



Pour plus de détails sur l'estimation de l'âge, voici deux références à consulter :

ICES Workshop participants. (2009). *Annex 4 : Manual for the Ageing of Atlantic Eel : Otolith preparation methodologies, age interpretation and image storage*. International Council for Exploration on the Sea, April 2009, Copenhagen.

ICES Workshop. (2009) *Workshop on Age Reading of European and American Eel, Bordeaux, 20-24 April, 2009*. International Council for Exploration of the Sea, Copenhagen.

9- Liste du matériel

Binoculaire de qualité avec optique de type planapo ou apochromatique, base avec éclairage diascopique, grossissement d'au moins 60 X, système d'éclairage à fibre optique à bras double. Caméra numérique de qualité d'au moins 5 mégapixels reliée à un ordinateur muni d'un logiciel de capture d'image

Scie à basse vitesse Isomet de marque Buehler, modèle N° 11-1280-170, lame diamantée de 4 pouces N°11-4244, porte échantillon double N° 11-1183 (cette pièce doit être modifiée par l'aménagement d'une ouverture dans la base et l'installation d'une mire)

Fil métallique pour le remplacement de la mire (Fil en stainless à soudure de 30 millième de diamètre ou 0,77 mm)

Plaque ronde de couleur noire, diamètre de 120 mm, pour utiliser sur la base du binoculaire

Sableur de fabrication artisanale pour maintenir les enrobages pendant le sablage

Disques de polissage en feutre autocollant de 20 cm de diamètre de marque Mecaprex, Société PRESI. (PRESI NT Rose 200mm diamètre, 5/paquet, code 16206)

Alumine en poudre, grain de 1 µm, (PRESI Alumina powder 1 micron 1kg, code 12018)
Fournisseur au Canada pour les produits PRESI : <http://webhome.idirect.com/~ancansco/>

Résine époxy, MIA-POXY-100, Gallon de 8 livres
et durcisseur MIA-HARD-95, Hardener 95, Quart de 2 livres
Fournisseur : Freeman Manufacturing and Supply Company, www.freemansupply.com

Bleu de toluidine en poudre, contenant de 25 g. ICN N° 152649, Fischer N° SSP 9770574

EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) en poudre, contenant de 500g, Fischer N° E478-500

Balance électronique, précision de 0,1 g

Plaque chauffante

Thermomètre électronique avec câble de 1 mètre et sonde indépendante

2 chronomètres

Lampe loupe montée sur un bras articulé

Pinces fines à bouts en céramique de la compagnie Canemco (Black Ceramic Tipped Tweezers) N°200-27 pour la manipulation des otolithes

Pinces métalliques fines pour la manipulation des enrobages

Paire de ciseaux délicats à bouts pointus (coupe des gélules), Fischer N° 08-951-5

Paire de ciseaux à bouts pointus, format moyen (coupe des équerres)

Pinces longues de laboratoire, longueur 310 mm

1 plaque de verre de 9 pouces X 22 pouces

6 plaques de verre de 9 pouces X 11 pouces

Papier abrasif 1200 grains, 3M Wetordry (disponible dans les magasins de pièces d'auto)

Ruban à transfert d'adhésif, marque Scotch 3M # 465 (largeur ½ pouce)

Spatules de métal et petits contenants de plastique pour peser les produits chimiques

10 petits bouchons pour servir de support aux otolithes

20 plats de pétris de 100 mm de diamètre

30 petits béchers de 10 ml

Lames de microscope (celles dont l'extrémité est non dépolie conviennent)

Cylindres gradués de 25 ml et de 100 ml

4 béchers de 500 ml

Capsules de gélatine vide, diamètre 7 mm, longueur 22 mm. Taille # 00, Code : CT00-1000 (pharmacie Familiprix)

Boîtes à compartiments de marque « Plano » pour le classement des otolithes montés

Flacons avec bout fin genre compte-gouttes de 125 ml, Fischer N°03-006

Scalpel

Aiguilles montées d'environ 40 mm

Compte-gouttes jetables, Fischer N°6219-0068

Ruban adhésif gris (Duct tape)

Bloc de bois dur

Lunettes de sécurité

Crayons lumocolor noir « S » indélébile

Papier imperméable « Rite in the Rain »

Poinçonneuse de diamètre correspondant au diamètre intérieur des gélules

Verres de plastique jetables (la résine époxy peut faire fonder certains types de verre de plastique, faire un test préliminaire. Ceux vendus chez Dollarama conviennent)

Cuillères de plastique jetables

Bâtons à café

Colle Krazy Glue tout usage

Contenants de plastique récupérés « PETE 1 » pour fabriquer les petites équerres

Ruban Scotch tape transparent 3M

Papier essuie-tout brun et papier essuie-tout bleu d'atelier

Gants jetables

Éthanol 95%

Acétone

Eau de javel

Eau déminéralisée

10- Notes sur la préparation des solutions

Préparation de la solution d'Acide EDTA 5% : 2,0 g de poudre dans 38 ml d'eau déminéralisée.

Préparation du bleu de toluidine 0,01% :

Étape 1 : mélanger 0,1 g de bleu de toluidine en poudre de marque ICN dans 50 ml d'eau déminéralisée, ce qui donne une solution de 0,2%.

Étape 2 : Dans une autre bouteille, utiliser 1 partie de la solution ci-haut dans 19 parties d'eau déminéralisée. Par exemple, mélanger 5 ml de la solution préparée à l'étape 1 dans 95 ml d'eau déminéralisée.