

Département Ressources Biologiques et Environnement
Laboratoire Ressources Halieutiques de Boulogne sur Mer
Centre Manche Mer du Nord
Plateforme Réseaux Trophiques



Pierre Cresson
Margaux Denamiel
Manuel Rouquette
Charles André Timmerman

Guide des protocoles pour la dissection et le prélèvement des échantillons en vue de l'étude des réseaux trophiques.

Version 1 – novembre 2016

Guide des protocoles pour la dissection et le prélèvement des échantillons en vue de l'étude des réseaux trophiques.

Version 1 – Novembre 2016

Fiche documentaire

Numéro d'identification du rapport : Diffusion : libre : <input type="checkbox"/> restreinte : <input type="checkbox"/> interdite : <input type="checkbox"/> Validé par : Adresse électronique :		date de publication : Nov. 16 nombre de pages : 26: bibliographie : non illustration(s) : 13 langue du rapport : Français
Titre de l'article: Guide des protocoles pour la dissection et le prélèvement des échantillons en vue de l'étude des réseaux trophiques. Version 1 – Novembre 2016		
Rapport intermédiaire <input checked="" type="checkbox"/> Rapport définitif <input type="checkbox"/>		
Auteurs principaux : Pierre Cresson Margaux Denamiel Manuel Rouquette Charles André Timmerman		Organisme / Direction / Service, laboratoire Ifremer / RBE / LRHBL Ifremer / RBE / LRHBL Ifremer / RBE / LRHBL Ifremer / RBE / LRHBL
Encadrement(s) :		
Cadre de la recherche :		
Destinataire :		
Résumé Ce document a pour objectif de définir un cadre méthodologique standardisé pour la plateforme « Réseaux trophiques », du laboratoire Ressources Halieutique Manche-Mer du Nord. Il doit servir de référence de travail pour l'ensemble des personnels amenés à réaliser des étapes de dissection. Il a pour vocation de couvrir l'ensemble des travaux réalisés au sein de la plateforme, depuis la détermination des paramètres biométriques jusqu'à la préparation d'échantillons de tissus en vue d'une analyse par un laboratoire extérieur. La mise en place de protocoles standardisés répond aux exigences du processus qualité, notamment en ce qui concerne la répétabilité des travaux, et l'intercomparaison des résultats issus de travaux différents.		
Mots-clés : méthodologie ; trophique ; dissection		

Rédigé/révisé par : Nom : Pierre Cresson Fonction : Responsable de la Plateforme Réseaux trophiques, laboratoire RBE-HMMN-LRHBL Emargement :  Date : 16/11/2016	Vérifié par : Nom : Kélig Mahé Fonction : Responsable Qualité du laboratoire RBE-HMMN-LRHBL Emargement :  Date : 16/11/2016	Approuvé par : Nom : Paul Marchal Fonction : Chef du laboratoire RBE-HMMN-LRHBL Emargement :  Date : 16/11/2016
--	--	--

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION.....	9
2. FORMULAIRE « DISSECTION ».....	10
3. RECEPTION DES ECHANTILLONS ET PRETRAITEMENT	12
3.1. DECONGELATION ET NETTOYAGE.....	12
3.2. IDENTIFICATION DE L'ECHANTILLON.....	12
4. PREPARATION DU MATERIEL DE STOCKAGE DES PRELEVEMENTS.	14
5. PRISE DE PHOTO POUR LES ANALYSES MORPHOMETRIQUES.....	14
5.1. PREPARATION DU POISSON	15
5.2. PRISE DE PHOTO.	16
6. BIOMETRIE EXTERNE.....	18
6.1. MASSE TOTALE ET LONGUEURS	18
6.2. MESURE DU TOUR ET DE LA LARGEUR DU CORPS.....	18
6.3. DIAMETRE DE LA GUEULE.....	19
6.4. MESURES DE L'ŒIL.....	20
7. DISSECTION, BIOMETRIE INTERNE ET PRELEVEMENTS.....	21
7.1. DISSECTION DE LA CAVITE ABDOMINALE	21
7.2. DISSECTION ET PRELEVEMENT DE MUSCLE.....	22
7.3. PRELEVEMENT DE PIECES CALCIFIEES POUR AGEAGE.....	23
7.4. PRELEVEMENT DES VISCERES.....	23
8. FINALISATION DE LA DISSECTION ET NETTOYAGE DU MATERIEL	26

1. Introduction

La complexité des interactions trophiques et l'impossibilité d'utiliser un traceur universel applicable à l'ensemble des problématiques, impose de disposer d'un ensemble d'outils pour reconstruire les réseaux trophiques marins. La prise en compte de paramètres biotiques ou abiotiques est par ailleurs nécessaire pour comprendre les facteurs qui structurent ces réseaux. D'un point de vue méthodologique, il convient donc de s'assurer d'un cadre méthodologique standardisé, qui tient compte des contraintes propres à chaque outil, et qui spécifie un ensemble de paramètres de base nécessaire à l'interprétation des résultats. La définition de ce cadre méthodologique s'inscrit dans la démarche qualité mise en œuvre par l'institut, notamment via les processus P3, P6 et P7.

L'objectif du présent document vise à définir ce cadre de travail, pour les travaux réalisés au sein de la plateforme « Réseaux trophiques », du laboratoire Ressources Halieutique Manche-Mer du Nord. Il a pour vocation de couvrir l'ensemble des travaux réalisés au sein de la plateforme, depuis la détermination des paramètres biométriques jusqu'à la préparation d'échantillons de tissus en vue d'une analyse par un laboratoire extérieur. Il doit notamment permettre d'utiliser de manière indifférenciée des résultats acquis durant différents projets ou par des opérateurs différents, notamment lorsqu'il s'agit de personnels non permanents.

Il ne couvre pas la partie liée à la collecte des échantillons (*e.g.* durant les campagnes halieutiques, pour lesquels des protocoles analogues à celui-ci sont disponibles), même s'il conviendra de conserver les informations relatives au mode de collecte (numéro de station et campagne pour les poissons issus des campagnes opérées par l'Ifremer, informations les plus exhaustives possibles pour les poissons collectés par d'autres moyens, pêche professionnelle par exemple). Par ailleurs, il conviendra de s'assurer que le mode de préparation des échantillons dédiés à une analyse externe correspond aux protocoles requis par les laboratoires prestataires. Il ne couvre par ailleurs pas non plus la saisie des données au sein de la base MINESTRONE¹, non opérationnelle au moment de la rédaction de ce guide.

Ce guide se focalise sur les poissons *sensu stricto* (téléostéens), qui représentent le support de la majorité des analyses effectuées. De ce fait, dans ce document, le support de l'analyse sera désigné par le terme poisson, lorsque le travail sera réalisée de manière identique quel que soit le groupe taxonomique considéré. Si la taxonomie influe sur les travaux à réaliser², cela sera explicitement précisé

Ce document est par ailleurs prévu pour être évolutif, chaque version successive intégrant les derniers développements logistiques ou méthodologiques de la plateforme, tels qu'une modification des méthodes de travail ou l'acquisition de nouvelles compétences. Il couvre les travaux suivants :

- Réception et préparation initiale des organismes au sein de la plateforme
- Prise de photos pour l'analyse morphométrique
- Mesures biométriques

¹ Management and INtEgration System for TROphic NEtwork data

² Par exemple, la mesure d'une longueur céphalothoracique pour les crustacés.



- Mesures et prélèvements du tube digestif
- Prélèvements en vue de l'analyse isotopique
- Prélèvements en vue de l'analyse des niveaux de contamination chimique
- Autres prélèvements

2. Formulaire « dissection »

Un formulaire de dissection standardisé est en usage au sein de la plateforme (FIG.1). Il convient d'utiliser exclusivement ce formulaire. La version la plus à jour est disponible sur le disque réseau « resotro ».

Le formulaire est propre à **chaque individu**.

Ce formulaire doit être considéré comme un guide des travaux à effectuer :

- Il est organisé de manière à suivre un ordre logique. Il convient donc de respecter cet ordre, qui est basé sur la priorité entre analyses (pesée de la masse totale avant les prélèvements de tissus par exemple) et qui permet de minimiser les risques de contamination entre échantillons.
- Par ailleurs, il permet de s'assurer que l'ensemble des travaux ont bien été effectués.
- Il permet de noter l'ensemble des informations liées à la dissection, comme les longueurs ou les masses mesurées, mais aussi le type et le nombre de prélèvements effectivement réalisés.

A l'image du présent guide, le formulaire se veut le plus exhaustif possible, pour prendre en compte l'ensemble des travaux réalisable au sein de la plateforme. Il est donc voué à évoluer avec l'évolution de la plateforme. Par ailleurs, selon les études, il est probable que l'ensemble des mesures et/ou prélèvements ne soient pas nécessaires.

Il conviendra donc de s'interroger en amont sur les mesures/prélèvements à faire, et de créer un formulaire pour chaque projet, à partir du formulaire « base » disponible sur le disque resotro. Utiliser un formulaire par projet permet (1) d'éviter les formulaires remplis quasi-exclusivement de cases barrées, et (2) de conserver l'objectif d'utiliser le formulaire comme un « pense-bête » des travaux à effectuer.

A chaque projet, il est nécessaire 'd'enregistrer sous' le formulaire, afin de ne pas écraser le formulaire de base. Un espace dans le haut du formulaire est spécifiquement dédié au nom du projet. Cette information doit être spécifiée **avant** l'impression et/ou photocopie des formulaires.

Formulaire : Réception, Photographie, Biométrie, Dissection, Prélèvement

Nom du projet :			
Suivi formulaire		saisie effectuée <input type="checkbox"/> saisie vérifiée <input type="checkbox"/>	
Début des manipulations Date : / / Visa opérateur :			
Identification et vérification des informations de mer			
Code Rubbin	Numéro de station	Code année labo	Incrément
Remarques			
Photographie			
Cliché photo pour analyse de géomorphométrie	Oui / Non		
Autres clichés pris			
Biométrie externe			
Masse totale	g		
Longueur totale	Longueur à la fourche	Longueur standard	
mm	mm	mm	
Tour du corps maximum (mm)	Tour du corps sur la pointe des opercules	Largeur du corps sur la pointe des opercules	
mm	mm	mm	
Diamètre de l'ouverture de la gueule (mm)	mm		
Mesures de l'œil	Gauche	Droit	
Diamètre	mm	mm	
Hauteur	mm	mm	
Largeur	mm	mm	

Plateforme « Réseaux Tropiques » LRHBL

Formulaire Dissection V1

Dissection, Biométrie interne et prélèvements			
Masse totale éviscérée	g		
Epine dorsale ou muscle	Prélèvement pour ADN	Oui / Non	
Muscle dorsal	Prélèvement pour analyse d'IS (muscle dorsal en partie avant)	Masse micro-tube étiqueté vide	g
		Masse micro-tube étiqueté + prélèvement	g
	APRES SECHAGE	Masse micro-tube étiqueté + prélèvement séché	g
	Prélèvement pour analyse de mercure (muscle dorsal en partie caudale)	Masse micro-tube étiqueté vide	g
		Masse micro-tube étiqueté + prélèvement	g
	APRES SECHAGE	Masse micro-tube étiqueté + prélèvement séché	g
	Masse approximative, prélèvement pour analyse de POP (filet sans peau)	g	
	Masse approximative, prélèvement pour analyse de métaux (filet sans peau)	g	
Colonne vertébrale	Prélèvement pour analyse d'IS	Oui / Non	
Pièces calcifiée	Prélèvement pour âgeage	Otolithes	
		Ecailles	
		Vertèbres	
		Illicium	
Gonades	Sexage	♂ / ♀ / I indéterminé	
	Stade de maturité	1 / 2 / 3 / 4 / 5 <small>immature en maturation - mature - s'est reproduit - sénescence</small>	
	Masse totale	g	
Foie	Masse totale	g	
	Prélèvement pour analyse d'IS	Oui / Non	
	Masse approximative prélèvement pour analyse de POP	g	
Tractus digestif	Longueur plein	mm	
Estomac	Indice de remplissage	D 0 0.25 0.5 0.75 Full <small>Dégradé</small>	
	Masse estomac plein	g	
	Prélèvement pour analyse fine du contenu	Oui / Non	
	Masse estomac vide	g	
Intestin	Prélèvement pour analyse du contenu limitée à de l'occurrence	Oui / Non	

Plateforme « Réseaux Tropiques » LRHBL

Formulaire Dissection V1

FIG. 1 : FORMULAIRE DE DISSECTION « DE BASE » (RECTO ET VERSO) CONTENANT L'ENSEMBLE DES PRELEVEMENTS QU'IL EST POSSIBLE DE FAIRE SUR UN POISSON, ET LA TOTALITE DES INFORMATIONS COLLECTABLES

3. Réception des échantillons et prétraitement

3.1. Décongélation et nettoyage

En préalable à la dissection, les poissons seront mis à décongeler. Il conviendra de décongeler un nombre de poissons approprié par rapport au temps de travail disponible³. L'ensemble des poissons décongelés doivent être traités. La re-congélation de poissons non traités est à éviter dans la mesure où elle peut affecter les mesures réalisées. Elle est à proscrire lorsqu'un prélèvement de contenus stomacal doit être effectué, dans la mesure où chaque étape de congélation/décongélation induit de nouveau un processus de dégradation par digestion des proies contenues dans l'estomac.

Dans le cas des « blocs » comprenant un grand nombre de poissons qu'il n'est pas possible de traiter dans le temps imparti, il est possible de décrocher quelques poissons du bloc avant que la décongélation ne soit trop avancée (sans endommager l'intégrité des poissons congelés), et de remettre à congeler l'autre partie, en vue d'un traitement ultérieur. Ce problème lié à la décongélation de blocs avec un grand nombre de poissons doit être pris en compte lors de la rédaction des protocoles de travail lors des campagnes.

Il conviendra également de se rappeler que l'état de fraîcheur d'un lot de poisson évolue. Un poisson congelé resté trop longtemps hors du froid est de mauvaise qualité, ce qui complique son traitement, dégrade certains tissus fragiles (gonades ou foie) et peut biaiser certaines analyses. Il est donc plus intéressant de décongeler plusieurs lots de faible effectif de manière décalée, afin que les poissons disséqués en dernier ne subissent pas une période hors du froid trop longue.

A cette étape, le poisson peut être nettoyé si nécessaire. Pour cela, il est possible de passer précautionneusement le poisson sous l'eau du robinet (eau froide) puis de l'essuyer afin de retirer des débris ou des salissures sur l'épiderme du poisson.

Par ailleurs, à tout moment du traitement, si l'opérateur remarque un élément particulier (difformité, coloration, parasite externe et/ou interne, etc.) il convient de le noter dans la case « remarques » sur la feuille de dissection, ainsi que de prendre une photo de ce détail pour référence ultérieure. Le fichier correspondant à la photo prendra comme nom l'identifiant de l'individu (voir paragraphe 2.3 ci-dessous), suivi d'une information sur le type de particularité (par exemple GADUMOR_T0274_A002_parasite_oeil, TRACTRA_T0899_A255_tache etc.) et sera noté dans la case « autres clichés pris », dans la partie « photographie » du formulaire de dissection ;

La case « remarque » peut aussi servir à noter tout élément important mais non prévu par ailleurs. Dans le cas d'un poisson issu de pêches professionnelles, on peut noter à cet endroit le nom du navire et l'engin utilisé, les coordonnées GPS du point de capture etc.

3.2. Identification de l'échantillon

La dissection commence avec le remplissage des informations concernant la date et l'opérateur ayant réalisé les travaux (FIG. 2). Dans le cadre de la traçabilité des travaux, cette

³ Par exemple, ne pas décongeler 10 poissons si on est seul pour faire en une matinée un travail estimé à 1h par poisson.



information sur l'opérateur est particulièrement importante. Elle peut par exemple permettre de savoir où trouver les informations complémentaires, dans le cadre de travaux réalisés par des personnels non permanents. Le nom du projet doit avoir été rempli préalablement à la saisie manuscrite, vu qu'il convient d'utiliser la version du formulaire dédié au projet (cf. paragraphe 2 ci-dessus).

Formulaire : Réception, Photographie, Biométrie, Dissection, Prélèvement			
Nom du projet :			
Suivi formulaire		saisie effectuée <input type="checkbox"/>	saisie vérifiée <input type="checkbox"/>
Début des manipulations		Date : / /	Visa opérateur :
Identification et vérification des informations de mer			
Code Rubbin	Numéro de station	Code année labo	Incrément

FIG. 2: DETAIL DU FORMULAIRE DE DISSECTION CORRESPONDANT A L'IDENTIFICATION DE L'ECHANTILLON

Une fois traité au sein de la plateforme Réseaux Trophique, chaque individu devient unique, notamment par le fait que sa taille et sa masse ont été précisément mesurées. Il est donc nécessaire de créer pour chaque échantillon un **code échantillon** qui lui est propre et qui sera renseigné dans la partie supérieure de la feuille.

Le code échantillon est composé des informations suivantes : le code rubbin de l'espèce, l'identifiant de la station, et un numéro d'incrément propre à l'individu, qui intègre l'année de dissection :

Le code rubbin est généralement composé des 4 premières lettres du nom de genre et les 3 premières du nom d'espèce de chaque espèce de poisson, mais des exceptions peuvent exister, notamment pour des espèces avec des noms proches. Pour plus de détails, le lecteur est indiqué à se référer à la base « référentiel taxonomique »⁴

Pour l'identifiant de la station, on reprendra le code complet attribué lors de la campagne, la lettre correspondant à l'année, et le chiffre correspondant au numéro du trait.

Pour les poissons issus de captures par des professionnels, mettre « pro » à la place du numéro de station, et préciser autant que possible la localisation (coordonnées GPS, carré statistique etc.) et la date de capture dans la case remarques.

Enfin, pour les échantillons capturés par d'autres biais, mettre XXX comme numéro de station, et préciser le mode de capture et l'année dans la case « remarques ».

Concernant le numéro incrément, il se compose d'une lettre et de chiffres. La lettre correspond à l'année de dissection (TAB. 1). Ce système de codage est comparable à celui qui est utilisé pour désigner les stations sur le N/O Thalassa, mais est propre à la plateforme réseaux trophiques.

TABEAU. 1 : REFERENCE LETTRE – ANNEE DANS LE NUMERO INCREMENT

⁴ Disponible sur le disque N:/, sous forme d'une base de données Access, à l'adresse
N:\commun\Referentiel\Referentiel_Taxonomique

Année	Lettre	Année	Lettre
2015	A	2019	E
2016	B	2020	F
2017	C	2021	G
2018	D	etc.	etc.

Le chiffre représente la position du poisson dans la liste des dissections réalisées au sein de la plateforme réseaux trophiques, et est indépendant de l'espèce. Pour éviter les erreurs de numérotation, il convient de se référer au tableau de la plateforme qui précise le numéro d'incrément du dernier organisme préalablement traité. Ce numéro doit par ailleurs être soigneusement mis à jour lors des dissections. Il conviendra d'être particulièrement vigilant sur ce point, notamment lorsque plusieurs personnes traitent des poissons de différentes espèces en parallèle. Quelques exemples de codes individus sont détaillés dans le tableau 2 ci-dessous.

TABLEAU 2 : QUELQUES EXEMPLES DE CODES INDIVIDUS

GADUMOR_T0274_A002 : Morue, prélevée sur le trait T0274 - 2ème poisson traité en 2015
DICELAB_S0312_A003 : Bar, prélevé sur le trait S0312 – 3ème poisson traité en 2015
GADUMOR_T0274_A004 : Morue, prélevée sur le trait T0274 - 4ème poisson traité en 2015
...
TRACTRA_T0899_A255 : Chinchard, prélevé sur le trait T0899 – 255ème poisson traité en 2015
GADUMOR_T0899_A256 : Morue, prélevée sur le trait T0899 – 256ème poisson traité en 2015
GADUMOR_T0899_B001 : Morue, prélevée sur le trait T0899 – 1er poisson traité en 2016

Pour des contraintes informatiques, les différentes parties du code individu doivent être séparées par des tirets bas (« tiret du 8 »)

4. Préparation du matériel de stockage des prélèvements.

Une imprimante à étiquette est en service au laboratoire, et doit être systématiquement utilisée pour identifier les échantillons. Cela permet d'éviter les problèmes de lecture des écritures manuscrites, notamment quand les échantillons sont envoyés dans des laboratoires de pays non francophones. Ces étiquettes doivent comporter les informations suivantes : code échantillon, type de matrice analytique (muscle, foie, gonade, otolithe etc.) et analyse prévue (isotopes stables, métaux, POP, ADN etc.). Il est préférable d'écrire l'analyse dans la langue du pays du laboratoire qui réalisera l'analyse (IS/SI pour isotopes stables, métaux/métaux, ADN/DNA etc.)

Par ailleurs, il est nécessaire de préparer l'ensemble des contenants qui vont servir à stocker les prélèvements **avant de commencer la dissection**, afin d'éviter de salir l'étiqueteuse ou les contenants avec les résidus de poissons. Il est donc nécessaire de s'assurer quel contenant doit être utilisé pour quelle analyse.

Ici aussi, le fait de préparer les contenants avant la dissection permet de disposer d'un « pense-bête ». Il convient en effet de s'interroger si un contenant reste vide une fois le poisson totalement disséqué. L'étiquette pouvant se décoller au congélateur, il est nécessaire de rajouter un morceau de scotch par-dessus.

5. Prise de photo pour les analyses morphométriques

5.1. Préparation du poisson

En préalable à la prise de la photo, le poisson est préparé et fixé sur un support en plastique mou. Les nageoires sont déployées et fixées au support à l'aide d'épingles, de manière à pouvoir en distinguer les origines. Le contraste entre la nageoire et le support et/ou le poisson peut être augmenté en disposant une étiquette jaune sous la nageoire. Si le poisson à la gueule ouverte, il faut la lui bloquer en position fermée (FIG. 3A).

Le poisson sera positionné toujours sur la même face, avec la tête orientée vers la droite, sauf si cette face est endommagée (FIG. 3B). Du fait de la position de l'appareil, le poisson apparaîtra avec la tête orientée vers la gauche sur la photo (FIG. 3A). Une étiquette avec le code échantillon devra être placée à proximité du poisson afin que la photo soit identifiable, et avec la même orientation que le poisson pour qu'elle soit lisible (en rose sur la FIGURE 3A). Cette étiquette peut être une des étiquettes pré-imprimées préalablement préparées, quel que soit le nom de l'analyse à laquelle elle sera destinée, à condition que le code échantillon soit lisible.

L'appareil sera placé de manière standard à 100 cm au-dessus du poisson (FIG. 3C). Ensuite, le poisson devra être présent en totalité sur la photo, sans qu'une des extrémités ne dépasse ou touche le bord de l'image, et en occupant la plus grande place possible sur l'image. Pour cela, il sera nécessaire d'ajuster le zoom à l'aide de la bague de l'objectif.

Si nécessaire, plusieurs poissons de petite taille peuvent être placés les uns au-dessus des autres pour réduire le temps de prise des photos (FIG. 3D). Par contre, les photos doivent toujours être prises individuellement, en utilisant le grossissement maximum.



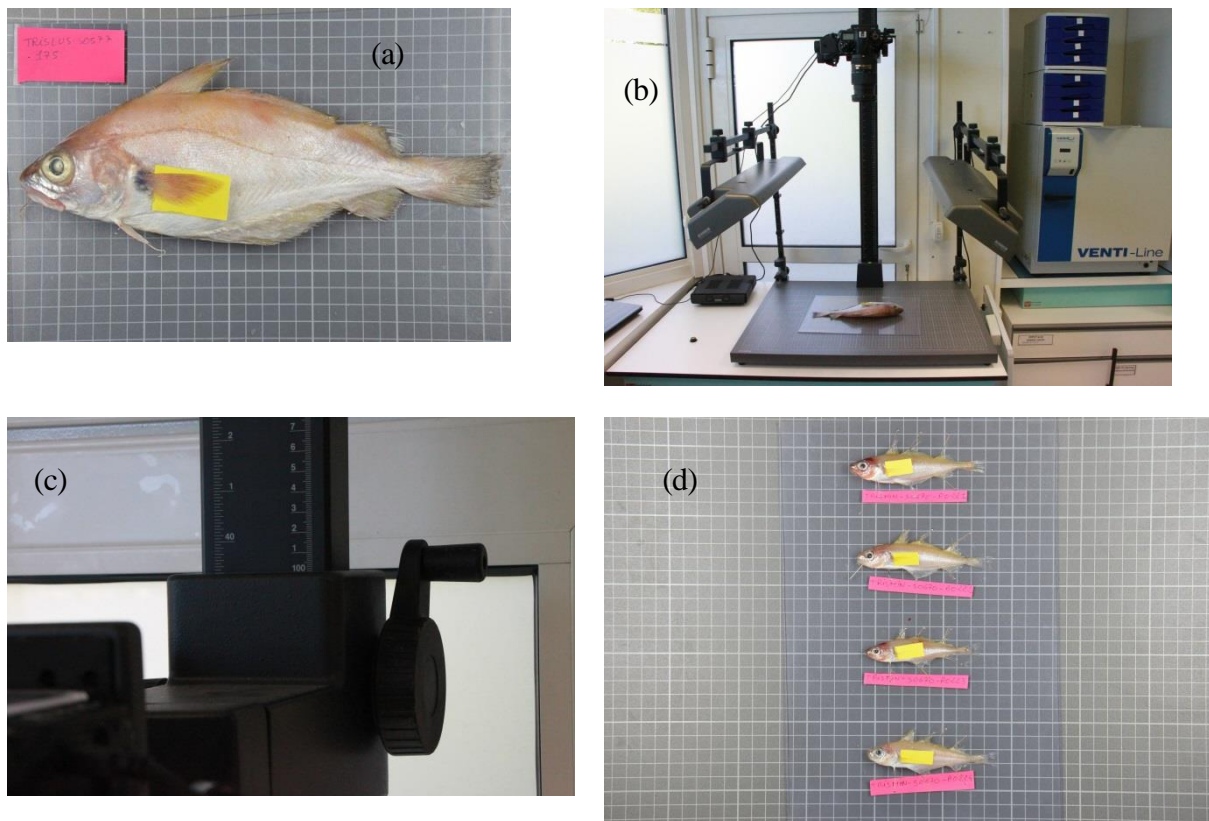


FIG. 3A : PREPARATION DU POISSON AVANT LA PHOTO. B : ILLUSTRATION DE LA POSITION DU POISSON POUR LA PRISE DE PHOTO. C : DETAIL DE LA POSITION DU SUPPORT DE L'APPAREIL D : ILLUSTRATION DU POSITIONNEMENT POSSIBLE POUR PRENDRE EN PHOTOS PLUSIEURS PETITS POISSONS

5.2. Prise de photo.

La photo est réalisée à l'aide du logiciel Camera Control Pro, qui pilote l'appareil photo depuis un ordinateur.

Avant d'ouvrir le logiciel, il faut s'assurer que l'appareil photo et l'éclairage sont bien allumés. Par ailleurs, il faut également s'assurer que la photo est prise au format JPEG, avec la résolution d'image maximale.

Avant de prendre la photo, il est nécessaire de sélectionner le dossier dans lequel seront enregistrées les photos. Pour cela, suivre le chemin suivant : Outils > Option transfert > Dossier des images. Par défaut, les photos pourront être stockées sur le disque réseau resotro, dans le dossier nommé Analyse de géomorphométrie, en créant un sous-dossier par projet.

1. Une fois le logiciel lancé, cliquer sur Appareil> Activer le contrôle du boîtier (FIG. 4)
2. Ensuite, changer le mode d'exposition et choisir « Auto (flash désactivé) »
3. Appuyer sur le bouton « Lv » (en bas à droite) pour activer l'affichage « Live View » sur l'écran de l'ordinateur
4. Sur l'écran Live View qui vient d'apparaître, cliquer sur AF (autofocus) pour mettre l'image au point, puis sur « prise de vue » pour acquérir la photo. A cette étape, il peut être nécessaire d'ajuster la position du poisson pour qu'elle soit effectivement centrée sur la photo. Il est également possible de sélectionner la zone sur laquelle la mise au

point sera faite, en cliquant sur cette zone, ce qui a pour effet de déplacer le carré de mise à point. Une fois l'autofocus réalisé, ce carré passe en vert

A la suite de cette étape, et après s'être assuré que la photo est correctement prise, le nom du fichier doit être modifié pour qu'il corresponde au code individu du poisson.

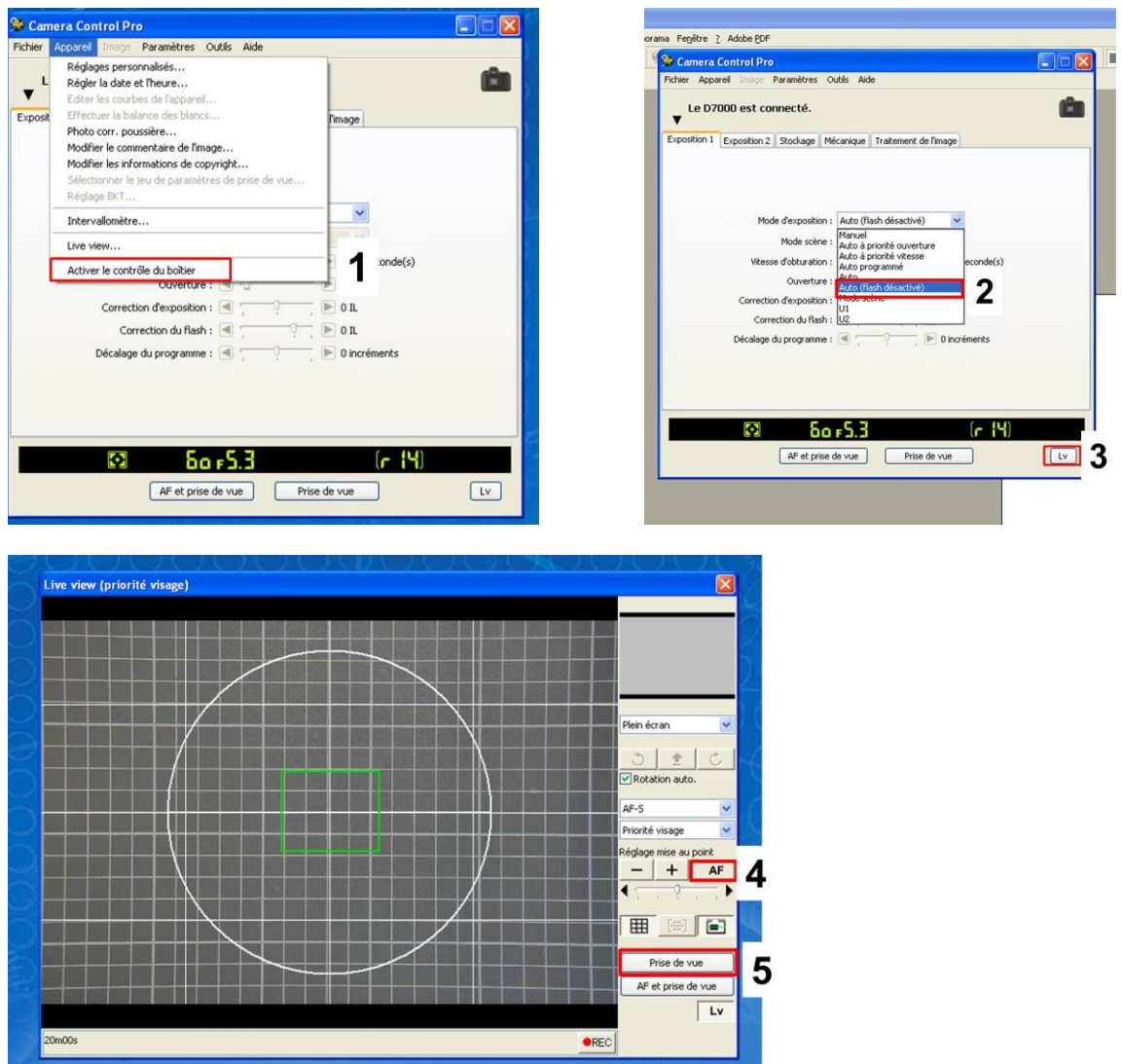


FIG. 4 : ÉTAPES DE PRISE DE LA PHOTO POUR L'ANALYSE MORPHOMETRIQUE DES POISSONS

Enfin, la case « cliché photo pour géomorphométrie » du formulaire (FIG. 5) doit être renseignée (oui/non). Dans cette partie figure également une case pour lister si d'autres clichés ont été pris, pour documenter des particularités du poisson (parasite externe, pigmentations etc.).

Photographie	
Cliché photo pour analyse de géomorphométrie	Oui / Non
Autres clichés pris	

FIG. 5 : DETAIL DE LA PARTIE DU DU FORMULAIRE CONSACRE AUX PHOTOS

6. Biométrie externe

6.1. Masse totale et longueurs

La masse et la longueur sont des paramètres classiquement mesurés et qui sont considérés comme des facteurs explicatifs importants de nombreux phénomènes biologiques. Dans le cadre d'une approche trophique, ils permettent notamment de mieux appréhender la variation ontogénétique de l'alimentation. Ils sont également nécessaires pour caractériser la gamme de taille des proies d'un prédateur.

Pour tous les poissons, la **masse totale** sera mesurée avant la dissection. Conformément à la démarche qualité, une calibration de la balance doit être effectuée régulièrement, afin de s'assurer de l'absence de dérive de celle-ci.

La mesure par défaut est la **longueur totale (LT)**, qui se mesure du point le plus en avant de la tête, bouche fermée, jusqu'à l'extrémité de la queue, en la rabattant. Cette mesure est également utilisée pour les requins et les crustacés. La longueur à la fourche (LF) se mesure du point le plus en avant de la tête jusqu'à la fourche au milieu de la nageoire caudale. Enfin, la longueur standard (LS) se mesure depuis le point le plus en avant de la tête jusqu'à l'extrémité de la dernière vertèbre (déterminée par pliure entre la queue et le pédoncule caudale). Pour certaines espèces de crustacés, il est par ailleurs possible de mesurer la longueur céphalothoracique.

Par convention, et dans un souci d'inter-comparaison entre les travaux, **toutes les longueurs s'expriment en millimètres, et toutes les masses en grammes.**

6.2. Mesure du tour et de la largeur du corps

Le tour et la largeur du corps d'un poisson sont des indicateurs complémentaires concernant la morphologie du poisson. Ils peuvent jouer un rôle important dans le déterminisme des choix alimentaires d'un prédateur, en lien avec l'ouverture maximale de sa gueule (voir paragraphe 6.3).

Le tour du corps du poisson sera mesuré à deux emplacements : au niveau de la pointe des opercules, de manière à garantir une homogénéité de l'emplacement de la mesure entre tous les poissons, et à l'endroit où le tour du corps est le plus important. La mesure s'effectue à l'aide d'un mètre ruban, en s'assurant de sa rectitude, et en s'assurant que la mesure est bien prise sur le même coté du ruban (FIG. 6).



FIG. 6 : MESURE DU TOUR DU CORPS MAXIMUM. LA MEME MESURE DOIT ETRE EFFECTUEE AU NIVEAU DES OPERCULES. ICI LA LECTURE DE LA LONGUEUR SE FAIT SUR LE COTE GAUCHE DU RUBAN.

Concernant la largeur du poisson, une mesure sera effectuée au niveau de la pointe des opercules, à l'aide d'un pied à coulisse (FIG. 7).



FIG. 7 : MESURE DE LA LARGEUR DU CORPS DU POISSON

6.3. Diamètre de la gueule

Le diamètre de la gueule est un paramètre important dans le déterminisme des relations trophiques. En effet, l'augmentation de la taille de la gueule implique une possibilité de consommer des proies plus grandes et surtout plus grosses. Il est donc possible de considérer le diamètre de la gueule comme un trait fonctionnel trophique.

Pour réaliser cette mesure, on utilise des cônes de différents diamètres tronqués à leur extrémité (FIG. 8)



FIG. 8 : ILLUSTRATION DES CONES DE DIFFERENTS DIAMETRES UTILISES POUR LA MESURE DU DIAMETRE DE LA GUEULE

Le cylindre est inséré dans la gueule du poisson, au maximum de l'ouverture possible mais sans aller au-delà de l'ouverture naturelle (*i. e.* sans « forcer »). Le diamètre maximal de l'ouverture de la gueule est mesuré à l'aide des cercles concentriques présents sur le cylindre. Le diamètre maximal du cylindre est inscrit sur son extrémité supérieure, chaque cran correspondant à une diminution du diamètre de 1mm. Le diamètre de la gueule correspond au plus diamètre du cran le plus grand inclus complètement dans la gueule du poisson (cercle vert sur la FIG. 9 ci-dessous).



FIG. 9 : MESURE DU DIAMETRE MAXIMAL DE L'OUVERTURE DE LA GUEULE. LE DIAMETRE MAXIMAL DU CYLINDRE APPARAÎT SUR LE SOMMET (ICI 40 MM). LE DIAMETRE MAXIMAL DE LA GUEULE DE CE POISSON EST MESURE PAR LE CERCLE VERT, DANS LA MESURE OU LE CERCLE ROUGE EST DANS LA GUEULE DU POISSON DANS SA PARTIE SUPERIEURE UNIQUEMENT.

6.4. Mesures de l'œil

Chez certaines espèces de poissons prédateurs, une modification des capacités sensorielles induit une modification de l'efficacité de prédation. Une modification de l'acuité visuelle, liée à un développement des yeux, peut par exemple permettre d'accéder à de nouveaux environnements, et de consommer les espèces présentes dans cet environnement. Le diamètre de l'œil peut donc également être considéré comme un trait trophique.

Concernant la mesure de l'œil, une dissymétrie peut exister entre les deux côtés du poisson. Il convient donc de mesurer les deux yeux. Cependant, il n'est pas nécessaire de mesurer l'œil du côté déjà pris en photo.

Pour le côté non photographié, la totalité de l'œil sera mesurée, à l'aide d'un pied à coulisse (FIG. 10). Si l'œil est parfaitement rond, son diamètre seul peut être mesuré. Si la rotondité de l'œil n'est pas certaine, il est préférable de mesurer séparément la plus grande hauteur et la plus grande largeur.



FIG. 10 : MESURE DU DIAMETRE DE L'ŒIL.

L'ensemble des informations concernant les différents paramètres morphométriques liés à la biométrie externe du poisson seront renseignés dans la partie dédiée du formulaire.

7. Dissection, biométrie interne et prélèvements

Avant chaque dissection ou prélèvement, il est nécessaire que la lame du scalpel soit a minima nettoyée à l'éthanol, à l'eau, puis séchée pour éviter la contamination de l'échantillon. Dans certains cas, et en fonction des analyses qui seront effectuées par la suite, il pourra être nécessaire d'utiliser une lame par individu.

7.1. Dissection de la cavité abdominale

Afin d'éviter de toucher le tube digestif au moment de la dissection, l'incision pour la dissection de la cavité abdominale sera faite de manière à ce que le trait d'incision passe à côté de l'anus (FIG. 11).



FIG. 11 : POSITION DE L'INCISION POUR LA DISSECTION DES ORGANES INTERNES (TUBE DIGESTIF, FOIE, GONADES)

Le contenu de la cavité abdominale (tube digestif, foie et gonades) doit être ensuite sorti et récupéré précautionneusement si des prélèvements sont prévus. La découpe du tube digestif s'effectuera de manière à en conserver la plus grande part, c'est-à-dire en incisant à la base de l'œsophage et à l'extrémité de l'anus. Une fois retiré, il sera mis à part et conservé. Les viscères étant des sources potentielles de contamination (aussi bien pour les analyses isotopiques que de contaminants), elles seront traitées en dernier une fois la totalité des autres prélèvements effectués.

Une fois le contenu de la cavité abdominale retiré, et avant les dissections de muscle, la masse éviscérée du poisson sera mesurée.

7.2. Dissection et prélèvement de muscle

De par ses propriétés métaboliques et sa consommation préférentielle, le muscle est la matrice principalement analysée dans la plupart des travaux. Il convient donc de le prélever précautionneusement, et de sélectionner le morceau de muscle et la quantité de matière les plus appropriés à chaque analyse, conformément à la littérature et à l'expérience du laboratoire, et à la répartition des besoins de matière pour chaque analyse.

Le muscle dorsal est le tissu classiquement utilisé pour les analyses isotopiques, principalement en raison de son taux de lipides faible. L'analyse de mercure sera effectuée sur un morceau de muscle prélevé sur le pédoncule caudal. Pour ces deux analyses, une quantité faible est nécessaire, environ 2 mg masse humide, soit une section d'environ 2 cm.

Enfin, les analyses de polluants organiques seront effectuées sur un morceau de filet. Il est cependant possible de prélever la totalité du muscle restant après les prélèvements pour les isotopes et le mercure, dans la mesure où l'analyse des contaminants organiques requiert une quantité de matière plus importante (~20 mg masse humide).

Dans tous les cas, il conviendra avant la dissection de s'assurer auprès du laboratoire qui réalisera les analyses que la quantité de matière prélevée et les contenants utilisés sont cohérents avec le protocole d'analyse. Néanmoins, en raison de la faible quantité de matière nécessaire pour

l'analyse isotopique et de mercure, l'utilisation d'éppendorfs doit être privilégiée, car elle permet un stockage et une lyophilisation plus facile. Elle permet également de broyer les échantillons directement dans l'éppendorf, ce qui représente un gain de temps, et également évite les contaminations potentielles et les pertes de matière liées aux changements de contenant.

Si une information concernant le rapport masse humide / masse sèche est nécessaire (notamment dans le cas des analyses de contaminants⁵), il sera nécessaire de peser la masse de l'éppendorf vide, de l'éppendorf plein avant et après lyophilisation.

La pesée du muscle dédié à l'analyse des métaux ou des POP pourra également être faite, afin d'estimer la quantité de matière disponible pour l'analyse, et d'éliminer les échantillons pour lesquels cette quantité n'est pas suffisante.

Par ailleurs, un morceau de colonne vertébrale pourra également être prélevé pour l'analyse isotopique. En effet, le temps d'intégration plus long dans ce tissu permet d'appréhender l'alimentation avec une résolution temporelle plus longue. Pour cette analyse, un morceau de colonne d'environ 5 cm sera prélevé, en essayant d'enlever le plus possible de chair autour des vertèbres. Ce prélèvement sera conditionné en sachet zip. Si le prélèvement a été effectué, il est nécessaire d'entourer la modalité « oui » dans la case correspondante.

7.3. Prélèvement de pièces calcifiées pour ageage

Chez les poissons, un ensemble de pièces calcifiées sont disponibles et permettent d'estimer l'âge des individus. Les principales sont les otolithes, les écailles, les vertèbres et l'illicium chez les baudroies (*Lophius* spp.). Selon les espèces, la pièce calcifiée la plus propice à la lecture de l'âge varie. Il conviendra donc d'échanger avec l'équipe du pôle national de sclérochronologie en amont de l'étude, afin de s'assurer de la pièce à prélever, et du protocole d'extraction, de préparation et de nettoyage à mettre en œuvre. Si le prélèvement d'une ou plusieurs pièces calcifiées a été effectué, il est nécessaire d'entourer la ou les pièces calcifiées prélevées dans la case correspondante.

7.4. Prélèvement des viscères

Suite à la dissection et l'extraction des viscères, les différents organes d'intérêt seront prélevés et mesurés le cas échéants.

Les gonades seront extraites de manière à identifier le sexe de l'individu, et le stade de maturité sexuelle, conformément aux documents de référence à ce sujet. Elles seront également pesées, afin de calculer le rapport gonado-hépatique. Si nécessaire, elles seront conservées. Le protocole de stockage dépendra de la finalité du prélèvement, et devra être conforme au protocole du laboratoire prestataire qui réalisera les analyses.

⁵ Dans le cadre d'une vision « sanitaire » des contaminants (risque pour la santé humaine), les concentrations sont exprimées relativement à une masse humide et ensuite comparées aux textes de référence. Dans le cadre de l'utilisation des contaminants comme traceurs de processus écologiques, approche mise en œuvre au sein de la plateforme Réseaux Trophiques, les concentrations seront exprimées relativement à des masses sèches. Il convient donc, quand les deux objectifs sont recherchés dans un même projet, par exemple dans le cas de collaborations extérieures, de disposer de coefficients de conversion entre concentrations exprimées relativement à des masses sèches ou des masses humides.



Le foie de l'individu sera également extrait et pesé pour calculer le rapport hepato-somatique. Si nécessaire, le foie sera conservé pour des analyses ultérieures selon les spécificités propres à chaque analyse, comme évoqué précédemment.

Aussi bien pour les gonades que le foie, ces prélèvements devront être conservés dans un contenant en matériau inerte et non contaminant pour la réalisation d'analyses de contaminants organiques. Dans l'optique d'une analyse isotopique, il sera possible d'en conserver une petite partie seulement, et de la stocker dans un tube eppendorf, pour les mêmes raisons que celles évoquées pour le muscle.

Une fois les gonades et le foie prélevés, le tube digestif sera mesuré dans sa totalité, en le dépliant au maximum, mais sans exercer une tension trop importante. Cette mesure sera exprimée en millimètres (FIG. 12).

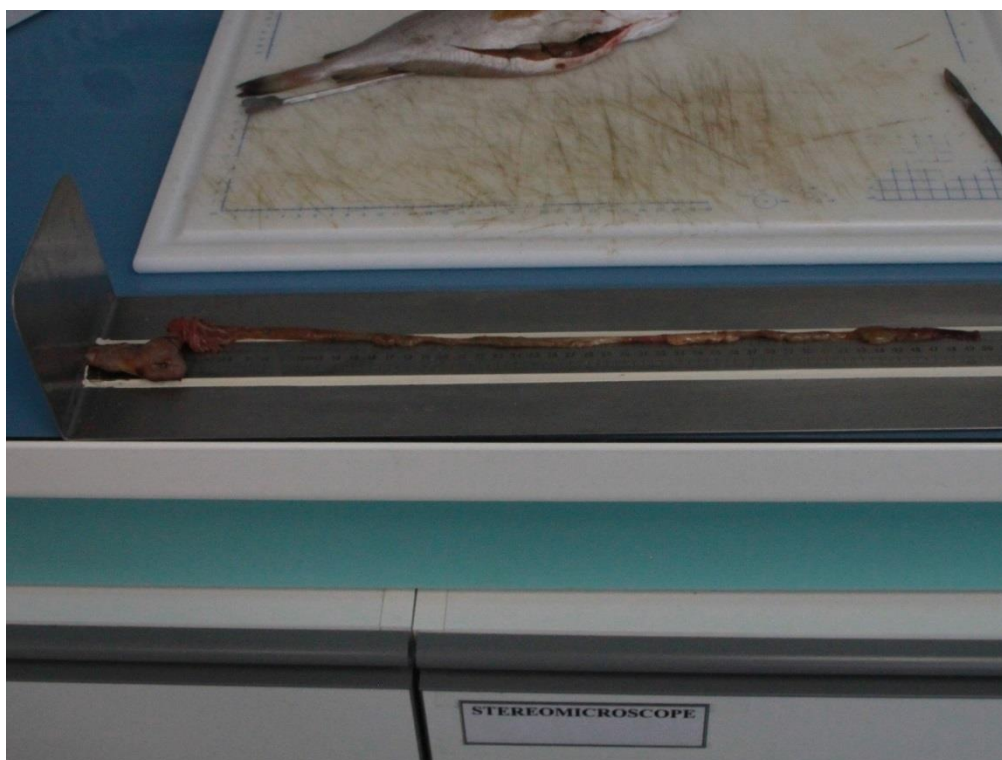


FIG. 12 : MESURE DE LA LONGUEUR DU TUBE DIGESTIF

Le tube digestif sera ensuite séparé en deux : l'estomac sera séparé de l'intestin, par une coupe au niveau du caecum pylorique (Fig. 13). La masse de l'estomac plein (*i.e.* estomac plus son contenu) sera mesurée.

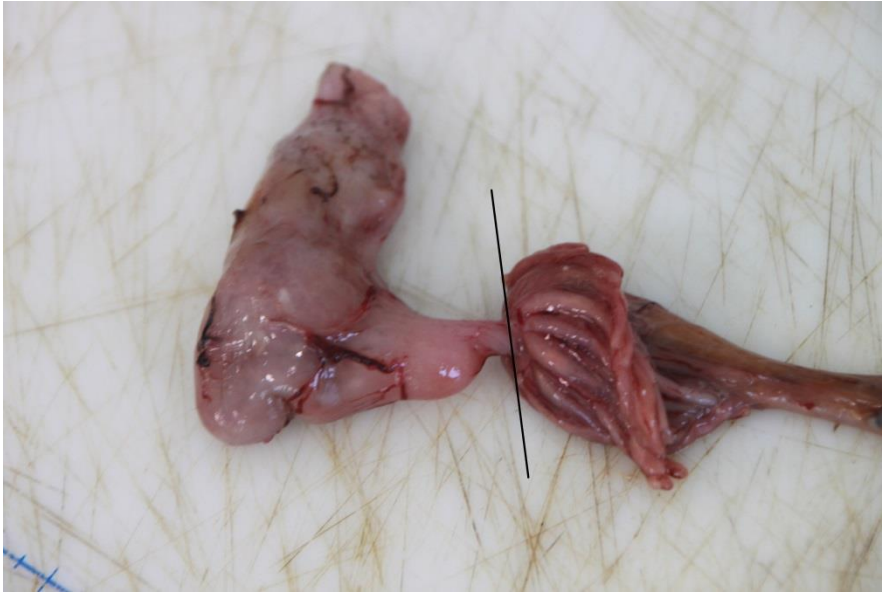


FIG. 13 : ILLUSTRATION DE LA ZONE DE COUPE POUR LA SEPARATION DE L'ESTOMAC ET DE L'INTESTIN

Par la suite, le contenu de l'estomac sera extrait, en réalisant une coupure au niveau de la paroi. Le contenu de l'estomac sera ensuite collecté dans un contenant adapté au volume présent. Pour la plupart des poissons, le contenu sera collecté dans une boîte de Petri, mais il est possible d'utiliser un flaconnage de plus grande contenance pour les estomacs d'individus de plus grande taille. La boîte de Petri sera ensuite scellée hermétiquement à l'aide de parafilm, puis placée le plus rapidement possible au congélateur -20°C pour stopper l'action de digestion. Le prélèvement du contenu de l'estomac sera notifié en entourant oui sur la feuille de dissection. Dans le cas d'un estomac vide, il sera possible de ne pas faire de prélèvement, mais il conviendra d'entourer « non » et de préciser la vacuité avec l'indicateur qualitatif de remplissage de l'estomac, estimé visuellement. Cet indicateur comprend 6 modalités détaillées dans le TABLEAU 3 ci-dessous

Modalité	Critère d'identification
D : Estomac dévaginé	Estomac vide et que l'on voit ressortir par la bouche. La vacuité est liée à l'élimination du contenu de l'estomac et non à l'absence d'alimentation
0 : Estomac vide	Pas de restes observables dans l'estomac, qui n'est pas expansé, et dont la paroi forme des replis bien discernables.
0.25 : estomac rempli à $\frac{1}{4}$	Quelques proies observables, les parois sont très légèrement dilatées
0.5 : estomac rempli à moitié	Le nombre de proies observables, et la dilatation des parois augmentent
0.75 : estomac rempli aux $\frac{3}{4}$	augmentation du nombre de proies et de la dilation de la paroi stomacale.
1 : estomac plein	Grande quantité de proies (nombreuses petites/quelques-unes de grande taille). La paroi de l'estomac est complètement lisse.

TAB. 3 : MODALITES DE L'INDICATEUR QUALITATIF DU DEGRE DE REMPLISSAGE DU CONTENU STOMACAL, ET CRITERES D'IDENTIFICATION.

Dans le cas d'estomacs très remplis (catégories 0.75 et 1), cette abondance peut être le reflet d'une consommation artificielle de proies dans l'engin de collecte. Si un doute existe à ce sujet, il convient de le notifier sur la feuille de saisie. Par ailleurs, il est possible de noter à ce stade des observations qui faciliteront l'analyse future du contenu de l'estomac. Par exemple, si des proies non digérées sont retrouvées, il est intéressant de noter leur présence. De même, si les otolithes d'un poisson proie sont retrouvées en dehors mais à proximité du poisson (par exemple légèrement sorties de la boîte crânienne), il est également utile de le noter, afin d'éviter de compter deux fois cette proie lors de l'analyse du contenu.

Une fois le contenu de l'estomac vidé, la masse de l'estomac vide sera pesé afin d'estimer la masse du contenu par différence.

Pour terminer, le contenu de l'intestin sera prélevé, dans une boîte de Petri ou un flacon de plus grande taille, en fonction de la quantité contenue dans l'intestin. Aucun indicateur (observation visuelle ou pesée) n'est estimé sur l'intestin.

8. Finalisation de la dissection et nettoyage du matériel

Une fois la dissection du poisson terminée, l'ensemble du matériel et du poste de travail doit être nettoyé avant de passer au poisson suivant. Le matériel et le poste de travail sont tout d'abord rincé à l'eau afin de retirer les salissures les plus importantes. Par la suite, ils sont systématiquement rincés à l'éthanol à l'aide d'un essuyeur de laboratoire (type Kimtech).

Avant de passer au poisson suivant, chaque opérateur doit s'assurer :

- Que l'ensemble des prélèvements et des mesures nécessaires ont été effectuées. Il peut pour cela s'aider de la feuille de dissection.
- Que le numéro incrément a bien été augmenté sur l'ardoise du laboratoire, afin d'éviter que deux poissons, éventuellement disséqué par deux opérateurs différents, portent le même numéro. Il convient aussi de s'assurer que le nouveau numéro ne correspond pas au numéro d'un poisson déjà disséqué ou en cours de dissection par un autre opérateur.