

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

Margaux Denamiel
Clémence Cure
Rémy Cordier
Thibaut Kersaudy
Pierre Cresson

Guide des protocoles pour l'analyse des contenus digestifs en vue de l'étude des réseaux trophiques

Version 1- Juillet 2021

Sommaire

Table des matières

1	Introduction	4
2	Comprendre et réaliser l'analyse de contenus digestifs.....	6
2.1	Préparation du poste de travail et des échantillons.	6
2.2	Formulaire « Analyse de contenu digestif sans fractionnement ».....	6
2.3	Arbre de décision.....	7
2.3.1	Identification de l'échantillon.....	9
2.3.2	Observations.....	10
2.3.3	Détermination	11
2.3.4	Mise en collection d'un item	12
2.3.5	Dénombrement et mesures	13
2.4	Photographie et mesures	15
2.4.1	Prise de photographie	15
2.4.2	Mesures à l'aide du logiciel	18
3	Fin de l'analyse.....	20
3.1	Rangement du matériel.....	20
3.2	Saisie des données.....	20
	Annexe 1 : Questions pour suivre l'Arbre de décision pour la lecture des contenus digestifs.....	21
	Annexe 2: Protocole de fixation et rinçage des contenus digestifs au formaldéhyde (formol).....	23
	Annexe 3 : Exemples de comptage de l'effectif, lorsque plusieurs pièces sont retrouvées dans un même tractus digestif	26

1 Introduction

La compréhension de la structure des réseaux trophiques marins est une préoccupation importante à l'heure actuelle, notamment dans le cadre d'une vision intégrée de leur gestion. Malgré leur caractère historique, et le fait que de nouvelles approches basés sur des traceurs biochimiques intégrés (isotopes stables ou acides gras par exemple) sont maintenant largement répandues en écologie trophique, l'analyse des contenus stomacaux reste une technique toujours utilisée (Pethybridge et al., 2018), notamment quand la détermination taxonomique précise des proies est requise, ou lorsque ces proies ne sont pas suffisamment différentes au niveau des traceurs intégrés. Les modèles d'écosystèmes – à l'image des modèles OSMOSE ou Atlantis mis en œuvre par l'unité HMMN (Girardin et al., 2018; Travers-Trolet et al., 2019) – nécessitent ainsi des données trophiques issues des contenus stomacaux, soit pour construire la matrice trophique qui détermine les interactions proies-prédateur, soit pour valider les sorties du modèle. Par ailleurs, dans le cadre des approches de gestion, les données issues des contenus stomacaux sont également utiles pour caractériser la dynamique de ces interactions, dans un contexte de changement global, et pour mieux définir la mortalité naturelle des espèces évaluées dans un contexte multi spécifique, voir écosystémique. À ce titre, les données liées à la prédation seront intégrées dans le programme européen de collectes de données pour la pêche 2022-2025.

L'analyse des contenus digestifs souffre cependant de biais méthodologiques bien connus. Certains sont inhérents à la méthode, et peuvent difficilement être contrés. Plusieurs travaux en ont fait la synthèse. Dans ce contexte, ce guide a vocation à préciser et standardiser les méthodes utilisées au sein de la Plateforme Réseau Trophique. Le lecteur ou la lectrice intéressée par une analyse détaillée des avantages et des inconvénients des différentes méthodes est invité à lire ces différents articles (voir par exemple Amundsen and Sánchez-Hernández, 2019; Hyslop, 1980; Saikia, 2016)

Pour autant, il est connu que la consommation et la digestion de proies possédant des tissus plus ou moins durs (et donc plus ou moins rapidement digérés) induit l'analyse à un temps t de proies n'ayant pas le même temps de résidence dans l'estomac. De ce fait, la surestimation des proies ayant des tissus durs (et donc la sous-estimation des proies n'ayant que des tissus mous) est un biais bien connu de cette analyse. Il est par ailleurs parfois difficile de quantifier l'importance réelle de certains types de proies, notamment pour des organismes coloniaux ou des producteurs primaires, ou la notion d'individu est difficilement définissable. Mettre ces différents items au même niveau pose donc un problème de robustesse quant à la représentation de l'alimentation.

De même, la différence d'intérêt scientifique porté aux différents groupes fait aussi que les informations sont parcellaires. Par exemple, il existe plus de relations robustes permettant de recalculer la taille initiale du poisson prédaté à partir de la mesure de ses otolithes, que de relations entre la mesure des appendices et la taille ou la masse initiale de l'individu chez les crustacés. La part de subjectivité de chaque observateur dans l'analyse est également bien connue, du fait par exemple de niveaux d'expertise taxonomique variable entre les opérateurs.

L'ensemble de ces limites poussent à la mise en place d'une standardisation de l'analyse des contenus digestifs, afin de minimiser les biais, ou tout du moins de les identifier, et de les maintenir constants sur toutes les analyses, afin d'assurer l'intercomparaison des résultats. Cette

standardisation permettra également de définir des procédures d'intercalibration du protocole, avec d'autres protocoles répondant à d'autres objectifs le cas échéant.

NB : Ce guide se focalise sur les poissons *sensu lato* (téléostéens et chondrichthyens), 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 », par commodité de langage et malgré l'imprécision taxonomique, lorsque le travail devra être réalisé de manière identique quel que soit le groupe taxonomique considéré. Si la taxonomie influe sur les travaux à réaliser, cela sera explicitement précisé.

2 Comprendre et réaliser l'analyse de contenus digestifs

L'analyse de contenus digestifs est réalisée dans la continuité de la dissection des poissons. Le protocole de réalisation de ce travail a fait l'objet d'un autre guide méthodologique dédié auquel le lecteur intéressé est invité à se référer « Guide des protocoles pour la dissection et le prélèvement des échantillons en vue de l'étude des réseaux trophiques » (Cresson et al., 2016).

2 outils spécifiques à la Plateforme Réseaux Trophiques sont à la disposition de l'opérateur pour l'analyse du contenu digestif :

- le formulaire d'Analyse de contenu digestif, permettant de suivre un ordre logique dans le déroulement de l'analyse et de récolter toutes les informations nécessaires,
- l'arbre de décision des contenus digestif, proposant à l'opérateur (1) des critères simples permettant de classer les proies en différents états de dégradation croissant, et (2) les opérations à réaliser en fonction des différents états.

L'opérateur a par ailleurs à sa disposition un ensemble de guides d'identification des principales espèces pouvant être retrouvées dans les contenus digestifs.

2.1 Préparation du poste de travail et des échantillons.

Avant de commencer la lecture de contenus digestifs congelés, il convient de se rappeler que les contenus seront mis à décongeler et que cette étape peut être longue, notamment pour les contenus volumineux. Il est par ailleurs important de se rappeler que la décongélation réactive les sucs digestifs. Il ne faudra donc pas laisser les contenus à décongeler à une température trop élevée. Il est par exemple recommandé de placer les contenus dans la chambre froide (~6°C) la veille, afin de laisser une nuit de décongélation lente. Échelonner la décongélation de plusieurs tractus, plutôt que de mettre le lot entier à décongeler, peut également être une solution à privilégier. Enfin, recongeler un contenu décongelé induit une étape de dégradation supplémentaire, il faut donc faire en sorte de décongeler un nombre de contenus approprié par rapport au temps de travail disponible.

Le formol est parfois utilisé pour fixer des contenus digestifs. Dans ce cas, il est nécessaire de garder en mémoire que le formol est un réactif dangereux, notamment du fait de son caractère cancérigène. Il convient donc de se référer au « Protocole de fixation et rinçage des contenus digestifs au formaldéhyde » en usage à la Plateforme disponible sur le disque réseau « Resotro » via Protocoles\Protocoles fixation et rinçage formol, et qui figure en annexe 2 de ce guide.

Il est nécessaire d'enlever toutes les housses et capuchons de protections présents sur le matériel d'observation, c'est-à-dire sur le stéréomicroscope, la balance et la source de lumière. Ces protections devront être remises chaque soir sur le matériel pour éviter les poussières et prolonger la durée de vie du matériel.

2.2 Formulaire « Analyse de contenu digestif sans fractionnement »

Un formulaire d'analyse de contenu digestif 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 « Resetro » via Formulaires\Formulaires d'analyse de contenus digestifs

Suivi formulaire		Saisie effectuée <input type="checkbox"/>	Saisie vérifiée <input type="checkbox"/>	PROJET :	Date : / /	Visa opérateur :	Page /
Prélèvement		Estomac / Intestin		Code échantillon	Déstockage <input type="checkbox"/>		

Observations			
Code item			
Catégorie	Proie \ Parasite \ Autres		
Stade	oeuf \ larve \ juvénile/adulte \ NA		
Etat	1 \ 2 \ 3 \ 4		
Remarques, Type(s) item(s):			
Détermination			
Nom taxonomique le plus bas dans la classification			
Mesures			
Nombre individu			
Masse totale (g)			
Masse sous échantillon (g)			
Type de mesure de taille utilisé			Photographie
Taille sur chaque item (cm) :			

Observations			
Code item			
Catégorie	Proie \ Parasite \ Autres		
Stade	oeuf \ larve \ juvénile/adulte \ NA		
Etat	1 \ 2 \ 3 \ 4		
Remarques, Type(s) item(s):			
Détermination			
Nom taxonomique le plus bas dans la classification			
Mesures			
Nombre individu			
Masse totale (g)			
Masse sous échantillon (g)			
Type de mesure de taille utilisé			Photographie
Taille sur chaque item (cm) :			

Observations			
Code item			
Catégorie	Proie \ Parasite \ Autres		
Stade	oeuf \ larve \ juvénile/adulte \ NA		
Etat	1 \ 2 \ 3 \ 4		
Remarques, Type(s) item(s):			
Détermination			
Nom taxonomique le plus bas dans la classification			
Mesures			
Nombre individu			
Masse totale (g)			
Masse sous échantillon (g)			
Type de mesure de taille utilisé			Photographie
Taille sur chaque item (cm) :			

Formulaire : Analyse de contenu digestif

FIGURE 1 : FORMULAIRE DE SAISIE DES RESULTATS DE L'ANALYSE DES CONTENUS DIGESTIFS

Le formulaire, quel que soit son nombre de pages, est propre à chaque échantillon/poisson et doit être considéré comme un guide des travaux à effectuer. Sa conception suit l'ordre logique de réalisation des tâches. Il convient donc de s'assurer de remplir les cases dans l'ordre.

Il est aussi nécessaire de renseigner le nombre de page utilisée pour l'analyse du contenu digestif sur chacune des feuilles pour éviter les erreurs de saisie et/ou les oublis, dans le cas d'estomacs contenant un grand nombre de proies.

2.3 Arbre de décision

Cet arbre de décision a pour objectif de proposer une méthode standardisée d'analyse des contenus digestifs. Il évite la réalisation de mesures non pertinentes pour répondre à des questions trophiques (par exemple peser un appendice de crustacé, ou mesurer la taille d'un débris non identifiable). Il minimise également le biais opérateur puisqu'il représente un guide, proposant (1) des critères simples et partagés permettant de classer un item dans un état, et (2) des opérations que chacun doit réaliser selon le niveau de dégradation de l'item. La lecture de l'arbre de décision se fait de haut en bas en suivant le sens des flèches (Fig. 2).

En plus du guide d'utilisation que représente le présent document méthodologique, la version imprimée de cet arbre est affichée au sein de la plateforme Réseaux Trophiques. Il convient de s'y référer régulièrement, et notamment en cas de doute lors de la réalisation des analyses.

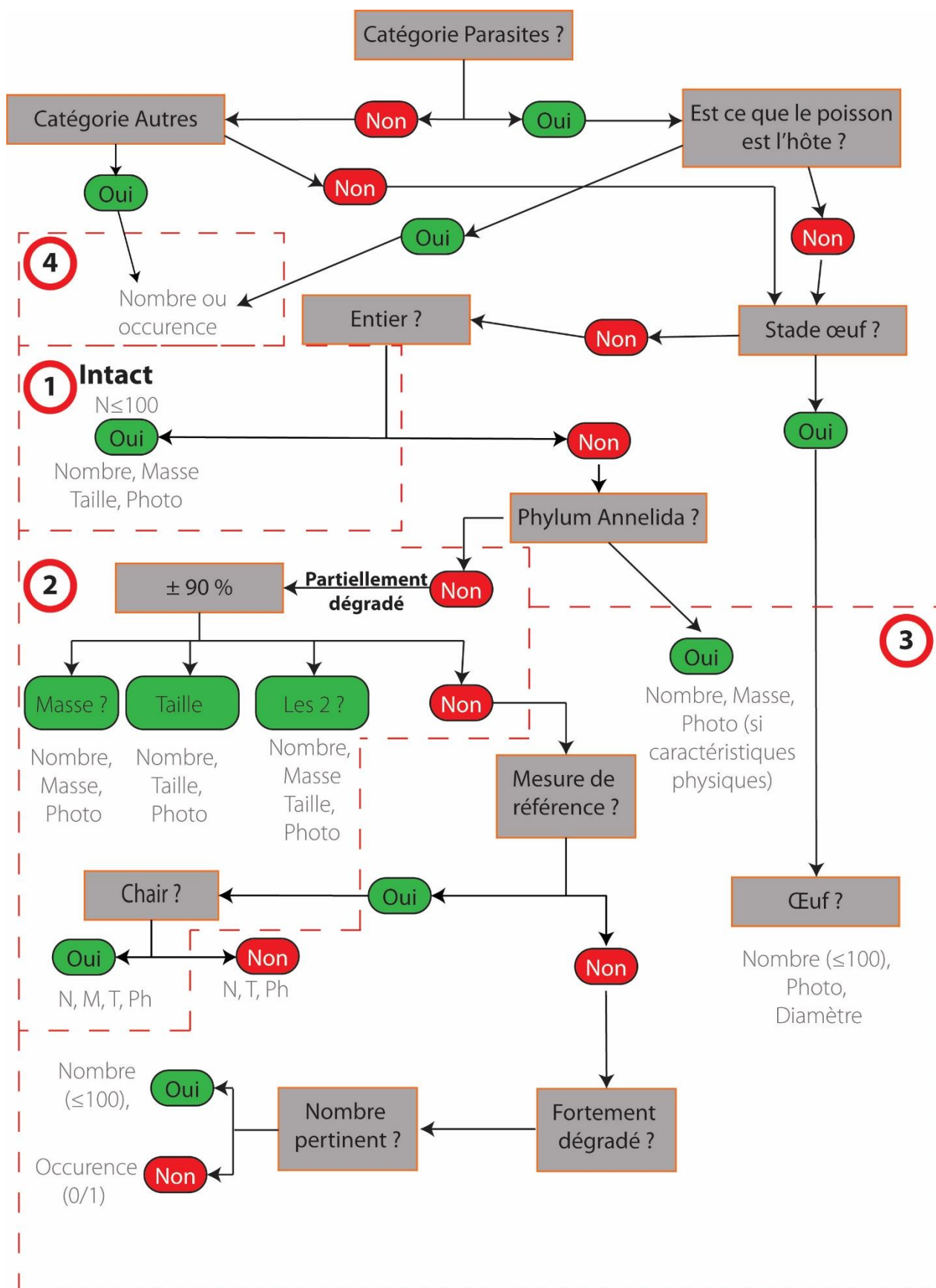


FIGURE 2 : ARBRE DE DECISION POUR LES CONTENUS DIGESTIFS

L'arbre divise les items retrouvés dans les contenus digestifs en 4 états, qui correspondent principalement à des niveaux de dégradation croissants :

- l'état 1 correspond à un item défini comme « Intact »,
- l'état 2 correspond à un item défini comme « Partiellement dégradé »,
- l'état 3 correspond à un item défini comme « Fortement dégradé » ou de stade « Œuf »,
- l'état 4 correspond à un item de catégorie « Parasites » ou « Autres ».

L'arbre doit se lire comme une suite de questions, que l'opérateur doit se poser à chaque croisement. L'annexe 1 permet de faire la lecture détaillée de l'arbre de décision des contenus digestifs. Par exemple, la première question à se poser concerne le caractère « Parasite » de l'item. Si la réponse est oui, l'item est classifié en état 4, aucune mesure n'est nécessaire. Si non, est ce que c'est un œuf ? Si oui, l'item est inclus dans l'état 3 « Œuf », et l'opérateur doit effectuer un dénombrement (dans la limite de 100 items), une photographie globale ainsi qu'une photographie d'un item, et la mesure du diamètre de 10 œufs au maximum. Il convient par la suite de suivre les flèches.

Lorsque l'opérateur arrive à la fin d'un « chemin », les différentes mesures à réaliser sont mentionnées. Le protocole de réalisation de ces différentes mesures est précisé ci-après dans le guide :

- Nombre (ou N) : comptage du nombre d'items, dans la limite de 100 items au maximum¹.
- Masse : pesée individuelle des items,
- Photographie : photographie individuelle des items,
- Longueur totale : mesure de la longueur totale, soit à l'aide d'un réglet ou de papier millimétré, soit par analyse de la photo grâce au logiciel cellSensEntry.

2.3.1 Identification de l'échantillon

L'analyse du contenu digestif débute par le remplissage des informations concernant le nom du projet, la date et l'opérateur ayant réalisé la lecture du contenu digestif.

En second lieu il faut renseigner la case du type de prélèvement étudié (Estomac\Intestin), puis le code échantillon, tous deux notés sur le récipient de collecte. L'exactitude du code échantillon doit être vérifiée en se référant au fichier « MINESTRONE Biométrie », saisi au moment de la dissection, et présent sur le disque « Resotro » via MINESTRONE\TrophicNetworkDatabase, référant tous les contenus digestifs prélevés. Cela permet d'éviter de propager une erreur de saisie qui aurait pu se produire au moment de l'étiquetage du contenant. Il convient également de vérifier à cette occasion le nombre de contenants distincts, en se référant à la cellule « commentaires » du fichier « MINESTRONE Biométrie », afin de s'assurer que la totalité du contenu a été analysé. Une analyse en différé des différents contenants est évitée, ce qui évite des questionnements dans la saisie. Enfin il est nécessaire de déstocker l'échantillon dans le fichier

¹ Un cas particulier concerne le comptage de quantités très importantes de zooplancton, pour lequel un fractionnement à la boîte de Motoda doit être réalisé

de stockage sur le disque « Resotro » via Stockage biologique - IFREMER afin de suivre l'avancer des échantillons.

Dans le cas d'une analyse d'un contenu digestif où aucune proie n'est observée, les étapes concernant les informations d'identification restent les mêmes. Il conviendra de noter la mention « vide » sur le formulaire. Pour la saisie des données se référer à la partie 3.2. Saisie des données.

2.3.2 Observations

On définit comme « item » toute entité retrouvée dans un contenu digestif, qu'il s'agisse d'un élément du régime alimentaire, d'un parasite ou d'un déchet. Pour démarrer l'analyse il est possible de diluer le contenu digestif dans différentes coupelles ou de le passer au tamis de 200 µm sous un faible débit d'eau. L'opérateur peut alors regrouper dans une coupelle les items de même niveau taxonomique, puis séparer dans cette même coupelle les états de dégradations différents.

Il est conseillé d'alterner les fonds clairs et sombres de la base du stéréomicroscope pour distinguer tous les items du contenu digestif et ne pas en oublier.

Chaque item recevra un code construit sur la base du numéro d'incrément du poisson, c'est-à-dire les 5 derniers caractères du code échantillon (*e.g.* D0056), auquel on fera suivre un underscore (« tiret du 8 ») et le numéro de l'item. Le premier item observé sera identifié D0056_1, puis le second D0056_2 et ainsi de suite.

L'analyse se poursuit en identifiant la catégorie de l'item « Proie\Parasite\Autres », des notions de taxonomie sont nécessaires à la catégorisation de l'item observé :

- « Proie » correspond à un item faisant partie à proprement parler du régime alimentaire du poisson. Il s'agit d'un item ingéré par une action de prédation. Les éléments végétaux (débris d'algues par exemple) rentrent dans cette catégorie, même s'il n'est pas toujours possible de déterminer si leur présence résulte d'une consommation délibérée ou non (résultant par exemple de l'ingestion d'une proie posée sur une algue),
- « Parasite » correspond à un item ne faisant pas partie du régime alimentaire du poisson. Leur présence dans le tractus digestif s'explique parce que le poisson est un des hôtes du cycle de vie du parasite interne. Lorsque la présence du parasite s'explique par une action de prédation (*e.g.* ectoparasite retrouvé dans le tractus digestif), il est considéré comme étant une proie, ceux-là sont classés en catégorie « Proie »,
- « Autres » correspond à un item non issu d'un organisme vivant et n'apportant aucun apport nutritionnel (*e.g.* sable, gravier, microplastique etc.).

Le stade de l'item « œuf \ larve \ juvénile/adulte \ NA » est à renseigner : en effet, en fonction des saisons la disponibilité des proies varie et les demandes énergétiques du poisson aussi. Cette information permet de mieux appréhender la variation ontogénétique de l'alimentation.

Concernant le stade « juvénile/adulte » c'est un seul et même stade, et dans le cas d'un item de stade « larve » il est bien de préciser s'il s'agit d'un stade de développement zoé ou mégalope dans la case « Remarques, Type(s) item(s) ». Ces informations figurent dans la littérature dédiée à laquelle il convient de se référer (Martin, 2000).

À chaque item sera attribué un état « 1\2\3\4 », puisqu'en fonction de ses caractéristiques physiques et de son temps de résidence dans le tube digestif, l'item sera plus ou moins dégradé. Une pièce dure comme un otolithe se dégradera moins rapidement qu'une pièce molle comme un corps de crevette.

L'arbre de décision pour les contenus digestif est l'outil à utiliser pour distinguer les 4 états possible, son utilisation est décrite précédemment dans le guide (cf. 2.3 Arbre de décision).

Toute mention ayant besoin d'être spécifiée par l'opérateur doit figurer dans la case « Remarques, Type(s) item(s) » (e.g. le nombre de pinces ou le nombre d'yeux observés). Mentionner cette information initiale est cruciale, car elle permet de comprendre le calcul du « Nombre individu ». Il est primordial d'être précis et cohérent dans les termes écrits car le commentaire n'est pas standardisé. Si l'on observe un corps de poisson sans la tête, on mentionnera « corps de poisson sans la tête », si une mesure de taille est effectuée sur cet individu on saura que la mesure est partielle.

Par ailleurs si l'opérateur n'est pas certain du niveau taxonomique de l'item étudié, la remarque « *Forte probabilité que l'item soit un sprat* » peut être mentionnée, ou si une identification/vérification de niveau taxonomique est faite en présence d'une personne experte il est bon de mentionner « Vu par ... ».

2.3.3 Détermination

Le « Nom taxonomique le plus bas dans la classification » est le niveau taxonomique où l'on arrive le mieux à déterminer l'item avec les indices récoltés.

La règle qui prévaut quant à l'identification taxonomique est que l'information retenue doit être celle pour laquelle l'opérateur est sûr de lui, sur la base de ce qui est observé, et non sur la base d'interprétations. Il n'est pas acceptable qu'un item trop dégradé pour être identifié au niveau de l'espèce le soit par supposition, par exemple parce que **cette proie est présente en grand nombre dans l'estomac d'un individu de la même espèce analysé auparavant.** La case « Remarques, Type(s) item(s) » permet cependant de faire figurer cette information, qui pourra être utile au moment de l'analyse des données.

Ce nom taxonomique est issu de la Systématique. Sa détermination se base sur les connaissances propres aux opérateurs, mais également sur différents ouvrages de référence disponible dans la bibliothèque de la Plateforme Réseaux Trophiques. Elle couvre au mieux tous les embranchements rencontrés dans l'analyse des contenus digestifs.

Les ouvrages sont constitués de clés de déterminations, qui permettent d'atteindre une identification taxonomique, sur la base de critères morphologiques discriminants successifs. Chaque réponse à une question permet de passer à la suivante, il est important de ne pas passer à la question suivante si on n'a pas la réponse à la question précédente. Dans ce cas, l'opérateur considère le niveau auquel il est arrivé comme le « nom taxonomique le plus bas dans la classification ».

Le nom taxonomique doit être renseigné en respectant quelques règles classiques, visant à garantir une compréhension par l'ensemble des utilisateurs potentiels et une durabilité de l'information :

- les différents items doivent être référencés selon leur nom scientifique (latin). Le nom vernaculaire n'est pas autorisé car soumis à trop de variations culturelles ou géographiques. Les abréviations sont également proscrites, pour éviter de confondre deux items différents ayant le même nom d'espèce et un nom de genre commençant par la même initiale (Par exemple : *C. typicus* au lieu de *Centropages typicus*).
- le nom taxonomique renseigné respecte la nomenclature. Par exemple, il convient d'écrire *Calanus helgolandicus* et pas *Calanus Helgolandicus*,
- seul le nom taxonomique est renseigné. Afin d'éviter des confusions, le niveau taxonomique (famille, genre, espèce ...) ne doit pas être renseigné. Cela pourrait amener à des erreurs de lecture. Par exemple, pourraient figurer sur la même feuille « G. *Calanus* » (avec « G » signifiant genre) et « *C. typicus* » (avec « C » signifiant *Centropages*).
- un seul nom taxonomique doit être renseigné. En cas de doute, il convient de faire figurer dans la case « nom taxonomique le plus bas », l'information pour laquelle l'opérateur est sûr, donc au niveau taxonomique plus élevé, et mentionner éventuellement les éléments de doute dans la case « Remarques, Type(s) item(s) » (cf 2.3.2 Observations). Par exemple, si l'observateur hésite entre plusieurs espèces de calanoides, l'information « Calanoida » (*i.e.* un ordre) sera renseigné dans la case « nom taxonomique le plus bas », et il sera possible de mentionner des informations taxonomiques plus précises mais moins certaines (par exemple des noms d'espèces supposés) dans la case « Remarques, Type(s) item(s) ».

Dans le cas d'un item inconnu ou inidentifiable, l'opérateur doit renseigner au minimum le règne supposé de l'item (*i.e.* *Animalia* ou *Plantae*), l'item sera photographié quel que soit son état et conservé pour une identification différée (cf. 2.3.4 Mise en collection d'un item).

2.3.4 Mise en collection d'un item

Dans certains cas, il peut être nécessaire de conserver des items observés dans les contenus digestifs, pour permettre des travaux ultérieurs.

Par exemple, l'analyse de la forme des otolithes permet d'identifier l'espèce, la mesure de la taille de l'otolithe peut permettre d'estimer la taille du poisson. Les otolithes présents dans le contenu digestif sont toujours mis en collection. Pour cela, ils sont nettoyés avec précaution, afin de retirer tout résidu. En séchant, ces restes de tissus pourraient modifier la forme. Les otolithes sont ensuite stockés au sec dans un tube eppendorf, pour transfert vers le Pôle de Sclérochronologie.

De même, il peut parfois être nécessaire de stocker certains items pour confirmer une identification, soit en sollicitant un collègue expert du groupe, soit pour réaliser des analyses de biologie moléculaire. Dans ces cas, il convient d'appliquer un protocole permettant le maintien et la conservation de ces échantillons.

Si l'échantillon est conservé pour détermination, il est placé dans un tube eppendorf scellé au parafilm et stocké dans une solution d'éthanol 70%. Outre son caractère dangereux, le formol est à proscrire ici car il agit sur l'ADN et pourrait empêcher l'analyse moléculaire. Le tube eppendorf sera rangé dans la boîte dédiée, soit celle du projet, soit celle de l'année de prélèvement mentionnée dans le code échantillon.

Dans les deux cas, les tubes doivent être identifiés par une étiquette imprimée, afin d'éviter les problèmes liés à la lecture de l'écriture manuscrite. Le mode d'emploi de l'imprimante figure dans le guide des protocoles de dissection (Cresson et al., 2016). Les informations suivantes doivent être mentionnées sur le tube :

- le nom de l'échantillon, suivi du numéro d'item,
- « CS » » pour un item provenant d'un contenu stomacal et « CI » pour un contenu intestinal,
- le nom taxonomique le plus bas supposé, au besoin la case « Remarques, Type(s) item(s) » du formulaire peut être renseigné (cf 2.3.2 Observations),
- *Soit* le terme « à déterminer » ou « A DTR » pour un item dont le nom taxonomique est à vérifier, *soit* le terme « otolithe » pour un otolithe mis en collection pour le Pôle de Sclérochronologie.

SCOMSCO V0447 D0885-3 CS FORAMINIFERA A DTR	SCOMSCO V0477 D0927-1 CS TRACTRA OTOLITHES
---	--

2.3.5 Dénombrement et mesures

Le dénombrement des individus se base sur une méthode parcimonieuse, visant à retrouver le nombre minimal d'individus ayant abouti au nombre d'items partageant le même nom taxonomique observés dans le tractus digestif. À ce titre, il convient tout d'abord de différencier les items intacts des items plus dégradés, et également les items dont le nombre par individus est connu de ceux dont il ne l'est pas, ou qu'il n'est pas possible d'estimer. La case « Nombre individu » renseigne sur le nombre de proies ayant le même nom taxonomique, elle se renseigne en analysant le nombre d'items recensés en « Remarques, Type(s) item(s) ».

Dans le cas d'items peu dégradés, il est facile de compter le nombre total d'items, qui sera quasiment tout le temps équivalent au nombre d'individus. Il est également possible de regrouper des items qui sont sûrement issu du même individu initial.

Évidemment comme l'état 1 caractérise un item « entier », seuls les états 2 et 3 peuvent être regroupés.

Par exemple, si un corps de crustacé sans pince, et deux pinces sont retrouvés dans le même estomac, et qu'il est possible d'affirmer avec la plus grande certitude que les pinces sont bien issues d'un individu de la même espèce, on considère ici que le nombre d'items est de 2 (corps sans pince, et pinces), mais que le nombre d'individu est de 1, en considérant le plus probable que les pinces proviennent de l'individu sans pinces.

Dans le cas où plusieurs débris identifiés avec certitude comme provenant du même item (la plupart du temps la même espèce ou le même genre) sont retrouvés dans le même estomac (par exemple différents appendices de crustacés), la même méthode parcimonieuse doit être appliquée pour « reconstituer » le nombre le plus probable d'individus consommés. Si l'on trouve deux pinces de *Carcinus maenas*, deux céphalothorax sans pinces, et un grand nombre de pattes, l'approche la plus parcimonieuse attribue un effectif de deux pour *Carcinus maenas*: les 2 pinces et un céphalothorax proviennent d'un premier individu, le deuxième céphalothorax d'un deuxième individu (pour lequel les pinces ont probablement été digérées). Concernant les pattes,

il est complexe de les réattribuer, donc cet élément n'influe pas sur l'estimation de l'effectif. Un certain nombre d'exemples concrets de cette approche sont détaillés en Annexe 3.

Dans le cas où l'on observe une coupelle avec un item avec par exemple un *Annelida* ou *Caridea* qui portent des œufs et aussi la présence d'œufs du même type dans la coupelle, l'opérateur se doit de compter un seul individu et de ne pas compter les œufs au risque de surestimer le « Nombre individu » réel.

Par ailleurs, pour les items présents en très grands nombre (*e.g.* œufs), le dénombrement s'arrêtera à 100. Il conviendra de préciser que le nombre total était nettement supérieur à 100 dans la case « commentaires ». Si possible, et avant le développement et la calibration d'une méthode robuste de fractionnement, par exemple en utilisant une boîte de Motoda, une estimation de l'ordre de grandeur du nombre d'item à l'aide de fourchettes (entre 100 et 500/1000 ...) doit être réalisée et rajoutée en commentaires.

L'arbre de décision des contenus digestifs guide l'opérateur sur les informations à collecter. Pour certains items en état 1, état 2 et état 3 la « Masse totale » peut être mesurée. Si la mesure de « Masse totale (g) » n'est pas réalisable pour diverses raisons et que la mesure de la masse est requise, c'est la case « Masse sous échantillon (g) » qui doit être renseignée. Par convention la masse s'exprime en gramme et est mesurée grâce aux balances de précision présente sur chaque poste, une précision de 0.0001g est attendue pour chaque mesure. 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. Dans tous les cas, la raison de l'impossibilité de mesurer la masse totale doit être renseignée en commentaires.

Les champs à renseigner dans la partie « Mesures » dépendent du niveau de dégradation des proies. En effet, certaines mesures ne sont pas pertinentes. Par exemple, la longueur « totale » d'une proie trop dégradée ou la masse d'un otolithe n'apportent pas d'informations précises sur la biométrie initiale de la proie. Ces informations apparaissent explicitement dans l'arbre de décision (cf. 2.2). Si la mesure est partielle, il faut veiller à préciser la partie de l'individu manquante dans la case « Remarques, Type(s) item(s) » par exemple « individu sans la tête ».

Différents « Type[s] de mesure de taille utilisé » existent. La plus commune est la longueur totale (LT). Pour les crustacés il est possible de mesurer la longueur céphalothoracique (LC) ou la largeur céphalothoracique (LAC). Quelques spécificités existent :

- pour les copépodes les soies ne doivent pas être comprises dans la mesure,
- pour le sous ordre *Crangonoidea*, la mesure est prise de l'extrémité des écailles antennaires à l'extrémité du telson.

Enfin la case « Taille sur chaque item (cm) » est renseignée au maximum par 10 mesures si les individus font partie de la même gamme de taille. Si les individus sont composés de différentes gammes de taille bien définies (2 ou 3) : 10 mesures par gamme de taille sont à renseigner (*i.e.* corps grand, corps petit).

Pour réaliser les mesures de taille, 3 outils sont à la disposition de l'opérateur :

- le logiciel cellSens Entry permettant de mesurer l'item après la prise de photographie depuis le stéréomicroscope (2.1.5. Prise de photographie),
- une feuille de papier millimétré plastifiée,

- un réglet.

Il revient à l'opérateur de décider quel outil est le plus approprié à la mesure, en fonction de la taille de l'item.

2.4 Photographie et mesures

2.4.1 Prise de photographie

La photographie est réalisée à l'aide du logiciel cellSens Entry, qui pilote la caméra installée sur le stéréomicroscope depuis l'ordinateur (Fig. 3). Pour réaliser l'acquisition photo, veiller à positionner le taquet au-dessus de la microvis sur l'icône « œil et appareil photo ».

En préalable à la prise de la photo, l'item a été nettoyé de tout débris ne faisant pas partie de son corps. Classiquement un seul item doit apparaître par photo. Il est préférable de photographier l'item avant d'aller plus loin dans l'identification taxonomique car la manipulation avec les pinces sous le stéréomicroscope peut altérer l'item.

1. Une fois le logiciel lancé, cliquer sur le bouton « Live » ou enfoncer la touche F7,



FIGURE 3 : INTERFACE CELLSSENSEENTRY

2. La fenêtre « Live (active) » s'ouvre et affiche l'image observée au stéréomicroscope,
3. Utiliser la mise en page « Analyse contenu digestif », vérifier que l'onglet tout en haut à droite est sélectionné sur celle-ci.
4. Placer l'item au centre du champ de la caméra et régler les sources de lumière à disposition pour éclairer au mieux l'item,
5. Effectuer la mise au point pour obtenir l'item le plus net possible, s'aider du « focus indicator » présent dans le menu « Camera Control » sur le côté de l'écran,



FIGURE 4 : OUTIL "FOCUS INDICATOR"

6. Préciser quel est le grossissement utilisé dans le menu déroulant,

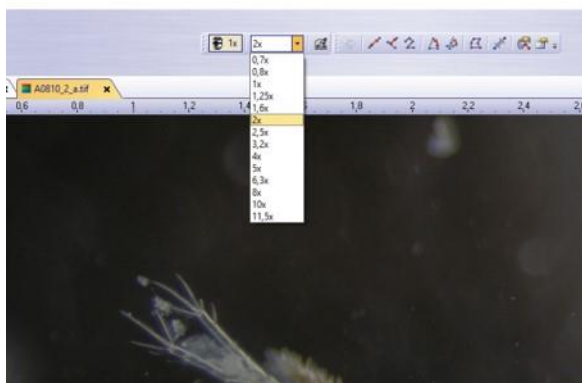


FIGURE 5 : MENU DEROULANT DES GROSSISSEMENTS

7. Vérifier la présence du nom de l'opérateur (Info Stamp) et de l'échelle (Scale Bar) en bas de l'image,



FIGURE 6 : BAS DE LA PHOTOGRAPHIE LEGENDEE

8. Cliquer sur le bouton « Snapshot » ou enfoncer la touche F8 pour prendre la photo,
9. Une nouvelle fenêtre s'affiche brièvement avec la photo capturée et la nomme avec un nom générique « Image_000 » puis bascule de nouveau sur le « Live (active) ».
10. Sélectionner la nouvelle photo nommée « Image_000 ».
11. Sélectionner dans l'onglet « Image » en haut à droite la ligne « Burn In Info ».

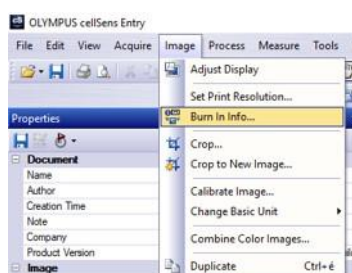


FIGURE 7 : ONGLET "IMAGE"

12. Cliquer sur le bouton « OK » en bas de la fenêtre qui vient d'apparaître. Cette étape permet d'incruster le nom de l'opérateur et l'échelle.

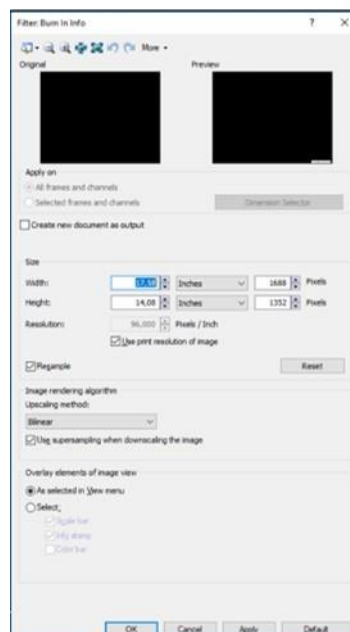


FIGURE 8 : FENÊTRE "BURN IN INFO"

- Dans les « Properties » de l'image, renseigner dans le champ « Note » le nom taxonomique le plus bas en respectant les règles établies précédemment (cf.2.3.3. Détermination) et un underscore (« tiret du 8 ») sera placé entre le nom de genre et d'espèce « *Temora_longicornis* »,

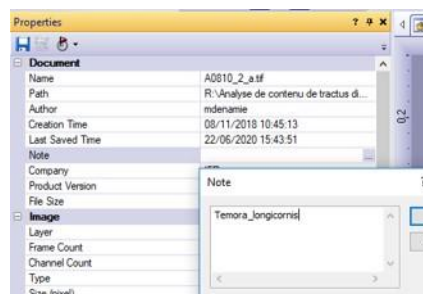


FIGURE 9 : RENSEIGNER LE NOM TAXONOMIQUE LE PLUS BAS

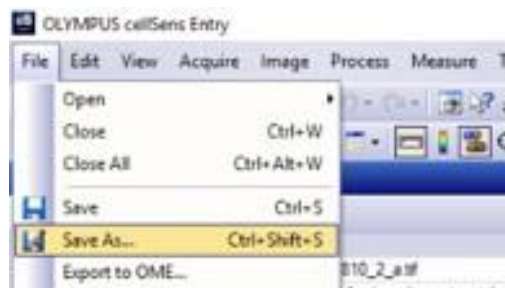


FIGURE 10: ENREGISTRER LA PHOTOGRAPHIE

- Sélectionner dans l'onglet « File » en haut à droite la ligne « Save As », choisir l'emplacement de la photo sur le disque « Resotro » via Analyse de contenu de tractus digestif, renseigner le nom de l'item pour qu'il corresponde au code item suivi d'un caractère alphabétique, la première photo de l'item « D0056_1 » se nommera « D0056_1_a », la seconde « D0056_1_b », et ainsi de suite,
- Enregistrer la photographie au format .tif.

À la suite de cette étape, on renseigne sur le formulaire la case « Photographie » avec le nom de la photographie « D0056_1_a » ou juste la lettre « a ».

Pour les paires d'otolithes, les 2 otolithes doivent apparaître sur la photographie et il faut photographier les 2 faces (concave et convexe) (Fig. 4)

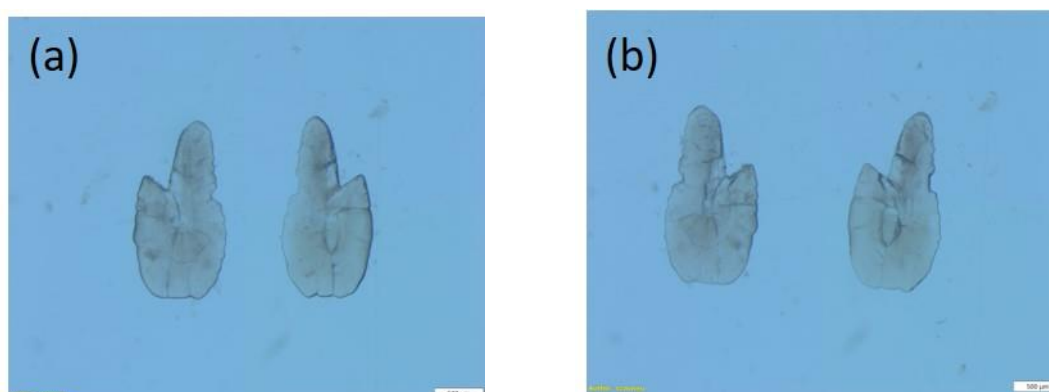


FIGURE 11 : PHOTOS D'OTOLITHES, SUR LEUR FACE (A) CONCAVE ET (B) CONVEXE

Pour les items de grande taille ne pouvant être photographié via le stéréomicroscope se référer à l'autre guide méthodologique « Guide des protocoles pour la dissection et le prélèvement des échantillons en vue de l'étude des réseaux trophiques » (Cresson et al., 2016).

2.4.2 Mesures à l'aide du logiciel

Le logiciel cellSens Entry permet de mesurer les items présents à l'écran en direct et les photographies via la boîte à outils « Measurement Objects » (FIG.12)

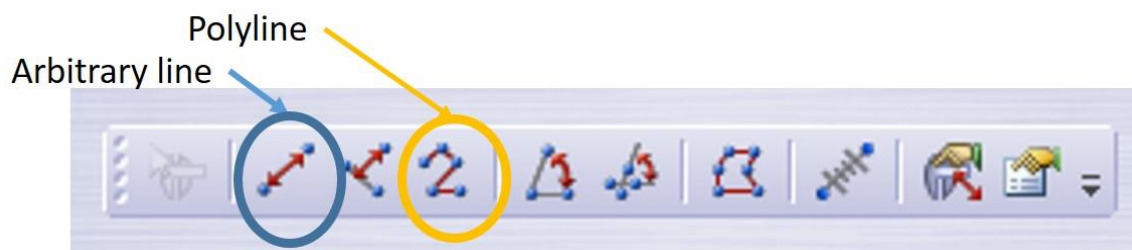


FIGURE. 12 : BOITE A OUTIL « MEASUREMENT OBJECT »

Le principe général est qu'il convient de mesurer la taille des items la plus proche de taille de la proie telle qu'elle a été ingérée par le prédateur. La relation entre la taille de la gueule du prédateur et la taille de la proie est en effet un facteur majeur qui contrôle la prédation.

Comme précisé plus haut, les copépodes doivent être mesurés sans leurs soies, du haut du céphalosome jusqu'à l'extrémité de la fourche. C'est l'outil « Arbitrary line » (FIG.13) qui est utilisé pour mesurer en traçant une droite.



FIGURE.13 : ILLUSTRATION DE LA MESURE D'UN COPEPODE

Pour les crevettes au sens large, la mesure s'effectue du rostre à la pointe du pléon. Ici le rostre est caché entre les 2 yeux. Si nécessaire, la taille peut se mesurer en utilisant plusieurs segments successifs, pour tenir compte des cassures du corps de la crevette. C'est l'outil « Polyline » (FIG. 14) qui est utilisé pour mesurer en traçant une ligne irrégulière.

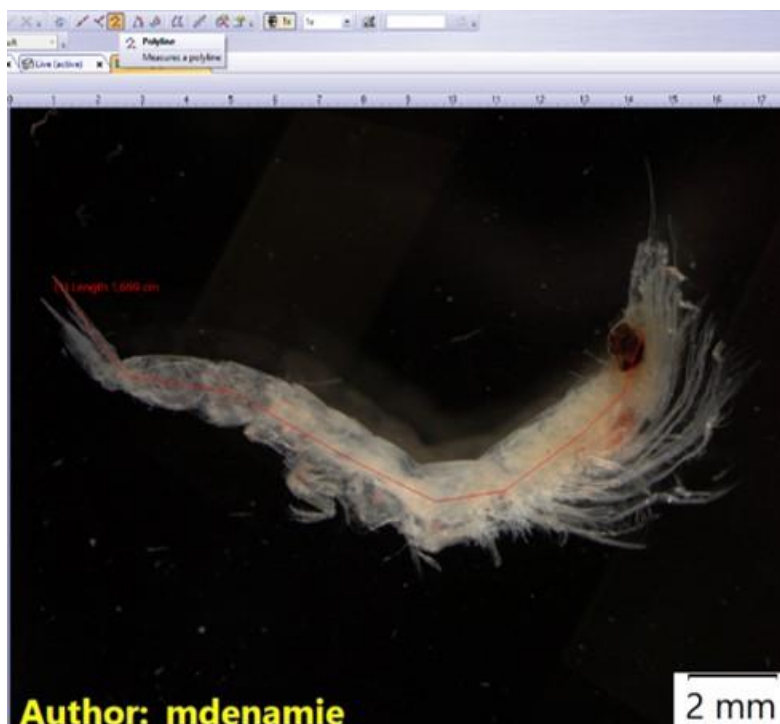


FIGURE 14 : ILLUSTRATION DE LA MESURE D'UNE CREVETTE

3 Finalisation de l'analyse

3.1 Rangement du matériel

Une fois l'analyse du contenu terminée, chaque opérateur doit s'assurer que pour l'ensemble des items le dénombrement, les photos, les mesures, et les pesées nécessaires ont été effectuées. Il peut pour cela s'aider de l'arbre de décision (2.2 Arbre de décision). Ainsi que relire le formulaire de saisie des résultats permettant de s'assurer que l'ensemble des informations ont bien été notées.

Le contenu digestif exempt d'agents chimiques peut être jeté à l'évier, dans le cas échéant recueilli dans un bidon de collecte du produit chimique dédié.

La coupelle de lecture peut être lavée pour être réutilisée si elle n'est pas détériorée.

Avant de quitter son poste, positionner les mollettes de réglages de l'intensité lumineuse sur le minimum avant d'éteindre l'interrupteur, afin d'augmenter la durée de vie des ampoules. Faire attention à ne pas encapuchonner un embout lumineux allumé au risque de le faire fondre. Enfin s'assurer de descendre la potence au plus bas, d'encapuchonner les oculaires et de couvrir le tout avec la housse dédiée.

3.2 Saisie des données

La saisie numérique des données clôt définitivement l'analyse. Elle se fait sur le fichier « Saisie_contenus_digestifs » disponible sur le disque réseau « Resotro » via MINESTRONE\TrophicNetworkDatabase\Saisie contenus digestifs.

Ce fichier Excel est composé de 2 types de feuilles : des feuilles nommées « Année_X » et des feuilles nommées « Taille_année_X ».

Dans la feuille Année X, l'opérateur renseigne toutes les informations du formulaire d'analyse de contenu digestif. Elle est construite sur le principe « une ligne = un item ». Pour plus de praticité la saisie sous Excel suit l'ordre du formulaire, seule la colonne « Vacuité » est absente du formulaire.

Cette case peut être renseignée « Oui » dans 2 cas : si la mention « vide » apparaît sur le formulaire, ou si les seuls items retrouvés ne font pas partie du régime alimentaire (i.e. « parasites » ou « autres »). Dans ces 2 cas, les colonnes suivantes du fichier Excel doivent être renseignées par « NA » et « N » si pas de photographies. Il est cependant possible de renseigner un numéro de photo si un parasite, ou un élément du contenu digestif avait un intérêt qui justifiait de le prendre en photo. Il est en effet important de ne laisser aucune cellule vide pour le traitement numérique.

Une spécificité concerne la colonne « Taille sur chaque item (cm) » dans laquelle la formule (=MOYENNE) fait appel aux données du second type de feuille. En effet, dans la seconde feuille « taille_Année_X », seules les informations concernant la taille des items sont renseignées. Ici, une ligne correspond à une mesure effectuée. Il peut donc y avoir plusieurs lignes pour le même item. Par exemple, si plusieurs proies appartenant au même groupe taxonomique ont été observées, elles seront considérées comme un même item, mais avec un effectif supérieur à 1, et des mesures individuelles de taille. La colonne « taille de chaque item » de la feuille « Année X » représentera donc la moyenne des tailles individuelles mesurées.

Annexe 1 : Questions pour suivre l'Arbre de décision pour la lecture des contenus digestifs

La classification des 4 états est possible grâce à la série de questions suivantes:

- **Est-ce que l'item est en catégorie « Parasites » ?**

Oui, nous passons à la question **Est-ce que le poisson est l'hôte du parasite interne ?**

Non, nous passons à la question suivante

- **Est-ce que l'item est en catégorie « Autres » ?**

Oui, l'item est classé en état 4. Il sera seulement dénombré.

Non, nous passons à la question **Est-ce que l'item est en stade « œuf » ?**

- **Est-ce que le poisson est l'hôte du parasite interne ?**

Oui, l'item est classé en **état 4**. Il sera seulement dénombré.

Non, nous passons à la question suivante

- **Est-ce que l'item est en stade « œuf » ?**

Oui, l'item est classé en **état 3**. Il sera dénombré (100 max), son diamètre mesuré (dans la limite de 10), et photographié.

Non, nous passons à la question suivante

- **Est-ce que l'item est « Entier » ?**

Oui, l'item est classé en **état 1**. Il sera dénombré, sa taille sera mesurée (10 individus max), photographié et pesé.

Non, nous passons à la question suivante

- **Est-ce que l'item fait partie du phylum Annelida ?**

Oui, l'item est classé en **état 3**. Il sera dénombré, photographié s'il possède des caractéristiques morphologiques qui permettent son identification et pesé

Non, nous passons à la question suivante

- **Est-ce que la masse de l'item est préservée à 90%?**

Oui, l'item est classé en **état 2**. Il sera dénombré, mesuré, pesé, et photographié

Non, nous passons à la question suivante

- **Est-ce que la taille de l'item est préservée à 90%?**

Oui, l'item est classé en **état 2**. Il sera dénombré, mesuré, et photographié

Non, nous passons à la question suivante

- **Est-ce que la masse et la taille de l'item sont préservées à 90% ?**

Oui, l'item est classé en **état 2**. Il sera dénombré, pesé, photographié et sa taille mesurée.

Non, nous passons à la question suivante

- **Est-ce qu'une mesure de référence peut être mesurée sur l'item ?**

Oui, nous passons à la question **Est-ce que l'item est composé de chair ?**

Non, l'item est classé en état 3 et nous passons à la question suivante

- **Est-ce qu'un dénombrement de l'item est pertinent ?**

Oui, l'item sera dénombré dans la limite de 100 items

Non, nous utiliserons l'occurrence « 1 » dans la case « Nombre individu ».

- **Est-ce que l'item est composé de chair ?**

Oui, l'item est classé en **état 2**. Il sera dénombré, sa taille mesurée photographié et pesé

Non, l'item est classé en **état 3**. Il sera mesuré et photographié

Annexe 2: Protocole de fixation et rinçage des contenus digestifs au formaldéhyde (formol)

Le formol peut être utilisé afin de conserver les prélèvements de contenus digestifs. Dans ce cas, les échantillons doivent être mis en présence de formol sous une **hotte aspirante** et manipuler avec des **gants**, une **blouse**, des **lunettes de protection** avec du matériel et des **réipients adaptés identifiés** (pots en verre ou PE, eppendorf) stockés dans une armoire chimique.

Après avoir vidé le contenu digestif dans un flaconnage préalablement identifié avec le nom de l'échantillon, la fixation du contenu digestif se fait sous la hotte au laboratoire Réseaux Trophiques :

- Distribuer le formol à l'aide de la dispensette identifiée « Formol 10% » et immerger le prélèvement,
- Fermer le flacon, pour les eppendorf sceller le capuchon avec du parafilm,
- Placer l'échantillon dans une armoire de sécurité pendant **7 jours**.

Tout le matériel jetable (gants, papier absorbant, coupelle d'observation) ayant été en contact avec le formol est jeté dans un seau de collecte spécifique situé au pôle Ichtyoplancton. Le matériel réutilisable ayant été en contact avec le formol (pot en verre, pince, spatule) est mis à tremper quelques jours dans un bac rempli d'eau désionisée sous la hotte, puis nettoyer à l'eau, au savon puis sécher et stocker dans l'armoire de sécurité.

Matériel du Réseaux Trophiques dédié au contact avec le formol (armoire chimique) :

- pissette d'éthanol 70% identifié « formol »
- spatule, pince, poire de pipetage, pipette Pasteur en verre
- tamis 200 μm (**Toujours le rincer à l'eau avant utilisation**)

Matériel du Pôle Ichtyoplancton présent sous leur hotte:

- Entonnoir, pissette d'eau douce
- tamis 200 μm (**Toujours le rincer à l'eau avant utilisation**)
- Bidon (bonbonne) de collecte identifié « formol »

→ **Pour les contenus formolés en pot en verre (sous la hotte du Pôle Ichtyoplancton)**

- Placer l'entonnoir dans le goulot du bidon de collecte du formol,
- placer le tamis à l'envers dans l'entonnoir et le rincer à l'aide de la pissette d'eau douce
- placer le tamis à l'endroit légèrement incliné dans l'entonnoir,
- Verser le contenu du flacon de prélèvement dans le tamis,
- Rincer à l'eau douce les parois du flacon (2 à 3 fois) pour que le contenu digestif descende dans le tamis, puis rincer le bouchon du flacon,
- Rassembler à l'aide de la pissette d'eau douce le contenu digestif sur le bord inférieur du tamis,
- Mettre l'entonnoir dans le goulot du flacon de prélèvement

Lecture du contenu digestif à la suite du rinçage (sous la hotte réseaux trophiques) :

- Transférer le contenu du tamis dans le flacon de prélèvement avec la spatule et en rinçant le tamis à l'aide de la pissette d'eau douce
- Sous la hotte réseaux trophiques, verser le contenu du flacon de prélèvement à l'aide de la pissette d'eau désionisée au-dessus d'une boîte de Pétri,
- Immerger le contenu dans de l'eau désionisée pendant 1 heure avant l'analyse
- Après analyse du contenu digestif, tout est jeté dans le bidon de collecte prévu sous la hotte réseaux trophiques. Tout le matériel jetable (gants, papier absorbant, coupelles d'observation) ayant été en contact avec le formol est jeté dans la poubelle dédiée au réseau trophiques puis dans le seau de collecte spécifique situé au pôle Ichtyoplancton.

Remarque : Quand le bidon de collecte « Formol » situé sous la hotte du laboratoire Réseaux trophiques est plein : vider dans le bidon de collecte « formol » du laboratoire Ichtyoplancton.

Lecture du contenu digestif différée (sous la hotte du pôle Ichtyoplancton) :

- Transférer le contenu du tamis dans le flacon de prélèvement avec la spatule et en rinçant le tamis à l'aide de la pissette d'éthanol 70%,
- Rincer tout le matériel avec l'éthanol 70% au-dessus du flacon de prélèvement pour ne pas perdre de matériel biologique,
- Immerger-le contenu dans l'éthanol 70% afin de le conserver pour une analyse différée,
- Inscrire « **Éthanol** » au marqueur sur le flacon de prélèvement afin de l'identifier comme rincé,
- **Rincer le tamis à l'envers à l'eau douce entre chaque échantillon au-dessus du bidon de collecte,**
- Ranger les pots de prélèvements rincés et le matériel ayant été en contact avec le formol dans l'armoire chimique.

Après conservation à l'éthanol des contenus digestifs (sous la hotte du Réseaux Trophiques) :

- Sous la hotte au laboratoire Réseaux Trophiques, verser le contenu digestif dans un tamis 200µm au-dessus du bidon de collecte identifié « formol »,
- Rincer l'échantillon à l'eau désionisée dans le tamis 200µm au-dessus d'un bidon de collecte identifié
- Transférer le contenu du tamis avec la spatule et en rinçant le tamis à l'aide de la pissette eau douce au-dessus d'une boîte de Pétri,
- Laisser le contenu digestif dans l'eau désionisée 1h avant l'analyse.

Remarque : **Rincer le tamis à l'envers à l'eau douce entre chaque échantillon au-dessus du bidon de collecte.**

→ Pour les contenus formolés en eppendorf, sous la hotte du Pôle Ichtyoplancton

- Pipeter à l'aide d'une pipette Pasteur en verre le surnageant de formol pour le verser dans le bidon de collecte du formol,
- Remplir l'éppendorf d'eau douce puis laisser sédimenter le contenu quelques minutes,
- Pipeter de nouveau le surnageant pour le verser dans le bidon de collecte du formol,

- Répéter les 2 étapes précédentes une nouvelle fois,

Lecture du contenu digestif à la suite du rinçage (sous la hotte réseaux trophiques) :

- Verser le contenu de l'éppendorf à l'aide de la pissette d'eau désionisée dans une boîte de Pétri
- Immerger le contenu dans de l'eau désionisée pendant 1 heure avant l'analyse.

Lecture du contenu digestif différée (sous la hotte du pôle Ichtyoplancton) :

- Remplir l'éppendorf d'éthanol 70% afin de le conserver pour une analyse différée, inscrire « **Éthanol** » ou « E » au marqueur sur l'éppendorf afin de l'identifier comme rincé,
- Sceller le capuchon de l'éppendorf avec du parafilm.

Après conservation à l'éthanol des contenus digestifs (sous la hotte du Réseaux Trophiques) :

- Sous la hotte au laboratoire Réseaux Trophiques, verser le contenu digestif dans un tamis 200µm au-dessus du bidon de collecte identifié « formol »,
- Rincer l'échantillon à l'eau désionisée dans le tamis 200µm au-dessus d'un bidon de collecte identifié
- Transférer le contenu du tamis avec la spatule et en rinçant le tamis à l'aide de la pissette eau douce au-dessus d'une boîte de Pétri,
- Laisser le contenu digestif dans l'eau désionisée 1h avant l'analyse.

Remarque : **Rincer le tamis à l'envers à l'eau douce entre chaque échantillon au-dessus du bidon de collecte.**

Annexe 3 : Exemples de comptage de l'effectif, lorsque plusieurs pièces sont retrouvées dans un même tractus digestif

Pour un même contenu digestif on peut avoir plusieurs fois le même taxon renseigné, à condition d'avoir des stades différents et/ou des états différents.

Les 2 exemples suivants concernent des items de **même stade** « juvénile\adulte » et de **même nom taxonomique** :

L'opérateur observe dans sa coupelle 1 corps entier, 1 corps sans 1 péréiopodes et 1 céphalothorax, il renseigne son formulaire :

D0001_1 en état 1, <i>Carcinus maenas</i> : corps entier	N individu = 1
D0001_2 en état 2, <i>Carcinus maenas</i> : corps sans 1 péréiopodes	N individu = 1
D0001_3 en état 3, <i>Carcinus maenas</i> : céphalothorax	N individu = 1

L'opérateur observe dans sa coupelle 1 corps entier, 1 corps sans 1 pince et 1 pince, il renseigne son formulaire :

D0001_1 en état 1, <i>Carcinus maenas</i> : corps entier	N individu = 1
D0001_2 en état 2, <i>Carcinus maenas</i> : corps sans 1 pince	N individu = 1
D0001_3 en état 3, <i>Carcinus maenas</i> : 1 pince	N individu = 1

Une attention particulière doit être apportée au comptage des individus. En effet la séparation des items en fonction de leur état ne doit pas induire une surestimation du nombre d'individus présents. Les items D0001_2 et D0001_3 ont des états différents, cependant on surestime la quantité de proies ingérées. **Après analyse il faut regrouper les items qui le peuvent et leur attribuer l'état le moins dégradé.** L'opérateur aurait dû renseigner :

D0001_1 en état 1, <i>Carcinus maenas</i> : corps entier	N individu = 1
D0001_2 en état 2, <i>Carcinus maenas</i> : corps sans 1 pince, 1 pince	N individu = 1

Le comptage est correct grâce au regroupement, ici le renseignement de la case « Remarques, Type(s) item(s) » (2.3.2 Observations) est primordial, il informe sur le raisonnement de l'opérateur.

Évidemment comme l'état 1 caractérise un item « entier », seuls les états 2 et 3 peuvent être regroupés.

Les 2 exemples suivants concernent des items de **stades différents** et de **même nom taxonomique** :

L'opérateur observe dans sa coupelle 1 corps entier de stade « larve », 1 corps sans 1 pince de stade « larve » et 1 corps entier de stade « juvénile\adulte », il renseigne son formulaire :

D0002_1 en stade « larve » en état 1, <i>Pisidia longiconis</i> : corps entier	N individu = 1
--	----------------

D0002_2 en stade « larve » en état 2, *Pisidia longiconis* : corps sans 1 pince N individu = 1
 D0002_3 en stade « J\A » en état 1, *Pisidia longiconis* : corps entier N individu = 1

L'opérateur observe dans sa coupelle 1 corps sans 1 pince de stade « larve », 1 pince de stade « larve », 1 corps entier de stade « juvénile\adulte » et 1 pince de stade « juvénile\adulte », il renseigne son formulaire :

D0002_1 en stade « larve » en état 2, *Pisidia longiconis* : corps sans 1 pince N individu = 1
 D0002_2 en stade « larve » en état 3, *Pisidia longiconis* : 1 pince N individu = 1
 D0002_3 en stade « J\A » en état 1, *Pisidia longiconis* : corps entier N individu = 1
 D0002_4 en stade « J\A » en état 3, *Pisidia longiconis* : 1 pince N individu = 1

Les items D0002_1 et D0002_2 ont des états différents, cependant on surestime la quantité de proies ingérées, on doit les regrouper et leur attribuer l'état le moins dégradé. L'opérateur aurait dû renseigner :

D0002_1 en stade « larve » en état 2, *Pisidia longiconis* : corps sans 1 pince, 1 pince N individu = 1
 D0002_2 en stade « J\A » en état 1, *Pisidia longiconis* : corps entier N individu = 1
 D0002_3 en stade « J\A » en état 3, *Pisidia longiconis* : 1 pince N individu = 1

L'exemple suivant concerne des items de **même stade** et de **niveau taxonomique différent** :

L'opérateur observe dans sa coupelle 1 corps avec 1 œil de *Crangon crangon*, 1 corps avec 1 pince de *Crangon crangon* et 5 yeux de *Crustacea*, il renseigne son formulaire :

D0003_1 en état 2, *Crangon crangon* : corps avec 1 œil, corps avec 1 pince N individu = 2
 D0003_2 en état 3, *Crustacea* : 5 yeux N individu = 3

L'item D0003_2 concerne des yeux de crustacés, l'opérateur ne peut pas renseigner un nom taxonomique plus bas dans la classification. L'opérateur pour ne pas surestimer le nombre de proies ingérées peut effectuer un regroupement, car *Crangon crangon* est une espèce qui est classée dans le sous-phylum des Crustacea, il aurait dû renseigner :

D0003_1 en état 2, *Crangon crangon* : corps avec 1 œil, corps avec 1 pince, 1 œil N individu = 2
 D0003_2 en état 3, *Crustacea* : 4 yeux N individu = 2

Ce regroupement est possible en présence d'items issu de la même classification, ici Arthropoda (Embranchement) > **Crustacea (Sous-embranchement)** > Multicrustacea (Superclasse) > Malacostraca (Classe) > Eumalacostraca (Sous-classe) > Eucarida (Super-ordre) > Decapoda (Ordre) > Pleocyemata (Sous ordre) > Caridea (Infra-ordre) > Crangonoidea (Super-famille) > Crangonidae (Famille) > Crangon (Genre) > ***Crangon crangon* (Espèce)**.