

CHAPITRE II

Le milieu vivant

De la connaissance de l'individu à celle de l'espèce

**Méthodes d'observation des populations
et des communautés en milieu naturel**



Introduction

Le milieu vivant se caractérise par sa grande diversité que l'on retrouve dans les thèmes de ce chapitre, depuis l'évaluation en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier jusqu'à l'étude des écailles des poissons, des tests en pathologie, des piégeages de micromammifères, l'extraction de systèmes racinaires d'arbres entiers etc. On y retrouve aussi une certaine variabilité des échelles d'observation, des individus, aux populations et aux communautés.

Le milieu naturel est un milieu non contrôlé, si on le compare aux laboratoires, et il s'agit plus souvent d'observations que d'expérimentations au sens strict du terme. Tirer parti des situations naturelles pour accéder aux phénomènes que l'on veut observer fait souvent appel à une grande ingéniosité ainsi qu'à un précieux savoir naturaliste, que l'on note au fil de ces articles. Il est nécessaire, par exemple, de localiser des animaux en milieu naturel, de les suivre, parfois de les piéger et de les marquer sans les blesser et en modifiant le moins possible leurs comportements. Chaque niveau d'organisation, du moléculaire à la communauté entière, peut être observée et peut apporter une information cruciale.

La première partie de ce chapitre vise des techniques destinées à l'observation d'individus, de populations, d'espèces et de leur suivi dans le milieu naturel. Cela requiert des techniques fines de reconnaissance et de localisation des individus (GPS, implantation d'émetteurs), de reconstitutions historiques (pour les poissons via les écailles, les arbres via les cernes), ou de meilleure connaissance des composés chimiques ou de l'architecture des arbres, par exemple.

La seconde partie vise des techniques de suivi démographiques de populations, plus rarement de communautés, en milieu naturel : marquage et suivi de poissons, survie en phase juvénile, suivi de micro-organismes, ou rôle fonctionnel de ces populations (tests de pathogénicité, dégâts occasionnés par la prédation des graines, d'activité enzymatique, suivis de phénologie).

Cette variété d'articles rend compte de la diversité des organismes, des populations, des communautés d'intérêt au sein du département EFPA à l'Inra, avec des questions plutôt centrées sur l'écologie. Elle met en valeur de façon pragmatique et réelle le rôle des interactions biotiques dans le fonctionnement des communautés et des écosystèmes (prédation, parasitisme, symbiose mycorhizienne) ainsi que l'articulation avec les facteurs abiotiques (phénologie, proliférations algales, colmatage des frayères, écotoxicologie, etc.), dont la connaissance revêt une importance cruciale dans le contexte actuel des changements globaux (climatiques et pratiques culturelles).

Le milieu vivant

Bien entendu, pas plus que les autres chapitres, cette partie de l'ouvrage consacrée au milieu vivant ne prétend pas à l'exhaustivité de ce qui est fait ou pourrait être fait. Manquent en particulier des articles mettant en exergue le rôle d'indicateur de qualité de milieux attribué à certaines espèces ou à certains cortèges d'espèces, des organismes indicateurs de la qualité des milieux. Le savoir-faire de l'Inra dans ce domaine est notable et se traduit par des innovations utilisées par les gestionnaires des milieux naturels, tant en milieux terrestres qu'aquatiques. Un lien riche de promesses pourra être fait prochainement avec le phénotypage « à haut débit » pour mettre en relation des données à l'échelle des organismes, des populations et des communautés avec des données sur la variabilité moléculaire, comme cela se met en place sur certains caractères comme le bois, la résistance à la sécheresse, etc.

Face à la diversité du vivant et à la complexité de son organisation à toutes les échelles reconnues, les techniciens de l'Inra développent des méthodes d'observation de plus en plus fines. Accéder à des organismes ou organes difficilement accessibles, quantifier et qualifier des organismes, des populations, des communautés à l'aide de méthodes innovantes, par exemple, contribue aux qualités et aux progrès des recherches par l'emploi de techniques avec label de qualité. Cela fait partie intégrante des progrès des disciplines concernées par un aller retour constant entre données et théories.

Alain Franc¹

Chef de département adjoint EFPA

¹ INRA Domaine de l'hermitage – 33612 Cestas cedex ☎05 57 12 28 13 - Alain.Franc@pierroton.inra.fr

De la connaissance de l'individu à celle de l'espèce

Utilisation du *Global Positioning system* (GPS) pour localiser les grands mammifères sauvages

² Georges Janeau, Jean-Marc Angibault, Bruno Cargnelutti, Jean Joachim

Résumé : Pour localiser les grands mammifères sauvages étudiés dans notre unité, nous avons choisi en 1996 d'utiliser le *Global Positioning System* (GPS). Ce système a remplacé progressivement la radiolocalisation par VHF³ employée depuis les années 70. Cet article décrit le principe de fonctionnement du GPS utilisé en mode différentiel ou non, le matériel, l'exactitude des localisations obtenues. Nous présentons ensuite deux exemples de performances de colliers GPS utilisés en mode différentiel. En conclusion nous analysons les principaux problèmes rencontrés et les perspectives d'évolution pour l'utilisation de ce système.

Mots clés : animaux sauvages, *Global Positioning System*, GPS, occupation de l'espace.

Introduction

La localisation des grands mammifères sauvages est une nécessité pour l'étude de leurs déplacements, de leur mode d'occupation de l'espace et de leur utilisation des habitats. L'observation directe ayant ses limites, notamment la nuit et dans les milieux fermés, les biologistes ont eu recours à des méthodes indirectes comme le suivi de traces, la capture (et éventuellement la recapture) des animaux ou leur radiolocalisation par VHF... Mais aucune de ces méthodes ne permet un suivi individuel sur une longue période de nuit comme de jour, et quelles que soient les conditions météorologiques avec une exactitude des localisations telle que celle offerte par le *Global Positioning System* (GPS). C'est au début des années 90 que des biologistes ont commencé à adapter la technologie GPS au suivi des grands mammifères. Des prototypes ont été produits et testés par des équipes de recherche (Cupal *et al.* 1993, Brun *et al.* 1994). Parallèlement, une firme canadienne (Lotek Engineering Inc.) a développé puis commercialisé en 1993 un équipement d'un poids plus raisonnable que les prototypes précités et utilisable sur les grands animaux (Rodgers et Anson 1994).

Dès 1996 nous avons choisi d'utiliser le GPS pour remplacer la radiolocalisation par VHF en usage dans l'unité depuis le début des années 70. Même si, cette technique a révolutionné les recherches sur l'occupation de l'espace par les animaux sauvages, elle ne peut délivrer des localisations aussi exactes et fréquentes que celles issues du GPS. De plus, cette technique est fort coûteuse en temps sur le terrain et ne permet de suivre qu'un nombre limité d'animaux simultanément ; par exemple six personnes sont nécessaires pour suivre 5 animaux, au maximum, pendant une période de 24 heures avec des localisations toutes les 15 minutes.

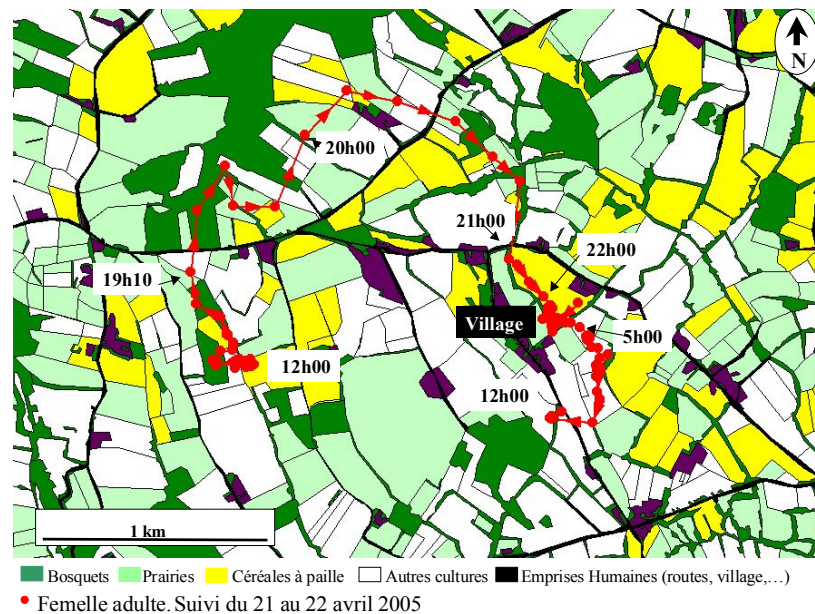
² INRA UR Comportement et Ecologie de la Faune Sauvage (CEFS) - Chemin de Borde Rouge, Auzeville, B.P. 52627 - 31326, Castanet-Tolosan Cedex ☎ 05 61 28 51 34, georges.janeau@toulouse.inra.fr,

³ VHF Very high frequency

1. Matériel et méthode

1.1 Principe général et fonctionnement du système

Le GPS est un système américain de localisation par satellites. Une constellation de 24 satellites actifs en orbite haute (un peu plus de 20 000 km) émettent en permanence des signaux. Ils permettent aux récepteurs GPS situés "sur terre" (au sol, en mer ou dans les airs) de calculer leur position géographique à tout instant t , à condition que les signaux de 3 satellites (pour une localisation en 2 dimensions -2D- : latitude, longitude) ou 4 satellites (pour une localisation en 3 dimensions -3D- : latitude, longitude et altitude), au minimum, soient perçus simultanément à cet instant t . Les plans orbitaux de ces satellites sont tels que, à tout instant et tout endroit sur la terre ou presque (99,6 % de la surface terrestre) il est possible de recevoir les informations d'au moins 4 satellites simultanément.



Exemple d'un trajet journalier réalisé par une femelle chevreuil dans un milieu fragmenté (localisations réalisées toutes les 10 minutes).

1.2 Exactitude des localisations et mode d'utilisation des GPS

Dans sa version militaire, ce système permet des localisations avec une exactitude de l'ordre du mètre. Dans ses applications civiles, il permettait officiellement une exactitude des localisations de l'ordre de 100 mètres, avant la suppression au mois de mai 2000 d'un système de dégradation des performances imposé par les militaires, système appelé Selective Availability (SA) qui intervenait de façon aléatoire. L'utilisation du GPS en mode différentiel, ou DGPS, permettait aux appareils civils de corriger ce SA et de revenir à une exactitude de l'ordre de quelques mètres, mais au prix d'une importante complication du système (matériel et logiciel). Depuis la suppression du SA, l'exactitude pour le matériel civil en mode non différentiel est de l'ordre de 15 à 30 mètres.

Le principe de fonctionnement en mode différentiel repose sur l'intégration au système d'un récepteur GPS de position fixe et connue (station de référence) : la dégradation aléatoire due au SA, lorsqu'elle se produisait, était reçue simultanément par les récepteurs GPS de position variable (par exemple portés par un animal) et par le récepteur de référence de position fixe.

Dès la récupération des données (*pseudoranges*) qui permettait de calculer les localisations du collier porté par l'animal, le post-traitement différentiel consistait en la comparaison simultanée des *pseudoranges* reçues par la station de référence avec les *pseudoranges* acquises par le collier GPS. Naturellement, cette correction différentielle réalisée par un logiciel spécifique, ne peut se faire que si la station de référence et les GPS embarqués sur les animaux ont reçu en commun les informations en provenance des mêmes satellites. Plus la distance entre la station de référence et les GPS des animaux est grande et plus le risque de ne pas recevoir en commun les informations des mêmes satellites augmente.

Malgré la suppression du SA nous avons choisi de conserver le mode différentiel car il permet toujours d'obtenir de meilleurs résultats en terme d'exactitude des localisations (Moen *et al.* 1997, Rempel et Rodgers 1997, Janeau *et al.* 1998, 2001b, Adrados *et al.* 2002). En effet le mode différentiel permet de corriger d'autres sources d'erreur comme celles qui sont liées aux délais de traversée des signaux émis par les satellites dans l'ionosphère et la troposphère, les décalages de temps possibles entre les horloges au césium des satellites et les « *timers* » des récepteurs GPS, les erreurs d'éphémérides...

Toutes les localisations acquises, malgré ce traitement en différentiel, n'ont pas la même qualité en terme d'exactitude. Avant d'être considérées comme « localisations exploitables » les localisations sont triées en fonction de leur statut à savoir celles obtenues en 2D (2 dimensions : latitude, longitude) en théorie les moins exactes et en 3D (3 dimensions : latitude, longitude et altitude) les plus exactes ainsi que d'un indice de la géométrie des satellites désigné sous le sigle DOP (plus cet indice est faible et plus l'exactitude de la localisation est grande). Ainsi, et après avoir réalisé nos propres tests d'exactitude des localisations (Janeau *et al.* 2001b, Adrados *et al.* 2002) et les avoir comparés à ceux obtenus par d'autres équipes (disponibles dans la littérature), nous ne considérons comme « localisations exploitables » que les localisations en 3D dont les DOP sont inférieures à 10 et les localisations en 2D dont les DOP sont inférieures à 5.

1.3 Programmation des GPS

La programmation des GPS consiste, à l'aide d'un logiciel spécifique à chaque type de récepteur GPS, à fixer les temps d'acquisition des localisations. Le programme est chargé dans le GPS via une unité de commande filaire. Suivant le type d'appareil, l'intervalle de temps entre localisations successives peut être variable (de 5 minutes à 6 heures). Il est possible de faire varier cet intervalle de temps pour un jour donné et également d'un jour à l'autre, voire de fixer l'heure et la minute de chaque localisation souhaitée. Sur certains appareils il est aussi possible de programmer un ou plusieurs jours par semaine sans localisations. Ce programme ne pourra pas être modifié dans le cas d'un collier GPS non pourvu d'un modem de communication radio. Si le collier possède un modem il est possible d'envoyer un nouveau programme en fonction des besoins de l'utilisateur.

1.4 Potentiel de localisations et durée de fonctionnement des colliers GPS

Le nombre potentiel de localisations qu'un collier GPS va pouvoir acquérir dépend de l'énergie électrique embarquée (sous forme de piles au lithium). Cette énergie est nécessaire pour subvenir tout à la fois au temps de travail d'acquisition des signaux des satellites, au temps nécessaire à la transmission des données par modem radio UHF4 ou par ARGOS, au temps de veille des modules des instruments d'acquisition et de transmission et non pas à la capacité mémoire pour stocker les informations. Qui dit piles, dit poids et volume, ce qui

⁴ UHF ultra high frequency

signifie que plus on embarque d'énergie, plus le poids du collier augmente, mais cela autorisera un nombre potentiel de localisations plus élevé. Comme nous travaillons sur le comportement des animaux, notre souci est avant tout d'optimiser le confort de l'animal et de diminuer au maximum les risques de perturbations imposées par l'équipement. S'il est admis dans la littérature qu'un mammifère terrestre peut supporter un équipement représentant 5% de son poids, nous avons choisi d'être nettement en dessous de cette valeur.

1.5 Equipements complémentaires des colliers

Tous les colliers GPS que nous utilisons sont équipés d'un émetteur VHF classique qui permet de venir au contact de l'animal (pour observation visuelle, recapture par télé-anesthésie, téléchargement par modem) ou de retrouver un collier après le fonctionnement du système automatique ou télécommandé d'ouverture du collier appelé *drop-off*. Ces colliers sont équipés également d'un capteur de mortalité qui déclenche un signal d'alarme de l'émetteur VHF en cas d'immobilité supérieure à un nombre d'heures que nous pouvons programmer, d'un capteur d'activité et de température ambiante dont les informations sont enregistrées dans une mémoire embarquée.

2. Résultats

Il serait illusoire de vouloir présenter l'ensemble des résultats obtenus et leur implication dans la réalisation des objectifs scientifiques de notre unité dans un document aussi court. Nous avons choisi de donner deux exemples de performances d'un type de collier GPS utilisé en mode différentiel.

Les utilisateurs de banques de données de localisations ont besoin de connaître leur exactitude. Les critères les plus souvent utilisés sont le statut de la localisation (2D ou 3D) et la DOP (**tableau 1**). Des tests sont nécessaires pour chaque type de collier utilisé. Par exemple des colliers dotés de nombre de canaux différents pouvant aller de 6 à 16 canaux.

		Pourcentage de localisations					
		2D			3D		
	Erreur	DOP<5	5≤DOP<10	DOP≥10	DOP<5	5≤DOP<10	DOP≥10
	Sans SA	< 5m	88.9	0	0	70.4	66.5
< 10m		100	50	50	98.2	94.0	80.2
< 30m		100	50	75	100	100	97.3
<i>erreur max (m)</i>		<i>9.8</i>	<i>48.3</i>	<i>61.9</i>	<i>12.5</i>	<i>17.9</i>	<i>171.8</i>
	<i>n</i>	<i>9</i>	<i>2</i>	<i>4</i>	<i>280</i>	<i>248</i>	<i>111</i>

Tableau 1 : Pourcentages cumulés de localisations lors des tests en point fixe (colliers GPS différentiels, 8 canaux), sans Selective Availability (sans SA), en fonction du statut de la localisation (2D, 3D) et de la DOP (DOP<5, 5≤DOP<10, DOP≥10).

Un des facteurs dont l'influence est négative sur le taux d'acquisition des localisations est le phénomène d'obstruction qui réside dans le fait que les signaux émis par le satellite peuvent être masqués par des obstacles au récepteur GPS. Il peut s'agir d'obstructions topographiques (montagne, paroi, canyon...) ou liées à la végétation forestière (hauteur, diamètre et densité des arbres, présence de feuilles, d'eau ou de neige sur les feuilles...).

Pour évaluer ce phénomène d'obstruction, des tests d'acquisition sont réalisés pour chaque zone d'étude. Ils permettent de connaître les zones où les localisations sont sous estimées. Voici dans le **tableau 2** ci-après un exemple de l'influence de la taille des arbres dans 7 milieux.

Type d'habitat	Hauteur moyenne des arbres en m	Diamètre moyen des arbres en cm	n	Collier GPS % échec	8 canaux % 2D	% 3D
Milieu ouvert	-	-	51	0.0	9.8	90.2
Hêtraie	16.6	11.3	101	1.0	18.8	80.2
Hêtraie	21.0	21.6	101	1.0	39.6	59.4
Pinède	20.7	27.5	43	0.0	34.9	65.1
Conifères mélangés	10.6	14.4	43	9.3	25.6	65.1
Mélange épicéas/sapins	23.5	47.6	43	27.9	60.5	11.6
Mélange épicéas/sapins	26.1	64.8	47	25.5	61.7	12.8

Tableau 2 : Succès des localisations comparés dans sept types d'habitat. Résultats obtenus par des simulations avec un collier GPS 8 canaux transporté par les observateurs à une vitesse de 2 à 3 km/h dans chaque type d'habitat avec un rythme d'acquisition des localisations toutes les 5 mn.

Conclusion et perspectives

L'évolution des composants (miniaturisation, moindre consommation électrique...) réduit l'encombrement des GPS, limitant ainsi les risques de perturbation comportementale d'un équipement qui devient utilisable sur des espèces de plus petite taille. La multiplication de l'offre (actuellement plus d'une douzaine de fabricants) abaisse le coût des colliers qui deviennent plus accessibles aux équipes de recherche. En 10 ans, le prix d'un collier GPS complet (avec modem UHF) est passé d'environ 8 000 € à environ 3 500 € ; le poids a diminué de 1,9 kg pour les premières versions à moins de 0,8 kg pour un potentiel de localisations qui a crû de 3 500 à plus de 12 000.

Les problèmes d'obstructions liées à la topographie (Girard *et al.* 2002) quantifiable par Système d'Information Géographique (SIG), à la hauteur des arbres et à la densité des milieux forestiers auront toujours une incidence négative sur le taux de réussite des localisations (Rempel *et al.* 1995, Edenius 1997, Janeau *et al.* 1998, 2001a, 2004, Dussault *et al.* 1999) ; cela entraîne une sous-estimation de l'utilisation de ces milieux par les animaux (qu'il est possible de quantifier par des tests de performances des colliers GPS dans ces milieux).

Il reste surtout primordial de rendre plus performants les systèmes d'ouverture des colliers (*drop-offs*) pour ne pas perdre les colliers et les données qu'ils contiennent (dans le cas des colliers non équipés de possibilités de transmission). Malgré un taux d'ouverture plus élevé avec les nouvelles générations de *drop-offs*, surtout avec les modèles télécommandés, des progrès indispensables sont attendus.

Avoir fait partie des « pionniers » de l'utilisation de GPS, pour localiser les mammifères sauvages, nous a permis d'acquérir une sérieuse expérience technique et un réel savoir-faire (surtout en mode différentiel). A présent le challenge est scientifique, car nous disposons désormais de jeux de localisations considérables dont l'analyse occupe plusieurs chercheurs et

étudiants. L'investissement financier a été très important mais l'utilisation de GPS a permis de réduire de plus de 95% l'investissement humain sur le terrain par rapport aux localisations VHF, qui ne nous aurait jamais livré des données de même qualité et en aussi grande quantité.

Bibliographie

- Adrados C, Girard I, Gendner JP, Janeau G (2002) Global Positioning System (GPS) location accuracy improvement due to Selective Availability removal. *C. R. Biol.*, 325 : 165-170.
- Brun JP, Vimal T, Brelurut A, Thériez M (1994) Un capteur de position géographique : GPS. *Compte rendu des IIIèmes Journées de la Mesure*. INRA, Ronces-les-Bains, France : 151-156.
- Cupal JJ, Lacy LJ, Lindzey FG (1993) A GPS animal tracking system. *in : Biotelemetry XII*, Mancini P., Fioretti S., Cristalli C. & Bedini R., Litografia Felici, Italy : 298-304.
- Dussault Ch, Courtois R, Ouellet JP, Huot J (1999) Evaluation of GPS telemetry collar performance for habitat studies in the boreal forest. *Wildl. Soc. Bull.*, 27(4) : 965-972.
- Edenius L (1997) Field test of a GPS location system for Moose *Alces alces* under Scandinavian boreal conditions. *Wildl. Biol.* 3 : 39-43.
- Girard I, Adrados C, Peracino A, Martinot JP, Bassano B, Janeau G (2002) Feasibility of GPS use to locate wild ungulates in high mountain environment. *Pirineos, J. Mount. Ecol.*, 157 : 7-13.
- Janeau G, Angibault JM, Cargnelutti B, Joachim J, Pépin D, Spitz F (1998) Le Global Positioning System (GPS) et son utilisation (en mode différentiel) chez les grands mammifères sauvages. *Arvicola, Actes "Amiens 97"* : 19-24.
- Janeau G, Adrados C, Joachim J, Pépin D (2001a) GPS performance in a temperate forest environment. *in : Tracking animals with GPS*. Macaulay Land Use Research Institute, Aberdeen : 69-72.
- Janeau G, Adrados C, Girard I (2001b) Is it still necessary to use GPS differential mode since the elimination of selective availability ? *in : Tracking animals with GPS*. Macaulay Land Use Research Institute, Aberdeen : 73-75.
- Janeau G, Adrados Ch, Joachim J, Gendner JP, Pépin D (2004) Performance of differential GPS collars in temperate mountain forest. *C. R. Biol.*, 327 : 1143-1149.
- Moen R, Pastor J, Cohen Y (1997) Accuracy of GPS telemetry collar locations with differential correction. *J. Wildl. Manage.*, 61(2) : 530-539.
- Rempel RS, Rodgers AR, Abraham KF (1995) Performance of a GPS animal location system under boreal forest canopy. *J. Wildl. Manage.*, 59(3) : 543-551.
- Rempel RS, Rodgers AR (1997) Effects of differential correction on accuracy of a GPS animal location system. *J. Wildl. Manage.*, 61(2) : 525-530.
- Rodgers AR, Anson P (1994) Animal-borne GPS : tracking the habitat. *GPS World*, 5 : 20-32.

Insertion chirurgicale d'émetteurs radio chez le poisson anesthésié par galvanonarcose

Jacques Rives⁵

Résumé : Nous proposons une méthode d'insertion intrapéritonéale d'émetteurs radio à antenne filaire chez des poissons anesthésiés par électronarcose en courant continu (galvanonarcose). Elle supprime le temps d'induction des anesthésiques chimiques, elle réduit le temps d'intervention (ce qui contribue à diminuer le stress du poisson), elle maintient les mouvements respiratoires durant toute l'anesthésie et elle supprime le temps de réveil (récupération immédiate de la capacité de nage), tout en procurant un confort d'utilisation à l'opérateur ce qui améliore sa précision. La méthode présente donc des avantages pratiques pour l'expérimentateur avec une bonne récupération post opératoire des poissons.

Mots clés : Anesthésie, électronarcose, émetteur radio, marquage intrapéritonéal

Introduction

Dans les études comportementales de longue durée en milieu naturel par radiopistage (suivi de migration, franchissement d'obstacle), l'implantation chirurgicale d'un émetteur radio dans la cavité ventrale du poisson est la méthode la mieux adaptée : l'animal n'est pas gêné dans ses mouvements de nage et peut se nourrir normalement. Deux types d'émetteur sont utilisés suivant la taille du poisson et la distance d'émission nécessaire : à antenne filaire externe (**photo 1A**) lorsqu'une distance maximale est requise ou à antenne enroulée interne (**photo 1B**) lorsque l'animal est de taille plus importante et que l'on peut accepter une distance d'émission plus faible.

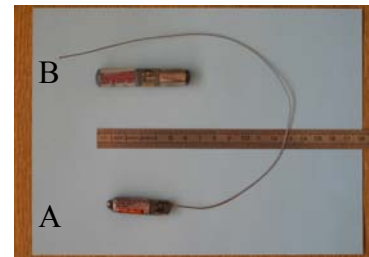


Photo 1 : Deux types d'émetteurs

L'intervention est plus longue et délicate dans le cas d'émetteur à antenne externe puisque l'on doit laisser sortir l'antenne par un orifice à côté de l'incision ayant permis l'insertion. Cela nécessite une anesthésie fiable pour un relâcher rapide des poissons.

Les anesthésiques chimiques (eugénol, phénoxy-2- éthanol) présentent l'inconvénient majeur d'un temps d'induction et de récupération important et aléatoire, d'un risque d'arrêt respiratoire (d'autant plus important que l'anesthésie est longue), de réveils intempestifs et d'une toxicité non négligeable pour l'opérateur. L'électronarcose en courant continu ou galvanonarcose, bien que peu utilisée chez le poisson, représente une alternative intéressante pour des opérations ne nécessitant pas de mettre le poisson à sec, comme l'insertion intrapéritonéale d'émetteurs radio. L'objectif de ce travail a été la mise au point d'un berceau de contention à immerger dans une cuve à galvanonarcose, adaptable à la taille et à la forme du poisson, et d'une technique spécifique d'introduction d'émetteur à antenne filaire.

Ces techniques ont été appliquées en milieu contrôlé sur des truites communes (*Salmo trutta*) de pisciculture (Gosset et Rives 2005), mais aussi lors d'expérimentations en milieu naturel sur des truites communes (Gosset et Rives 2004), et des anguilles argentées. (*Anguilla anguilla*) (Subra S *et al.* 2005)

⁵ INRA - UMR ECOBIOP Pôle d'Hydrobiologie 64310 Saint-Pée-sur-Nivelle ☎ 05.59.51.59.84 rives@st-pee.inra.fr

1. Matériel et méthode

1.1 Cuve à galvanonarcose équipée d'un berceau de contention

Dans une cuve à anesthésie électrique, le poisson est soumis à un champ électrique de courant continu constant qui induit un blocage des messages cérébraux vers les nerfs moteurs spinaux (Lamarque, 1967 ; Cowx et Lamarque, 1990) et maintient le poisson en état de galvanonarcose. Ce champ électrique est obtenu en alimentant en courant continu deux électrodes couvrant les deux extrémités d'une cuve à section rectangulaire (Gosset, 1974). L'état du poisson est caractérisé par une immobilisation complète et une flaccidité musculaire qui peuvent être maintenues sans inconvénient pendant plusieurs dizaines de minutes.

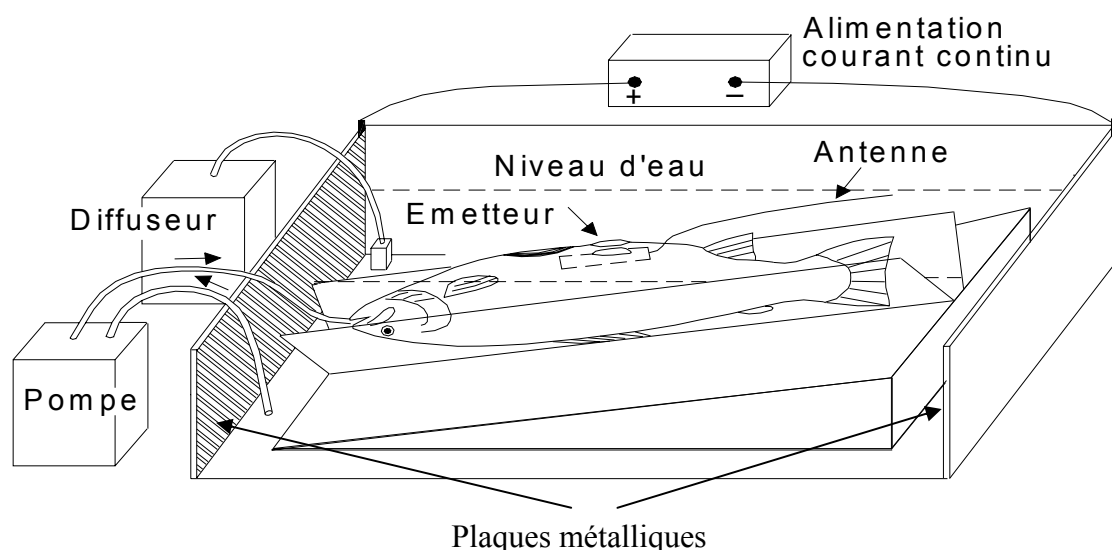


Figure 1 : Cuve à galvanonarcose équipée d'un berceau de contention

L'anesthésie à l'électricité est effectuée dans une cuve de forme parallélépipédique (68 x 21 x 12 cm) équipée de 2 plaques métalliques placées à chaque extrémité et faisant office d'électrodes (**figure 1**). L'alimentation électrique est assurée par un générateur de courant continu (forme de courant la moins choquante pour le poisson). Le voltage inter-électrodes a été réglé à 40 V pour une eau de $240 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ de conductivité, ce qui, compte tenu de la déformation des lignes équipotentielles par le poisson, induit, pour une truite de 32 cm de longueur, une différence de potentiel tête-queue d'environ 7,5 V. (plage efficace entre 0.20 et 0.85 V/cm). Dès qu'on le plonge dans la cuve la tête vers l'anode (pôle positif), le poisson est immédiatement immobilisé et ne réagit pas pendant l'opération chirurgicale. Le réveil est immédiat dès que l'on sort le poisson de la cuve pour le mettre en bac de récupération. Le poisson est maintenu, sur le dos dans un berceau constitué d'une plaque horizontale de PVC de 60 x 20 cm et de deux plaques verticales de même longueur et de 4 cm de hauteur (**figure 1, photo 2**). L'une de ces plaques est fixe, l'autre est mobile et peut être bloquée en différentes positions afin de s'adapter à l'épaisseur et à la forme du poisson. De la mousse polyuréthane tapisse les deux plaques verticales pour améliorer la contention du poisson et des encoches sont pratiquées dans la mousse pour laisser



Photo 2 : Cuve et berceau

libre le mouvement des opercules. Le système est incliné à l'aide de cales, de manière à ce que la tête et la queue soient immergées tout en laissant le ventre accessible et hors de l'eau. Pour des anguilles argentées pouvant mesurer plus de 90 cm, il faut prévoir une cuve de plus grande taille. Le berceau reste efficace mais doit être calé horizontalement à quelques cm du fond de la cuve. La tête et la queue de l'anguille dépassent de chaque côté du berceau afin de rester immergées tandis que le ventre est accessible et hors de l'eau. Un diffuseur d'air assure le maintien d'un taux d'oxygénation correct et un tuyau souple, relié à une pompe à eau de faible débit fonctionnant en circuit fermé dans la cuve, peut être introduit dans la bouche du poisson pour améliorer la circulation branchiale. La température de l'eau doit être voisine de celle de l'eau dont sont issus les poissons et, l'eau changée régulièrement entre les opérations.

1.2 Insertion d'un émetteur radio à antenne filaire externe

Pour insérer un émetteur à antenne filaire externe, l'antenne est préalablement soudée à l'extrémité (côté chas) d'une aiguille à section triangulaire (type 3/8 cercle / 00). La soudure de l'antenne à l'aiguille est normalement quasi impossible à cause du matériau de l'aiguille (inox). On peut résoudre le problème en dénudant très légèrement l'antenne de sa protection (2 mm) et en découpant l'aiguille et le bout de l'antenne à l'aide d'acide orthophosphorique.

Le bourrelet d'étain quasi inévitable à la base de l'aiguille est légèrement poli (sans pour autant risquer de soulever des brins de l'antenne) pour ne pas léser les tissus lors du passage à travers la paroi abdominale.

On pratique une incision de 1 à 2 cm en avant de la ceinture pelvienne. L'émetteur est introduit en commençant par l'aiguille (**figure 2A**) que l'on fait passer sous la ceinture pelvienne et ressortir entre celle-ci et l'anus (**figure 2B**). Il ne reste plus qu'à tirer sur l'aiguille pour entraîner l'antenne, positionner l'émetteur et se débarrasser de l'aiguille en sectionnant l'antenne au ras du chas (**figure 2C**). Le passage de l'aiguille doit être effectué avec soin, en se guidant à l'aide d'une sonde cannelée, pour glisser la pointe de l'aiguille dans la cavité ventrale sans occasionner de blessure interne.

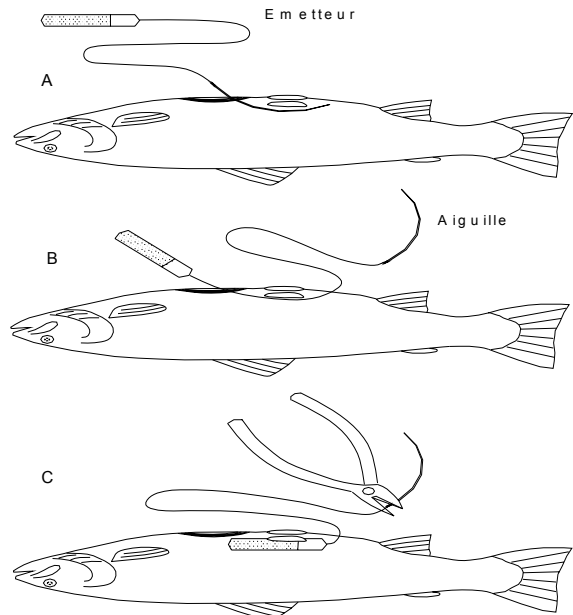


Figure 2 : Insertion de l'émetteur radio

La protection de la pointe (Ross et Kleiner, 1982) par un fourreau plastique ou le passage préalable d'une canule (Steven, *et al* 1995), qui ont pour inconvénient d'agrandir l'orifice de sortie de l'aiguille, ne se sont pas révélés nécessaires. On suture par 2 ou 3 points, dits en « U » à l'aide de fil (ETHICON PDS II 2-0) semi-résorbable et d'une aiguille courbe 3/8T de 24 mm, une pommade grasse cicatrisante et non corticoïde (Fucidine 2%) est ensuite appliquée sur les lèvres de l'incision. Enfin le poisson est surveillé durant 1/2 heure environ dans un bac de récupération où il reprend immédiatement sa capacité de nage.

2. Résultats et exemples d'applications

Cette méthode d'insertion d'émetteur sur des poissons anesthésiés par galvanonarcose a été utilisée avec d'excellents résultats, tant en essai méthodologique en milieu contrôlé que dans des suivis par radiopistage en milieu naturel de truites communes et d'anguilles argentées. Sur 56 poissons marqués, l'anesthésie et le réveil ont été immédiats, même après 15 minutes d'opération. Il n'y a eu ni arrêt ni diminution du rythme respiratoire et l'utilisation du berceau de contention a assuré un bon confort de travail à l'opérateur. Aucune mortalité n'a été constatée dans les jours post opératoires.

En milieu expérimental, la nourriture a été acceptée le jour suivant l'opération. Un mois après le marquage, sur 10 truites 4 sont mortes. Cette mortalité a été probablement provoquée par des mycoses dues à la perte de mucus et d'écaillés inhérente à la manipulation des poissons et aggravée par le confinement en bassin et non au marquage (cicatrisation parfaite).

En milieu naturel, 16 truites (>30cm) et 40 anguilles (>60cm) ont été marquées et suivies entre un et trois mois. Durant cette période, pour les truites, 6 émetteurs se sont immobilisés indiquant la mort du poisson ou plus probablement l'expulsion de l'émetteur (% d'expulsion identique en milieu contrôlé). Pour les anguilles, toutes les mortalités à moyen terme (35%) ont pu être attribuées au franchissement des ouvrages hydroélectriques et non au marquage.

Conclusion

La méthode de contention et la technique d'insertion associées à une anesthésie par galvanonarcose se sont révélées efficaces en terme de récupération des capacités des poissons après intervention et de survie post opératoire. Ce protocole a été conçu pour être le plus adaptable possible au marquage par différents types d'émetteurs sur des poissons de taille et forme différentes. Son utilisation ne présente aucun danger, ni pour le poisson ni pour les expérimentateurs.

Bibliographie

- Cowx IG, Lamarque P (1990) Fishing with electricity. Applications in freshwater Fisheries Management. Oxford: Fishing News Books Blackwell Scientific Publications Ed. 248 p.
- Gosset C (1974) Cuve galvanonarcotique pour la mensuration des poissons. Bull. fr. Pêche Piscic. 255 : 72-76.
- Gosset C, Rives J (2004) Suivi par radiopistage de la migration des truites de la Bidassoa. Rapp. *INRA /GAVRNA*, INRA, Station d'Hydrobiologie, Ecologie Comportementale des Poissons, Saint-Pée-sur-Nivelle, 17 p. + annexes.
- Gosset C, Rives J (2005) Anesthésie et procédures chirurgicales pour l'implantation de radio émetteurs dans la cavité ventrale de truites communes adultes (*Salmo trutta*) Bull. Fr Pêche Pisci 374 : 21-34
- Ross MJ, Kleiner CF (1982) Shielded-needle technique for surgically implanting radio-frequency transmitters in fish. *Progressive Fish-Culturist* 44 : 41-43.
- Steven WM, Long JA, Pearson TN (1995) Comparison of survival, gonad development and growth between rainbow trout with and without surgically implanted dummy radio transmitters. *North American Journal of Fisheries Management* 15 : 494-498.
- Subra S, Gomes P, Vighetti S, Larinier M, Thellier P, Travade F (2005) Rapport de Contrat de Collaboration N° P7-019 entre Electricité de France R&D, le Conseil Supérieur de la Pêche et MIGRADOUR relatif à la mise au point de dispositifs de dévalaison pour l'anguille argentée à l'usine de Baigts de Béarn.

Exemples d'utilisation des écailles en écologie

⁶Frédéric Marchand, Julien Tremblay, Nicolas Jeannot, Didier Azam

Résumé : *Nous étudions les écailles pour déterminer l'âge et la croissance des poissons et dans certains cas, pour discriminer les espèces, le sexe, le cycle biologique voire les différents stocks d'une même espèce. Les progrès réalisés en génétique ou sur l'utilisation des isotopes ont permis aux hydrobiologistes de créer des méthodologies nouvelles, utilisables à partir des écailles pour mieux comprendre le fonctionnement des populations et leurs évolutions. Nous présentons quelques utilisations possibles des écailles de poisson en écologie. Après avoir montré la préparation des écailles, nous décrivons les principales caractéristiques illustrées d'exemples d'interprétations. Enfin, nous montrons l'intérêt de conserver les échantillons d'écailles pour des analyses rétrospectives.*

Mots clés : Poissons, écaille, âge, croissance, microchimie, génétique.

Introduction

A l'image des coupes d'arbre qui permettent d'étudier « les cernes de croissance », les écailles sont utilisées par les scientifiques pour connaître l'âge et la croissance des poissons (Jearld, 1983). Sous nos latitudes, on voit sur une écaille des anneaux ou stries de croissance qui permettent de déterminer l'âge en comptant les alternances de zone de faibles croissances en hiver et de plus fortes en été. Ces différences de croissance informent sur l'histoire de vie du poisson, comme le passage de la rivière vers la mer et, dans certains cas, sur l'origine géographique. On y observe aussi des marques liées à la reproduction : certaines espèces puisent dans leurs réserves minérales, notamment dans les écailles, ce qui se traduit par leur érosion ; la forme, la taille, la disposition et le nombre des écailles sont autant de critères servant à déterminer et à classer des espèces.

Les techniques récentes tant en génétique que sur les isotopes offrent de nouvelles possibilités intéressantes en écologie. Cela est vrai pour les prélèvements actuels mais aussi pour les collections anciennes maintenues dans les différents laboratoires. Celles-ci constituent aujourd'hui un matériel biologique de plus en plus recherché pour analyser rétrospectivement l'évolution de la variabilité génétique des populations ou la qualité de leur milieu de vie.

Au vu des différentes techniques d'analyses des écailles et des perspectives qu'elles offrent, nous livrons ici une synthèse des utilisations classiques et nouvelles de ce matériel biologique.

1. Matériels et méthodes

1.1 Prélèvement et préparation

Les écailles sont prélevées à l'aide d'un scalpel ou d'une pince brucelle sur une zone standard qui diffère selon les espèces (Ombredane et Baglinière, 1992). Un nombre minimum d'écailles est nécessaire, compris entre 5 et 20 selon la taille et l'espèce du poisson. Les écailles sont prélevées chez les individus dont la taille ne permet pas d'estimer directement et correctement l'âge. Le premier travail consiste à les trier sous



Figure 1 : écailles de saumon à droite, écaille régénérée et à gauche écaille d'origine

⁶ INRA – Ecologie et Ecotoxicologie – 65, rue de St Briec - 35042 Rennes Cedex ☎ 02 23 48 57 86
Frederic.Marchand@rennes.inra.fr,

loupe binoculaire (grossissement compris entre 12 et 50 fois) pour garder les bonnes et éliminer les écailles régénérées qui remplacent celles que le poisson a perdu accidentellement (**figure 1**). Il est indispensable de les nettoyer pour éliminer les impuretés ou le mucus gênant la lecture. La technique la plus courante consiste à les placer dans une solution de soude à 5% puis à les rincer à l'eau distillée. On peut utiliser un pinceau pour enlever les saletés sur les grosses écailles ; des auteurs préconisent les ultrasons pour les petites écailles. Le nettoyage des écailles destinées à des analyses génétiques est déconseillé car il peut détruire des informations contenues dans le mucus ou dans la partie superficielle ; pour les mêmes raisons le séchage et la conservation des échantillons se fait dans de bonnes conditions pour effectuer par la suite ces analyses.

Le montage se fait soit entre 2 lames de verre soit entre lame et lamelle (en fonction de la taille de l'écaille) soit par impression sur film plastique avec une presse à bijoutier. La lecture est réalisée à l'aide d'un lecteur de microfiche ou d'un rétroprojecteur, tous deux équipés de grossissements adaptés à la taille des écailles à interpréter.

Leur numérisation permet de faire toutes sortes de mesures (longueur, largeur, comptage du nombre de circuli (cf. §1.2)). L'autre intérêt, tout comme l'impression sur film plastique est de conserver la possibilité d'une relecture et donc d'utiliser les écailles à des fins d'analyses génétiques ou isotopiques.

1.2 Description des écailles

Il existe différents types d'écailles, placoïdes, rhomboïdes ou élasmoïdes. Les écailles placoïdes que l'on retrouve par exemple chez le requin, ne grandissent pas mais leur nombre augmente au cours de la vie du poisson. Ce n'est pas le cas des écailles rhomboïdes (en forme de losange comme chez le dipneuste), ou élasmoïdes (lamelles fines et transparentes). Nous n'allons aborder par la suite que les écailles élasmoïdes qui concernent la majorité des poissons que nous étudions.

Le centre de l'écaille est appelé focus. On distingue

1- Les circuli, crêtes concentriques tournant autour du nucléus. Elles sont formées par la superposition de lamelles fibreuses (**figure 2**).

2- Les radii ou sillons transverses qui s'orientent depuis le focus vers le bord de l'écaille. Ils ne sont pas présents chez toutes les espèces.

Dans la plupart des cas, les écailles s'imbriquent comme les tuiles d'un toit, les unes sous les autres. Cela se traduit par deux zones distinctes : (1) la partie interne ou champ antérieur où tous les éléments de l'écaille sont bien visibles, est située sous l'écaille précédente et est reliée au derme du poisson et (2) la partie externe ou champ postérieur, où la majorité des circuli et autres marques sont moins visibles. Chez des espèces comme le bar, la perche ou les cichlidés, ce champ postérieur est orné de spinules ou ctenii (**figure 3**), ce qui donnent à ces poissons un aspect rugueux au toucher.

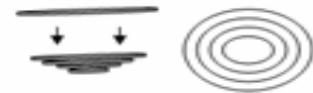


Figure 2 : *Ecaille*
vue en coupe (1), de dessus (2)

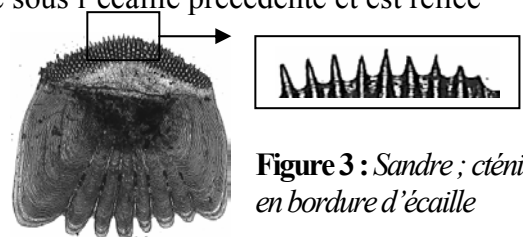


Figure 3 : *Sandre ; ctenii*
en bordure d'écaille

2. Applications à partir des observations directes sur l'écaille

2.1 L'âge et la croissance

La connaissance de l'âge individuel est essentielle dans les études de fonctionnement des populations. L'âge et la croissance sont des paramètres inclus dans les modèles de dynamique des stocks par exemple. L'analyse des fréquences de tailles permet dans certains cas de définir les classes d'âge (ou cohorte = ensemble des individus nés la même année). Cependant, il

existe souvent un chevauchement entre les plus grands individus d'une cohorte, et les plus petits de la cohorte suivante. On utilise alors les écailles pour estimer l'âge. Par ailleurs, la taille de l'écaille et celle du poisson grossissant proportionnellement, il est possible d'une part, d'effectuer des mesures de croissance rétrospectives pour toutes les années précédant la capture (**figure 4**); et d'autre part, de distinguer les différents milieux où le poisson a vécu. L'analyse des écailles du saumon (*Salmo salar*), permet de distinguer deux phases, l'une eau douce et l'autre marine.

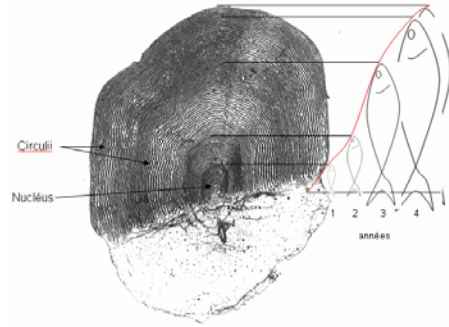


Figure 4 : Saumon ; relation taille de l'écaille et celle du poisson

La nomenclature du saumon est basée sur l'estimation du temps de séjour marin et non sur celle de son âge total. Ainsi un saumon de trois ans d'âge total peut avoir séjourné soit deux ans en rivière comme juvénile et 1 an en mer, soit un an en rivière et deux ans en mer.

Dans le premier cas, on parle alors d'un castillon ; ce type de poisson a une taille souvent comprise entre 600 et 700 mm et a une probabilité de 50% d'être un mâle. Dans le second cas, on parle d'un petit saumon de printemps dont la taille varie entre 700 et 800 mm et qui a une forte probabilité d'être une femelle.

2.2 La connaissance des reproductions multiples

L'analyse des écailles indique si le poisson se reproduit. L'identification des marques de reproduction donne une estimation de l'âge de première reproduction. Cela permet d'ajuster les mesures de gestion (tailles légales) afin qu'un individu se reproduise au moins une fois avant d'être capturé. Cette analyse indique également si le poisson s'est reproduit plusieurs fois au cours de son cycle de vie ; on parle alors de taux d'itéroparité.

2.3 La distinction des espèces

La forme et la taille des écailles (**figure 5**), leur nombre sont des critères utilisés pour différencier des espèces.

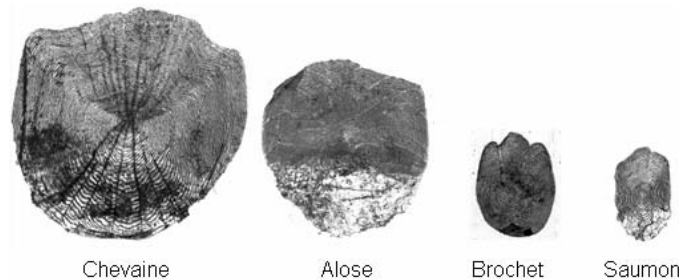


Figure 5 : Ecailles de 4 espèces de poisson de même taille, 18 cm.

Cette identification des espèces de poissons à partir des écailles est utilisée pour analyser le régime alimentaire des prédateurs (poissons carnassiers, oiseaux et mammifères) dans la mesure où la constitution minérale de l'écaille résiste assez bien au processus de digestion (présence d'écailles -entières ou non- dans les fèces ou l'estomac). Par ailleurs, le nombre d'écailles et leur organisation sur le corps du poisson permet également de distinguer les espèces. Ainsi, le plus grand nombre d'écailles présentes sur la ligne latérale permet de distinguer entre les deux genres *Salmo* et *Oncorhynchus* de la sous famille des Salmoninés. De même, une organisation régulière des écailles sur la ligne longitudinale distingue l'Alose feinte (*Alosa fallax*) de la grande Alose (*Alosa alosa*) chez laquelle l'organisation de l'écaille est irrégulière.

3. Application à partir d'analyses de la composition de l'écaille

3.1 Microchimie

Chez les poissons migrateurs, le rapport strontium sur calcium de l'écaille indique si le poisson a séjourné en mer, voire en estuaire, ou si il est resté en eau douce. Cette technique permet notamment chez la truite d'identifier la forme marine de la forme eau douce alors que la livrée de la robe ne permet plus de le faire notamment en période de reproduction. Aujourd'hui, les techniques d'analyse isotopique du carbone appliquées aux écailles sont employées pour identifier les milieux de croissance et faire la distinction entre individus résidants en eau douce et migrateurs marins. De même, les techniques d'analyse isotopique de l'azote appliquées aux écailles permettent d'identifier des statuts trophiques des individus et/ou de mettre en évidence l'apport en nutriments azotés d'origine exogène (agricole) dans les réseaux trophiques (Wainright *et al.* 1993).

3.2 Génétique

Grâce à l'amélioration des techniques en génétique (méthodes des PCR)⁷ nous utilisons les écailles au lieu des muscles ou des nageoires et surtout nous pouvons réaliser des analyses rétrospectives sur des collections d'écailles. Leur utilisation permet aussi bien de distinguer des espèces (Baglinière *et al.* 2002) que des formes biologiques au sein d'une même espèce (truite de mer et truite de rivière : Charles *et al.* 2005).

Conclusion

Les écailles en tant que structures dures sont des enregistreurs biologiques de l'histoire de vie du poisson ; elles indiquent l'âge, la croissance et apportent des renseignements sur la vie du poisson. Les techniques développées et présentées ici valident certaines plus anciennes et ouvrent des perspectives en écologie. En effet, de nouveaux paramètres peuvent être mesurés et répondre à de nouvelles questions. Un autre élément intéressant est la somme de renseignements biologiques et environnementaux que recèlent les écailles lorsqu'elles sont utilisées dans le cadre d'analyses rétrospectives spatio-temporelles. Les progrès dans ces domaines devraient ouvrir de nouvelles perspectives d'où l'intérêt pour les hydrobiologistes d'assurer une veille technologique dans ce sens et de conserver leurs échantillons.

Bibliographie

- Baglinière JL, Tabet Aoul K, Menella JY (2002) Occurrence of an adult Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in the River Rhône (Mediterranean basin, France). *J. Fish. Biol.*, 60, 249-255.
- Charles K, Guyomard R, Hoyheim B, Ombredane D, Baglinière JL (2005) Lack of genetic differentiation between anadromous and non-anadromous sympatric trout in a Normandy population. *Aquatic Living Resources*, 18, 65-69.
- Jearld A (1983) In: Nielsen L (Ed), Age determination. Fisheries Techniques, Blacksburg, pp. 301-324.
- Ombredane D, Baglinière JL (1992) Les écailles et leurs utilisations en écologie halieutique. In "Tissus durs et âge individuel des vertébrés". Baglinière JL, Castanet J, Conand F, Meunier F (Eds), ORSTOM-INRA, Paris, pp 151-192.
- Wainright SC, Fogarty MJ, Greenfield RC, Fry B (1993) Long-term changes in the Georges Bank food web: trends in stable isotopic compositions of fish scales. *Marine Biology* 115, 481-493.

⁷ PCR : Polymerase Chain Reaction (ou ACP : Amplification en Chaîne par Polymérase), technique de répllication ciblée in vitro.

Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier

⁸ *Nathalie Boizot, Jean-Paul Charpentier*

Résumé : *Parmi les méthodes de quantification des composés phénoliques, nous utilisons dans notre laboratoire préférentiellement un protocole utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Il s'agit d'une méthode analytique biochimique nécessitant la prise d'échantillons, l'extraction des composés phénoliques à partir de ces échantillons puis d'une mesure spectrophotométrique des extraits. Nous l'avons adaptée pour traiter beaucoup d'échantillons et avec peu de matière végétale à extraire. Tous les organes de l'arbre peuvent être étudiés de la feuille jusqu'aux racines en passant par le bois.*

Mots clés : extraction, polyphénols, réactif de Folin-Ciocalteu, spectrophotométrie

Introduction

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits. Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tannins.

Le dosage des polyphénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrit dès 1965 (Singleton et Rossi). Depuis, son utilisation s'est largement répandue pour caractériser les extraits végétaux d'origines les plus diverses. Dans notre laboratoire, nous utilisons ce dosage en routine après l'avoir adapté, afin qu'il réponde à deux objectifs : traiter un nombre important d'échantillons et ce à partir de très peu de matière végétale, être transposable à tout type de tissu de l'arbre (bois, feuilles, racines...).

1. Dosage des polyphénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu

1.1 Matériel végétal : Les tissus végétaux sont congelés dans l'azote liquide au moment du prélèvement puis lyophilisés. Ils sont ensuite réduits en fine poudre grâce à un broyeur à billes de type Danguomeau (taille des particules environ 40µm), la finesse de la poudre conditionnant la qualité de l'extraction ultérieure.

1.2 Extraction des composés phénoliques : Les polyphénols sont extraits par macération de 50 mg de poudre dans 2 mL de solvant organique (acétone 80%), sous ultrasons pendant 45 min et à 4°C pour empêcher l'action de polyphénoloxydases qui dégraderaient les composés phénoliques. Après centrifugation, le surnageant contenant les polyphénols est récupéré. On procède à une deuxième extraction identique sur le culot pour extraire 30% de polyphénols supplémentaires et donc d'obtenir un dosage plus exhaustif. Les surnageants sont réunis avant d'être concentrés à sec sous vide.

⁸ INRA - Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, Laboratoire d'Analyses Biochimiques, BP 20619 Ardon - 45166 Olivet Cedex ☎ 02 38 41 78 64 noel@orleans.inra.fr ; charpentier@orleans.inra.fr

1.3 Dosage des polyphénols utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu

1.3.1 Principe : Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Ribéreau-Gayon, 1968). La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

1.3.2 Mise en œuvre du dosage : L'extrait sec est dilué dans de l'eau pour obtenir une absorbance finale comprise entre 0,5 et 1. On réalise une gamme étalon en milieu aqueux (8 points de concentrations de 0 à $20\mu g.mL^{-1}$) avec un polyphénol témoin, en général de l'acide gallique. Pour réaliser le dosage, $500\mu L$ de réactif de Folin-Ciocalteu (Sigma, dilué 10 fois dans de l'eau ultra pure) sont ajoutés à $100\mu L$ d'extrait dilué ou de point de gamme. On ajoute ensuite $400\mu L$ de Na_2CO_3 ($75g.L^{-1}$). Le blanc de la réaction ne contenant pas de polyphénol est réalisé comme le point $0\mu g.mL^{-1}$ de la gamme. Les mélanges réactionnels, correspondant à chaque point de gamme et échantillon, sont agités et incubés 5 min à $40^\circ C$. $250\mu L$, sont distribués en triplicata sur une microplaque 96 puits (**photo 1**). La lecture de l'absorbance à 735 nm se fait grâce à un spectrophotomètre à microplaque *Multiskan Spectrum* (ThermoLifeSciences) dont le logiciel, par le biais de la gamme étalon, calcule la concentration moyenne des polyphénols présents dans les extraits végétaux en μg équivalent acide gallique. mL^{-1} par exemple si l'on choisit l'acide gallique comme témoin. Nous exportons ces résultats sous Excel pour les convertir en quantité (mg) d'équivalent acide gallique par g de matière sèche (MS) extraite. L'utilisation des microplaques nous permet de quantifier en quelques minutes les polyphénols de 23 échantillons. On peut également utiliser des microplaques à barrettes modulaires de 8 puits (*Nunc*), ce qui permet d'utiliser une seule gamme pour lire successivement plusieurs microplaques.

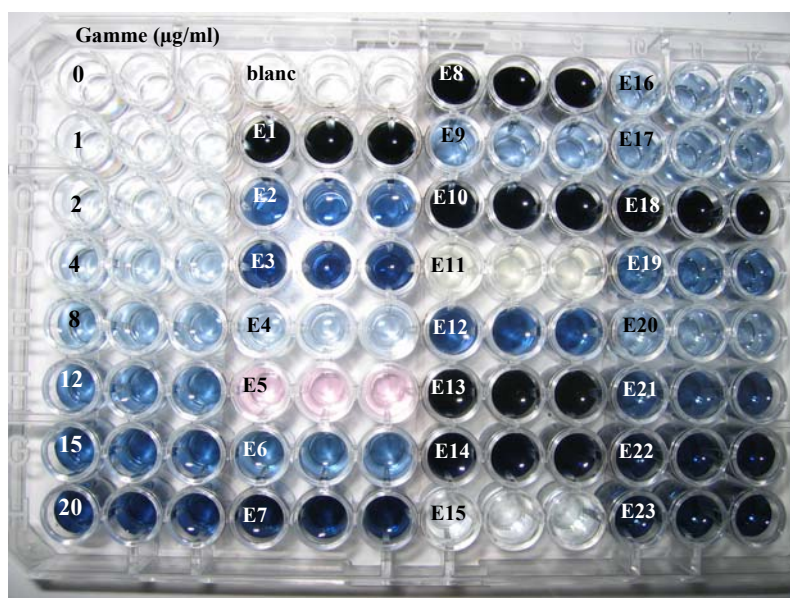


Photo 1 : Exemple de microplaque comportant une gamme d'acide gallique ($\mu g.mL^{-1}$) et 23 extraits de bois provenant de diverses essences

1.3.3 Critique de la méthode : Si l'extrait sec est faiblement soluble dans l'eau, on peut le diluer dans du méthanol. Il y a alors formation d'un précipité blanc au cours de la réaction qui doit être éliminé par centrifugation avant de remplir les microplaques. Cela n'affecte en rien les résultats obtenus ni leur reproductibilité (Scalbert *et al.* 1989).

Si le dosage de Folin-Ciocalteu est simple à mettre en œuvre et très sensible, il n'est cependant pas spécifique des polyphénols ; il réagit avec les acides aminés tyrosine et tryptophane des protéines, les sucres réducteurs comme le glucose et le fructose, l'acide ascorbique, l'acide tartrique et les sulfites. Nous utilisons un solvant acétonique plutôt que le

méthanol ou l'éthanol pour extraire les polyphénols, car il a l'avantage de précipiter les protéines et d'extraire faiblement les sucres. Néanmoins, il convient d'évaluer au préalable pour chaque type de tissu la quantité de composés non phénoliques pouvant interférer avec le réactif de Folin. Pour cela, on réalise un dosage différentiel avant et après passage de l'extrait sur une cartouche contenant 250 mg de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), sur lequel vont s'adsorber spécifiquement les polyphénols. Nous nous affranchissons d'un tel dosage si la teneur en composés non phénoliques des extraits est inférieure à 1%.

Dans des publications, les dosages indiqués sont réalisés avec une gamme d'acide gallique qui est un composé de coût peu élevé et qui se solubilise facilement dans l'eau. De plus, la gamme une fois préparée se conserve environ 1 mois à 4°C. Il est préférable de choisir le polyphénol témoin en fonction de la composition de l'extrait à analyser (acide gallique pour le bois de chêne riche en tannins hydrolysables, taxifoline pour le bois et les aiguilles de mélèze dont elle est le flavonoïde majoritaire...), car l'intensité de la réaction varie en fonction du nombre de groupements hydroxyles (-OH) portés par les noyaux benzéniques des molécules.

1.3.4 Hygiène et sécurité : Nous avons évalué le risque chimique lié à la mise en œuvre de notre protocole de dosage par le réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode OHB. La fiche toxicologique fournie par Sigma (version 1.4 du 8 Février 2006 selon 91/155/CEE) indique que le réactif est un mélange de 5 composants entre autres de l'acide phosphorique dont l'indice OHB de 4 est le plus élevé. Le risque chimique devient acceptable à condition de réaliser toutes les manipulations sous sorbonne à parois latérales et fermeture frontale.

2. Résultats et exemples d'application

Dans le bois et plus particulièrement dans le duramen, l'accumulation de polyphénols solubles joue un rôle essentiel pour sa qualité, couleur et durabilité naturelle (résistance aux attaques de champignons et insectes pathogènes). Nous évaluons quantitativement les contenus en extractibles phénoliques dans le bois avec notre méthode et nous pouvons comparer différentes espèces entre elles (**figure 1**) ou différentes zones de bois d'une même espèce à différentes périodes (**figure 2**).

Ici, le choix du polyphénol témoin choisi pour la calibration a son importance. L'acide gallique, possédant un nombre moyen (3) de fonctions phénols est un bon compromis mais certains contenus sont forcément sous évalués par rapport à d'autres, comme chez le Teck.

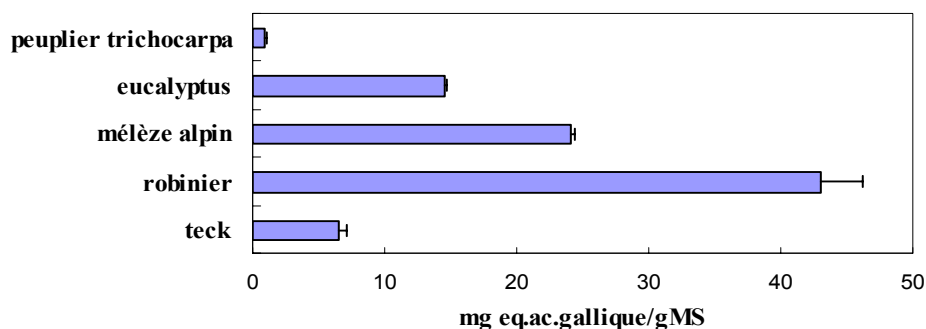


Figure 1 : Teneur en composés phénoliques dans le duramen de différentes essences ligneuses

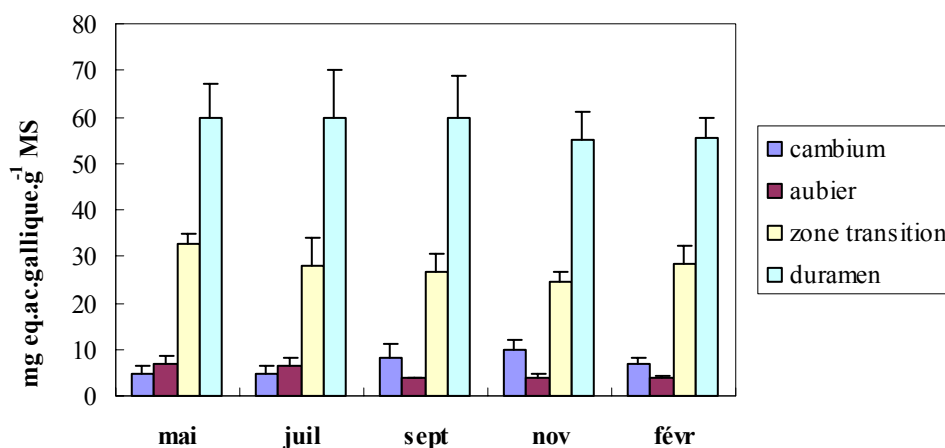


Figure 2 : Evolution de la teneur en polyphénols totaux dans différentes zones du bois de noyer noir en fonction de la période de végétation.

Conclusion et perspectives

L'évaluation du contenu en composés phénoliques dans divers organes et tissus d'un arbre peut-être un indicateur très pertinent de changements d'états dus aux différentes conditions environnementales ou une réponse à des conditions de traitement particulier. Le contenu en composés phénoliques est aussi sous très forte influence génétique.

La méthode d'évaluation du contenu en composés phénoliques utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu est utilisée dans les laboratoires et donne des résultats fiables et reproductibles. Elle reste néanmoins une méthode analytique destructive (prise d'échantillon, réalisation d'un extrait) qui bien qu'optimisée demande la mise en œuvre de nombreuses manipulations. Nous étudions actuellement la mise en corrélation des mesures effectuées à l'aide de cette méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu et les Spectres Proche Infrarouge pris sur le bois massif de différentes espèces afin d'aboutir à une méthode rapide et non destructive d'évaluation quantitative du contenu en composés phénoliques dans le bois.

Bibliographie

- Ribéreau-Gayon P (1968) Les composés phénoliques des végétaux. Editions Dunod, Paris 254 pp
- Scalbert A, Monties B, Janin G (1989) Tannins in wood: comparison of different estimation methods. *J Agric Food Chem* 37: 1324-1329
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16:144-158
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 299:152-178

Le point sur le carottage mécanisé d'arbres vivants

François Geremia⁹ et Marcel-Alain Nassau¹⁰

Résumé : *Tous les ans, nous extrayons un millier de carottes de sondages de tronc d'arbres vivants, avec une tarière de Pressler. Pour améliorer l'efficacité du carottage et réduire l'effort physique que sollicite le vissage manuel des mèches, nous avons conçu deux carotteurs mécaniques et portatifs qui nous donnent satisfaction depuis une quinzaine d'années. Le premier est constitué d'une perceuse électrique alimentée par un groupe électrogène, et permet de carotter des arbres groupés et à bois tendre. Le second est une chignole à moteur thermique équipée d'un réducteur de vitesse ad hoc ; il permet de carotter des arbres dispersés et dont le bois est relativement dur.*

Mots clés : Carottage, tarière de Pressler, carotteur, perceuse, chignole à moteur, réducteur de vitesse

Introduction

Densité, croissance radiale, âge, composition chimique du bois sont quelques uns des paramètres utilisés pour comprendre l'influence des facteurs génétiques et environnementaux sur la croissance des arbres. On ne peut les observer qu'en utilisant des échantillons de bois provenant de l'intérieur des arbres vivants (Millier *et al.* 2006). Cependant, pour que les propriétaires de forêts nous autorisent à échantillonner plusieurs centaines d'arbres par étude, nous ne devons leur occasionner que des dégâts minimes. C'est pourquoi, suivant l'exemple de nos collègues Inra du Laboratoire d'Etude des Ressources Forêt-Bois de Nancy, nous avons choisi d'extraire des carottes de 5 mm de diamètre environ et de quelques cm à quelques dizaines de cm de long avec une tarière de Pressler, car elle fore un trou de sondage que l'arbre cicatrise aisément.

Il y a une dizaine d'années, nous vissions ces mèches creuses à la main ; cela nous obligeait d'une part, à fournir des efforts physiques importants et d'autre part, à limiter la taille de l'échantillonnage pour obtenir des carottes ondulées passant parfois assez loin de la moelle (cœur de l'arbre). Pour y remédier, nous avons conçu deux équipements portables qui améliorent la qualité des carottes et la vitesse de carottage et réduisent l'effort physique des personnes.

⁹ UMR INRA-UHP Ecologie et Ecophysiologie Forestières, Equipe Phyto-écologie 54280 Champenoux

☎ 03 83 39 40 41 geremia@nancy.inra.fr

¹⁰ INRA Unité Expérimentale Forestière Lorraine 54 280 Champenoux ☎ 03 83 39 40 92 nassau@nancy.inra.fr

1. Matériels et méthode

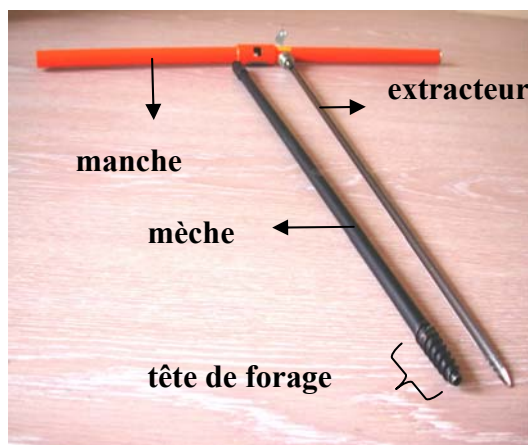


Photo 1 : tarière de Pressler (Photo F. Gérémia)



Photo 2 : extraction de la carotte (Photo F. Lebourgeois)

Petit rappel sur le carottage

La tarière de Pressler que nous utilisons est constituée d'un manche, d'un extracteur composé d'une tige métallique en forme de gouttière et d'une mèche tubulaire en acier spécial de 40 cm de longueur et de 1 cm de diamètre extérieur, terminée par une tête conique biseautée munie d'un double filetage permettant la pénétration dans le bois par vissage à raison de 8,5 mm par rotation (**photo 1**). Pour carotter, nous emmanchons la mèche, et la vissons dans le tronc en direction de la moelle jusqu'à la profondeur désirée. Ensuite, nous coinçons la carotte dans le cône intérieur de la tête de forage avec l'extracteur, nous la détachons du bois en dévissant la tarière d'un tour complet, enfin, nous la sortons en tirant l'extracteur (**photo 2**). Pour terminer, nous bouchons le trou de sondage avec un tourillon de bois désinfecté, et pansons la plaie de l'écorce avec du cicatrisant horticole (Polge, 1971).

Remarque importante : Certaines mèches de sondage produisent des carottes fragmentées en petites rondelles. Souvent, ce défaut provient d'un mauvais affûtage du cône intérieur de la tête de fraisage, d'origine ! Il convient alors de l'affûter conformément à la méthode décrite par Perrin (1984).

Des carotteurs pour améliorer le carottage

Le vissage manuel des mèches nécessite des efforts musculaires soutenus qui correspondent à un couple de torsion maximum de 30 N.m^{-1} (Newton par mètre) pour les bois tendres et de 60 N.m^{-1} pour les bois durs. On comprend que le carottage soit long et fastidieux surtout au-delà de 20 cm de profondeur.

Pour le faciliter, nos collègues étrangers ont inventé des carotteurs qui utilisent un moteur qui peut-être une tronçonneuse (Greig, 1971) ou une perceuse électrique alimentée par un groupe électrogène (Wilhelm, 1993) dont on augmente la force en adaptant un réducteur de vitesse.

Se passer d'un réducteur de vitesse n'est donc pas évident *a priori* ; cependant, il y a 15 ans, dans l'Unité Expérimentale Forestière Lorraine nous avons imaginé d'adapter les mèches directement sur une perceuse électrique grâce à un adaptateur spécial (photo n°3). Les essais que nous avons effectués ont prouvé que la puissance consommée de ces machines, indiquée par le fabricant, n'est que rarement en rapport direct avec le couple fourni ; c'est pourquoi nous avons dû tester plusieurs types de perceuses avant d'en trouver une qui développe un couple satisfaisant. Ce carotteur simple est alimenté par un groupe électrogène de 2 kw/h et

permet de carotter les arbres à bois tendre à larges accroissements comme le peuplier, le sapin, l'épicéa, le pin... Pour l'actualiser, il serait nécessaire de tester les perceuses présentes sur le marché actuellement.

Photo 3 : *carotteur à perceuse électrique*
(Photo F. Millier)



Photo 4 : *vissage d'une mèche au carotteur à moteur thermique*
(Photo F. Lebourgeois)

Au sein de l'Equipe Phytoécologie Forestière, nous avons besoin de carotter des bois plus durs comme le Chêne et le Hêtre. C'est pourquoi nous avons conçu, avec une entreprise de mécanique industrielle qui le commercialise actuellement, un carotteur similaire à celui de Greig, mais plus léger. Il se compose d'une chignole classique visseuse-dévisseuse à moteur thermique deux temps et d'un réducteur de vitesse (**photo 4**). L'ensemble pèse 8,2 kg, poids maximum admissible pour un appareil portable. Il permet tout de même d'atteindre un couple de 60 N.m^{-1} pour une vitesse de rotation de sortie de 45 t min^{-1} . Son utilisation nécessite le port de coquilles antibruit.

Ces 2 carotteurs remplacent aisément le poussoir-starter, aussi appelé *manche de Reineke* (Polge, 1971), qui sert à pousser la mèche dans le bois au début du carottage et à empêcher les changements de direction qui occasionneraient des ondulations indésirables de la carotte. Parfois, la mèche reste coincée dans le tronc d'un arbre creux et on ne peut l'extraire qu'avec un palan ou un cric (Yamaguci, 1991). Avec le carotteur à moteur thermique, il suffit de tirer l'appareil lors du dévissage pour récupérer la mèche. Autre avantage, comme le carottage est plus facile, on n'hésite plus à refaire les carottes qui s'écartent de plus de 30 mm de l'axe de la moelle. Rappelons que cette distance est le maximum admissible, déterminée par Bert sur des sapins pectinés, pour que l'âge des arbres puisse être estimé avec une précision de 5%. (Bert, 1992).

2. Résultats

Depuis 15 ans, nous avons augmenté avec ces carotteurs aussi bien la vitesse de prélèvement que la qualité et le nombre de carottes prélevées ; les troubles musculo-squelettiques, comme les lombalgies et les tendinites, ont également été réduits dans les équipes Inra, Engref, CEA, CNRS ou Cemagref qui s'en sont dotées.

Conclusion

Aujourd'hui, les carottes de 40 cm de longueur au maximum et de 5,15 mm de diamètre, répondent aux exigences des scientifiques et nos équipements permettent un travail de terrain plus rapide, moins physique et de meilleure qualité. Dans un proche avenir, il sera nécessaire de disposer en plus de carottes plus grosses, pour obtenir un volume de bois suffisant pour certaines analyses chimiques, et plus longues, pour étudier des arbres plus gros. Il existe d'ores et déjà sur le marché des tarières de 80 cm de longueur maximale et d'autres de 10 et 12 mm de diamètre intérieur. Elles nécessitent des efforts musculaires extrêmes et ne pourraient donc être vissées qu'avec un carotteur reportant l'effort sur un châssis ancré à l'arbre, tel celui breveté par Bastian (Wilhelm, 1993).

Remerciements

Tous nos remerciements vont à Monsieur Sargis de l'entreprise Mécanique Industrielle de l'Est, pour la conception et la réalisation du réducteur ; ainsi qu'aux personnels du centre Inra de Nancy et de l'Engref de Nancy qui nous ont aidés et conseillés lors de l'élaboration de ces prototypes et particulièrement Messieurs Gérardot, Schipfer, Lebourgeois, Monnier, Behr, Kieffer et Mercanti.

Bibliographie

- Bert D (1992) Influence du climat, des facteurs stationnels et de la pollution sur la croissance et l'état sanitaire du Sapin pectiné (*Abies alba* Mill.) dans le Jura. Etude phytoécologique et dendrochronologique. *Thèse Université de Nancy I*, 200p + annexes.
- Greig BJW (1971) The adaptation of boring attachments on motor-driven chain-saws, for the detection of decay in trees, and other uses. - *Forestry*, 44, 2, 151-153
- Johansen RW (1987) Taking increment cores with power tools. *Southern Journal of Applied Forestry*, 11, 151-153
- Perrin JR (1984) Affûtage et rectification des tarières de sondage.- *R.F.F.* XXXVI, 1, 59-65
- Polge H (1971) Quelques conseils pratiques pour l'entretien et l'utilisation des tarières de Pressler.- *R.F.F.* 1971, XXIII, 2, 251-261
- Reineke LH (1941) A new increment core instrument and coring wrinkles. *Journal of Forestry*, 39, 3, 304-309
- Wilhelm GJ (1993) Neues Verfahren zur mechanisierten Zuwachsbohrung. *Holz-Zentralblatt*, 119. Jahrgang, Nr. 63, S. 1054.
- Yamaguchi DK (1991) AMAGUCHI (D. K.).- Mechanical devices for extracting stuck increment borers.- *Can. J. For. Res.*, 21, 712-714
- Millier et al. (2006) Microdensitrométrie sur arbres forestiers, *in* Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques. *Le Cahier des techniques de l'Inra, Milieux naturels*, 87-91.

Microdensitométrie sur arbres forestiers

¹¹ Frédéric Millier, Michel Verger, Philippe Rozenberg

Résumé : *La densité est une caractéristique importante du bois car elle va influencer sur ses propriétés mécaniques. La microdensitométrie est une technique d'étude des propriétés du bois qui vise à mesurer les variations de densité à l'intérieur du cerne. Le principe est d'analyser des clichés radiographiques numérisés d'échantillons de bois. La microdensitométrie a été utilisée pour sélectionner génétiquement des arbres sur des critères de qualité du bois. Le bois enregistrant les variations climatiques, elle permet également de mesurer l'activité cambiale et d'analyser les réactions de l'arbre soumis à des stress climatiques.*

Mots clefs : qualité du bois, densité, sélection, stress climatique

Introduction

En climat tempéré, la croissance des arbres est rythmée par les saisons : cerne après cerne, le bois s'accumule dans le tronc. Chaque cerne est constitué de cellules, allongées, verticales et creuses : la proportion de parois (pleines) et de lumen (vides) dans un certain volume de bois est la densité. Les variations de la densité mesurées à petite échelle (quelques dizaines de microns) le long d'un rayon allant du cœur de l'arbre vers l'écorce en traversant tous les cernes accumulés constituent la microdensité. Elle peut-être vue à la fois comme :

- une propriété physique, déterminant des aspects importants de la qualité d'un matériau industriel,
- une trace des variations du fonctionnement de l'arbre au cours du temps, années après années.

En génétique des arbres forestiers, on améliore généralement sur des caractères d'adaptation et de croissance. Dans certains cas, par exemple l'épicéa commun, la sélection sur la vitesse de croissance a entraîné une diminution de la densité rendant le bois impropre à certains usages. Il est donc crucial d'au moins surveiller l'évolution des propriétés de base du bois comme la densité quand on sélectionne sur d'autres caractères.

1. Description de la méthode

1.1 Récolte des échantillons

Les analyses microdensitométriques nécessitent la récolte d'échantillons de bois qui sont obtenus par deux méthodes, destructive (i) ou non destructive (ii) de l'arbre :

- (i) Des rondelles de bois sont taillées dans un billon avec une tronçonneuse. Ce type de prélèvement peut être effectué au cours d'une éclaircie sylvicole, c'est-à-dire durant l'exploitation partielle d'un peuplement forestier. On effectue tout d'abord un trait de scie sur chaque rondelles, de l'écorce jusqu'au cœur, afin de libérer les contraintes internes du bois. Cette opération évite la formation de micro fissures qui nuisent ultérieurement à la

¹¹ INRA -Amélioration, génétique et physiologie forestières - Ardon BP 20619 45166 Olivet Cedex
☎ 02 38 41 78 00 frederic.millier@orleans.inra.fr , verger@orleans.inra.fr , Rosenberg@orleans.inra.fr

préparation des échantillons (**photo 1**). Les rondelles sont ensuite stockées dans un local bien aéré.

- (ii) Des carottes de bois récoltées à l'aide d'une tarière de Pressler (outil à main permettant de forer et extraire une carotte de bois à l'intérieur d'un tronc) à une hauteur de 1,30 mètre dans une orientation constante pour un même protocole, l'idéal étant de passer par le cœur de l'arbre. Elles sont placées dans une boîte de récolte (plaque alvéolée de polycarbonate) puis, au laboratoire, séchées 2 à 4 mois, dans des boîtes en bois prévues à cet effet, afin d'atteindre un taux d'humidité d'environ 12% (**photo 2**).

1.2 Préparation des échantillons en atelier

Dans chaque rondelle, un barreau (rectangle de bois de bord à bord passant par le cœur) est découpé au combiné bois (**photo3**). Les barreaux et les carottes sont sciés avec une scie-fraise à lames jumelles (**photo 4**), pour obtenir des planchettes (**photo 5**).

La vitesse d'avancement du chariot et la vitesse de rotation des lames sont réglables, pour optimiser la qualité du sciage, donc l'état de surface des planchettes. Leur épaisseur doit être régulière (on tolère au maximum 1/10 mm entre chaque extrémité de la planchette).

1.3 Radiographie aux rayons X des échantillons

Une quinzaine de planchettes peuvent être radiographiées (**photo 6**) en même temps, ce nombre variant selon leur dimension. Dans un premier temps, elles sont posées sur un film radiographique de dimension 18 x 24 centimètres sensible aux rayons X avec une cale étalon en acétate de cellulose, un composé possédant des propriétés physiques d'absorption des rayons X proche de la matière ligneuse. La densité bois étant liée de façon linéaire à la densité optique, la cale étalon, constituée de douze paliers, correspondant chacun à un niveau de gris, va permettre la conversion des densités optiques de la radiographie en densité bois.

Planchettes et cale sont placées perpendiculairement à un flux de rayons X dans un caisson plombé. Une certaine quantité de ce flux va être absorbée par le matériau bois tandis que l'autre partie va venir frapper le film radiographique et l'impressionner. L'absorption, et donc la transmission du flux de rayons X varient en fonction de l'épaisseur de l'échantillon et de sa densité.

Le temps d'exposition est de 14 minutes. La distance source-film est de 1,6 mètre, l'intensité du flux de 10 mA et la tension de 9 Kv. Ces réglages peuvent varier en fonction de l'épaisseur des échantillons ou des espèces d'arbres.

1.4 Développement des radiographies

Le développement manuel est préférable au développement machine. Il nécessite cinq étapes, chacune est séparée par un rinçage de quelques secondes à l'eau courante.

- la révélation : 15 minutes sur agitateur,
- le bain d'arrêt : 5 minutes,
- la fixation : 12 minutes,
- le trempage dans une solution d'éthylène glycol : quelques secondes,
- le séchage à l'air libre : plusieurs heures.



Photo 1 : Rondelle



Photo 2 : carotte



Photo 3 : barreau



Photo 4 : scie à lame jumelle



Photo 5 : planchette



Photo 6 : radiographie

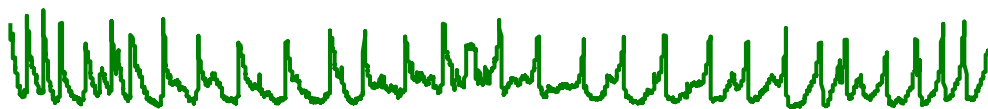


Figure 1 : profil microdensitométrique

1.5 Numérisation des radiographies

Pour cette étape nous utilisons un scanner commercial de bonne qualité et nous travaillons à une résolution de 1000 pixels par pouce, ce qui donne une mesure de densité environ tous les 25 microns. L'image est ensuite traitée à l'aide de Windendro, logiciel commercial Canadien.

Après calibrage par rapport à la cale étalon, le profil microdensitométrique est dressé le long d'un chemin dont la largeur est déterminée par l'opérateur. Le logiciel propose des limites de cerne qui peuvent être corrigées par l'opérateur. Ce profil de densité est ensuite sauvegardé dans un fichier informatique indiquant des valeurs de densité.

1.6 Réalisation du profil microdensitométrique

Les valeurs de densité sont exploitées avec un programme informatique qui permet de calculer certaines variables du cerne telles que : la densité moyenne du cerne, la densité maximum du bois d'été, la densité minimum du bois de printemps etc. (**figures 1 et 2**)

Ces variables servent à étudier la qualité du bois et/ou la réponse de l'arbre aux variations de son environnement, en particulier du climat.

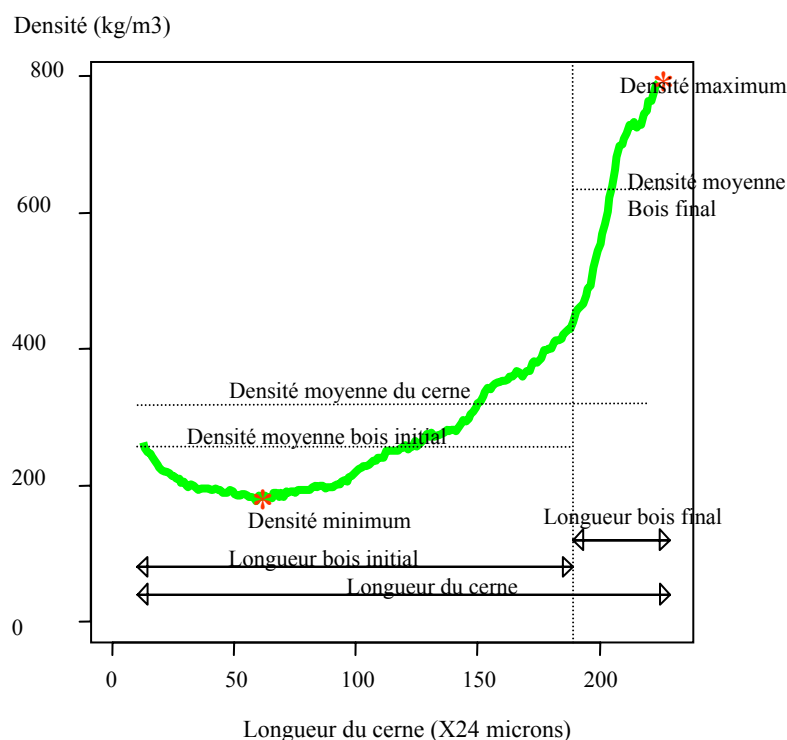


Figure 2 : Principaux paramètres intra-cerne

2. Résultats et exemples d'application

Grâce à son excellent compromis quantité-qualité de l'information / coût d'obtention, la microdensité est utilisée en amélioration génétique des arbres forestiers. Les résultats accumulés depuis des dizaines d'années montrent que la densité moyenne du cerne est un caractère à la fois moins variable et plus fortement contrôlé génétiquement (plus héritable) que la croissance en diamètre ou hauteur. D'autres résultats mettent en évidence que, dans le cerne, la densité de la zone de bois initial est souvent plus héritable que la densité de la zone de bois final. Enfin, le niveau de densité atteint localement dans le cerne par le bois formé en réaction à des conditions climatiques changeantes (favorables ou défavorables) en cours de saison de végétation semble très inégalement héritable.

Par ailleurs, la microdensitométrie montre la réaction des arbres aux variations climatiques. Ainsi lors d'une étude sur des sapins de Douglas de la forêt d'Orléans, on a observé le côté atypique du cerne formé durant la canicule 2003. Ce cerne entouré, en vert sur la **figure 3** est nettement plus étroit que le précédent et le suivant. Son bois final est plus étroit et moins dense car, cette année-là, la croissance de cet arbre s'est arrêtée beaucoup plus tôt que les années précédentes et que les suivantes.

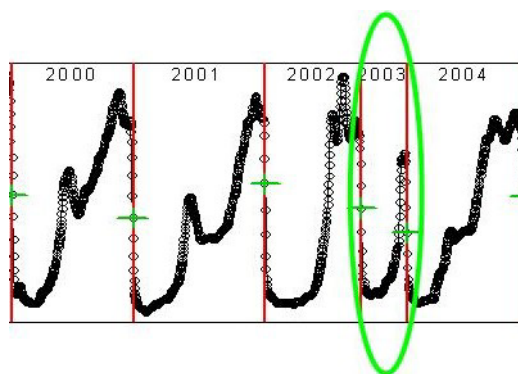


Figure 3 : Profil microdensitométrique de sapin de Douglas ayant subi la canicule 2003

Conclusion et perspectives

La technique de microdensitométrie pourrait être améliorée dans un proche avenir. Les échantillons de bois seraient numérisés grâce à un scanner incorporé à la source de rayons X. Nous supprimerions donc le développement de la radiographie et sa numérisation. A l'heure actuelle les appareils vendus dans le commerce ne répondent pas à notre attente.

Bibliographie

- Mothe F, Duchanois G, Zannier B, Leban JM (1998) Microdensitometric analysis of wood samples: data computation method used at INRA-ERQB (CERD programme). *Annales des Sciences Forestières* 55 (3) : 301-313
- Rozenberg P, Franc A, Cahalan C (2001) Incorporating Wood Density in Breeding Programs for Softwoods in Europe: a Strategy, and Associated Methods, *Silvae Genetica*, 50, 1, 1-7.
- Polge H (1966) Etablissement des courbes de variations de la densité du bois par exploration densitométrique de radiographies d'échantillons prélevés à la tarière sur des arbres vivants. Application dans les domaines technologiques et physiologiques. Thèse de doctorat, Université de Nancy, 206 p

Extraction de systèmes racinaires complets d'arbres en forêt avec une lance à air comprimé

René Canta¹²

Résumé : *Nous décrivons ici une méthode d'extraction du sol, du système racinaire d'un arbre forestier avec une lance à air « Supersonic dielectrik Soil Pick ». Le principe général est de creuser une fosse d'accès encerclant la souche de l'arbre sur un rayon voisin de la longueur des plus grandes racines traçantes, de désagréger la terre à partir du fond de fouille avec la lance à air, puis d'enlever la terre par jet sur berge.*

Cette technique a été appliquée sur des hêtres d'âge compris entre 10 et 175 ans (pour une biomasse racinaire sèche totale comprise entre 50 g et 450 kg). Les très bons résultats obtenus sur les souches d'une vingtaine de hêtres de la forêt domaniale de Hesse en Moselle, confirme qu'elle est bien adaptée à l'étude de la biomasse racinaire. Elle nécessite assiduité et persévérance car le temps d'extraction d'un système racinaire peut être très long de quelques heures à plusieurs semaines suivant la taille des arbres.

Mots clefs : Racines, biomasse, extraction, lance à air comprimé, compresseur

Introduction

La méthode d'extraction de systèmes racinaires présentée a été développée dans un programme de recherche concernant la croissance du hêtre. Celui-ci portait sur l'étude de la biomasse et de son accroissement existant entre les différents compartiments de l'arbre (houppier, tronc et système racinaire). Nous avons adapté la technique d'extraction à des arbres de tailles variées, fonction de leur âge, statut social et concurrentiel.

La méthode d'extraction repose sur le dégagement de la terre enserrant le système racinaire, à l'aide d'une lance à air comprimé du modèle « Supersonic dielectrik soil pick ». Après un premier essai sur un frêne croissant sur un sol brun calcique, nous avons très rapidement compris les limites de cette technique. En effet, le jet d'air comprimé devient totalement inefficace sur un horizon argileux.

A la suite des acquis de cette première expérience nous avons appliqué la méthode sur les sols limoneux en forêt domaniale de Hesse en Moselle. Lors des essais sur des hêtres chablis après la tempête de décembre 1999, nous avons amélioré la technique et envisagé l'extraction de systèmes racinaires entier d'arbres sur pied de ce même massif. Nous avons effectué cette opération sur une vingtaine d'arbres dont la circonférence à 1,30 m était comprise entre 4 cm et 198 cm, leur hauteur totale entre 2 m et 40 m et les profondeurs moyennes d'enracinement de 80 cm à 140 cm.

¹² UMR.LERFOB INRA- Equipe « Croissance » -54280Champenois- ☎ 03 83 39 41 07 rene.canta@nancy.inra.fr

1 Matériel et méthodes

1.1 Le matériel utilisé est une lance à air alimentée par un compresseur de chantier, «Supersonic dielectrik soil pick», composée d'un bloc «poignée pistolet» et d'un tube de 1,07 m de long se terminant par un orifice de 8 mm de diamètre par où s'échappe un jet d'air comprimé à haute pression, Ce jet est propulsé à la vitesse de 2 375 km/heure. Lors du maniement de ces matériels les personnes portent des protections individuelles : casque anti-bruit, lunettes de protection et chaussures de sécurité.

1.2 Procédé d'extraction

1.2.a Délimitation de l'aire d'intervention

Après avoir coupé et évacué l'arbre du chantier, on procède au décapage de surface avec la lance à air pour dégager les feuilles mortes, les cailloux et autres obstacles comme les branchettes ainsi que les ronces et leurs racines qui sont systématiquement arrachées.

Ensuite, à partir de la souche, on dégage en surface la plus grosse racine et on la suit jusqu'à son extrémité pour définir approximativement la zone d'extension du système racinaire.

1.2.b Creusement d'une fosse circulaire

On trace un cercle ayant pour centre la souche de l'arbre et pour rayon, la longueur théorique de la racine. Il sert de base au creusement avec une mini pelle mécanique, d'une fosse circulaire de 60 cm de large et de profondeur comprise entre 80 cm et 140 cm limitée par l'apparition d'un horizon argileux. La terre extraite est sortie de l'enceinte.

1.2.c Le dégagement du système racinaire est l'étape suivante qui consiste à désagréger la terre avec la lance à air ; on commence à la base de la fosse et en direction de la souche. La terre ainsi émiettée est jetée sur le bord extérieur à la pelle à main pour laisser le fond de la fouille toujours dégagé.

Au fur et à mesure de leur dégagement les racines sont attachées ensemble pour être relevées et fixées au chevalement préalablement installé ; ainsi, on évite de sectionner des racines lors de l'enlèvement de la terre.

On procède à l'aide de deux lances à air pour améliorer l'efficacité du travail. Pour préserver les racines fines, il ne faut pas insister sur un même segment car il y a risque d'arrachement, notamment lorsque le sol n'est pas suffisamment ressuyé. La distance d'action de l'orifice de la lance au sol, est comprise entre 1 et 10 cm.

Il est tout à fait possible, lorsque le travail de sape est bien avancé, de passer à l'action par le dessus. Cependant, la présence d'un « paillason » très dense de racines fines dans l'horizon supérieur rendra l'action de la lance moins efficace. L'idéal est de remonter du fond de la fosse vers la base du « paillason », puis de relever les racines ainsi dégagées avant d'intervenir par le dessus.

Sur un sol filtrant, une action courte sur la gâchette permet de désagréger la terre autour des racines, sur une dizaine de cm d'épaisseur.

Lorsqu'une zone résiste à l'action de la lance, le mieux est de contourner cette zone et de reprendre un peu plus loin. Ceci est valable en présence de cailloux de toutes tailles, qui, en se disjoignant, peuvent provoquer l'effondrement de tout un pan du front de fouille.

Durant toute la phase de dégagement des racines traçantes, il sera nécessaire, en cours d'extraction, de couper les racines des arbres voisins mélangées au système racinaire et qui se dirigent vers la souche. Elles seront dégagées et séparées de celles de l'arbre étudié durant la phase suivante de préparation au lavage.

Remarque : Pour les très gros systèmes racinaires, on intervient avec une pelle mécanique de 20 ou 30 tonnes sur chenilles équipée d'un godet étroit et orientable pour creuser en profondeur et pour dégager les racines pivotantes. La terre est tellement compactée au niveau des racines pivotantes, notamment à la verticale du tronc de l'arbre, qu'il devient impossible d'intervenir avec la lance à air. Dans ce cas, la souche est attachée à l'aide de chaînes à la flèche ou au godet de la pelle mécanique pour être extraite de la fosse par soulèvement.

1.2.d La finition du travail de dégagement s'effectue après l'extraction complète du système racinaire pour libérer les racines traçantes de la terre qui les emprisonne encore, soit à lance soit à l'aide d'un outil de type gros tournevis. Ainsi tout en limitant l'exportation de la terre résiduelle on allège la souche avant son transport vers l'aire de lavage extérieure à la forêt.



Photos : Quelques étapes successives de l'extraction de la souche d'un hêtre âgé de futaie.¹³ (âge : 175 ans, hauteur totale : 33 m, circonférence à 1,30 m : 94 cm.)

1.2.e Le lavage des racines se fait au jet d'eau à pression domestique, de préférence par temps pluvieux et à l'abri du soleil pour éviter le dessèchement. Pour les grosses racines pivotantes on peut utiliser un nettoyeur à haute pression, en veillant à ne pas décaper l'écorce et à ne pas arracher les racines fines ; pour les petits systèmes racinaires, l'idéal est de les immerger quelques jours de manière à détremper la terre résiduelle qui s'enlèvera alors facilement sous l'action d'un simple jet d'eau fin.

¹³ On voit sur les photos les outils indispensables pour exécuter ce travail : protections individuelles de sécurité, compresseur, lance à air, pelles, ainsi que chevalement pour relever les racines et pour dégager le système racinaire par dessous.

Conclusion

Avec cette technique d'extraction mise en œuvre à bon escient, on extrait la quasi totalité de la masse racinaire car on préserve les racines dont les diamètres avoisinent le demi millimètre contrairement à la technique utilisant des nettoyeurs à haute pression.

Cette technique a ses inconvénients, comme la fatigue due au bruit, à l'effort physique et à l'attention soutenue ; ceci implique des relais dans les postes de travail de 15 à 20 minutes. Par ailleurs, le temps d'extraction est très dépendant de la taille de l'arbre. Pour une équipe de trois personnes dynamiques, il faut de 2 à 3 heures pour extraire le système racinaire d'un arbre de 10 cm de circonférence, 1 jour pour celui d'un arbre de 25 cm de circonférence et de 1 à 2 semaines pour celui d'un arbre de 100 cm de circonférence.

Remerciements

Nous remercions les personnes qui ont participé à ces travaux d'extraction des systèmes racinaires : Frédéric Bordat, Sébastien Daviller, Guillaume Gotz, Noël Le Goff et Guy Maréchal.

Bibliographie

Ottorini JM, Le Goff N (1999) Etude de la croissance du Hêtre sur le Plateau lorrain. Rapport scientifique final, Convention ONF-INRA n°1165B, Juillet 1999, 18pp.

Le Goff N, Ottorini JM (2003) Biomass and biomass increment of Beech in the State Forest of Hesse (NE France), Rapport d'avancement, CarboEuroflux, WP4 "Carbon stock changes versus fluxes", Janvier 2003, 3 pp.

Le Goff N, Ottorini JM (2001) Root biomass and biomass increment in a beech (*Fagus silvatica* L.) stand in North-East of France, *Ann. For. Sci.* 58, 1-13.

Données techniques

Spécifications techniques concernant le modèle de lance à air utilisée : MODEL SP-125		
Type du matériel	Supersonic dielectrik Soil Pick	
Référence du modèle	model SP-125	
Poids	6.5 lb	3 kg
Longueur totale	52 in	132 cm
Diamètre du tube	1.25 in.	3 cm
Vitesse de sortie de l'air	1475 mph	2375 km/h
Distance d'efficacité	4 in	10 cm
Débit d'air	125 cfm	3540 l/min
Pression à la gâchette	100 psi	6.9 bar
Type de connecteur rapide	3/4 in	2 cm
Longueur du tube	42 in	107 cm

Localisation spatiale fine de ligneux en milieu forestier Comment procéder de manière précise et dans des délais acceptables ?

¹⁴ Jérôme Willm, Laurent Burnel

Résumé : Les bois des coteaux de Gascogne sont originaux : de taille réduite, souvent privés, morcelés et diversifiés, ils ont des rôles importants dans les territoires ruraux notamment comme refuge pour la biodiversité et source de revenu. Leur caractérisation est complexe, particulièrement pour la mise en évidence des relations entre la répartition spatiale des arbres et les autres facteurs de variations. Ceci implique de réaliser la cartographie des ligneux sur des surfaces variables, dans des conditions forestières denses donnant peu de visibilité. Les techniques existantes sont peu adaptées au milieu forestier et insuffisamment précises ; aussi nous travaillons depuis 4 ans dans plusieurs bois avec une technique alternative utilisant un télémètre laser, une boussole magnétique et un dendromètre à ultrasons qui répond à nos besoins en termes de précision et de faisabilité.

Mots clés : Localisation spatiale, forêt, ligneux, cartographie, dendromètre à ultrasons, télémètre laser, boussole magnétique, GPS

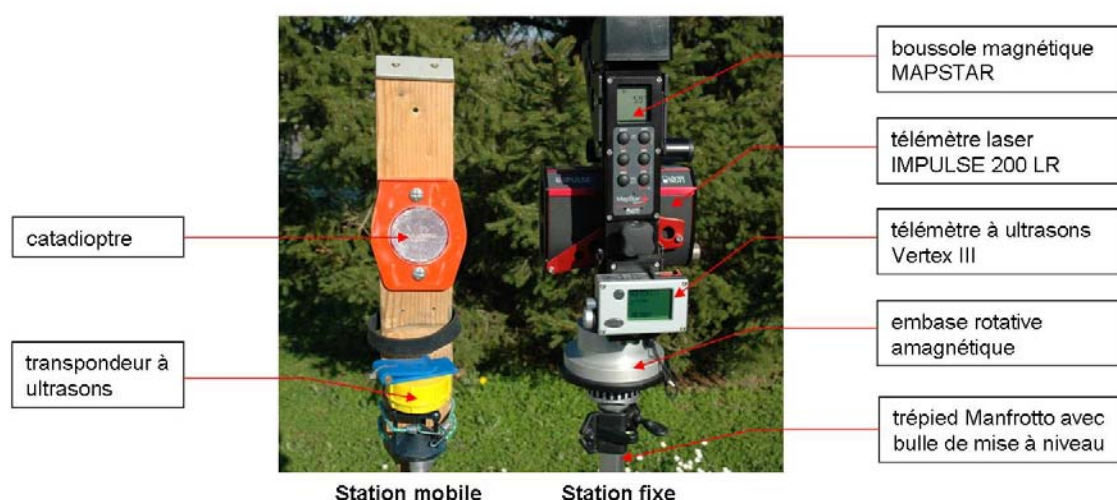


Photo 1 : la station de mesure comprend 7 éléments

Introduction

Les bois des coteaux de Gascogne étudiés par l'UMR Dynafor¹ se distinguent du reste de la forêt française ; ils sont en majorité privés¹⁵, souvent d'une superficie inférieure à 10 hectares, morcelés, diversifiés et dispersés en îlots boisés dans les paysages, ils sont appelés à jouer un rôle important dans la gestion des territoires ruraux notamment comme réserve de biodiversité et source de revenu. Leurs originalités les rendent complexes à caractériser, surtout lorsqu'il s'agit de mettre en évidence des relations entre la répartition spatiale des arbres et certains facteurs de variations telles que la gestion forestière ou encore la variabilité du sol. La cartographie doit donc indiquer la position individuelle de chaque ligneux et cela, sur une

¹⁴ UMR INRA / INP-ENSAT- DYNAFOR, Dynamiques forestières dans l'espace rural - BP 52627
31326 Castanet-Tolosan ☎ 05 61 28 54 98 Jerome.Willm@toulouse.inra.fr, Laurent.Burnel@toulouse.inra.fr

¹⁵ 82% de la forêt en Midi Pyrénées appartient à des propriétaires privés

surface étudiée de quelques dizaines de mètres carrés à plusieurs hectares, dans des conditions forestières denses donnant peu de visibilité.

Les techniques existantes sont peu nombreuses, peu adaptées au milieu forestier et insuffisamment précises : par exemple, le GPS en forêt laisse une imprécision aléatoire de 10 à 15 m, améliorable par correction différentielle mais insuffisante pour nos besoins ; le théodolite a une visée optique trop grossissante qui n'est pas adaptée aux visées proches dans un milieu encombré. Nous proposons ici une technique alternative utilisant des appareils mieux adaptés au milieu forestier touffu, d'une précision décimétrique et nécessitant une mise en œuvre raisonnable en moyens humains et matériels.

1. Matériels et méthodes

La station de mesure (**photo 1**) comprend 7 éléments. Les 3 appareils de mesure sont décrits dans le **tableau 1** ; la précision obtenue par ces appareils est supérieure à celle requise par le protocole de recherche : des vérifications au décamètre ont montré une marge d'erreur inférieure à 2%.

Désignation	Fonction	Marque	Modèle	Résolution
boussole	mesure de l'azimut	Laser Technology	Mapstar	1/10ème de degré
télémètre laser (fonction inclinomètre)	mesure de la pente*	Laser Technology	Impulse 200 LR	1/100ème de degré
dendromètre à ultrason	mesure des distances	Haglöf	Vertex III	décimétrique, portée d'environ 25 mètres

* la mesure de la pente correspond à la différence d'altitude entre la station fixe et la station mobile

Tableau 1 : caractéristiques des 3 appareils de mesure

Remarque : La mesure de la pente, relevée au télémètre laser, n'est pas utilisée dans les résultats présentés ci-après. Avec cette valeur nous pourrions élaborer une carte en trois dimensions représentant les micro variations topographiques de la parcelle ainsi qu'une cartographie en projection horizontale après correction.

1.1 Matérialisation de la zone à cartographier

Nous choisissons entre 2 méthodes de cartographie en fonction de la surface du bois et du nombre d'individus à localiser (**figure 1**).

1.1.a La 1^{ère} méthode consiste à quadriller la surface totale du bois par un maillage et à utiliser les intersections des carrés comme points de station sur lesquels sera positionnée la station fixe. Nous avons utilisé cette méthode pour cartographier un nombre réduit de chênes adultes répartis sur la surface entière d'un bois.

Ses avantages

- la couverture systématique du bois sans risque d'oubli de zones à cartographier,
- la possibilité de positionner d'autres travaux de recherche dans ce quadrillage par une matérialisation durable des points d'intersection,
- la conversion plus aisée des coordonnées polaires en coordonnées cartésiennes.

Ses inconvénients

- le temps nécessaire à quadriller l'ensemble du bois est de un à plusieurs jours ;
- *a priori*, il n'y a pas de liberté de positionnement des points de station en fonction de l'état du terrain : roncier, trou, arbre, etc. Néanmoins il est possible de faire un report, mais cela est délicat.

1.1.b La 2^{ème} méthode consiste à cartographier les ligneux sur une surface continue sous forme de bande ou de placette, puis à reporter les points de station au fur et à mesure de la progression dans le bois. Nous l'avons utilisée pour des surfaces échantillon de bois avec un inventaire exhaustif des individus à localiser, comme par exemple tous les ligneux d'une hauteur supérieure à 2 mètres.

Ses avantages

- le gain de temps car il n'y pas de quadrillage à réaliser ;
- le choix libre des points de station dans la zone de portée des appareils de visée.

Ses inconvénients

- l'absence de repères cartographiques pour d'autres travaux sur la même parcelle,
- la conversion moins aisée des coordonnées polaires en coordonnées cartésiennes,
- la nécessité de marquage des objets déjà repérés.

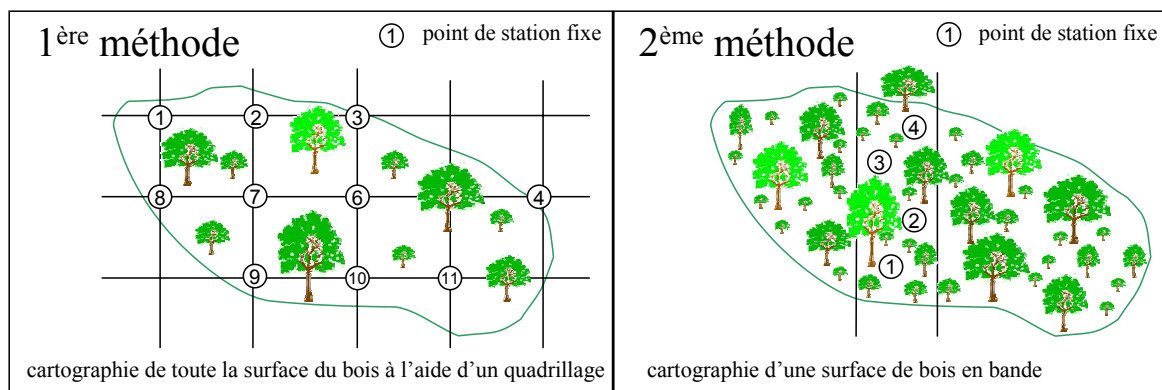


Figure 1 : les deux méthodes de cartographie utilisées.

1.2. Mise en oeuvre des appareils

1.2.a Mise en station des appareils

Les appareils émetteurs en station fixe : la boussole et le télémètre sont fixés sur une embase rotative amagnétique en aluminium, elle-même vissée sur le trépied. La station doit être à l'aplomb du point de station prédéfini ou choisi sur le terrain, grâce à un niveau à bulle et au fil à plomb. Le dendromètre à ultrasons est utilisé depuis le point de station.

Les appareils récepteurs mobiles : le transpondeur du dendromètre à ultrasons et le catadioptré du télémètre laser sont positionnés devant chaque individu. Pour faciliter leur manipulation, nous les avons fixés sur un même support. Le transpondeur est placé à une hauteur de 1,30 m conformément aux prises de mesures et le catadioptré à la même hauteur que le point central de fixation du télémètre laser.

Remarque : Deux personnes sont nécessaires pour réaliser les relevés cartographiques.

1.2.b Mesures

La position de chaque individu est déterminée par 2 coordonnées polaires et un paramètre de pente à partir du point de station fixe ;

- un **azimut (α)** exprimé en degré : angle horizontal α indiqué par la boussole magnétique entre le nord magnétique et l'individu visé, à partir de la station fixe,
- une **distance (d)** réelle, exprimée en mètre : distance mesurée au dendromètre à ultrasons entre le point de la station fixe et l'individu,
- un **angle vertical** exprimé en degré : pente mesurée par l'inclinomètre du télémètre laser entre le point de station fixe et l'individu en visée parallèle au sol.

Remarque : L'ultrason est plus adapté que le laser en milieu forestier parce qu'il permet une meilleure transmission à travers la végétation touffue, alors que le laser est intercepté au moindre obstacle rencontré.

Enfin, les mesures sont récoltées et enregistrées sur un appareil de saisie portable. Des mesures dendrométriques sont également possibles pour caractériser chaque individu localisé.

1.3. Conversion de coordonnées polaires (d et α) en coordonnées cartésiennes (x,y puis X,Y) dans un repère orthonormé sans tenir compte de la pente

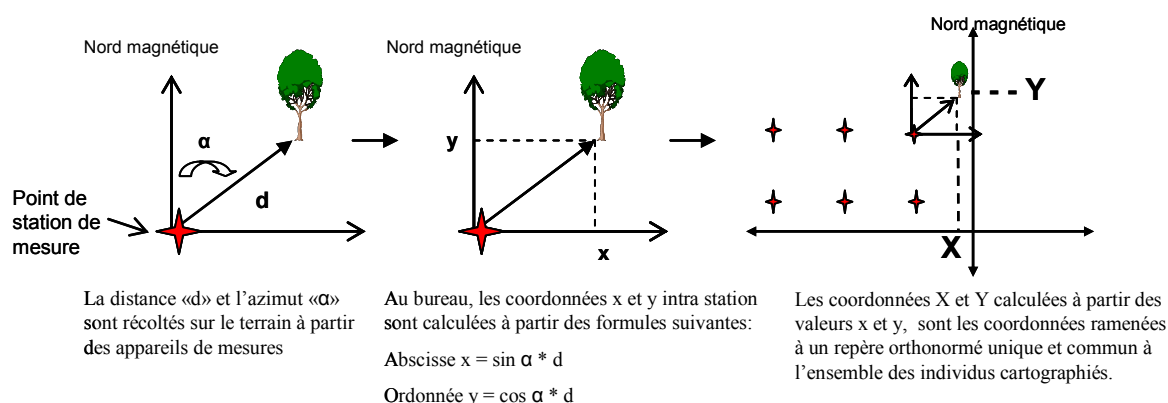


Figure 2 : étapes méthodologiques du relevé de terrain à la conversion des coordonnées

2. Résultat et exemples d'application

Le résultat de la cartographie se présente sous forme d'une carte de répartition des ligneux (figure 3). Dans notre exemple, il s'agit de 2 bandes perpendiculaires de bois où chaque ligneux est représenté par un cercle proportionnel à son diamètre. Chaque couleur correspond à une espèce d'arbre. Nous indiquons dans le tableau 2 le temps passé dans les bois déjà étudiés. Ces indications sont dépendantes du type de protocole de mesure, de la quantité de ligneux cartographiés et de la structure du bois.

Nom du bois	Surface du bois ou de la zone cartographiée	Mesures dendrométriques	Nombre d'individus cartographiés	Nombre d'hommes jours
Saint-André n°1	0,3 ha	oui	1271	36
Saint-André n°2	0,33 ha	oui	759	20
Eoux	0,44 ha	oui	1090	24
Paguère	11,5 ha	non	215	20
Briouant	1,7 ha	non	798	10

Tableau 2 : tableau indicatif du temps passé dans différents bois

Conclusion et perspectives

Cette technique a répondu à nos besoins de cartographie d'arbres en termes de précision et de faisabilité ; nous l'avons pratiquée et validée depuis 4 ans dans 4 bois différents. Elle est utilisable dans d'autres structures forestières pour les mêmes besoins de cartographie.

Il est possible d'adapter un système de mini stations combinant un télémètre à ultrasons, une boussole et un dendromètre de type SUUNTO pour réaliser les mêmes relevés de coordonnées polaires. D'un coût inférieur à 2000 euros, légères, et utilisant des appareils classiques connus des forestiers, ces mini stations mériteraient d'être testées.

Enfin, d'autres pistes restent à explorer sur l'utilisation d'appareils fonctionnant avec d'autres procédés physiques comme les ondes radar, les ondes radio ou encore le champ magnétique dans le cas où ces procédés permettraient aux appareils d'augmenter leur portée et de diminuer le report successif des points de stations.

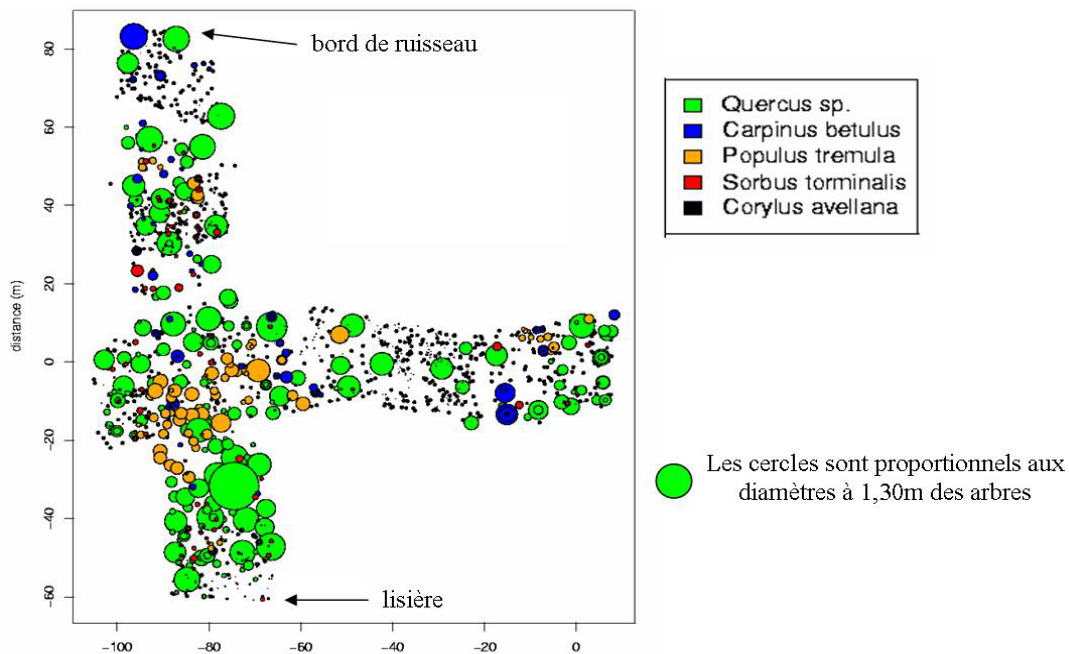


Figure 3 : Carte de répartition des ligneux

Bibliographie

Piedallu C, Gégout JC (2002) Etude de la précision du système GPS en milieu forestier, RFF n° LIV - 5 -p. 429-442.

Nguyen The N, Ginet C, Giraud A, Bouvet A (2004) Calcul des surfaces. Atouts et limites des récepteurs GPS Grand public, RFF n° LVI - 6 -, p. 529-536.

Cabanettes A (2005) Protocole de cartographie des ligneux au bois Paguère, DYNAFOR document interne, code AQR : PRE-ACD-CAL-01.

Willm J (2002) Instruction d'utilisation de la boussole magnétique et du télémètre laser en cartographie des ligneux, DYNAFOR, document interne, code AQR : INS-MAT-CAL-01.

**Méthodes d'observation
des populations et des communautés en milieu naturel**

Identification par le marquage des poissons

Quelques exemples utilisés en écologie aquatique

Nicolas Jeannot¹⁶, Frédéric Marchand¹⁷

Résumé : *Pour étudier les populations de poissons, il faut pouvoir identifier, le groupe d'individu (lot) et l'individu lui-même. Des systèmes de marquage ont été imaginés et commercialisés. Nous présentons une liste non exhaustive des principales marques qui vont de l'ablation au tatouage en passant par les implants et les puces électroniques. Nous développons dans cet article un système de marquage par tatouage utilisé par l'Inra de Pont-Scorff, qui est un compromis entre le marquage de masse et le marquage individuel.*

Mots clés : Poissons, Marquage, Tatouage.

Introduction

L'étude des populations de poissons passe par leur reconnaissance dans le temps. Il est donc nécessaire d'identifier les poissons individuellement ou en groupe grâce au marquage. Les techniques de marquage des animaux imaginées et développées sont multiples mais la taille des poissons ainsi que leur milieu conditionnent leurs performances. Des techniques peuvent être traumatisantes aussi le bien-être de l'animal oriente le choix du marquage à retenir.

Suivant les besoins et les niveaux de reconnaissance, le marquage dit « de masse » permettra de reconnaître un lot alors que des marques individuelles différencient chaque animal. Enfin les marques peuvent être visibles à l'œil nu ou lues à plus ou moins longue distance à l'aide de détecteur.

Dans un premier temps, nous ferons une liste non exhaustive des différentes marques utilisées pour les poissons. Ensuite nous présenterons, à titre d'exemple, un système utilisé dans notre unité. Enfin nous conclurons sur les limites de ces techniques, le coût et la technicité à mettre en œuvre.

1. Le marquage des poissons

Suivant les besoins des études pour le suivi des populations de poissons, il est nécessaire d'identifier *a posteriori* des lots de poissons. Un marquage identique de chaque individu du même lot suffira, on parle de marquage de « masse »

¹⁶ INRA – Unité expérimentale Ecologie et Ecotoxicologie Aquatique – Station du Moulin des Princes - 56620 Pont-Scorff
☎ 02 97 32 54 29 nicolas.jeannot@wanadoo.fr

¹⁷ INRA – Ecologie et Ecotoxicologie Aquatique – 65, rue de St Briec – 35042 Rennes Cedex
☎ 02 23 48 57 86 Frederic.Marchand@rennes.inra.fr

1.1 Les marquages de masse

Beaucoup de techniques ont été mises en place pour identifier des groupes de poissons, parmi celles-ci, on trouve :

1.1.a Les ablations de nageoires sont souvent utilisées. On choisira des nageoires non motrices de préférence (pelviennes et adipeuses chez les salmonidés) afin de ne pas affecter la nage. Les nageoires pourvues de rayons repoussent dans la plupart des cas. L'ablation totale des pelviennes laisse réapparaître une nageoire absente ou déformée. L'ablation de la nageoire adipeuse (salmonidés) est généralement utilisée pour une identification à long terme (poissons de repeuplement par exemple). Cette petite nageoire ne repousse pas contrairement aux pelviennes (**photo 1**).



Photo 1

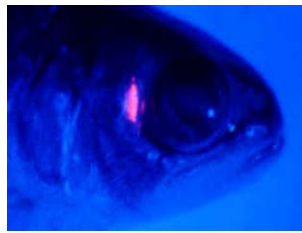


Photo 2



Photo 3

1.1.b Les brûlures sont parfois pratiquées en utilisant de la chaleur (fer à souder) ou du froid (Cryomarquage). On applique au fer chaud ou froid, un symbole (croix, rond) sur le flanc, le dos ou le ventre du poisson afin de créer une lésion par brûlure du derme. La cicatrice reste visible à long terme mais ces techniques très « traumatisantes » provoquent des plaies importantes. Elles sont de moins en moins utilisées.

1.1.c Les injections colorées (**photo 2**) permettent par l'injection de peinture, élastomère colorés et/ou phosphorescente de révéler le marquage du poisson (révélation sous ultraviolet).

1.1.d Le tatouage au Dermojet, (**photos 13, 14**) permet d'injecter un jet de produit colorant sous pression. (Cf. § 2).

1.1.e Les antibiotiques sont parfois utilisés pour marquer les œufs ou alevins par baignade (trempage) dans une solution d'antibiotique (tétracycline). La relecture se fait à partir des otolites, structures osseuses situées dans l'oreille interne du poisson où se fixe la coloration. Dans ce cas, le poisson est euthanasié.

1.1.f Les chocs thermiques : méthode décrite dans l'article suivant (Parade et Beall, 2006)

1.2 Le marquage individuel répond à des besoins d'identification plus précis en utilisant des marques telles que :

1.2.a Les agrafes (**photo 3**) fixées et insérées sous les rayons de la nageoire dorsale, à l'opercule ou au maxillaire supérieur, permettent une identification individuelle (numéro, lettre). Elles sont de moins en moins utilisées car elles ouvrent des voies de pénétration (blessures) aux agents pathogènes. Ces marques ne sont pas adaptées aux poissons de petites tailles.

1.2.b Les Floy Tags sont de petites étiquettes, de formes différentes (rondes, plates, en forme de spaghetti) et reliées au poisson par une accroche. On fixera ces étiquettes en perforant les tissus (sous la dorsale généralement). Elles sont équipées d'un arpon, qui logé sous le derme, évite l'arrachement de la marque.

1.2.c Un implant magnétique numéroté (photos 4, 5 et 6) est inséré dans la partie supérieure de la tête du poisson. La détection visuelle est impossible et seule, l'utilisation d'un détecteur spécifique permet de détecter le magnétisme de l'implant. Pour une identification individuelle, l'extraction, donc l'euthanasie est nécessaire pour la lecture du numéro. Le matériel de pose et de contrôle des marques est très coûteux.



Photo 4



Photo 5



Photo 6

1.2.d Les implants visibles (photo 7) sont de petites étiquettes insérées sous le tégument dont les lettres et chiffres sont lisibles par transparence et facilement décelables pour les modèles phosphorescents.

Photo 7



1.2.e Les PIT tags (Passive Integrated Transponder) (**photos 8, 9 et 10**) sont de plus en plus utilisés pour l'identification des animaux. Cette petite capsule de verre enferme une puce inerte qui permet une identification individuelle. La lecture se fait à distance variable de quelques centimètres à quelques mètres pour les plus grosses puces à l'aide de détecteurs spécifiques. L'utilisation dans beaucoup de domaine d'application a diminué les prix (< 2€ l'unité).



Photo 8



Photo 9



Photo 10

1.2.f Les émetteurs sont utilisés pour des études comportementales des poissons, permettant ainsi une localisation spatiale des poissons équipés. La taille de ces émetteurs varie avec la durée de vie de l'émetteur. La pile étant le facteur limitant. Les distances de détection peuvent atteindre plusieurs centaines de mètres.

2. Le marquage des saumons adultes par *tatouage au Dermojet s*, exemple d'utilisation

Le dispositif de contrôle de la station du moulin des Princes, sur le fleuve Scorff en Bretagne Sud, est un dispositif de piégeage partiel des poissons migrateurs (juvéniles migrants et adultes qui remontent). Afin d'estimer la population totale de saumons adultes qui remontent, on marque la fraction piégée. La fraction non marquée est estimée à partir des informations collectées issue :

- de la pêche de loisir,
 - des mortalités naturelles et/ou accidentelles,
 - des contrôles nocturnes effectués durant la période de reproduction du saumon sur les frayères.
- Le procédé de marquage choisi a été le tatouage. Chaque semaine, les saumons capturés se voient attribuer des points bleus sur leur ventre correspondants à un code semaine de passage au piège.

2.1 Matériels

- Un vaccinateur sans aiguille (injection de solution sous pression) type « Dermojet »,
- Un embout mono point pour réaliser un point d'injection,
- Un embout 7 points pour réaliser une tache de 7 points d'injection,
- Une solution alcoolique de bleu alcian 8 GX (2g à 4 g/ 50 ml alcool 70°).

2.2 Méthodes

Par l'injection de solution de bleu alcian dans le derme du poisson, on obtient un point bleu (« spot ») large de 3 mm environ (**photo 11**). Nous utilisons en complément un embout 7 points (**photo 12**) pour injecter le colorant sous forme de rosace de la taille d'une pièce de 2 € (identification immédiate).



Photo 11

Photo 12

Nous avons recherché à obtenir un « codage » sur le ventre du poisson permettant une différenciation hebdomadaire avec au minimum 52 codes différents correspondant au numéro de semaine.

Dans un premier temps, nous avons défini le nombre d'emplacements (n) possible sur le ventre d'un poisson, puis nous avons utilisé les combinaisons mathématiques pour déterminer le nombre de codes possibles en fonction du nombre de points (p) à mettre en œuvre.

On note C_n^p le nombre de combinaison de p éléments parmi n. On a :

$$C_n^p = \frac{n!}{p!(n-p)!} = \frac{n(n-1)\dots(n-p+1)}{p(p-1)\dots 1}$$

La solution la mieux adaptée couvrant les 52 semaines est celle combinant 3 points et 8

emplacements. $C_8^3 = \frac{8!}{3!(8-3)!} = 56$

Le tableau ci-contre permet de choisir suivant les besoins, le nombre de combinaisons souhaité en fonction du nombre d'emplacements et des codes à 2, 3 et 4 chiffres :

	2 pots	3 spots	4 spots
6 emplacements	15	20	15
7 emplacements	21	35	35
8 emplacements	28	56	70
9 emplacements	36	84	126
10 emplacements	45	120	210

Définition des zones d'implantation pour la recherche d'un code semaine :

On a divisé le ventre du poisson en deux parties symétrique (**photo 13**). La tête du poisson vers la droite, le premier point en arrière de la pectorale droite pour le 1, le 2 au milieu, le 3 en avant de la pelvienne droite et le 4 derrière la pelvienne droite. Le 5 situé derrière la pectorale gauche et symétriquement en face du 1, le 6 en face du 2, le 7 devant la pelvienne gauche en face du 3 et le huit derrière la pelvienne gauche.

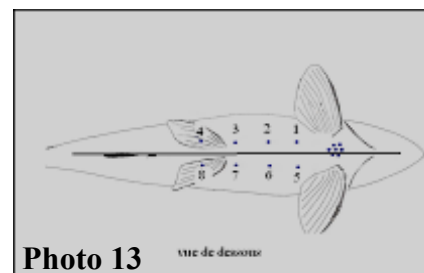


Photo 13

La semaine 1 peut être codifiée 123 (**photo 14**) et correspond à la première semaine de l'année, 124 la deuxième. La semaine 34 (**photo 15**) est codée 267...

L'ordre de lecture est important. Les chiffres des emplacements se lisent de manière croissante. Dans les combinaisons utilisant les chiffres 1, 2 et 3 (123, 231, 321, 132....), seul le code 123 est utilisé.

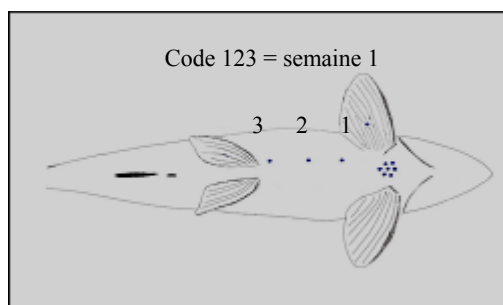


Photo 14

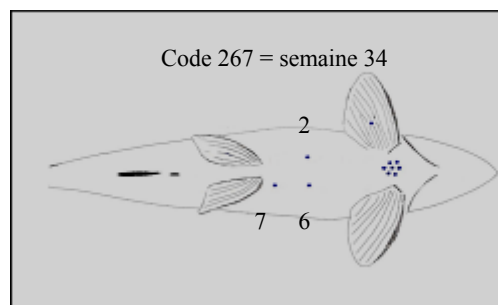


Photo 15

Conclusion

Depuis le début des recherches sur les poissons, l'identification de masse ou individuelle a progressé ; les techniques ont évolué tant sur le bien-être du poisson que sur la qualité de la marque. Cependant, au début de l'expérimentation, il faut marquer un grand nombre de poissons, car peu d'entre eux seront re-capturés. Les quantités de poissons à marquer et le coût du marquage individuel conditionnent le choix de la marque. Un deuxième problème, technique celui-là, est la taille minimale des poissons pouvant être marqués individuellement sans les euthanasier pour connaître leur numéro.

Le challenge est donc de trouver un produit peu coûteux et fiable pour individualiser les poissons vivants dès leur plus jeune stade.

L'identification des poissons est parfois délicate à mettre en œuvre et nécessite un savoir-faire pour assurer une bonne tenue de la marque mais également pour préserver au mieux l'intégrité des animaux. Si le marquage individuel répond bien aux besoins d'identification, le prix reste un facteur limitant.

Bibliographie

- Parade M, Beall E (2006) Marquage par chocs thermiques *in* Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques. *Le Cahier des Techniques de l'Inra*, Milieux naturels, 111-114.
- Bonneau JL, Thurow RF, Scarnecchia DL (1995) Capture, marking, and enumeration of juvenile bull trout and cutthroat trout in small, low-conductivity streams. *North American Journal of Fisheries Management* 15:563-568.
- Buckley RM, West JE, Doty DC (1994) Internal micro-tag systems for marking juvenile reef fishes. *Bulletin of Marine Science*, 55(2) :850-859.
- Champigneulle A, Escommel J, Laurent pH (1987) Magnétisées par injection de miromarques de taille de chevalier de d'ombles de Marquage petits (*alpinus de Salvelinus*) De. Armature Pêche de bull. *Piscic.* 304:22 - 31.
- Cristau-Quost I (1980) Essais d'étude comparative de différents types de marquage de poissons. Observations histologiques préliminaires de l'effet du cryomarquage. Thèse Doct. 3ème cycle Univ. Lyon I Ecologie fondamentale et appliquée aux eaux continentales. 1 vol., 643 pp.
- Haw F, Bergman PK, Fralick RA, Buckley RM, Blankenship HL (1990) Visible implanted fish tag. *American Fisheries Society Symposium* 7:311-315.
- Jones R (1979) Materials and methods used in marking experiments in fishery research. *FAO Fish. Tech. Pap.*, 190, 134 p.
- Parker NC, Giorgi AE, Heidinger RC, Jester DB, Prince ED, Winans GA (1990) Fish marking techniques. *Am. Fish. Soc. Symp.*, 7, Bethesda, Maryland USA, 1 vol, 879 pp.
- Wydoski R, Emery L (1983) Tagging and marking. In: *Fisheries techniques*, Nielsen L.A. and Johnson D.L. (eds), 215-237, Amer. Fish.Soc., Bethesda, Maryland.

Marquage par chocs thermiques

¹⁸ *Michel Parade, Eddy Beall*

Résumé : *La technique de marquage par chocs thermiques permet d'inscrire des bandes visibles sur les otolithes des embryons de poissons durant la période des stades "oeillé" et alevin vésiculé. Elle implique l'utilisation de chocs thermiques sans transition mais de faible amplitude (3 à 4 degrés C) ; son inconvénient est de devoir sacrifier le poisson recapturé pour l'analyse des otolithes.*

Mots clés : marquage, chocs thermiques, otolithe

Introduction

Les populations de poissons migrateurs, en particulier de salmonidés, déclinent dans de nombreuses régions du globe. Les habitats d'eau douce ou de la frange littorale disparaissent ou subissent des dégradations. Des stratégies de gestion ont été mises au point pour restaurer ou maintenir ces espèces à forte valeur symbolique et économique. Outre l'aménagement et la réhabilitation des habitats et les mesures réglementaires, la restauration des populations passe par des actions de repeuplement qui doivent être évaluées pour déterminer leur succès et pour informer sur les possibilités d'amélioration.

La méthode la plus directe pour mener ces évaluations consiste à marquer des groupes représentatifs de poissons pour déterminer leur survie, croissance, taux de migration et autres paramètres pertinents de la dynamique des populations. Cette approche a été largement suivie et a permis le développement des techniques originales pour les salmonidés et autres poissons (Rives 2006). Cependant, la plupart de ces techniques ne sont applicables qu'à des individus d'une taille supérieure à 5 cm, voire 8 cm ou plus et elles impliquent une manipulation génératrice de stress.

Or, il est nécessaire de marquer de façon permanente des poissons aux stades larve ou alevin, car les repeuplements sont pratiqués à ces stades précoces. Ces juvéniles dont la taille est inférieure à 40 mm, sont fragiles et facilement stressés ; par ailleurs on effectue le marquage sur de grandes quantités pour compenser les fortes mortalités auxquelles ils sont soumis à ces stades. La combinaison de ces deux facteurs a toujours rendu délicat le marquage des salmonidés juvéniles.

Des recherches sur des techniques originales pour marquer en masse des juvéniles, dès le stade de l'oeuf embryonné ou de l'alevin vésiculé, ont été développées à l'étranger (Behrens Yamada et Mulligan 1982 ; Volk *et al.* 1990 ; Schroder *et al.* 1996) et à l'Inra (Rojas Beltran *et al.* 1995 a, b ; Jeannot et Marchand 2006). Nous proposons d'adapter et de développer une méthode susceptible de marquer à moindre coût des nombres importants d'oeufs embryonnés ou d'alevins de truite.

¹⁸ INRA Station d'Hydrobiologie 64310 Saint-Pée-sur-Nivelle - ☎05 59 51 59 67 michel.parade@st-pee.inra.fr, eddy.beall@st.pee.inra.fr

1. Matériel et méthode

1.1 Site de l'étude : Les œufs de truites proviennent de la pisciculture de Lées-Athas, une unité expérimentale Inra de Saint-Pée-sur-Nivelles. Ce site se caractérise par une température froide et constante de l'eau proche de 7°C conférant des conditions idéales pour l'incubation des salmonidés et pour réaliser ce type d'expérience.

1.1.a Protocole de marquage : Les œufs ont éclos du 28 mars au 31 mars dans l'eau de source à 7,9°C. Le 31 mars au matin 6 lots de 600 alevins sont constitués. Pour marquer les poissons nous disposons de deux circuits d'eau maintenus à des températures constantes et différentes de 4°C. Pour cela un circuit thermorégulé, maintenant l'eau à 12°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) est installé dans la salle d'incubation. Les 6 lots d'alevins ont été introduits dans ce circuit le 31 mars à 17h.

Les lots sont constitués de la façon suivante :

Un lot témoin servira de référence avec des poissons non marqués, un lot témoin bougé mais non marqué permettra de voir une éventuelle incidence du déplacement sur la structure de l'otolithe, 4 lots (M1, M2, M3, M4) seront marqués par chocs thermiques.

Code M1	1 ^{er} CTh	3j	2 ^{ème} CTh	3j	3 ^{ème} CTh	3j	4 ^{ème} CTh	3j	5 ^{ème} CTh
Code M2	1 ^{er} CTh	4j	2 ^{ème} CTh	2j	3 ^{ème} CTh	2j	4 ^{ème} CTh	4j	5 ^{ème} CTh
Code M3	1 ^{er} CTh	2j	2 ^{ème} CTh	4j	3 ^{ème} CTh	4j	4 ^{ème} CTh	2j	5 ^{ème} CTh
Code M4	1 ^{er} CTh	5j	2 ^{ème} CTh	1j	3 ^{ème} CTh	1j	4 ^{ème} CTh	5j	5 ^{ème} CTh

Tableau 1 : Tableau représentant les différents codes, les chocs thermiques (CTh) et les intervalles entre les épisodes de marquage (nombre de jours).

Le marquage consiste à faire passer les clayettes contenant les lots d'alevins vésiculés du circuit d'eau réchauffé au circuit d'eau ambiante où ils sont plongés pendant 4 heures. Au terme de ce laps de temps, les clayettes sont replacées dans le circuit à 12°C.

2. Résultats

Les otolithes sont prélevés dans les poissons échantillonnés tout au long de l'expérimentation. La taille des otolithes est fonction de celle de l'individu. Elles sont de très petites tailles pour les très jeunes poissons et ne subissent aucun traitement avant leur lecture ; les otolithes sont simplement placées sur une lamelle dans une goutte de glycérine et lues sous le microscope. Pour les poissons plus âgés, la méthode de préparation des otolithes s'est faite par usure après inclusion de celle-ci dans un support en résine.

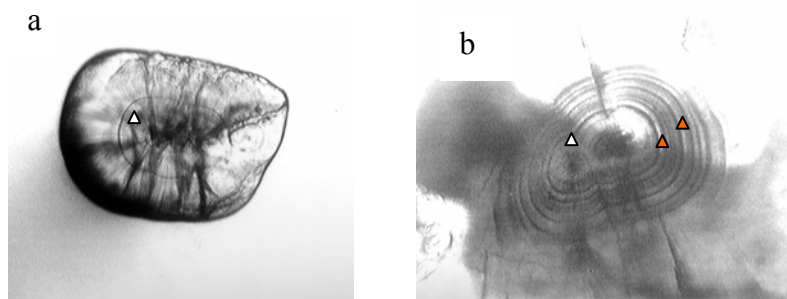


Figure 1 : Microphotographies d'une otolithe témoin (a) montrant l'anneau d'éclosion (Δ) et d'une otolithe marquée (b) avec l'anneau d'éclosion (Δ) et les marques induites par les chocs thermiques (\blacktriangle). Grossissement X20

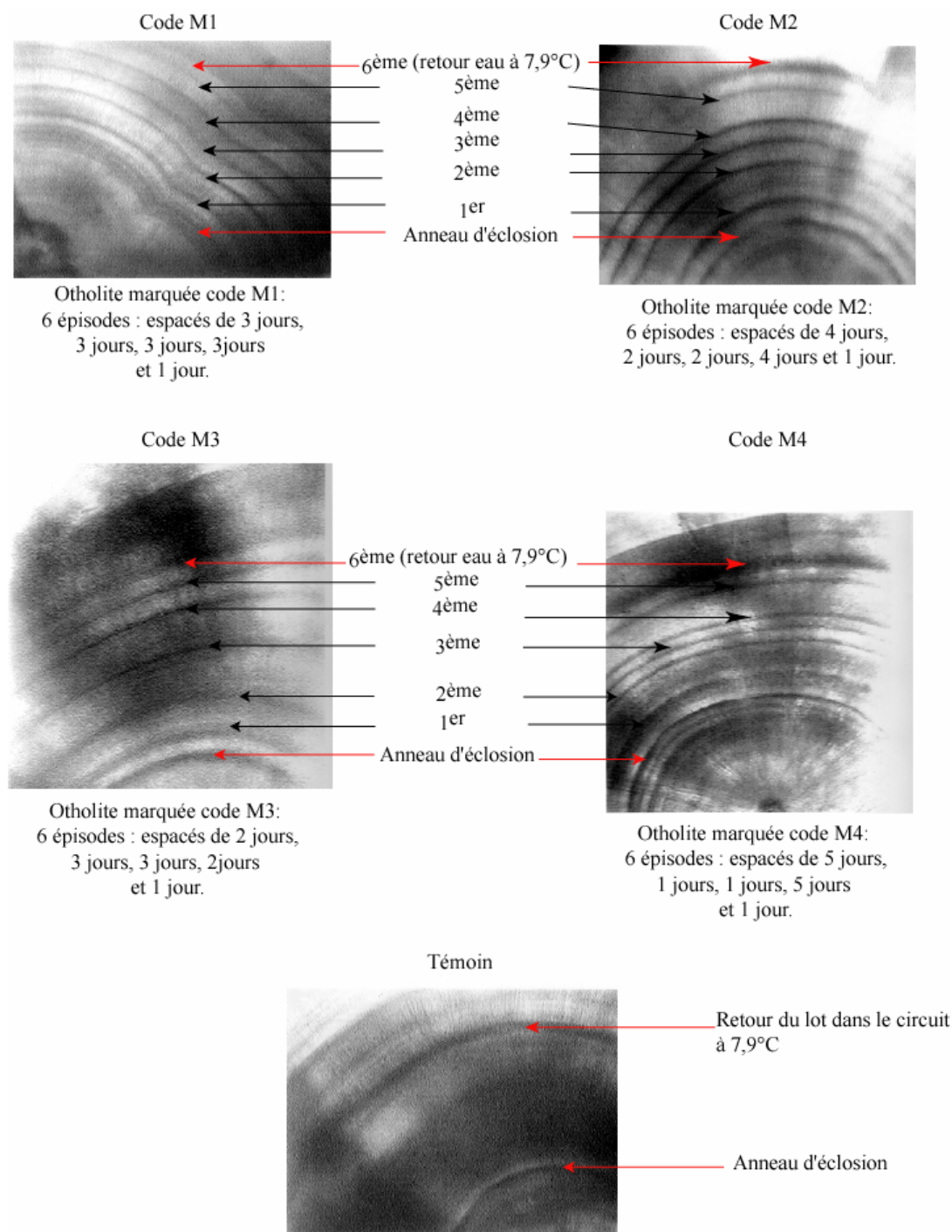


Figure 2 : *Microphotographie des otolithes marquées et une otolithe témoin.*

Les marques provoquées par les épisodes thermiques sont visibles sur une grande majorité des otolithes. Les otolithes du lot témoin présentent seulement deux marques visibles : la première correspond à l'anneau d'éclosion et la seconde située près du bord extérieur coïncide avec le retour des poissons dans le circuit à 7,9°C. Ces deux marques se retrouvent également sur les poissons marqués (**figure 2**).

Conclusion et perspectives

L'utilisation de chocs thermiques provoque des marques caractéristiques, reconnaissables sur les otolithes échantillonnées peu de temps après le dernier épisode de marquage, grâce à une succession de chocs séparés par des intervalles courts (un ou deux jours) et des intervalles longs (quatre ou cinq jours). Avec 5 épisodes de marquage étalés sur 20 jours, on peut créer une succession de 4 bandes larges et étroites, dont la disposition établit 4 codes différents. On augmente le nombre de codes en répétant la séquence une ou deux fois au cours de la période entre l'apparition des yeux et la fin de la résorption de la vésicule, et en utilisant des combinaisons différentes de bandes larges et étroites.

Cette technique de marquage est simple, il suffit de disposer de deux circuits d'incubation présentant une différence de température de 4°C, et de transférer à des dates programmées les clayettes ou incubateurs contenant les embryons dans le circuit le plus froid pendant de courtes périodes (4 heures suffisent). Cette technique est utilisable en pisciculture pour un marquage à grande échelle sans risque et sans stress pour les poissons. L'analyse des otolithes nécessite un microscope pour le décodage. Pour les poissons un peu plus gros (au-delà de 7 à 8 cm), il faut inclure les otolithes dans des blocs de résine et les polir avant lecture ; cette opération délicate demande une certaine expérience mais ne pose pas de problèmes majeurs et son coût reste modéré.

Nous n'avons pas constaté de mortalité ou de malformation liée à cette méthode son seul inconvénient est le sacrifice du poisson. Elle est donc particulièrement adaptée aux populations exploitées mais beaucoup moins aux populations à préserver.

Bibliographie

- Rives J (2006) Insertion chirurgicale d'émetteurs radio chez le poisson anesthésié par galvanonarcose *in* Méthodes et outils d'observation pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques. *Le Cahier des Techniques de l'Inra*, Milieux naturels, 71-74.
- Jeannot N, Marchand F (2006) Identification par le marquage des poissons quelques exemples utilisés en écologie aquatique *in* Méthodes et outils d'observation pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques. *Le Cahier des techniques de l'Inra*, Milieux naturels, 105-110
- Schroder SL, Volk EC, Knudsen CM, Grimm JJ (1996) Marking embryonic and newly emerged salmonids by thermal events and rapid immersion in alkaline-earth salts. *Bull.Natl. Res. Inst., Suppl. 2*, 79-83.
- Rojas-Beltran R, Gillet C, Champigneulle A, (1995b) Immersion mass-marking of otoliths and bone tissue of embryos, yolk-sac fry and fingerlings of Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.). *Nordic J. Freshw. Res.* 71, 411-418.
- Rojas-Beltran R, Champigneulle A, Vincent G (1995a) Mass-marking of bone tissue of *Coregonus lavaretus* L. and its potential application to monitoring the spatio-temporal distribution of larvae, fry and juveniles of lacustrine fishes. *Hydrobiologia* 300/301, 399-407.
- Volk EC, Schroder SL, Fresh KL (1990) Inducement of unique otolith banding patterns as a practical means to mass-mark juvenile Pacific salmon. *Am. Fish Soc. Symp.* 7, 203-215.
- Behrens Yamada S, Mulligan TJ (1982) Strontium marking of hatchery reared coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* Walbaum, identification of adults. *J. Fish Biol.* 20, 5-9.

Outils de pêche actifs pour l'échantillonnage de larves et de juvéniles de poissons dans les grands lacs alpins.

¹⁹ Michel Colon, Jean-Christophe Hustache, Pascal Chifflet

Résumé : *Les stocks de poissons en milieu lacustre subissent des fluctuations inter-annuelles, aussi nous étudions les populations de plusieurs espèces de poissons lacustres : perche, gardon, corégone afin de déterminer les facteurs pouvant influencer la mortalité et modifier les taux de croissance des jeunes stades. Pour disposer d'un échantillonnage représentatif des différents stades, de la larve au juvénile, nous avons adapté et développé des engins de pêche actifs : filets à ichtyo-plancton type bongo ou tractés latéralement et chaluts à barres ou à panneaux souples. Nous décrivons ici chaque engin de pêche et nous présentons quelques résultats.*

Mots clés : Ecologie, échantillonnage, chalut, lac, pêche, poisson.

Introduction

L'échantillonnage des différents stades de développement des espèces lacustres est la base de toute étude menée sur la dynamique du recrutement larvaire et les dynamiques spatio-temporelles des populations de poissons vis à vis des paramètres environnementaux ou anthropiques. Cet échantillonnage, conséquent et de qualité, nécessite la mise en place de diverses techniques de pêche, en particulier celles qui font appel à des engins de pêche dits actifs. Il existe deux grands modes de pêche actifs : les pêches utilisant un engin équipé d'un filet ou des techniques d'attraction et d'immobilisation du poisson sans filet (pêche électrique, à la ligne, par empoisonnement...), (Masson et *al*). Dans les lacs, les techniques utilisant des engins équipés d'un filet viennent souvent en complément d'autres méthodes d'échantillonnage (hydroacoustique, filets maillants...). Leur maniement diffère en fonction des sites de pêche et du comportement des espèces cibles ; ces engins sont tractés ou poussés (chalut), ou actionnés verticalement (carrelet) ou bien capturent par encerclement (senne).

1. Description du matériel

Nous traiterons ici de quatre engins tractés, deux filets à ichtyoplancton et deux chaluts pélagiques déjà utilisés pour l'échantillonnage du poisson dans d'autres milieux, mais adaptés à nos problématiques et mis en oeuvre dans des plans d'eau naturels ou de retenue. Tous sont utilisés à partir de la même unité de navigation, un Antarès 640 équipé d'un moteur diesel de 55 cv, pourvu d'un portique fixe et d'un treuil thermique d'une traction maximum de 1000 kg.

1.1 Les filets à ichtyoplancton ont une maille constante et sont dotés en bout d'un réceptacle rigide pour la collecte d'échantillons vivants des plus jeunes stades larvaires (taille 5 mm).

¹⁹ INRA-UMR CARRTEL – Equipe Relation Trophique et Réhabilitation - BP 511- 74203 Thonon les Bains
☎ 04 50 26 78 31 michel.colon@thonon.inra.fr, hustache@thonon.inra.fr, chifflet@thonon.inra.fr

1.1.a Les filets tractés latéralement sont montés sur des cadres de 1,5 m x 1 m en acier inox ; deux filets en nytex (nylon) de 1000 μ et de 5 m de long (**figure 1**) sont tractés de part et d'autre de l'embarcation. Deux déflecteurs, formant un angle de 30° avec la face avant du cadre, l'un positionné sur la longueur basse et l'autre sur le côté du cadre, assurent l'écartement et la stabilité de l'engin.

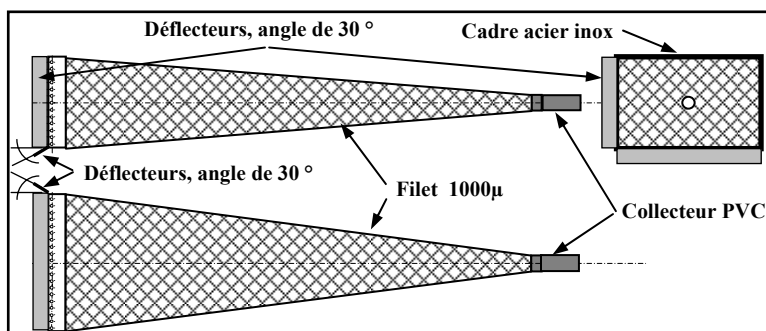


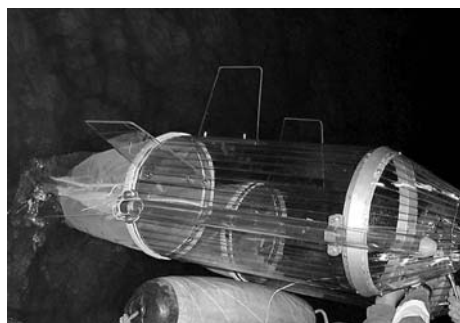
Figure 1 : *Filet à ichtyo-plancton tracté latéralement.*



Photo 1 : *Perches de traction.*

Ces engins²⁰ sont suspendus à l'extrémité de deux perches en aluminium de 4 m, déployées et haubanées sur le haut du portique (**photo 1**), ils sont tractés à 1,5 noeuds et sont immergés à moins d'un mètre de profondeur. Ils sont dotés à leur extrémité d'un collecteur que l'on remonte à bord à l'aide d'une corde de rappel et il n'est pas nécessaire de sortir tout le filet pour la récolte de l'échantillon. L'acquisition simultanée de deux prélèvements accroît l'effort d'échantillonnage.

1.1.b Filets type bongo



Photos 2 : *Filet bongo modifié.*

Par l'adjonction d'une partie antérieure en macrolon (polycarbonate) transparent à ouverture conique, cet engin est une adaptation du filet bongo classique (**photos 2**). Il se compose de deux tubes en macrolon de 1 m de long et d'ouverture conique de 40 cm de diamètre montés sur une structure métallique en inox. Chaque tube, relié à un filet conique long de 2 m en nytex (nylon) de 300 μ de maille, est fermé par un collecteur rigide. De part et d'autre de cette structure, deux tubes supplémentaires de 1 m de long et de 5 cm de diamètre équipés d'un filet nytex de 200 μ permettent la capture simultanée du zooplancton.

²⁰ Cet engin a été intégralement imaginé et mis au point par l'équipe RTR de Thonon les Bains.

L'adjonction d'ailerons verticaux et latéraux réalisés en macrolon assure la stabilité de l'engin (photo 2). Son positionnement dans la strate d'eau varie, comme pour tout engin tracté, selon la vitesse de traction ici 2 à 3 noeuds, le poids du lest et la longueur de filage.

1.2 Les Chaluts pélagiques permettent la prospection de milieux divers, de surfaces et de volumes conséquents. Leurs positionnements dans la tranche d'eau sont fonction de la vitesse de traction, de la longueur du filage et du poids des lests.

1.2.a Le chalut à barre, long de 14 m et d'une ouverture de 3 m x 3 m, est constitué d'un filet de 6 nappes de tailles de mailles décroissantes, de l'ouverture jusqu'au cul du chalut (**figure 2**). Il est accroché à deux barres métalliques et il s'ouvre sous l'action conjuguée de la barre supérieure creuse armée de deux bouées tirant vers le haut et de la barre inférieure pleine agissant comme lest ; l'ouverture latérale est fixée par la longueur des barres.

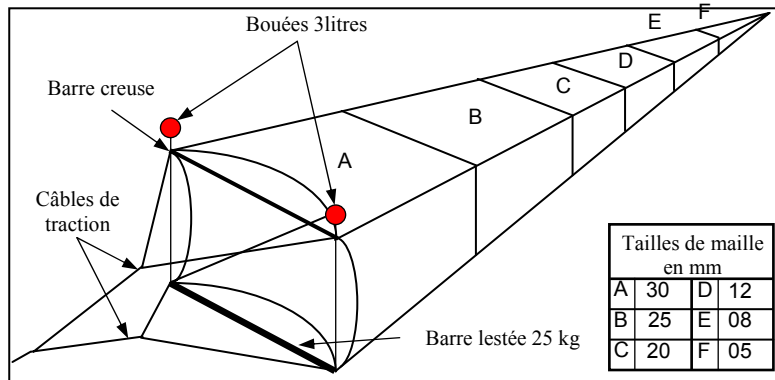


Figure 2 : Chalut à barre.

L'ensemble est traîné par une « fune » de traction en acier de 6 mm de diamètre et deux « pattes d'oie » en acier de 3 mm de diamètre ; la « patte d'oie » inférieure est plus longue que la patte d'oie supérieure pour maintenir la verticalité de l'ouverture du chalut. Cet engin tracté à 1,5 noeuds capture des juvéniles et des poissons adultes.

1.2.b Chalut méso pélagique (**figure 3**), de type Isaac Kidd a été mis au point par l'Ifremer de Lorient et adapté, en particulier le maillage, pour la capture des bancs de juvéniles en milieu lacustre. De 26 m de long, il est composé de huit nappes de mailles décroissantes réparties de l'ouverture jusqu'au cul du chalut.

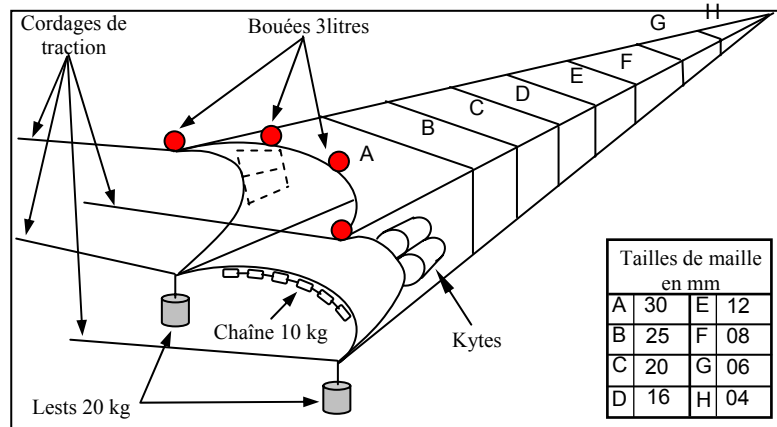


Figure 3 : Chalut méso pélagique.

La « fune » de traction et les « pattes d'oie » longues de 25 m, sont en Dynema de 5 mm de diamètre. L'ouverture du chalut (6,3 m x 4,2 m) s'effectue verticalement sous l'action antinomique des lests situés aux extrémités de la ralingue du bas et des bouées situées sur la ralingue du haut. L'action des deux panneaux souples ou kytes, positionnés de part et d'autre du filet, conjuguée à la vitesse de l'embarcation assure l'ouverture latérale du chalut. Plus filtrant et plus facile à traîner que le chalut à barre, il peut être tracté à plus de 2,5 noeuds.

2. Résultats

Lors des campagnes de pêche du printemps, été et automne 2002 sur le lac d'Annecy, effectuées aux filets bongo et aux chaluts pélagiques 5 671 perches ont été capturées, leur tailles moyennes évoluent entre 11 mm et 71 mm (**figure 4**). L'étude de leurs contenus stomacaux a montré leur infestation par le parasite *Trianophorus Crassus*. Le taux de parasitisme de 60 à 80 % explique la mortalité de ces cohortes durant la première année (Guillard et al.).

Dates	Engins de pêche	Nombre de parcours	Nombre de poissons
Juin	Bongo	5	582
Juin	Bongo	3	1765
	Chalut	6	
Juillet	Chalut	2	1271
Août	Chalut	4	532
Septembre	Chalut	7	729
Octobre	Chalut	5	273
Novembre	Chalut	3	519

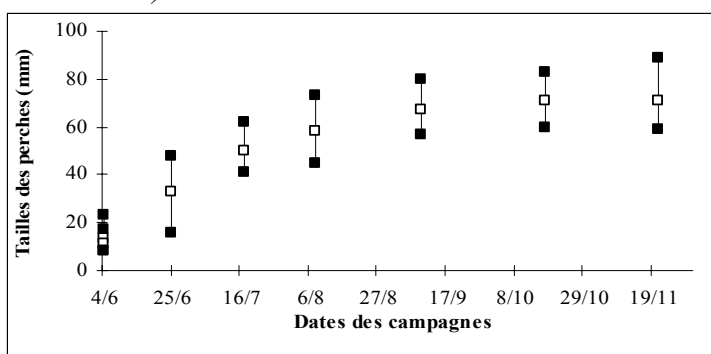


Figure 4 : Evolution des tailles moyennes des perches

Lors des campagnes hebdomadaires de captures de larves de corégones, aux filets à ichtyoplancton tractés latéralement, organisées sur le lac d'Annecy de février à mai 2006, 1379 larves ont été capturées. A partir des prélèvements effectués sur chaque larve (estomac, tête, chair) on étudie le régime alimentaire par l'analyse des contenus stomacaux, la détermination fine de l'âge par l'examen des incréments journaliers sur les otolithes et l'assimilation de l'alimentation dans les tissus par analyse isotopique des chairs.

Conclusion

Il est nécessaire d'employer plusieurs engins ou techniques d'échantillonnage pour collecter tous les stades d'une même espèce, sachant que tous les individus à un stade donné n'ont pas la même accessibilité spatio-temporelle pour des raisons éco-éthologiques ou environnementales. L'utilisation d'engins de pêche actifs apparaît comme la technique de pêche la mieux adaptée à la capture des larves. Pour échantillonner les individus de plus grandes tailles d'autres techniques ou engins de pêche (senne de plage, filets maillants...) doivent être utilisés. L'équipe Inra de Thonon-les-Bains a acquis la maîtrise et a adapté des techniques de pêche et de localisation (hydroacoustique) pour aborder des milieux aux conditions environnementales différentes.

Bibliographie

- Masson G, Pedon-Flesch A, Marzou R (2001) Méthodes de pêche active en milieu lacustre : caractéristiques et contraintes d'utilisation. D. Gerdeaux (ed.), *INRA, Paris. Gestion piscicole des grands plans d'eau*.
- Guillard J, Perga ME, Colon M, Angeli N (2006) An annual survey of Y-O-Y perch (*Perca fluviatilis*) monitored by hydroacoustic in an oligotrophic lake (Lake Annecy, France). *Sous presse, Fisheries Management and Ecology*.

Méthode d'estimation de la survie embryolarvaire de Salmonidés par insertion de capsules d'incubation sous gravier

²¹ Frédéric Lange, Jacques Dumas, Lionel Barrière, Samuel Marty²²

Résumé : Nous décrivons une nouvelle technique utilisée pour l'estimation de la survie sous graviers des Salmonidés entre l'œuf fécondé et l'émergence de l'alevin. Elle met en œuvre des capsules cylindriques grillagées de 7 ou 12 cm³ contenant des petits lots d'œufs qui sont implantés dans le substrat de frayères naturelles ou artificielles au moyen de petits tubes conducteurs amovibles insérés à l'aide d'une tige métallique.

Mots clés : frayères, méthode et dispositif, pontes, salmonidés, stades précoces, survie.

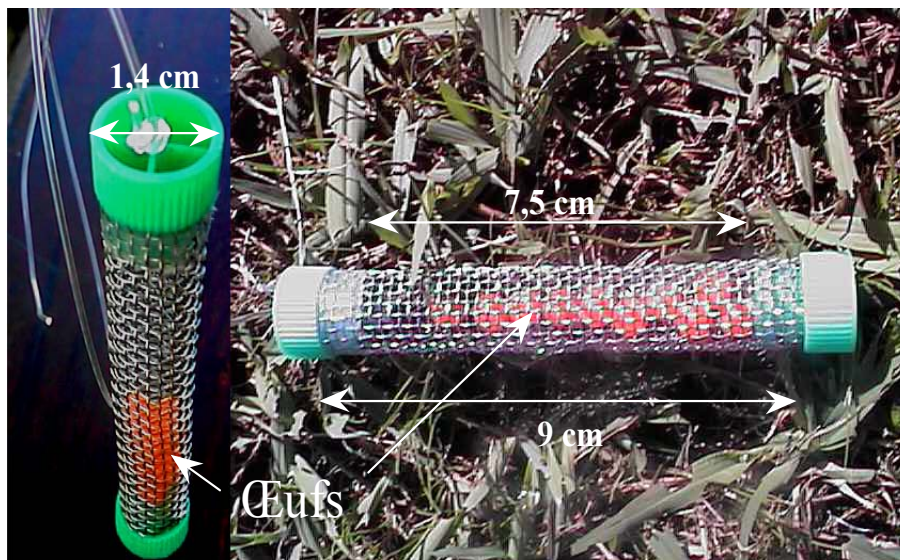


Figure 1 : Capsule d'incubation grillagée contenant 10 œufs

Introduction

Le développement embryolarvaire des salmonidés se déroule sous les graviers des frayères entre décembre et début avril dans la partie méridionale de l'aire de répartition de l'espèce. Il représente une des phases les plus cruciales de leur cycle biologique en terme de survie. Le taux de survie entre la ponte et l'émergence des alevins peut varier de 2 à 35 % (MacKenzie et Moring, 1988) selon les cours d'eau. Il témoigne de l'efficacité de la reproduction des Salmonidés et prend en compte la totalité de la phase de développement embryolarvaire. Ce critère constitue l'un des indicateurs biologiques de qualité des habitats d'eau courante. Depuis longtemps, des auteurs ont essayé de quantifier la survie des œufs et des alevins au sein d'une frayère jusqu'à l'émergence. Ils ont utilisé deux méthodes principales. La première consiste à récupérer les alevins émergents à l'aide de filets-capes ou de cages grillagées

²¹ UMR ECOBIOP INRA, Station d'hydrobiologie, Quartier Ibaron - 64310 Saint-Pée-sur-Nivelle ☎ 05 59 51 59 51
Frederic.Lange@st-pee.inra.fr, dumas@st-pee.inra.fr, barriere@st-pee.inra.fr

²² Conseil Supérieur de la Pêche, Building des Pyrénées 2D - 64000 Pau

recouvrant les frayères (Dumas et Darolles, 1999). Elle présente des problèmes liés à l'estimation du nombre initial d'œufs déposés dans les frayères par les femelles, à la difficulté de la mise en place des pièges, aux risques d'évasion des alevins par les interstices du substrat et enfin à la vulnérabilité du dispositif aux forts courants lors des crues. La seconde consiste à incuber les œufs dans des boîtes grillagées de divers modèles, placées dans le substrat et auxquelles un piège à alevins de faible volume dépassant du substrat est fixé peu avant l'émergence (Rubin, 1995). Elle présente aussi des inconvénients liés notamment à la déstructuration et à l'amélioration granulométrique du substrat par perte d'éléments fins lors du remplissage des incubateurs avec le gravier en place, à la modification de la frayère existante lors de la pose et à la vulnérabilité du dispositif surmonté de son piège lors des crues.

Afin d'éviter les inconvénients de ces deux procédés, nous avons mis au point une nouvelle méthode d'estimation de la survie sous gravier adaptée de celle de Scrivener (1988). Elle consiste à insérer dans le substrat d'une frayère naturelle ou artificielle sans le modifier, à l'aide d'un tube conducteur en plastique amovible et d'une tige métallique, plusieurs petites capsules (tubes cylindriques) de grillage de quelques centimètres cubes de volume, remplies d'un nombre connu d'œufs fraîchement fécondés et empêchant ultérieurement les alevins de s'évader (**figure 1 et 2**) (Dumas et Marty, 2006).

1. Description d'une frayère à Salmonidés

1.1 La frayère naturelle est, selon l'espèce, une zone de quelques décimètres à quelques mètres carrés allongée dans l'axe du courant. Elle se situe le plus souvent dans quelques dizaines de centimètres d'eau à la limite amont d'un faciès d'écoulement rapide. Elle est constituée d'un dôme de graviers sous lequel se trouvent plusieurs poches d'œufs à une profondeur de 5 à 25 cm sous le substrat. Ces poches correspondent à autant de dépressions creusées par la femelle de l'aval vers l'amont, puis remblayées après chaque ponte avec le produit de creusement de la poche suivante. Le substrat de la frayère se trouve ainsi débarrassé d'une grande partie des éléments les plus fins (< 2 mm) pour une meilleure circulation de l'eau véhiculant l'oxygène nécessaire au développement des œufs. Elle se termine en amont par une dépression non remblayée plus large que celles des poches d'œufs. Le fond de chaque poche est tapissé de gros cailloux qui n'ont pu être remué, entre lesquels se logent des amas de quelques dizaines à quelques centaines d'œufs ensuite recouverts de matériaux de granulométrie plus fine. La morphologie caractéristique de la frayère (dépression suivie d'un dôme) ainsi que sa structure granulométrique favorisent la pénétration et la circulation de l'eau dans les interstices du substrat et donc l'apport d'oxygène nécessaire au développement des embryons puis des larves.

1.2 Les frayères artificielles (figure 3) sont réalisées au moyen d'une houe dentée en s'aidant du courant pour chasser les fines comme le ferait une femelle sur une frayère naturelle. L'axe du courant définit l'orientation de la frayère sur le lit de la rivière. Pour simuler une frayère à saumon, une première cavité d'environ 20 cm de profondeur est creusée en aval. Puis toujours en procédant de la même manière, on creuse vers l'amont, le substrat remué remblayant la cavité en aval et ce sur une distance d'environ 1,5 m à 3 m. Une fois terminée, la frayère artificielle représente une tranchée recouverte de substrat remué sur 15 ou 20 cm de profondeur et 20 cm de large à la base. Elle se présente alors avec un creux en amont suivi d'un dôme en aval. Ses caractéristiques granulométriques sont voisines de celles des frayères naturelles.

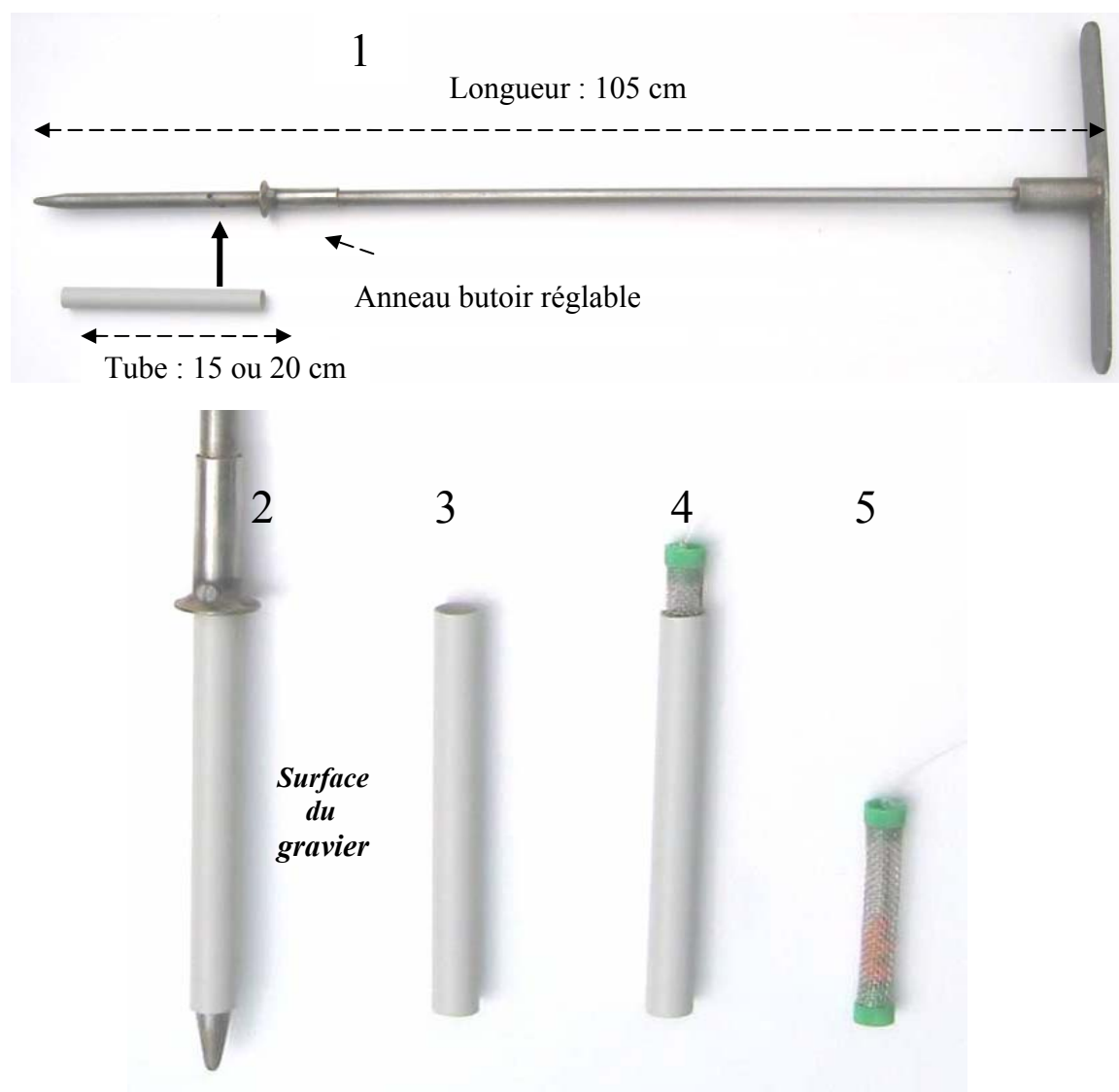


Figure 2 : Matériel et étapes d'insertion des capsules dans le gravier d'une frayère

1 - Insertion du tube de guidage sur la barre métallique.

2 - Introduction verticale du tube de guidage dans le gravier. 3 - Retrait de la barre métallique.

4 - Insertion d'une capsule jusqu'au fond du tube. 5 - Retrait du tube de guidage.

2. Description des capsules d'incubation et du matériel d'introduction

2.1 Les capsules d'incubation sont de tailles différentes, selon le diamètre des œufs qui varie avec la taille des espèces (par exemple, 5 à 7 mm chez le saumon Atlantique et 4 à 5 mm chez la truite commune de ruisseau). Il s'agit de petits tubes cylindriques en grillage d'acier inoxydable (**figure 1**). Pour les grands Salmonidés les capsules font 9 cm de longueur pour un diamètre de 1,4 cm. Le vide de maille est de 1,5 mm et le pourcentage de vide est de 54 %. Les deux extrémités du cylindre sont obturées par des bouchons en PVC qui réduisent la longueur utile à 7,5 cm pour un volume utile de 12 cm³. Un fil de Nylon d'environ 50 cm est relié à l'un des bouchons, lui-même fixé à la capsule avec une colle à la silicone (qualité

aquarium). Ce fil sert à localiser et à retirer les capsules dans le cours d'eau. Pour les Salmonidés de petite taille, la longueur du tube est réduite de 3 cm laissant une longueur utile de 4,5 cm pour un volume de 7 cm³.

2.2 Matériel d'introduction

Afin de pouvoir insérer les capsules d'incubation dans le gravier, les frayères sont équipées de tubes « conducteurs » en PVC (**figure 2**) de 15 ou 20 cm de long et de 1,7 cm de diamètre intérieur. Ils sont placés au moyen d'une aiguille d'introduction (barre métallique pointue de 105 cm) sur laquelle le tube PVC est enfilé et retenu par un anneau butoir. Une fois enfoncée dans le substrat à la profondeur souhaitée (jusqu'au butoir), la barre métallique est soigneusement retirée en prenant soin de ne pas déloger le tube implanté, qui est ensuite bouché pour éviter tout dépôt à l'intérieur avant la mise en place des capsules d'incubation.

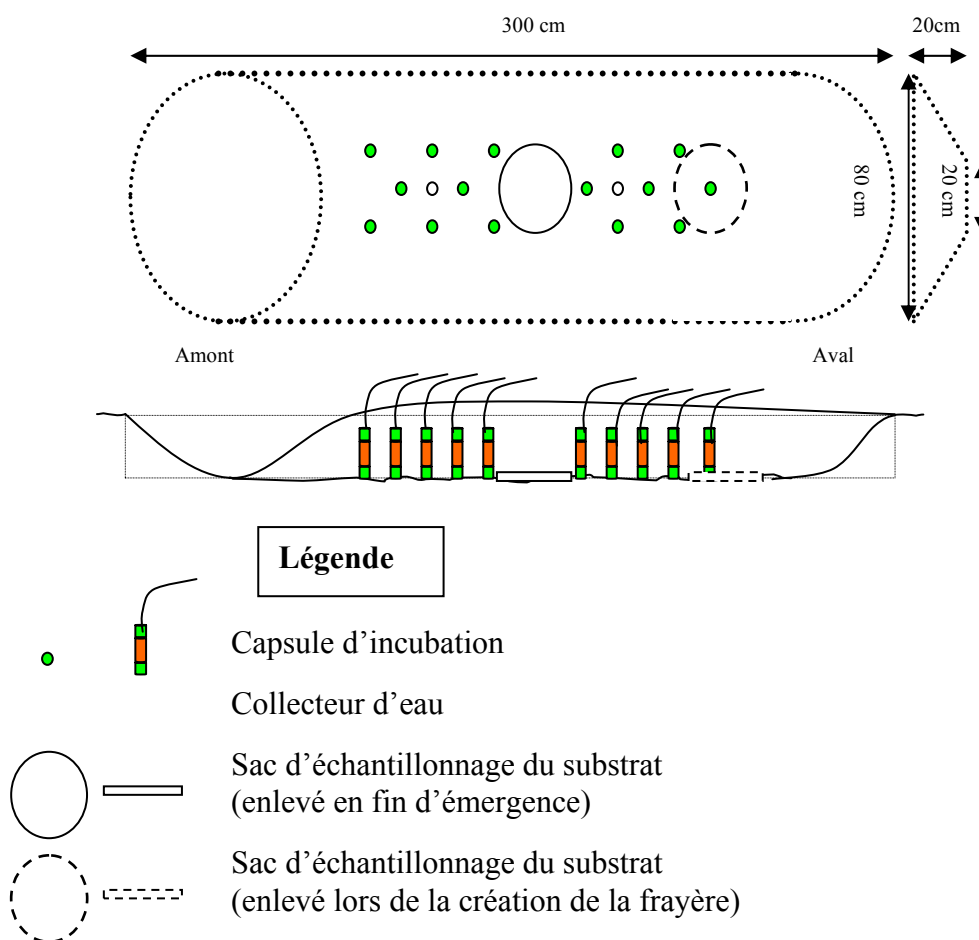


Figure 3 : Frayère artificielle de saumon équipée de capsules d'incubation, collecteurs d'eau et sacs d'échantillonnage du substrat.

3. Obtention, manipulation, conditionnement et pose des œufs

Les pontes artificielles (fécondation à sec) de géniteurs sauvages, qui peuvent être transportés en pisciculture pour faciliter les manipulations, sont utilisées à ces fins. Après observation d'un temps de repos d'une demi-heure après la fécondation, le comptage et le conditionnement des lots d'œufs sont réalisés dans les deux heures qui suivent la fécondation.

Les capsules remplies d'œufs (par l'intermédiaire d'un petit entonnoir) sont transportées dans des glacières remplies d'eau pour éviter le brassage et les chocs. La mise en place des œufs et des dispositifs d'incubation dans les frayères doit intervenir au maximum 12 heures après la fécondation avec dans ce cas la nécessité de contrôler régulièrement la température, la maintenir stable et changer l'eau régulièrement si nécessaire. Les capsules sont introduites dans les tubes conducteurs préalablement installés, lesquels sont retirés immédiatement après. Seuls les fils de Nylon reliés aux capsules dépassent du substrat et permettent de les repérer.

4. Exemple de contrôle des survies en fonction des objectifs d'étude d'une espèce : le saumon Atlantique (*Salmo salar L.*) et perspectives d'utilisation

La survie du saumon Atlantique (*Salmo salar L.*) entre la ponte et l'émergence des alevins hors gravier est testée dans le bassin de la Nivelles grâce à l'insertion de capsules d'incubation contenant des œufs fraîchement fécondés dans des frayères artificielles et naturelles (**figure 3**). Le débit et la température de l'eau de surface, l'oxygène dissous des eaux de surface et interstitielle et les caractéristiques granulométriques du substrat des frayères sont contrôlés durant toute la durée de l'expérience. L'encombrement mineur de ces capsules permet une souplesse dans leur agencement au sein de la frayère et éventuellement l'association d'autres dispositifs comme des préleveurs d'eau pour déterminer la concentration en oxygène, la quantité d'azote (**figure 3**).

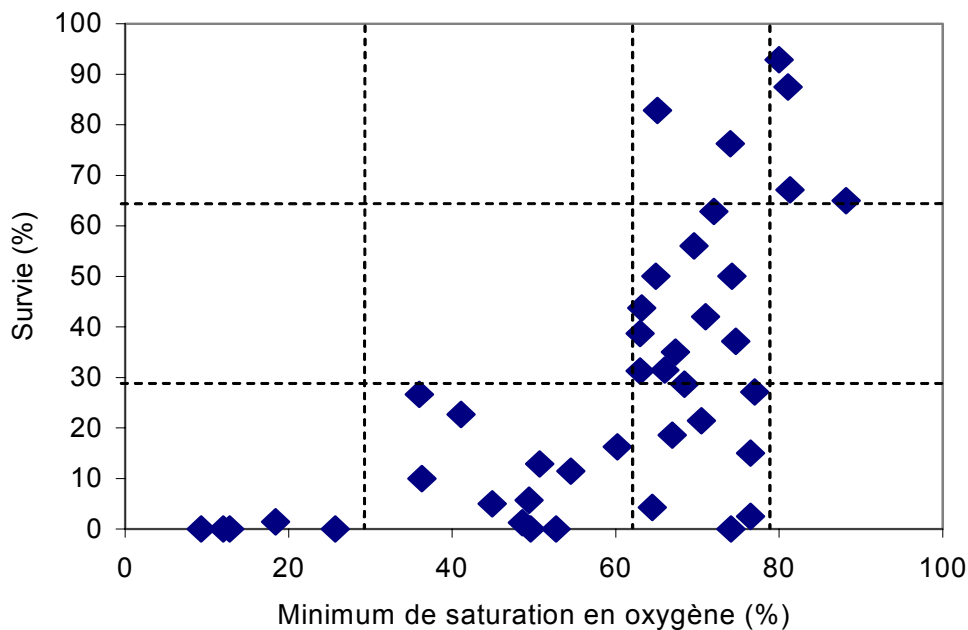


Figure 4 : Relation entre la survie dans les groupes de capsules et la saturation minimum en oxygène de l'eau interstitielle des frayères de décembre 2000 à mars 2001 dans la Nivelles (Dumas et al. soumis)

Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence de survie entre les frayères artificielles et naturelles et que les mortalités interviennent principalement lors d'épisodes de crues avant éclosion et l'on estime ainsi la survie embryolaire sur l'ensemble du domaine accessible aux saumons. Il y a une corrélation positive très forte entre le taux de survie et le taux de saturation minimum en oxygène de l'eau interstitielle ($N = 41$, $R_s = 0.67$, $p < 0.001$). La survie est d'autant meilleure que la concentration en oxygène est élevée (**figure 4**).

Conclusion

Avec cette nouvelle méthode on s'affranchit de problèmes et de biais récurrents dans les deux dispositifs utilisés auparavant. Le suivi d'effectifs connus d'œufs avec des capsules permet par exemple de s'affranchir de l'incertitude sur l'estimation des nombres d'œufs déposés dans les frayères naturelles, de favoriser une insertion des œufs dans un milieu où les contraintes sont respectées (éviter les manipulations du gravier et ne pas modifier le substrat de la frayère testée qu'elle soit naturelle ou artificielle). La technique des capsules fournit des estimations de survie entre ponte et émergence plus objectives et plus réalistes que les deux autres méthodes. On a constaté une sous estimation de la survie dans le cas des filets-capes et une surestimation dans le cas des boîtes d'émergence (Dumas et Marty, 2006). Enfin le coût de cette technique est faible (environ 10 euros pour une capsule). Les perspectives d'utilisation sont nombreuses. On pourrait par exemple associer aisément plusieurs espèces au sein d'une même frayère (saumon, truite ou truite de mer). Utilisée sur des Salmonidés à gros œufs, cette méthode est adaptable à d'autres espèces.

Bibliographie

- MacKenzie C, Moring JR (1988) Estimating survival of Atlantic salmon during the intra-gravel period. *North American Journal of Fisheries Management* **8**, 45-49.
- Dumas J, Darolles V (1999) Caractéristiques environnementales et survie embryolaire du Saumon atlantique, *Salmo solar* L., dans un cours d'eau du piémont pyrénéen, la Nivelle (France). *Cybium*, 23 (1) suppl., 29-44.
- Dumas J, Marty S (2006) A new method to evaluate egg-to-fry survival in salmonids, trials with Atlantic salmon, *Journal of Fish Biology*, 68, 284-304.
- Dumas J, Olaizola M, Barrière L. Survie embryolaire du saumon atlantique, *Salmo salar* L., dans un cours d'eau du sud de son aire de répartition, la Nivelle. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* (soumis).
- Rubin JF (1995) Estimating the success of natural spawning of salmonids in streams. *J. Fish Biol.*, 46, 603-622.
- Scrivener JC (1988) Two devices to assess incubation survival and emergence of salmonid fry in an estuary streambed. *N. Am. J. Fish. Manag.*, 8, 248-258.

Piégeage de micromammifères

Une nouvelle boîte-dortoir pour le piège non vulnérant Inra

Patricia Le Quilliec²³, Solène Croci²⁴

Résumé : *Lors d'une étude portant sur la comparaison de micromammifères vivant dans différents boisements de la région rennaise, nous devons réaliser des campagnes de piégeages en occasionnant le moins de mortalité possible au sein des populations étudiées. Pour cette raison, nous avons fait le choix d'utiliser des pièges non vulnérant Inra munis de boîtes-dortoirs ; nous posons et déplaçons un grand nombre de pièges lors de nos travaux. Les boîtes-dortoirs, classiquement en bois sont lourdes et peu commodes, nous avons donc adapté des boîtes en polypropylène aux pièges. Ces nouvelles boîtes-dortoirs ont l'avantage d'être légères, résistantes, économiques et faciles à nettoyer. Leur efficacité sur la baisse de mortalité des mulots, campagnols et musaraignes capturés a été testée sur le terrain : le taux de mortalité est passé de 27% sans boîte-dortoir à 1,4% avec boîte-dortoir. Elles seront donc utilisées lors de suivi à long terme pour évaluer l'effet de l'urbanisation sur les populations de micromammifères.*

Mots clés : piège, taux de survie, boîte-dortoir, micromammifères, suivi de population

Introduction

Les études des micromammifères - rongeurs ou insectivores - sont nécessaires dans différents domaines notamment en écologie pour les inventaires, les études spatiales ou temporelles, la dynamique des populations, mais aussi en gestion agricole pour la surveillance des pullulations, le contrôle d'abondance dans les cultures ainsi qu'en épidémiologie pour la recherche de virus, bactéries, endoparasites et ectoparasites.

Les micromammifères sont discrets et généralement nocturnes, ce qui implique de recourir au piégeage pour les recenser et les manipuler. Différents types de pièges existent et ils sont choisis en fonction des espèces ciblées et des objectifs poursuivis. Avec le piège non vulnérant Inra, nous capturons des micromammifères dont le poids n'excède pas 40 grammes et de les relâcher vivants. Afin d'augmenter la probabilité de leur survie, une boîte-dortoir peut être fixée à l'arrière du piège.

Lors d'une étude portant sur la comparaison inter site et le suivi à long terme de populations de mulots, de campagnols et de musaraignes de petits boisements, nous devons manipuler et

Avec le **piège non vulnérant Inra** mis au point par Aubry en 1950, nous capturons un unique animal par piège : en effet, le passage d'un animal dans le piège provoque la fermeture d'une trappe qui empêche la fuite de l'animal piégé et prévient la capture d'un second animal. Toutefois, ce piège métallique, bien que non vulnérant, peut induire une mortalité gênante : les animaux capturés urinent dans le piège et mouillent leur pelage ce qui réduit son pouvoir isolant. Ce phénomène combiné aux basses températures nocturnes peut ainsi provoquer la mort des individus.

La boîte-dortoir Inra a été mise au point par Spitz à la fin des années 50, elle est habituellement en bois et adaptée à l'extrémité du piège. Elle peut être pourvue de nourriture et de foin.

²³ INRA, SCRIBE Campus de Beaulieu 35042 Rennes cedex ☎ 02 23 48 57 29 Lequilliec@rennes.inra.fr

²⁴ UMR ECOBIO, CNRS, Université de Rennes - 1, Av. Général Leclerc, 35042 Rennes cedex
Solene.Croci@rennes.inra.fr

déplacer un grand nombre de pièges. Les densités de micromammifères dans nos sites d'études étant faibles, la mortalité induite par le piégeage pouvait influencer fortement sur la dynamique des populations. Nous devons donc impérativement munir nos pièges de boîtes-dortoirs. Le poids, l'encombrement et la difficulté de nettoyage des boîtes-dortoirs classiquement construites en bois, présentaient, dans notre cas, des inconvénients évidents de manipulation et de manutention. Nous avons donc cherché à utiliser une nouvelle boîte-dortoir constituée d'un matériau plus léger que nous décrivons ici.

1. Matériel et méthode

1.1 Description de la nouvelle boîte-dortoir

Notre choix s'est porté sur une boîte du commerce en polypropylène parce que c'est un matériau non cassant et qu'il se découpe facilement. C'est une boîte opaque, de forme carrée de 90 mm x 90mm, d'un volume de 500ml, distribuée par la société Paxor. La base de la boîte est incisée au cutter sur 3 côtés de 5 cm pour obtenir un volet délimitant une ouverture et permettant d'encaster la boîte sur l'arrière du piège (**photo 1**). Ce volet, par son élasticité fait levier et permet de maintenir assemblée la boîte au piège. Même si celui-ci contient un animal, il peut être transporté aisément en position horizontale sans risque de désassemblage. Les autres intérêts de cette boîte-dortoir sont sa légèreté, son étanchéité, son faible coût (moins de 0,5 euros HT pièce en 2006) et sa résistance aux chocs. De plus, le polypropylène permet un nettoyage rapide et efficace, la boîte-dortoir est donc réutilisable. Nous conseillons quant au choix de la boîte qu'elle soit le plus lisse possible afin d'éviter les prises aux morsures des animaux.

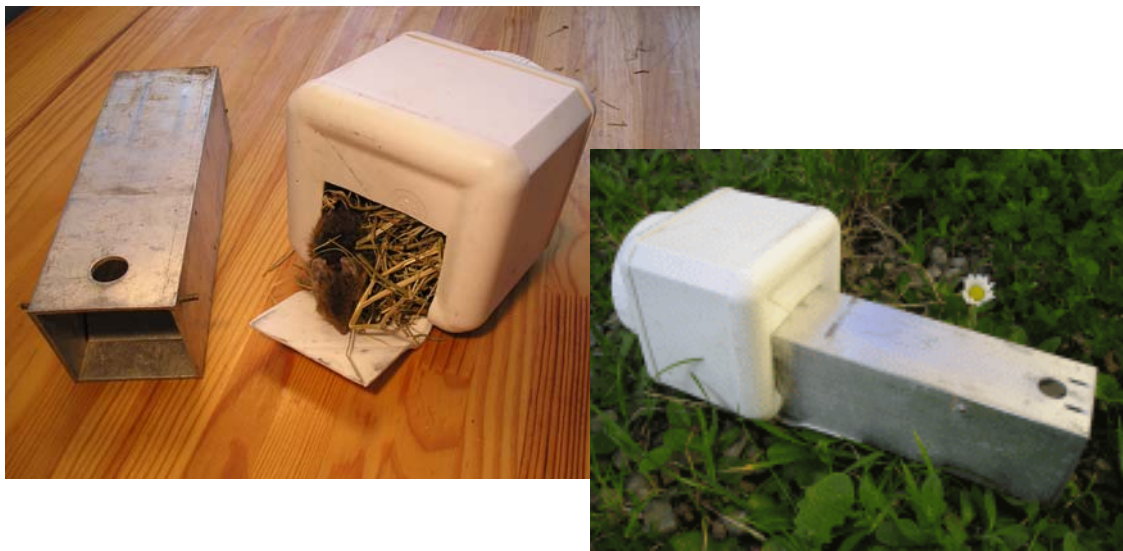


Photo 1 : *Le piège Inra et la boîte-dortoir en polypropylène (à gauche : dissociés, à droite : assemblés)*

1.2 Utilisation lors des piégeages

Le polypropylène est moins isolant que le bois et n'absorbe pas les urines. Pour pallier cet inconvénient, la boîte-dortoir est garnie de sciure afin d'absorber l'urine, de foin pour servir de litière et de nourriture pour les herbivores : l'animal peut s'y construire un nid et rester au sec.

Pour améliorer la survie de l'animal capturé mais aussi pour augmenter l'attractivité des pièges (certaines espèces se font capturer du simple fait de leur comportement exploratoire), un appât est appliqué au fond du piège. Cet appât attire les animaux par son odeur et leur fournit aussi un apport nutritionnel. Il est composé d'une petite boule de 1 cm³ constituée d'un mélange de pâte d'arachide, de flocons d'avoine et de quelques gouttes d'huile de sardine dont le caractère appétant permet d'augmenter les probabilités de capture des musaraignes. Un petit morceau de pomme est ajouté dans la boîte-dortoir pour fournir aux animaux capturés une réserve d'eau.

Les pièges sont appâtés, armés et posés horizontalement sur le sol, l'ouverture orientée de façon aléatoire. Installés le soir, ils sont laissés sur le terrain durant la nuit et relevés le lendemain matin, de bonne heure pour amoindrir encore le risque de mortalité et pour éviter que les animaux, enfermés trop longtemps, finissent par ronger le polypropylène et par s'enfuir. En cas de pluie, on veillera à changer l'appât non consommé et la garniture lors d'une réutilisation pour une autre nuit de piégeage afin d'éviter le développement de moisissures.

2. Essai et application

La boîte-dortoir en polypropylène se révélant légère et pratique d'utilisation, il restait à vérifier sur le terrain son efficacité à assurer la survie des animaux. Pour cela, nous avons réalisé un piégeage de micromammifères, en automne 2003 et 2004 dans différents boisements :

-Sans boîte-dortoir, au cours de 544 nuits pièges, sur 8 sites, nous avons capturé 30 animaux dont 8 ont été trouvés morts soit 27% de mortalité.

-Avec la boîte-dortoir en polypropylène, au cours de 1700 nuits pièges, sur 10 sites, nous avons capturé 208 animaux dont 3 ont été trouvés morts soit 1,4 % de mortalité.

Ces résultats montrent donc l'efficacité de l'utilisation de la boîte-dortoir en polypropylène pour diminuer le taux de mortalité des micromammifères capturés.

Ces boîtes-dortoirs sont utilisées pour les piégeages dans le programme de recherches ECORURB²⁵ dans le cadre du travail de thèse de S. Croci. Ce programme vise, entre autre, à évaluer l'effet de l'urbanisation sur les communautés de micromammifères présentes entre les différents petits boisements. Il implique un suivi pendant 10 ans des sites et donc une perturbation minimale des populations étudiées. Le protocole nécessite d'utiliser un grand nombre de pièges : nous avons choisi de poser 5 lignes de 34 pièges, soit 170 pièges, par site en soirée et de les relever le lendemain matin pour les reposer dans un autre site le soir même. De plus pour limiter la durée de notre recensement, deux sites sont échantillonnés par nuit sur un total de 10 sites. Les boîtes-dortoirs résistent bien aux nombreuses manipulations.

²⁵ ECORURB = ECOlogie du RUral vers l'URBain

Conclusion

Cette nouvelle boîte-dortoir présente l'avantage, par rapport à celle, classique, en bois, d'être légère et simple d'utilisation ce qui facilite la manutention. Lors des piégeages, elle fournit un abri aux micromammifères capturés et les maintient plus facilement en vie. Elle contribue ainsi à ne pas trop affecter les populations échantillonnées qui sont souvent constituées de peu d'individus, et elle présente donc un certain intérêt lors de suivis à long terme. Nous envisageons des améliorations supplémentaires pour faciliter le remplacement de l'appât en cas de pluie.

Bibliographie

Aubry J (1950) Deux pièges pour la capture des petits rongeurs vivants. *Mammalia*, 14 : 174-177.

Guédon G, Bélaire M, Pascal M (1990) Comparaison de l'efficacité de cinq pièges non vulnérants à l'égard de la capture du Campagnol provençal (*Pitymys duodecimcostatus* de Sélvs - Longchamps, 1839). *Mammalia*, 54, 137-145.

Le Louarn H, Quéré JP (2003) Les rongeurs de France. INRA Editions Paris. 256p

Spitz F (1963) Echantillonnage des populations de petits mammifères. *La Terre et la vie*, 17 : 203-207.

Consulter le site suivant :

ECORURB, programme de recherche ECOlogie du RUral vers l'URBain, (2003-2012) Comprendre les effets de l'urbanisation sur la biodiversité locale et sur l'émergence de risques biologiques. [Consulté en octobre 2006]. <http://rennet.rennes.inra.fr/ecorurb/>



Mulot sylvestre (Photo © Yann Rantier)

Méthodes d'estimation des dégâts causés par les insectes ravageurs des graines de conifères

Alain Chalon²⁶

Résumé : Les insectes ravageurs attaquent les graines de conifères ; les dégâts provoqués n'étant pas visibles à l'œil nu, il a fallu mettre au point une méthode d'estimation spécifique à ces ravageurs. Le choix du peuplement, l'échantillonnage et la désarticulation des cônes, le tri densimétrique et le tri radiographique des graines sont les principales étapes menant à cette estimation des dégâts. Cette méthode permet de suivre l'évolution des populations de ces insectes dans l'espace et dans le temps. Une amélioration dans la méthode est envisagée : l'utilisation d'un appareil à rayons X couplé à un scanner digital.

Mots clés : Cèdre, Ravageurs des graines, tri densimétrique, radiographie, taux d'infestation, *Megastigmus pinsapinis*, *Megastigmus schimitscheki*.

Introduction

Les insectes ravageurs des graines (**Photo 1**) peuvent provoquer des dégâts très importants dans les vergers à graines de conifères et dans les peuplements naturels (Roques, 1983). Certaines années, ils sont responsables de la destruction de plus de 80% des graines viables entraînant des pertes de revenus pour les producteurs de graines et une diminution de la régénération naturelle dans les peuplements attaqués. Ces insectes et leurs dégâts sont cependant peu visibles pour un observateur non averti. En effet, on ne peut les voir voler autour de leurs arbres hôtes que pendant les quelques semaines (en général 3 ou 4) que dure leur phase adulte. Ils sont par ailleurs de petite taille (3 à 4 mm) et généralement d'une couleur qui se confond avec la végétation. Le reste de leur cycle biologique se passe à l'état d'oeuf ou de larve dans les graines où ils se nourrissent des tissus qu'elles contiennent. La simple observation visuelle des graines ne permet pas non plus de détecter leur présence dans celles-ci. Ces insectes ne font pas de dégâts sur les parties apparentes de l'arbre (tronc, branche, aiguille, cône) et sont donc difficilement décelables.

Ces particularités font qu'il n'est pas possible d'utiliser les méthodes visuelles classiques pour estimer les dégâts causés par ces insectes, il a donc fallu développer des méthodes spécifiques. Nous illustrerons ces méthodes en décrivant plus particulièrement la méthode utilisée à l'Unité de Recherches Forestières Méditerranéennes pour l'étude des insectes ravageurs des graines de Cèdre (Fabre 1986, 1989) et nous indiquerons à chaque étape les modifications nécessaires pour adapter le protocole à d'autres ravageurs des graines.



Photo 1 : *Megastigmus pinsapinis*, ravageur des graines de Cèdre

²⁶ INRA Recherches forestières méditerranéennes, Domaine Saint-Paul, Site Agroparc - 84914 Avignon Cedex 9
☎ 04 32 72 29 84 alain.chalon@avignon.inra.fr

1. Description de la méthode

L'estimation des dégâts causés par les insectes ravageurs des graines peut être utilisée pour répondre à plusieurs types de questions telles que la simple détection de la présence des ces insectes, le suivi de leurs populations ou l'étude de leur dispersion. Le protocole d'étude pourra varier selon la question posée mais il comportera en général les 5 étapes suivantes.

1.1 Choix du peuplement et de la période d'échantillonnage

La sévérité des dégâts causés par ces insectes est généralement exprimée comme un taux d'infestation des graines (pourcentage de graines infestées). Ce taux dépend à la fois du nombre d'insectes présents l'année de l'estimation et du nombre de graines disponibles la même année. En conséquence, un taux de dégât faible peut indiquer une faible population d'insectes (peu d'individus) ou une forte production de graines (phénomène de « satiété »). Il faut donc tenir compte de ces 2 facteurs pour avoir une bonne estimation des dégâts dans un peuplement ou dans une région. Pour cela il faudra donc : (1) faire une estimation de la fructification en même temps que l'échantillonnage des graines, (2) faire des estimations durant plusieurs années pour échantillonner des années de bonne fructification et des années de faible fructification, (3) faire des échantillonnages dans des peuplements qui ont des taux de fructification différents pour une année donnée si le but de l'échantillonnage est d'avoir une estimation des dégâts dans une région. En règle générale, une étude préliminaire de la distribution spatiale du taux d'infestation permettra de mieux définir le plan d'échantillonnage. Le choix de la période d'échantillonnage est aussi important: celui-ci doit se faire au plus tôt 3 mois après la période de ponte pour que les larves aient eu le temps d'atteindre leur taille maximale, et avant l'ouverture des cônes et la chute des graines. Chez le Cèdre, cette période correspond à l'automne de l'année n+2 (l'année n étant l'année de la floraison). A ce moment là, les larves sont dans les graines depuis environ 18 mois, les cônes commencent à s'ouvrir naturellement et sont donc plus faciles à décortiquer.

1.2 Échantillonnage des cônes

La taille et la forme des cônes ainsi que leurs position et orientation dans l'arbre peuvent avoir une influence sur le taux d'attaque. Chez le Cèdre, on observe que les cônes du sommet de l'arbre sont plus attaqués que ceux du bas. Il faut donc prendre en compte ces facteurs lors de l'échantillonnage des cônes. On prend généralement un minimum de 10 cônes par arbre, répartis sur l'ensemble de l'arbre (en hauteur et en orientation) et de taille et de forme différente si possible. L'échantillonnage se fait sur un minimum de 5 arbres jugés représentatifs de la production moyenne du peuplement mais là encore, une étude préliminaire de la distribution spatiale du taux d'infestation à l'intérieur de l'arbre et entre les arbres permettra de mieux définir le plan d'échantillonnage.

1.3 Extraction et tri des graines

L'extraction des graines s'effectue de manière manuelle au laboratoire. S'ils ne sont pas assez ouverts, les cônes peuvent être conservés dans l'eau pendant au moins 24 heures puis séchés à l'air libre. Les cônes sont ensuite désarticulés, les graines se trouvant à l'intérieur sont désaillées puis on sépare celles de petite taille (graines avortées précocement) et celles de taille normale. Ces graines sont comptées, mais ne sont conservées que les graines de taille normale. Ces dernières sont soumises à un tri densimétrique dans de l'alcool éthylique à 96% en volume. Grâce à ce tri on sépare les graines saines (graines contenant un embryon végétal) plus denses qui tombent au fond du récipient et les graines vaines (vides à cause d'un avortement tardif ou parasitées) qui surnagent. Chez d'autres espèces de conifères le tri

densimétrique n'est pas encore mis au point, ce qui nécessite de radiographier toutes les graines.

Il faut prendre quelques précautions lors de la phase d'extraction et de tri des graines. En particulier, il est essentiel que les cônes et les graines restent autant que possible dans des conditions « naturelles » de température et d'humidité. Ceci implique de désarticuler les cônes par petites quantités et de remettre les graines après le tri dans les conditions naturelles. En effet, si les graines ou les cônes sont conservés trop longtemps à des températures trop chaudes pendant l'hiver, le développement larvaire risque d'être perturbé et d'entraîner une forte mortalité à ce stade ou bien l'émergence précoce des individus avant le printemps.

1.4 Radiographie rayons X

Les graines vaines sont disposées sur un film plastique transparent préalablement collé sur un châssis métallique de 29 x 26 cm comportant 5 séparations longitudinales. Ces plaques rangées dans une boîte sont transportées à l'Unité de Zoologie Forestière du centre Inra d'Orléans pour être radiographiées avec un appareil de radiographie X de type Faxitron. Un Film Kodak industrex M100 24 x 30 est disposé à plat dans l'appareil et la plaque posée dessus. Les graines sont exposées aux rayons X pendant 2 minutes avec un voltage de 20 kv. Pour d'autres espèces le temps d'exposition et le voltage peuvent varier. Le développement du film se fait de façon automatique ; le temps d'exposition dépend du type de film utilisé. Dans le cas du papier Kodak Industrex M100, le temps d'exposition est de 6 minutes.

Cette phase de radiographie doit se faire dans des conditions de sécurité spécifiques à l'utilisation des appareils à rayons X. La pièce est équipée d'un voyant indiquant que l'appareil est en cours d'utilisation. L'appareil lui-même est pourvu d'une porte étanche assurant une sécurité contre les rayons et d'un voyant qui, lorsqu'il est allumé, signale que la radiographie est en cours. Un badge permettant de détecter le rayonnement doit être porté par les utilisateurs. Le bon fonctionnement et la sécurité de l'appareil font aussi l'objet de contrôles réguliers.

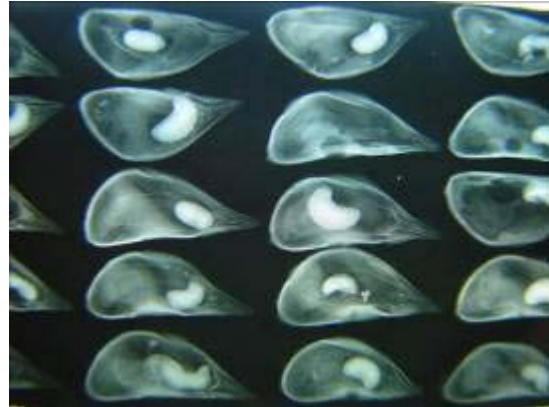


Photo 2 : radiographie X de graines parasitées (larve blanche) ou vides

1.5 Estimation des taux d'infestation

Le comptage des différents types de graines s'effectue en plusieurs étapes :

1. après désarticulation, on sépare les graines de grande taille (GT) de celles de petite taille (PT) ;
2. le tri densimétrique sépare les graines saines (GS) des graines vaines ;
3. le tri radiographique (**Photo 2**) permet de séparer, parmi les graines vaines, les graines vides (GV) de celles parasitées (GP).

Lors des 3 étapes, on estime différents pourcentages. Dans la première étape, le taux de graines de grande taille par rapport à celui des graines de petite taille donne une estimation du pourcentage d'avortement précoce des graines. Pour la deuxième étape, on peut estimer le pourcentage de graines saines et de graines vaines (vides + parasitées). Enfin, la troisième étape permet l'estimation des pourcentages de graines vides et parasitées. Le tri densimétrique, lorsqu'il est bien réalisé, ne laisse passer qu'une très petite quantité de graines saines mais il n'oublie aucune graine vaine.

Deux types de taux d'attaque peuvent être calculés suivant l'hypothèse faite sur le mode d'infestation des insectes. Dans la première hypothèse, on considère que les insectes ne peuvent infester que les graines qui allaient se développer en graines saines, dans ce cas le taux d'infestation est calculé comme suit :

$$(GP * 100) / (GS + GP)$$

Dans la deuxième hypothèse, on considère que les insectes peuvent infester et se développer dans les graines saines et dans les graines vides. Dans ce cas, le taux d'infestation se calcule comme suit :

$$(GP * 100) / GT$$

Le choix du mode de calcul dépendra de la connaissance de la biologie et du développement de l'insecte. Lorsque le taux de graines vides est important, la différence entre les deux modes de calcul des taux d'infestation peut être importante.

Pour déterminer le taux d'infestation par espèce de ravageur ou la proportion de chaque sexe dans une espèce donnée, les graines infestées sont placées en conditions naturelles dans des éclosiers. Les émergences seront ensuite suivies dans ces éclosiers à partir du début du printemps. Il faut noter que les graines infestées pour lesquelles on ne souhaite pas suivre l'émergence des insectes doivent être détruites après radiographie de façon à éliminer les risques d'introduction d'insectes car les graines simplement jetées à la poubelle peuvent être transportées sur de longues distances et créer de nouveaux foyers d'infestation. On pourra dans ce cas brûler ou étuver les graines après radiographie.

Les résultats des comptages et des émergences sont stockés dans des fichiers réalisés sous tableur (**Tableau 1**), puis sont transférés dans une base de données. Des données de positionnement (longitude et latitude) des arbres et des peuplements échantillonnés sont ensuite rajoutées pour constituer des cartes sous SIG (Système Information Géographique).

2. Résultats et exemples d'application

Nous utilisons, dans notre unité, depuis 1994 ce protocole d'estimation des dégâts dus aux insectes ravageurs des graines pour estimer les taux d'infestation des graines dans les peuplements de Cèdre du Sud-est de la France (Fabre et *al.* 1994, 2004). Nous avons suivi la dynamique des populations de *Megastigmus pinsapinis*, un ravageur des graines de Cèdre de l'Atlas probablement introduit en France en même temps que son hôte à la fin du 19^{ème} siècle, et l'invasion des peuplements de la région par une autre espèce, *Megastigmus schimitscheki*, introduite de Turquie au début des années 90. Des échantillonnages de cônes sont réalisés chaque année dans divers peuplements du Sud-est (**tableau 1**). Avec cette estimation des dégâts nous suivons l'évolution des populations dans l'espace (**figure 1**) et dans le temps.

A titre d'exemple, en 2005 nous avons récolté 1220 cônes dans une trentaine de peuplements. Nous avons extrait 88732 graines de grande taille et 66514 de petite taille. Le tri densimétrique (notamment chez le Cèdre) élimine les graines saines qui étaient au nombre de 57091, avec cette étape nous économisons du temps et des manipulations. Nous avons radiographié 31641 graines.

STATION	Date de récolte	Nb CONES	DESARTICULATION		TRI DENSIMETRIQUE		TRI RADIOGRAPHIQUE			% ATT/GT
			GRAINES GT	GRAINES PT	GRAINES SAINES	GRAINES VID/PAR	GRAINES SAINES	GRAINES VIDES	GRAINES PARASITEES	
F.D. VENT. 7	9/11/04	30	3186	918	1758	1428	4	157	1267	39,77
F.D ST-LAMBERT .1	9/11/04	30	3241	617	2339	902	18	284	600	18,51
VENTOUX 800M SUD	9/11/04	30	3204	1072	1504	1700	9	207	1484	46,32
F.D. (C) VENASQUE	17/11/04	30	3029	1676	509	2520	21	398	2101	69,36
MENERBES	24/11/04	30	1701	1954	514	1187	11	155	1021	60,02
LUBERON CRETE	24/11/04	30	2735	1350	2195	540	2	344	194	7,09
GRAND LUBERON	7/12/04	30	2288	2064	1486	802	3	161	638	27,88
F.D. DE LURE	16/11/04	30	3551	614	2660	891	16	366	509	14,33
SISTERON	16/11/04	30	3036	1766	1403	1633	53	595	985	32,44

Tableau 1 : Différentes étapes de tri des graines pour l'estimation du taux d'infestation dans des peuplements du S.E. de la France en 2004

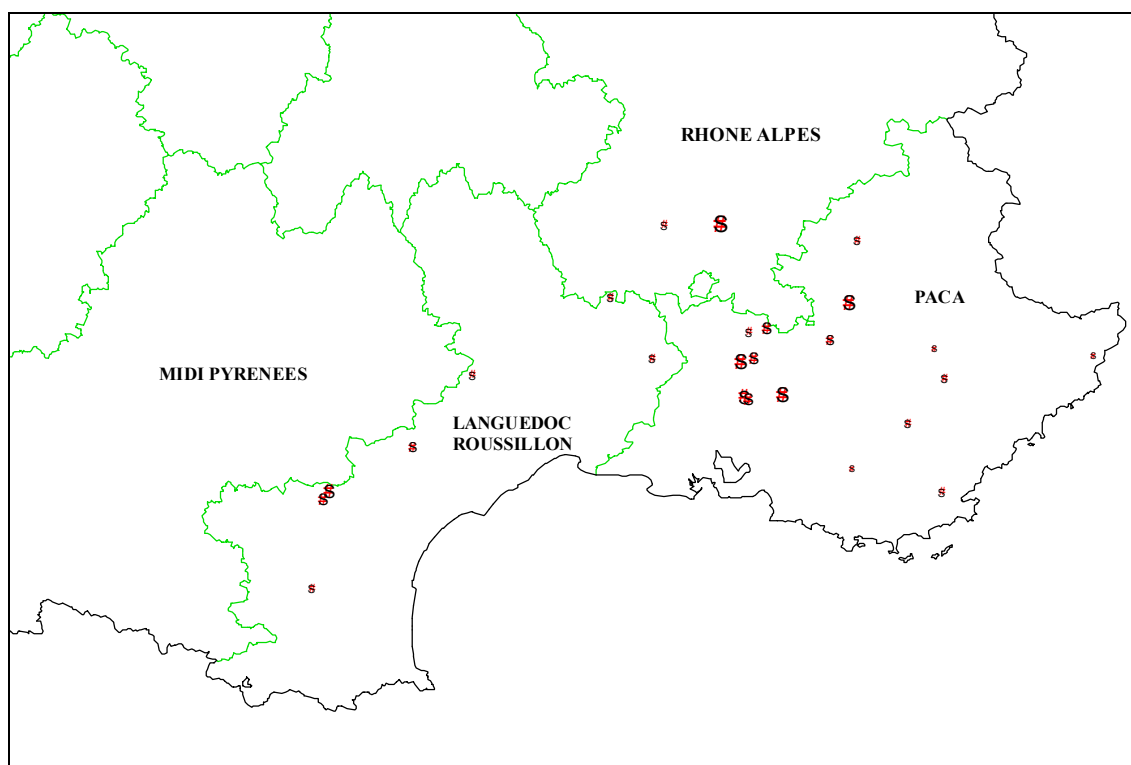


Figure 1 : Taux d'infestation des peuplements de Cèdre du S.E. de la France en 2005

Conclusion

L'estimation des dégâts des ravageurs des graines présentée dans ce document est l'adaptation au Cèdre d'une méthode bien établie et utilisée dans de nombreux pays. Elle permet d'échantillonner des nombres assez importants de graines avec une bonne précision, notamment grâce à l'utilisation du tri densimétrique. Une voie d'amélioration consisterait en l'utilisation d'un appareil²⁷ à rayons X couplé à un scanner digital qui remplace le film photographique et qui enregistre les images directement sur ordinateur. Ensuite, un logiciel

²⁷ Dans un futur proche l'URFM pourrait se doter d'un tel appareil.

permet de visualiser les radiographies, de les analyser et de les enregistrer. En éliminant la phase du film, on réduit grandement le temps de manipulation qui consistait à coller les graines sur des cadres métalliques, on réduit les coûts de fonctionnement liés à l'achat et au développement des films photographiques et on supprime les problèmes liés au traitement des déchets (films et produits de développement). On envisage par la suite le développement de logiciels de traitement d'images pour compter automatiquement les graines saines, vides et parasitées sur l'image provenant du scanner.

Remerciements

Je remercie Jean Paul Raimbault de ses conseils avisés lors de l'utilisation de l'appareil à rayons X et de la développeuse de radiographie ainsi que Jean Noël Candau de son aide à la rédaction de cet article.

Bibliographie

- Fabre JP (1986) Dynamique des populations de *Megastigmus suspectus* var. *pinsapis* Hoff. (Hym. Torymidae) dans les cédraies du Sud-est de la France. *In*: Roques A (ed) Proceedings of the 2nd Conference of the IUFRO Cone and Seed Insects Working Party S2.07.01, pp 127–145. Institut National de la Recherche Agronomique, Versailles, France
- Fabre JP (1989) Distribution spatiale de *Megastigmus suspectus* var. *pinsapis* Hoffm. (Hym. Torymidae) sur *Cedrus atlantica* Manetti dans un peuplement du Sud-Est de la France. *In*: Miller G (ed) Proceedings of the 3rd Conference of the IUFRO Cone and Seed Insects Working Party S2-07-01, pp 101–116. Forestry Canada, Pacific Forestry Centre, Victoria, British Columbia
- Fabre JP, Alptekin CU, Chalon A (1994) Importance des attaques des graines de Cèdre du Liban, *Cedrus libani*, en Turquie par *Megastigmus schimitscheki* (Hymenoptera Torymidae) et risques d'extension de cet insecte au Cèdre de l'Atlas, *Cedrus atlantica*. *Annales des Sciences Forestières du Maroc* 27: 566–575
- Fabre JP, Auger-Rozenberg MA, Chalon A, Boivin S, Roques A (2004) Competition between exotic and native insects for seed resources in trees of a Mediterranean forest ecosystem. *Biological Invasions* 6(1) :11-22
- Roques A (1983) Les insectes ravageurs des cônes et graines de conifères en France. INRA, Versailles, France, 138 pp

Suivi de la prolifération d'algues avec la sonde spectrofluorimétrique

Pascal Perney²⁸

Résumé : La protection des écosystèmes aquatiques et leur restauration constituent un enjeu essentiel en terme d'environnement, de ressource en eau et d'aménagement du territoire. Des micro algues (phytoplancton) présentes dans les grands lacs alpins peuvent être gênantes. Il faut donc surveiller ces espèces et leur dynamique pour intervenir rapidement et prévenir les risques liés à leur propagation. La compagnie allemande Moldaenke a développé une sonde spectrofluorimétrique immergeable (BBE Fluoroprobe) pour réaliser une surveillance rapide et efficace des plans d'eau par la mesure de la fluorescence de la chlorophylle a, pigment présent dans le phytoplancton, en qualité et en quantité variables selon les espèces. Ces données sont utilisées dans le suivi des grands lacs assuré par la Station d'Hydrobiologie Lacustre de l'Inra de Thonon-les-Bains

Mots clés : Sonde spectrofluorimétrique, communautés algales, fluorescence, cyanobactéries, suivi de la qualité des eaux des lacs.

Introduction

Certaines espèces de cyanobactéries présentent un caractère toxique ; les risques engendrés par la prolifération de ces microorganismes en période estivale, est un problème récurrent qui influe sur le classement des zones de baignades. Un suivi régulier permet d'alerter les gestionnaires de plans d'eau et les élus en cas de concentration trop élevée. La station Inra de Thonon en collaboration avec des organismes tel que la CIPEL²⁹, le SILA³⁰ et le CISALB³¹, réalise le suivi de ces grands lacs. La mesure de la chlorophylle est un moyen simple et rapide de détecter la présence et l'abondance des phytoplanctons. Cette mesure est réalisée au laboratoire depuis des années par des méthodes d'analyses donnant des résultats précis, mais différés, représentant une lourde charge de travail. A la suite de l'apparition massive à la fin des années 1990 dans le lac du Bourget d'une cyanobactérie toxique, *Planktotrix Rubescens*, l'équipe EMA³² s'est dotée d'une sonde spectrofluorimétrique qui donne un résultat immédiat, permettant la réactivité des organismes de contrôle face à un pic de concentration, et augmentant la précision des prélèvements d'échantillons ponctuels.

1. Les acteurs

1.1 Le phytoplancton

La connaissance des espèces en présence (**photo 1**) et de leur abondance est un élément biologique fondamental pour appréhender la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques. Des dérèglements, même infimes, peuvent avoir un impact sur l'écosystème entier, zooplancton, poissons... On parle alors de dystrophie (See et al. 2005). Cette prolifération donne naissance à des dépôts organiques qui sédimentent sur les fonds, provoquant l'appauvrissement en oxygène et donc la réduction des espèces qui y vivent. Des espèces comme les cyanobactéries peuvent provoquer des lésions au foie (Ressom et al. 1994) et des troubles neuronaux. (*Planktothrix*, *Anabaena*, *Nostoc*)

²⁸ INRA UMR CARRTEL - Centre Alpin de Recherche sur les Réseaux Trophiques des Ecosystèmes Limniques - Station d'Hydrobiologie Lacustre - 75 av de Corzent - 74200 Thonon-les-bains ☎ 03 80 69 32 19 perney@thonon.inra.fr

²⁹ CIPEL : commission internationale pour la protection des eaux du Léman

³⁰ SILA : Syndicat Mixte du Lac d'Annecy

³¹ CISALB : Comité Intersyndical d'Assainissement du Lac du Bourget

³² EMA : écologie microbienne aquatique



Photo 1 : Exemples de formes de phytoplancton rencontrées dans les lacs alpins (d'après Inra SHL Thonon les bains de gauche à droite : *Fragillaria crotonensis*, *Cryptomonas*, *Planktothrix rubescens*, *Dinobryon divergens*, *Eudorina elagans*, *Asterionella formosa*)

	Longueur d'onde d'excitation (nm)	
Chlorophycées	450 nm	<i>Eudorina elagans</i>
Cyanophycées	610 nm	<i>Planktothrix rubescens</i>
Diatomées	525 nm	<i>Asterionella formosa</i>
Cryptophycées	570-590 nm	Rhodomonas minuta
Substances colloïdales	370 nm	
Ré-émission lumineuse	680 nm	

Tableau 1 : Classes de phytoplancton lacustre et longueur d'onde d'excitation

1.2 La lumière est un des facteurs clés qui conditionne la présence du phytoplancton au voisinage de la surface (Anneville et *al.* 2002). La répartition des classes algales s'explique par la quantité et qualité de lumière perçue par les organismes. Les saisons et donc les conditions climatiques ont aussi un impact puisque la température, la transparence et la structure de la colonne d'eau ne sont pas les mêmes en été et en hiver. Précisons aussi que la masse d'eau agit comme un filtre sur les rayons lumineux ce qui laisse pénétrer différentes longueurs d'onde à plusieurs profondeurs. Les Chlorophycées se situent en surface. Les Diatomées tolèrent d'importantes variations thermiques et une faible intensité lumineuse. Les Cyanobactéries nécessitent moins de lumière car elles possèdent plus de pigments dont certains leur permettent d'utiliser les longueurs d'ondes plus en profondeur.

1.3 Les nutriments tels que nitrates, silicates et phosphates sont des indicateurs de prolifération planctonique, le phosphore reconnu comme facteur limitant de l'eutrophisation et donc comme un paramètre primordial de la qualité des eaux lacustres (Falciatore et *al.*, 2002), il est principalement présent sous forme de PO_4^{3-}

L'azote est présent dans les écosystèmes d'eau douce sous de nombreuses formes : N_2 , NH_4^+ (ammonium), NO_2^- (nitrites), NO_3^- (nitrates) biodisponibles.

1.4 La chlorophylle a (chl *a*), est un pigment photosynthétique présent dans toutes les espèces du phytoplancton, eucaryotique (algues) et procaryotique (cyanobactéries). Nous utilisons plusieurs méthodes de laboratoire pour extraire et doser ce pigment :

- la spectrophotométrie qui mesure la densité optique ;
- la fluorimétrie qui mesure la fluorescence des pigments ;
- la chromatographie (HPLC)³³ qui sépare les différents composés organiques, est utilisée pour déterminer les pigments et les concentrations en toxines ;
- les comptages phytoplanctoniques, par observation au microscope.

Ces méthodes représentent une charge de travail importante et donne des résultats précis mais différés, réduisant la réactivité face à des seuils élevés (Gregor et *al.*, 2004). Les sondes multiparamètres, la sonde spectrofluorimétrique palient ce problème mais elles sont coûteuses.

³³ Chromatographie liquide haute performance

2. La sonde spectrofluorimétrique BBE Fluoroprobe

Les sondes spectrofluorimétriques analysent et mesurent la fluorescence de la chlorophylle *a* des différentes espèces par une excitation lumineuse directement dans l'eau. Elles permettent l'étude du phytoplancton en temps réel et en continu dans la colonne d'eau. Ces sondes sont reliées à un micro-ordinateur pour visualiser les données et leurs représentations graphiques sous forme de profils verticaux.

2.1 Caractéristiques techniques de la sonde spectro fluorimétrique immergeable (BBE Fluoroprobe) développée par la compagnie allemande Moldaenke. Elle utilise la lumière, l'eau et le phytoplancton pour déterminer la présence et la quantité des classes d'algue avec 5 diodes qui émettent à différentes longueurs d'onde pour exciter les pigments de chaque classe de phytoplancton (Moldaenke, 2002) Avant utilisation, la sonde est calibrée par le constructeur ce qui s'effectue t en plusieurs étapes. Il faut d'abord vérifier la qualité et la régularité du flux de lumière émise par les LEDs (diodes à lumière monochromatique) ; ensuite, il faut soustraire deux autres signaux provenant :

- de la sonde elle même (électronique et système optique) par une lecture d'eau désionnisée,
- des substances fluorescentes dans l'eau qui ne sont pas des algues, par une lecture d'eau ultra filtrée.

A l'étape suivante on mesure avec la sonde des produits qui fluorescent à la même longueur d'onde que les classes d'algues que l'on veut repérer ; ce sont les *fingerprints* ou empreintes de chaque classe algale ; ces résultats sont enregistrés. Sur les 5 diodes disponibles, on peut choisir de calibrer une classe pour une étude ou un suivi ; c'est ce que nous avons réalisé pour l'étude des cyanobactéries dans le suivi du lac du Bourget (Leboulanger et *al.* 2002). Les concentrations seront calculées à partir de ces paramètres de calibration.

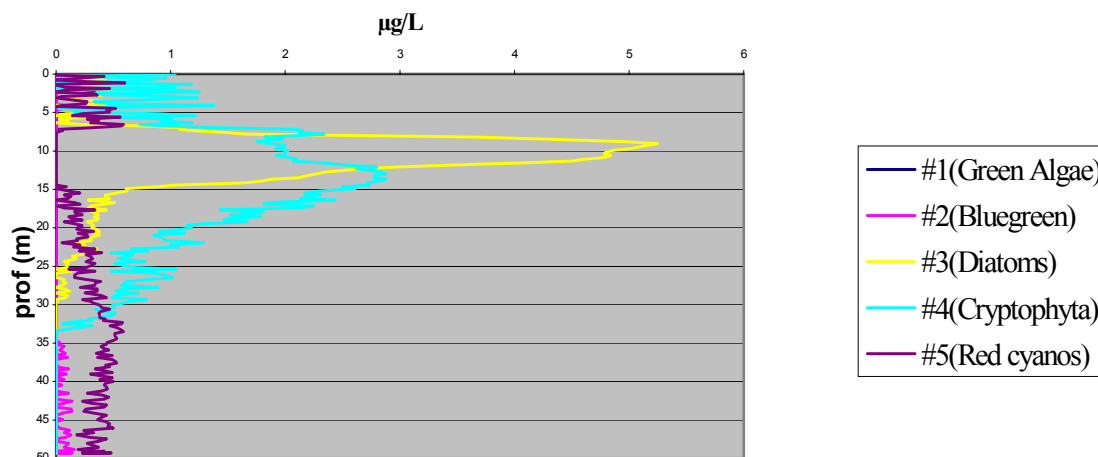


Photo 2 : sonde BBE Fluoroprobe

2.2 Utilisation sur le terrain

Nous réalisons mesures et prélèvements sur les lacs (sondes de lumière, sondes multiparamétriques...) à des profondeurs définies pour optimiser l'échantillonnage et les analyses et estimer l'état de la colonne d'eau. Pour utiliser la sonde, on la suspend au câble d'un treuil, on branche les câbles de connexion à l'ordinateur, puis on l'immerge lentement jusqu'à la profondeur souhaitée (100 m maximum).

Les diodes allumées excitent les pigments aux différentes longueurs d'ondes des classes algales recherchées (**tableau 1**) ; la ré-émission lumineuse des algues est captée par une cellule photo-électrique à 680 nm. Au fur et à mesure de la descente, la répartition des communautés algales et les pics éventuels (**graphique 3**) s'affichent à l'écran, permettant ainsi de faire un prélèvement à la profondeur observée et de mieux estimer la quantité et la qualité d'algues toxiques. La chlorophylle *a* totale est déterminée par la somme des multiples groupes recensés ; les concentrations sont données en μg équivalent de chl *a*/litre. Des capteurs donnent la température de l'eau et déterminent les profondeurs d'observation. Ces résultats pourront être mentionnés dans les rapports annuels sur l'état des lacs remis aux gestionnaires des plans d'eau. Ils sont aussi publiés dans des revues spécialisées.



Graphique 3 : résultat d'une mesure (observation d'un pic de diatomées à 10 m)

Conclusion

D'après Leboulanger et *al.* (2002), la détermination de la chl *a* basée sur la fluorescence *in vivo* (avec une sonde submersible) est une méthode de choix pour la surveillance régulière de la biomasse phytoplanctonique. Les résultats sont précis pour l'aspect qualitatif car leur corrélation avec les observations en laboratoire (taxonomie) est bonne, mais la méthode doit être affinée pour l'aspect quantitatif. Les comparaisons avec les comptages au microscope ou l'utilisation d'autres sondes BBE, ne donnent pas toujours les mêmes valeurs, d'où l'importance de la calibration. Les résultats exportables sous Excel, ne sont pas faciles à exploiter ou à transposer d'une sonde à l'autre à cause des paramètres liés à la sonde (**cf. 2.1**). Les proliférations phytoplanctoniques font parties des sujets qui préoccupent les gestionnaires et les élus en charge de plan d'eau. Les études récentes ont mis en évidence le rôle des nutriments phosphorés et azotés dans la production de biomasse par les algues. Les objectifs de réduction des intrants passent par une meilleure compréhension des mécanismes de fonctionnement des écosystèmes ; pour cela il faut poursuivre le développement et l'affinage des méthodes de surveillance rapide et efficace, telle que la sonde BBE Fluoroprobe. La poursuite des mesures simultanées, une meilleure exploitation des données et la corrélation avec les données obtenues en laboratoire, valoriseraient mieux le matériel et les résultats.

Bibliographie

- Anneville O, Ginot V, Druart JC, Angeli N (2002) Long term study (1974-1998) of seasonal changes in the phytoplankton in lake Geneva: a multiple table approach. *Journal of plankton research*. 24(10) 993-1007.
- Falciatore A, Bowler C (2002) Revealing the molecular secrets of marine diatoms. *Annual Revue of. Plant Biology*. 53, 109-130.
- Gregor J, Marsalek B (2004) Freshwater phytonplankton quantification by chlorophyll a: a comparative study of in vitro, in vivo and in situ method. *Water research* 38,517-522
- Leboulanger C, Dorigo U, Jacquet S, Le Berre B, Paolini G, Humbert JC (2002) Application of a submersible fluorometer for rapid monitoring of freshwater cyanobacterial bloom: a case of study. *Aquat Microb Ecol* 30,83-89
- Moldaenke (2002) The bbe Fluoroprobe. Software manual .31 pp
- See JH, Campbell L, Richardson TL, Pinckney JL, Shen R, Norman L, Guinasso jr. (2005) Combining new technologies for determination of phytoplankton community structure in the northern gulf of Mexico. *J. Phycol.*41, 305-310.

Notations de phénologie foliaire sur arbres forestiers

³⁴ Marc Faucher, Cédric Meslier, Dominique Veisse, Michel Verger, Jean-Charles Bastien

Résumé : Les gelées tardives au printemps endommagent fréquemment les arbres. Les forestiers doivent donc disposer de matériels de reboisement ayant un rythme de croissance naturelle qui les mettent à l'abri de tels aléas. Aussi, ils recherchent des arbres qui débourrent tard au printemps, tout en conservant une vigueur satisfaisante malgré une durée de végétation plus courte.

Pour apprécier ce caractère tardif, nous réalisons une ou plusieurs notations de débourrement qui sont de deux sortes : passages multiples et fréquents en mode binaire (jusqu'à 20 passages de type débourré ou pas débourré) ou nombre de passages réduits mais en classes multiples (5 à 7 classes selon les espèces). Ces observations effectuées depuis des années dans des programmes d'amélioration génétique, servent à étudier les effets du réchauffement climatique sur les arbres.

Mots clés : débourrement, durée de végétation, dégât de gel

Introduction

Les aires naturelles des espèces forestières sont, sauf exception, d'une étendue considérable. Par exemple sur la côte Pacifique de l'Amérique du Nord, on trouve le Sapin de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) sur des amplitudes de 20° en latitude entre la Californie et la Colombie Britannique (près de 3000 km) et plus de 20° en longitude (1500 km). Par ailleurs cette espèce occupe des étages allant du niveau de la mer jusqu'à 1600 m d'altitude pour la variété *viridis* et jusqu'à 3000 m dans l'est des Rocheuses pour la variété *glauca* (**figure 1**).

Au cours des millénaires passés, la pression de sélection naturelle a donc bien évidemment différencié des écotypes adaptés aux diverses conditions locales : des confins du Mexique avec 400 mm d'eau par an, à la côte Pacifique, froide et très humide, de la Colombie Britannique (+ de 3000 mm d'eau par an).

En France, le Douglas est utilisé en reboisement et le premier travail des "sélectionneurs" est donc de déterminer les spécificités de chacun de ces écotypes afin de proposer aux reboiseurs des matériels qui répondent au mieux aux conditions du milieu où l'on veut installer les plantations. Parmi les différents critères qui intéressent le forestier, il en est un primordial : c'est la résistance aux gelées printanières, autrement dit l'arrivée tardive du débourrement végétal.

Au-delà de -5, -6°C, tous les bourgeons non dormants, même protégés par leurs écailles, gèlent irrémédiablement. On sait que ces gelées, généralement de faibles amplitudes, agissent d'autant plus que le végétal est dans un état physiologique sensible avec ses bourgeons et (ou) ses pousses gorgées de sève et non lignifiées.



Figure 1 : Aire naturelle de *Pseudotsuga menziesii* (avec limite *viridis* à l'ouest et *glauca* à l'est)

³⁴INRA Amélioration des arbres forestiers – BP 20619 – 45166 Olivet Cedex

☎02 38 41 78 65 Cedric.Meslier@orleans.inra.fr

Ce stade physiologique très sensible pose quelquefois des problèmes. En effet, les espèces à débourrement très précoce (janvier) peuvent échapper à des gels de mai, si elles échappent à ceux de l'hiver, puisque déjà en lignification avancée. A l'inverse, des tardifs peuvent être dans un état physiologique hypersensible lorsque surviennent les gelées.

Bien que le gel ait une incidence sur l'ensemble des bourgeons de l'arbre (avortement, perte de croissance, malformation) le forestier ne s'intéresse qu'à la pousse principale et les notations portent en général sur le bourgeon terminal qui débourne le dernier ou parmi les derniers.

1. Méthodes

On dispose de deux méthodes pour apprécier le débourrement des arbres.

1.1 La notation binaire consiste, selon le pas de temps défini, à visualiser tous les arbres pour leur accorder une note de type : débourré ou non débourré.

Cette méthode relativement simple est cependant très coûteuse puisqu'elle impose le respect strict du pas de temps défini. Ainsi elle peut demander jusqu'à 20 voire 25 passages à cause de l'étalement de la période de débourrement (parfois 45 jours entre les premiers et derniers douglas débourrés !). Couplée à des relevés météorologiques quotidiens, en particulier de la température, cette méthode présente l'avantage de déterminer le nombre de degrés jours qui a induit le débourrement

1.2 La notation en classe consiste pour une espèce végétale donnée, à définir un nombre de classes correspondant à des stades facilement identifiables du débourrement (**figure 2**). Cette méthode permet de passer une seule fois sur un site donné, même si l'idéal est de deux passages à des stades déterminés : un premier lorsque 30 % environ des arbres atteignent le stade 3 et le deuxième lorsque 70 % environ des arbres sont à ce même stade. On « piège » ainsi parfaitement, d'une part les génotypes les plus précoces (pour élimination parce que trop sensibles au gel) et d'autre part les plus tardifs (pour conservation et autres études parce que plus résistants aux gelées). Il faut veiller à une harmonisation parfaite des notateurs dans la définition des stades de débourrement et éviter les dérives de notation

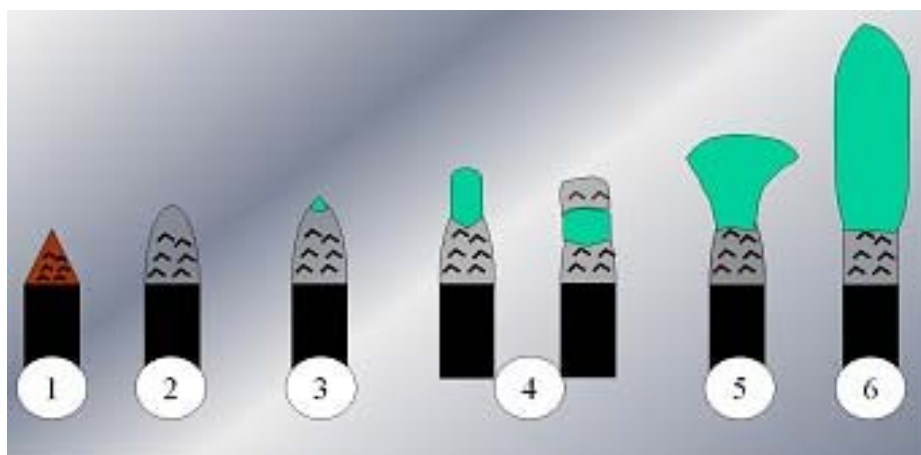


Figure 2 : *Différentes classes de débourrement du Sapin de Douglas*

Légende : 1 = bourgeon dormant (au repos) - 2 = bourgeon gonflé (et ou allongé) - 3 = bourgeon éclaté - 4 = bourgeon en "pinceau fermé" - 5 = bourgeon en "pinceau ouvert" - 6 = pousse en elongation

1.3 Les particularités de mise en œuvre

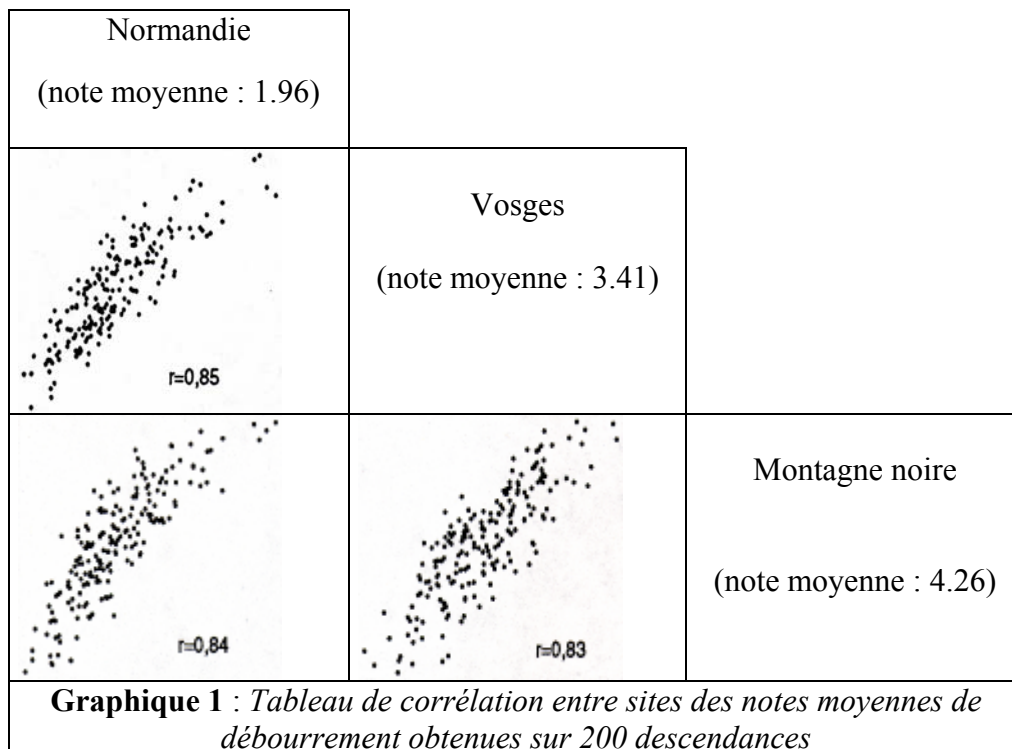
Compte tenu de l'imprévisibilité et de l'évolution du phénomène, deux impératifs s'imposent :

- Une surveillance locale quotidienne d'un échantillon représentatif de l'ensemble des arbres à noter, pour démarrer les notations dans la fenêtre idéale.
- La mise en alerte du personnel nécessaire pour effectuer les mesures en un minimum de temps.

Ces notations décrivent le débourrement de la plupart des espèces forestières usuelles ; mais, nous n'avons pas de méthode pour les espèces à croissance continue telles les *Cupressacées*.

2. Résultats

Pour l'ensemble des espèces forestières courantes, les chercheurs ont constaté une grande stabilité du caractère débourrement, dans l'espace et dans le temps. Ainsi en 1992, pour les 3 sites du même test de Sapin de Douglas installés en Normandie, dans les Vosges et dans la Montagne Noire, nous obtenons d'excellentes corrélations linéaires entre sites pour les 200 descendances en test, bien que les notes moyennes de débourrement ne soient pas tout à fait homogènes (**graphique 1**).



Les chercheurs ont aussi montré une structuration du débourrement pour le Sapin de Douglas et ils ont défini trois grandes zones :

- le nord de l'aire (Colombie Britannique) aux climats rudes dont les origines trouvent en France des conditions de croissance très tôt en saison (nombre de degrés/jours trop rapidement atteint), débourrent trop tôt et se trouvent donc sensibles aux gelées
- la zone centrale (Etat du Washington et Nord de l'Orégon), partie de l'aire aux conditions climatiques les plus proches des nôtres, et qui fournit les génotypes les plus adaptés aux besoins français

- le sud de l'aire (sud Orégon et Californie) aux climats doux et chauds qui produisent des matériels qui ne supportent aucune gelée.

On a également montré que les origines à débourrement précoce font davantage de polycyclisme (plusieurs pousses dans l'année, séparées par des arrêts de croissance), qui, quoique potentiellement intéressant sur le plan de la vigueur au stade juvénile, est plutôt néfaste sur le plan de la qualité du bois car induisant chaque année un pseudo verticille (couronne de branches) supplémentaire donc des nœuds en plus.

Conclusion

Après l'intérêt initial de sélectionner des matériels "résistants" aux gelées tardives puis de les croiser entre eux pour créer des variétés améliorées, il apparaît maintenant que l'évaluation de la phénologie permettra en plus de prédire les aires de répartitions des espèces forestières, confrontées aux conséquences des changements climatiques globaux.

Dans cette perspective, un Groupement de Recherche intitulé « Système d'Information Phénologique pour l'Etude et la Gestion des Changements Climatiques »³⁵ a été créé et qui a comme objectif de constituer une base de données compilant des observations phénologiques réalisées en France par divers organismes de 1880 à nos jours. C'est le parfait exemple d'une relecture par une nouvelle discipline d'observations réalisées lors de la conduite de programmes d'amélioration génétique.

Bibliographie

- Lacaze JF, Tomassone R (1967) Contribution à l'étude de la variabilité infraspécifique du douglas. *Annales des Sciences Forestières*, n°1 volume 24, 85-106
- Birot Y (1972) Propositions sur les moyens pour obtenir du matériel amélioré de reproduction de douglas. Document CNRF, 22p
- Bastien JC, Roman Amat R, Michaud D (1986) Le douglas, in n° spécial « Amélioration génétique des arbres forestiers », *Revue Forestière Française*, 113-117
- Bastien JC, Roman Amat B (1992) Le douglas, in "Amélioration des espèces végétales cultivées", 710-719

³⁵ Pour plus d'informations sur le GDR : consulter le site <http://medias.dsi.cnrs.fr/pheno/>

Tests en laboratoire d'évaluation de la résistance partielle des clones de Peuplier vis-à-vis des rouilles à *Melampsora larici-populina*

³⁶ Jean Gauvin, Daniel Lacan, Patrick Poursat, Michel Verger

Résumé : Les rouilles à *Melampsora larici-populina* sont des ennemis majeurs du Peuplier. Mieux comprendre les mécanismes génétiques de la relation hôte – pathogène et mettre sur le marché des nouveaux clones minimisant l'impact du champignon est un enjeu essentiel pour la populiculture. La sélection de variétés à résistance complète s'est avérée vaine du fait du fort potentiel d'adaptation de l'agent pathogène. Dans l'objectif d'explorer des formes de résistance potentiellement plus durables, des tests en laboratoire d'évaluation de la résistance partielle ont été mis au point par les améliorateurs forestiers de l'Inra d'Orléans. Des protocoles d'inoculation sur disques foliaires excisés permettent d'accéder à trois composantes épidémiologiques clés : la latence infectieuse, le nombre d'urédosores et leur taille.

Ce travail, couplé à des expérimentations en pépinière, des travaux de cartographie génétique et de détection de QTL, permettra d'identifier l'emplacement puis la nature des gènes qui contribuent aux résistances partielles présentes chez le Peuplier.

Mots clés : Peuplier, clones, rouille, résistance partielle, *Melampsora larici-populina*

Introduction

Les Peupliers, de la famille des Salicacées, appartiennent au genre *Populus* qui se divise en six sections botaniques. Bien que ne représentant en France que 230 000 ha (1,3% de la surface boisée), sa forte productivité en fait une espèce d'intérêt majeur pour la filière bois. La bonne aptitude au bouturage généralement observée chez les Peupliers a amené l'homme très tôt à utiliser des « cultivars » (clones). Hélas, cette culture est attaquée par de nombreux ennemis et la faible variabilité génétique du matériel planté (plantations monoclonales, peu de cultivars commercialisés parfois même apparentés) accentue l'importance du phénomène.

Parmi ces ennemis, les rouilles foliaires, maladies qui induisent des défeuillaisons précoces, provoquent de grosses pertes de rendement (jusqu'à 30% sur la croissance) et souvent des mortalités. La rouille à *Melampsora larici-populina* (Mlp) est la plus fréquente et la plus dommageable en France. Elle doit son nom à un cycle hétéroïque combinant une phase de recombinaison (reproduction sexuée) en avril-mai sur Mélèze et une longue période de multiplication végétative sur Peuplier, entre mai et octobre, par production d'urédosores donnant des urédosores à la face inférieure des feuilles.

Durant plusieurs décennies, les améliorateurs ont sélectionné des clones de Peuplier dont la résistance totale fut à chaque fois rapidement contournée par le champignon. Ils s'orientent maintenant vers la sélection de clones sensibles à Mlp mais ne subissant pas de pertes de croissance économiquement dommageables et n'exerçant pas non plus une forte pression de sélection sur l'agent pathogène : autrement dit des clones tolérants porteurs de résistances partielles. Cet article décrit le protocole mis au point pour les étudier.

³⁶ INRA UAGPF, amélioration, génétique et physiologie forestières, Avenue de la Pomme de Pin, Ardon BP 20619 - 45166 Olivet cedex ☎02 38 41 48 41 jean.gauvin@orleans.inra.fr

1. Description du matériel et de la méthode

1.1 Gestion des isolats de Mlp

Ces isolats sont constitués d'urédo-spores et se présentent sous la forme d'une poudre orange. Ils sont conditionnés dans des tubes Eppendorf rangés dans des boîtes à couvercle dont le fond, rempli de chlorure de magnésium, permet de conserver un taux d'humidité de 30%. Afin d'éviter les pollutions, tous les tubes, à l'intérieur d'une boîte, contiennent le même isolat. Les boîtes sont conservées au réfrigérateur à +5° C.

Pour multiplier un isolat, on en prélève 1 à 2 mg que l'on met en suspension dans 10 à 15 ml d'eau osmosée gélosée (0,5 g/L d'agar). Afin d'assurer une bonne homogénéité, on agite le mélange durant 2 minutes. Au préalable, des feuilles du clone 'Robusta', qui a la particularité d'être sensible à toutes les souches de Mlp connues, ont été récoltées. Ces feuilles, placées sur pellicule d'eau (face inférieure en haut) dans une boîte de Pétri, sont alors inoculées par pulvérisation de la suspension d'urédo-spores. La faculté germinative de l'isolat est contrôlée en le pulvérisant sur 2 boîtes de Pétri contenant une pellicule de gélose solide (à 20 g/L d'agar). On compte 24 et 48 h après pulvérisation, au microscope, le pourcentage d'urédo-spores qui ont germé.

Les feuilles de 'Robusta' sont mises en chambre de culture (température de 17 °C et photopériode de 16 heures de jour). Après 10 à 12 jours, les urédo-spores sont récoltées en tapotant les feuilles sur du papier aluminium. L'isolat est pesé, stocké et on en teste la faculté germinative (même méthode que précédemment).

La gestion du stock se fait sur ordinateur grâce à une base de données sous Access.

1.2 Elevage du matériel végétal

Des boutures de 20 à 25 cm, issues de parcs à pieds mères, sont récoltées en hiver, stockées en chambre froide à 4°C puis mises en pot et élevées en serre climatisée. Il est important de surveiller ces plants de manière à éviter tout stress (thermique, hydrique, phytosanitaire) qui induise des variations de comportement vis-à-vis de l'attaque de rouille.

Durant cette étape, il est primordial d'éviter toute pénétration de rouille dans la serre : sas, entrée contrôlée, combinaison pour les agents intervenant dans la serre, traitements fongicides de contact en cas d'attaque...

1.3 Récolte du matériel végétal et mise en place du dispositif

Le matin de l'installation d'un test, on prélève une à deux feuilles, entre la 5ème et la 10ème feuille en partant du sommet du plant de Peuplier ; et on y découpe à l'emporte pièce des disques de 3 cm de diamètre. Parallèlement, on dispose des boîtes à puits (6 puits par boîte) sur une table. Le dispositif comporte 5 blocs complets. Pour des raisons de place en chambre de culture, les blocs ne peuvent dépasser 90 boîtes. On remplit à moitié les puits d'eau distillée. Puis, clone par clone, les disques sont distribués dans les puits aux emplacements affectés aléatoirement par une procédure informatique. Ils sont disposés face inférieure vers le haut. Dans chaque bloc, outre les clones en testage, on trouve les parents de la population en test (2 à 3 disques), 8 clones porteurs de résistances complètes qui permettent de discriminer (= clones discriminants) les différents pathotypes de rouille (3 disques chacun).

1.4 Inoculation

Le lendemain de l'installation, on remplace les disques qui ont coulé ou qui se sont recroquevillés. La pulvérisation de l'inoculum s'effectue à l'aide d'un pulvérisateur à main à réserve d'air comprimé en 2 fois 5 passages. Pour une surface d'1 m² à inoculer, on pulvérise sur les boîtes à puits 25 ml de solution (isolat + eau gélosée). La quantité d'isolat nécessaire (de 1 à 3.5 mg/m²) est décidée en fonction de la faculté germinative de l'isolat et de son pourcentage d'humidité. La solution est maintenue au froid pendant l'homogénéisation par agitateur magnétique pour ralentir l'évolution des urédospores dont la durée de vie dans l'eau est limitée (+/- 30 minutes) à température ambiante.

Entre les boîtes à puits sont intercalées des boîtes de Pétri contenant de la gélose solide (de 4 à 8 suivant la taille du bloc) qui permettent de vérifier, par comptage au microscope, sur une surface équivalente à un disque de 3 cm, l'homogénéité et l'intensité de l'inoculation.

Les boîtes contenant les disques foliaires sont ensuite refermées et mises dans la chambre de culture (cf. conditions décrites § 1.1).

1.5 Les observations

Du 6^{ème} au 13^{ème} jour, la latence (temps entre l'inoculation et l'apparition du 1^{er} sore sporulant) est observée deux fois par jour. Un disque où le 1^{er} sore sporulant apparaît le matin du 8^{ème} jour sera noté 8 et 8,5 s'il apparaît le soir. La température de la chambre de culture (17°C) permet d'accentuer les différences entre clone pour la latence par rapport à ce qui se passe en milieu naturel.

Au matin du 13^{ème} jour, on compte sur chaque disque le nombre de sores. Ce comptage est assorti de commentaires informatifs sur l'état sanitaire du disque. Les disques qui à première vue ne présentent pas d'attaque de rouille sont examinés plus attentivement pour ne pas conclure abusivement à la présence d'une résistance totale.

Au 14^{ème} jour intervient la notation de taille des sores. On constitue pour chaque bloc une échelle de 1 (petit) à 5 (taille maximum) avec un disque représentatif pour chaque taille. Le notateur attribue à chaque disque foliaire porteur d'urédosores une note correspondant à cette échelle. Quand tous les disques sont notés, on photographie à l'aide d'un appareil numérique posé sur banc, les disques qui ont servi à construire les échelles, plus deux autres disques par bloc et par classe de taille. On procède de même pour les disques des parents et des clones discriminants. Ces photos sont analysées avec un logiciel d'analyse d'image ImageJ®. Puis on calcule une surface moyenne de sore (en mm²) pour toutes les échelles de notation. On peut ainsi passer d'une variable qualitative (note) à une variable quantitative exprimée sur une échelle linéaire.

2. Résultats

Un résultat important obtenu dans notre laboratoire est une connaissance fine des relations entre les différents paramètres mesurés. Ainsi on constate (**figure 1(1) et 1(2)**) que, pour des génotypes présentant des valeurs de latence faible (zone A), à une valeur donnée de latence correspondent des valeurs de nombre et de taille d'urédosores très diverses. En d'autres termes, une grande variabilité génétique peut s'exprimer pour ces caractères.

En revanche, on voit que des valeurs de latence élevées (zone B) empêchent l'expression des différences entre génotypes pour les deux autres caractères : nombre et taille des urédosores sont faibles pour tous les génotypes. Pour la taille des urédosores, lorsqu'ils apparaissent tard, on peut penser qu'ils n'ont pas le temps d'exprimer tout leur potentiel de développement. Pour le nombre d'urédosores, on peut faire l'hypothèse qu'il existe des gènes qui conduisent à

la fois à une latence élevée et à un faible nombre d'urédosores. Les génotypes porteurs de ces gènes ont un niveau de résistance partielle proche de la résistance totale.

Par ailleurs, aux pressions d'inoculum utilisées, l'indépendance entre le nombre et la taille des urédosores est complète (figure 1(3)).

Tous ces résultats justifient que l'on continue à mesurer ces trois caractères et laisse espérer que l'on puisse un jour les combiner favorablement dans un même génotype.

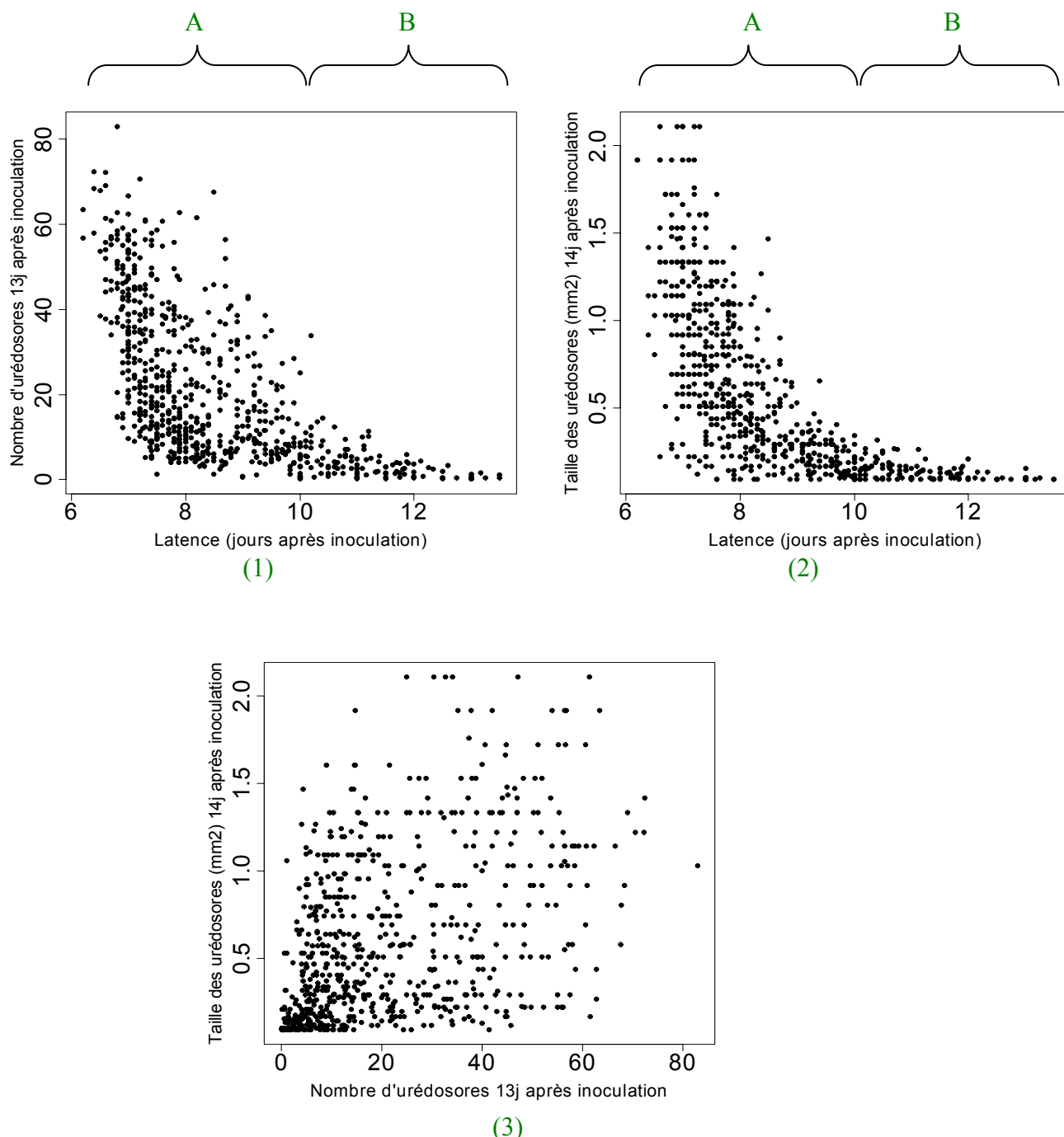


Figure 1 : Exemple caractéristique des relations fréquemment observées entre les différentes composantes de la résistance partielle mesurées en laboratoire.

Chaque point représente un génotype de Peuplier.

Zone A = génotypes à latence courte (<10j), zone B = génotypes à latence longue (10j<X<14j).

Conclusion et perspectives

Nous envisageons d'améliorer notre protocole d'étude de la résistance partielle à Mlp. On se focalisera plus particulièrement sur les points suivants :

- L'élevage en serre : il sera nécessaire d'améliorer le contrôle climatique et d'augmenter l'étanchéité des serres pour éviter les contaminations par la rouille naturelle.
- L'inoculation : on cherchera à mieux calibrer la concentration des suspensions d'inoculation. On pourrait réaliser des mesures de densité optique, ce qui serait compatibles avec la durée de survie des spores dans l'eau à condition de disposer d'une courbe étalon. La dispersion spatiale de l'inoculum devra aussi être améliorée. Les premiers essais de tour à inoculation n'ont malheureusement pas donné satisfaction.
- Les observations : il serait nécessaire d'automatiser la mesure de la taille des urédosores grâce à un système automatique d'analyse d'image.

L'amélioration technique de ces étapes nous permettra de constituer une plateforme expérimentale performante pour le phénotypage à haut débit du Peuplier vis-à-vis de la rouille foliaire et d'aboutir plus rapidement à la sélection de nouveaux cultivars performants.

Bibliographie

- Dowkiw A (2003) Analyse génétique de la résistance et de la tolérance de peupliers hybrides *Populus deltoides* X *Populus trichocarpa* à la rouille foliaire à *Melemopsis larici-populina*. Thèse de doctorat de l'université d'Orléans, 179p
- Lefèvre F, Faivre-Rampant P, Goué M.C, Laurens F, Pilate G, Pinon J, Valadon A, Villar M (1995) Composantes de la résistance aux rouilles chez les peupliers : utilisation en sélection. Comptes-Rendus de l'Académie d'Agriculture de France 81:111-121
- Paillasa E (2006) Quelles pertes de croissance pour 7 cultivars de peuplier face aux attaques de la rouille E4 du mélèze. Forêt-Entreprise 168:60-63
- Pinon J, Frey P, Villar M (2001) La populiculture à la recherche de la résistance durable aux maladies, La Forêt Privée 258:25-32

Comment doser plusieurs activités enzymatiques sur un même type d'ectomycorhizes avec un minimum de matériel prélevé ?

Jean-Louis Churin³⁷

Résumé : Afin de mesurer efficacement la capacité des mycorhizes à mobiliser les éléments du sol au bénéfice des arbres, nous avons développé une micro-technique à haut débit qui permet de mesurer les activités de huit enzymes différentes secrétées par les mêmes ectomycorhizes avec seulement sept échantillons d'un même type. Ainsi d'une part nous comparons les profils d'activités enzymatiques de différents types d'ectomycorhizes dans un même peuplement, et d'autre part nous apprécions les variations de ces activités dues aux interventions sylvicoles : chaulage, fertilisation, éclaircies...

Mots clés : Ectomycorhize, fluorimétrie, colorimétrie, fluorochrome, tubes PCR, activités enzymatiques.

Introduction

Les racines fines des arbres des forêts tempérées sont associées avec des champignons formant des organes symbiotiques mixtes appelés ectomycorhizes (ECM). Les champignons ectomycorhiziens jouent un rôle crucial dans la survie et le développement des arbres. Ils sont capables de mobiliser et de prélever les nutriments à partir de la litière par sécrétion d'un grand nombre d'enzymes.

La plupart de nos connaissances sur la diversité fonctionnelle des ECM résultent des expérimentations sur les jeunes semis cultivés en conditions contrôlées en laboratoire. Ces conditions sont très différentes de celles qui prévalent sur les arbres adultes en sols forestiers.

Afin de décrire la diversité fonctionnelle des ECM *in situ* pour comprendre le rôle joué par les partenaires fongiques parmi les communautés ectomycorhiziennes des écosystèmes forestiers, nous mesurons différentes activités contribuant à la nutrition de l'arbre.

Nous avons d'abord utilisé une méthode de micro-radiorespirométrie (Jany *et al.* 2003) qui demandait un investissement important en temps du fait de l'impossibilité de traiter plusieurs types de mycorhizes simultanément. Nous traitons seulement vingt quatre échantillons à la semaine. Puis nous avons utilisé un système mesurant le potentiel d'activité enzymatique des phosphatases et des déshydrogénases à l'aide de microplaques (Buée *et al.* 2004). Plus récemment nous avons développé, en collaboration avec un laboratoire de Munich dans ces mêmes conditions de microplaques, des méthodes de colorimétrie et de fluorimétrie pour la détection simultanée de plusieurs activités enzymatiques sur un même type de mycorhize (Pritsch *et al.* 2004 et Courty *et al.* 2005). Nous avons ainsi abouti à une méthode à haut débit avec 50 types de mycorhizes traités par jour et huit activités enzymatiques. Nous décrivons ici cette méthode.

³⁷INRA-Univ.Nancy 1- UMR Interactions Arbres/Microorganismes - 54280 Champenoux

☎ 03 83 39 40 82 churin@nancy.inra.fr

1. Principe de la méthode

Les huit enzymes étudiées contribuent à la dégradation de la paroi des végétaux morts : dégradation cellulolytique (cellobiohydrolase et glucosidase), hémicellulolytique (glucuronidase et xylosidase) et dégradation de la lignine et des composés phénoliques (laccase). Elles contribuent également à la dégradation de la chitine qui provient des parois des cellules fongiques et des insectes (chitinase), des phosphates organiques (phosphatase acide) et des protéines (leucine amino peptidase).

Selon les enzymes, deux méthodes sont employées : la fluorimétrie ou la colorimétrie.

Dans le cas des mesures par fluorescence, les substrats des enzymes étudiées sont couplés avec des fluorochromes : MU (MéthylUmbelliférone) ou AMC (AminoMéthylCoumarine). En solution, par exposition à une longueur d'onde précise, ces fluorochromes ont la propriété de réémettre à une autre longueur d'onde. C'est la mesure de la quantité de photons réémise qui indique la quantité de fluorochrome libre dans le milieu et ainsi de connaître la quantité de substrat hydrolysé par les enzymes. En effet, lorsque la liaison entre le fluorochrome et le substrat reste intacte, on ne mesure que l'autofluorescence naturelle du couple substrat-fluorochrome ; mais, si la liaison entre le substrat et le fluorochrome est rompue, on mesure la quantité de fluorochrome en solution, qui est proportionnelle à la quantité d'enzyme secrétée. En colorimétrie (détermination de l'activité laccase), l'ABTS (diammonium 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate), un substrat synthétique de l'enzyme étudiée, change de couleur lorsqu'il est oxydé ; on mesure l'intensité de la couleur verte proportionnelle à la quantité d'enzyme secrétée dans le milieu.

On souhaite mesurer les différentes activités enzymatiques secrétées sur les mêmes apex ectomycorhiziens. Il faut donc pouvoir transférer ces apex d'un réactif à un autre. Pour cela on utilise des barrettes de tubes PCR modifiées. Ces barrettes sont utilisées dans les laboratoires de biologie moléculaire et entrent parfaitement dans une rangée de 8 puits des microplaques à 96 puits utilisées ici pour l'incubation et le rinçage. La modification de ces barrettes de tubes PCR³⁸ s'effectue ainsi : on coupe la base conique des 8 tubes d'une barrette, on coupe également le dôme de chacun des bouchons pour garder sur l'anneau résiduel le début de la courbure (**figure 1**). Des rondelles de 5 mm de diamètre sont alors découpées à l'emporte-pièce dans de la toile nylon³⁹ de maillage 250 µm et déposées à la pince au fond des bouchons préparés. Il ne reste plus qu'à insérer les tubes dans les bouchons et à élaguer au scalpel les liants plastiques restant autour des capuchons (**figure 1 et photo 1**). Avec les barrettes ainsi transformées, nous transférons ces apex d'un substrat à un autre sans avoir à les reprendre avec des pinces et risquer ainsi de les détériorer.

1.1 Mode opératoire

1.1.a Échantillonnage

Les échantillons de sol contenant les racines sont collectés dans des boîtes isothermes puis conservés avant traitement à 4 C°. Les racines sont traitées dans les quatre jours suivants. Elles sont lavées précautionneusement pour ne pas détériorer les mycorhizes. Les morphotypes d'ECM (types morphologiques communs) sont décrits à la loupe binoculaire selon Agerer (1987-98). Sept apex ectomycorhiziens de chaque morphotype étudié, sensiblement de même taille, sont prélevés et déposés individuellement dans chacun des tubes des barrettes PCR modifiées (**photos 1 et 2**) installées dans la plaque de rinçage (**photo 3**).

³⁸ Astucieux bricolage imaginé par un technicien du laboratoire de Munich avec lequel nous collaborons.

³⁹ Sté Busine - 60600 Clermont de l'Oise

Le huitième puits ne contient pas de mycorhize (témoin négatif). Un échantillon de chaque morphotype est congelé (-80°C) pour de futures identifications moléculaires.

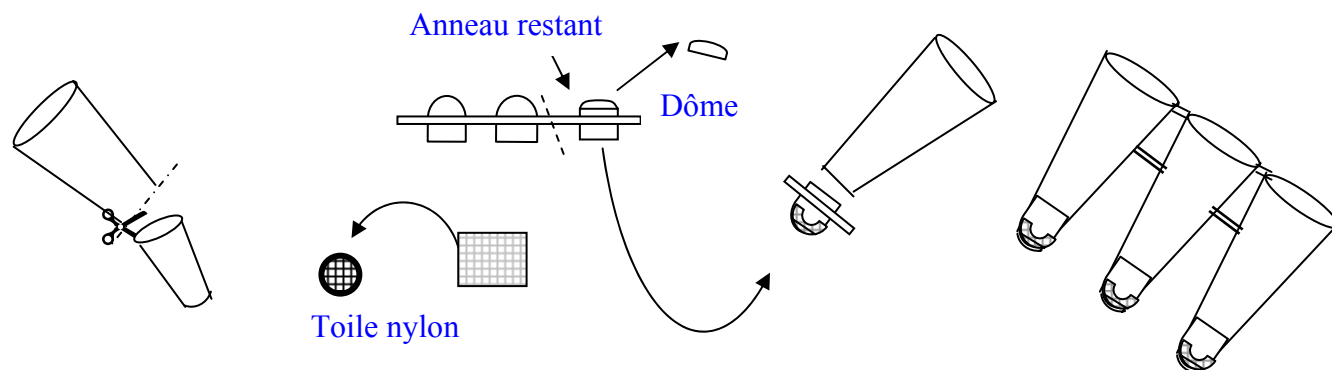


Figure 1 : schéma représentant les étapes de transformations des barrettes PCR



Photo 1 : Barrettes et capuchons tronqués

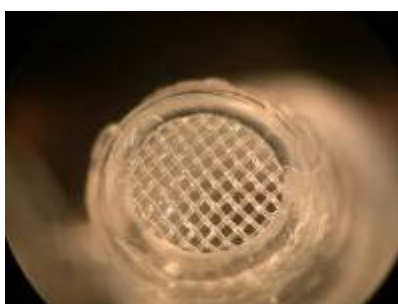


Photo 2 : Tamis en place



Photo 3 : Barrette dans une microplaque

Ordre des tests	Substrats	Concentration de la solution de travail (μM)	pH	Temps d'incubation (min)
Glucuronidase	MU- β -D-glucuronide hydrate	500	4,5	60
Xylosidase	MU- β -D-xylopyranoside	500	4,5	60
Cellobiohydrolase	MU- β -D-cellobioside	400	4,5	40
β -Glucosidase	MU- β -D-glucopyranoside	500	4,5	60
Chitinase	MU-N-acetyl- β -D-glucosaminide	500	4,5	20
Phosphatase acide	MU-phosphate	800	4,5	10
Leucine aminopeptidase	L-leucine-AMC	400	6,5	60
laccase	ABTS	2000	4,5	60

Tableau 1 : Récapitulatif des caractéristiques de chaque test enzymatique

1.1.b Préparation des solutions

Le tableau 1 donne les substrats et les paramètres expérimentaux pour chacune des huit activités enzymatiques mesurées. Tous les produits sont référencés chez Sigma Aldrich. Les solutions mères de chaque substrat (5 mM) et les solutions de calibration d'AMC et MU (25 mM) sont préparées dans du méthoxyéthanol. Les substrats sont dilués avec de l'eau ultra pure stérile pour atteindre les concentrations désirées (tableau 1). Les solutions mères, les substrats dilués et les solutions de travail doivent être stockés à -20 °C à l'abri de la lumière.

Le tampon d'incubation est préparé à une concentration de 150 mM et stérilisé. C'est un mélange d'acide maléique et de Tris (pH 2-7). Le tampon stop utilisé pour alcaliniser la solution et arrêter les réactions est le Tris 1 M à pH 10 – 11.

1.1.c Incubation et mesure (figure 2)

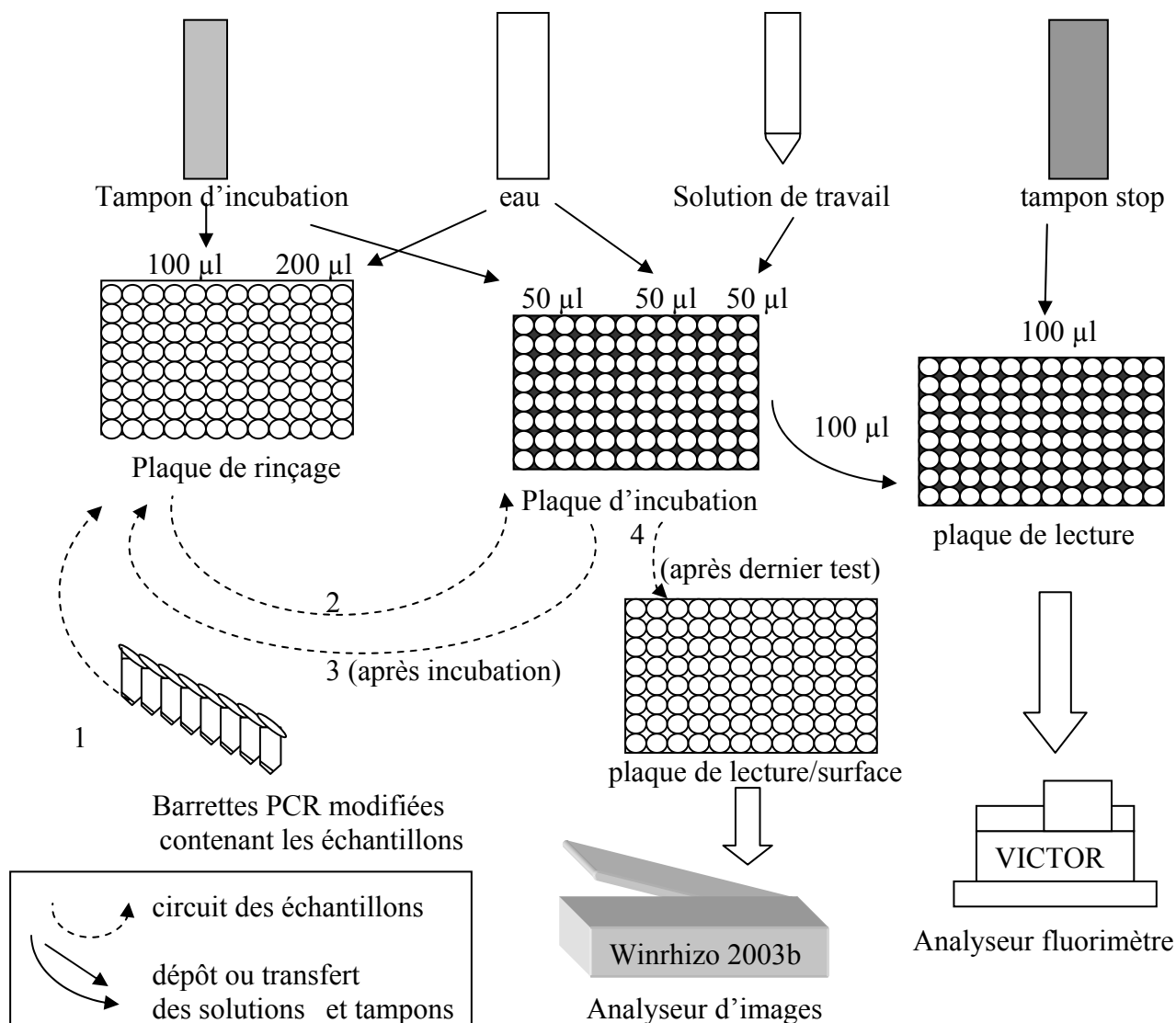


Figure 2 : schéma des manipulations en fluorimétrie.
Ce cycle est répété autant de fois qu'il y a d'activités à mesurer

En fonction du substrat, le temps d'incubation dans les plaques de titration noires à 96 puits est variable. Il a été choisi pour mesurer l'activité enzymatique la plus élevée. Chaque puits contient 50 µl de tampon d'incubation, 50 µl d'eau ultra pure et 50 µl de solution de travail. Les mesures sont obtenues avec le lecteur de microplaques Victor (Wallac Perkin-Elmer Life Sciences) à une longueur d'onde d'excitation de 355 nm et de 460 nm en émission. Pour les laccases, l'intensité de la couleur verte est dosée à 415-425 nm avec le lecteur de plaques Hercules 550 (Biorad, Hercules, CA, USA).

Dès que les analyses fluorimétriques et colorimétriques sont terminées, les apex sont transférées à la pince directement des barrettes au fond des puits d'une microplaque transparente afin d'être passés à l'analyseur d'images Winrhizo 2003b (Regent Instrument, Inc., Québec, Canada) qui détermine la surface projetée de chaque échantillon. Les résultats de ces analyses sont exprimés par unité de temps et par unité de surface projetée de chaque type d'ectomycorhize (pmol/mm²/min). Les surfaces projetées présentent une corrélation linéaire avec les surfaces développées des ectomycorhizes supposées cylindriques.

2. Résultats et exemple d'application

La **figure 3**, tirée du travail de Courty *et al* (2005) montre qu'un même type d'ectomycorhize (formée par le champignon *Lactarius quietus*) présente des profils d'activité différents selon la saison. En été, les activités dominantes sont : glucosidase, chitinase et cellobiase, alors qu'en hiver, après la chute des feuilles, l'activité xylosidase domine.

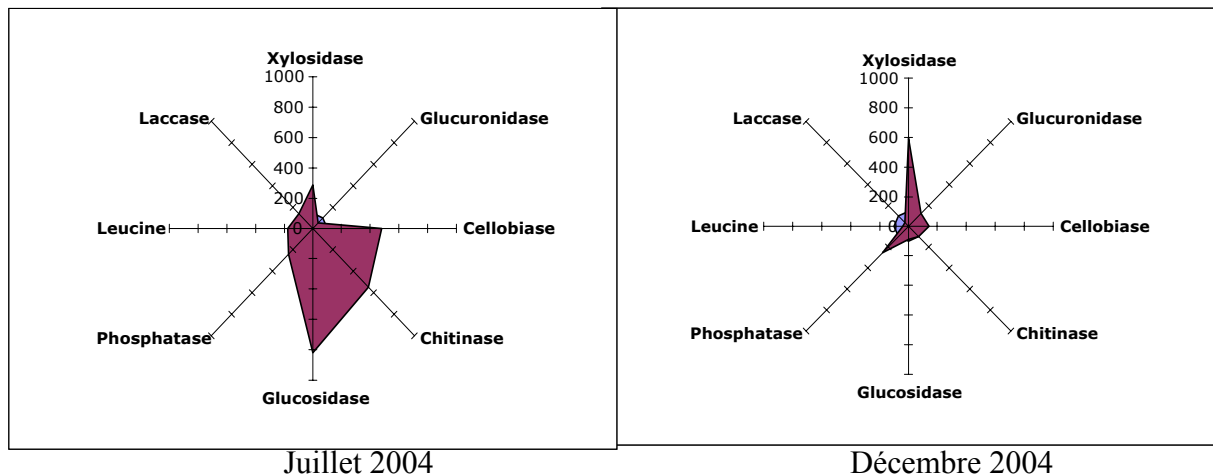


Figure 3 : Exemple de profils d'activités d'ectomycorhize de *Lactarius quietus* selon la saison

Conclusion

Un grand progrès vient d'être réalisé, nous faisant passer de 24 échantillons et une seule activité par semaine à une cadence possible de 50 échantillons et 8 activités par jour. Ce progrès a été obtenu en combinant trois techniques :

- méthode d'analyse en colorimétrie et fluorimétrie utilisant les substrats fluorescents,
- analyse d'image évitant les pesées fastidieuses pour la calibration des mesures,
- adoption d'un bricolage gardant intacts les échantillons tout au long du processus.

Cela nous permet d'une part de comparer les profils d'activités enzymatiques de différents types d'ectomycorhizes dans un même peuplement, et d'autre part d'apprécier les variations de ces activités dues aux interventions sylvicoles (chaulage, fertilisation, éclaircies...).

Cette méthode pourra être utilisée pour de nouveaux tests concernant non seulement les activités enzymatiques extracellulaires mais aussi d'autres mécanismes relatifs à la mobilisation des nutriments, comme la chélation du fer ou l'altération des minéraux.

Bibliographie

- Agerer R (1987-1998) Colour atlas of ectomycorrhizea. Munich, Germany: Einhorn-Verlag Eduard Dietenberger
- Buée M, Vairelles D, Garbaye J (2004) Year-round monitoring of diversity and potential metabolic activity of the ectomycorrhizal community in a beech (*Fagus sylvatica*) forest subjected to two thinning regimes. *Mycorrhiza* 15, 235-245
- Courty PE, Pritsch K, Schloter M, Hartmann A, Garbaye J (2005) Activity profiling of ectomycorrhiza communities in two forest soils using multiple enzymatic tests, *New phytologist*, 167, 309-319.
- Jany JL, Martin F, Garbaye J (2003) Respiration activity of ectomycorrhizas from *Cenococcum geophilum* and *Lactarius sp.* In relation to water potential in five beech forest. *Plant Soil* 255 : 487-494.
- Pritsch K, Raidl S, Marksteiner E, Blaschke H, Agerer R, Schloter M, Hartmann A (2004) A rapid and highly sensitive method for measuring enzyme activities in single mycorrhizal tips using 4-methylumbelliferone-labelled fluorogenic substrates in a microplate system. *Journal of Microbiological Methods*, 58, 233-241.