



**HAL**  
open science

## Méthode de dénombrement automatique des larves et juvéniles d'esturgeon européen : chapitre VI

Charles Roqueplo, Patrick Lambert, Philippe Jatteau

► **To cite this version:**

Charles Roqueplo, Patrick Lambert, Philippe Jatteau. Méthode de dénombrement automatique des larves et juvéniles d'esturgeon européen : chapitre VI. Programme de recherche et de conservation de l'esturgeon européen *Acipenser sturio* : bilan scientifique et technique 2014, 2015, pp.71-79. hal-02601450

**HAL Id: hal-02601450**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02601450>**

Submitted on 16 May 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Chapitre VI : Méthode de dénombrement automatique des larves et juvéniles d'esturgeon européen

Roqueplo C., Lambert P.

## VI.1 Rappel des actions menées en 2013

L'unité EABX a fait l'acquisition d'un appareil de comptage automatique de petits organismes aquatiques mis au point par une jeune société québécoise. Après plusieurs séances de mise au point avec des comptages de larves de *A. baeri* et de *A. sturio* ainsi que plusieurs adaptations du logiciel de traitement, nous avons pu calculer que l'appareil donne une estimation de l'effectif d'un lot, avec une incertitude moyenne de mesure de **4.5%**.

Lorsqu'un lot de poissons est mis dans l'appareil, nous effectuons systématiquement 4 à 5 mesures ce qui permet d'en calculer la moyenne et la variabilité (**Figure 35**). Dans certains cas, les estimations données par l'appareil sont sujettes à de grandes variations ; les larves peuvent se regrouper en petits cordons au fond du seau de mesure, ce qui perturbe les mesures d'absorption de lumière et donne des estimations aberrantes (**Figure 36**).



Figure 35 : Capot de l'XperCount avec le panneau de contrôle



**Figure 36** : Larves d'esturgeon européen en phase d'agrégation dans le seau de l'XpertCount

A la suite de ces mesures nous avons préconisé de :

- effectuer 4 à 5 mesures pour l'estimation de l'effectif d'un lot de poissons,
- avoir le moyen de calculer automatiquement la moyenne puis l'erreur relative de chaque mesure par rapport à cette moyenne pour chacun des lots,
- écarter toutes mesures ayant un écart-type supérieur à **12%** et compléter par 1 ou 2 valeurs supplémentaires pour avoir au moins 3 valeurs correctes.

## **VI.2 Les actions menées en 2014**

Avant d'utiliser XpertCount pour estimer l'effectif des larves de *A. sturio*, qui seront obtenues en juin - juillet par reproduction assistée, nous avons affiné et validé le protocole de manipulation de l'appareil et de comptage. En mars - avril 2014, nous avons effectué des comptages sur des lots de larves et de juvéniles d'esturgeons sibériens (*A. baerii*), de 18 à 20 mm de longueur totale provenant de la SAEG.

### **VI.2.1 Validation de la méthode de comptage sur *A. baerii***

La station de St Seurin a fait l'acquisition en 2013 d'un nouveau système de comptage automatique de petits organismes aquatiques, dont le brevet a été déposé au Canada en 2012 par la société XpertSea.

### VI.2.1.1 Méthode

Pour ce test de validation de l'appareil de comptage automatique, nous avons utilisé 10 000 larves de *A. baeri*, âgées d'une semaine, de 14 mm de longueur moyenne, en provenance de l'Écloserie de Guyenne. Les poissons sont dénombrés manuellement un par un par 9 personnes (**Figure 37**), puis par lots de 50 individus pour obtenir des groupes de : 200, 500, 1 000, 3 000, 5 000

Chaque lot compté est déversé dans un bac à fond grillagé individualisé et installé dans une auge (**Figure 38**), avant de passer dans l'XpertCount.



**Figure 37** : Comptage manuel des lots de larves



**Figure 38** : Déversement d'un lot compté dans son bac de stabulation

Chaque lot passe 3 fois dans l'XpertCount, avec 5 estimations de l'effectif à chaque fois. Les données sont immédiatement saisies sur un fichier Excel (**Figure 39**), avec calcul automatique des moyennes et des écart-type, pour limiter les erreurs de retranscription. Entre chaque passage, les poissons sont mis au repos dans un petit bac avec des parois en grillage de 0,5 mm d'ouverture et installé dans une auge alimentée en circuit ouvert. Après les comptages avec XpertCount, les poissons de chaque lot sont euthanasiés dans un bain d'eugénol à 10 ppm. Les poissons sont ensuite conservés dans des flacons d'alcool puis comptés 1 par 1, pour vérifier les valeurs des comptages manuels ainsi que les estimations données par ExpertCount.



**Figure 39** : Saisie directe des valeurs sur ordinateur

### VI.2.1.2 Résultats

Les cinq lots de larves, après avoir été euthanasiées sont dénombrés manuellement. Nous pouvons ainsi vérifier l'effectif des lots qui sont passés dans l'XpertCount, et estimer les erreurs de comptage sur larves vivantes (**Tableau 30**).

**Tableau 30** : Estimation de l'erreur sur le comptage manuel de larves vivantes

Comptage manuel sur des larves vivantes	200	500	1000	3000	5000
Comptage manuel sur des larves mortes	203	510	1000	2730	4951
Erreur relative(%) (valeur absolue)	1,4	1,9	0	9,8	0,9

Les résultats montrent que les personnes qui ont participé à cette expérience ont très bien travaillé ; l'erreur sur 4 des 5 lots est inférieure à 2 %. Le lot de 3 000 larves présente une erreur proche de 10 %, mais le dénombrement de ces larves a eu lieu en fin de matinée ; la fatigue se faisait peut être sentir.

Ce test permet de comparer les résultats obtenus avec les différentes méthodes de comptage, en tenant compte du nombre de personnes et de la durée d'intervention (**Tableau 31**).

**Tableau 31** : Comparaison des résultats des différentes méthodes de comptage

Méthodes de comptage	Nombre de larves	durée (minutes)	Nombre de personnes	Erreur relative
comptage normal de larves vivantes	1 000	13'30	1	15%
Comptage de larves vivantes 1 par 1	1 000	55'	1	2,8
Comptage de larves mortes	1 000	40'	1	0%
Comptage avec XpertCount	3 000	4'	2	moyenne 4,5% de 0 à 17 %

### VI.2.1.3 Conclusion du test de mise au point méthodologique

- Si le dénombrement des larves vivantes une par une donne des résultats fiables (moins de 3 % d'erreur), cette méthode ne peut pas être utilisée en routine du fait du temps passé pour les compter (1000 larves en 1 heure pour 1 personne).
- La méthode rapide habituellement employée est fondée sur la comparaison visuelle des lots à compter par rapport à un échantillon de 500 larves dénombrées manuellement. La durée du comptage est assez rapide (1000 individus en moins de 15 minutes pour 1 personne), mais le résultat présente une erreur de 15 %.
- L'emploi de l'XpertCount est rapide (3000 larves en 4 minutes avec 2 personnes) et donne des résultats globalement correct (erreur moyenne de 4,5 %). Mais la variabilité des résultats peut augmenter grandement, surtout en fonction du comportement d'agrégation des poissons au fond du seau.

L'appareil de comptage automatique XpertCount donne donc des résultats satisfaisants, mais il est indispensable de vérifier régulièrement la calibration de l'appareil, en faisant passer des lots préalablement comptés manuellement.

## VI.2.2 Comptage des larves d'esturgeon européen

### VI.2.2.1 Méthode

A la suite des mesures réalisées au printemps sur les esturgeons sibériens, des échanges de données et les discussions avec la société XpertSea, de profondes modifications de l'algorithme ont été opérées par le fabricant.

Nous avons donc effectué le comptage des larves de *A. sturio* nées en juin dans la station, avec un appareil XpertCount muni d'un nouvel algorithme et d'un nouveau protocole.

Le 30 juin, nous avons donc passé dans l'XpertCount la totalité des larves de *A. sturio* nées sur la station à cette date. L'application du nouveau protocole implique la calibration de l'appareil avec des lots de 100 individus comptés manuellement. Nous y avons rajouté un lot de 300 larves. La calibration de l'appareil a été réalisée plusieurs fois au cours du comptage. Le passage dans l'appareil des larves de *A. sturio* se fait par lots de 1 500 à 2 000 individus prélevés, avec une petite épuisette à mailles fines, dans les auges d'élevage séparées en fonction des différents géniteurs. Pour chaque lot de larves, nous avons effectué 4 mesures.

### VI.2.2.2 Résultats

Le principal problème rencontré au cours de ce comptage a été le regroupement des larves de plusieurs lots au fond du seau de l'appareil, ce qui perturbe totalement l'évaluation donnée par l'XpertCount. De ce fait nous avons dû éliminer plusieurs estimations aberrantes données par l'appareil.

La calibration avec des lots dénombrés manuellement permet d'estimer l'erreur sur le résultat donné par l'appareil (**Tableau 32**). Pour ce comptage avec XpertCount, les valeurs obtenues sont généralement inférieures au nombre réel, avec une erreur relative maximum de **4,5 %**.

**Tableau 32** : Résultats donné par XpertCount lors de la calibration et erreur relative

Lots de larves comptées manuellement	Effectif moyen donné par XpertCount	Erreur relative %
100	99,3	-0,7
100	96	-4
300	306,7	2,2
300	286,4	-4,5

La répétition des mesures pour un même lot permet d'en calculer la moyenne avec son intervalle de confiance. L'utilisation de l'appareil XpertCount a permis d'obtenir une estimation des larves issues de la reproduction des géniteurs de *A. sturio* en 2014. Selon les résultats de calibration, les valeurs sont probablement sous-estimées (**Tableau 33**).

**Tableau 33** : Résultats des comptages des larves de *A. sturio* issues des différents croisements

Géniteurs	Moyenne	Mini	Max
Julie x Delphine	1008	801	1 214
Léonce x Carol	25 472	24 236	26 708
<i>Léonce x Delphine (1)</i>	<i>41 677</i>	<i>39 884</i>	<i>43 470</i>
<i>Léonce x Delphine (2)</i>	<i>45 223</i>	<i>43 701</i>	<i>46 744</i>
Léonce x Delphine Total	86 900	83 585	90 214
Léonce x Pascal	33 056	32 306	33 806
Léonce x Hervé	8 914	8 514	9 314
<b>TOTAL</b>	<b>155 350</b>	<b>149 442</b>	<b>161 256</b>

Il est à noter que les larves prélevées pour les expérimentations (3 lots de 500 larves) et les larves issues de la dernière séquence du 4 juillet 2014, ne sont pas prises en compte dans ce tableau. Au total le nombre de larves produites, estimé à J6, en 2014 s'élève à 160 300.

### VI.3 Evolution des systèmes de comptage automatique

Les appareils de comptages automatiques ont intégré les évolutions technologiques et les progrès de la miniaturisation, pour répondre aux besoins de comptage automatique des organismes élevés en aquaculture. Ils utilisent différentes techniques :

- 1- La rupture d'un faisceau lumineux. Mis au point et utilisé surtout pour le comptage de larves de crevettes. Contrainte majeure : la distance entre les deux capteurs doit être inférieure ou égale à 3 mm, ce qui oblige à utiliser des tubes de faible diamètre, donc de n'utiliser ce système que pour des très petits organismes.
- 2- Le comptage par analyse d'images sur des clichés photographiques est utilisé dans les années 2000, surtout pour les larves et demande une répartition homogène des individus dans le récipient de sous échantillonnage.
- 3- L'analyse d'images prises par une ou deux caméras vidéo installées sur les côtés d'une canalisation où passent les organismes. Méthode mise au point par Rolls Royce pour compter les organismes planctoniques lors des études océanographiques (Laser Optical Plankton Counter ; LOPC) . Système efficace, mais encombrant et surtout très cher (> 70 000€).



- 4- Dénombrement d'organismes par la mesure de la quantité de lumière qu'ils absorbent. Cette technique a été mise au point en 2012 par XpertSea, dont nous utilisons l'appareil. Peu encombrant, rapide d'utilisation et facile d'emploi, il donne une estimation de l'effectif d'organismes jusqu'à 5 cm, avec une précision de 4 % en moyenne. Il nécessite une vérification régulière de la calibration, pour limiter toute déviation des estimations. La fiabilité des résultats dépende du comportement des individus dans l'enceinte de comptage, ce qui n'est pas contrôlable.
- 5- Depuis 2 ans la technique de comptage par caméra a fait d'énormes progrès. Plusieurs sociétés commercialisent des systèmes permettant de compter les organismes passant dans un tuyau de 8 ou 12 cm de diamètre. Il est déjà utilisé dans plusieurs élevages de poissons et crevettes.
- En 2013, Vaki Aquaculture (Islande) associée à Larcos (USA) propose un système qui s'installe sur l'évacuation d'un bassin, ou qui peut être alimenté par des seaux (**Figure 40**). Le comptage se fait par une caméra (35 000 images /s) un logiciel d'analyse d'images permettant d'identifier les organismes et par exemple de différencier les crevettes vivantes de leurs mues. Le système permet de compter en continu, sans sortir les animaux de l'eau. La seule contrainte : les organismes ne doivent pas être translucides. En conditions optimales, le Nano Counter peut dénombrer jusqu'à 100 000 organismes en une heure.



**Figure 40** : Le Nano Counter de la société Vaki

Le **Tableau 34** permet de comparer les caractéristiques des 2 systèmes. Le Nano Counter apparaît très bien adapté à nos conditions. La « taille » minimum est de 0,05 g et la précision annoncée est de l'ordre de 99%. Il permet de plus de travailler sur des individus de plus grande taille, correspondant à des juvéniles dans notre cas.

**Tableau 34** : Comparaison des systèmes de comptage automatique de larves de poissons

	<b>XpertCount</b>	<b>Nano Counter</b>
<b>Principe</b>	Mesure de l'absorption de la lumière	Analyse des images d'une caméra ultra rapide
<b>Taille des organismes</b>	< 5 cm	< 15 cm
<b>Contraintes</b>	Répartition homogène des organismes dans le seau	Pas d'organisme translucide
<b>Débit</b>	4 000 / heure	100 000 / heure en continu
<b>Matériel</b>	Seau de 20 l - boîtier d'interface et logiciel	Chenal de comptage transportable, ordinateur + logiciel, caméra + projecteur
<b>Coût</b>	3 600 € en 2012	21 000 €

## VI.4 Bilan des comptages 2014

L'appareil XpertCount que nous utilisons permet un comptage rapide de lots de larves de poissons. Depuis son achat, la modification de son algorithme pour son adaptation à la forme et au comportement de cette espèce l'a rendu plus facilement opérationnel. Mais certaines précautions de manipulation ont été instaurées pour fiabiliser les résultats :

- stabiliser le seau servant aux mesures
- vérifier la répartition homogène des organismes dans le seau
- contrôler régulièrement la calibration de l'appareil en passant des lots dont l'effectif a été compté manuellement au préalable.

Néanmoins, le comportement des poissons influe sur le résultat et peut conduire à des résultats aberrants.

Depuis deux ans les technologies utilisées dans ces appareils ont fait de grands progrès et d'autres systèmes sont actuellement utilisés dans des sites de production aquacole. Une veille technologique doit être mise en place, qui permettra de juger de l'opportunité d'un changement de système.