

SURVEILLANCE DE L'IMPACT DES **DECHETS MARINS** SUR LES **TORTUES MARINES**



**PROTOCOLE POUR LA COLLECTE DE DONNEES D'INGESTION
ET D'ENCHEVETREMENT CHEZ LA TORTUE CAOUANNE¹**

(Caretta caretta Linnaeus, 1758)



Référence recommandée

INDICIT consortium, 2018

Surveillance de l'impact des déchets marins sur les tortues marines. Protocole pour la collecte de données d'ingestion et d'enchevêtrement chez la tortue caouanne (*Caretta caretta* Linnaeus, 1758).

Livrable D2.6 du projet European «Implementation of the indicator of marine litter impact on sea turtles and biota in Regional Sea conventions and Marine Strategy Framework Directive areas » (indicit-europa.eu).

Grant agreement 11.0661/2016/748064/SUB/ENV.C2. Bruxelles. 22 pp.

Pour toute question sur ce protocole, merci de contacter :

coordination@indicit-europa.eu



INTRODUCTION	4
A. INFORMATION GENERALE SUR LES SPECIMENS VIVANTS ET MORTS	5
A.1. PREMIERES NOTES SUR LE SITE DE DECOUVERTE	5
1. Contact	5
2. Sur l'individu.....	5
3. Sur le site.....	5
A.2. DESCRIPTION DE LA CONDITION CORPORELLE DE L'ANIMAL	6
1. Statut de conservation ou niveau de décomposition.....	6
2. Circonstances de découverte	6
3. Cause de mort probable/échouage	7
4. Statut de santé.....	7
5. Engin de capture accidentelle	7
6. Principales blessures	8
7. Parties affectées	8
8. Type d'enchevêtrement.....	8
9. Déchets causant l'enchevêtrement.....	9
10. Autres paramètres descriptifs	9
A.3. MESURES BIOMETRIQUES	10
B. ECHANTILLONNAGE DES DECHETS MARINS A PARTIR DES CARCASSES – PROTOCOLE POUR LES ANIMAUX MORTS	11
B.1. AUTOPSIE DE LA TORTUE	11
B.2. EXTRACTION DU CONTENU DIGESTIF	12
B.3. EXTRACTION DES DECHETS MARINS	12
C. ECHANTILLONNAGE DES DECHETS MARINS DANS LES FECES – PROTOCOLE POUR LES ANIMAUX VIVANTS	13
C.1. COLLECTE DES FECES	13
C.2. COLLECTE DES DECHETS A PARTIR DES FECES	13
D. ANALYSE DES DECHETS ET CLASSIFICATION	14
D.1. CLASSIFICATION DES DECHETS	14
D.2. COLLECTE DES DONNEES	15
REFERENCES	16
ANNEXE 1 – FEUILLE D'OBSERVATION	17
ANNEXE 2 – LISTE DU MATERIEL	19
Pour la récupération de l'animal et le prélèvement d'échantillons sur le site de découverte.....	19
Pour la collecte des échantillons sur des animaux morts en laboratoire et l'extraction des déchets ingérés du système gastro-intestinal	19
Pour la collecte des échantillons sur des individus vivants dans les centres de soins et l'extraction des déchets dans les fèces.....	19
PROTOCOLE POUR L'EXTRACTION DE MICRO-PLASTIQUES (OPTIONNEL)	20
1. Actions préparatoires pour éviter la contamination.....	20
1. Pour les animaux morts.....	20
2. Pour les animaux vivants.....	20
2. Extraction des micro-déchets ingérés	20

¹ Le protocole pour les individus morts peut être applicable à d'autres espèces de tortues marines.



INTRODUCTION

Le suivant protocole est destiné à répondre aux exigences de la DCSMM concernant l'indicateur 10.2.1 "Tendances des quantités et de la composition des déchets ingérés par les animaux marins". Le programme INDICIT a proposé les tortues marines comme espèces indicatrices pour étudier l'ingestion des déchets marins sur le biote par le développement et l'implémentation d'un indicateur majeur « Déchets ingérés par les tortues marines ». Des méthodes normalisées d'extraction des déchets ingérés d'individus morts ou vivants sont exposées dans le présent document. Certaines modifications ont été apportées à la méthodologie originale élaborée et testée en Italie depuis 2012 (Matiddi et al., 2011 ; MSFD TG Litter, 2013), suite aux premières applications (Camedda et al., 2014 ; Matiddi et al., 2017) et au sein du projet européen INDICIT (GA n°11.0661/2016/748064/SUB/ENV.C2) ainsi que grâce au retour des centres de soins et des réseaux de surveillance des échouages.

Il est proposé de collecter à la fois les paramètres « basiques » et « optionnels ». **Les paramètres basiques** (notés par la suite en gras) correspondent aux paramètres minimums fondamentaux pour déterminer les critères de l'indicateur. Les paramètres optionnels (notés par la suite en gras italique gris) permettent d'acquérir davantage de connaissances sur le comportement et la probabilité d'ingestion de déchets par les caouannes ainsi que de mieux préciser les critères des indicateurs en développement. Les paramètres optionnels peuvent également aider à mieux évaluer la pertinence de deux nouveaux indicateurs sur les impacts des déchets pour lesquels des études pilotes sont en cours (« Enchevêtrement avec des débris marins par le biote » et « Débris micro-plastiques ingérés par les tortues marines et les poissons »). Suivant le sous-groupe Technique sur les déchets marins de la DCSMM (Galgani et al., 2013) et la nouvelle décision de la Commission (décision 2017/848 du 17 mars 2017), la taille minimale des déchets considérés pour l'indicateur « Déchets ingérés par les tortues marines » est de 1 mm, incluant donc les micro (1-5 mm) et macro-plastiques (> 5 mm).

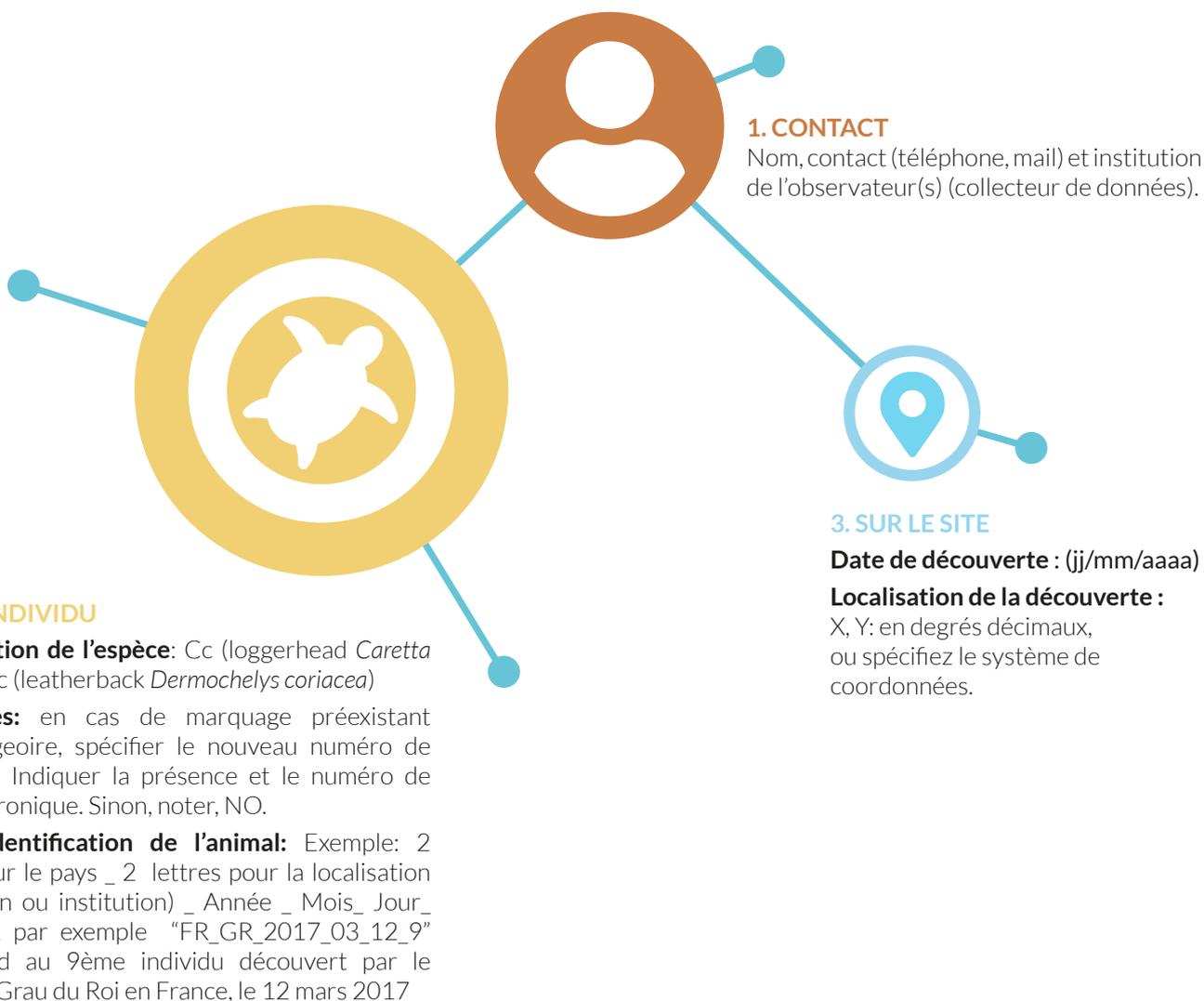
Une **feuille d'observation** est fournie en Annexe. Afin de faciliter la constitution d'une banque de données et les analyses statistiques, les données doivent être complétées dans le **tableau normalisé** INDICIT correspondant, en respectant les unités et les choix de menus proposés, et en précisant les remarques ou autres propositions dans la dernière colonne « Remarques ». **Toutes les cases doivent être remplies**, soit par l'information (données), soit par 0 ou « NA » (information non disponible ou non évaluée).

REMARQUE: La tortue caouanne (*Caretta caretta*) est une espèce protégée, par conséquent seules les personnes autorisées peuvent manipuler des animaux vivants et morts ou des parties de ceux-ci. Une fois l'animal trouvé, sa gestion et son rétablissement devraient être signalés et coordonnés avec les autorités responsables. Noter qu'un permis CITES est demandé si un spécimen ou un échantillon doit être envoyé/reçu.

REMARQUE: Des précautions sanitaires doivent être prises pour la manipulation des animaux sauvages morts ou vivants afin de minimiser les risques de maladies infectieuses telles que les zoonoses. La zone d'intervention doit être délimitée des passants et la manipulation nécessite le port d'une combinaison de protection avec lunettes, gants et bottes de caoutchouc, devant être soigneusement séparés et désinfectés ou jetés par la suite. Idéalement, une paire de gants résistant aux coupures peut être portée sous deux paires de gants, l'une d'elles étant changée pour l'écriture ou en cas de coupure.

A. INFORMATION GENERALE SUR LES SPECIMENS VIVANTS ET MORTS

A.1 PREMIERES NOTES SUR LE SITE DE DECOUVERTE



REMARQUE: Il est très important de prendre des photos de l'animal avant de le manipuler afin de vérifier l'état de la récupération. L'utilisation d'un ruban gradué permet d'afficher l'ordre de grandeur sur les photos. Veuillez préciser s'il y a eu prise de photos dans la colonne « Photos lors de la découverte » du fichier Excel.

A.2

DESCRIPTION DE LA CONDITION CORPORELLE DE L'ANIMAL

1. Statut de conservation ou niveau de décomposition

Noter **le statut** selon ces 5 niveaux :



Fig. 1. Statut de conservation ou niveau de décomposition (Thomson et al., 2009)

- Pour le **Niveau 1**, les déchets peuvent être extraits de l'analyse des fèces dans les centres de soins. .
- Les **Niveaux 2 et 3** sont adéquats pour l'analyse de l'ingestion des déchets des autopsies..
- Le **Niveau 4** permet de mesurer les données biométriques et d'évaluer la présence/absence de plastique ingéré (pour l'évaluation de la fréquence d'occurrence d'ingestion de déchets (ou prévalence, FO%) et l'enchevêtrement.
- Le **Niveau 5**, pour lequel les individus ont généralement perdu le matériel gastro-intestinal, l'analyse de l'ingestion de déchets n'est pas possible².

2. Circunstancia del descubrimiento

Noter **les circonstances** parmi les 4 catégories :

- **Echouage** : Animal retrouvé échoué sur la plage ou sur le rivage,
- **Capture accidentelle/Pêche** : Animal capturé activement par des pêcheurs (ex : ingestion d'un hameçon, coincé dans un filet, rapporté par un pêcheur, etc.),
- **Trouvé en mer** : Animal découvert à la surface de la mer,
- **Mort en centre de soins** : L'animal est arrivé vivant, mais est mort pendant son rétablissement.

² Certains tissus (muscle, etc.) peuvent être prélevés et conservés dans de l'alcool à 95°C ou congelés à -20°C pour des analyses génétiques ultérieures.

3. Cause de mort probable/échouage

Lorsque possible, déduire *la cause de la mort ou d'échouage* à partir d'observations externes et si possible, à partir de l'observation des organes pendant l'autopsie des individus morts. Inspectez également la cavité orale pour détecter la présence de corps étrangers. Ensuite, choisissez parmi les 10 catégories:

- **Capture accidentelle/Pêche** : Présence d'un hameçon ingéré, mal de décompression, individu piégé dans un filet d'engin de pêche (dans ce cas, remplir les colonnes "Type d'enchevêtrement" et « Déchets causant l'enchevêtrement »), individu noyé dans un engin de pêche ...,
- **Enchevêtrement dans les débris** : Enchevêtrement dans des débris autres que ceux liés à l'activité de pêche. Veuillez remplir les colonnes « Type d'enchevêtrement » et « Déchets causant l'enchevêtrement »,
- **Ingestion de déchets** : Obstruction digestive, perforation ou autres symptômes,
- **Traumatisme anthropique** : Collision avec un bateau ou une hélice, individu battu au couteau, au bâton ou au harpon...,
- **Traumatisme naturel** : ex : attaque de requin,
- **Maladie naturelle** : Liée à la malnutrition, à un trouble de flottabilité, cachexie, dermatite, conjonctivite, rhinite...,
- **Huiles** : Ingestion ou imprégnation externe avec des huiles,
- **En bonne santé** : Aucun dommage, blessure ou maladie notables,
- **Non identifié** : Impossible de connaître la cause du décès ou de l'échouage,
- **Autre** : Veuillez préciser dans la colonne « Remarques ».

4. Statut de santé

Noter *le statut de santé* selon le niveau de condition corporelle (Fig. 2)



Fig. 2. Statut de santé d'après l'observation visuelle de la forme du plastron (dans Thomson et al., 2009)

5. Engin de capture accidentelle

Si l'animal a été découvert par capture accidentelle, spécifier parmi ces 6 catégories proposées, *l'engin de la capture accidentelle* :

- Palangre
- Chalut
- Filet dérivant
- Canne à pêche
- Non identifié
- Autre: Veuillez spécifier dans la colonne "Remarques".

Veuillez également préciser lorsque possible dans la colonne "Remarques" la distance par rapport à la côte et la durée du déploiement du filet avant qu'il ne soit remonté à bord.

6. Principales blessures

En cas de blessures, indiquez **le type principal de blessure** (fracture, amputation, sectionnement, abrasion ou autre) selon la Fig. 3. Pour tout autre type, veuillez le spécifier dans la colonne « Remarques ».



FRACTURE

De la carapace, la tête, mâchoires, plastron ou os, habituellement cause par une collision avec un bateau.



AMPUTATION

Partielle (une ou plusieurs nageoires (amputation nécessaire) ou totale (une ou plusieurs nageoires manquantes))



SECTIONNEMENT

Coupures ou cisaillement produit par différents types de déchets habituellement sur les nageoires ou la tête



ABRASION

Perte ou usure produite par la friction avec un matériel adhérent à l'animal ou causant un emmêlement

Fig. 3. Typologie des principales blessures observées chez les tortues marines

7. Parties affectées

Si l'animal présente une blessure, signalez la **partie affectée** :

- **RFF** pour la nageoire avant droite;
- **LFF** pour la nageoire avant gauche;
- **RRF** pour la nageoire arrière droite;
- **LRF** pour la nageoire arrière gauche; **cou; carapace; plastron; tête; multiples** (si plusieurs parties du corps sont touchées) ou **autre** (à préciser dans la colonne « Remarques »)..

8. Type d'enchevêtrement

Si l'individu a été trouvé enchevêtré dans des déchets marins, spécifiez le type d'enchevêtrement selon les 3 catégories :

- **Actif**: Lié à un engin de pêche, par exemple, l'individu a été relâché par un pêcheur, ou une partie du filet emmêlant a été coupée pour relâcher l'individu ou par l'individu après s'être enchevêtré. La présence d'un hameçon est considérée comme un enchevêtrement actif,
- **Passif**: L'individu enchevêtré dans des débris non liés à l'activité de pêche ou lié à l'activité de pêche mais abandonnés en mer pendant une longue période (signe de vieillesse ; veuillez préciser dans le colonne « Remarques »),
- **Indéterminé**.

9. Déchets causant l'enchevêtrement

Si l'individu a été trouvé enchevêtré dans des déchets marins, précisez le *type de déchets dans laquelle la tortue marine a été trouvée enchevêtrée* selon les catégories suivantes (Fig. 4):

- Morceaux de filet (N),
- Ligne monofilament (nylon) (L),
- Corde ou piles de cordes (R),
- Sac en plastique (Pb),
- Raffia (Rf),
- Autres plastiques (Ot),
- Matériaux multiples (Mu),
- Inconnu (Unk).

Pour chaque catégorie, veuillez spécifier ou décrire le déchet causant l'enchevêtrement dans la colonne « Remarques ». En particulier, préciser en cas de déchet lié à l'activité de pêche si le matériel a été colonisé par exemple par des algues ou des coquillages et semble vieux (abandonné).



Fig. 4. Classification des déchets causant l'enchevêtrement des tortues marines et biote.

10. Autres paramètres descriptifs

Inspectez visuellement les *réserves de graisse* de l'animal au niveau du cou. Pour les individus morts, ceci peut être vérifié lors de l'ouverture du plastron en fonction de la quantité de graisse recouvrant les muscles abdominaux (voir ci-dessous, Fig. 7c). Choisir parmi les 3 catégories :

- Maigre (cou creux)
- Grasse
- Normale.

Lorsque possible, spécifiez le sexe (Mâle ou Femelle) de l'individu (Fig. 5) en fonction de la longueur de la queue et de la griffe de la nageoire avant, en le confirmant éventuellement par une observation visuelle de l'appareil génital lors de l'autopsie pour les individus morts. Le cas échéant, préciser par NI (pour Non Identifié) s'il n'est pas possible d'identifier le sexe de l'individu.

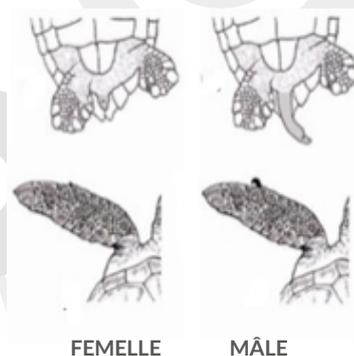


Fig. 5. Détermination du sexe (dans Wyneken, 2001)

A.3

MESURES BIOMETRIQUES

Suivant la Fig 6., plusieurs longueurs corporelles basiques et optionnelles peuvent être mesurées (en centimètres, précision 0.01 cm), ainsi que le Poids (en grammes g) :

- **Longueur courbe de carapace maximum (CCLmax)**
- Longueur courbe de carapace minimum (CCLmin)
- Longueur courbe de carapace standard (CCLst)
- Largeur courbe de carapace (CCW)
- Longueur droite de carapace maximum (SCLmax)
- Longueur droite de carapace minimum (SCLmin)
- Longueur droite de carapace standard (SCLnt)
- Largeur droite de carapace (SCW)
- Longueur courbe de plastron (CPL)
- Longueur droite de plastron (SPL)
- Largeur courbe de plastron (CPW)
- Largeur droite de plastron (SPW)

Utilisez un ruban à mesurer pour les longueurs courbes et un étrier coulissant pour les longueurs droites.

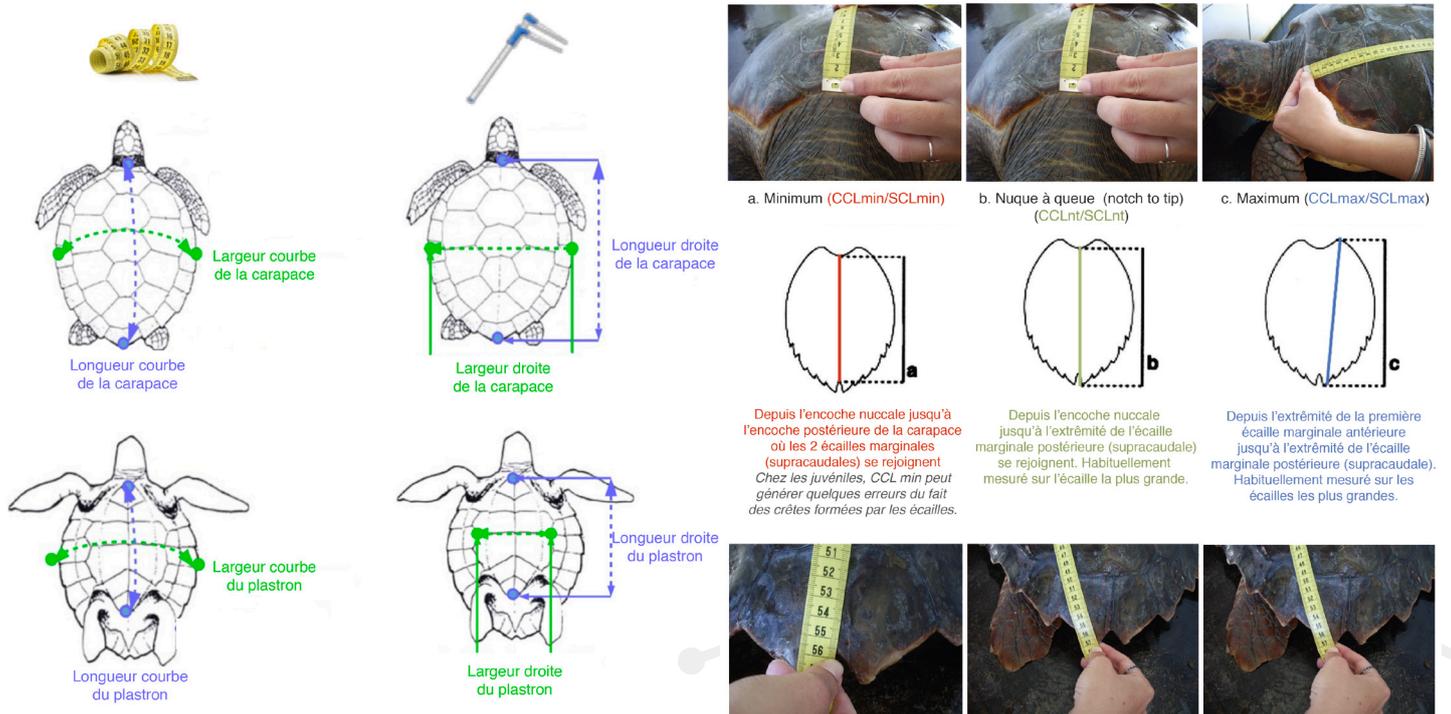


Fig. 6. Paramètres biométriques (mesures de carapace et de plastron).

B. ECHANTILLONNAGE DES DECHETS MARINS A PARTIR DES CARCASSES – PROTOCOLE POUR LES ANIMAUX MORTS

En cas d'animal en décomposition (statut des Niveaux 3 et 4), vérifier l'intégrité du tractus digestif avant de transporter la tortue dans le laboratoire.

Dans tous les cas (excepté le statut du Niveau 5), si l'autopsie ne peut pas être réalisée immédiatement, congeler la carcasse à -20°C.

B.1 AUTOPSIE DE LA TORTUE

Suivre les étapes décrites dans la Fig. 7 :

Retirer le plastron de la carapace par une incision au niveau de la bordure extérieure (ligne jaune) (Fig. 7a).

Faire attention lors de l'utilisation d'une lame courte ou en coupant avec une inclinaison horizontale afin de ne pas affecter l'intégrité des organes internes (Fig. 7b)

Dès que l'intérieur du plastron est accessible, couper l'attache ligamentaire à la ceinture pectorale et pelvienne.

Reporter les **Réserves de graisses** de l'animal (Fig. 7 c) selon :

- Atrophie des muscles pectoraux (aucune, modérée, sévère),
- Epaisseur de graisse dans les cavités articulaires et dans la membrane coelomique (abondante, normale, faible ou nulle),
- Compléter ensuite les réserves de graisse en informant l'état trophique de l'animal (maigre, normal ou gras).



Fig. 7. Séquence d'autopsie d'une tortue: a) Vue ventral de la tortue morte. La ligne jaune indique la façon de séparer le plastron du reste de la tortue ; b) Coupes horizontales pour éviter d'affecter les organes internes ; c) Vue ventrale de la tortue ouverte (réserves de graisses (marron) observables sur les muscles) ; d) Retrait du muscle pectoral et du cœur ; e) Extraction du SG ; f) Vue du SG entier.

Les flèches jaunes indiquent les endroits où les pinces à clamps doivent être fixées afin de séparer les 3 sections du SG.

- Exposer le système gastro-intestinal (SG) en enlevant les muscles pectoraux et le cœur de l'animal (Fig. 7d et 7e). Le sang peut être vidé de la cavité abdominale en faisant pivoter soigneusement la tortue sur un côté.
- Nouer l'œsophage proche de la bouche et nouer le cloaque, au plus proche de l'orifice anal. Retirer l'ensemble du SG et le placer sur la surface d'examen. Cette opération est plus facile si elle est réalisée par au moins 2 opérateurs : une personne maintient l'animal pivoté sur un côté, tandis que l'autre sépare les ligaments des différents organes et membranes de la carapace, extrayant le SG de l'animal.
- Isoler les différentes portions du SG (œsophage, estomac, intestins) en étranglant et en coupant entre 2 pinces clamps (flèches jaunes, Fig. 7f) le sphincter gastro-œsophagien et le sphincter pylorique.

REMARQUE : Lorsque possible, inscrivez le **sexe** de l'animal

B.2

EXTRACTION DU CONTENU DIGESTIF

Séparer les 3 sections du SG (œsophage, estomac, intestins) en ajoutant un deuxième étranglement aux niveaux des extrémités qui vont être coupées pour éviter le déversement du contenu (Fig. 8a)³. Ouvrir chaque section du SG dans le sens de la longueur à l'aide de ciseaux et vider le contenu directement hors de la section vers un tamis à mailles de 1 mm⁴.

REMARQUE : Tout échantillon ne pouvant être directement analysé doit être conditionné dans une bouteille ou un sachet zippé adapté, identifié au marqueur permanent en inscrivant le code d'identification de l'animal ainsi que la section correspondante. Il est proposé d'utiliser 2 lettres pour le pays _ 2 lettres pour la région/l'institution _ Année _ Mois _ Jour _ N° tortue _ Type d'échantillon (C Eso/Esto/Intest) (ex : FR_GR_2017_03_12_9_Oeso correspond à l'œsophage du 9ème individu découvert au Grau du Roi en France, le 12 mars 2017). L'échantillon est ensuite conservé à -20°C, en attendant les analyses de laboratoire.

Pour extraire le contenu de la section du SG, rincer le contenu avec de l'eau du robinet courante en abondance (Fig. 8b) pour enlever la partie liquide, le mucus et la matière digérée non identifiable⁵.

Inspecter le contenu et noter la présence de goudron, d'huile ou de matières fragiles, qui doivent être retirées et analysées séparément, et le signaler dans la colonne « Remarques » du fichier Excel INDICIT.

Rincer toute la matière recueillie dans le tamis de mailles 1 mm (Fig. 8b, c) et la conserver dans des bocaux ou dans des sachets zippés en y indiquant le code de l'échantillon (code de l'individu et section du SG).



Fig. 8. Analyse du contenu digestif: a) Sections du SG séparées: Cœsophage (haut), estomac (milieu) et intestins (bas); b) Ouverture de la section et rinçage du contenu digestif; c) Extraction du contenu digestif.

B.3

EXTRACCIÓN DE BASURAS MARINAS

La collecte des déchets s'effectue manuellement par observation visuelle directement à partir du tamis de 1 mm (Fig. 8c)⁶. Noter la présence de toute occlusion ou perforation causée par des débris dans la colonne « Remarques ».

³Les 3 sections du SG (œsophage, estomac, intestins) sont analysées séparément afin d'évaluer les possibles différences de teneur de déchets par section et de mieux évaluer le transit digestif des déchets marins.

⁴Pour séparer les micro (1-5mm) des macro-items (paramètre optionnel), il est possible de superposer un tamis de maille 5mm avec un le tamis de maille 1 mm (voir section F de ce document).

⁵Des échantillons peuvent être prélevés à ce stade pour déterminer le régime alimentaire grâce à des analyses ADN. Le protocole peut être demandé à coordination@indicit-europa.eu.

⁶Le contenu biologique peut être conservé afin d'analyser le régime alimentaire et identifier les principales proies ingérées en relation avec les débris marins.

C. ECHANTILLONNAGE DES DECHETS MARINS DANS LES FECES – PROTOCOLE POUR LES ANIMAUX VIVANTS

C.1 COLLECTE DES FECES

REMARQUE : Pour l'homogénéité des approches permettant la comparaison des tortues et des régions dans le temps, les fèces collectées ne seront analysées que pour les individus ayant séjourné au minimum 1 mois dans le centre de soins. Les fèces sont collectées jusqu'à 2 mois après l'arrivée de l'individu.

Rincer soigneusement la tortue avec de l'eau pour éviter toute contamination et placer l'animal dans un bassin individuel (Fig. 9a).

Disposer un filtre de mailles 1 mm sur tous les tuyaux d'évacuation du bassin (Fig. 9b).

Surveiller le bassin quotidiennement en filtrant à travers des mailles de 1 mm selon les méthodes suivantes :

- Recueillir les fèces manuellement à l'aide d'une épuisette de mailles de 1 mm (Fig. 9c),
- Placer un collecteur flexible de mailles 1 mm au niveau des tubes de vidange (Fig. 9d),
- Placer un tamis rigide de mailles 1 mm sous le drain pour filtrer l'eau du bassin (Fig. 9e).

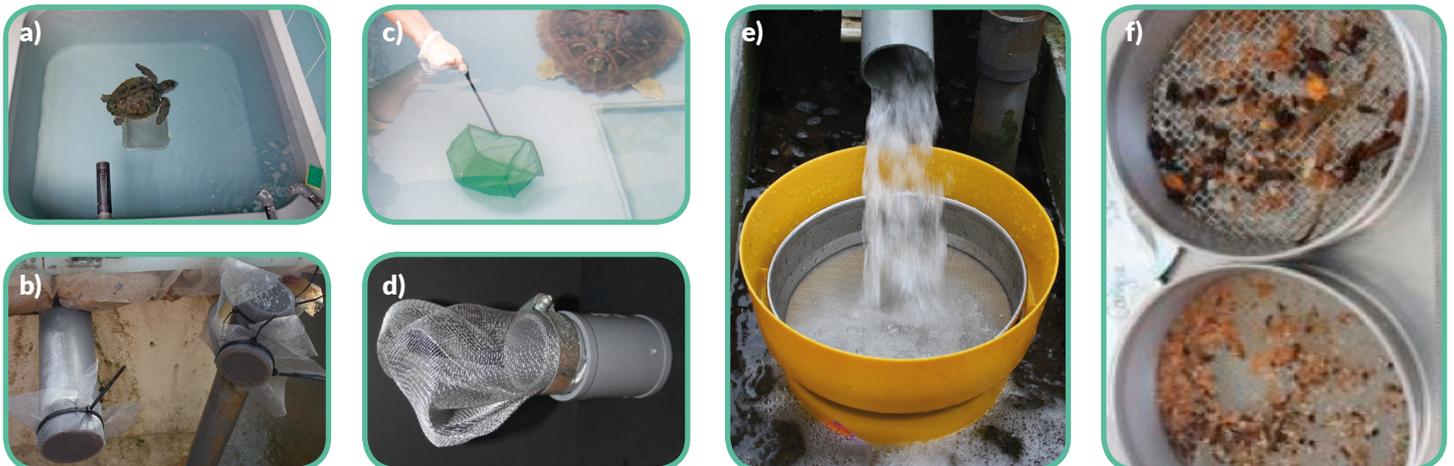


Fig. 9. Séquence d'échantillonnage des fèces. a) La tortue est disposée dans un bassin individuel; b) Un tamis de mailles de 1 mm est disposé sur les tuyaux d'évacuation du bassin; c) Une épuisette pour recueillir les fèces; d) Un collecteur de mailles de 1 mm au niveau des tubes de vidange pour filtrer l'eau du bassin; e) Un tamis rigide de mailles de 1 mm sous le drain pour filtrer l'eau du bassin; f) Échantillons recueillis dans un tamis rigide.

REMARQUE : Tout échantillon ne pouvant être directement analysé doit être conditionné dans un tube ou un sachet zippé adapté, identifié au marqueur permanent en inscrivant le code d'identification de l'animal, avec par exemple 2 lettres pour le pays _ 2 lettres pour la région/l'institution _ Année _ Mois _ Jour _ N° tortue _ Type d'échantillon (ex : FR_GR_2017_03_12_9_Fèces correspond aux fèces excrétées par le 9ème individu découvert au centre de soins du Grau du Roi en France, le 12 mars 2017). L'échantillon est ensuite conservé à -20°C ou dans de l'alcool à 70°C à température ambiante, en attendant les analyses de laboratoire.

C.2

COLLECTE DES DECHETS A PARTIR DES FECES

Rincer abondamment les tamis et les collecteurs au-dessus d'un tamis rigide (mailles de 1 mm) (Fig. 9f).

La collecte des débris est effectuée manuellement par observation visuelle directement à partir du tamis.

D. ANALYSE DES DECHETS ET CLASSIFICATION

D.1

CLASSIFICATION DES DECHETS

Préciser le **protocole** utilisé, entre « Autopsie » et « Fèces ».

Pour chaque section du SG de l'animal autopsié (Section B du présent document) ou pour les fèces (Section C du présent document), classifiez les déchets selon les catégories suivantes (Tableau 1, Fig. 10)⁷.

TYPE	CODE	DESCRIPTION
Plastiques industriels	IND PLA	Granulés industriels en plastique, généralement cylindriques mais parfois également de formes ovale, sphérique ou cubique, ou objet suspecté d'être d'origine industriel, utilisés pour les petites sphères (vitreuses, laiteuses...)
Feuilles plastiques	USE SHE	Restes de feuilles, par ex. de sachets, de feuilles adhésives, de feuilles d'usage agricoles, de sacs poubelles
Filaments de plastique	USE THR	Matériaux filiformes, par ex. des morceaux de fil de nylon, des fragments de filets, des vêtements tissés...
Mousses	USE FOA	Toutes les matières plastiques de type mousses, telle que la mousse de polystyrène, du caoutchouc souple (comme le rembourrage des matelas)...
Fragments plastiques	USE FRAG	Fragments, morceaux cassés de plastiques plus épais, peuvent être un peu flexibles, mais pas comme des matériaux de type « feuilles ».
Autres plastiques ménagers	USE POTH	Tout autre type de plastique, y compris les élastiques, le caoutchouc dense, les filtres de cigarettes, les ballons, les balles souples de fusil à air comprimé... Préciser dans la colonne "Remarques".
Déchets non plastiques	OTHER	Tous les déchets et polluants non plastiques.
Nourriture naturelle	FOO	Nourriture naturelle pour les tortues marines (ex : morceaux de crabes, méduses, algues...)
Naturel non alimentaire	NFO	Tout ce qui est naturel, mais qui ne peut pas être considéré comme un aliment nutritif normal pour les tortues marines (pierres, bois, pierre ponce, etc.).

Tab. 1. Classification des déchets marins pour les tortues marines

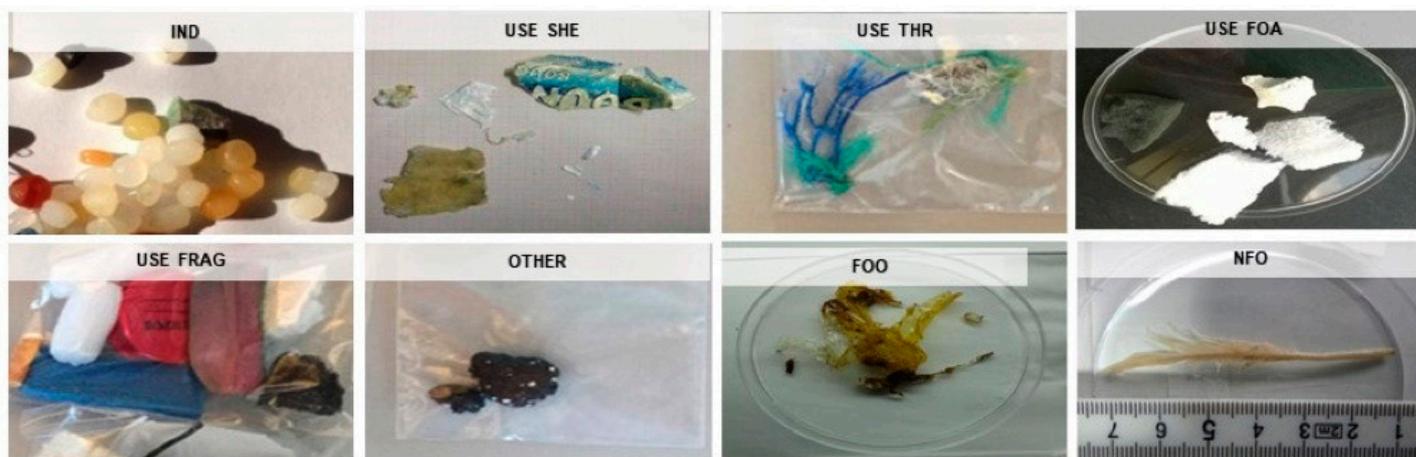


Fig. 10. Exemples des catégories de déchets établies pour l'ingestion des tortues marines.

⁷ La classification des débris a été ajustée par le consortium INDICIT, sur la base de la directive DCSMM (Galgani et al., 2013) et des retours d'expérience des partenaires et collaborateurs d'INDICIT (ex : centres de soins et réseaux d'échouage). Les catégories de déchets peuvent être identifiées visuellement et éventuellement confirmées par stéréomicroscopie.

D.2

COLLECTE DES DONNEES

Pour chaque section du SG des individus autopsiés ou de l'ensemble des échantillons des fèces pour les individus vivants de 1 à 2 mois depuis leur arrivée en centre de soins, enregistrer **la masse sèche des restes alimentaires (FOO)** et des **restes naturels non alimentaires (NFO)** et pour **chaque catégorie de déchets** collecter les paramètres suivants :

- **Masse sèche (grammes, précision 0.01g)**: Sécher l'échantillon à température ambiante pendant au moins 24h minimum ou dans un four à 35°C pendant 12h et noter le poids sec de chaque catégorie de déchets en grammes,
- **Nombres d'items** : Noter tous les items comptés,

Pour un **individu** (tous les échantillons, par exemple l'ensemble des sections du SG ou des fèces collectées par individu durant 1 ou 2 mois après son arrivée en centre de soins), noter :

- L'occurrence: Présence ou absence de déchets ingérés, 1 si au moins un déchet a été trouvé, 0 si aucun déchet n'est trouvé,
- La quantité de déchets ingérés en termes de:
 - **Masse sèche totale des déchets** (grammes, précision 0.01 g): somme des masses sèches rapportées pour les articles non naturels, après séchage à température ambiante pendant 24h minimum ou dans un four à 35°C pendant 12h,
 - **Nombre total d'items plastiques** : Compter tous les items plastiques (pour les catégories IND PLA, USE SHE, USE THR, USE FOA, USE FRAG, USE POTH), quelle que soit leur taille,
 - **Volume total des items plastiques** (millimètre, précision 0.01 ml): Mesurer le volume de toutes les catégories de plastiques (IND PLA, USE SHE, USE THR, USE FOA, USE FRAG, USE POTH) dans un bécher gradué et noter la variation de l'eau (Fig. 11). Pousser les déchets flottants dans l'eau à l'aide d'une tige ou d'un décimètre.
- Le nombre total d'items par catégorie de taille:
 - **Nombre total de micro-plastiques (1 - 5 mm)** : Compter tous les items plastiques dont la taille maximale est comprise entre 1 et 5 mm ,
 - **Nombre total des méso-plastiques (5 - 25 mm)** : Compter tous les items plastiques dont la taille maximale est comprise entre 6 et 25 mm,
 - **Nombre total des macro-plastiques (> 25 mm)** : Compter tous les items plastiques dont la taille maximale est supérieure à 25 mm,
- Le nombre total d'items plastiques par catégorie de couleur:
 - **Nombre total d'items plastiques blancs-transparents**: Compter tous les items plastiques blancs opaques ou transparents,
 - **Nombre total d'items plastiques de couleur foncée** : Compter tous les items plastiques de couleur foncée (noir, bleu, marron, vert foncé...)⁸,
 - **Nombre total d'items plastiques de couleur claire**: Compter tous les items plastiques de couleur claire (beige, jaune, rose, vert clair...)⁹,

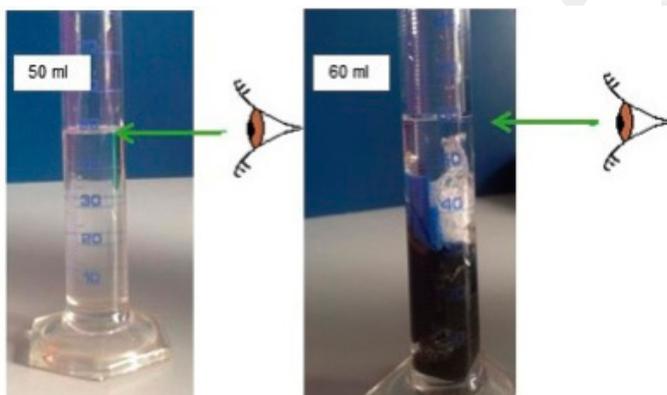


Fig. 11. Le volume des déchets correspond à la différence entre le volume avec (droite) et le volume sans (gauche) les débris. Le volume doit être lu en considérant la base du ménisque formé par l'eau à la surface.

⁸ Si 2 tamis (de mailles de 1 et 5 mm) ont été utilisés lors du rinçage des contenus digestifs ou fécaux, cela correspond à tous les items plastiques trouvés dans le tamis de mailles de 1 mm. Veuillez vous référer à l'Annexe 3 pour un protocole spécifique d'évaluation des micro-déchets chez les tortues marines.

⁹ La couleur peut être détaillée dans la colonne "Remarques".



Références

Bjorndal KA, Bolten AB, Chaloupka MY. (2000) Green turtle somatic growth model: evidence for density dependence. *Ecol Appl* 10:269-282

Camedda A., Marra S., Matiddi M., Massaro G., Coppa S., Perilli A., Ruiu A., Briguglio P. and de Lucia G.A. (2014) Interaction between loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) and marine litter in Sardinia (Western Mediterranean Sea). *Marine Environmental Research*. 100, 25-32.

Matiddi M., Hochscheid S., Camedda A., Baini M., Cocumelli C., Serena F., Tomassetti P., Travaglini A., Marra S., Campani T., Scholl F., Mancusi C., Amato E., Briguglio P., Maffucci F., Fossi MC., Bentivegna F., de Lucia G.A. (2017) Loggerhead Sea Turtles (*Caretta caretta*): a Target Species for Monitoring Litter Ingested by Marine Organisms in the Mediterranean Sea. *Environmental Pollution*. 230, 199-209.

Matiddi M., van Franeker J.A., Sammarini V., Travaglini A., Alcaro L. (2011) Monitoring litter by sea turtles: an experimental protocol in the Mediterranean. *Proceedings of the 4th Mediterranean Conference on Sea Turtles*. 7-10 November, Naples.

MSFD TG Marine Litter: Hanke G, Galgani F, Werner S, Oosterbaan L, Nilsson P, Fleet D, Kinsey S, Thompson R, Palatinus A, Van Franeker J, Vlachogianni T, Scoullou M, Veiga J, Matiddi M, Alcaro L, Maes T, Korpinen S, Budziak A, Leslie H, Gago J, Liebezeit G. (2013) *Guidance on Monitoring of Marine Litter in European Seas*. EUR 26113. Luxembourg (Luxembourg): Publications Office of the European Union; 2013. JRC83985

Thomson J.A., Burkholder D., Heithaus M.R. and Dill L.M. (2009) Validation of a Rapid Visual-Assessment Technique for Categorizing the Body Condition of Green Turtles (*Chelonia mydas*) in the Field. *Copeia* 2009, No. 2: 251-255.

Wyneken J. (2001) *The anatomy of sea turtles*. US Department of Commerce NOAA technical memorandum NMFS-SEFSC-470, 172 p.

ANNEXE 1 - FEUILLE D'OBSERVATION 1/2

OBSERVATION SHEET - Litter ingestion by sea turtles			
COLLECTOR:		LOCAL CODE:	
INSTITUTION:			
CONTACT:			
Discovery circumstances:			
SPECIES	<input type="checkbox"/> <i>Caretta caretta</i> <input type="checkbox"/> <i>Dermochelys coriacea</i> <input type="checkbox"/> <i>Chelonia mydas</i> <input type="checkbox"/> Other		
INDIVIDUAL TAG	Tag number:		Electronic chip N°:
INDIVIDUAL CODE:	CC	RR (Region)	YY MM DD n°
DATE OF DISCOVERY (yyyy/mm/dd):			
LOCATION:		X CORD: Y CORD:	
CIRCUMSTANCES	<input type="checkbox"/> By-catch/Fishery <input type="checkbox"/> Stranding <input type="checkbox"/> Dead at rescue centre <input type="checkbox"/> Found at sea <input type="checkbox"/> Other <input type="checkbox"/> NR		
BY-CATCH ENGINE CAUSE	<input type="checkbox"/> Longline <input type="checkbox"/> Trawl <input type="checkbox"/> Drift net <input type="checkbox"/> Fishing rod <input type="checkbox"/> Other <input type="checkbox"/> NR		
CAUSE OF DEATH/ STRANDING	<input type="checkbox"/> Bycatch/Fisheries <input type="checkbox"/> Entanglement in debris <input type="checkbox"/> Ingestion of litter <input type="checkbox"/> Anthropogenic trauma <input type="checkbox"/> Natural trauma <input type="checkbox"/> Natural disease <input type="checkbox"/> Oils <input type="checkbox"/> Healthy <input type="checkbox"/> Other <input type="checkbox"/> NR		
ENTANGLEMENT TYPE	<input type="checkbox"/> Active <input type="checkbox"/> Passive <input type="checkbox"/> NR		
LITTER CAUSING ENTANGLEMENT	<input type="checkbox"/> Net pieces <input type="checkbox"/> Monofilament lines <input type="checkbox"/> Rope/s <input type="checkbox"/> Plastic bags <input type="checkbox"/> Raffia <input type="checkbox"/> Other <input type="checkbox"/> NR		
PICTURES <input type="checkbox"/>	Picture names :		
Animal body condition:			
CONSERVATION STATUS	<input type="checkbox"/> 1 - Alive <input type="checkbox"/> 2 - Fresh <input type="checkbox"/> 3 - Partial <input type="checkbox"/> 4 - Advanced <input type="checkbox"/> 5 - Momified <input type="checkbox"/> NR		
HEALTH STATUS (Plastron shape)	<input type="checkbox"/> Poor (concave) <input type="checkbox"/> Fair (plane) <input type="checkbox"/> Good (convex) <input type="checkbox"/> NR		
MAIN INJURIES	<input type="checkbox"/> No injuries <input type="checkbox"/> Fracture <input type="checkbox"/> Amputation <input type="checkbox"/> Sectioning <input type="checkbox"/> Abrasion <input type="checkbox"/> Other		
AFFECTED PARTS	<input type="checkbox"/> Flipper () <input type="checkbox"/> Carapace <input type="checkbox"/> Neck <input type="checkbox"/> Head <input type="checkbox"/> Plastron <input type="checkbox"/> Other		
FAT RESERVES	<input type="checkbox"/> Thin <input type="checkbox"/> Fat <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> NR		
Biometric measurements:			
Curved measurements (0,01cm)		Straight measurements (0,01cm)	
CCLst	cm	SCLst	cm
CCLmax	cm	SCLmax	cm
CCLmin	cm	SCLmin	cm
CCW	cm	SCW	cm
CPL	cm	SPL	cm
CPW	cm	SPW	cm
WEIGHT (0,01kg)			
NOTES AND REMARKS (Discovery and Animal conditions):			

ANNEXE 1 - FEUILLE D'OBSERVATION 2/2

INDIVIDUAL CODE:									
CC	-	RR (Region)	-	YY	-	MM	-	DD	n°
Extraction of ingested litter									
PROTOCOL		<input type="checkbox"/> Necropsy <input type="checkbox"/> Observation of faeces							
ARRIVAL DATE / /		DEPARTURE DATE / /							
DEAD DATE / /									
FAT RESERVES		<input type="checkbox"/> Thin <input type="checkbox"/> Fat <input type="checkbox"/> Normal							
Please describe :									
VISCERAS STATUS <i>(note the presence of any infection, suspect colour, fluid effusion, perforation, presence of oil, etc.):</i>									
DIGESTIVE TRACT <i>(note the presence of any infection, suspect colour, fluid effusion, perforation, presence of oil, etc.):</i>									
TURTLE BEHAVIOUR AND TREATMENTS:									
Capacities of digestive tract section and gut content									
	FULL				EMPTY				
	mass	Vol (V1)	vol (V0)	V1-V0	mass	Vol (V1)	vol (V0)	V1-V0	
ŒSOPHAGUS									
STOMACH									
INTESTINES									
Marine debris measurements									
	ŒSOPHAGUS		STOMACH		INTESTINES				
	DRY MASS	NUMBER	DRY MASS	NUMBER	DRY MASS	NUMBER			
Ind. Plastic									
USE SHE									
USE THR									
USE FOA									
USE FRAG									
Other (USE poth)									
Non plastic									
FOO (nat. Food)									
NFO (nat. no food)									
TOTAL									
	TOTAL DEBRIS		NUMBER OF ITEMS		NUMBER OF ITEMS				
	dry mass		micro (1-5mm)		white transparent				
	number of items		meso (5-25mm)		dark coloured				
	volume		macro (>25mm)		light coloured				

ANNEXE 2 – LISTE DU MATERIEL

Pour la récupération de l'animal et le prélèvement d'échantillons sur le site de découverte

Corde (pour délimiter la zone)		Crayon/stylo	
Combinaison de protection intégrale		Feuille d'observation	
Lunettes et masques ou visières de protection		Bouteilles/sachets zippés	
Gants anti-coupures		Glacière	
Gants		Marqueur permanent	
Bottes		Bacs ou conteneurs de transport pour la tortue	
Caméra		Sacs poubelles	
Ruban à mesurer			

Pour la collecte des échantillons sur des animaux morts en laboratoire et l'extraction des déchets ingérés du système gastro-intestinal

Dans la salle de laboratoire		Pour l'autopsie et la collecte des échantillons	
Chambre froide ou congélateurs (-20°C) avec une grande capacité de stockage		Pincés clamps (au moins 6) et/ou de la ficelle de cuisine ou des colliers de serrage (ou serflex)	
Etuve (non obligatoire)		Scalpel (si possible avec lame interchangeable)	
Sacs poubelles		Ciseaux	
Pour ceux qui manipulent		Pincés à griffes	
Combinaison de protection intégrale		Contenants en métal	
Lunettes et masque ou visière de protection		Contenants pour les échantillons (Bouteilles/sachets zippés)	
Gants anti-coupures		Pour l'analyse des déchets ingérés	
Gants		Tamis de mailles de 1 mm	
Bottes		Tamis de mailles de 5 mm (optionnel – pour l'étude des micro-plastiques ingérés (1-5 mm))	
Pour la prise de notes et le rapport		Eprouvettes graduées (10 ml, 25 ml, 50 ml)	
Caméra		Décimètre	
Crayon/Style		Balance de précision (0.01 g)	
Feuille d'observation		Loupe binoculaire (optionnel)	
Marqueur permanent			
Pour les mesures biométriques			
Ruban à mesurer			
Etrier coulissant			

Pour la collecte des échantillons sur des individus vivants dans les centres de soins et l'extraction des déchets dans les fèces

Dans la salle de laboratoire		Pour la collecte des échantillons et l'analyse des déchets ingérés	
Congélateurs (-20°C)		Marqueur permanent	
Etuve (non obligatoire)		Feuille d'observation	
Sacs plastiques		Contenants pour les échantillons (tubes/sachets zippés)	
Pour ceux qui manipulent		Tamis de mailles de 1 mm	
Lunettes et masque de protection (optionnel)		Tamis de mailles de 5 mm (optionnel – pour l'étude des micro-plastiques ingérés (1-5 mm))	
Gants		Eprouvettes graduées (10 ml, 25 ml, 50 ml) (optionnel)	
Pour les notes et le rapport		Décimètre (optionnel)	
Caméra		Balance de précision (0,01 g)	
Crayon/Style		Loupe binoculaire (optionnel)	
Feuilles d'observation		Grilles de filtrations de mailles de 1 mm (au niveau de l'entrée et des sorties d'eau du bassin)	
Marqueur permanent		Epaisseur de mailles de 1 mm	
Pour les mesures biométriques		Micro-billes colorées de diamètre < 1 mm (optionnel)	
Ruban à mesurer			
Etrier coulissant			

PROTOCOLE POUR L'EXTRACTION DE MICRO-PLASTIQUES (OPTIONNEL)

1. ACTIONS PRÉPARATOIRES POUR ÉVITER LA CONTAMINATION

1. Pour les animaux morts

- Effectuer un lavage complet des sections du système gastro-intestinal avant l'ouverture en utilisant de l'eau au-dessus d'un tamis de mailles de 1 mm (eau filtrée).
- Effectuer un lavage complet de tous les instruments utilisés pendant l'analyse du contenu digestif et des déchets.

2. Pour les animaux vivants

- Effectuer un lavage exhaustif de la tortue avant de la placer dans un bassin d'échantillonnage en utilisant de l'eau courante.
- Placer un filtre de maille de 1 mm au niveau de l'entrée d'eau d'échantillonnage.
- Eviscérer les proies (poissons, calmars, crabes, etc.) avant de nourrir les tortues afin d'éviter la contamination causée par d'éventuels micro-plastiques ingérés par les proies.
- Prélever un échantillon dans un bassin vide (« témoin ») situé près du bassin d'échantillonnage afin de contrôler la contamination de l'air.

2. EXTRACTION DES MICRO-DÉCHETS INGÉRÉS

Pour évaluer spécifiquement la masse sèche des micro-déchets, superposer 2 tamis de mailles 1 et 5 mm et collecter les items de taille comprise entre 1 et 5 mm dans le tamis de mailles de 1 mm. **Les méthodes de collecte des micro-déchets à partir du contenu digestif ou des fèces sont similaires à celles décrites dans le texte (section D du présent document).**

Afin de mieux séparer les micro-déchets, qui pourraient être camouflés dans du contenu biologique, il est possible de procéder à une digestion chimique de la matière organique en introduisant la totalité du filtre à mailles de 1 mm dans un bocal en verre contenant de l'H₂O₂ / KOH, qui nécessite entre 12 et 24h selon la quantité de l'échantillon (Fig. 11).

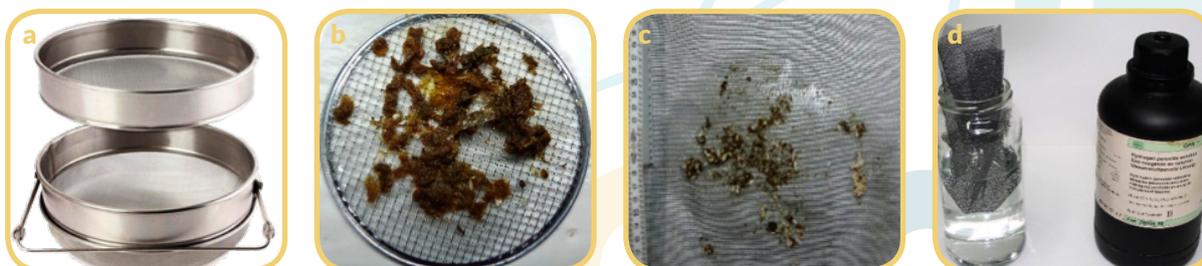


Fig. 11. Méthode d'extraction des micro-déchets. a) Méthode des 2 tamis; b) Échantillon collecté dans le tamis rigide de mailles de 5 mm; c) Échantillon collecté dans le tamis flexible de mailles de 1 mm; d) Digestion de l'échantillon de 1 mm dans de l'H₂O₂.