

GUIDE METHODOLOGIQUE DES METHODES DCE EN HYDROBIOLOGIE LITTORALE

ZOSTERES, BLOOMS OPPORTUNISTES, PHYTOPLANKTON

Aquaref-I-A-04 - Méthodes de bioindication en eaux littorales

Laurence Miossec
Janvier 2013

Programme scientifique et technique
Année 2012

Rapport d'étape

Contexte de programmation et de réalisation

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du programme d'activité AQUAREF pour l'année 2012

Auteur (s) : Laurence Miossec

Prénom Nom : Laurence Miossec

Etablissement : Ifremer

Email : lmiossec@ifremer.fr

Vérification du document :

Prénom Nom : Christian Chauvin

Etablissement : Irstea

Email : Christian.C Chauvin@irstea.fr

Prénom Nom : Anne Morin

Etablissement : Aquaref - Ineris

Email : Anne.MORIN@ineris.fr

Les correspondants

Onema : Emilie Breugnot, emilie.breugnot@onema.fr

Marie-Claude Ximénès, marie-claude.ximenes@onema.fr

Référence du document : Laurence Miossec - Guide méthodologique des méthodes DCE en hydrobiologie littorale Rapport AQUAREF 2013 - 32 p.

Droits d'usage :	Accès libre
Couverture géographique :	International
Niveau géographique :	National
Niveau de lecture :	Professionnels, experts
Nature de la ressource :	Document

I.	Introduction	8
II.	Les zostères en Manche- Atlantique (Auby et al., 2012)	8
II.1.	<i>Zostera noltii</i>	8
II.2.	<i>Zostera marina</i>	12
II.3.	Bibliographie	15
II.4.	Annexe : Utilisation du logiciel Image J.....	15
III.	Les blooms de macroalgues opportunistes en Manche Atlantique	20
III.1.	Masses d’eaux concernées	20
III.2.	Calcul de l’aire potentiellement colonisable	20
III.3.	Protocole d’acquisition de données	20
III.4.	Traitement des données.....	22
III.5.	Enquête auprès des communes.....	24
III.6.	Bibliographie.....	24
III.7.	Annexes.....	25
IV.	Le phytoplancton en Manche Atlantique et Méditerranée	30
IV.1.	Description des indices	30
IV.2.	Echantillonnage sur le terrain	30
IV.3.	Au laboratoire	30
IV.4.	Bibliographie	31

Liste des annexes :

Annexe 1 : cartes des littoraux suivis avec les trajets en avion effectués en Normandie, Bretagne et Sud-Loire

Annexe 2 : Délimitation des sites de suivi du CEVA et sa liste associée par ordre géographique du site le plus au nord vers le site le plus au sud

Annexe 3 : Aires potentiellement colonisables (AIH) issues de la somme des substrats meubles (sable et vase) sur les masses d’eau côtières et de transition des bassins Loire-Bretagne et Seine Normandie. Le classement d’un substrat en sable et en vase est effectué par photointerprétation (échelle 1/10000ème) et ne repose pas sur des critères géologiques stricts.

Annexe 4 : Liste des espèces d’algues vertes observées sur les côtes Manche-Atlantique (liste non exhaustive, à compléter au fil des observations)

Annexe 5 : Questionnaire type envoyé à toutes les communes du bassin Loire-Bretagne, Seine-Normandie et Adour-Garonne (île d’Oléron)

Titre : Guide méthodologique des méthodes DCE en hydrobiologie littorale

AUTEUR : Laurence Miossec, Ifremer

Resumé

Ce guide a pour objectif de recenser l'ensemble des méthodes appliquées pour déterminer les éléments de qualité biologique DCE en eaux littorales. Il prend en compte les méthodes de prélèvement et d'analyse des éléments de qualité validés. Il s'appuie sur les documents rédigés par les experts thématiques DCE de chacun de ces éléments de qualité. En 2012, un premier rapport avait décrit la méthodologie portant sur les zostères et les macroalgues intertidales et subtidales. Ce second rapport porte sur les blooms opportunistes et sur le phytoplancton dans les masses d'eau côtières et de transition. Il reprend la méthodologie relative aux zostères modifiée depuis la parution du rapport 2012.

Mots clés (thématique et géographique) : éléments de qualité, milieu marin, bloom opportunistes, phytoplancton, zostères, prélèvements, méthodes analytiques

Title: Methodological guide on WFD biological parameters and analyses

Author(s): Laurence Miossec, Ifremer

Abstracts

This guide aims to describe all methods used to evaluate the WFD biological quality elements in coastal waters. It takes into account the methods of sampling and analysis of the biological quality elements already validated. It is based on documents written by scientists, experts in these topics. In 2012, a first report described the methodology on eelgrass and intertidal and subtidal macroalgae. This second report focuses on opportunistic blooms and phytoplankton in coastal and transitional water bodies. It updates the methodology on eelgrass, modified since the report was published in 2012.

Key words (thematic and geographical area): Biological quality elements, marine water, opportunistic bloom, phytoplankton, seagrasses, sampling, analytical methods

Avant propos

L'un des objectifs d'Aquaref est de participer à l'harmonisation des prescriptions techniques des cahiers des charges rédigés par les donneurs d'ordre pour les prestataires de prélèvement et d'analyse et appuyer les donneurs d'ordre pour la conception et la gestion des réseaux de surveillance.

Dans ce contexte et pour les eaux littorales, l'Ifremer élabore un guide méthodologique. Celui-ci reprend les nouvelles méthodes développées par les experts thématiques et utilisées pour l'acquisition des données hydrobiologiques dans les réseaux de surveillance DCE en milieu littoral. Ce livrable 2012 constitue une partie de ce guide. Le tableau suivant précise la liste des éléments de qualité concernés et fait un bilan de la compilation des méthodes en cours de rédaction.

Façades	EQB	Masses d'eau	Description de la méthode
Manche - Atlantique	Phytoplancton	MEC et MET	2012
	Macroalgues intertidales	MEC et MET	2011 pour MEC
	Macroalgues subtidales	MEC	2011
	Macroalgues opportunistes	MEC et MET	2012
	Invertébrés benthiques	MEC et MET	A faire
	Herbiers de zostères	MEC et MET	2011 et 2012
	Poisson	MET	A faire (Irstea)
Méditerranée	Phytoplancton	MEC et MET	2012
	Macroalgues médiolittorales (CARLIT)	MEC	A faire
	Herbiers à posidonie	MEC	A faire
	Macrophytes	MET	A faire
	Invertébrés benthiques	MEC et MET	A faire
	Poisson	MET	A faire (Irstea)

I. Introduction

Ce chapitre s'inscrit dans l'action « Consolidation et mise au point de méthodes de bioindication et transfert aux opérateurs ». Il décrit les méthodes de prélèvements et d'analyse des indicateurs biologiques développés en milieu littoral. Il n'a, par contre, pas vocation à préciser le mode de calcul de ces indicateurs. En 2011, les méthodes concernant les macroalgues intertidales et subtidales ainsi que les herbiers en Manche Atlantique ont été décrites. Ce dernier protocole ayant fait l'objet d'ajustement en 2012, nous le reprenons dans sa totalité ; le descriptif publié dans le document précédent (Miossec et al., 2012) devient caduque. De plus, cette année nous décrivons les méthodes développées pour les blooms de macroalgues opportunistes en Manche Atlantique et pour le phytoplancton en Manche Atlantique et Méditerranée. Ce travail reprend les éléments des matériels et méthodes contenus dans les rapports rédigés par les experts de chacun des indicateurs concernés. Ces documents sont précisés dans la bibliographie. Des compléments ont pu être apportés, toujours sous le contrôle des experts. La version finale du guide a été soumise pour relecture à chacun d'entre eux puis corrigée si nécessaire :

- Isabelle Auby et Hélène Oger-Jeanneret de l'Ifremer pour les herbiers de zostères ;
- Nadège Rossi du CEVA pour les blooms de macroalgues opportunistes ;
- Catherine Belin, Hubert Grossel, Nathalie Malet, Nadine Neaud-Masson de l'Ifremer et Béatrice Bec de l'Université Montpellier 2.

Lorsque le protocole fait l'objet d'une norme, les références de celle-ci sont précisées. Le lecteur est invité à s'y reporter pour plus de détails sur la méthodologie.

Nous avons fait le choix d'inclure la bibliographie et les annexes dans le chapitre qui les concernaient et non en fin de document, ceci pour faciliter la lecture de chacun des chapitres ainsi que son utilisation ultérieure.

II. Les zostères en Manche- Atlantique (Auby et al., 2012)

II.1. *Zostera noltii*

Le protocole français, utilisé depuis 2007 pour le suivi stationnel des herbiers intertidaux de *Zostera noltii*, a été modifié à la fin 2011 puis en 2012. Basé initialement sur 3 métriques (composition taxinomique, extension spatiale de l'herbier et développement de l'herbier en termes non exclusifs de densité, biomasse et taux de recouvrement des herbiers à *Zostera noltii*) il a été réduit aux 2 premières métriques afin de mieux caractériser à méso échelle l'état des herbiers d'une masse d'eau et de réduire le temps et le coût de traitement des données au laboratoire. En contrepartie ce protocole, plus simple, est mis en œuvre chaque année.

Ce protocole s'applique à *Zostera noltii* en masses d'eau côtières et de transition.

Ces 2 métriques sont :

- La composition taxinomique qui s'appuie sur un arpentage des alentours de chaque station pour déterminer si *Zostera marina* var. *angustifolia* (variété à petites feuilles, souvent présentes dans les cuvettes) est ou non présente sur la station et ses alentours. Cette prospection s'avère nécessaire surtout dans les cas où cette variété était connue historiquement des herbiers d'une masse d'eau. Si elle est présente, elle sera alors prise en compte dans le nombre « d'espèces et/ou variétés » afin d'assurer la cohérence avec les autres protocoles européens (in Auby et al., 2010) ;
- La densité des herbiers à *Zostera noltii* » évaluée par la mesure du taux de recouvrement (et non plus des densités et des biomasses), de la même façon que les protocoles d'autres pays européens (in Auby et al., 2010) ;

La métrique « extension spatiale de l'herbier » fait actuellement l'objet de travaux devant déboucher sur une harmonisation des protocoles au niveau national. Elle n'est pas développée dans ce document qui traite uniquement du suivi stationnel.

Remarque : Trois paramètres supplémentaires¹ sont relevés même si ceux-ci n'interviennent pas dans la métrique Zostère. Il s'agit de paramètres accompagnateurs potentiellement explicatifs sur le long terme de l'état évolutif des herbiers :

- *la granulométrie et la teneur en matière organique si celles-ci ne sont pas déjà incluses dans un autre suivi DCE ;*
- *la biomasse des macroalgues par grands groupes (algues vertes, rouges et brunes) ;*
- *le nombre et la localisation des oiseaux herbivores consommateurs de Zostera noltii (bernaches, cygnes) quand ces données sont disponibles.*

II.1.1. Echantillonnage sur le terrain

a - Période :

L'échantillonnage est réalisé entre août et septembre, période de biomasses maximales.

b - Station et points :

Une station est constituée d'une grille rectangle de 100 x 80 m, dont chaque ligne et chaque colonne sont espacées de 20 m. Une station compte donc 30 points situés à l'intersection des 6 colonnes avec les 5 lignes (voir schéma ci-dessous).

Les coordonnées géographiques des points affectés à ces intersections sont codifiées par un code lettre-chiffre allant du code A1 au code F5 (figure 1). Ces coordonnées sont préalablement saisies dans le GPS, permettant si nécessaire de faire un trajet en direction de ce point par lecture du GPS.

Le point DCE « Herbier de Zostera noltii » est positionné au point D3 approximativement au centre de cette grille.

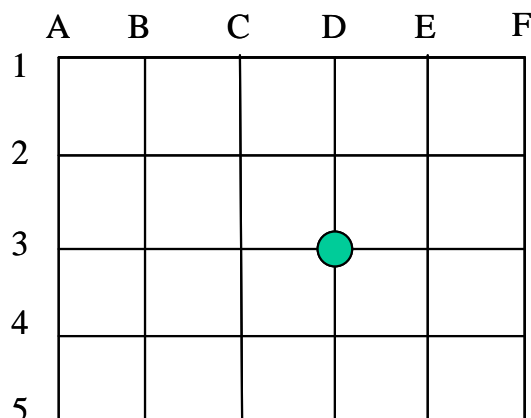


Figure 1 : Grille d'échantillonnage

Pour les herbiers de petite taille, cette grille peut être adaptée en conservant, dans la mesure du possible, un nombre de points égal à 30, en resserrant les mailles (jusqu'à 2 m de côté) et en adaptant la forme du rectangle à celle de l'herbier.

Cette grille de points est définie une fois pour toute pour chaque station puis réutilisée telle quelle pour les suivis ultérieurs.

c - Matériel :

Pour l'estimation des taux de recouvrement :

- 1 quadrat plat 50 X 50 cm soit 0,25 m² ;
- 1 appareil photo numérique et un pied éventuellement ;
- Poches en plastique préalablement numérotées (pour macroalgues) ;
- 1 GPS, éventuellement programmé pour la récolte des données et dans lequel les données des points ont été préalablement saisies ;
- Une plaque en formica pour écriture en milieu humide si les données ne sont pas saisies directement dans le GPS ;

¹ Dans la suite de ce texte, ce qui relève de ces paramètres sera noté en italique et en caractères plus petits

- 1 plaquette formica avec marqueur effaçable pour indiquer le code des points ;
- 1 parasol si le temps est ensoleillé (sinon placer un préleveur de manière à faire une ombre uniforme sur le quadrat.

Pour le sédiment :

- Carottiers (diamètres 9 cm et 3 cm) ;
- Pots ou sacs préalablement numérotés.

d - Taux de recouvrement des zostères et biomasses macroalgues :

Une observation sur chacun des 30 points de la station comporte :

- La pose du quadrat de 50 X 50 cm ;
- Le prélèvement des macroalgues, en distinguant algues vertes, algues brunes et algues rouges, avec prélèvement dans un sachet plastique différent si nécessaire, et numéroté pour l'estimation des biomasses. En cas d'absence de macroalgues, le noter. Dans le cas où les macroalgues sont très abondantes sur l'herbier, on effectue les prélèvements seulement sur un quadrat sur 3. Dans ce cas, on indique la présence ou non de macroalgues et le prélèvement ou non de macroalgues. En cas de présence des macroalgues, la réalisation d'un cliché du quadrat avant prélèvement de celles-ci. La photo est prise à la verticale en plein cadre (éventuellement sur pied), en prenant garde à ce que l'ombre soit répartie sur toute la photo (parasol ou opérateur) et en évitant les secteurs avec des flaques d'eau. Poser sur le côté du cadre la plaquette formica avec « M » code station - année - lettre et chiffre du point. Une résolution de 1600*1200 pixels environ est suffisante ;
- La prise d'une photo à la verticale en plein cadre sur pied en prenant garde à ce que l'ombre soit répartie sur toute la photo (parasol ou opérateur) et en évitant les secteurs avec des flaques d'eau. Poser sur le côté du cadre la plaquette formica avec code station - année- lettre et chiffre du point. Une résolution de 1300*1200 pixels environ est nécessaire. Pour garder un historique du développement de macroalgues, on prend une photo avant et après échantillonnage de macroalgues ;
- L'estimation visuelle des taux de recouvrement des zostères avec report de la valeur médiane de classe selon la correspondance du tableau ci-dessous. Les classes de recouvrement sont : 0, 0-25, 25-50, 50-75, 75-100, 100 (figure 2). Le « 0 » est un vrai 0 % avec absence de zostère ;

Classe de taux de recouvrement (%)	0	1-25	26-50	51-75	76-99	100
Valeur	0	0,125	0,375	0,625	0,875	1

Figure 2 : Classes de recouvrement des zostères et médianes correspondantes

- Le report des valeurs médianes sur la plaquette où figure le schéma de la grille (figure 3) ou bien une saisie dans le GPS si celui-ci le permet. Un exemple de report est fourni dans la figure 3 (ainsi, sur le point D3, la valeur de la médiane est de 0,625).

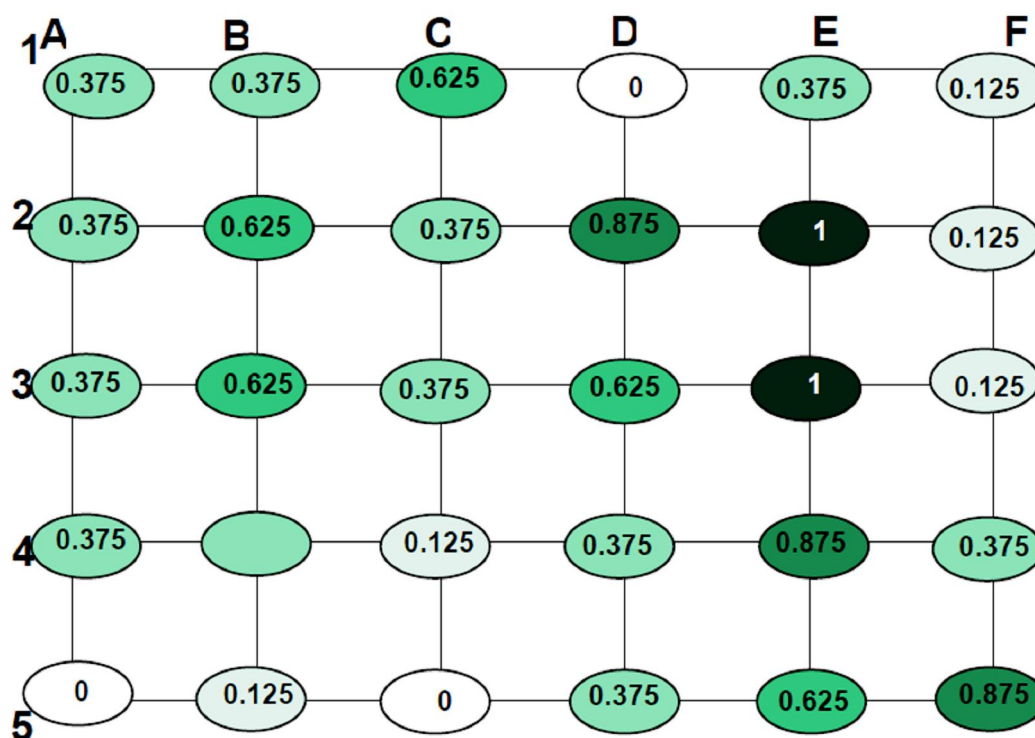


Figure 3 : Exemple de report des valeurs médianes sur la plaquette où figure le schéma de la grille d'échantillonnage

e - Sédiment :

Si la station n'est pas échantillonnée dans le cadre du suivi d'autres indicateurs :

- Pour la granulométrie, prélever 3 carottes sur l'emprise de la station (5 cm de profondeur, 9 cm de diamètre) ; mettre chaque carotte dans un pot en plastique ou un sac numéroté,
- Pour la matière organique, prélever 9 carottes sur l'emprise de la station (5 cm de profondeur, 3 cm de diamètre) ; mettre chaque carotte dans un pot en plastique ou un sac numéroté.

II.1.2. Au laboratoire

a - Taux de recouvrement zostères

Il s'agit de conforter le taux de recouvrement donné par l'observation visuelle sur le terrain avec une analyse semi-automatique des photos à l'aide d'un logiciel du domaine public :

- Renommer les fichiers photo par leur code de point : code station (initiales de la station)-année-lettre-chiffre ;
- Pour les classes extrêmes (0 et 100%), l'estimation visuelle sur le terrain suffit. Pour les autres classes de recouvrement, valider l'estimation faite sur le terrain (valeur médiane d'une classe de recouvrement) en utilisant le logiciel Image J (précisions en annexe du chapitre) ;
- Le calcul obtenu doit être rattaché à une classe de recouvrement et correspond à la valeur médiane de la classe de recouvrement (voir le tableau ci-dessus des classes de recouvrement et médianes associées). L'intérêt de cette approche est double : 1) elle est cohérente avec l'approche développée pour l'indicateur macroalgues intertidales (Ar Gall & Le Duff, 2007) et 2) elle permet de minimiser les biais liés à l'utilisation du logiciel Image J par plusieurs utilisateurs en ne retenant dans le calcul de la métrique que la valeur médiane d'un intervalle de classe.

b - Macroalgues

Dès le retour du terrain, congeler les échantillons à - 20°C.

Par la suite, séparer algues vertes, rouges et brunes (si non réalisé sur le terrain) puis lavage et séchage des échantillons à l'étuve (48 h minimum à 60°C), puis pesée à 0,1 g.

c - Sédiment

Granulométrie : De retour au laboratoire, réunir et homogénéiser les trois prélèvements de sédiment destinés à la granulométrie, Si nécessaire, retirer les coquilles de mollusques et les végétaux dans cet échantillon. Congeler à -20°C. S'il est impossible d'homogénéiser les prélèvements au retour au laboratoire, on peut congeler immédiatement les échantillons, Dans ce cas, le pré-traitement sera réalisé juste avant les analyses. Par la suite, granulométrie sur colonne humide,

Matière organique : Dès le retour du terrain, congeler les échantillons à -20°C. Par la suite :

- Retirer les débris végétaux et la faune du sédiment. Mesurer le poids sec (48 h minimum à l'étuve à 60°C). Mesurer le poids de cendres (4 h au four à 450°C), Calculer le PSSC² (= Psec - Pcendres).
- Le pourcentage de matière organique se calcule de la façon suivante : $AFDW \times 100 / PSec$.

II.2. *Zostera marina*

Remarque préalable : comme précédemment, plusieurs paramètres accompagnateurs³, potentiellement explicatifs sur le long terme de l'état évolutif des herbiers, sont relevés même si ceux-ci n'interviennent pas dans la métrique Zostère

II.2.1. Echantillonnage sur le terrain

a - Période

L'échantillonnage est réalisé au printemps en Manche et Bretagne et entre fin août et début septembre en Aquitaine. Dans les 2 cas, il s'agit de la période de biomasse maximale. L'échantillonnage est annuel.

b - Station et points

Il a été décidé d'échantillonner une station de *Zostera marina* par masse d'eau. Chaque station est composée de trois sous-stations (dénommées points), réparties sur l'ensemble du site et situées sur un même niveau bathymétrique (exemple en figure 4).

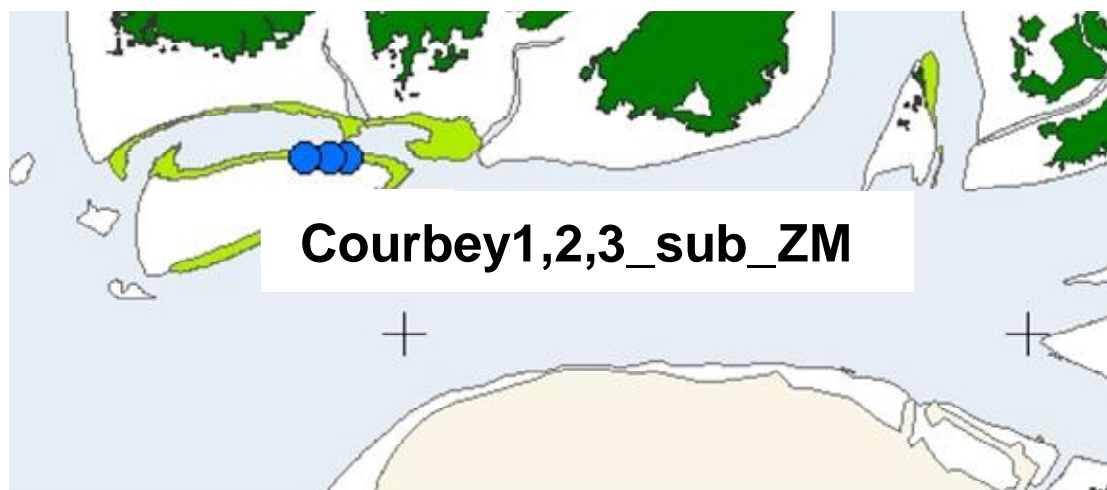


Figure 4 : Localisation des 3 points composant la station dans la masse d'eau « Arcachon amont ».

Les trois points composant la station doivent être choisis dans un secteur homogène et représentatif de l'herbier considéré, en évitant les zones de bordures. Il conviendra, lors de l'échantillonnage, de

² PSSC : Poids Sec Sans Cendre

³ Dans la suite de ce texte, ce qui relève de ces paramètres sera noté en italique

vérifier que le type biosédimentaire correspond bien à celui décrit lors des campagnes précédentes.

Tous les prélèvements sont réalisés dans les zones couvertes par les zostères.

c - Matériel

- Truelle
- Cadres 0,04 m² (20 cm de côté) ou 0,1 m² (31,6 cm de côté)
- Carottiers sédiment granulométrie (9 cm de diamètre)
- Carottiers sédiment MO (diamètre 3-4 cm)
- Poches plastique pour les végétaux
- Pots pour sédiment
- Appareil photo, si jugé utile

d - Zostères et macroalgues

Sur chaque point, les opérations sont les suivantes :

- Comptage du nombre de pieds de zostères in situ dans deux quadrats de 0,1 m² (ou 2 fois 2 quadrats de 0,04m² : dans ce cas, les densités dans 2 quadrats seront ajoutées).
- Prélèvement de deux quadrats de 0,1 m² (ou deux fois deux quadrats de 0,04 m²) sur 5 à 10 cm de profondeur (découpage avec une truelle). L'ensemble de la matte (pieds de zostères avec rhizomes, macroalgues) est mis en sacs séparément si surface = 0,1 m², deux par deux si deux fois 0,04 m².
- Si possible, prendre quelques photos du site.

e - Epiphytes et wasting disease

Dix pieds de zostères sont prélevés aléatoirement autour de chaque point et mis en sac pour quantifier les algues épiphytes et le wasting disease.

Il faut veiller à prélever des pieds intacts (feuilles non-cassées) jusqu'au rhizome, et ne pas écraser ces sacs.

f - Sédiment

- Pour la granulométrie, prélever 1 carotte par point, soit 3 par station (5 cm de profondeur, 9 cm de diamètre) ; les 3 carottes sont ensuite réunies dans le même pot.
- Pour la matière organique, prélever 3 carottes par point, soit 9 par station (5 cm de profondeur, 3 cm de diamètre) ; mettre chaque carotte dans un pot en plastique ou un sac numéroté.

II.2.2. De retour au laboratoire

Au retour du terrain, tamiser les prélèvements de zostères + macroalgues sur maille de 1 ou 2 mm. Séparer les zostères des macroalgues (par catégorie : vertes, rouges, brunes) et congeler à -20°C.

a - Zostères

Densité et biométrie sur l'échantillon prélevé

Pour chacun des 6 échantillons (2 par point)

- dénombrer les pieds.

Réaliser des mesures biométriques sur l'ensemble des pieds :

Nombre de feuilles par pied puis, pour chaque feuille :

- longueur de la gaine (depuis le nœud basal jusqu'en haut de la gaine)
- longueur du limbe (depuis le haut de la gaine jusqu'en haut de la feuille)
- largeur de la feuille (mesurée dans la zone moyenne)

NB : Les feuilles sont numérotées de la plus jeune (1. La plus courte, la moins épiphytée et la moins atteinte par la maladie) à la plus vieille (X : La plus longue, la plus épiphytée et la plus atteinte par la maladie).

Biomasses

Mesurer le poids sec (après 48 h à l'étuve à 60°C) de l'ensemble des limbes (depuis le haut de la gaine jusqu'en haut de la feuille).

Mesurer le poids sec (après 48 h à l'étuve à 60°C) de l'ensemble des gaines (depuis le nœud basal

jusqu'au sommet de la gaine).
Mesurer le poids sec des rhizomes + racines.

Si possible, mesurer le poids de cendres (après 4 h au four à 450°C). Calculer le PSSC (=PS-Pcendres).

NB : Ces mesures permettent, entre autres, d'obtenir des rapports biomasse/surface des feuilles, qui seront ensuite utilisés pour rapporter les biomasses d'épiphytes à une biomasse de feuilles (dont on ne mesurera que la surface).

Epiphytes et wasting disease

Les mêmes pieds seront utilisés pour les deux opérations.

Epiphytes

Il s'agit d'estimer la biomasse d'épiphytes présents sur les feuilles.

Wasting disease

Il s'agit d'estimer le pourcentage de zones noires, voire blanches, bien délimitées (à ne pas confondre avec des taches brunes plus diffuses dues à la dégradation des pigments chlorophylliens de la feuille plus parfois nécrose blanche qui fait des entailles sur les zones noircies) sur les feuilles.

Ces pourcentages s'apprécient à partir des images suivantes (figure 5) :

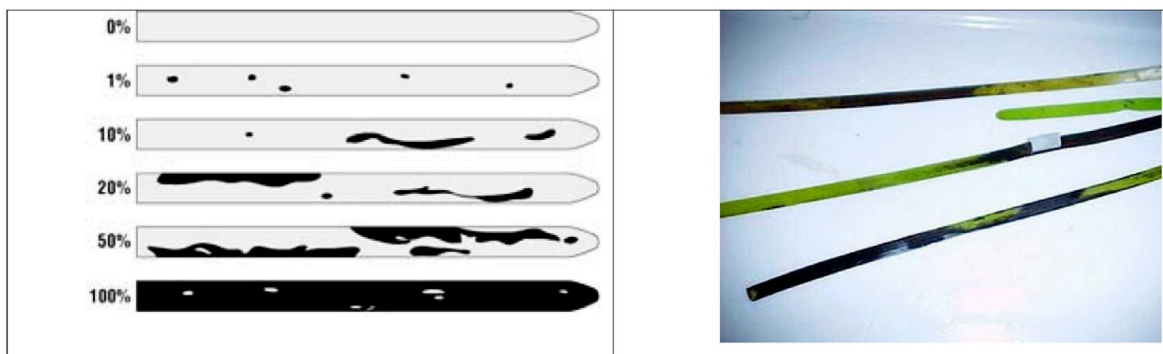


Figure 5 : Echelle d'évaluation du phénomène de Wasting disease sur Zostera marina

Pour chaque échantillon de 10 pieds provenant de chacun des 3 points :

- Racler les épiphytes présents sur les feuilles des 10 pieds. Les recueillir sur une feuille d'aluminium préalablement pesée et gravée. Conserver les pieds.
- Mesurer le poids sec (après 48 h à l'étuve à 60°C) des épiphytes
- Mesurer le poids de cendres (après 4 h au four à 450°C) des épiphytes. Calculer le PSSC (=PS-Pcendres).

Pour chaque échantillon de 10 pieds provenant de chacun des 3 points :

Nombre de feuilles par pied puis, pour chaque feuille :

- longueur du limbe (depuis le haut de la gaine jusqu'en haut de la feuille)
- largeur de la feuille (zone moyenne)
- pourcentage de maladie estimé sur la feuille

NB : Les feuilles sont numérotées de la plus jeune (1. La plus courte, la moins épiphytée et la moins atteinte par la maladie) à la plus vieille (X : La plus longue, la plus épiphytée et la plus atteinte par la maladie)

b - Macroalgues

Pour chacun des 6 échantillons de macroalgues (2 par point), les 3 catégories d'algues non épiphytes (vertes, brunes ou rouges) sont séparées.

Les biomasses (poids sec PS) des algues par catégorie sont mesurées (à 0,1g) après séchage à l'étuve : 48 heures minimum à 60°C.

Si possible, mesurer le poids de cendres (après 4 h au four à 450°C). Calculer le PSSC⁴ (=PS- Pcendres).

c - Sédiment

Granulométrie

De retour au laboratoire, homogénéiser les trois prélèvements de sédiment destinés à la granulométrie. Si nécessaire, retirer les coquilles de mollusques et les végétaux dans cet échantillon. Congeler à -20°C.

S'il est impossible d'homogénéiser les prélèvements au retour au laboratoire, on peut congeler immédiatement les échantillons. Dans ce cas, le prétraitement sera réalisé juste avant les analyses.

Par la suite, granulométrie sur colonne humide.

Matière organique

Dès le retour du terrain, congeler les échantillons à -20°C ;

Par la suite :

Retirer les débris végétaux et la faune du sédiment. Mesurer le poids sec (48 h minimum à l'étuve à 60°C). Mesurer le poids de cendres (4 h au four à 450°C)

Calculer le PSSC (= Psec - Pcendres)

Le pourcentage de matière organique se calcule de la façon suivante : PSSC) x 100 / PSec.

II.3. Bibliographie

Ar Gall E. et Le Duff M. (2007). Protocole d'observation in situ et proposition de calcul d'un indice de qualité pour le suivi des macroalgues sur les estrans intertidaux rocheux dans le cadre DCE, Rapport non publié LEBHAM - IUEM - UBO, Brest: 14 pp.

Auby I., Dalloyau S., Hily C., Oger-Jeanneret H., Plus M., Sauriau, P.-G. et Trut G. (2012). Protocoles de suivi stationnel des herbiers à zostères pour la Directive Cadre sur l'Eau (DCE), *Zostera marina* et *Zostera noltii*, Ifremer, document interne, 20 pages, septembre 2012.

Auby I., Oger-Jeanneret H., Sauriau P.-G., Hily C. et Barillé L. (2010). Angiospermes des côtes françaises Manche-Atlantique, Propositions pour un indicateur DCE et premières estimations de la qualité, Ifremer, Arcachon, Rapport Ifremer: 72 pp. + annexes.

Miossec L., Soudant D. et Le Stum M. (2012). Consolidation et mise au point de méthodes de bio-indication et transfert aux opérateurs - Contributions Hydrobiologie en milieu marin. Rapport Aquaref, Action I-A-04 (8), 96 pages.

II.4. Annexe : Utilisation du logiciel Image J

1- Télécharger le logiciel

<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>

2- Choisir la version adaptée à votre plateforme Pour Windows

Download ImageJ 1, bundled with 32-bit Java 1.6.0_20 (28MB), or without Java

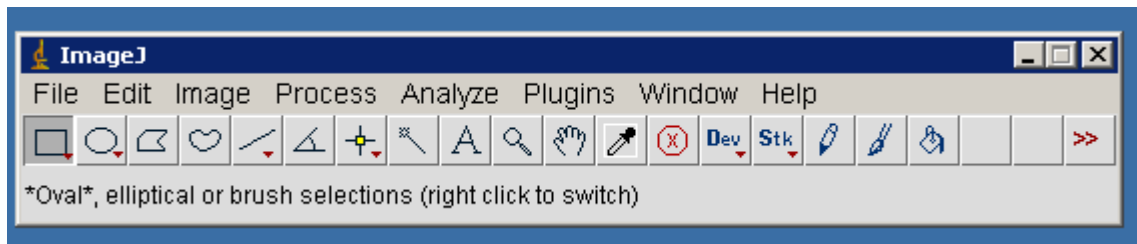
(3MB).

Par défaut, prendre la version sans Java.

3- Installer et valider les deux premiers écrans d'installation

le logiciel s'ouvre et fournit la fenêtre du menu suivant :

⁴ PSSC : Poids Sec Sans Cendre



4- Dans ce menu « ImageJ »

4.1- Ouverture d'un fichier

File

Open : choisir le répertoire et fichier (ici une image des Doux, Oléron), ouvrir

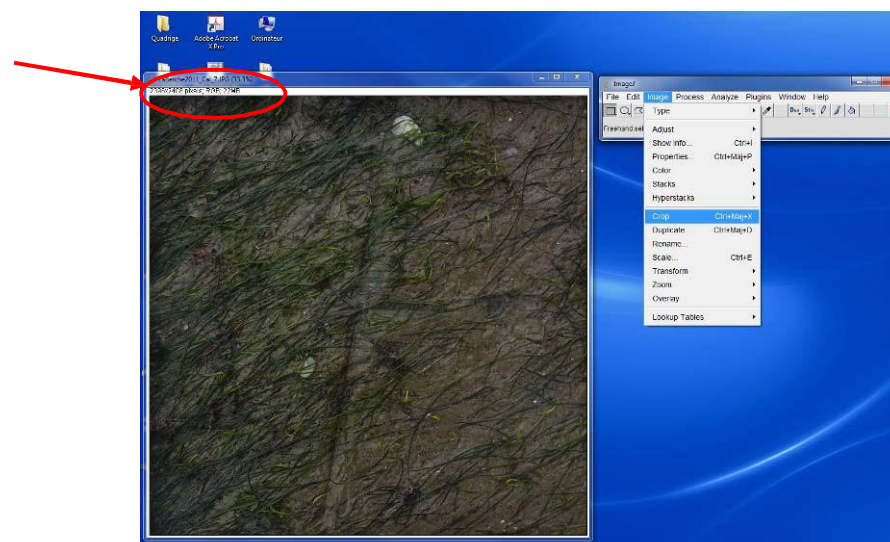
4.2- Choix de la surface à traiter

Si nécessaire, redresser la photo : Image/transform/rotate

Recadrer la photo : dans le menu, cliquer sur (outil de sélection rectangle) et tracer le rectangle le plus près possible du pourtour interne du cadrat. Relâcher la souris



Valider la sélection : Image/crop. Le nombre de pixels de l'image sélectionnée s'affiche en haut de l'image et servira pour le calcul final



Nb pixels

4.3 - Délimitation de la surface occupée par les zostères

Image

Adjust

Threshold

Le but est de colorer sur l'image tout ce qui est de la zostère. Si le logiciel ne le choisit pas par défaut, sélectionner :

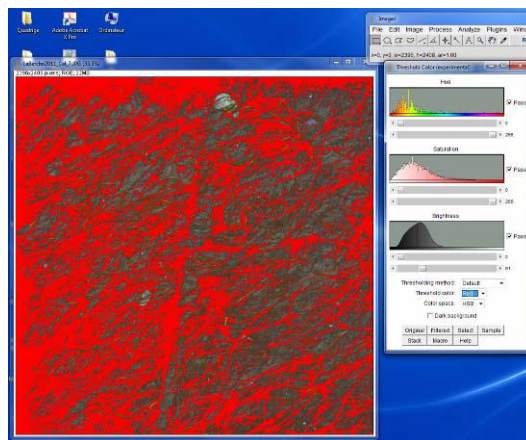
Thresholding method : **Default**

Threshold color : **Red**

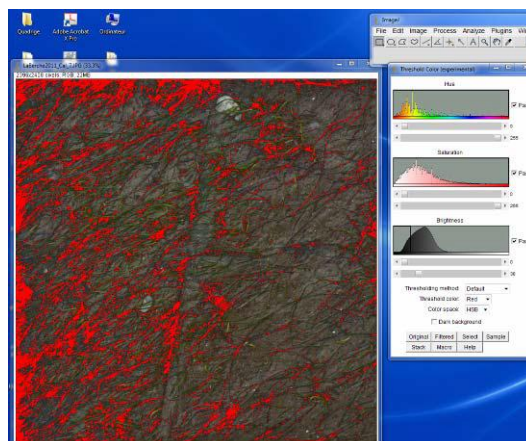
Color space : **HSB**

Décocher : **Dark background**.

Pour colorer les zostères en rouge, augmenter progressivement le second curseur %Brightness-, soit à partir de la valeur sélectionnée automatiquement par le logiciel, soit en le mettant à 0, ce qui permet de suivre précisément l'augmentation de la surface colorée.



Brightness 61

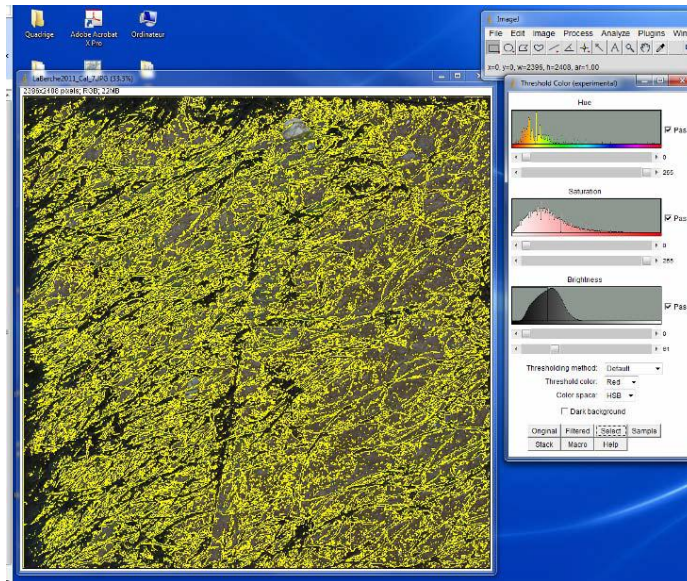


Brightness 38

Il est possible à tout moment de comparer l'image colorée en rouge avec l'image originale en cliquant sur le bouton « original ».

En revenant à l'image filtrée (bouton « filtered »), il arrive que l'image soit en noir et blanc. Dans ce cas, actionner à nouveau « Threshold color : red ».

Lorsque la sélection est proche de l'original, actionner le bouton « select » : les zones à exclure sont entourées en jaune.



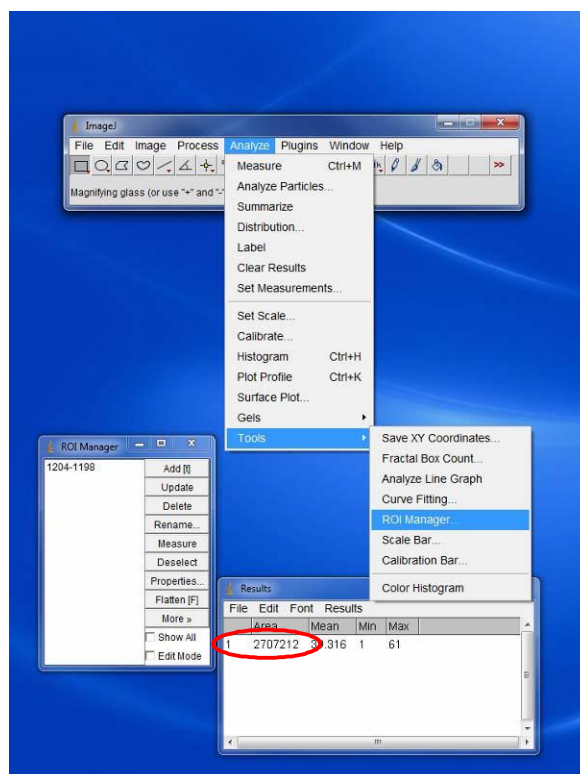
4.4 Æ Calcul du taux de recouvrement

Dans le menu, choisir : **Analyze/Tools/ROI Manager**





Cliquer sur : **Add(t)**, puis sur **Measure**

La fenêtre « **Results** » s'ouvre : dans la colonne « **Area** », elle indique le nombre de pixels sélectionnés correspondant aux zostères.

Calculer le **taux de recouvrement** en divisant ce nombre par le nombre total de pixels qui apparaît en haut à gauche de l'image sélectionnée.



4.5 Æ Exemples de taux de recouvrement

Classe de taux de recouvrement (%)	Recouvrement mesuré par ImageJ	Photo	Médiane
1-25	25%		0,125
26-50	42%		0,375
51-75	61%		0,625
76-95	89 %		0,875

III. Les blooms de macroalgues opportunistes en Manche Atlantique

Ce protocole a été élaboré par Patrick Dion, Nadège Rossi et Sylvain Ballu du CEVA.

III.1. Masses d'eaux concernées

La méthodologie décrite dans la suite de ce document s'applique à l'ensemble du linéaire côtier des bassins Artois-Picardie, Seine-Normandie, Loire-Bretagne et Adour-Garonne sur les masses d'eau côtières comme sur les masses d'eau de transition, à l'exception de la masse d'eau côtière FRFC09 (lac d'Hossegor) qui fait l'objet d'un protocole spécifique que nous ne détaillons pas ici (Blanchet et al., 2011).

Le CEVA a découpé le littoral en sites selon la continuité et la nature des dépôts algaux et en considérant les zones a priori homogènes en termes d'apports en nutriments. Ce découpage a été initié en amont de la DCE, à partir des premiers inventaires (1997) puis complété dans le cadre de la DCE. Ces sites sont classés en 2 catégories : les sites « ouverts », sableux, sur lesquels se retrouvent des dépôts algaux mobiles, et des sites « enclavés », vaseux à dépôts peu mobiles. L'ensemble du linéaire côtier est surveillé (survol de l'avion en annexe 1) et la cartographie des sites actuellement déterminés est fournie en annexe 2 (certains sites définis n'ont pour autant jamais fait l'objet de classement pour une prolifération d'ulves). Le nombre de sites est potentiellement évolutif en cas d'apparition de nouveaux secteurs d'échouage. Une masse d'eau peut être subdivisée en plusieurs sites de catégories différentes ce qui est plus fréquent pour les masses d'eau côtières que pour les masses d'eau de transition généralement composées de sites vaseux.

III.2. Calcul de l'aire potentiellement colonisable

Pour l'évaluation de la qualité écologique des masses d'eau, il est nécessaire de définir l'aire potentiellement colonisable par les algues vertes. Cette aire est définie comme étant l'aire de substrat meuble de la zone d'estran comprise entre le trait de côte et le niveau de basse mer à coefficient 120 (0 des cartes SHOM). Pour chaque masse d'eau, les zones de sables, vase, roches et schorres ont été estimées et digitalisées à une échelle 1/10000e par le CEVA. Chaque zone de substrat a été identifiée à partir des orthophotos littorales V1 (IGN, 2000-2002) et des indications issues de cartes IGN (1/25000e) et de photos aériennes prises par le CEVA (2010). La zone potentiellement colonisable a été établie en effectuant la somme des zones sableuses et vaseuses pour chaque masse d'eau suivie. Ces évaluations sont détaillées dans le tableau de l'annexe 3 et constituent des données de référence pour le calcul des métriques.

Cette évaluation a été réalisée en 2009 et 2011 suivant les secteurs côtiers.

III.3. Protocole d'acquisition de données

Les données sont collectées sur photos aériennes lors de survols ; chaque survol fait l'objet d'un contrôle de terrain sur les sites présentant des échouages dont la nature doit être précisée. Les survols couvrent l'ensemble du littoral de la Normandie (à l'exception du secteur entre La Hague et Cherbourg dans le département de la Manche), de la Bretagne (à l'exception de la presqu'île de Crozon et des îles), et du département de Loire Atlantique, de la Vendée (exception de l'île d'Yeu). En Charente Maritime, l'île d'Oléron ainsi que le littoral compris entre la limite de la Vendée et la pointe ouest de l'île de Ré est prise en compte.

Conditions des survols aériens :

Chaque année, 3 survols sont réalisés, encadrant la période de prolifération la plus intense, au cours des mois de mai, juillet et septembre en période de vive-eau, avec un coefficient supérieur à 75 (sauf impossibilité de réalisation liée aux contraintes météo).

Les observations se font à marée basse en privilégiant des conditions météorologiques favorables : si possible, absence totale de nuage ou présence d'un plafond élevé afin de s'assurer d'une bonne qualité de prises de vue, vent et houle minimum, conditions favorables à l'échouage et à l'observation des algues.

L'appareil est un avion de type CESSNA caractérisé par des ailes hautes afin de dégager au maximum le champ de prise de vue. L'altitude du vol est généralement comprise entre 1500 et 4000 pieds. Cette donnée est adaptée en fonction des plafonds observés lors du vol et en fonction de l'étendue des sites.

Deux opérateurs sont à bord de l'avion, l'un prend les photos, l'autre positionne sur une carte les photos prises. Cependant, dans le cas d'utilisation de boîtier photo stockant les positions GPS de prise de vue, un seul opérateur peut être embarqué. Les photos sont acquises en oblique suivant un angle compris entre 0 et 80 ° avec un boîtier photo de type reflex numérique de 12 millions de pixels minimum, éventuellement équipé une option d'enregistrement de la position GPS (fichier .exif). Chaque site peut faire l'objet d'une ou plusieurs photos suivant sa taille et les conditions de vol. Les meilleurs clichés de chaque site classé comme touchés par des échouages d'ulves sont intégrés dans le SIG afin de couvrir l'ensemble des dépôts.

Contrôles terrain :

Tous les sites présentant des échouages détectables sur les photos sont visités si leur morphologie laisse suspecter la présence d'ulves non marginale. La plupart des observations in situ sont réalisées dans les 4 j suivant le vol de telle sorte de bénéficier des coefficients de marée permettant de retrouver les dépôts observés lors des survols. Cependant, certains sites, présentant des dépôts a priori peu mobiles, peuvent l'être dans un délai plus long allant jusqu'à 10 j.

Chaque site contrôlé fait l'objet d'une fiche d'observation. Celle-ci comporte la date, le nom du site, deux cartes IGN (1/250000e et 1/25000e) permettant de localiser le site d'observation, et la photo aérienne qui a permis la mise en évidence des dépôts. Elle mentionne :

- Les proportions d'algues vertes, rouges et brunes (plusieurs observations si les dépôts sont de composition variable) ;
- Parmi les algues vertes, la proportion d'ulves (en lame) et d'entéromorphes (algues vertes filamenteuses) et les proportions d'ulves issues d'arrachage récent et d'algues à croissance libre dans la masse d'eau.

Elle comporte également des photos numériques de l'ensemble du dépôt avec zoom permettant de distinguer les types d'algues présents. Au mieux, l'appareil photo utilisé doit être équipé d'un GPS afin de géoréférencer les observations.

Idéalement, pour chaque site faisant l'objet d'un contrôle de terrain, un échantillon correspondant aux espèces d'algues majoritairement présentes est prélevé pour identification au laboratoire et conservé en glacière (T°C moyenne 10°C) jusqu'au retour au laboratoire ; ils sont alors placés au réfrigérateur à 4°C. L'identification des espèces se fait sous microscope (grossissement maximum X 200). La liste d'espèces candidates est précisée en annexe 4.

A l'issue de chaque survol, les sites sont classés comme étant touchés par un échouage d'ulves si :

- *pour les sites ouverts* : les dépôts visibles sur les clichés aériens sont constitués à plus de 30% d'ulves (estimation visuelle de la couverture que représentent les ulves par rapport au total des algues) ;
- *pour les sites enclavés* : les couvertures d'algues vertes repérées lors du survol sont composées, au moins localement, de tapis continus d'ulves.

Ce classement s'appuie sur les photos aériennes complétées des vérifications terrain effectuées dans les jours qui suivent le survol aérien. Ce classement est une étape de la chaîne de traitement menant à l'évaluation surfacique des blooms.

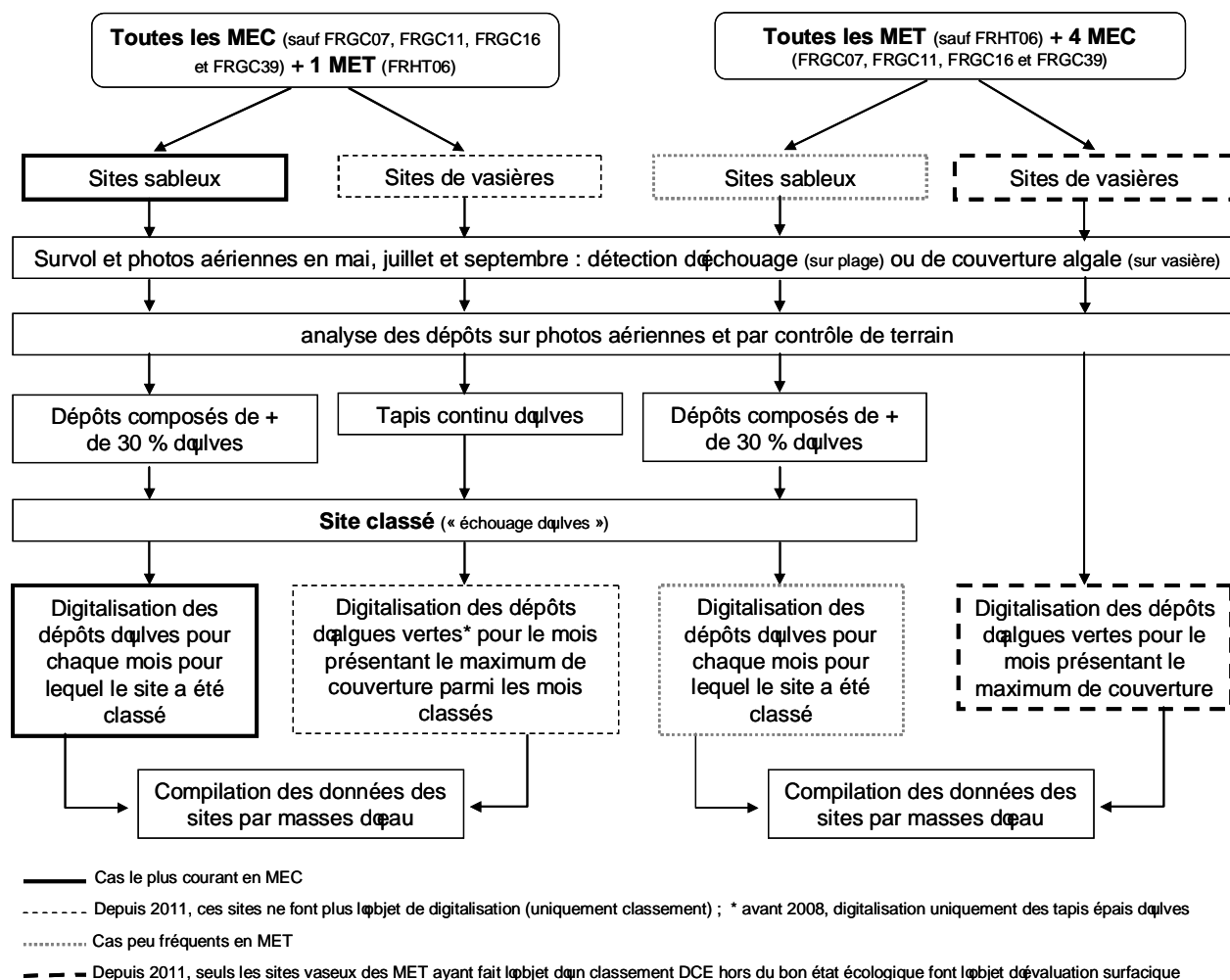


Figure 1 : Organigrammes de procédure d'acquisition des données surfaciques de marées vertes par masses d'eau et par sites.

III.4. Traitement des données

Seuls les sites classés font l'objet d'une évaluation surfacique : les dépôts des sites ouverts sont digitalisés à chaque fois qu'un site est classé comme touché (parmi les trois inventaires annuels) ; les dépôts des sites enclavés sont digitalisés uniquement au maximum annuel (estimation visuelle sur les clichés aériens). A noter que, depuis 2011, les évaluations surfaciques des sites de vasière sont restreintes aux masses d'eau ne respectant pas le bon état écologique (classement par l'outil « vasière » qui intéresse les masses d'eau de transition et quatre masses d'eau côtières présentant des proliférations de type « vasière »)⁵.

De retour au laboratoire, pour chaque site devant faire l'objet d'évaluation de surface, les photos aériennes sont intégrées dans un SIG (logiciel ArcGis) ; elles sont géoréférencées ce qui permet leur redressement géométrique à partir d'au minimum 10 points de calage par cliché (utilisation de l'ortholittorale, de photos aériennes complémentaires sur certains secteurs, du scan 25 de l'IGN, de la base de données d'amers du CEVA). Pour un site donné et sur la base de la mosaïque des photos

⁵ Pour les années 2007 à 2010 tous les sites de type « vasière » classés comme touchés par des échouages d'algues ont fait l'objet d'une évaluation surfacique au maximum annuel ; depuis 2011, seules une liste restreinte de sites de vasières fait l'objet d'évaluation surfacique ; néanmoins les acquisitions aériennes et de terrain ont été réalisées par le CEVA, permettant des évaluations surfaciques ultérieures des sites non traités.

ainsi créée, les dépôts d'algues sont digitalisés sous forme de polygone à une échelle comprise entre le 1/2500e et 1/5 000e. Chaque type de dépôt (de haut de plage en andain, en tapis épais, diffus médio littoraux, dendrites de bas de plage, rideau) donne lieu à un polygone. Chaque polygone obtenu fait l'objet d'une estimation visuelle du pourcentage de couverture algale par l'opérateur comme illustré par l'exemple donné en figure 2 (taux d'ulves -lames- pour les sites sableux et taux d'algues vertes, en lames comme en filaments pour les sites de vasières), permettant le calcul d'une surface en équivalent 100 % de chaque polygone (taux de couverture X surface du polygone). Ce travail d'évaluation d'un taux de recouvrement est délicat ; il est réalisé sur les photos géoréférencées en utilisant les autres photos aériennes non géoréférencées prises à des échelles éventuellement mieux adaptées complétées par celles prises sur le terrain lors du contrôle sur sites si les dépôts semblent avoir les mêmes typologies (dates proches et conditions météorologiques stables). Cette évaluation peut être réalisée par différents opérateurs mais, afin de veiller à une homogénéité des photo-interprétations, et de lisser les éventuels biais liés aux opérateurs, le responsable des suivis valide l'ensemble des digitalisations réalisées.



Figure 2 : Géoréférencement des clichés aériens et digitalisation des dépôts algaux (polygones, tracé vert) avec attribution des pourcentages de recouvrement en algues (chiffres en noirs dans les polygones) en baie de Guisseny pour un inventaire de l'année 2008 (photo CEVA).

Pour les eaux côtières, la somme des dépôts digitalisés est réalisée par masse d'eau et par mois. Les sites enclavés étant au mieux digitalisés une seule fois par an⁵, il peut en résulter une légère sous-estimation des dépôts algaux, jugée admissible.

Pour les masses d'eau de transition (et les quatre masses d'eau côtières dont la prolifération est de type « vasière »), seule les masses d'eau ayant fait l'objet d'un classement hors bon état écologique font l'objet d'une évaluation surfacique⁵. Pour les eaux de transition, lorsque plusieurs sites enclavés sont compris dans une même masse d'eau, les digitalisations sont faites à la même date d'inventaire pour chaque site, la date retenue correspond au maximum de couverture algale à l'échelle de la masse d'eau.

III.5. Enquête auprès des communes

Actuellement, les masses d'eau qui font l'objet d'un ramassage important par les communes sont classées, du fait de la présence d'échouage, de facto en dehors du bon état. Ce ramassage, avec les outils actuels, ne représente qu'une petite partie des échouages à l'échelle de la masse d'eau. Néanmoins, il est envisageable que le ramassage (surtout s'il s'accroît avec l'utilisation des nouveaux moyens techniques) contribue significativement à une amélioration de l'état écologique de la masse d'eau considérée. Dans ce contexte, il convient, en parallèle à la mise en place du protocole détaillé plus haut, d'enquêter auprès des communes. L'analyse des données concernant les volumes récoltés et le nombre d'interventions, issues de cette enquête, pourrait permettre de détecter une possible implication du ramassage à l'amélioration mesurée.

Un formulaire d'enquête, accompagné d'un courrier l'introduisant, est envoyé chaque année à toutes les communes littorales des bassins Loire-Bretagne, Seine-Normandie et Adour-Garonne (Ile d'Oléron). Il aborde les constatations d'échouages sur le littoral communal et les ramassages éventuellement entrepris : volume, type d'algue, coûts engendrés, moyens de ramassage et destination des algues. Les informations issues de ces enquêtes permettent d'appréhender dans les grandes lignes les volumes collectés et leurs évolutions au fil des ans. L'annexe 5 présente le questionnaire envoyé aux communes.

Remarque : Notons que le critère « Ramassage » ne peut être standardisé car l'effort de ramassage d'une commune à l'autre ne dépend pas uniquement des quantités présentes. En effet, d'autres éléments interviennent tels que la pression touristique, les moyens techniques et financiers, la configuration des dépôts plus ou moins accessibles au ramassage...etc. Ce contexte rend d'autant plus délicat le déclassement systématique une masse d'eau en cas de ramassage.

III.6. Bibliographie

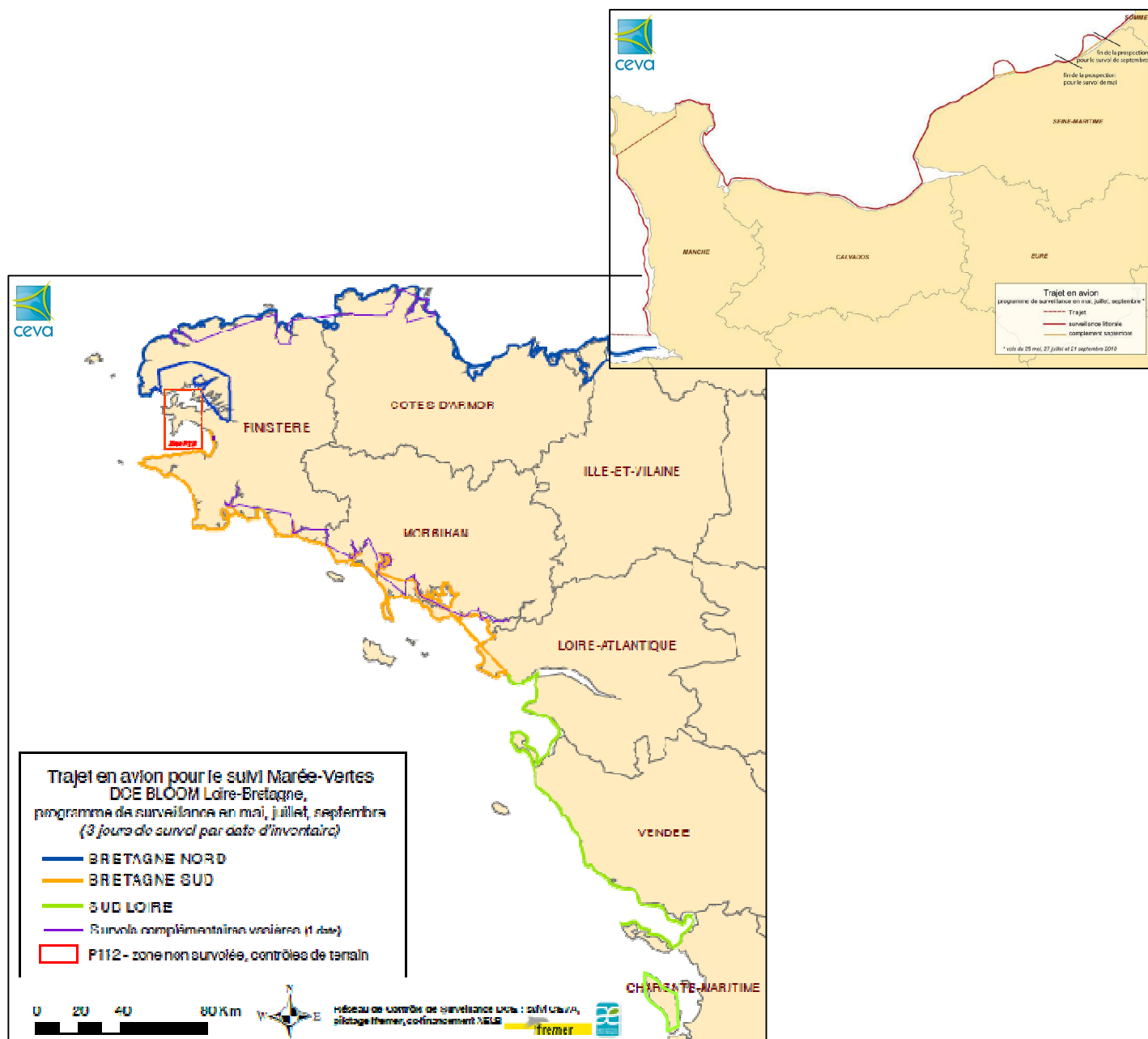
Blanchet H., Gouillieux B., Bouillard H. et Lebleu P. (2011) : Estimation du degré de prolifération des macroalgues opportunistes sur le lac marin d'Hossegor. Rapport du contrat de prestation n°10/5210560, 20 pages.

Rossi N. et Dion P. (2012) - Développement et intercalibration d'outils DCE de classement de qualité des eaux côtières et de transition par l'EQB « Blooms macroalgues » Classement des masses d'eau côtières des bassins Loire-Bretagne et Seine-Normandie à partir de l'élément de qualité macroalgues de bloom dans le cadre de la DCE - Rapport CEVA, convention Onema-Ifremer 2011 (action 4), 59 pages.

Protocole de suivi surfacique des blooms macroalgues sur substrats meubles pour la Directive Cadre sur l'eau (DCE) - document CEVA, 4 pages, 3 annexes.

III.7. Annexes

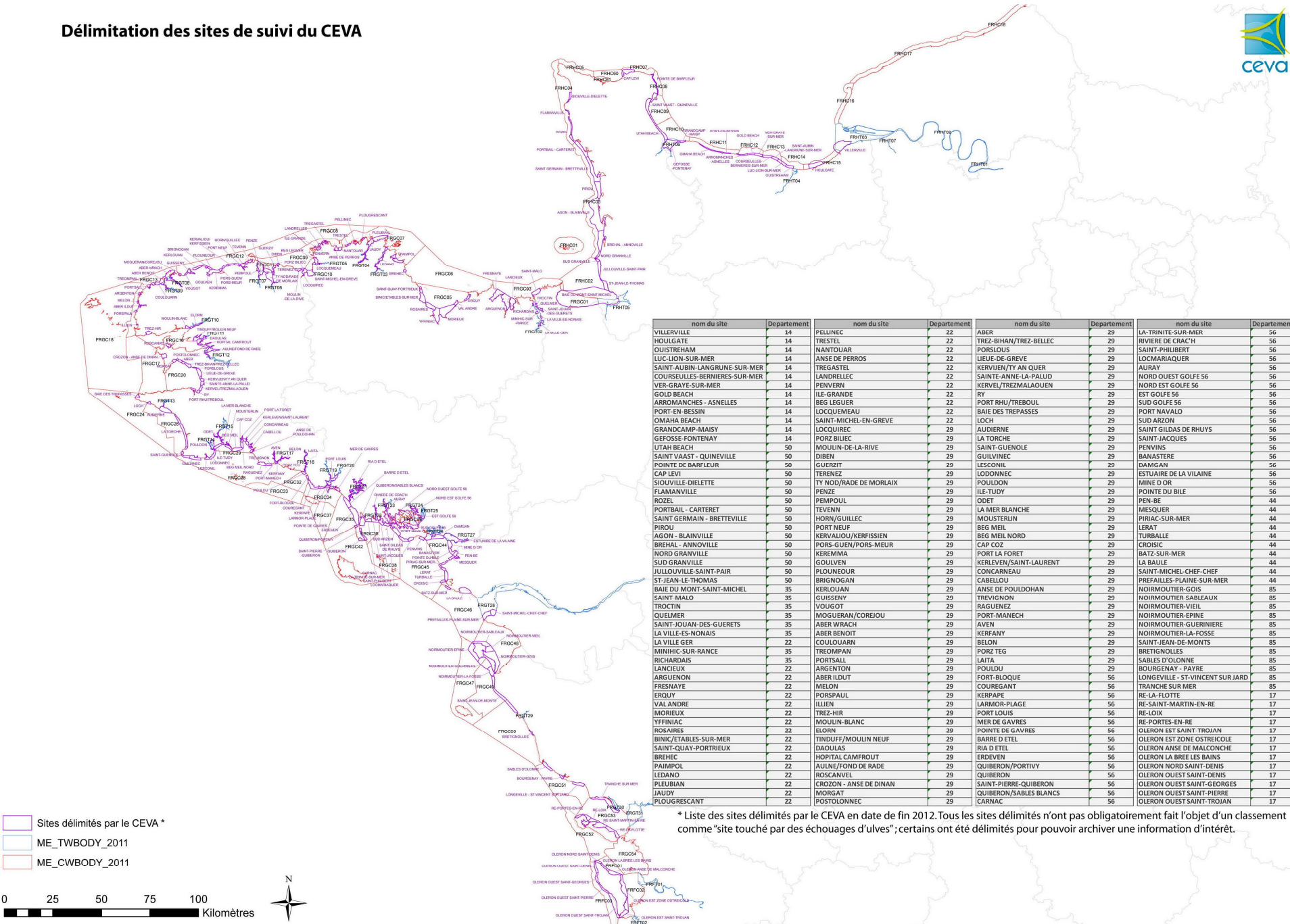
Annexe 1 : cartes des littoraux suivis avec les trajets en avion effectués en Normandie, Bretagne et Sud-Loire



Annexe 2 : Délimitation des sites de suivi du CEVA et sa liste associée par ordre géographique du site le plus au nord vers le site le plus au sud



Délimitation des sites de suivi du CEVA



nom du site	Departement	nom du site	Departement	nom du site	Departement	nom du site	Departement
VILLERVILLE	22	PELLINEC	22	ADER	29	LA-TRINITE-SUR-MER	56
MOULGATE	14	TRESTEL	22	TREZ-BIHAN/TREZ-BELLEC	29	RIVIERE DE CRAC'H	56
OUISTREHAM	14	NANTOUAR	22	PORSLOUS	29	SAINT-PHILBERT	56
SANT-LION-SUR-MER	14	ANSE DE PERROS	22	LIEUE-DE-GREVE	29	LOCMARIAQUER	56
SAINT-AUBIN-LANGRUNE-SUR-MER	14	TREGASTEL	22	KERVUEN/TY AN QUER	29	AURAY	56
COURSULLES-BERNIERES-SUR-MER	14	LANDRILLEC	22	SAINT-ANNE-LA-PALLUD	29	NORD OUEST GOLFE 56	56
VER-GRAYS-SUR-MER	14	PENVERN	22	KERVEL/TREZMALAOUEN	29	NORD EST GOLFE 56	56
GOLD BEACH	14	ILE-GRANDE	22	RY	29	EST GOLFE 56	56
ARROMANCHES - ASNELLES	14	BEG LEGUER	22	PORT RHU/TREBOUL	29	SUD GOLFE 56	56
PORT-EN-BESSIN	14	LOCQUEMEAU	22	BAIE DES TREPASSES	29	PORT NAVALO	56
OMAHA BEACH	14	SAINT-MICHEL-EN-GREVE	22	LOCH	29	SUD ARZON	56
GRANDCAMP-MAISY	14	LOCQUREC	29	AUDIERNE	29	SAINT-GILDES DE RHUYS	56
GEFOSSE-FONTENAY	14	PORZ BILEC	29	LA TORCHE	29	SAINT-JACQUES	56
UTAH BEACH	50	MOULIN-DE-LA-RIVE	29	SAINT-GUENOLE	29	PENVINS	56
SAINT VAAST - QUINEVILLE	50	IDIBEN	29	GUILVINEC	29	BANASTERE	56
POINTE DE BARFLEUR	50	GUERZIT	29	LESCONIL	29	DAMGAN	56
CAP LEVI	50	TERNEZ	29	LODONNEC	29	ESTUAIRE DE LA VILAINE	56
SIOLVILLE-DIELETTE	50	TY NOD/RADE DE MORLAIX	29	POULDON	29	MINE D'OR	56
FLAMANVILLE	50	PENZE	29	ILE-TUDY	29	POINTE DU BILE	56
ROZEL	50	PEMPOUL	29	ODET	29	PEN-BE	44
PORTBAIL - CARTERET	50	TEVENN	29	LA MER BLANCHE	29	MESQUER	44
SAINT GERMAIN - BRETTEVILLE	50	HORN/GUILLEC	29	MOUSTERLIN	29	PIRIAC-SUR-MER	44
PIRCOU	50	PORT NEUF	29	BEG MEIL	29	LERAT	44
AGON - BLAINVILLE	50	KERVALLIOU/KERFISSIAN	29	BEG MEIL NORD	29	TURBALLE	44
BREHAL - ANNOVILLE	50	PORS-GUEN/PORS-MEUR	29	CAP COZ	29	CROISIC	44
NORD GRANVILLE	50	KEREMMA	29	PORT LA FORET	29	BATZ-SUR-MER	44
SUD GRANVILLE	50	GOUVERN	29	KERLEVEN/SAINT-LAURENT	29	LA BAULE	44
JULLOUVILLE-SAINT-PAIR	50	PLOUNOUR	29	CONCARNEAU	29	SAINT-MICHEL-CHEF-CHEF	44
ST-JEAN-LE-THOMAS	50	BRIGONOGAN	29	CABELLOU	29	PREFAILLES-PLAINE-SUR-MER	44
BAIE DU MONT-SAINT-MICHEL	35	KERLOUAN	29	ANSE DE POULDOHAN	29	NOIRMOUTIER-GOIS	85
SAINT MALO	35	GUISSENY	29	TREVIGNON	29	NOIRMOUTIER-SABLEAUX	85
TROCTIN	35	VOUGOT	29	RAGUENEZ	29	NOIRMOUTIER-VIEIL	85
QUELMER	35	MOGUERAN/COREIOU	29	PORT-MANECH	29	NOIRMOUTIER-EPINE	85
SAINT-JOUAN-DES-GUERETS	35	ABER WRACH	29	AVEN	29	NOIRMOUTIER-GUERINIERE	85
LA VILLE-ES-NOAIS	22	KERFANY	29	SAINT-JEAN-DE-MONTS	85	NOIRMOUTIER-LA-FOSSE	85
MINIHIC-SUR-RANCE	35	REMPAN	29	PORZ TEG	29	BRETIGNOLLES	85
RICHARDAIS	35	PORTSALL	29	LAITA	29	SABLES D'OLONNE	85
LANCIEUX	22	ARGENTON	29	POULDU	29	BOURGENAY - PAYRE	85
ARGAUNEDON	22	ABER ILDUT	29	PORT-BLOQUE	56	LONGEVILL - ST-VINCENT SUR JARD	85
FRESNAYE	22	MELON	29	COUREGANT	56	FRANCHE SUR MER	85
EROUY	22	PORS-PAUL	29	KERPAPPE	56	RE-LA-FLOTTE	17
VAL-ANDRE	22	ILLIEN	29	LARMOR-PLAGE	56	RE-SAINT-MARTIN-EN-RE	17
MORIEUX	22	TREZ-HIR	29	PORT LOUIS	56	RE-LOIX	17
YFFINIAC	22	MOULIN-BLANC	29	MER DE GAVRES	56	RE-PORTES-EN-RE	17
POLEAURES	22	LOREN	29	POINTE DE GAVRES	56	OLERON EST SAINT-TROJAN	17
BINIC/ETABLES-SUR-MER	22	TINDUFF/MOULIN NEUF	29	BARRE D ETEL	56	OLERON EST ZONE OSTREICOLE	17
SAINT-QUAY-PORTRIEUX	22	DAOULAS	29	OLERON ANSE DE MALCONCHE	17	OLERON LA BREE LES BAINS	17
BREHEC	22	HOPITAL CAMFROUT	29	ERDEVEN	56	OLERON NORD SAINT-DENIS	17
PAIMPOL	22	AULNE/FOND DE RADE	29	QUIBERON/PORTIVY	56	OLERON OUEST SAINT-DENIS	17
LEDANO	22	ROSCANVEL	29	QUIBERON	56	OLERON OUEST SAINT-GEORGES	17
PLEUBIAN	22	CRICOUX - ANSE DE DINAN	29	SAINT-PIERRE-QUIBERON	56	OLERON OUEST SAINT-PIERRE	17
JAUDY	22	MORGAT	29	QUIBERON/SABLES BLANCS	56	OLERON OUEST SAINT-TROJAN	17
PLUGUESCANT	22	POSTOLONNEC	29	CARNAC	56		

* Liste des sites délimités par le CEVA en date de fin 2012. Tous les sites délimités n'ont pas obligatoirement fait l'objet d'un classement comme "site touché par des échouages d'ulves"; certains ont été délimités pour pouvoir archiver une information d'intérêt.

Annexe 3 : Aires potentiellement colonisables (AIH) issues de la somme des substrats meubles (sable et vase) sur les masses d'eau côtières et de transition des bassins Loire-Bretagne et Seine Normandie. Le classement d'un substrat en sable et en vase est effectué par photointerprétation (échelle 1/10000ème) et ne repose pas sur des critères géologiques stricts.

CODE ME	Roches (ha)	Sable (ha)	Schorres (ha)	Vase (ha)	AIH (ha)
FRFC01	721	305	0	0	305
FRFC02	51	3646	39	0	3646
FRFC03	1489	958	0	0	958
FRGC01	170	8482	1138	0	8482
FRGC03	648	3627	150	56	3683
FRGC05	295	4432	105	11	4443
FRGC06	279	471	23	0	471
FRGC07	4652	457	27	3895	4352
FRGC09	2155	890	23	374	1263
FRGC10	325	911	10	0	911
FRGC11	874	622	0	300	921
FRGC12	2278	2548	144	74	2621
FRGC13	1541	993	30	130	1123
FRGC16	560	95	19	1340	1435
FRGC20	260	946	14	23	969
FRGC26	479	755	0	0	755
FRGC29	285	564	47	145	709
FRGC32	58	94	0	0	94
FRGC34	271	276	69	472	749
FRGC35	99	436	2	0	436
FRGC36	216	872	72	334	1206
FRGC38	426	474	15	108	582
FRGC39	288	41	100	6084	6125
FRGC42	130	126	0	0	126
FRGC44	826	993	53	297	1290
FRGC45	533	343	66	598	941
FRGC46	243	318	0	0	318
FRGC48	1537	303	41	9107	9409
FRGC49	19	1793	0	0	1793
FRGC50	495	778	0	0	778
FRGC53	1023	2990	113	1379	4369
FRHC02	419	10196	264	0	10196
FRHC03	4605	10817	1483	0	10817
FRHC04	590	1409	0	0	1409
FRHC09	272	2114	33	0	2114
FRHC10	564	1121	0	0	1121
FRHC11	300	374	0	0	374
FRHC12	196	808	0	0	808
FRHC13	596	596	0	0	596
FRHC14	118	1082	0	0	1082
FRHC15	1	1183	11	0	1183
FRGT02	11	0	225	1384	1384
FRGT03	67	1	36	438	439
FRGT04	43	1	18	259	259
FRGT05	25	42	0	59	101
FRGT06	34	17	16	1121	1138
FRGT07	31	0	19	436	436
FRGT08	108	7	0	455	462
FRGT09	68	132	10	164	296
FRGT10	57	1	73	319	320
FRGT11	45	0	43	288	288
FRGT12	117	0	232	753	753
FRGT14	22	24	64	464	488
FRGT15	22	8	9	514	522
FRGT16	6	8	3	114	122
FRGT17	3	2	11	129	130
FRGT18	4	80	117	17	97
FRGT19	0	0	79	87	87
FRGT20	28	22	39	558	580
FRGT21	27	26	268	1416	1441
FRGT22	26	61	20	164	225
FRGT23	0	0	116	224	224
FRGT24	1	0	47	291	291
FRGT25	0	0	511	292	292
FRGT27	85	40	85	1015	1054
FRHT06	205	2107	439	0	2107

Annexe 4 : Liste des espèces d'algues vertes observées sur les côtes Manche-Atlantique (liste non exhaustive, à compléter au fil des observations)

Ulva armoricana,

Ulva rotundata,

Ulva rigida,

Ulva scandinavica,

Ulva pertusa

Ulva linza

Ulva olivascens

Ulvaria obscura

Enteromorpha spp,

Cladophora spp.

Chaetomorpha spp.

IV. Le phytoplancton en Manche Atlantique et Méditerranée

Ce protocole s'appuie sur les normes en vigueur, le cahier REPHY version 2012 et pour le protocole en lagune sur le document de référence du suivi RSL (2000) et les publications de Bec, 2005, Bec et al., 2008 et Bec et al. 2011.

IV.1. Description des indices

L'indicateur Phytoplancton est composé de trois indices : biomasse/chlorophylle, abondance/bloom et composition taxonomique. Seules les 2 premières sont actuellement définies. La biomasse est définie par la chlorophylle a, l'abondance et la composition par des dénombrements de la flore phytoplanctonique.

Dans la suite de ce chapitre, nous ne nous intéresserons qu'à la partie hydrobiologie de l'indicateur, c'est-à-dire, au dénombrement de la flore phytoplanctonique. Ce dénombrement s'appuie sur 2 méthodologies différentes :

Le dénombrement cellulaire par observation sous microscope inversé par la méthode Utermohl qui s'applique sur les échantillons prélevés en Manche-Atlantique et Méditerranée (sauf lagunes) ; le comptage par cytométrie de flux des cellules phytoplanctoniques sur deux gammes de taille ($>3 \mu\text{m}$ et $< 3 \mu\text{m}$). Cette séparation en taille permet de distinguer le nano et le picophytoplancton, composants majeurs du phytoplancton en lagune.

IV.2. Echantillonnage sur le terrain

Conformément à l'arrêté de surveillance du 29 juillet 2011 modifiant l'arrêté du 25 janvier 2010 établissant le programme de surveillance de l'état des eaux, le phytoplancton est échantillonné une fois par mois tout au long de l'année dans les masses d'eau côtières et de transition en Manche Atlantique et en Méditerranée, sauf dans les lagunes. Dans ce cas, l'échantillonnage est réalisé annuellement, une fois par mois, entre juin et août⁶.

Le protocole d'échantillonnage doit s'appuyer sur les normes ou les guides en vigueur pour les opérations d'échantillonnage. Pour le phytoplancton, ceci implique le respect de la norme française NF EN 15972 qui fournit un guide pour l'échantillonnage, la conservation, le stockage, la quantification et l'analyse qualitative du phytoplancton dans l'eau de mer.

L'échantillonnage du phytoplancton est effectué dans la colonne d'eau. Pour l'observation en microscopie, un volume de 1 litre est fixé au lugol (solution d'iode), puis conservé jusqu'à l'observation à l'abri de la lumière. Pour la cytométrie en flux, un échantillon de 1 ml est fixé avec 50 μl de formol à 40% dans un tube cryogénique Nunc et conservé dans l'azote liquide jusqu'au moment de l'analyse.

IV.3. Au laboratoire

La méthode concernant le dénombrement du phytoplancton par microscopie inversée (méthode Utermohl) est détaillée dans la norme NF EN 15204. Les résultats sont exprimés, pour chaque espèce, en nombre de cellules par litre. La liste de référence des espèces potentiellement identifiables se trouve dans le référentiel taxinomique de Quadrigé², qui s'appuie sur le référentiel mondial WORMS.

Pour la cytométrie en flux, le phytoplancton est dénombré à l'aide d'un cytomètre FACSCalibur Becton Dickinson (ou équivalent) équipé d'un laser argon de longueur d'onde d'excitation 488 nm. Chaque cellule excitée diffuse une partie de la lumière incidente et émet simultanément plusieurs fluorescences. Les fluorescences orange (FL2) et rouge (FL3) sont séparées à l'aide d'un filtre dichroïque large bande à 640 nm (filtre LP, « long pass ») et récupérées respectivement à l'aide de filtres à 585/542 nm (filtre BP, « band pass ») et $680 \pm 20 \text{ nm}$ (filtre LP). La fluorescence rouge est produite par la chlorophylle a, tandis que la fluorescence orange est due à la phycoérythrine. Cette

⁶ Signalons, cependant, que la norme française NF EN 15972 qui est citée dans la suite du document préconise un échantillonnage 2 fois par mois.

dernière est un pigment accessoire caractéristique de certains groupes d'algues (Rowan, 1989): Cyanobactéries, Rhodophycées (algues rouges) et Cryptophycées. Les algues comportant ce pigment fluorescent donc à la fois dans l'orange et dans le rouge, ce qui permet de les distinguer des autres groupes d'algues.

Les signaux de diffusion lumineuse sont liés à des caractéristiques cellulaires des microalgues. La diffusion lumineuse mesurée aux petits angles (10-15°, FSC « forward scatter ») serait plutôt liée à la taille des cellules, tandis qu'aux grands angles (90°, SSC « side scatter ») elle serait reliée à la granularité des cellules.

Mais les mesures obtenues sont des valeurs relatives qui doivent être calibrées par rapport à des objets étalons. A cet effet, des billes synthétiques fluorescentes ('Fluoresbrite' YG beads, Polysciences, Inc., Warrington, PA) sont ajoutées dans les échantillons à analyser et permettent de distinguer les différents groupes de cellules en fonction de leur taille. Généralement les dimensions et les fluorescences relatives des cellules sont rapportées à des billes respectivement de 0,96 µm, 1,8 µm et 2,98 µm de diamètre. Ces billes fluorescent dans le vert (530 nm), le rouge (> 650 nm) et l'orange (585/542 nm). Ceci permet de normaliser tous les paramètres et de distinguer le picophytoplancton (cellules < 3 µm) du nanophytoplancton (cellules > 3 µm).

Une analyse correcte nécessite un passage des cellules une par une devant le laser. Le nombre d'événements analysés par seconde est important ; il est recommandé de ne pas dépasser 10 à 500 cellules par seconde.

Les acquisitions sont généralement effectuées à une vitesse moyenne de flux (30-40 µl/minute) et le temps d'acquisition varie entre 3 minutes (picophytoplancton) et 6 minutes (nanophytoplancton). Avec ce type de réglage, pour un volume d'échantillon de 400 µl, 120 µl (picophytoplancton) et 240 µl (nanophytoplancton) sont ainsi prélevés. Deux types de réglage sont généralement utilisés selon la taille cellulaire du phytoplancton : un « instrument setting » PICO (FSC:E01, SSC:400, FL3:650, FL2:550) et un « instrument setting » NANO (FSC:E00, SSC:300, FL3:500, FL2:400). Ces réglages peuvent être modifiés en fonction du cytomètre et des caractéristiques de fluorescence et taille des cellules phytoplanctoniques.

Le cytomètre est couplé à un ordinateur qui permet de collecter les données acquises (valeurs des paramètres de diffraction lumineuse et de fluorescence, abondances) à l'aide du logiciel « Cell Quest ». Les données peuvent ensuite être analysées par différents logiciels (« BD Cell Quest™ », « Attractor™ » (Becton Dickinson)). L'analyse du cytogramme (représentation biparamétrique ou dot plot) permet de déterminer les abondances des différents groupes identifiés. Cette analyse est délicate quand un groupe de cellules est à cheval sur le seuil de 3 µm séparant le picophytoplancton du nanophytoplancton. Il convient, alors, de calculer le rapport entre la taille de chaque cellule du groupe et celle de la bille de 3 µm de diamètre. Si le rapport moyen pour l'ensemble du groupe est supérieur à 1, ce dernier est considéré comme appartenant au nanophytoplancton. Si ce rapport est inférieur à 1, le groupe est affecté au picophytoplancton. Les résultats sont exprimés, pour chaque catégorie, en 106 cell/l.

Concernant la méthode en cytométrie de flux, les opérateurs peuvent consulter également les articles suivants : Trousselier et al, 1993 et 1995 ; Vaquer et al, 1996 ; Marie et al (1999) ; Marie et al (2000) ; Collier 2000 ; Grégori et al., 2001 et Becker et al., 2002.

IV.4. Bibliographie

EN 15972 (2011). Qualité de l'eau - Guide pour l'étude quantitative et qualitative du phytoplancton marin. 27 pages.

EN 15204 (2006). Qualité de l'eau - Norme guide pour le dénombrement du phytoplancton par microscopie inversée (méthode Utermöhl). 39 pages.

Bec B (2005). Dynamique du picophytoplancton dans les lagunes méditerranéennes du Languedoc-Roussillon et de Corse. Thèse de l'Université Toulouse 3, 204 pages.

Bec B, Collos Y, Vaquer A, Mouillot D, Souchu P (2008). Growth rate peaks at intermediate cell size in marine photosynthetic picoeukaryotes. *Limnology and Oceanography* 53:863-867

Bec B, Collos Y, Souchu P, Vaquer A, Lautier J, Fiandrino A, Benau L, Orsoni V, Laugier T (2011). Distribution of picophytoplankton and nanophytoplankton along an anthropogenic eutrophication gradient in French Mediterranean coastal lagoons *Aquatic Microbial Ecology* 63:29-45.

Belin C. et Neaud-Masson N (2012). Cahier de Procédures REPHY 2012-2013. Document de prescription. Document Ifremer/ODE/DYNECO/VIGIES/12-07, octobre 2012.
http://envlit.ifremer.fr/content/download/81386/558742/version/4/file/Cahier_REPHY_2012_version_finale_12_sep_+2012.pdf

Collier JL (2000). Flow cytometry and the single cell in phycology. *J Phycol* 36:628-644.

Grégori G., Colosimo A. et Denis M. (2001). Phytoplankton group dynamics in the Bay of Marseilles during a 2-year survey based on analytical flow cytometry. *Cytometry* 44:247-256.

Ifremer (2000). Mise à jour d'indicateur du niveau d'eutrophisation des milieux lagunaires méditerranéens Rapport final Tome 1, 236 pages.

Marie D, Partensky F., Vaulot D, Brussaard C (1999). Enumeration of phytoplankton, bacteria and viruses in marines samples. In: Robinson JP, Darzynkiewicz D, Dean PN, Orfao A, Rabinovitch PS, Stewart CC, Tanke HJ, Wheelless LL (eds) Current Protocols in Cytometry. John Wiley & Sons, New York, suppl. 10, Unit 11.11, p 1-15.

Marie D, Simon N, Guillou L, Partensky F, Vaulot D (2000) Flow cytometry analysis of marine picoplankton In: Diamond RA, DeMaggio S (eds) In living color: protocols in flow cytometry and cell sorting, Springer-Verlag, Heidelberg, p421-454.

Rowan KS (1989). Photosynthetic pigments of algae. 344 pp. Cambridge Univ. Press

Troussellier M, Courties C et Vaquer A (1993). Recent applications of flow cytometry in aquatic microbial ecology. *Biol. Cell.* 78 : 111-121.

Troussellier M., Courties, C. et Zettelmaier S. (1995). Flow cytometric analysis of coastal lagoon bacterioplankton and picophytoplankton: fixation and storage effects. *Estuarine Coastal Shelf Sci.* 40: 621-633

Vaquer A., Troussellier M., Courties C. et Bibent B. (1996). Standing stock and dynamics of picophytoplankton in the Thau lagoon (northwest Mediterranean coast). *Limnol. Oceanogr.*, 41(8), 1821 - 1828.