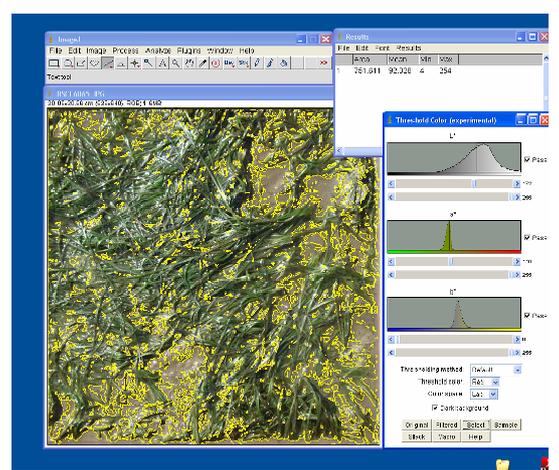


Isabelle Auby – Ifremer, Laboratoire Environnement et Ressources d’Arcachon
Sébastien Dalloyau – LPO
Mireille Fortune – Ifremer, Laboratoire Environnement et Ressources Morbihan Pays de la Loire
Christian Hily – UBO, Institut Universitaire Européen de la Mer - Laboratoire de l’Environnement MARin (LEMAR)
Hélène Oger-Jeanneret – Ifremer, Laboratoire Environnement et Ressources Morbihan Pays de la Loire
Martin Plus- Ifremer, Laboratoire Environnement et Ressources d’Arcachon
Pierre - Guy Sauriau - LIENSs, CNRS, Université de La Rochelle
Gilles Trut- Ifremer, Laboratoire Environnement et Ressources d’Arcachon

Mars 2013. RST/LER/MPL/13.01

Protocoles de suivi stationnel des herbiers à zostères pour la Directive Cadre sur l’Eau (DCE)

Zostera marina
Zostera noltii



REBENT
réseau benthique

**Protocoles de suivi stationnel des
herbiers à zostères pour la Directive
Cadre sur l'Eau (DCE)**

Zostera marina
Zostera noltii

Nous remercions tous les collègues qui ont testé les protocoles sur le terrain à l'automne 2011 et participé à l'interprétation des photos. Leurs remarques et commentaires nous ont permis d'améliorer la version précédente de ce rapport et de rédiger les protocoles d'échantillonnage définitifs.

CRESCO Dinard : Daniel Gerla, Patrick Le Mao, Thibaut Nebout, Claire Rollet.

Ifremer LER/MPL La Trinité-sur-mer et Nantes : Jean-Pierre Allenou, Sandra Fauré.

Ifremer LER/Arcachon : Loïc Rigouin.

Ifremer LRH Anglet : Marie Noëlle de Casamajor, Florence Sanchez.

Ifremer DYNECO Nantes : Alice Lamoureux, Anaëlle Pothier.

CNRS LIENSs : Pauline Cajeri, Cécile Curti.

Protocole de suivi stationnel de l'herbier de *Zostera marina* dans le cadre de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE).....1

1. Echantillonnage sur le terrain.....1	
1.1. Date et fréquence d'acquisition	1
1.2. Station et points	1
1.3. Matériel.....	2
1.4. Zostères et macroalgues.....	2
1.5. Epiphytes et wasting disease	2
1.6. Sédiment.....	3
2. De retour au laboratoire3	
2.1. Zostères.....	3
2.1.1. Densité mesurée <i>in situ</i>	3
2.1.2. Densité et biométrie sur l'échantillon prélevé	3
2.1.3. Biomasses.....	4
2.1.4. « Wasting disease » et épiphytes	4
2.2. Macroalgues	5
2.3. Sédiment.....	5
2.3.1. Granulométrie.....	5
2.3.2. Matière organique	6

Proposition pour un nouveau protocole de suivi stationnel de *Zostera noltii* dans le cadre de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE)7

1. Contexte et stratégie pour un protocole simplifié7	
1.1. Contexte	7
1.2. Stratégie	7
2. Echantillonnage sur le terrain.....8	
2.1. Date	8
2.2. Station et points	8
2.3. Matériel.....	10
2.4. Taux de recouvrement des zostères et biomasses de macroalgues	10
2.5. Sédiment.....	11
3. Au laboratoire.....11	
3.1. Taux de recouvrement des zostères	11
3.2. Macroalgues	12
3.3. Sédiment.....	12
3.3.1. Granulométrie.....	12
3.3.2. Matière organique	13

Bibliographie.....13

sommaire

Annexe 1 : Elaboration du rapport biomasse épigée vs. taux de recouvrement	14
1. Contexte de l'action	14
2. Méthodes	15
3. Résultats et discussion	15
3.1. Données brutes.....	15
3.2. Représentation graphique et statistiques	16
4. Correspondances entre données acquises avec l'ancienne méthode et la nouvelle	20
Bibliographie	20
Annexe 2 : Utilisation du logiciel Image J	21

Protocole de suivi stationnel de l'herbier de *Zostera marina* dans le cadre de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE)

Ce protocole reste quasiment inchangé par rapport au précédent (Hily *et al.*, 2007), si ce n'est que les organismes herbivores ne sont plus pris en compte.

1. Echantillonnage sur le terrain

1.1. Date et fréquence d'acquisition

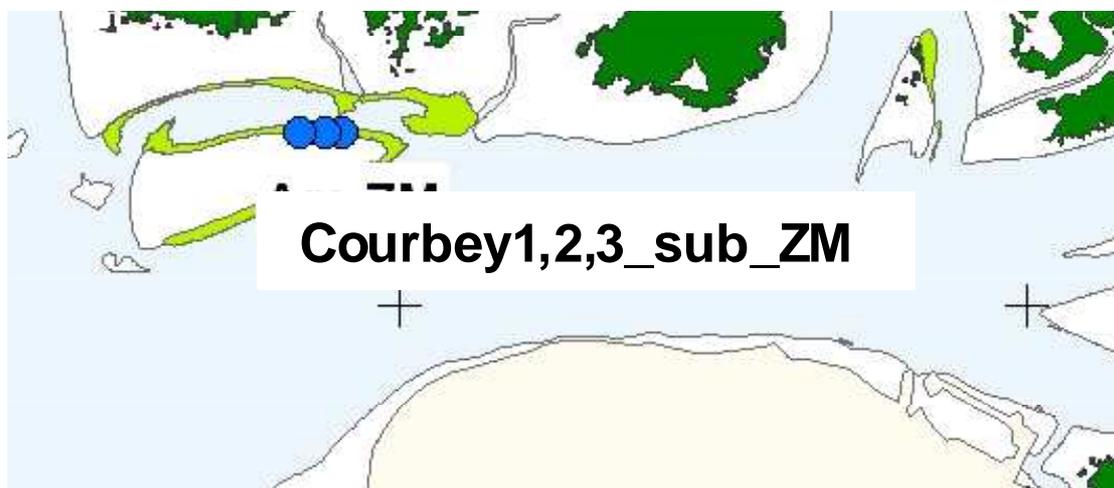
- En Manche et Bretagne au printemps.
- En Aquitaine, fin août - début septembre, période de biomasse maximale.

L'échantillonnage est annuel.

NB : si nécessaire, faire une demande d'autorisation de prélèvement scientifique auprès de la DREAL.

1.2. Station et points

Pour l'instant, 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.



Localisation des 3 points composant la station : Exemple de 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 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.

Sous réserve d'accessibilité, les stations suivantes seront échantillonnées dans les masses d'eau DCE

Masse d'eau	Dernière superficie connue	Stations
Arcachon amont	105 ha	Courbey_sub_ZM
Golfe du Morbihan	1100 ha	Arradon
Concarneau (large)	300 ha	Glénan
Iroise (large)	50 ha	Molène
Rade de Brest	65 ha	Roscanvel
Les Abers (large)	190 ha	Sainte Marguerite
Baie de Morlaix	235 ha	Callot
Perros-Guirec (large)	7 ha	Les sept îles
Paimpol – Perros-Guirec	670 ha	L'Arcouest
Rance Fresnaye	285 ha	Saint Malo
Archipel Chausey	330 ha	SIZM01
Ouest Cotentin	160 ha	SIZM02 et SIZM03

1.3. 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 étanche si jugé utile

1.4. Zostères et macroalgues

Sur chaque point, les opérations sont les suivantes :

- Comptage du nombre de pieds de zostères in situ dans deux cadrats de 0,1 m² (ou 2 fois 2 cadrats de 0,04m² : dans ce cas, les densités dans 2 cadrats seront ajoutées).
- Prélèvement de deux cadrats de 0,1 m² (ou deux fois deux cadrats de 0,04 m²) sur 5 à 10 cm de profondeur (découpage avec une truelle). L'ensemble de la matre (pieds de zostères avec rhizomes, macroalgues, sédiment) 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.

1.5. 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.

1.6. 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.

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 .

2.1. Zostères

2.1.1. Densité mesurée *in situ*

Saisie Quadrige² :

Pour chacun des 6 échantillons (2 par point)

- Surface échantillonnée
- Nombre de pieds comptés dans les cadrats sur le terrain

2.1.2. 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).

Saisie Quadrige² :

Pour chacun des 6 échantillons (2 par point)

- Surface échantillonnée
- Nombre de pieds

Pour chaque échantillon et chaque pied (nombre variable par échantillon)

- Nombre de feuilles

Pour chaque feuille (nombre variable par pied)

- Longueur gaine (cm)
- Longueur limbe (cm)
- Largeur limbe (mm)

A partir de ces données, on calcule une surface totale des limbes par échantillon qui sera reportée dans Quadrige² au niveau de la saisie « échantillon »

2.1.3. 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 (après 48 h à l'étuve à 60°C) 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).

Saisie Quadrige² :

Pour chacun des 6 échantillons (2 par point)

- Biomasse PS (éventuellement biomasse PSSC) limbes (g)
- Biomasse PS (éventuellement biomasse PSSC) gaines (g)
- Biomasse PS (éventuellement biomasse PSSC) rhizomes+racines (g)

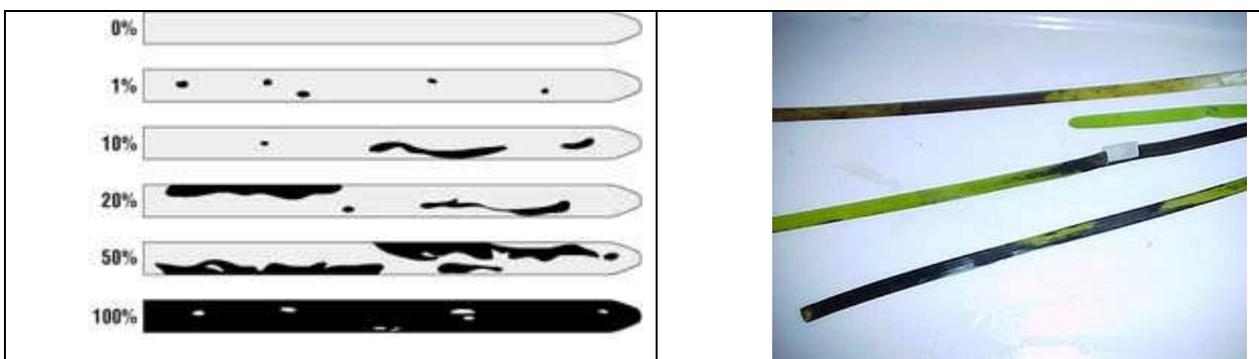
2.1.4. « Wasting disease » et épiphytes

Les mêmes pieds seront utilisés pour les deux opérations.

Wasting disease

Il s'agit d'estimer le pourcentage de zones noires, voire blanches, bien délimitées (à ne pas confondre avec des tâches 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 :



Epiphytes

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

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 du limbe (zone moyenne)
- pourcentage de maladie estimé sur le limbe.

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)

Conserver les limbes des 10 pieds examinés. Sur ces limbes :

- Racler les épiphytes (algues et faune). Les recueillir sur une feuille d'aluminium préalablement pesée et gravée.
- 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).

Saisie Quadrige² :

Pour chacun des 3 échantillons (1 par point)

- Biomasse (PS et PSSC) des épiphytes présents sur les limbes des feuilles des 10 pieds.
- Surface des limbes des feuilles des 10 pieds
- Biomasse calculée (PS) des limbes des feuilles des 10 pieds (calculée à partir du rapport moyen « Biomasse/Surface » des limbes, issu des résultats obtenus aux paragraphes 2.1.2 et 2.1.3).

2.2. 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).

Saisie Quadrige² :

Pour chacun des 6 échantillons (2 par point)

- Surface échantillonnée (même valeur que 2.1.2)
- Biomasse PS d'algues vertes, brunes ou rouges. En cas d'absence, noter 0.

2.3. Sédiment

2.3.1. 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 prétraitement sera réalisé juste avant les analyses.

Par la suite granulométrie sur colonne humide en respectant la progression des tailles de tamis AFNOR : 63 - 80 - 100 - 125 - 160 - 200 - 250 - 315 - 400 - 500 - 630 - 800 - 1000 - 1250 - 1600 - 2000 - 4000 μm . L'interprétation des résultats pourra s'appuyer sur la procédure GRADISTAT d'analyse des résultats granulométriques développées par Blott & Pye (2001) en particulier pour calculer de façon homogène la médiane.

Saisie Quadrige² :

Pour l'unique échantillon

- Proportion (%) de chaque classe granulométrique
- Médiane

2.3.2. 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 : $\text{PSSC} \times 100 / \text{Psec}$.

Saisie Quadrige² :

Pour chacun des 9 échantillons (3 par point)

- Pourcentage de MO (%)

Proposition pour un nouveau protocole de suivi stationnel de *Zostera noltii* dans le cadre de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE)

1. Contexte et stratégie pour un protocole simplifié

1.1. Contexte

Le protocole français utilisé depuis 2007 pour le suivi stationnel des herbiers intertidaux de *Zostera noltii* est basé sur plusieurs métriques dont trois ont été retenues pour la proposition d'un indicateur de qualité « Angiospermes » des herbiers de zostères (Auby *et al.*, 2010). Ces trois métriques sont 1) la composition taxinomique, 2) l'extension spatiale de l'herbier et 3) le développement de l'herbier en termes non exclusifs de densité, biomasse et taux de recouvrement des herbiers. Pour les herbiers intertidaux à *Zostera noltii*, les réflexions menées en 2010 pour aboutir à cette proposition ont cependant mis à jour plusieurs inconvénients à ce protocole inspiré de celui mis en place par le réseau REBENT, en particulier pour la troisième métrique.

Ces inconvénients sont au nombre de quatre :

- le suivi stationnel est limité dans l'espace du fait de l'acquisition d'une information trop localisée sur la masse d'eau pour les taux de recouvrement, densités et biomasses d'herbier ;
- l'acquisition des données de biométrie foliaire liées à la troisième métrique « densité des herbiers à *Zostera noltii* » est très fastidieuse et trop chronophage au laboratoire ;
- les données acquises liées à l'ensemble des métriques suivies ne sont pas toutes utilisées pour le calcul de l'indicateur Angiospermes car *in fine* pas toutes pertinentes ;
- la fréquence actuelle d'acquisition des données tous les 3 ans ne permet pas de rendre compte de la variabilité interannuelle des herbiers ni de changements brusques d'une pression pouvant être répercutées par l'herbier à *Zostera noltii* sur un laps de temps annuel.

Les attendus d'un nouveau protocole sont donc 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.

La contre partie d'un protocole plus simple serait sa mise en œuvre chaque année.

1.2. Stratégie

Parmi les trois métriques retenues pour l'indicateur DCE à savoir 1) la composition taxinomique, 2) l'extension spatiale de l'herbier et 3) le développement de l'herbier, il est proposé de conserver les métriques 1 et 3 et de modifier, en la simplifiant, la troisième métrique.

- La métrique « composition taxinomique » s'appuiera sur un arpentage des alentours de chaque station pour déterminer si *Zostera marina var. angustifolia* (variété à petites feuilles, souvent présente 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 (voir l'analyse de 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.
- La métrique « densité des herbiers à *Zostera noltii* » s'appuiera sur 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 (voir l'analyse de Auby *et al.*, 2010). L'utilisation de classes de recouvrement et de leurs médianes associées dans le calcul de la métrique permet alors d'être en cohérence avec les protocoles DCE français utilisés pour l'indicateur macroalgues intertidales (Ar Gall & Le Duff, 2007). Un travail spécifique, permettant d'établir une relation recouvrement vs. biomasse a été réalisé en 2011 afin de pouvoir comparer les données issues du nouveau protocole avec les données antérieures (annexe 1).

Il est également proposé de conserver l'acquisition de 3 métriques supplémentaires, qui ne rentrent pas dans le calcul de l'indicateur mais dont l'acquisition est aisée et permet une évaluation plus fine de l'état 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.

2. Echantillonnage sur le terrain

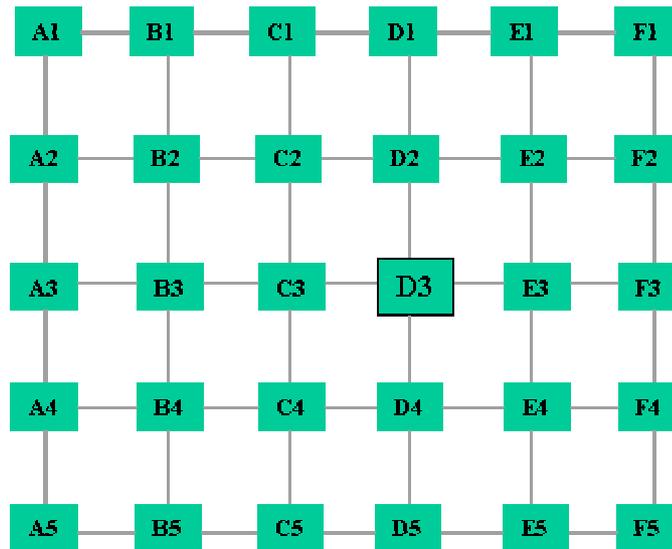
2.1. Date

Août-septembre, période de biomasses maximales.

2.2. 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. Les coordonnées géographiques des points affectés à ces intersections sont codifiées par un code lettre-chiffre allant du code A1 au code F5 (voir schéma ci-dessous). 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* » défini dans la base de données Quadrigé² et dans les atlas DCE est positionné au point D3 approximativement au centre de cette grille.



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 en chaque station puis réutilisée telle quelle pour les suivis ultérieurs. Une telle stratégie est utilisée dans le protocole indicateur macroalgues intertidales avec retour régulier sur les points de suivi (Ar Gall & le Duff, 2007).

Le code de chaque point sera : **Code station (initiales de la station)-année-lettre-chiffre**. Par exemple, si la grille ci dessus concerne la station La Berche, pour l'échantillonnage réalisé en 2011, le point « D3 » s'appelle : **LB-2011-D3**

En fonction de la superficie actuelle des herbiers, le nombre de stations sera le suivant dans les masses d'eau DCE, sous réserve d'accessibilité.

Masse d'eau	Dernière superficie connue	Nombre de stations
Estuaire Bidassoa	1,7 ha	1 (station actuelle)
Hossegor	0,5 ha	1 (station actuelle)
Arcachon amont	4600 ha	3 (Estey tort, Afrique, Hautebelle)
Pertuis charentais	1500 ha	3 (les Doux, Château d'Oléron, Bellevue)
Pertuis breton	400 ha	2 (Charge Neuve, Fier d'Ars)
Estuaire du Lay	17,6 ha	1 (Lay crochon1982)
Baie de Bourgneuf	600 ha	2 (La Berche, Noirmoutier à confirmer)
Golfe du Morbihan	720 ha	2 (Sarzeau, Auray ou Tascon)
Rance Fresnaye	60 ha	1 (St Jacut)
Le Trieux	24 ha	1 (Kergrist)

2.3. Matériel

Pour l'estimation des taux de recouvrement :

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

Pour le sédiment :

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

2.4. Taux de recouvrement des zostères et biomasses de macroalgues

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

- La pose du cadrat de 50 X 50 cm
- La notation sur la feuille terrain de : présence de macroalgues ou non sur ce cadrat.
- En cas de présence des macroalgues, la réalisation d'un cliché du cadrat 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.
- Le prélèvement des macroalgues, en collectant l'ensemble des algues ou en distinguant algues vertes, algues brunes et algues rouges, avec prélèvement dans un sachet plastique différent si nécessaire, et numéroté (code A1 à F5) pour l'estimation des biomasses.

NB : Dans les cas où les macroalgues sont très abondantes et réparties de façon homogène sur l'herbier, on effectue les prélèvements seulement sur un cadrat sur 3. On indique alors, sur la feuille terrain : prélèvement de macroalgues ou non.

- La prise d'une ou plusieurs photos à la verticale, après le prélèvement éventuel de macroalgues, 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 **code station – année – lettre et chiffre du point**. Une résolution de 1600*1200 pixels environ est suffisante.
- L'estimation visuelle des taux de recouvrement des zostères avec report pour chacun des 30 points sur la feuille terrain. **Cette estimation visuelle est**

absolument nécessaire. En effet, dans certains cas (présence d'eau sur l'herbier, forte abondance des macroalgues dont le ramassage induit un enfouissement des feuilles), le traitement de la photo par ImageJ donne une vision très faussée du taux de recouvrement. On retiendra alors la valeur de recouvrement estimée sur le terrain.

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

2.5. 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.

3. Au laboratoire

3.1. Taux de recouvrement des 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 :

- Dès le retour au laboratoire, renommer les fichiers photo (clichés sans macroalgues) par leur code de point : code station (initiales de la station) – année – lettre – chiffre. Par exemple, si les grilles des paragraphes 2-2 et 2-4 concernent la station La Berche pour l'échantillonnage réalisé en 2011, la photo réalisée sur le point D3 (page 3) s'appelle : LB-2011-D3.jpg ;
- 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 (annexe 2) ;
- Le calcul obtenu doit être rattaché à une classe de recouvrement et correspond à la valeur médiane de la classe selon le tableau suivant :

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

NB : le « 0 » est un vrai 0 % avec absence de zostère.

L'intérêt de cette approche est double :

- elle est cohérente avec l'approche développée pour l'indicateur macroalgues intertidales (Ar Gall & Le Duff, 2007),
- 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.

Saisie Quadrige² : 30 valeurs/station

- Médiane des classes de recouvrement pour chaque cadrat.

NB : stocker également dans Quadrige² la photo de chaque cadrat après enlèvement des macroalgues.

3.2. Macroalgues

Dès le retour du terrain :

- Renommer, quand ils existent, les fichiers photo (clichés avec macroalgues) par leur code de point : « M » - code station (initiales de la station) – année – lettre – chiffre. Par exemple, si les grilles des paragraphes 2-2 et 2-4 concernent la station La Berche pour l'échantillonnage réalisé en 2011, la photo réalisée sur le point D3 (page 3) s'appelle : M-LB-2011-D3.jpg
- Congeler les échantillons d'algues à – 20°C. Par la suite :
 - Tri en distinguant algues vertes, rouges et brunes (si non réalisé sur le terrain)
 - Lavage et séchage des échantillons à l'étuve (48 h minimum à 60°C), puis pesée à 0,1g.

Saisie Quadrige² : 90 échantillons/station, ou 30 si échantillonnage partiel (voir § 2.4).

- Surface échantillonnée : soit 0,25 m²

- Poids Sec = Biomasse sèche des macroalgues par groupe (vertes, rouges, brunes) collectées sur le cadrat de 0,25 m². En cas d'absence, noter 0.

NB : stocker également dans Quadrige² la photo de chaque cadrat AVANT enlèvement des macroalgues

3.3. Sédiment

3.3.1. 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 prétraitement sera réalisé juste avant les analyses.

Par la suite granulométrie sur colonne humide en respectant la progression des tailles de tamis AFNOR : 63 - 80 - 100 - 125 - 160 - 200 - 250 - 315 - 400 - 500 - 630 - 800 - 1000 - 1250 - 1600 - 2000 - 4000 µm. L'interprétation des résultats pourra s'appuyer sur la procédure GRADISTAT d'analyse des résultats granulométriques développées par Blott & Pye (2001) en particulier pour calculer de façon homogène la médiane..

Saisie Quadrige² : 1 échantillon/station

- Proportion (%) de chaque classe granulométrique

- Médiane

3.3.2. 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 : $PSSC \times 100 / Psec$.

Saisie Quadrige² : 9 échantillons/station

- Pourcentage de MO (%)

Bibliographie

Auby I., Oger-Jeanneret H., Sauriau P.-G., Hily C. & 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.

Ar Gall E. & 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.

Blott S.J. & Pye K. (2001). Gradistat : a grain size distribution and statistics package for the analysis of unconsolidated sediments. *Earth Surface Processes and Landforms*, 26: 1237-1248.

Annexe 1 : Elaboration du rapport biomasse épigée vs. taux de recouvrement

1. Contexte de l'action

En 2007, un protocole destiné à assurer le suivi stationnel des herbiers de zostères (*Zostera noltii* et *Zostera marina*) dans le cadre de la Directive Cadre sur l'Eau a été élaboré (Hily *et al.*, 2007). Ce protocole était inspiré de celui mis en place par le réseau REBENT pour ces phanérogames.

Dans le cadre de ce protocole, un certain nombre de paramètres étaient mesurés dans les herbiers des deux espèces de zostères, notamment ceux permettant de caractériser le niveau de leur développement: densité des pieds, longueur et largeur des limbes, biomasse des différents organes.

En ce qui concerne *Zostera marina*, le plus souvent située en position infralittorale et échantillonnable, le plus souvent, exclusivement en plongée, ce protocole s'est avéré bien adapté pour caractériser au mieux l'état des herbiers.

Par contre, il est apparu inadéquat pour qualifier correctement le niveau de développement des herbiers de la zostère naine *Zostera noltii*, notamment en raison de l'hétérogénéité spatiale des herbiers, à la fois à méso et macro-échelles. Les informations recueillies étaient trop localisées vis-à-vis de l'étendue des masses d'eau. Par ailleurs, le temps passé aux analyses en laboratoire s'avérait trop important vis-à-vis de l'intérêt des informations recueillies pour l'élaboration de l'indicateur « angiospermes », qui ne prend pas en compte les paramètres biométriques (Auby *et al.*, 2010).

Pour cette raison, il a été décidé de modifier les protocoles pour *Zostera noltii* afin de prendre en compte cette hétérogénéité spatiale, le temps économisé au laboratoire permettant par ailleurs d'augmenter le nombre de stations suivies et la fréquence d'observation.

Le nouveau protocole consiste en une mesure des taux de recouvrement des feuilles de zostères sur un nombre de stations adapté à la surface des différentes masses d'eau, 30 points étant échantillonnés sur chaque station.

Toutefois, afin de ne pas perdre le bénéfice des résultats du suivi entrepris depuis 2007, il était important de déterminer la relation entre anciens et nouveaux paramètres, en l'occurrence les résultats de biomasses interprétables à travers une relation biomasse épigée (feuilles +gainés) vs taux de recouvrement.

C'est dans ce cadre que l'action décrite dans ce document a été réalisée en septembre 2011 sur 4 sites de la façade atlantique. Cette opération a été effectuée à la même époque que celle définie pour le suivi stationnel des zostères intertidales (août-septembre).

2. Méthodes

.La méthode adoptée pour établir la relation biomasse épigée vs recouvrement est la suivante :

Sur le terrain :

- Choisir 3 à 5 points pour chacune des cinq classes de recouvrement (1-25%, 26-50%, 51-75%, 76-99% et 100%) sur la base d'une estimation visuelle basée sur les observations de terrain.
- Sur chaque point :
 - si nécessaire, enlever les macroalgues présentes sur la surface du cadre à poser ;
 - poser le cadre 31,6x31,6 cm, avec, sur le côté du cadre, la plaquette en formica marquée d'un identifiant qui sera similaire à celui du sac plastique dans lequel seront placées les zostères. Estimer le recouvrement, le noter et prendre une photo ;
 - planter les 4 piquets au coin du cadrat et retirer celui-ci ;
 - prélever les zostères à l'intérieur des piquets et les placer dans 1 sac en plastique (1 par cadrat).

Au laboratoire :

- De retour au laboratoire, rincer les prélèvements et les congeler à -20°C .
- Par la suite, pour chaque sac, séparer les parties épigées (feuilles+gaines) du reste (rhizomes+racines) du matériel végétal. Laver et sécher les feuilles+gaines à l'étuve (48 h minimum à 60°C), puis peser à 0,1g.
- De retour au laboratoire, décharger l'appareil photo sur un ordinateur. Renommer le plus rapidement possible ces photos avec le même identifiant que celui marqué sur les sacs en plastique contenant les zostères.
- Calculer le pourcentage de recouvrement sur la photo à l'aide du logiciel Image J.

L'analyse statistique est basée sur la régression linéaire simple et l'analyse de covariance (Sokal et Rohlf 1981, Rohlf et Sokal, 1981).

3. Résultats et discussion

Quatre stations ont été échantillonnées en août et septembre 2011, dans les masses d'eau suivantes : Arcachon amont, Estuaire du Lay, Baie de Bourgneuf, Rance-Fresnaye.

3.1. Données brutes

Le tableau 1 contient les données recueillies dans les 4 stations aux dates indiquées dans la première ligne.

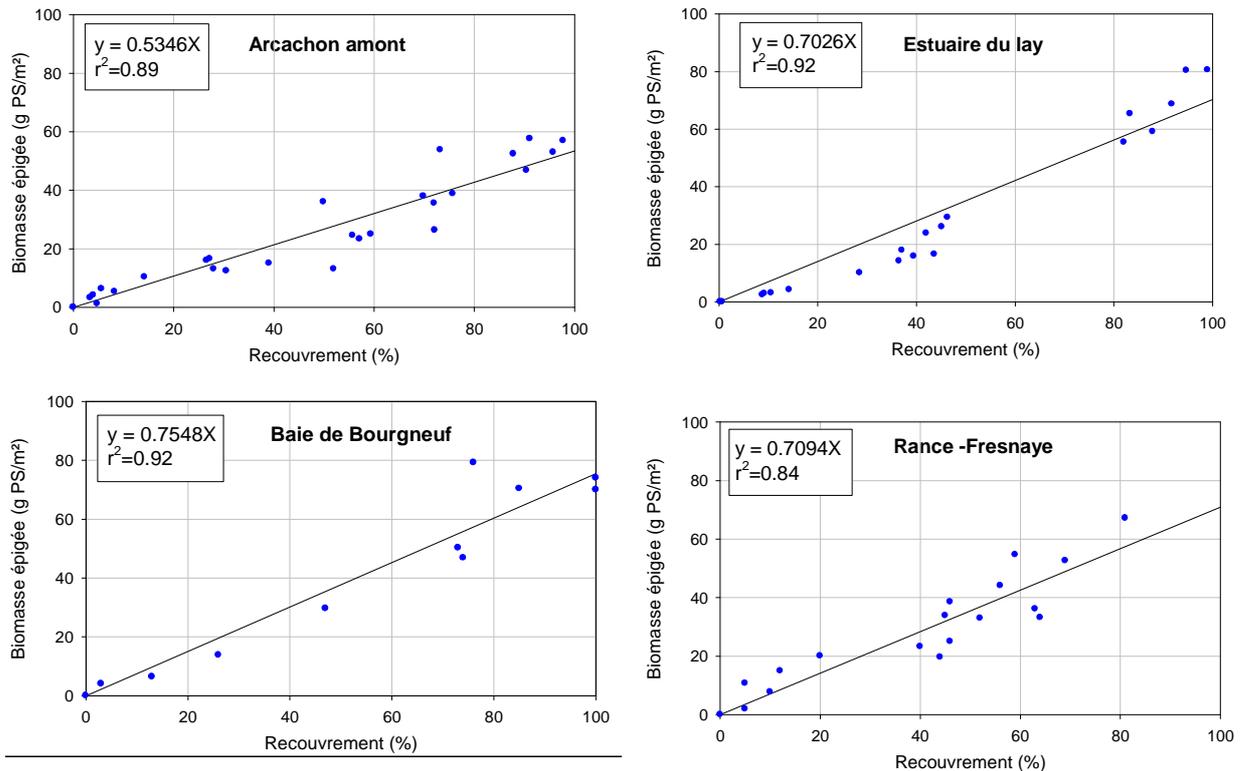
Tableau 1 : Résultats des recouvrements évalués avec le logiciel ImageJ (Rec) et de biomasses épigées (Bio Epi) acquis sur les 4 stations en 2011.

Bourgneuf 12/09/2011		Arcachon 30/08/2011		Rance-Fresnaye 13/09/2011		Estuaire du Lay 26/09/2011	
Rec (%)	Bio Epi (g PS/m ²)	Rec (%)	Bio Epi (g PS/m ²)	Rec (%)	Bio Epi (g PS/m ²)	Rec (%)	Bio Epi (g PS/m ²)
0	0,0	0	0	0	0,0	0	0,0
3	4,0	14	10,3	44	19,6	0,64	0,0
13	6,4	3	3,2	64	33,1	9,19	2,9
26	13,8	72	26,3	12	14,9	10,54	3,1
47	29,6	59	25,0	52	32,9	8,78	2,4
73	50,2	8	5,3	46	25,0	14,23	4,2
74	46,8	90	46,7	10	7,7	43,66	16,5
76	79,2	88	52,4	69	52,6	39,47	15,8
85	70,4	4	4,2	59	54,6	28,51	10,1
100	74,0	72	35,6	45	33,8	36,51	14,2
100	70,0	76	38,7	5	1,9	42,01	23,8
		98	56,9	5	10,7	45,14	26,0
		27	15,9	46	38,5	46,35	29,3
		91	57,6	40	23,2	37,09	17,9
		57	23,3	63	36,1	83,28	65,4
		96	52,9	20	20,0	91,77	68,7
		39	15,0	56	44,0	87,89	59,1
		52	13,0	81	67,1	82,05	55,5
		27	16,5			99,00	80,6
		6	6,3			94,71	80,3
		5	1,2				
		28	13,1				
		50	36,0				
		56	24,5				
		73	53,8				
		70	37,9				
		31	12,4				

3.2. Représentation graphique et statistiques

Les résultats obtenus (pentes et résultats des régressions linéaires) sont reportés dans les figures 1-1 à 1-4.

Sur ces figures, il apparaît que les pentes déterminées à partir des données recueillies dans les 4 masses d'eau ne sont pas identiques. Elles varient de 0,53 pour Arcachon amont à 0,75 en baie de Bourgneuf.



Figures 1-1 à 1-4 : Régressions linéaires biomasse épigée vs recouvrement dans les 4 stations échantillonnées

Afin de tester la significativité de ces différences, une ANCOVA fixant le *site* comme variable qualitative a été effectuée.

Sur le jeu de données complet, cette analyse indique une dissimilarité des pentes, qui disparaît lorsque les données d’Arcachon amont sont retirées de l’analyse. La pente de la régression linéaire entre biomasse épigée et taux de recouvrement est donc significativement différente pour Arcachon que pour les autres sites testés. Cette différence indique pour un même taux de recouvrement, une biomasse plus faible sur le site Arcachon amont et suggère en première analyse des différences entre sites du rapport surface des feuilles/poids sec.

Une analyse plus fouillée de la variabilité du rapport surface des feuilles/poids sec peut cependant suggérer une autre hypothèse, comme le montrent les résultats réunis dans le tableau 2, extraits des rapports présentant les résultats du suivi stationnel dans les masses d’eau « Lac d’Hossegor » (Auby et Trut, 2011) et « Arcachon amont » (Auby et al., 2011).

La variabilité du rapport surface des feuilles/poids sec s’exerce aussi bien sur les niveaux spatiaux que temporels avec des différences annuelles pour un même site et des différences entre sites pour une même année. Cette variabilité n’est pas constante comme le montre la comparaison des sites en 2009 avec aucune différence significative du rapport.

Tableau 2 : Valeurs du rapport surface feuilles/poids sec pour *Zostera noltii* en 3 stations suivies dans le cadre de la DCE. (Source Auby et Trut, 2011, Auby *et al.*, 2011)

Rapport surface feuilles/poids sec (cm²/g) - Moyenne ± ES				
Année	2006	2007	2008	2009
Hossegor		728 ± 234	622 ± 95	491 ± 23
Arcachon amont – Station 1	241,7 ± 82,9	535,1 ± 56,3	496,5 ± 95,4	485,3 ± 30,1
Arcachon amont – Station 2	447,4 ± 17,6	500,9 ± 68,9	526,9 ± 83,0	502,7 ± 42,3

Il est donc suggéré que l'effet « site » mis en évidence en 2011 entre les 4 sites prospectés n'est qu'apparent et que la relation établie sur les 4 stations rend compte de l'étendue possible de la relation entre ces deux variables.

A cet égard, on peut finalement remarquer que la relation mise en évidence par Dalloyau (2008) dans les Pertuis charentais (présentée ci dessous) se rapproche de celle mise en évidence pour Arcachon amont en 2011.

$$\text{Bio. Epi} = 0,603 \text{ Rec} \quad (n = 126; r^2 = 0,834)$$

(avec Bio. Epi et Rec définis dans le Tableau 1).

En considérant que le jeu de données 2011 est homogène, la relation établie à partir du jeu complet de données acquises en 2011 est reportée dans la figure 2.

Le coefficient de détermination de la qualité du modèle est élevé : $r^2 = 0,85$

Les résultats de l'analyse de variance indiquent que cette relation est très significative avec $r = 0,90$, $n = 76$ et $p < 0,001$ (Tableau 3).

Tableau 3 : Analyse de variance sur le jeu complet des données 2011.

Analyse de la variance :				
Source	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	100572.880	100572.880	1249.289	< 0.0001
Erreur	5876.798	80.504		
Total corrigé	106449.678			

La grande majorité (72 valeurs sur 76 sont situées dans l'intervalle de prédiction. Seules 4 observations sont en dehors de l'intervalle de prédiction : elles peuvent être considérées comme suspectes.

L'analyse des résidus centrés réduits (Figure 3) met également en évidence ces 4 observations suspectes. Ce graphique indique aussi une légère tendance dans les résidus à augmenter en fonction du taux de recouvrement à partir d'un taux de 60 % mais c'est peut être un artefact lié au faible nombre d'observations (9 sur un total de 76).

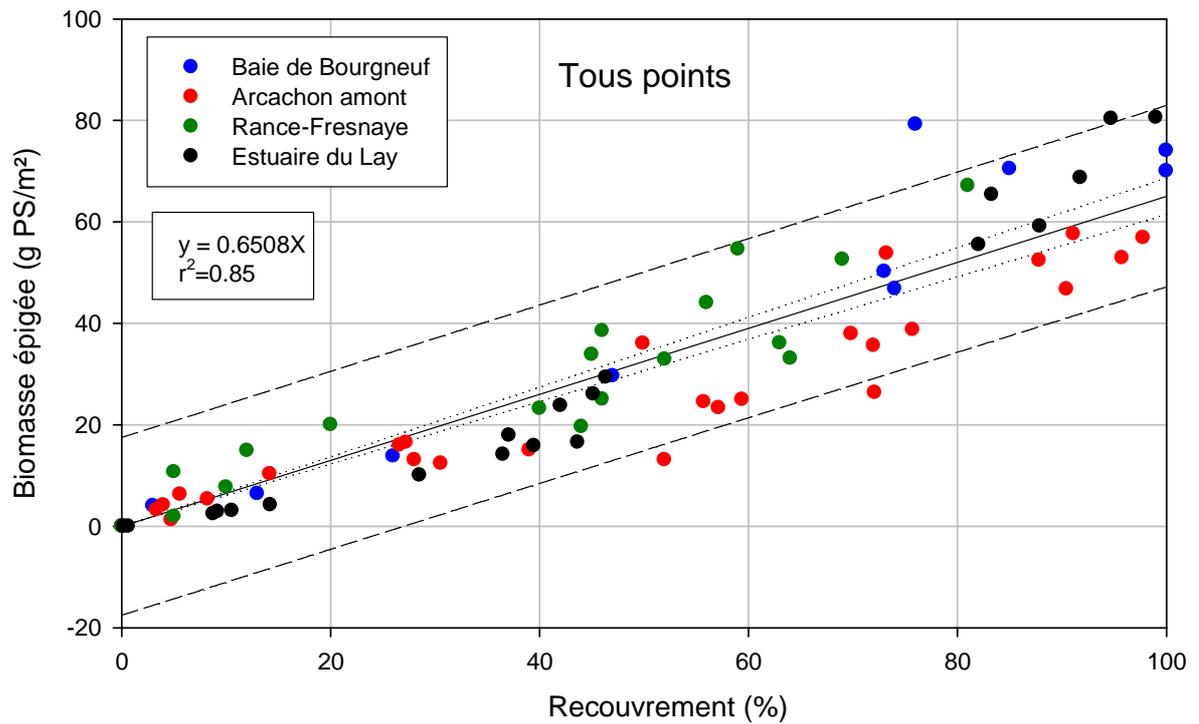


Figure 2 : Régression linéaire entre la biomasse épigée et le taux de recouvrement pour toutes les stations échantillonnées en 2011 (ligne pleine : régression – pointillés : intervalle de confiance autour de la moyenne de l'estimateur – tirets : intervalle de prédiction à 95 %).

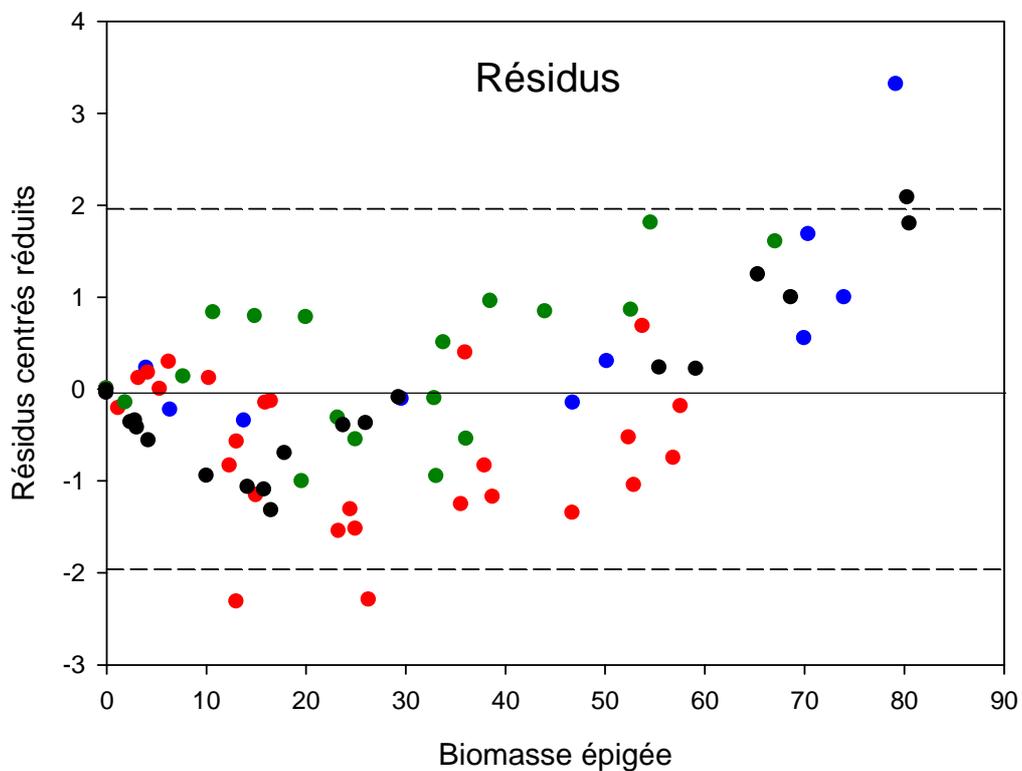


Figure 3 : Relation entre les résidus et la biomasse épigée sur l'ensemble du jeu de données

4. Correspondances entre données acquises avec l'ancienne méthode et la nouvelle

En ce qui concerne les organes épigés, l'application de l'ancien protocole permettait d'acquérir des données de biomasse sur les zones végétalisées et un pourcentage de surface végétalisée.

Trois paramètres pouvaient être déduits de ces données : pourcentage de surface végétalisée sur la station, biomasse moyenne sur les zones végétalisées et biomasse moyenne sur l'ensemble de la station (en rapportant les biomasses à l'ensemble de la station).

Le nouveau protocole permet d'acquérir un pourcentage de recouvrement sur chacun des 30 points. Grâce à la relation déterminée dans ce rapport, ce taux de recouvrement peut être transformé en biomasse épigée par point.

Trois paramètres peuvent être déduits de ces données : pourcentage de surface végétalisée sur la station, biomasse épigée moyenne sur les zones végétalisées et biomasse épigée moyenne sur l'ensemble de la station.

Bibliographie

Auby I., Dalloyau S., Hily C., Oger-Jeanneret H., Plus M., Sauriau P.-G., Trut G. (2012). Protocoles de suivi stationnel des herbiers à zostères pour la Directive Cadre sur l'Eau (DCE), *Zostera marina*, *Zostera noltii*. Rapport RST/LER/MPL/12.03, 24 p.

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

Auby I., Trut G. (2011). Suivi stationnel de l'herbier de zostères naines (*Zostera noltii*) de la Masse d'eau côtière FRFC09 – Lac d'Hossegor – District Hydrographique Adour-Garonne – 2007-2008-2009. Rapport RST/LER/AR/11.001, 16 p.

Auby I., Trut G., Barbier C., Bujan S., Cordier M.-A. (2011). Suivi stationnel des herbiers de zostères (*Zostera noltii* et *Zostera marina*) de la Masse d'eau côtière FRFC06 – Arcachon amont – District Hydrographique Adour-Garonne – 2006-2007-2008-2009. Rapport RST/LER/AR/11.002, 40 p.

Dalloyau S. (2008). Réponse fonctionnelle et stratégies d'hivernage chez un anséridé en lien avec la disponibilité de la ressource alimentaire. Cas de la Bernache cravant à ventre sombre (*Branta bernicla bernicla*) en hivernage sur le littoral atlantique (Île d'Oléron – Charente Maritime – 17). Ecole Pratique des Hautes Etudes : 118 pp + annexes.

Hily C., Sauriau P.G., Auby I. (2007). Protocoles suivi stationnel des herbiers à zostères pour la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) - *Zostera marina* – *Zostera noltii*. Rapport LEMAR, CNRS, IFREMER, 10 p.

Rohlf F.J., Sokal R.R. (1981). Statistical tables, Second edition. N.J., Freeman, W.H. and Co. (eds.) : 219 p.

Sokal R.R. & Rohlf F.J. (1981). Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. Second edition. New York, Freeman, W.H. and Co (eds.): 859 p.

Annexe 2 : Utilisation du logiciel Image J

1- Télécharger le logiciel

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

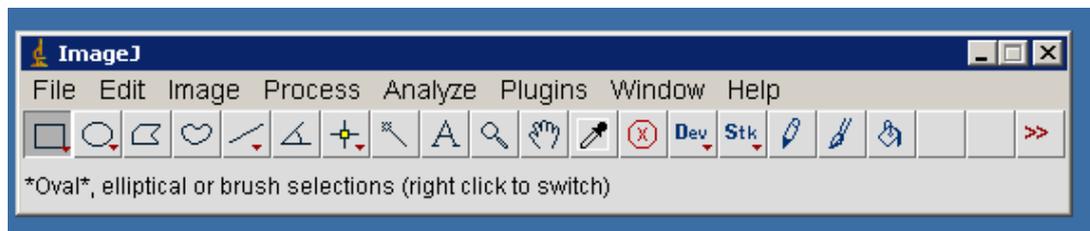
2- Choisir la version adaptée à votre plateforme Pour Windows

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- Dans ce menu « ImageJ »

4.1- Ouverture d'un fichier

File

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

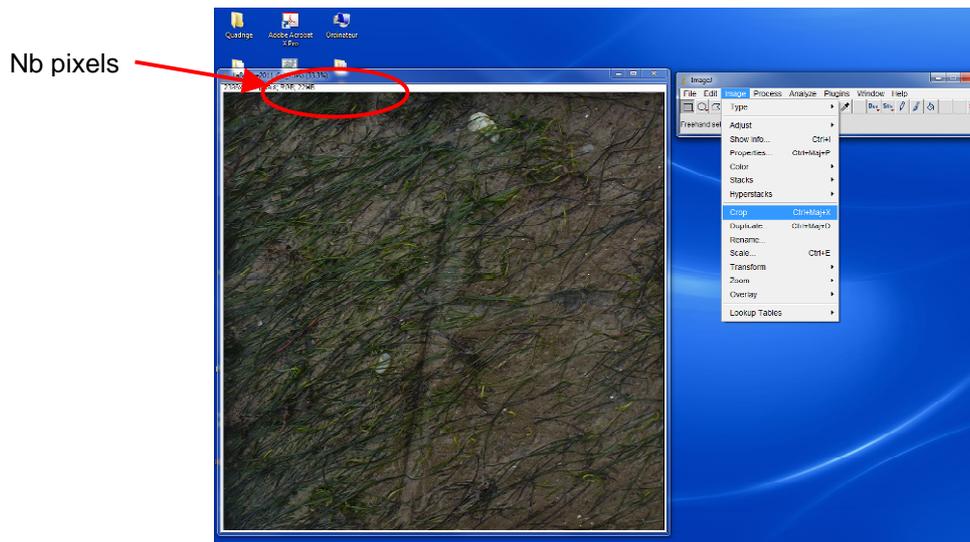
4.2- Choix de la surface à traiter

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



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 :

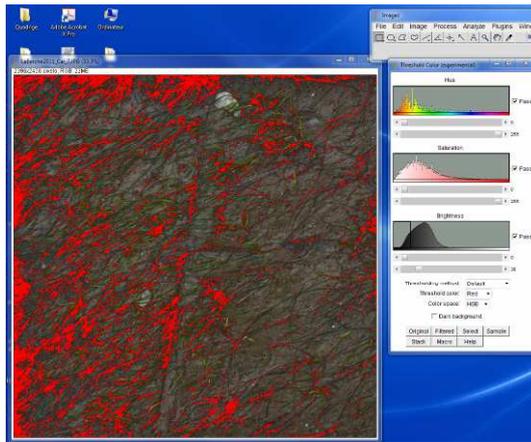
Thresholding method : **Default**

Threshold color : **Red**

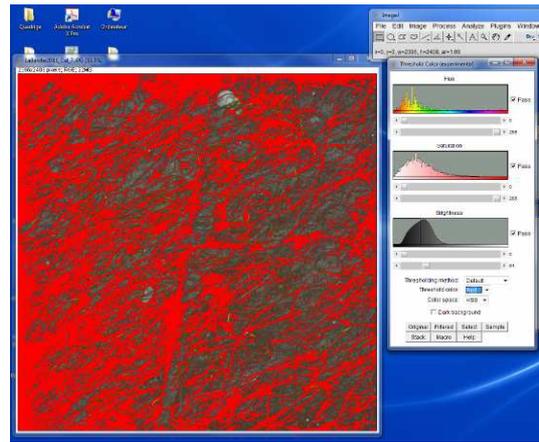
Color space : **HSB**

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 38

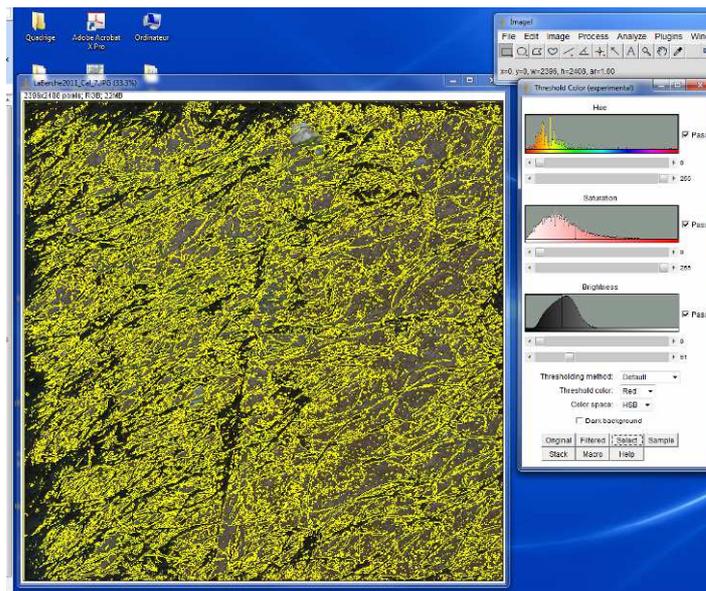


Brightness 61

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.



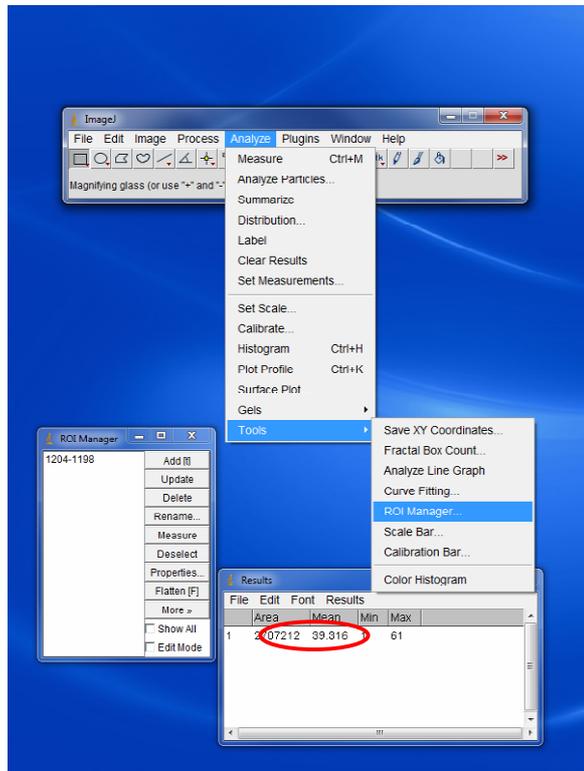
4.4 – Calcul du taux de recouvrement

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 – 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
76-99	89 %		0,875