

Protocoles et partenaires scientifiques

Les protocoles ont été conçus en collaboration entre les partenaires scientifiques et l'équipe de Gombessa 5. Chaque scientifique a apporté son matériel (parfois amélioré en collaboration avec l'équipe de Gombessa 5) puis s'est chargé / se charge de l'analyse des données et de sa valorisation (publications scientifiques, rapports aux financeurs etc.).

Au total 17 partenaires scientifiques de divers organismes de recherche français et étrangers ont collaboré à la mission Gombessa 5 :

Alfred Wegener Institute à Bremerhaven (Allemagne), Andromède océanologie à Mauguio, Centro de Ciências do Mar à Faro (Portugal), Chorus à Grenoble, CEFE (UMR CNRS, Université de Montpellier, Montpellier Supagro, EPHE, INRA, IRD) à Montpellier, Centre Scientifique de Monaco (CSM) à Monaco, ECLA (UMR AFB, ONCFS, IRSTEA, USMB), IMBE (UMR Aix Marseille Université, CNRS, IRD, Avignon Université), HE2B, le laboratoire commun InToSea à Montpellier, le laboratoire Arago à Banyuls-sur-mer (Observatoire océanologique de Banyuls-sur-Mer, CNRS, IRD, UPMC), MARBEC à Montpellier (UMR IRD, Université de Montpellier, Ifremer et CNRS), MIO (UMR Université Aix-Marseille, Université de Toulon, CNRS, IRD) à Marseille, REEDS à Montpellier, TETIS (UMR AgroParisTech, CIRAD, IRSTEA, CNRS) à Montpellier, STARESO à Calvi, l'université libre de Bruxelles (Belgique).

Les différents protocoles scientifiques peuvent être regroupés en sept catégories illustrées sur la figure suivante : température, conductivité, images d'espèces et paysages, sédiments (chimie et macrofaune), 3D et son, Biodiversité (Biologie, ADNe, génétique), chambres benthiques, macrodéchets.

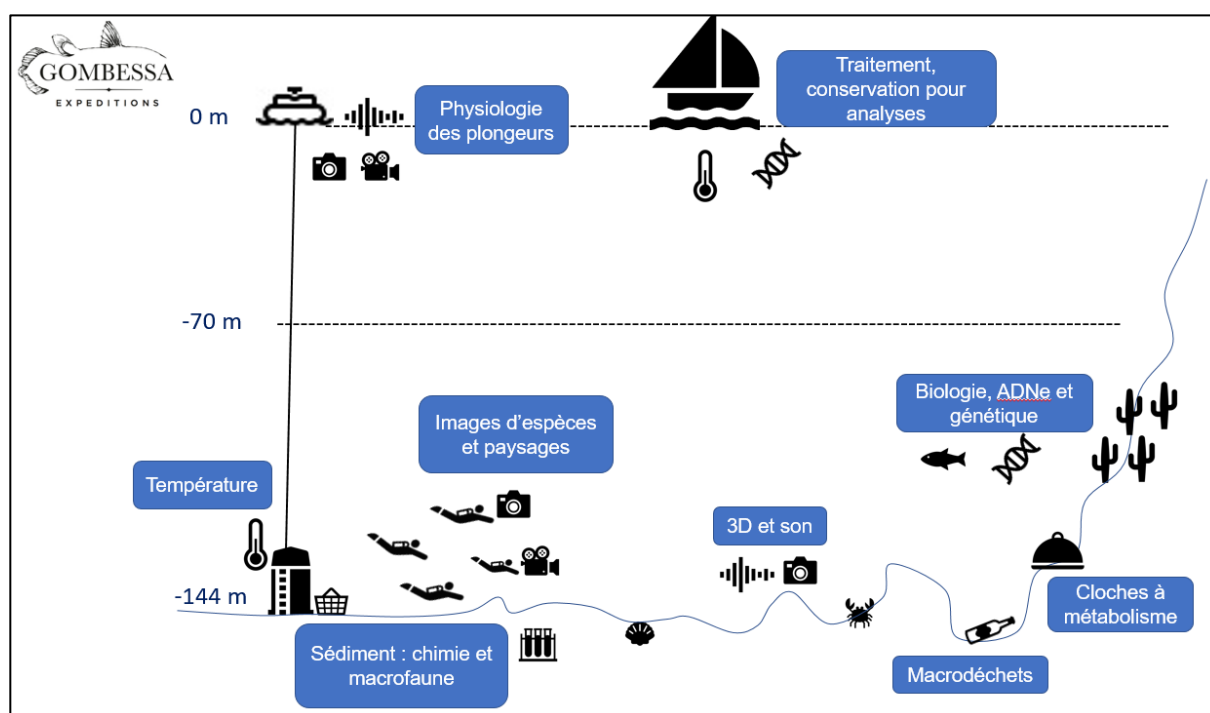


Figure 1 : Synthèse des protocoles scientifiques Gombessa 5.

Nous présentons ici un résumé des objectifs, matériels et méthodes des protocoles scientifiques mis en place durant la mission de Juillet.

I.A.1.a. Sonde multi-paramètres

Objectif : Caractérisation des paramètres physico-chimiques de la colonne d'eau.

Matériel : 1 sonde multi-paramètres, 200 m de bout 5 mm marqué tous les 10 mètres, 1 enrouleur, eau distillée, câble permettant de relier la sonde à un ordinateur pour la décharge des données.

Méthode : Immerger complètement la sonde au niveau de la surface, attendre quelques instants afin de permettre la stabilisation des capteurs puis plonger la sonde jusqu'à la profondeur voulue. Remonter ensuite la sonde à bord à l'aide d'un treuil. Les mesures permettent ensuite d'obtenir un profil de différents paramètres physico-chimiques (profondeur, température, pH, salinité, conductivité, densité, oxygène, saturation en oxygène, turbidité, fluorescence, lumière).

Partenaire scientifique : Régis Hocde (IRD - UMR Marbec) et Julie Deter (Université de Montpellier - UMR Marbec, labcom InToSea).

I.A.1.b. 3D et son

Objectif : Réaliser la carte sonore (origine, intensité et diversité des sons biologiques émis) d'un massif de coralligène et la relier avec la biodiversité présente et la complexité structurale de l'habitat mesurés à partir du modèle 3D du massif (photogrammétrie).

Matériel : Deux enregistreurs EA RTSYS, 8 hydrophones sur des antennes, 8 lest, Filets de plongeurs pour la pose et la relève et des parachutes de relevage, matériel pour la photogrammétrie.

Méthode : Deux réseaux de 4 hydrophones sont déployés en deux carrés concentriques : Un réseau de 35m*35m*10m est déployé sur le massif de coralligène ; Un réseau plus petit de 3m*3m*2m est déployé sur le massif de coralligène au centre du grand carré de 35m*35m. Il s'agit du même déploiement que le précédent à plus petite échelle. Tout le massif et le système déployé est photographié avec le matériel dédié à la reconstruction en 3D par photogrammétrie et notamment un prototype développé par le laboratoire commun InToSea.

Partenaire scientifique : Julie Lossent (Chorus), Guilhem Marre (Andromède Océanologie, UMR TETIS, UMR MARBEC), Florian Holon (Andromède océanologie), Julie Deter (Université de Montpellier – UMR MARBEC / Andromède océanologie, Laboratoire commun InToSea), Benoit Ropars (Reeds).

I.A.1.c. Biodiversité

Images d'espèces et de paysages

Objectif : Illustrer des paysages sous-marins, des comportements animaliers ou d'espèces jamais illustrées vivantes et dans leur milieu par des images (photos et vidéos) inédites.

Partenaire scientifique : Andromède Océanologie et aide d'experts pour certaines identifications (Thierry Pérez, Nicole Boury-Esnault, Pierre Chevaldonné, Jean Vacelet, Helmut Zibrowius).

Photogrammétrie de paysages

Objectif : Reconstruction 3D des sites explorés dans un but d'archivage et d'étude écologique de la biodiversité fixée et de la complexité de l'habitat. Le développement de la méthode d'identification d'espèces à partir des modèles (reconnaissance automatique et/ou identification manuelle sur quadrats(Deter et al., 2012a, 2012b,

Doxa et al., 2016)) fait l'objet d'une partie de la thèse en cours de Guilhem Marre (thèse CIFRE, « Développement et utilisation de la photogrammétrie sous-marine pour l'étude d'habitats sous-marins).

Matériel : Matériel dédié à la reconstruction en 3D par photogrammétrie (appareils photos) et notamment un prototype développé par le laboratoire commun InToSea.

Partenaire scientifique : Guilhem Marre (Andromède océanologie, UMR TETIS, UMR MARBEC), Florian Holon (Andromède océanologie), Julie Deter (Université de Montpellier – UMR MARBEC / Andromède Océanologie, Laboratoire commun InToSea), Benoit Ropars (Reeds).

L'ensemble des modèles 3D des sites sont disponibles sur la plateforme [MEDTRIX](#) dans le projet MODEL dédié à la surveillance des habitats sous-marins par photogrammétrie.

Macrofaune des sédiments

Objectif : Etude de la macrofaune benthique de substrat meuble profond.

Matériel : Benne à main de type Ekman-Brige, sachets de prélèvement et élastiques, Carotte et sachets plastiques, Tamis en inox de maille carrée de 0.5 mm, Boîtes de conservation et formol 35 %.

Méthode : Réalisation d'une carotte sur une profondeur de 15 cm environ et de quatre coups de benne aux alentours (distance de 1 à 2 m) du prélèvement de la carotte.

Partenaire scientifique : Michèle Leduc et Annick Donnay (Stareso).

ADN environnemental

(Biologie, ADNe, génétique)

Objectif : Effectuer un recensement de la diversité ichthyologique et comparer les assemblages d'espèces en/hors réserves et selon des profils de profondeurs.

Matériel : 50 kits de filtration d'eau de mer (Cartouche, tubes, tampon), 3 pompes péristaltiques, 5 filets de récoltes + mousquetons, bouteilles Niskin 10L, le prototype de pompe pour transect de fond.

Méthode : Transects de filtration d'eau en surface (annexe du Zembra, 3 x 10 litres) + transect de filtration d'eau au fond au plus près de l'habitat par les plongeurs (prototype, 3 x 10 litres) + prélèvement à différentes profondeurs par bouteille niskin (1 x 10 litres) à partir du Zembra.

Partenaires scientifiques : Pr David Mouillot (Université de Montpellier - UMR MARBEC), Emilie Boulanger (Université de Montpellier - UMR CEFE), Jean-Baptiste Juhel, Laure Velez (Université de Montpellier - UMR MARBEC).

ADN de référence

Objectif : Biopsie sur poissons pour complétion de la base de référence génétique.

Matériel : 4 épuisettes pliantes (+ 3 non pliantes en secours), 3 flasques molles d'eugénol pour anesthésie des poissons, 50 tubes de prélèvement, 1 flacon d'éthanol, 3 filets maillants.

Méthode : Capturer des poissons dans l'habitat benthique à l'aide de filets/épuisettes et des sprays d'eugénol, prélever un bout de nageoire et le placer dans un tube de prélèvement.

Partenaires scientifiques : Pr David Mouillot (Université de Montpellier - UMR MARBEC), Emilie Boulanger (Université de Montpellier - UMR CEFE), Régis Hocde (IRD - UMR Marbec).

Gorgones profondes

Objectif : Les gorgones forment des structures tri-dimensionnelles qui constituent un véritable paysage sous-marin, dans lequel les poissons et autres animaux viennent trouver refuge. Cinq espèces de gorgonaires (corail rouge *Corallium rubrum*, *Paramuricea clavata*, *Eunicella cavolini*, *Eunicella singularis*, *Eunicella verrucosa*) sont prélevées pour analyse de la composition en isotopes stables des tissus et analyses de microbiote, et prélèvements d'eau et de sédiment pour comparaison au milieu environnant.

Matériel : Bouteilles gonflables, tubes de 50 ml, sacs plastiques + en surface : 2 systèmes de filtration, filtres de différents diamètres, RNA later pour la conservation des échantillons, matériel de prélèvement

Méthode :

Gorgones : prélever 1 échantillon de 20 cm sur 5 colonies par espèce. Stocker dans l'eau chaque échantillon dans un sac plastique prévu à cet effet et étiqueté. Les échantillons de gorgone sont ensuite ramenés sur le Zembra pour division en différents échantillons et mise en conservation.

Eau de mer : Prélever 6 – 8 L d'eau de mer à la même profondeur que les gorgones dans des bouteilles gonflables prévues à cet effet. Filtration sur Zembra pour récupérer ADNe d'une part et plancton d'autre part et mise en conservation.

Sédiment : la couche superficielle de sédiment est prélevée avec cinq tubes de 50 ml, ramenés en surface et stocké à -20 °C.

Partenaires scientifiques : Jeroen Van de Water, Christine Ferrier-Pages (Centre scientifique de Monaco).

Corail noir

Objectif : Etude morphologique et génétique d'une population de corail noir.

Matériel : Ciseaux, Tubes de prélèvements, Ethanol 96%.

Méthode : Prélèvement de 30 échantillons à mettre dans des tubes.

Partenaire scientifique : Pascal Romans (Université Paris VI - Laboratoire Arago).

Laminaires

Objectif 1 : Evaluation de la Biomasse, de la production primaire, de la structure foliaire et de l'index LAI (Leaf Area Index) de *Laminaria rodriguezii*.

Matériel : Quadrat de 1 m², 10 Filets, Plaquette, Sac plastique de conservation, Marqueur, Alcool.

Méthode : Faire 5 quadrats de 1 m² dans chaque station et y récolter toutes les lamineaires dont la base des crampons se situe dans le quadrat (feuilles, rhizome et crampon).

Objectif 2 : Evaluation de la structure spatiale de *Laminaria rodriguezii*.

Matériel : 3 plaquettes vierges et crayon papier, Appareil photo, 1 mètre gradué de couturière.

Méthode : A faire trois fois : Effectuer des photos à la verticale, Faire un croquis et mesurer la longueur du rhizome entre deux feuilles et les dimensions des feuilles et noter la profondeur.

Objectif 3 : Evaluation de la capacité de reproduction de *Laminaria rodriguezii*.

Matériel : Plaquettes vierges et crayon papier, Alcool.

Méthode : Faire 3 quadrats par station. Dans chaque quadrat de 1 m²: récolter toutes les feuilles doubles dont la base des crampons se situe dans le quadrat (feuilles, rhizome et crampon) avec délicatesse sans rompre les feuilles et les mettre dans un filet noir (opaque).

Partenaires scientifiques : Thierry Thibaut, Lauric Reynes (Université d'Aix-Marseille - UMR MOI), Imka Bartsch, Klaus Valentin, Andreas Wagner (Alfred Wegener Institute de Bremerhaven (Allemagne)), Neusa Martins (Centro de Ciências do Mar à Faro (Portugal)).

I.A.1.d. Chambres benthiques

Objectif : Evaluer les flux de gaz du coralligène.

Matériel : 2 chambres benthiques dont une opaque et une transparente, 2 sondes O₂/température, 4 sondes CO₂/CH₄ (les sondes résistent jusque -100 m), 2 seringues START, 2 seringues END.

Méthode : Deux chambres à placer hermétiquement sur un massif de coralligène à quelques mètres de distance en conservant la même profondeur. Pour chaque chambre, 4 lests de 1kg sont placés sur la jupe pour assurer au mieux l'étanchéité. Un prélèvement d'eau est effectué à la pose (START) et au relevé (END) pour mesurer le pH.

Partenaires scientifiques : Martin Daufresne et Fanny Baudouin (IRSTEA – UR RECOVER), Nicolas Mouquet et Julie Deter (MARBEC, Univ Montpellier, CNRS, IFREMER, IRD (France)).

I.A.1.e. Macrodéchets.

Objectif : Quantifier, identifier et illustrer les macro-déchets.

Matériel : Caméra, ligne de 25 m de long, Appareil photo et Tablette.

Méthode : Transect de 25 m de long avec caméra filmant le fond pour compter et identifier macrodéchets visibles.

Partenaires scientifiques : Julie Deter et Gwenaëlle Delaruelle (Andromède océanologie).

I.A.1.a. Chimie des sédiments

Objectif : Quantifier et identifier les contaminants organiques et chimiques dans le sédiment superficiel.

Matériel : Benne manuelle de type Ekman-Bridge et grand zip lock.

Méthode : Un prélèvement de benne manuelle pour lequel des analyses de contaminants organiques et chimiques seront effectuées : % fine, COT (Carbone Organique Total), Azote total, Nitrites, Nitrates, 17 Métaux, 16 HAP (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques), 41 congénères de PCB et PCB totaux (Polychlorobiphényles). Conservation au congélateur.

Partenaires scientifiques : Emmanuel Wafo (faculté de pharmacie de Marseille), Annick Donnay (Stareso) et Gwénaëlle Delaruelle (Andromède Océanologie). **Analyses chimiques** par la faculté de chimie (sauf Azote total pour Nice- Haliotis réalisé par Eurofins), analyses granulométriques par Stareso et **interprétation** par Andromède Océanologie

Interprétation et valeurs seuils :

L'interprétation des résultats des analyses chimiques dans le sédiment est ici basée prioritairement sur les travaux des commissions MedPol (organisation internationale de la convention de Barcelone dédiée à la lutte contre la pollution de la Méditerranée). L'évaluation de la contamination utilise des critères d'évaluation avec lesquels il est possible de construire une grille de lecture (Bouchoucha et al., 2018). Deux seuils ont été retenus dans le présent rapport :

- **EAC** (Environmental Assessment Criteria) : Concentration au-dessous de laquelle aucun effet chronique n'est attendu pour les espèces marines,

- **ERL** (Effects Range Low) : Niveau défini comme le plus bas 10ème percentile des données qui seraient associées à des effets biologiques. Lorsque les concentrations dépassent ces seuils, l'état chimique peut être jugé inacceptable

L'interprétation par rapport aux EACs doit être effectuée avec prudence car ceux-ci ne prennent pas en compte les effets biologiques sur la vie marine spécifiques à long-terme, comme la carcinogénotoxicité, la génotoxicité et n'inclut pas les effets cumulés. De plus, la procédure par laquelle les critères ERL sont dérivés est très différente de la méthode de dérivation des EACs, aussi une équivalence précise entre ces deux séries de critères ne doit pas être attendue (Bouchoucha et al., 2018). Ces deux critères n'ont pas de valeur réglementaire. Ils permettent toutefois une caractérisation de l'état chimique des sédiments.

Les tableaux suivants présentent **les valeurs des seuils EAC ou ERL des HAP, Métaux, PCB, Pesticides** actuellement disponibles (source : Bouchoucha et al., 2018).

Tableau 1 : Valeurs seuils ERL $\mu\text{g/kg p.s}$ – **Métaux**.

Substance	Famille	Sédiment seuil	Sédiment valeur seuil
Cadmium et composés	Metaux	ERL $\mu\text{g/kg p.s}$	1 200
Mercure et composés	Metaux	ERL $\mu\text{g/kg p.s}$	150
Nickel	Metaux	ERL $\mu\text{g/kg p.s}$	21 000
Plomb	Metaux	ERL $\mu\text{g/kg p.s}$	47 000
Arsenic et composés minéraux	Metaux	ERL $\mu\text{g/kg p.s}$	8 200
Chrome	Metaux	ERL $\mu\text{g/kg p.s}$	81 000
Cuivre	Metaux	ERL $\mu\text{g/kg p.s}$	34 000
Zinc	Metaux	ERL $\mu\text{g/kg p.s}$	150 000

Tableau 2 : Valeurs seuils ERL µg/kg p.s – HAP.

Substance	Famille	Sédiment seuil	Sédiment valeur seuil
Anthracène	HAP	ERL µg/kg p.s	85
Benzo(a)pyrene	HAP	ERL µg/kg p.s	430
Benzo(g,h,i)perylene	HAP	ERL µg/kg p.s	85
Fluoranthène	HAP	ERL µg/kg p.s	600
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	HAP	ERL µg/kg p.s	240
Naphtalène	HAP	ERL µg/kg p.s	160
Pyrène	HAP	ERL µg/kg p.s	665
Phenanthrene	HAP	ERL µg/kg p.s	240
Dibenzothiophene	HAP	ERL µg/kg p.s	190
benzo(a)anthracène	HAP	ERL µg/kg p.s	261
chrysene (dont triphenylène)	HAP	ERL µg/kg p.s	384
Acénaphène	HAP	NOAA ERL µg/kg p.s	16
Acénaphthylène	HAP	NOAA ERL µg/kg p.s	44

Tableau 3 : Valeurs seuils EAC µg/kg 2,5 % TOC – PCB.

Substance	Famille	Sédiment seuil	Sédiment valeur seuil
2,3',4,4',5-P5CB (PCB 118)	PCB	EAC µg/kg 2,5% TOC	1
PCB 101	PCB	EAC µg/kg 2,5% TOC	3
PCB 138	PCB	EAC µg/kg 2,5% TOC	8
PCB 153	PCB	EAC µg/kg 2,5% TOC	40
PCB 180	PCB	EAC µg/kg 2,5% TOC	12
PCB 28	PCB	EAC µg/kg 2,5% TOC	2
PCB 52	PCB	EAC µg/kg 2,5% TOC	3
PCB totaux	PCB	EAC µg/kg p.s	12

Tableau 4 : Valeurs seuils ERL µg/kg p.s – Pesticides.

Substance	Famille	Sédiment seuil	Sédiment valeur seuil
DDE-4,4'	Pesticide	ERL µg/kg p.s	2,20
DDT total (somme DDT-4,4' + DDT-2,4' + DDE-4,4' + DDD-4,4')	Pesticide	ERL µg/kg p.s	1,58
DDT-2,4'	Pesticide	ERL µg/kg p.s	1
Hexachlorocyclohexane (tous les isomères, y compris lindane)	Pesticide	ERL µg/kg p.s	3

Nous présentons dans les résultats une **première interprétation avec ces valeurs seuils**, qu'il convient de prendre avec précaution en l'absence des résultats de granulométrie (analysée en même temps que la macrofaune benthique par STARESO ; analyses en cours de traitement). En effet, la composition des sédiments ainsi que la faune associée influent sur la teneur en contaminants pour une exposition donnée. Ainsi, parmi les facteurs naturels susceptibles de faire varier les concentrations en métaux trace d'un sédiment, la granulométrie est sans doute le plus important (Bouchoucha et al., 2018). Plus la taille des grains qui composent le sédiment est faible, plus sa surface par unité de masse est grande, et donc plus sa capacité à fixer les métaux présents dans le milieu est forte.

Tableau 5 : Code couleur des tableaux de résultats de la chimie des sédiments.

Interprétation
Aucun seuil existant
Seuil ERL/EAC existant
Valeur en-dessous du seuil ERL/EAC
Valeur au-dessus du seuil ERL/EAC

Le laboratoire Eurofins a calculé les concentrations en nitrates (NO₃) et nitrites (NO₂) solubles, l'azote Kjeldahl (NTK), l'azote global (NO₂+NO₃+NTK) pour un échantillon (Nice-Halietis).

Les **nitrites** constituent le stade intermédiaire entre les ions ammonium (NH₄⁺) et les nitrates. Peu stables en mer, ils n'y sont présents qu'en très faible concentration. Un pic de concentration serait le résultat d'un déséquilibre au niveau de l'oxygénation ou de la flore bactérienne des sédiments. Il n'existe pas dans la littérature de valeurs seuils pour les nitrites dans les eaux interstitielles des sédiments marins.

Les **nitrates** constituent le stade final de l'oxydation de l'azote. Dans des conditions d'oxygénation suffisante, l'ammonium est oxydé en nitrites, puis en nitrates par l'action de bactéries spécialisées. Les pollutions aux nitrates proviennent du lessivage des engrais et des rejets urbains et industriels. Les nitrates sont l'un des éléments nutritifs majeurs des végétaux. Leur présence associée aux autres éléments nutritifs, stimule le développement de la flore aquatique. De trop fortes teneurs en nitrates peuvent entraîner un développement excessif des végétaux marins et conduire à l'eutrophisation du milieu.

Il n'existe pas dans la littérature de valeurs seuils pour les nitrates et nitrites dans les eaux interstitielles des sédiments marins.

L'azote total Kjeldahl (NTK) est une appellation qui désigne la somme de l'azote ammoniacal et de l'azote organique. Les composés azotés mesurés par cette méthode proviennent principalement de la dégradation bactérienne des composés organiques provenant de l'azote. L'industrie alimentaire, les procédés de nettoyages industriels et l'épandage d'engrais sont aussi des sources importantes d'azote dans l'environnement.

Les valeurs seuils prises en compte pour l'azote total sont basées sur les valeurs seuils (exprimées en % sec) proposées par Licari en 1998 pour des sédiments marins très envasés (taux de particules fines > 60 %) :

Tableau 6 : Valeurs de référence pour l'azote total dans les sédiments marins – Données M. L. Licari 1998.

	Teneur faible	Teneur moyenne	Teneur forte	Teneur très forte
Azote Total (% MS)	<0,04	0,04 à 0,09	0,09 à 0,18	>0,18