

QUELQUES METHODES D'ETUDE DES ALGUES ENDOLITHES
ET DE LEURS GALERIES

par

Thérèse LE CAMPION

Station marine d'Endoume, rue Batterie des Lions, 13007 - Marseille.

SUMMARY : Inventory of different methods used in the study of boring algae and microborings

- Embedding-Casting method in polymerized resins to preserve endolithic algal structures in-situ.
- Experimental technique of the colonisation of transparent carbonate substrates (calcite, Iceland spars) planted in marine environment.
- Microborings quantitative estimate 1 - with transmitted light microscope : computation on uniforme surface (by transparency on calcite), transept method (thin section of the in-situ organisms after double imbedding technique) 2 - with Scanning Electron Microscope : computation on uniforme surface of the boreholes located at the rock surface, estimation of the bored substrate percentage by Weibel method.

Les algues endolithes localisées à l'intérieur d'un substrat carbonaté se prêtent difficilement à une étude directe. La méthode la plus couramment utilisée consiste à prélever des éclats rocheux de petites dimensions (environ 5 mm sur 5 mm) et à observer les algues isolées après calcification du substrat. La décalcification s'effectue généralement à l'aide du liquide de Pérényi (30 cc d'acide chromique à 0,5 %, 40 cc d'acide nitrique à 10 % et 30 cc d'alcool à 70° ou 90°), les éclats rocheux étant préalablement fixés au formol à 2 % ou à 3 % ; le liquide de Pérényi peut également jouer le rôle de fixateur. Cette méthode n'est pas entièrement satisfaisante car la dissolution du substrat entraîne la disparition des filaments et ne respecte plus leur position exacte dans la roche. On perd ainsi bon nombre d'informations concernant l'orientation, la répartition, la densité des végétaux endolithes et leurs relations avec les autres organismes perforants. D'autre part, les éclats rocheux et les coquilles, prélevés dans le milieu naturel, sont colonisés par un très grand nombre d'algues appartenant, le plus souvent, à des espèces différentes et à divers stades de développement, d'où des difficultés de détermination, d'interprétation et de comptage.

Pour améliorer cette méthode d'étude des végétaux endolithes, il était donc nécessaire, d'une part d'observer les algues *in-situ*, c'est à dire telles qu'elles sont réparties dans la roche, et, d'autre part, d'étudier des substrats faiblement colonisés par ces algues.

- L'étude des algues *in-situ* est maintenant réalisable grâce à la méthode de double inclusion d'un éclat rocheux dans une résine synthétique (GOLUBIC, BRENT et LE CAMPION, 1970 ; SCHNEIDER, 1973, 1976 ; LE CAMPION-ALSUMARD, 1976, 1978). Cette méthode qui permet d'observer les algues en place à la fois au microscope photonique, au microscope électronique à balayage et au microscope électronique à transmission, a permis de réaliser d'énormes progrès dans la connaissance des végétaux perforants.

- Pour pouvoir observer des substrats faiblement colonisés par les algues endolithes deux techniques sont utilisées : la première concerne la recolonisation de surfaces rocheuses préalablement dénudées, la seconde la colonisation de substrats naturels parfaitement transparents (calcite, spath d'Islande) placés dans le milieu marin. Cette étude expérimentale qui permet d'observer les organismes *in-situ* directement par transparence au microscope photonique et au microscope électronique à balayage (GOLUBIC, 1969 ; LE CAMPION-ALSUMARD, 1975 ; PERKINS et TSENTAS, 1976 ; KOBLUK et RISK, 1977) s'est révélé d'un grand intérêt pour étudier notamment la répartition de ces organismes et leur vitesse d'installation. Les détails de cette technique, telle qu'elle a été réalisée dans la région marseillaise, à partir d'éclats de calcite, sont donnés ci-dessous.

1. TECHNIQUE EXPERIMENTALE : COLONISATION DE CALCITE PLACEE DANS LE MILIEU MARIN :

Les séries expérimentales sont constituées d'éclats de calcite de petites dimensions (environ 2 cm de long sur 1 cm de large et 3 à 5 mm d'épaisseur) collés à l'aide d'une résine synthétique (araldite) sur des supports de plexiglass de 7 cm de long sur 5 cm de large et 4 mm d'épaisseur, assurant ainsi une parfaite transparence de l'ensemble. Sur chaque support sont fixés 6 à 10 éclats de calcite

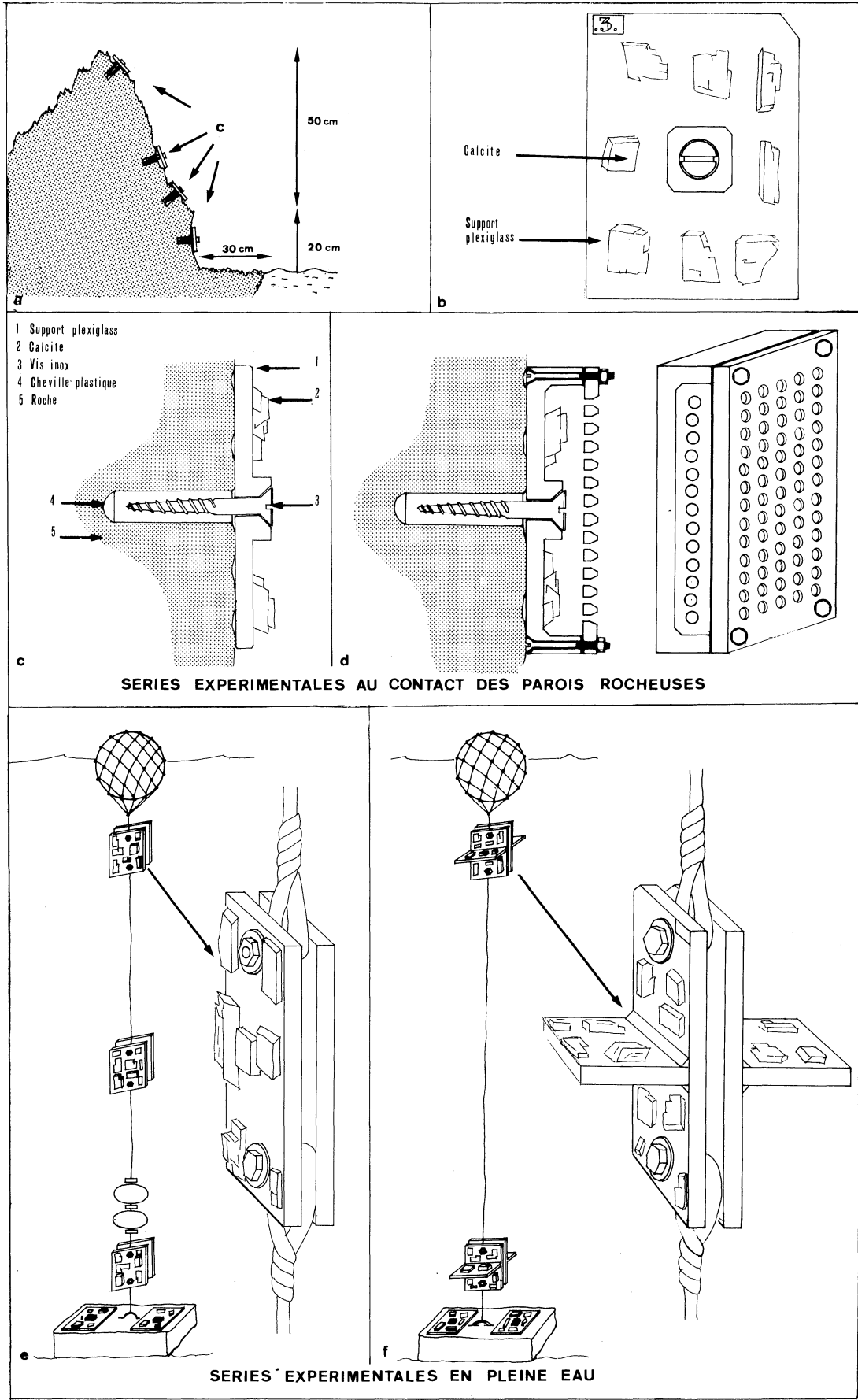


Figure 1

permettant le prélèvement régulier d'un éclat en vue d'observations plus poussées. Ces séries expérimentales sont placées, soit au contact des parois rocheuses, soit en pleine eau.

1a. Séries expérimentales au contact des parois rocheuses (fig. 1 a, b, c).

Les plaques de plexiglass (supportant les éclats de calcite) sont fixées contre les parois rocheuses à l'aide de vis en acier inoxydable ; il est préférable que le point d'ancrage soit situé au centre du support. Des trous préalablement creusés dans le rocher (à l'aide d'un petit marteau pneumatique actionné par une bouteille d'air comprimé) sont munis de chevilles plastiques destinées à recevoir les vis. Ce mode de fixation permet de retirer avec une grande facilité les plaques de plexiglass, d'observer les éclats de calcite par transparence au microscope photonique et de revisser le tout contre la paroi rocheuse. Il devient ainsi facile de suivre l'installation et l'évolution d'une population. Pour étudier l'impact des organismes brouteurs, des séries parallèles aux précédentes constituées des mêmes plaques (avec les éclats de calcite) mais munies d'un couvercle de plexiglass finement perforé ont été placées au contact des parois rocheuses (fig. 1d).

1b. Séries expérimentales en pleine eau (fig. 1 e, f).

Ces séries sont constituées d'un corps mort en béton, sur lequel est fixée une drisse en nylon maintenue verticale grâce à une bouée de surface et de petites bouées en profondeur afin d'éviter le frottement des dernières plaques sur le corps mort en période de forte pression atmosphérique. Sur cette drisse sont boulonnées deux à deux les plaques de plexiglass (supportant les éclats de calcite). Ces séries sont placées sur différents fonds plus ou moins éloignés de la côte. D'autres séries expérimentales destinées à étudier l'influence de l'orientation du substrat sont constituées de plaques de plexiglass, disposées perpendiculairement les unes par rapport aux autres et réparties à divers niveaux (fig. 1f).

2. ESTIMATION QUANTITATIVE DES MICROPERFORANTS :

L'estimation quantitative des microperforants s'effectue à l'aide de diverses méthodes soit au microscope photonique soit en microscopie électronique à balayage.

2a. Estimation quantitative en microscopie photonique.

2aa. Sur calcite, par transparence.

Comme on l'a vu précédemment les cristaux de calcite se prêtent facilement à une observation directe, les galeries étant visibles par transparence. Les dénombrements sont effectués à partir de 14 surfaces prises au hasard, chaque surface correspondant au champ microscopique (oculaire 10 x objectif 10), reproduit à la chambre claire et se présentant sous forme d'un rectangle de 1 500 μm de long sur 1 250 μm de large soit une surface de 26,25 mm^2 . On a choisi 14 surfaces de comptage afin d'éliminer les phénomènes de microrépartition. En effet, la distribution des algues est généralement de type agrégatif ($S^2/m \gg 1$), il est donc préférable de multiplier les échantillons de petite surface, plutôt que d'en observer un seul de grande taille (LAMOTTE et al., 1969).

2ab. Sur éclats rocheux inclus dans l'araldite (méthode de double inclusion).

Les côtes calcaires de la région marseillaise étant le plus souvent, constituées de calcaire urgonien parfaitement opaque, l'estimation quantitative des organismes perforants n'est donc plus réalisable par transparence. Elle s'effectue sur les organismes *in-situ* à partir d'éclats rocheux ayant subi une double inclusion dans l'araldite. Les comptages se font sur coupe épaisse, selon la méthode des transepts et les résultats sont alors donnés par unité de longueur. On peut également effectuer un comptage des filaments après décalcification d'une surface constante de substrat. Cette méthode est, cependant, imprécise et peu pratique, les algues endolithes étant très abondantes (on dénombre pour certaines espèces 800 000 individus/ cm^2), il est difficile d'obtenir des éclats rocheux suffisamment petits pour rendre les comptages fiables.

2b. Estimation quantitative en microscopie électronique à balayage.

Pour essayer de quantifier l'activité perforante des différentes espèces, les mensurations suivantes ont été effectuées sur les clichés obtenus au microscope électronique à balayage : plus grand diamètre des perforations à la surface de la roche, largeur et longueur des galeries, densité des perforants (c'est à dire nombre de perforations au cm²). Les dimensions moyennes, l'erreur standard des moyennes, le coefficient de variation ont été généralement calculés sur 100 individus.

2ba. Plus grand diamètre des perforations, largeur et longueur des galeries, densité des perforants.

- Les mesures relatives au diamètre des perforations à la surface de la roche sont effectuées à partir d'échantillons préalablement traités à l'hypochlorite de sodium et observés au microscope électronique à balayage après métallisation. L'hypochlorite de sodium, en éliminant les organismes perforants, ne laisse subsister que les galeries vides, dont les ouvertures à la surface de la roche sont facilement observables. Les mêmes clichés sont utilisés pour estimer le nombre de perforations au cm² et le pourcentage de roche perforée.

- Les mesures relatives au diamètre et à la longueur des galeries sont effectuées à partir d'échantillons rocheux inclus en totalité dans l'araldite puis décalcifiés (cf. méthode de double inclusion, LE CAMPION -ALSUMARD, 1976), il ne subsiste alors que le moulage des galeries dans l'araldite qui, après métallisation, peut être observé au microscope électronique à balayage.

2bb. Pourcentage de roche perforée.

- Le calcul du pourcentage de roche perforée, c'est à dire le rapport entre la surface des perforations et la surface totale de la roche est un bon critère d'estimation de l'intensité de l'activité perforante. Il tient compte, à la fois, de la densité des perforants et de la surface de perforations. Deux méthodes d'estimation quantitative sont généralement utilisées en cytologie (WEIBEL et al., 1966 ; SCHAEFER, 1970) soit le procédé par comptage différentiel de points soit le procédé par surfaces. Après avoir utilisé ces deux méthodes pour le

calcul du pourcentage de roche perforée sur des clichés identiques il s'avère que les résultats obtenus ne sont pas statiquement différents, les deux procédés donnent une estimation équivalente ; il est donc préférable d'adopter le comptage différentiel par points d'un emploi plus commode.

Il est ensuite possible d'établir des comparaisons entre les pourcentages (ou proportions) de roche perforée à l'aide des tests suivants :

- Test d'égalité de deux pourcentages. L'utilisation simultanée de la méthode exacte à l'aide de la loi hypergéométrique et des méthodes approchées de l'erreur standard (DAGNELIE, 1973, 1975) et de χ^2 avec correction de continuité (LISON, 1968), a donné, dans le cas présent, les mêmes résultats.

- Test d'égalité de plusieurs pourcentages. Ce problème a été traité par l'analyse de la variance après transformation angulaire des proportions (transformation $\text{arc. sin. } \sqrt{P}$) afin d'égaliser les variances. Les comparaisons, deux à deux, s'effectuent suivant la méthode de la plus petite différence significative, en utilisant le carré moyen résiduel (CM_R) comme estimation de la variance commune (DAGNELIE, 1973).

RESUME : Inventaire des différentes méthodes utilisées pour l'étude des algues perforantes et de leurs galeries.

- Méthode de double inclusion d'un éclat rocheux dans une résine synthétique permettant l'étude des algues *in-situ*.

- Technique expérimentale qui consiste à suivre la colonisation de substrats carbonatés transparents (calcite, spath d'Islande) placés dans le milieu marin.

- Estimation quantitative des microperforants - au microscope photomicroscopique : par comptage sur une surface constante (par transparence sur calcite), par la méthode des transepts (sur section des peuplements *in-situ*, après double inclusion dans l'araldite) - au microscope électronique à balayage par comptage du nombre de perforations à la surface de la roche, par calcul du pourcentage de roche perforée (méthode de Weibel).

BIBLIOGRAPHIE

- DAGNELIE P., (1973-1975) - Théorie et méthodes statistiques. 2vol. Gembloux, Presses agronomiques, 378 + 463 pp.
- GOLUBIC S., 1969 - Distribution, taxonomy and boring patterns of marine endolithic algae. *Amer. Zool.*, 9 : 747-751.
- GOLUBIC S., BRENT G. & LE CAMPION T., 1970 - Scanning electron microscopy of endolithic algae and fungi using a multipurpose casting - embedding technique. *Lethaia*, 3 : 203-209.
- KOBLUK D.R. & RISK M.J., 1977 - Rate and nature of infestation of a carbonate substratum by a boring alga. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, 27 : 107-115.
- LAMOTTE M., GILLON D., GILLON J. & RICOU G., 1969 - l'échantillonnage quantitatif d'Invertébrés en milieux herbacés, *in* Problèmes d'Ecologie : l'Echantillonnage des peuplements animaux des milieux terrestres. publié sous la direction de M. Lamotte et F. Bourlière, Masson et Cie., 1969, 303 p.
- LE CAMPION-ALSUMARD T., 1975 - Etude expérimentale de la colonisation d'éclats de calcite par les Cyanophycées endolithes marines. *Cah. Biol. mar. Roscoff*, 16 : 177-185.
- LE CAMPION-ALSUMARD T., 1976 - Etude préliminaire sur l'écologie et l'ultrastructure d'une Cyanophycée chroococcale endolithe. *J. Microscopie et Biol. cell.*, 26 (1) : 53-60.
- LE CAMPION-ALSUMARD T., 1978 - Les Cyanophycées endolithes marines : systématique, ultrastructure, écologie et biodestruction. Thèse d'état 198 pp. et 43 pl.
- PERKINS R.D. & TSENTAS C.I., 1976 - Microbial infestation of carbonate substrates planted on the St. Croix Shelf, West Indies. *Geol. Soc. Amer. Bull.*, 87 : 1615-1628.
- SCHAEFER A., 1970 - Les bases mathématiques de la microstéréologie. *Microskopion*, 18, 19 : 3-13
- SCHNEIDER J., 1973 - Biologische und anorganische Faktoren beim Abbau einer Kalkküste. *Habilitationsch.* Göttingen, 329 pp.
- SCHNEIDER J., 1976 - Biological and Inorganic Factors in the Destruction of Limestone coasts. *Contrib. Sedimentology*, 6 : 112 pp.
- WEIBEL E.R., KISTLER G.S. & SCHERLE W.E., 1966 - Practical stereological methods for morphometric cystology. *J. Cell. Biol.*, 30 : 23-38.