

Examen critique des méthodes d'estimation de la biomasse et de l'activité des microorganismes dans les systèmes aquatiques

A critical examination of present methods for estimating biomass and activity of microorganisms in aquatic environments

par Daniel J. Bonin, Marc Travers

Centre d'océanologie de Marseille (URA CNRS 41), Station marine d'Endoume, rue de la Batterie des Lions, 13007 Marseille (France)

Mots clés : *microorganismes aquatiques, méthodologie, biomasse, activité métabolique, croissance, production*
Key words: *aquatic microorganisms, methods, biomass, metabolic activity, growth, production*

RÉSUMÉ

Bonin Daniel J., Marc Travers, 1992 - Examen critique des méthodes d'estimation de la biomasse et de l'activité des microorganismes dans les systèmes aquatiques. *Mar. Life*, 2 (1) : 1 - 29.

Cette revue présente d'une manière critique la plupart des nombreuses méthodes employées actuellement en limnologie et en océanographie pour estimer l'abondance, la biomasse, l'activité, la production des microorganismes aquatiques : bactéries, champignons, microalgues, protozoaires et métazoaires microscopiques. La précision, la sensibilité, la facilité d'emploi, le coût de mise en oeuvre sont des qualités qui doivent être prises en compte. Mais bien souvent, dans les études de type écologique, l'adéquation entre une méthode et son milieu d'application est aussi déterminée par la physiologie, le type nutritionnel, la taille des microorganismes, la densité des populations et par la nature du milieu lui-même (eau ou sédiment). Une même méthode avec de légères variations de son protocole peut apporter des renseignements de nature différente : activité potentielle ou réelle, croissance réelle ou seulement apparente. En définitive, il n'existe aucune méthode idéale qui pourrait être considérée comme universelle, mais un champ très vaste de techniques dont chacune doit être choisie en toute connaissance et en fonction du but de l'étude et du problème initialement posé. De plus, comme les renseignements fournis par chacune d'elles restent obligatoirement partiels, il est conseillé de faire appel à plusieurs méthodes complémentaires.

ABSTRACT

Bonin Daniel J., Marc Travers, 1992 - A critical examination of present methods for estimating biomass and activity of microorganisms in aquatic environments. *Mar. Life*, 2 (1) : 1 - 29.

This critical review covers most of the numerous methods presently used in limnology and oceanography to estimate the abundance, biomass, activity and production of microorganisms (bacteria, microalgae, microscopic fungi, protozoa and metazoa) in aquatic systems. Accuracy, sensitivity, ease of use and cost are among the factors to be taken into account. However, in ecological studies, the appropriateness of a method is very often defined by the physiology, nutritional type and size of the organisms, and also by the nature of the environment, whether water or sediment. In addition, slight variations in the experimental procedure for a particular technique may alter the type of information provided (e.g. potential or actual activity, apparent or actual growth). In short, there is no perfect method which can be considered universal, but a large range of methods among which some have to be chosen with full consideration of their potential and according to the problem to be solved. Furthermore, the information provided by any one method is necessarily incomplete, and the use of several complementary techniques is therefore recommended.

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION

2. ABONDANCE DES MICROORGANISMES

2.1. Numérations

2.1.1. Numérations directes au microscope

2.1.2. Numérations par dilutions
accompagnées de cultures

2.1.3. Fluorescence des microorganismes

2.2. Biovolume

2.2.1. "Biovolume" global de l'échantillon

2.2.2. Volumes et volumes plasmiques
calculés à partir des dimensions
linéaires

2.2.3. Estimation du biovolume à partir
des surfaces projetées

2.2.4. Estimation du biovolume par analyse
au compteur électronique
de particules

2.3. Estimations globales de la biomasse

2.3.1. Filtrations fractionnées et masse
des particules par classes de taille

2.3.2. Dosage des éléments biogènes
(C, N et P) de la matière particulaire

2.3.3. Glucides, lipides, protéines et acides
désoxyribonucléiques

2.3.4. Contenu énergétique de la biomasse

2.4. Constituants spécifiques de la biomasse

2.4.1. Adénosine triphosphate et flavines
mononucléotides

2.4.2. Chlorophylle a et autres pigments
photosynthétiques

2.4.3. Constituants spécifiques
des bactéries et des champignons

2.4.4. Cytofluorimétrie en flux

2.4.5. Microanalyse aux rayons X

3. VIABILITÉ ET ACTIVITÉ MÉTABOLIQUE

3.1. Reconnaissance de la viabilité par coloration
vitale ou non vitale

3.2. Accumulation de l'INT-formazan
dans les cellules

3.3. Microautoradiographie

3.4. Rapports entre éléments ou molécules
constitutives des microorganismes

3.5. Augmentation de la fluorescence
après addition de DCMU

3.6. Rapports de certaines activités enzymatiques

3.7. Evaluation de l'activité métabolique
potentielle par mesure des activités
enzymatiques *in vitro*

3.7.1. Principes généraux

3.7.2. Lipases, protéases, glucidases

3.7.3. Nitrate réductase

3.7.4. Nitrogénase

3.7.5. Enzymes dégradant l'urée

3.7.6. Phosphatases et nucléotidases

3.7.7. Système ETS

3.8. Microcalorimétrie

4. CROISSANCE ET PRODUCTION

4.1. Echanges de molécules simples entre les
microorganismes et leur environnement

4.2. Mesure globale de la prise de substrats
marqués

4.2.1. Principe de la méthode

4.2.2. Mesures de potentiels

4.2.3. Mesures d'activités réelles

4.2.4. Concentrations croissantes
de substrats

4.2.5. Limites de la méthode des substrats
marqués

4.3. Fixation des éléments marqués
par des molécules particulières

4.3.1. Chlorophylle a et pigments vitaux

4.3.2. Acides ribonucléiques
et désoxyribonucléiques

4.3.3. Protéines

4.4. Fréquence des divisions cellulaires: indices
mitotiques

4.5. Suppression de l'action des consommateurs

4.5.1. Principe de la méthode

4.5.2. Filtrations sélectives

4.5.3. Dilutions

4.5.4. Inhibition sélective des métabolismes

5. CONCLUSIONS

6. RÉFÉRENCES

1. INTRODUCTION

L'étude de la productivité des eaux douces et marines ainsi que des transferts de matière qui se réalisent au sein des réseaux trophiques nécessite une connaissance de la biomasse et de l'activité de chacun des grands groupes de microorganismes libres : bactéries hétérotrophes, bactéries chimioautotrophes, cyanobactéries et microalgues photoautotrophes, champignons microscopiques, protozoaires et métazoaires microscopiques obligatoirement hétérotrophes par phagotrophie ou osmotrophie.

Or l'époque est révolue où l'on considérait la taille comme un critère important et suffisant de discrimination entre les bactéries et les autres microorganismes. Cela est tout particulièrement vrai dans les milieux oligotrophes où l'on observe, parmi les particules dont la taille est comprise entre le micromètre et quelques micromètres seulement, des représentants de tous les types nutritionnels (Sieburth *et al.*, 1978).

Par ailleurs, dans la plupart des écosystèmes naturels, il existe une proportion importante de particules non vivantes, d'origine organique, susceptibles d'être utilisées par les détritivores ou les diversivores et la nécromasse s'ajoute à la véritable biomasse au sein de la matière organique dosée selon des critères pondéraux (poids sec, charge en carbone ou en azote par exemple).

Il faut aussi parfaitement distinguer les mesures de type statique, qui ont trait à la biomasse, des mesures de type dynamique qui concernent l'activité métabolique, la croissance et donc la production: une forte biomasse n'est pas toujours accompagnée d'une production élevée et une forte activité métabolique n'est pas toujours associée à une croissance importante, d'où l'intérêt primordial des mesures de vitesse de renouvellement de la biomasse. Compte tenu de l'éventail taxinomique embrassé dans ce travail, il faut en outre préciser que le mot "croissance" revêt ici une acception assez large. Chez les organismes unicellulaires la croissance individuelle est généralement très limitée et se traduit rapidement et régulièrement par la multiplication des individus. Au contraire, chez les organismes multicellulaires, cet accroissement démographique n'intervient que périodiquement, tandis que la croissance individuelle est quasi constante et beaucoup plus importante que chez les unicellulaires. Dans ce cas il en résulte que la biomasse globale peut croître alors que la densité des populations diminue ou vice versa.

Les mesures de biomasse seules restent souvent insuffisantes pour donner une estimation réelle de la production, même si elles sont effectuées de manière répétitive dans le temps, du moins en milieu naturel, ou artificiel incomplètement contrôlé. Elles ne donnent qu'une information souvent déformée sur la croissance. En effet, l'évolution de la biomasse observée *in situ* est l'effet résultant,

d'une part de la croissance intrinsèque des organismes en nombre et en taille et, d'autre part, de leur diminution concomitante due à des causes multiples : sédimentation du plancton vers des couches d'eau sous-jacentes, autolyse, pour les bactéries notamment, et surtout, consommation par les organismes prédateurs situés à un niveau plus élevé dans la pyramide alimentaire.

Par ailleurs, les méthodes les plus fréquemment employées pour ces mesures de biomasse et de production sont souvent empruntées à d'autres disciplines qui les ont développées dans des buts différents de ceux de l'écologie et avec des conditions d'application bien précises et fort éloignées de celles rencontrées dans les milieux naturels (lesquels sont caractérisés par la présence simultanée d'un grand nombre d'espèces et de types nutritionnels, par une biomasse souvent réduite si on la compare à celle des milieux expérimentaux généralement pléthoriques et par une grande instabilité spatio-temporelle). Il en résulte une augmentation de l'erreur relative due à l'élévation du "bruit de fond" des mesures. Or il faut souligner que l'étalonnage, phase préalable à l'application de toute méthode, demande des conditions de reproductibilité qui ne sont atteintes que lorsque les systèmes biologiques sont simplifiés à l'extrême, donc souvent éloignés dans leur constitution et dans leur fonctionnement des écosystèmes naturels, par essence complexes, et chez lesquels il existe des relations mutuelles et des échanges permanents entre les diverses composantes.

Toutes ces difficultés avaient amené certains auteurs à une attitude très critique : ils se retranchaient derrière ces contraintes souvent contradictoires et pour eux insurmontables, pour nier la possibilité même de quantifier avec une garantie suffisante, l'intensité de la plupart des processus biologiques que l'on essayait de mesurer dans les milieux aquatiques. On pense aujourd'hui cependant que cette attitude de renoncement est excessive. Elle doit être revue notamment à la suite de l'amélioration des méthodes et de la création de nouveaux outils que l'on a mis récemment à la disposition des écologues de l'eau, qu'ils soient observateurs ou expérimentateurs.

Même si l'on résume l'évolution des idées aux concepts les plus récents, le sujet que nous abordons est en lui-même extrêmement vaste et, de ce fait, la bibliographie correspondante considérable. Par obligation, nous serons donc amenés à la limiter aux références jugées particulièrement importantes ou faciles d'accès. Le lecteur pourra trouver le principe, la description et l'origine des méthodes dont il sera fait mention dans les travaux de Stein (1973), Vollenweider (1974), Steedman (1976), Hellebust et Craigie (1978), Sournia (1978), Costerton et Colwell (1979), Falkowski (1980), Morris (1980), Raymond (1980), Platt (1981), Aminot et Chaussepied (1983), Leftley *et al.* (1983), Wetzel (1983), Fasham (1984), Hobbie et Williams (1984), Omori

et Ikeda (1984), Parsons *et al.* (1984), Karl (1986), Li (1986), Siegh (1987), Le Gal (1988), Bianchi *et al.* (1989), Furnas (1990), Riemann et Bell (1990). Même si la plupart de ces travaux portent sur les eaux océaniques et les écosystèmes marins, les applications de même que les protocoles décrits, au moins dans leurs principes, sont directement transférables à l'étude des eaux douces et saumâtres.

Mentionnons aussi que les méthodes d'étude des virus ne seront pas traitées ici puisqu'à moins de leur réserver un "règne" très particulier (celui des Archetista), on ne les considère pas habituellement comme de véritables organismes ou êtres vivants, mais seulement comme des sortes de systèmes incomplets, à la frontière du monde vivant et du non-vivant. Leur observation et leur dénombrement nécessitent la mise en oeuvre de techniques très délicates, aussi bien pour les colorer que pour les concentrer (Suttle *et al.*, 1991). Jusqu'à présent, seules quelques équipes de recherche hautement spécialisées ont travaillé sur les virus des eaux mais de tels travaux devraient se développer à l'avenir. En effet, les concentrations des virus dans les milieux aquatiques se révèlent beaucoup plus élevées qu'on ne l'a d'abord pensé, et suffisantes pour attaquer efficacement les microorganismes (Wiggins et Alexander, 1985) ou jouer un rôle trophique direct (Gonzalez et Suttle, 1993). Il devient donc indispensable de prendre en considération leur contribution à la lyse des bactéries et des microalgues (Bratbak *et al.*, 1990, Cochlan *et al.*, 1993) et leur rôle dans les grands équilibres trophodynamiques (Proctor et Fuhrman, 1991).

2. ABONDANCE DES MICROORGANISMES

La quantification des populations ou des peuplements peut être obtenue par simple dénombrement, en particulier lorsqu'on procède simultanément à l'identification taxinomique des organismes. Mais quand les dimensions de ceux-ci sont très variées, quand la composition spécifique n'est pas recherchée, ou simplement quand on désire gagner du temps, au risque de perdre de l'information, il convient de compléter ou de remplacer les dénombrements par des mesures de biomasse ou de parties caractéristiques de celle-ci.

La véritable biomasse est la masse de matière vivante ("matière fraîche", "poids frais" ou "poids humide") qui peut être simplement pesée après élimination de l'eau non constitutive. Elle peut aussi être facilement déduite du biovolume (volume de matière vivante) en particulier dans les milieux pélagiques puisque la masse volumique des êtres vivants y est presque constante et proche de celle du milieu environnant. Mais la proportion d'eau dans la matière vivante est si variable qu'il est souvent plus significatif de peser, après dessiccation dans des conditions standard, la matière sèche

("poids sec") ou, de préférence, si la proportion d'éléments squelettiques minéraux est notable, la matière organique sèche ou "poids sec sans cendres". Les cendres correspondent à la masse restante après élimination de la matière organique (Beers *in* Steedman, 1976).

Le poids de carbone organique, dosé après combustion à sec ou oxydation liquide, est un autre bon estimateur de biomasse qui représente environ la moitié de la matière organique sèche.

Puisque les rapports dits "de Redfield", modifiés par Richards (Redfield *et al.*, 1963) qui lient entre elles les quantités des principaux éléments biogènes C, N et P dans la matière organique vivante sont eux-mêmes relativement constants (106/16/1 en rapports atomiques ou 41/7,2/1 en rapports pondéraux), on peut aussi avoir une bonne image quantitative de la biomasse par le dosage de l'azote ou du phosphore organique.

On peut doser des constituants spécifiques, soit de la matière vivante, comme l'ATP, soit de catégories d'organismes tels les photoautotrophes, comme la chlorophylle a. Toutefois les rapports pondéraux entre ces molécules et le carbone organique ou la matière organique sèche sont très variables, de sorte que souvent ces composés constituent des estimateurs imparfaits de la biomasse; ils reflètent plutôt la vitalité ou la capacité de production des peuplements (Hallegraeff, 1977 ; Jonge, 1980 ; Moal *et al.*, 1987 ; Le Gal, 1988).

2.1. Numérations

2.1.1. Numérations directes au microscope

L'examen au microscope reste sans doute le moyen le plus naturel d'observer et de compter les particules fines présentes dans un échantillon d'eau. Cette méthode, cependant, est limitée par la taille des objets puisque le pouvoir de résolution du microscope optique s'arrête vers 0,1 μm . L'effet de halo autour des particules, dont l'importance relative est d'autant plus grande qu'elles sont plus ténues, nuit aussi à la définition des dimensions et au calcul subséquent des biovolumes et des biomasses. Cette méthode est également imparfaite par suite de l'aspect subjectif qui accompagne toute reconnaissance de microorganismes, de la difficulté d'apprécier par la seule observation leur viabilité réelle et de la fréquente impossibilité de distinguer, et donc de compter, les cellules réunies en amas ou masquées par les détritiques. Les actions physiques employées parfois pour dissocier les agglomérats, telles que la sonication, l'agitation ou les variations de pH, sont souvent la cause de la destruction de microorganismes qui ne sont plus alors pris en compte dans les numérations. S'y ajoute aussi la durée de ces observations oculaires qui amène de fait l'examen d'échantillons quantitativement réduits, d'où une moindre précision statistique des mesures et des dénombrements. D'autres biais proviennent aussi de

la destruction partielle de certains microorganismes ou au contraire du développement ultérieur d'autres microorganismes (bactéries) durant la période de conservation des échantillons si les fixateurs sont mal adaptés ou ont perdu de leur efficacité. Mentionnons cependant que la qualité de telles numérations a augmenté avec l'apparition déjà ancienne des aménagements concernant les microscopes optiques traditionnels (microscope inversé, lumière en contraste de phase, lumière polarisée, par exemple) et surtout un emploi devenu fréquent du microscope électronique (par transparence ou à balayage). La microscopie reste souvent la seule manière d'identifier avec une certaine précision les microorganismes qui constituent la biomasse ; c'est pourquoi elle est toujours pratiquée largement avec ou sans méthodes additionnelles (concentration par centrifugation, filtration ou sédimentation). Les descriptions correspondantes sont disponibles dans les traités de Stein (1973) et de Sournia (1978).

2.1.2. Numérations par dilutions accompagnées de culture

Il est maintenant bien reconnu que la méthode par observation directe des unicellulaires au microscope, malgré ses limites, est de loin préférable, pour l'examen de la microflore totale, aux techniques de dilutions suivies de cultures sur milieux solides ou liquides, avec détermination du nombre initial le plus probable de cellules ("Most Probable Number" des auteurs anglo-saxons, voir revue générale de Colwell, *in* Costerton et Colwell, 1979). Cette méthode est en effet fondée sur le postulat que tout germe viable est capable de croître sur un milieu considéré comme non sélectif. Or, tout milieu de culture, de par sa composition même, est plus ou moins sélectif et plus ou moins approprié à la croissance d'un microorganisme donné. De plus, les conditions physiques et chimiques (charge en sel, pH, concentration en O₂ notamment) permettant le développement, diffèrent également selon le microorganisme que l'on veut cultiver.

Compte tenu de la diversité considérable des caractéristiques physiologiques des microorganismes d'une part et des conditions physiques et chimiques des environnements naturels d'autre part, il est évident que l'on pourra avec des conditions culturales données, obtenir seulement la croissance d'une assez faible fraction de la population. Ce qui explique que l'on obtient avec cette méthode des nombres considérablement plus faibles, de l'ordre de 100 à 10 000 fois, que ceux déterminés par l'observation directe (Jannasch et Jones, 1959).

2.1.3. Fluorescence des microorganismes

Un progrès considérable a été accompli avec l'utilisation de la fluorescence émise par les particules vivantes, que cette fluorescence soit due à des molécules contenues dans les cellules elles-mêmes (autofluorescence) ou à des colorants capables de

fluorescence et qui se fixent sélectivement sur des molécules constitutives des cellules (fluorescence induite). Cette approche permet en effet, non seulement de différencier par examen microscopique en épifluorescence les grands types de cellules en fonction de la couleur de l'émission lumineuse, mais aussi de repérer au microscope, par leur brillance seule, des particules dont la taille trop faible ne permettait pas une distinction normale car située au-dessous de la limite de résolution des optiques habituelles (Daley et Hobbie, 1975 ; Daley, *in* Costerton et Colwell, 1979).

C'est ainsi que les algues riches en chlorophylle *a* et ne possédant pas de phycoérythrine fluorescent spontanément dans le rouge lorsqu'elles sont excitées par des rayons ultra-violets, tandis que celles qui possèdent de la phycoérythrine fluorescent dans le jaune ou l'orange. Ces caractéristiques sont maintenant couramment utilisées pour différencier les cyanobactéries de type coccoïde des petites algues eucaryotes qui coexistent dans de nombreux échantillons naturels de plancton provenant en particulier des eaux oligotrophes. Il est alors possible de déterminer les biomasses respectives de ces deux types de populations (Johnson et Sieburth, 1979 ; Waterbury *et al.*, 1979).

L'observation des bactéries de petite dimension a été facilitée aussi par l'emploi de fluorochromes qui se fixent sur les molécules d'acides nucléiques. L'orange d'acridine (Francisco *et al.*, 1973) a été très utilisé dans ce but il y a une quinzaine d'années. On tend à lui préférer aujourd'hui le DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole), spécifique de l'ADN, qui s'adsorbe moins que le premier sur les particules détritiques, présente une brillance supérieure et permet l'examen de bactéries au sein d'échantillons fixés par le formol, même après un temps assez long de conservation (Porter et Feig, 1980). Il existe également d'autres fluorochromes d'une qualité identique à celle du DAPI (Karl, 1986). Ces techniques, largement employées en biologie cellulaire, font constamment l'objet de recherches; il en résulte des progrès rapides qui concernent aussi bien la mise en oeuvre de nouveaux colorants que l'amélioration de leurs rendements par aménagement des sources d'excitation ou des capteurs d'émission de fluorescence.

L'immunofluorescence (Stanley *et al.*, *in* Costerton et Colwell, 1979) est une technique qui a commencé à être utilisée avec succès dans les études de type écologique. Elle permet de déterminer par fluorescence induite spécifique les microorganismes qui appartiennent à une espèce ou un type métabolique donné. Le principe en est le suivant: un animal de laboratoire répond à l'agression représentée par un antigène bactérien en synthétisant un anticorps que l'on retrouve dans son sérum. Cet anticorps peut être associé à un fluorochrome qui se fixe sélectivement sur les protéines (isothiocyanate de fluorescéine par exemple). Il sera alors possible

par épifluorescence de détecter au sein d'une population complexe, les seules bactéries appartenant au type qui a été à l'origine de la réaction antigénique. Cette démarche a surtout été employée jusqu'ici pour caractériser certains germes pathogènes et les indicateurs de pollution fécale, mais elle a eu aussi quelques applications de type écologique. C'est ainsi que l'on a pu déterminer le nombre de bactéries impliquées dans les processus de nitrification. Cette méthode, riche de promesses, devrait recevoir des applications multiples dans la caractérisation des microorganismes les plus divers (Bohlool et Schmidt, 1980).

2.2. Biovolume

2.2.1. "Biovolume" global de l'échantillon

La technique la plus ancienne, mentionnée pour mémoire, s'apparente à l'hématocrite. Elle est toujours employée pour apprécier rapidement le biovolume du zooplancton par exemple. Dans ce cas, l'échantillon a déjà été concentré par l'engin de collecte et correspond à des particules dont la dimension inférieure est environ celle du vide de maille de la soie du filet. Avec les petites particules il devient nécessaire d'accélérer la sédimentation par centrifugation. L'utilisation de gradients de densité permet aussi de séparer les grandes composantes de la population qui diffèrent suffisamment entre elles par leurs vitesses de sédimentation, elle-même fonction de la taille, de la forme et de la densité. De cette manière il devient possible de séparer et de quantifier les biovolumes respectifs correspondant à différents groupes d'organismes appartenant à des peuplements plurispécifiques (Guillard, *in* Sournia, 1978). Cette méthode présente l'inconvénient important d'englober dans l'évaluation la matière organique non vivante, voire même de la matière inorganique.

2.2.2. Volumes et volumes plasmiqes calculés à partir des dimensions linéaires

L'étude microscopique des organismes permet de mesurer leurs dimensions avec précision, y compris, en microscopie photonique, la dimension parallèle à l'axe optique. Il importe dans bien des cas de corriger les mesures en fonction des contractions subies par les organismes durant les traitements qui ont précédé l'observation. Le biovolume de chaque microorganisme peut alors être apprécié plus ou moins exactement, par assimilation à des combinaisons de volumes géométriques simples (Kovalá et Larrance, 1966).

Si les vacuoles occupent un volume important, comme c'est souvent le cas chez les Diatomées, le biovolume total est avantageusement remplacé par le volume plasmiqes de Lohmann (Smayda *in* Sournia, 1978; Hitchcock, 1983).

Divers modèles de régression, globaux ou calcu-

lés pour des catégories différentes d'organismes, ont été proposés pour déduire du biovolume mesuré les quantités de carbone ou d'azote présentes dans la biomasse (Verity *et al.*, 1992).

2.2.3. Estimation du biovolume à partir des surfaces projetées

Cette méthode s'appuie également sur l'examen optique de chacune des particules : il est en effet possible, toujours en théorie, de déterminer d'une manière approchée le volume à partir de la surface telle qu'elle peut être appréciée par l'observation au microscope optique ou électronique. Ce type de méthodes très lourdes à l'origine pour l'observateur a été considérablement amélioré par la mise-au-point de systèmes d'acquisition des mesures et de traitement d'images (Furuya, 1982 ; Estep *et al.*, 1986). Mais même dans ces conditions, l'estimation du volume à partir d'une surface reste approximative et plusieurs critiques ont été avancées. Outre les phénomènes de contraction signalés plus haut, il y a souvent juxtaposition, voire superposition sur les surfaces examinées, d'où une estimation par défaut. En microscopie optique, cette méthode n'est pas valable pour les cellules de trop petites dimensions pour les raisons déjà évoquées (existence de halo notamment). Il reste qu'elle peut être associée à d'autres techniques comme la détection de fluorescence (Sieracki *et al.*, 1985 ; Van Wambeke, 1988) et même l'autoradiographie (Douglas, 1984) et bénéficiera encore de très nombreuses améliorations.

2.2.4. Estimation du biovolume par analyse au compteur électronique de particules

Cette méthode introduite pour l'étude du plancton par Sheldon et Parsons (1967) a eu des applications très nombreuses durant ces vingt-cinq dernières années dans les domaines de l'océanographie, de la limnologie, de la physiologie végétale et dans la surveillance de nombreux systèmes expérimentaux ou aquicoles. Son avantage premier est qu'il est possible de déterminer, après étalonnage, le volume d'une particule avec le maximum de précision puisque le passage de la particule dans le système est à l'origine d'une variation de différence de potentiel proportionnelle à son volume. Il y a cependant des limites d'utilisation qui font que cette méthode n'est pas toujours parfaitement appropriée. Par exemple, il est difficile en pratique de mesurer le volume de particules dont le diamètre de sphère équivalente est inférieur à 0,5 μm , c'est-à-dire, en fait, un très grand nombre de bactéries ; cette méthode exige une adaptation pour son emploi en eaux douces, puisque le milieu porteur des particules doit être un électrolyte, ce qui nécessite un apport de sels pour élever la charge saline à 3 ou 5 UPS. Toutefois, cette altération de la charge osmotique du milieu peut retentir directement sur certaines

cellules qui, dans un premier temps, répondent à cette modification de la pression osmotique par une diminution de volume. Cette méthode est inadaptée lorsque l'on souhaite compter des cellules de diatomées formant des chaînes, puisque chaque chaîne est considérée comme une seule particule (voir revue de Sheldon, *in* Sournia, 1978).

Le principe de cette méthode peut d'ailleurs être transféré sur des systèmes adaptés à mesurer des particules de bien plus grandes dimensions que les algues du phytoplancton, comme du zooplancton ou des poissons. Les mesures peuvent même être réalisées *in situ* (Maddux et Kanwisher, 1965).

2.3. Estimations globales de la biomasse

Ces estimations globales, à l'exception des dosages de molécules disparaissant très vite après la mort, ne concernent pas seulement la biomasse mais l'ensemble de la matière organique particulaire, ou même de la matière particulaire totale. L'interprétation des données doit donc tenir compte de la nécromasse et des particules minérales. La limite supérieure de la fraction dite "dissoute" de la matière, considérée au sens large, a été longtemps fixée d'une manière assez arbitraire à 0,80 μm , puis à 0,45 μm ; cette fraction "dissoute" contient donc aussi des particules de très petites dimensions et du matériel colloïdal.

2.3.1. Filtrations fractionnées et masse des particules par classes de taille

La méthode de filtration sélective au travers de membranes filtrantes aux dimensions de pores bien définies peut être aussi utilisée pour déterminer la masse (dite "poids sestonique" en milieu pélagique) correspondant à une classe de particules dont les dimensions sont comprises entre celles des pores appartenant à deux filtres successifs dans la colonne de fractionnement. Cette méthode a eu un regain d'utilisation à partir du début des années 1970, lorsqu'il a été possible de disposer dans le commerce de membranes filtrantes parfaitement calibrées par perforation au laser. Une restriction de cette pratique réside dans le fait que les membranes perforées au laser sont constituées de matière organique et se prêtent donc mal à une analyse en aval qui demanderait une combustion de l'échantillon. Plusieurs auteurs (Brock, 1983 ; Li, 1986) attirent également l'attention des utilisateurs sur de nombreux biais qui peuvent interférer avec les résultats et que l'on a sans doute fortement sous-estimés jusque-là. La capacité de rétention d'un filtre dépend non seulement du volume des particules mais aussi de leur forme. En outre, des microorganismes sans paroi rigide ou sans squelette s'échappent au travers des membranes par amincissement de leur forme. D'autres éclatent sous l'action de la suction et de l'aplatissement sur le filtre. Des particules de dimension inférieure aux pores sont retenues sur le filtre par simple action électrostatique. De plus, tous

ces biais diffèrent selon la charge du milieu en particules, leur nature et leur dimension, la dépression ou la pression appliquée au système de filtration, si bien qu'il est impossible d'établir un protocole de correction général. Et ces difficultés sont d'autant plus grandes que les pores sont de plus petites dimensions. Des améliorations certaines ont été apportées avec l'utilisation de la filtration tangentielle ou d'appareillages mettant en jeu un flux inversé selon le principe de Dodson et Thomas (1964) amélioré par Hinga *et al.* (1979) ou une faible gravité (Sheldon et Rassoulzadegan, 1987). Enfin, on peut mentionner que les observations récentes de biomasses et de productions abondantes même chez des microorganismes picoplanctoniques de taille inférieure à 0,80 et 0,45 μm conduisent à utiliser maintenant des filtres dont les pores sont encore plus petits (0,30 ou 0,20 μm).

2.3.2. Dosage des éléments biogènes (C, N et P) de la matière particulaire

Plusieurs méthodes sont disponibles pour l'analyse quantitative de ces éléments; la plupart d'entre elles font appel à une combustion (Sakshaug *in* Morris, 1980 ; Parsons *et al.*, 1984) ; d'autres à une oxydation en milieu liquide (Raimbault et Slawyk, 1991).

Même si l'on connaît la marge d'erreur accompagnant les mesures, les interprétations écologiques qui en sont faites doivent toujours l'être avec prudence. D'une manière générale, tout d'abord, il faut bien réaliser que ce que l'on mesure est aussi directement lié à la capacité de rétention du filtre et dépend donc de toutes les imperfections dues à cette méthode de collecte et de concentration des particules. Avec le carbone, il ne faut jamais négliger la part additionnelle due aux précipités de carbonate de calcium. L'erreur ainsi apportée est d'autant plus élevée que l'on étudie des eaux littorales et calcaires ou riches en coccolithes par suite d'efflorescences de Coccolithophorides. Il semble donc préférable, avant toute analyse, de soumettre les filtres sur lesquels les particules sont rassemblées à des vapeurs de HCl qui réduisent cette fraction de carbone d'origine minérale. Pour ce qui est du phosphore, Nalewajko et Lean (*in* Morris, 1980) attirent l'attention sur la capacité de cet élément à constituer des précipités ou des colloïdes et donc à être retenu par les filtres. Il en résulte qu'une fraction souvent importante de phosphore n'appartenant pas à la biomasse est prise en compte dans les calculs.

D'autre part la minéralisation de la matière vivante à la mort des cellules n'est pas immédiate et l'on prend en compte également la fraction détritique d'origine organique dans le calcul de la biomasse. L'erreur ainsi apportée diffère selon que la charge en détritiques est élevée ou non. C'est ainsi que 90 à 100 % du carbone particulaire seraient directement liés à la biomasse dans de nombreuses eaux

eutrophes (parties des océans enrichies en surface par des remontées d'eau profonde chargées en sels nutritifs, lacs mésotrophes et eutrophes), alors que dans les grands fonds océaniques, ce pourcentage descendrait à moins de 1 %. L'azote et surtout le phosphore, qui sont dégradés plus vite que le carbone, sont cependant de ce point de vue, de meilleurs indicateurs de la véritable biomasse et l'étude des rapports C/N et C/P permet d'évaluer la part de cette dernière dans la matière organique particulière.

2.3.3. Charge en glucides, lipides, protéines et acides désoxyribonucléiques

Le dosage global de ces catégories de molécules constitutives apporte des résultats assez voisins de ceux fournis par l'analyse élémentaire, tout au moins dans les écosystèmes actifs (pour les méthodes, voir l'article de Moal *et al.*, 1985).

Mais ici aussi les résultats sont susceptibles de variations en fonction des pourcentages de matière détritique, des conditions de milieu et de la constitution même des peuplements.

Par exemple, on constate que les algues marines soumises à une faible intensité lumineuse ou une faible température compensent le ralentissement des réactions enzymatiques impliquées dans les processus de carboxylation en synthétisant un plus grand nombre de molécules d'enzymes ; il en résulte une augmentation de la charge en protéines par rapport aux autres molécules constitutives. Cette charge relative diminue au contraire lors de certaines carences du milieu en nutrilites : phosphates et surtout nitrates ou ammonium (Ganf *et al.*, 1986).

On a constaté aussi que la charge totale en lipides et leur qualité diffèrent selon la nature des espèces constituant la biomasse. C'est ainsi que chez les bactéries, les phospholipides restent à des taux sensiblement constants quelles que soient les influences de l'environnement et seraient donc de bons indicateurs de la biomasse (White *et al.*, in Costerton et Colwell, 1979). D'autre part, certains acides gras sont spécifiques de groupes précis de microorganismes (bactéries, différents types d'algues unicellulaires) et seraient donc de bons indicateurs de la présence ou même de la biomasse correspondant à ces groupes. Le degré d'insaturation des acides gras et la concentration en acides gras polyinsaturés des microorganismes peuvent aussi apporter une information sur la qualité de la nourriture transmise aux niveaux supérieurs. C'est pourquoi une grande attention est portée actuellement à l'analyse de ces molécules comme traceurs des transferts de la matière au sein des chaînes alimentaires (voir revue de Sargent *et al.*, in Sieigh, 1987).

L'analyse des concentrations en acides nucléiques est moins fréquemment utilisée que celle des protéines, glucides et lipides pour ces estimations de biomasse. Pourtant les méthodes de

mesure existent et l'une d'elles mettant en jeu la fluorescence est très sensible (voir Sakshaug, *in* Morris, 1980 pour les références correspondantes). Avec l'ADN comme avec les composés précédents, il persiste toujours une difficulté d'interprétation liée au fait qu'une partie de ces molécules reste associée aux particules même après la mort des organismes.

2.3.4. Contenu énergétique de la biomasse

C'est dans leur propre biomasse ou dans la matière organique consommée que les microorganismes trouvent l'essentiel de leur énergie de maintenance et de celle qui peut leur permettre de croître ou de se multiplier. Le contenu énergétique de la matière organique non vivante est très inégal, selon le niveau de dégradation atteint, mais celui de la biomasse des microorganismes reste assez constant, même s'il est en général un peu plus faible chez les autotrophes que chez les hétérotrophes. De leur poids de carbone organique ou de matière organique sèche on peut donc déduire approximativement la quantité d'énergie potentielle incluse dans les organismes sous forme biochimique.

Cependant le contenu énergétique de la biomasse ou de toute autre matière organique peut être mesuré de façon plus exacte, notamment après dessiccation, par combustion totale dans l'oxygène pur au moyen d'une bombe calorimétrique (Beers, *in* Steedman, 1976 ; Omori et Ikeda, 1984).

2.4. Constituants spécifiques de la biomasse

Pour se libérer des problèmes soulevés par la présence de matière non vivante, il suffit de doser des constituants strictement spécifiques de la matière vivante. Quelques méthodes vont dans ce sens, avec des succès inégaux.

2.4.1. Adénosine triphosphate et flavines mononucléotides

Les molécules d'ATP ont un rôle central et obligatoire dans les transferts d'énergie au sein du métabolisme. Elles sont présentes chez tous les organismes vivants et leur concentration diminue rapidement à la mort des cellules. Elles sont de ce fait davantage représentatives de la biomasse que ne le sont les composés précédents (Daumas et Fiala, 1969). Cependant la molécule d'ATP est assez stable chimiquement et peut perdurer quelque temps dans le milieu sous forme dissoute ; il n'est donc pas exclu, au moins dans certaines conditions, qu'une partie de cet ATP extracellulaire, dissous ou adsorbé sur des particules détritiques, soit retenu sur les filtres lors de la collecte des échantillons. De plus, les molécules d'ATP ne peuvent être considérées comme indicatrices de la biomasse que s'il existe un rapport sensiblement constant entre leur concentration et la biomasse mesurée par d'autres

méthodes. On a constaté que ce rapport ATP : C (poids ATP : poids de carbone cellulaire) est voisin de 1 : 250-300 chez les bactéries et le phytoplancton. Ce rapport est cependant susceptible de varier (Berland *et al.*, 1972). Il est légèrement supérieur chez les animaux et au contraire diminue fortement chez les algues unicellulaires et les bactéries lors de carences accusées en phosphore (Salaun et Bertru, 1987).

Les teneurs en ATP sont mesurées ou bien par la méthode devenue maintenant classique de Holm-Hansen et Booth (1966) qui s'appuie sur l'intensité de luminescence déclenchée par la réaction luciférine-luciférase (Strehler et Totter, 1952), ou bien par une méthode plus récente de chromatographie liquide à haute pression (HPLC). Plusieurs appareils ont été ainsi conçus spécialement pour ces analyses. La mesure de l'ATP, quoique assez lourde, est devenue commune aujourd'hui dans de nombreux laboratoires (voir revue très complète de Karl, 1980 et Amblard, 1986). L'emploi de la somme des adénylates (AMP + ADP + ATP) pour estimer la biomasse n'apporte pas d'information qualitativement très supérieure à ce qui est obtenu avec la mesure d'ATP seule, alors que le dosage est plus complexe (Romano, 1975).

Les flavines mono-nucléotides (FMN) sont des molécules qui interviennent comme intermédiaires dans les réactions d'oxydo-réduction et sont donc aussi rencontrées chez les cellules vivantes. Mais les travaux qui ont utilisé les FMN sont en nombre plus restreint que ceux portant sur l'ATP et l'absence de données concernant leurs concentrations chez un nombre suffisant d'espèces réduit assez fortement la possibilité d'utiliser cette approche méthodologique voisine de la précédente quant à son principe et ses finalités (Karl, 1986).

2.4 .2. Chlorophylle a et autres pigments photosynthétiques

L'inconvénient des mesures précédentes est qu'elles permettent difficilement de distinguer la biomasse appartenant à chacun des grands groupes trophiques : la mesure de la chlorophylle a, qui est présente chez toutes les microalgues et les cyanobactéries a été utilisée très tôt pour déterminer la part prise par les photoautotrophes dans la biomasse totale (voir Parsons *et al.*, 1984 pour la description des méthodes). Cette approche a été très progressive car les difficultés liées aux méthodes et à l'interprétation des analyses sont multiples : (1) la charge en chlorophylle a, et en pigments plus généralement, d'une biomasse végétale donnée, est susceptible de variations importantes qui dépendent des espèces présentes et des conditions de l'environnement : éclairage, température, carence en éléments nutritifs, etc. (Hallegraeff, 1977 ; Jonge, 1980) ; (2) les pigments dans une population naturelle sont variés (chlorophylles a, b et c, caroténoïdes, diverses xanthophylles, phycobilines) et

sont présents sous des formes considérées comme intactes ou au contraire dégradées (chlorophyllides, phéophytines, phéophorbides) ; il en résulte que, si l'on ne procède pas à une séparation préalable de tous ces pigments, il y a addition de ces différentes formes pigmentaires à la véritable chlorophylle a dans les mesures ; (3) les quantités de chlorophylles présentes dans un échantillon naturel, surtout dans les eaux oligotrophes, sont toujours faibles si on les compare à celles généralement utilisées en physiologie végétale et il en résulte quelquefois la nécessité d'utiliser des méthodes moins précises au plan qualitatif mais plus sensibles que celles utilisées par les fondamentalistes ; (4) les organismes qui possèdent de la chlorophylle a sont de taille et de structure variées dans la nature et il n'est pas certain que l'on puisse extraire tous les pigments présents dans les cellules de très petite dimension possédant une paroi. Cela est particulièrement vrai pour les cyanobactéries de type coccoïde, caractérisées par une très petite taille et une paroi de type bactérien, fortement résistante aux solvants et à la pression.

Deux méthodes fonctionnent sur le principe de la spectrophotométrie : celle dite trichromatique, de Richards et Thompson (1952), même si elle a été améliorée à plusieurs reprises, ne permet pas de distinguer la chlorophylle a complète de ses phéopigments. Par contre elle donne des indications utiles sur les concentrations des chlorophylles b et c. La méthode de Lorenzen (1967), dite monochromatique avec acidification, ne permet de mesurer que la concentration de chlorophylle a mais d'une manière plus précise puisqu'il est tenu compte ici des phéopigments. La méthode de dosage par fluorescence *in vitro* après extraction, de Yentsch et Menzel (1963), a l'avantage de rendre très sensibles les mesures de chlorophylle a, mais comme celle de Lorenzen, elle ne donne pas d'indication sur les teneurs en chlorophylles b et c. Il faut signaler que les mesures obtenues avec les deux dernières méthodes ne sont pas non plus sans erreur, car les autres pigments, et notamment la chlorophylle b, interfèrent avec les phéopigments de la chlorophylle a. Et l'artéfact qui en résulte est d'autant plus important que les algues appartenant aux Chlorophyta, qui possèdent de la chlorophylle b, sont plus abondantes dans l'échantillon. Cette dernière difficulté est en grande partie surmontée si l'on utilise des spectrofluorimètres (Neveux et Panouse, 1987). Ces derniers appareils ont cependant l'inconvénient d'être plus complexes, plus encombrants et plus onéreux que les fluorimètres classiques ; ils présentent une particularité, c'est qu'on peut y faire varier les longueurs d'onde, chaque ensemble de longueurs d'onde d'excitation et d'émission étant choisi pour être le plus possible caractéristique d'une forme de pigment donnée. On peut alors déterminer avec davantage de sécurité les proportions relatives des principaux pigments et de leurs produits de dégradation.

Même s'il ne permet pas de doser à proprement parler la chlorophylle a, on doit aussi mentionner le

principe de la fluorescence *in vivo* de Lorenzen (1966). Ce système de mesure est surtout pratiqué à l'heure actuelle pour une étude des concentrations de la chlorophylle *a* sur des eaux prélevées en continu le long de transects horizontaux ou sur des profils verticaux au sein de la colonne d'eau; il est alors possible d'étudier plus commodément et plus rapidement les répartitions spatio-temporelles de la biomasse constituée par les microalgues. Cette observation reste cependant approximative pour plusieurs raisons liées à la méthode elle-même : la première est que dans de nombreuses eaux marines et lacustres, on constate une fluorescence due à des substances dissoutes autres que les pigments photosynthétiques, laquelle constitue une source d'erreur par excès ; la seconde est que la fluorescence chlorophyllienne fluctue beaucoup chez les organismes en fonction de leur nature, des conditions d'éclaircissement et de température du milieu, de la charge en éléments nutritifs biogènes, de la concentration de certains toxiques dans les eaux considérées, etc. Mais cette méthode reste d'une grande précision lorsqu'elle est appliquée à des cultures d'algues unispécifiques parfaitement adaptées à leur environnement (Brand *et al.*, 1981). Il est aussi possible de mesurer la fluorescence due aux pigments chlorophylliens dans les tractus digestifs des petits animaux afin de mieux connaître leur régime alimentaire et leur capacité d'ingestion des microalgues (Mackas et Bohrer, 1976).

La spectrofluorimétrie *in vivo* de Yentsch et Yentsch (1979) est en quelque sorte une association des deux approches méthodologiques mentionnées précédemment. Sans correspondre à un dosage proprement dit, elle permet de définir ce que l'on appelle des signatures spectrales de fluorescence, compte tenu de ce que l'on sait des caractéristiques d'excitation et d'émission de fluorescence observées chez les algues en cultures unispécifiques ; il devient alors possible de déterminer les importances respectives des grands groupes de microphototrophes (Cyanobactéries et algues eucaryotes notamment) contenus dans un échantillon donné. Ces méthodes de fluorimétrie et de spectrofluorimétrie *in vivo* peuvent être associées aux systèmes optiques de détection de particules (microscopie en épifluorescence et cytofluorimétrie) et permettent donc de procéder à une numération discriminante des différents types de cellules.

C'est en définitive la chromatographie qui est la seule méthode analytique capable de séparer et de quantifier de manière fine les différents pigments. Les progrès récents réalisés dans ce domaine avec l'apparition de la méthode dite de chromatographie liquide à haute pression (= High Pressure Liquid Chromatography ou HPLC) ont augmenté considérablement la portée des analyses de pigments dans les milieux aquatiques (Mantoura et Llewellyn, 1983). En effet il devient alors possible de définir les importances relatives des principaux groupes d'algues unicellulaires, avec une sécurité encore accrue et sans avoir recours aux méthodes fasti-

dieuses d'observation des cellules au microscope ; toutefois cela reste plus difficile pour les populations de microalgues benthiques ; et, de ce point de vue, l'analyse des xanthophylles est particulièrement discriminante. Il est ainsi permis d'étudier la structure des écosystèmes en comparant les teneurs en chlorophylle *a* et celles de ses différentes formes dégradées (Vernet et Lorenzen, 1987) et le régime alimentaire des herbivores (Head et Harris, 1992).

Enfin, l'utilisation de la chlorophylle *a* eu récemment des développements d'une portée considérable avec la mise au point de sa mesure par télédétection à partir d'aéronefs ou de satellites artificiels basée sur la mesure et l'analyse du rayonnement rétrodiffusé et réfléchi. Les renseignements obtenus restent bien sûr approchés en valeur absolue puisqu'ils intéressent uniquement la partie supérieure de la colonne d'eau, mais l'obtention de telles données d'une manière pratiquement simultanée et sur de grandes étendues, apporte une vision holistique et tout à fait nouvelle de la répartition de la biomasse végétale sur les grandes aires océaniques (Sathyendranath, 1986 ; Aiken *et al.*, 1992), non sans difficultés d'interprétation (Ahn *et al.*, 1992).

2.4.3. Constituants spécifiques des bactéries et des champignons

On a assisté depuis une quinzaine d'années à plusieurs tentatives pour relier à leur biomasse les concentrations de constituants cellulaires particuliers à certains organismes, mais aucune d'entre elles n'a eu un succès comparable à celui de l'association entre charge en chlorophylle *a* et biomasse végétale.

L'acide muramique, par exemple, est un constituant essentiel de la paroi des cellules de procaryotes, mais son utilisation comme indicateur de la biomasse bactérienne vivante est rendue difficile à la suite d'une série de constatations (Moriarty, 1975 ; White *et al.*, in Costerton et Colwell, 1979) : tout d'abord la charge en acide muramique diffère fortement selon les organismes considérés ; c'est ainsi que les cyanobactéries et les bactéries Gram +, qui ont une paroi plus épaisse que les Gram -, en possèdent davantage pour des volumes cellulaires équivalents ; il est vrai que la plupart des bactéries rencontrées dans les milieux franchement marins sont des Gram - mais cette assertion ne vaut plus pour les eaux lagunaires dans lesquelles les Gram + constituent souvent une fraction importante des populations. Le taux relatif d'acide muramique, même au sein des Gram -, varie également en fonction de la taille moyenne des bactéries selon qu'elles sont prélevées dans des eaux eutrophes ou au contraire oligotrophes. La dégradation de l'acide muramique est aussi plus lente que celle des molécules fonctionnelles internes des cellules, ce qui limite encore l'intérêt de cette mesure pour caractériser la biomasse bactérienne, considérée par définition comme vivante. Enfin, pour un même échantillon, la teneur dosée varie assez fortement selon la

méthode d'analyse employée (enzymatique, colorimétrique ou directe par HPLC : voir revue de Karl, 1986).

La plupart de ces remarques valent aussi pour la mesure de la teneur en lipopolysaccharides (LPS) qui sont des constituants de la paroi cellulaire des bactéries Gram - uniquement (Watson et Hobbie, *in* Costerton et Colwell, 1979). La teneur en lipopolysaccharides chez une même population est également susceptible de variations en fonction des conditions de nutrition : elle est en effet plus élevée chez les bactéries cultivées sur des milieux riches en matière organique que sur des milieux plus pauvres.

Le poly- β -hydroxybutyrate (PHB) est un polymère trouvé chez la plupart des types bactériens vivant en aérobiose ou en anaérobiose facultative. Comme il s'agit d'un produit de réserve, sa concentration intracellulaire varie également en fonction des conditions nutritives et peut évoluer rapidement dans le temps. La teneur en PHB devrait donc être considérée davantage comme un indicateur général des contraintes subies par le métabolisme bactérien que comme une estimation de la biomasse elle-même (White *et al.*, *in* Costerton et Colwell, 1979).

Enfin, la chitine est un polymère de la glucosamine, commun à la plupart des champignons, mais elle constitue aussi la trame organique de l'exosquelette des crustacés. Ce point, associé au fait que la teneur en chitine varie également selon les espèces de champignons et les conditions de nutrition, diminue aussi l'intérêt de cette mesure lorsqu'elle est appliquée aux échantillons naturels complexes.

2.4.4. Cytofluorimétrie en flux

Certaines des limites d'utilisation rencontrées avec les méthodes mentionnées précédemment disparaissent si l'on emploie la cytofluorimétrie en flux. Son introduction en hydrologie et océanographie date des années 1980 seulement (voir revues de Shapiro, 1985 et Burkill, *in* Sieigh, 1987).

Dans le cytofluorimètre, les cellules maintenues en suspension dans un liquide, qui peut être leur milieu d'origine, sont entraînées dans un flux et passent successivement (et donc séparément) devant un rayonnement émis par un laser ou une lampe très puissante. Des capteurs situés dans l'axe de ce rayonnement ou dans des angles bien définis par rapport à cet axe, mesurent la diffusion due à la particule ; on peut en déduire l'ombre, donc la surface projetée de la particule, ce qui permet d'avoir des indications sur son volume et sa densité protoplasmique. Certains appareils sont équipés également pour mesurer électroniquement le volume (cf. 2.2.4.). De plus, une partie de l'énergie incidente accumulée par les particules est réémise sous forme de fluorescence dont la longueur d'onde et l'intensité sont spécifiques des molécules organiques qui ont été excitées. De ce fait il est possible d'utiliser

toutes les applications de l'autofluorescence et de l'immunofluorescence pour grouper électroniquement les informations relatives aux cellules en fonction de leur taille, de leur densité plasmique, de leur composition biochimique et même de certaines activités métaboliques.

Le grand intérêt de cette méthode réside donc dans le fait que les analyses ne sont plus globales mais qu'elles sont effectuées cellule par cellule et que, pour chacune de celles-ci, on dispose de renseignements concernant simultanément plusieurs variables. Il est alors possible d'associer les données dans des diagrammes bidimensionnels qui matérialisent les relations statistiques existant entre ces variables pour un nombre important de cellules.

Les appareils les plus perfectionnés sont capables aussi de trier physiquement les cellules en les chargeant électriquement (+ ou -) selon des choix établis d'après les indications qui ont été recueillies sur chacune des particules à partir des capteurs situés en amont. Il en résulte que les particules ainsi triées représentent tous les individus de la population possédant un ou plusieurs caractères en commun. Les cellules ainsi regroupées par ressemblance peuvent être repérées pour un examen au microscope, une mise en culture ou des traitements et analyses chimiques ultérieurs.

Il semble que la limite inférieure raisonnable de la mesure du volume, tout au moins pour les appareils existant actuellement, soit celle du compteur électronique de particules, soit 0,5 μm de diamètre de sphère équivalente (0,065 μm^3). En revanche, pour ce qui est des résultats relatifs aux mesures de fluorescence, cette limite inférieure n'est imposée que par la sensibilité des photomultiplicateurs qui évaluent la quantité de lumière de fluorescence, elle-même dépendante de la quantité de la lumière d'excitation, donc aussi de la puissance des lasers, si bien qu'il est possible aujourd'hui de caractériser les signatures de fluorescence pour des particules dont la taille est inférieure à 0,2 μm .

Avec ces systèmes il est possible de caractériser et de dénombrer d'une manière plus précise que par épifluorescence les cellules pigmentées capables d'autofluorescence, les bactéries et les débris sestoniques, et cela même si toutes ces particules ont des volumes similaires. Parmi les cellules autofluorescentes on peut aussi distinguer, et éventuellement trier, celles qui possèdent de la phycoérythrine, en particulier les cyanobactéries coccoïdes isolées, de celles qui n'en possèdent pas et qui appartiennent aux groupes des algues eucaryotes. C'est ainsi que l'on a pu apporter un début de réponse à la question encore posée récemment concernant les importances relatives de ces deux grands types de microorganismes photoautotrophes au sein de la colonne d'eau, en fonction de la profondeur et donc des conditions d'éclairement (Boucher *et al.*, 1991).

Sans doute les appareils actuels sont-ils onéreux à l'achat et à l'usage, et quelquefois volumineux,

surtout lorsqu'on les équipe de trieurs de particules ; ces derniers sont donc d'un emploi malaisé sur le terrain ; toutefois certains ont déjà été embarqués sur des navires océanographiques : leur utilisation est alors fort précieuse car elle apporte des informations exploitables presque immédiatement sur les distributions spatio-temporelles des principaux groupes de cellules (Oison *et al.*, 1985). On peut penser d'ailleurs que des progrès importants seront encore accomplis dans la conception des appareils (diminution de taille, augmentation des performances optiques, amélioration des calculateurs et des logiciels, réduction des coûts) qui faciliteront leur emploi et amèneront ce type de matériel à être utilisé par de nombreuses équipes de recherches (Cunningham, 1990).

2.4.5. Microanalyse aux rayons X

On doit aussi mentionner l'émergence de cette méthode ("energy dispersive X-ray microanalysis" des auteurs anglo-saxons), méthode qui devrait avoir de grands développements dans les prochaines années. Dans ses finalités, elle se rapproche de la cytofluorimétrie puisqu'elle permet de déterminer les caractéristiques constitutives de chacune des cellules étudiées et qu'elle s'affranchit ainsi des analyses globales d'échantillons, toujours accompagnées d'une perte importante d'information.

Le principe simplifié en est le suivant : les atomes contenus dans les particules exposées au faisceau du microscope électronique à transmission subissent un bombardement d'électrons. Ces électrons qui possèdent une énergie cinétique importante peuvent déplacer un électron appartenant à ces atomes vers une couche périphérique donc moins énergétique ; l'énergie ainsi libérée apparaît sous forme d'un rayonnement X dont la longueur d'onde correspond exactement à cette différence d'énergie, laquelle est étroitement caractéristique de la structure des atomes traversés. Par ailleurs, l'intensité du rayonnement, pour une longueur d'onde donnée, est fonction du nombre d'atomes de la même famille chimique qui ont subi cette transformation. Si l'on effectue au préalable un étalonnage à l'aide de particules de composition définie dont on connaît exactement la teneur en l'élément considéré, il est possible de déterminer la quantité d'atomes correspondant à cet élément dans la particule que l'on étudie et donc, par extrapolation, d'en définir la biomasse.

Cette méthode déjà fréquemment appliquée en biologie pour l'étude intracellulaire de certains tissus a reçu quelques applications en microbiologie. Des études comparatives ont été effectuées sur des cellules d'*Escherichia coli* avec des résultats remarquables même si les étalonnages, qui sont l'un des points clés de la méthode, restent délicats. Elle a fait l'objet d'adaptations à l'étude de populations bactériennes prélevées dans les milieux naturels (Heldal *et al.*, 1985) et s'annonce aussi comme un nouvel outil pour la description des communautés microbiennes.

3. VIABILITÉ ET ACTIVITÉ MÉTABOLIQUE

L'écologue utilise ces expressions, souvent associées à divers qualificatifs, sans définir toujours les concepts qu'il entend par ces appellations. Or il convient d'abord de distinguer : (1) l'état vivant des cellules, qui est déterminé par le maintien de structures fonctionnelles, sans autre indication sur l'intensité des processus vitaux à un moment donné ; (2) l'activité métabolique, qui devrait toujours impliquer une quantification et que l'on estime généralement par une transformation de la matière ou une croissance. Encore faut-il distinguer ce que l'on doit considérer comme une "activité réelle", qui est la vitesse de ces transformations telle qu'on l'observe *in situ* dans les conditions naturelles (ou tout au moins modifiées le moins possible par les systèmes mis en jeu pour l'obtention des mesures) et une "activité potentielle" qui exprime une capacité maximale, mesurée *in vitro* en optimisant artificiellement les vitesses métaboliques.

La confusion vient aussi du fait que plusieurs méthodes, selon leur sensibilité, leurs conditions d'application, ou la qualité des résultats obtenus, sont employées pour donner des indications appartenant à l'un ou l'autre de ces domaines et aussi de ce que, comme nous le verrons, les auteurs ne s'accordent pas toujours sur la nature même des informations apportées par chaque méthode.

3.1. Reconnaissance de la viabilité par coloration vitale ou non vitale

Certains composés colorés franchissent la membrane des cellules vivantes. D'autres au contraire ne peuvent franchir la barrière du plasmalemma et ne se fixent sur le matériel cellulaire qu'à sa mort. On devrait donc être à même de distinguer, au sein d'un ensemble de particules, la proportion de cellules "mortes" (et de détritiques) de celle des cellules considérées comme "vivantes".

C'est ainsi que des colorants comme le bleu de méthylène, le bleu trypan et le violet d'améthyste ne pénètrent dans les cellules que si la membrane est détruite. Au contraire, le diacétate de fluorescéine et le dibutyrate de fluorescéine sont absorbés par de nombreux champignons et bactéries hétérotrophes Gram +, durant leur croissance. Le composé absorbé activement est ensuite hydrolysé à l'intérieur du cytoplasme et la fluorescence ainsi démasquée est facilement détectée en épifluorescence.

Ces méthodes restent cependant aléatoires dans la mesure où la présence de la coloration (ou son absence) est variable. En effet, la capacité pour une cellule de prendre un composé dans le milieu diffère selon son activité métabolique (croissance active, dormance). Il en est de même pour sa capacité d'exclure les colorants considérés comme non vitaux. Dans tous les cas, la réponse dépend aussi de la concentration du colorant dans le milieu extérieur.

3.2. Accumulation de l'INT-formazan dans les cellules

Cette méthode s'appuie sur le principe de l'accumulation d'un composé dans les cellules, directement couplée à l'activité respiratoire, manifestation essentielle de la vie.

Les systèmes de transports électroniques respiratoires ("Electron Transport Systems" = ETS) sont en effet présents chez tous les organismes. On peut mesurer le potentiel maximum de transport électronique d'un échantillon total en ajoutant à l'extrait cellulaire un excès de substrat nécessaire au fonctionnement enzymatique et un accepteur d'électrons. On utilise le sel de tétrazolium ou INT qui est réduit sous l'action de ces systèmes en INT-formazan dosable. Cette méthode introduite depuis une vingtaine d'années en hydrobiologie est d'ailleurs fréquemment utilisée comme mesure de l'indice de la capacité respiratoire d'échantillons prélevés dans les milieux naturels (voir revue de Packard, 1985).

Il est possible d'associer la transformation de l'INT en INT-formazan par les cellules à une observation individuelle des microorganismes au microscope ; l'INT-formazan est en effet à l'origine d'inclusions cellulaires plus réfringentes, que l'on peut détecter. On peut aussi matérialiser davantage la présence de cet INT-formazan en l'associant à un colorant spécifique (vert malachite) détectable en épifluorescence (Dutton *et al.*, 1983).

Malheureusement l'intérêt de cette méthode est quelque peu diminué par diverses observations (Karl, 1986) : tout d'abord, la sensibilité assez réduite de la méthode, surtout en l'absence de vert malachite, ne permet pas un examen des microorganismes de très petite dimension ; ceci est un handicap certain car les particules de ce type sont abondantes. De plus, il est apparu que l'INT devenait lui-même un facteur inhibiteur de la croissance aux concentrations assez élevées généralement utilisées. Il en résulte un arrêt prématuré de l'accumulation de formazan dans les cellules dès le début des incubations, ce qui implique que ce composé apparaît en quantités suffisantes seulement chez les cellules qui possèdent une activité respiratoire très importante. Par conséquent, avec cette méthode, on tend à assimiler les cellules qui ont une activité respiratoire réelle, mais faible, à celles qui n'ont aucune activité. La proportion de cellules considérées comme vivantes est donc souvent sous-évaluée, ce qui compromet sérieusement l'utilisation de cette méthode pour la plupart des études de type écologique.

3.3. Microautoradiographie

Le principe de cette méthode s'appuie sur l'absorption par les cellules de produits nécessaires au métabolisme et que l'on a marqués au préalable avec des éléments radioactifs émetteurs de rayonnement β . Les cellules enrichies en produits radioactifs sont à l'origine d'un noircissement lorsqu'on met la préparation en contact avec une émulsion sensible contenant des sels d'argent. Cette méthode

permet même une première quantification de cette absorption par examen des dimensions de la tache ou du nombre de "grains" qui se sont formés sur la plaque sensible. Plusieurs techniques ont été développées (autoradiographie "de densité de grain" et autoradiographie "de trace"). Chacune d'elles possède des avantages et des inconvénients qui lui sont propres (Descolas-Gros, 1980).

L'intérêt de l'autoradiographie par rapport aux méthodes mettant en jeu de simples colorants est que l'activité qui est ainsi détectée est directement dépendante du type trophique des organismes et de leurs besoins en molécules particulières. Ainsi les photoautotrophes et les bactéries autotrophes pour le carbone, fixeront le ^{14}C du bicarbonate marqué et seront donc différenciés des hétérotrophes ; l'hétérotrophie peut, elle aussi, être caractérisée par l'absorption de composés organiques simples (glucose ou acides aminés) marqués au ^3H ou au ^{14}C . Le ^3H a une activité spécifique supérieure à celle du ^{14}C . Il en résulte qu'il apporte une plus grande sensibilité aux mesures, mais en contrepartie une exigence particulière de protection. D'autres éléments comme le ^{32}P , le ^{32}Si , le ^{71}Ge , ^{36}Cl ou le ^{35}S sont employés pour détecter d'autres besoins ou métabolismes.

Dans toutes ces interprétations, il faut cependant tenir compte des points suivants : (1) la radioactivité apparente de la particule dépend de l'absorption du produit marqué par cette particule mais aussi de son adsorption sur les surfaces, ce qui implique que l'on puisse vérifier que la radioactivité observée est bien associée à des organites internes ; (2) elle diffère aussi en fonction de la charge en produits radioactifs dans la solution et plus exactement du rapport qui existe entre les concentrations de l'isotope radioactif et de l'isotope stable du même élément dans le milieu d'incubation ; (3) elle est la conséquence de deux processus inverses qui sont, d'une part, l'introduction de l'élément dans le métabolisme et, d'autre part, son élimination partielle de la cellule avec les produits de respiration, d'excrétion et d'exsudation ; or, la fixation et l'élimination de l'élément radioactif ne sont pas toujours simultanées ; (4) elle traduit une fonction du métabolisme qui peut être perturbée par le fait que les échantillons sont confinés dans des récipients pendant l'incubation ; (5) non seulement la radioactivité dépend du temps d'incubation, mais encore cette relation est généralement non linéaire ; (6) on constate aussi que la forme, le volume et la structure des cellules retentissent sur la réponse ; (7) enfin, il y a souvent une perte importante de molécules marquées au sein des cellules, ou un déplacement de ces molécules au moment de la concentration qui précède leur examen. Cela est particulièrement vrai avec le tritium.

Des améliorations récentes de ce type de méthodes doivent être mentionnées. On peut, par exemple, associer l'autoradiographie à la détection par fluorescence : en microscopie (Douglas, 1984) ou en cytofluorimétrie (Li, 1986). Son utilisation

conjointe à un traitement d'image est réalisable. Avec la conjonction de ces deux techniques, il est possible de déterminer parmi les membres d'un même groupe trophique, et qui diffèrent par d'autres caractéristiques (taille, forme, présence ou non de certains pigments, etc.) les microorganismes qui sont actifs (en termes d'absorption de l'élément considéré) de ceux qui ne le sont pas ou le sont moins. Rivkin et Seliger (1981) ont mesuré la radioactivité émise par chacune des cellules phytoplanktoniques d'un échantillon incubé dans du bicarbonate marqué au ^{14}C en utilisant directement la scintillation liquide. Dans ce cas, la mesure de l'émission due à chacune des particules est plus fine qu'une autoradiographie globale, mais cet emploi reste limité à l'examen de particules d'assez grande taille et semble encore inapplicable à l'étude des bactéries.

3.4. Rapports entre éléments ou molécules constitutives des microorganismes

Pour que la composition chimique d'une population microbienne soit constante, il faut que deux conditions soient remplies : la population doit être homogène et elle doit se développer dans des conditions qui restent semblables au cours du temps. Ces conditions sont remplies en culture continue mais sont rarement rencontrées dans la nature qui est caractérisée, au contraire, par une grande variabilité spatio-temporelle des facteurs influençant la croissance (voir revue de Harris, 1984). Par ailleurs, dans une population complexe "mesurée globalement", on analyse toutes les particules, y compris donc les détritiques dont la composition retentit directement sur les résultats d'ensemble. Malgré ces difficultés de départ on a essayé d'utiliser certains rapports pour caractériser "l'état physiologique" d'une population, notion souvent mal définie puisqu'elle peut être considérée par certains comme une première approche de la vitesse de croissance de la biomasse totale ou, par d'autres plus prudents, comme un indicateur, d'ailleurs assez vague, des relations trophiques existant entre les différents composants de l'écosystème. De plus, les résultats obtenus par cette approche chimique (ou biochimique) sont de valeur très inégale selon les éléments ou molécules considérées (Madariaga et Joint, 1992).

C'est ainsi que le rapport N/P de la biomasse a été utilisé comme un indicateur des carences relatives en azote et en phosphore. Mais les résultats obtenus doivent être interprétés avec prudence. En effet, le rapport, à un moment donné, est le reflet d'une situation nutritive antérieure qui est intégrée par la population. D'autre part, il conviendrait d'insérer dans ce rapport les fractions particulières organiques seulement et non la charge totale en azote et en phosphore, qui tient compte aussi des fractions minérales présentes dans les cellules au moment de la fixation des échantillons. Si, pour

l'azote, la fraction minérale est faible comparée à la fraction organique, il n'en est pas de même pour le phosphore puisque les phosphates peuvent être accumulés en grande quantité, par les microalgues comme par les bactéries, sous forme de polyphosphates insolubles. Il en résulte une grande variabilité du rapport N/P qui a donc diverses origines et n'est pas toujours le reflet de la seule charge en molécules organiques azotées et phosphorées.

Cette difficulté d'interprétation se rencontre aussi avec les rapports C/N et C/P. Ces rapports tendent naturellement à s'élever lorsqu'apparaissent des carences en azote ou en phosphore mais, pour des conditions nutritives identiques, ils présentent aussi des variations en fonction de l'éclairement et de la température. Le rapport initial de Redfield, C :16 N :1 (at : at) ne serait atteint que pour des valeurs élevées de croissance spécifique ($\mu > 90\% \mu_{\text{max}}$) (Goldman *in* Falkowski, 1980). Mais les μ_{max} fluctuant assez fortement en fonction de la température et de l'éclairement, une analyse élémentaire ne peut en aucun cas donner une première approximation de μ/μ_{max} , à moins que l'on puisse connaître les μ_{max} des populations, c'est-à-dire que l'on ait procédé à des études préalables en culture sous diverses conditions de lumière et de température. Cela limite considérablement l'intérêt de cette approche indirecte et la rend pratiquement inutilisable lorsque l'on étudie des populations complexes qui, de plus, changent avec le temps.

En effet, les rapports C/N et C/P varient beaucoup selon les espèces considérées, la charge en carbone étant bien supérieure lorsque les algues possèdent des parois cellululosiques par exemple, ce qui oblige bien souvent à faire également une analyse qualitative des populations.

C'est pourquoi on a envisagé assez tôt d'utiliser des rapports plus directement liés à l'activité potentielle. L'un de ceux très fréquemment étudiés aujourd'hui est celui présenté par Bomsel et Pradet (1967) et Atkinson (1968, 1971) qui donne la charge énergétique des adénylates et qui est le suivant :

$$\text{ECa (mole/mole)} = [\text{ATP}] + 1/2 [\text{ADP}] / [\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}]$$

Ce rapport matérialise le taux des liaisons phosphates au sein du complexe des adénylates possédant une ou deux liaisons phosphates à haute énergie. On constate que ce rapport décroît lorsque le taux de croissance diminue. Mais il peut présenter des variations notables selon les organismes considérés (il tend à être plus faible chez les photoautotrophes que chez les hétérotrophes) il est aussi susceptible de variations en fonction des rythmes nyctéméraux ; dans l'absolu il est un effet résultant des concentrations respectives des AMP, ADP et ATP, elles-mêmes dépendantes de diverses activités métaboliques n'intervenant pas toujours dans le même sens. Cependant son utilisation intensive a permis d'assez bonnes comparaisons des potentiels de croissance de populations microbiennes préle-

vées dans différentes conditions trophiques aussi bien dans les eaux douces que dans les eaux marines.

D'autres rapports sembleraient plus directement liés au taux réel de croissance. Davis et White (1980) préconisent le rapport adénosine/ATP. Karl (1986) conseille le rapport guanosine triphosphate/ATP pour les populations bactériennes.

D'autres rapports de concentrations de molécules constitutives ont été utilisés dans des buts bien précis. On peut mentionner les taux chlorophylle *a*/chlorophyllides et chlorophylle *a*/phéopigments qui donnent respectivement une première estimation du vieillissement de la population végétale et de sa consommation par les herbivores. De même, les taux d'acides gras en C18, en C20 ou en C22 donnent une indication sur l'origine de la matière et les transferts au sein de la chaîne alimentaire entre les producteurs primaires, les herbivores et les carnivores (Ceccaldi, 1981 ; Sargent *et al.*, in Siegh, 1987) : il existe en effet une tendance générale des organismes situés plus haut dans la pyramide alimentaire à synthétiser des acides gras de plus en plus longs. Ainsi les acides gras du phytoplancton ont des chaînes assez courtes, de l'ordre de 18 atomes de carbone et les herbivores ont la faculté d'allonger ces chaînes jusqu'à 20 C alors que les poissons qui se nourrissent de ces herbivores augmentent encore la longueur des chaînes et la proportion d'acides gras en C22 y est plus élevée que dans les niveaux inférieurs. D'autre part, le rapport entre les glycolipides polaires associés aux biomembranes et les triglycérides souvent accumulés comme réserves donnent également une première indication de la capacité de croissance de la biomasse étudiée.

3.5. Augmentation de la fluorescence après addition de DCMU

Le DCMU (3(3,4-dichlorophényl)-1, diméthylurée) est un herbicide qui arrête la croissance végétale en s'opposant au transfert des électrons du photosystème II au photosystème I chez les organismes photosynthétiques qui possèdent deux photosystèmes (c'est-à-dire tous les végétaux eucaryotes et les cyanobactéries). L'énergie ainsi immobilisée est libérée spontanément en quelques secondes, sous forme d'une fluorescence qui vient s'ajouter à la fluorescence naturelle (F_i) accompagnant toute photosynthèse. Cette augmentation de la fluorescence ($F_{DCMU} - F_i$) sera d'autant plus importante que la fluorescence initiale F_i est plus faible ; or une fluorescence faible (pour une quantité de chlorophylle donnée) est précisément le signe d'une bonne transmission des électrons entre les deux photosystèmes, donc d'un bon transfert de l'énergie entre les réactions claires et les réactions sombres de la photosynthèse, et d'une activité photosynthétique initiale importante, ce qui traduit aussi un bon état physio-

logique des cellules, lui-même lié à un environnement favorable (Samuelsson et Oquist, 1977).

L'action du DCMU peut être analysée à deux fins : tout d'abord, F_{DCMU} permet de mieux apprécier la charge en chlorophylle que F_i . En effet, pour une même quantité de chlorophylle, F_i varie grandement avec les conditions du milieu alors que les variations de F_{DCMU} sont nettement moins marquées.

Un autre emploi, plus fréquent, du DCMU consiste à comparer directement F_{DCMU} et F_i ; on constate en effet que le rapport $F_{DCMU}-F_i/F_{DCMU}$ présente une bonne corrélation avec la production photosynthétique réelle (mesurée par les méthodes classiques de la fixation du CO_2 marqué au ^{14}C ou par la libération d'oxygène), tout au moins lorsque ces études sont effectuées sur des cultures unispécifiques. On doit cependant remarquer que cette correspondance diffère là aussi en fonction de l'espèce considérée et des conditions de l'environnement.

En fait, il semblerait que, sous des éclairagements réduits ne permettant pas la production optimale, ce rapport soit davantage indicatif de la production potentielle que de la production réelle. Des divergences apparaissent aussi au long du cycle nycthéral et les interprétations doivent toujours prendre en considération la situation nutritive antérieure de la population. De telles estimations indirectes ne peuvent donc être que semi-quantitatives et demanderaient même, lorsqu'elles concernent des populations unispécifiques, de véritables "échantillonnages préalables".

Même s'il est difficile de donner la signification précise de ce rapport, il reste qu'une valeur élevée, se rapprochant de l'unité, indique une population en croissance active. Une valeur faible, au contraire, que Cullen et Renger (1979) situent au-dessous de 0,25, est révélatrice d'une mauvaise efficacité photosynthétique, qui est souvent le reflet de carences nutritives ou d'une perturbation du métabolisme liée à une action toxique du milieu (voir revues de Prézélin, in Platt, 1981 et Leftley *et al.*, 1983, pour l'évolution des concepts liés à l'emploi du DCMU).

Malgré ses nombreuses imprécisions, cette démarche reste commode lorsque l'on veut comparer l'état physiologique des populations soumises à de très forts gradients spatio-temporels. En effet, comme elle s'appuie sur les mesures de fluorescence avant et après passage au DCMU, il est possible d'effectuer des mesures en continu sur des transects horizontaux ou des profils verticaux. Dans ce cas l'eau prélevée par une pompe est partagée en deux flux distincts, passant chacun au travers d'un fluorimètre : le premier est analysé directement, sans aucun apport, et donne F_i ; le second reçoit en permanence, avant le passage dans le deuxième fluorimètre, une solution de DCMU et fournit F_{DCMU} . L'emploi du DCMU a été aussi associé à d'autres techniques comme la cytofluorimétrie en flux (Furuya et Li, 1992).

3.6. Rapport de certaines activités enzymatiques

Le rapport entre l'activité de diverses enzymes impliquées dans le métabolisme peut aussi donner des indications sur l'état physiologique d'une population. C'est ainsi que l'on a envisagé d'utiliser le rapport observé dans les échantillons de plancton entre la ribulose-biphosphate-carboxylase (RuBPCase) et les β -carboxylases.

La première est directement impliquée dans la fixation du carbone sur les squelettes carbonés au sein du cycle des pentose-phosphates (Cycle de Calvin-Benson). Les secondes, contrairement à l'enzyme précédente, sont à l'origine de molécules en C4 (oxalo-acétate et malate). Elles sont de plusieurs types : phosphoénolpyruvate-carboxylase ; phosphoénolpyruvate-carboxykinase, pyruvate-carboxylase. Mais leur activité relative par rapport à celle de la RuBPCase peut être matérialisée d'une manière plus élégante par l'étude du rapport entre les deux isotopes $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ au sein du végétal. Le métabolisme en C4, même si sous cette appellation on doit considérer différents types de transformations, a l'avantage pour les cellules de diminuer les pertes d'énergie associées à la photorespiration (voir revue de Kremer, *in* Platt, 1981).

Chez de nombreuses algues, il y a une adaptation métabolique qui consiste à augmenter la part de ces β -carboxylations lorsque les conditions de nutrition et d'éclairement deviennent plus sévères. C'est ce qui se produit en particulier lorsque des cellules en culture atteignent la phase de plateau. C'est pourquoi Morris (*in* Falkowski, 1980) a pensé que le rapport des activités des deux types d'enzymes pouvait constituer un indice global de l'état physiologique (indicateur de carences) de populations végétales. Malheureusement il a constaté aussi que cette potentialité, si elle existe chez la plupart des algues, diffère fortement selon les espèces.

De plus, les β -carboxylases interviennent également en aval du métabolisme dégradatif (respiratoire) et d'autres auteurs estiment que les β -carboxylations sont aussi une indication de l'activité hétérotrophe. On a ainsi retrouvé une forte activité de carboxylases chez les Dinoflagellés, ce qui traduirait une potentialité hétérotrophe importante chez ces organismes (Descolas-Gros et Oriol, 1992). Il en résulte que cette approche est difficilement applicable à des populations complexes.

Une autre observation relève d'un principe voisin. L'azote est incorporé dans les squelettes carbonés sous forme d'ammonium, que celui-ci provienne directement du milieu périphérique ou qu'il résulte de la réduction d'autres espèces chimiques (nitrates, nitrites et azote moléculaire) ; deux systèmes enzymatiques sont impliqués dans cette incorporation : la glutamate-deshydrogénase (GDH) et le couple d'enzymes glutamine-synthétase/glutamine-2-oxyglutarate-aminotransférase (GS-GOGAT).

Même si le système GDH a été le premier mis en évidence, on s'est aperçu qu'il n'intervenait que sur une fraction de l'ammonium assimilé. Par ailleurs, le système GS-GOGAT interviendrait pour l'essentiel dans cette assimilation et cela dans la plupart des conditions. En effet, le système GS/GOGAT a sur le système GOH deux gros avantages : il fonctionne avec une moindre demande d'énergie et possède une plus grande affinité pour le substrat. On doit donc aussi admettre a priori qu'une diminution du rapport des deux activités GDH/GS-GOGAT, si elle est constatée, signifie que les algues se sont adaptées pour tirer le meilleur parti des conditions ambiantes (diminution de l'éclairement ou de la disponibilité en azote du milieu, par exemple) et donc que la production végétale pourrait être limitée par de mauvaises conditions d'environnement.

Cependant, là aussi et encore plus que dans le cas des β -carboxylases, nous manquons d'informations sur les importances respectives de ces deux systèmes enzymatiques chez les principaux composants du phytoplancton et sur les variations de ce rapport avec un changement des conditions de l'environnement. Il ne peut donc être utilisé avec une garantie suffisante lors de l'examen des populations naturelles. Il reste aussi que les mesures des activités de ces enzymes sont loin d'être aisées, particulièrement dans les eaux où la biomasse végétale est réduite (voir revue générale de Syrett, *in* Platt, 1981).

3.7. Evaluation de l'activité métabolique potentielle par mesure des activités enzymatiques *in vitro*

3.7.1. Principes généraux

La mesure *in vitro* de l'activité d'enzymes extraites du matériel particulaire apporte une information sur l'existence potentielle de transformations métaboliques au sein des échantillons. L'intérêt de cette approche est qu'elle se réalise après la fixation du matériel et sa conservation à de très basses températures, ce qui présente un double avantage : tout d'abord un gain de temps sur le terrain lorsque l'on doit effectuer un grand nombre de prélèvements et aussi l'absence d'incubation, ce qui évite tout confinement préjudiciable aux populations. On doit cependant prendre en considération plusieurs éléments avant de proposer toute interprétation : (1) les enzymes initialement présentes dans l'échantillon peuvent être dénaturées au moins en partie lors de la fixation ou de la conservation ; (2) les conditions dans lesquelles on effectue les mesures sont souvent optimales : substrats, cofacteurs, énergie sont apportés en excès, la température, le pH sont parfaitement appropriés aux réactions. Il en résulte que les mesures indiquent un potentiel maximum rarement atteint dans la nature et non l'activité réelle *in situ* ; (3) la plus grande partie des enzymes extraites

provient sans doute du matériel vivant, mais on ne peut jamais exclure la possibilité d'un apport extérieur venant de cellules mortes, de détritiques ou même d'enzymes extracellulaires dissoutes dans le milieu et susceptibles de s'absorber sur le filtre qui a servi à concentrer l'échantillon au moment de la collecte ; (4) la signification tirée de ces analyses est différente selon que l'on étudie des enzymes intervenant dans les phases du métabolisme commun à tous les êtres vivants ou des enzymes dont la synthèse est inductible. Dans le premier cas on peut penser que l'activité mesurée, qui est en fait associée à un grand nombre de molécules d'enzymes, est assez représentative de la biomasse elle-même. Dans le second au contraire, cette activité est plutôt un indicateur de situations nutritives particulières qui ont contribué à orienter le métabolisme dans un sens donné et, par conséquent, ont facilité la synthèse ou démasqué l'activité de nouvelles enzymes ; (5) certaines de ces enzymes concernent le métabolisme de l'azote, d'autres celui du phosphore ou du carbone ; d'autres encore sont à l'origine de l'hydrolyse de molécules organiques complexes, laquelle libère l'énergie contenue dans les liaisons de covalence carbone-carbone et utilisée par les hétérotrophes. Ces différentes enzymes ont donc des activités qui ne sont pas toujours simultanées. Elles varient aussi selon les espèces présentes.

3.7.2. Lipases, protéases, glucidases

Les enzymes appartenant au grand groupe des lipases, protéases et glucidases sont spécifiques des substrats sur lesquels croissent les hétérotrophes. Dans les classes de taille de l'ordre du micromètre, ces activités dépendent des principaux groupes bactériens. Lorsque l'étude porte sur des organismes de plus grande taille, elle permet aussi de définir un critère global d'"herbivorie" ou de "carnivorie" (Ceccaldi, 1981) car les charges respectives en protéases et glucidases sont fonction de l'abondance et de la nature des particules disponibles (Mayzaud et Poulet, 1978) ainsi que de l'activité alimentaire des herbivores et des carnivores. Cette observation de l'adaptation de populations aux aliments disponibles, constitue un élément déterminant pour la compréhension du fonctionnement des écosystèmes, que ceux-ci soient naturels ou au contraire orientés dans un but de production, aquicole par exemple.

3.7.3. Nitrate-réductase

La mesure de l'activité de la nitrate-réductase est également largement employée, aussi bien en limnologie qu'en océanographie. On sait que cette enzyme agit sur le premier stade de réduction du nitrate qu'elle transforme en nitrite. Elle est inductible : pratiquement absente chez des algues en culture croissant sur l'ammonium, elle apparaît lorsque la source d'azote est le nitrate. En conséquence, on

doit considérer la présence de cette activité comme un indicateur de l'utilisation du nitrate par les végétaux.

On observe d'ailleurs de bonnes concordances entre l'activité de la nitrate-réductase par unité de biomasse (ou de chlorophylle *a*) et la production primaire dans des eaux où le nitrate est la principale forme d'azote disponible. Dans des situations nutritives moins franches, l'interprétation des données devient plus difficile : tout d'abord, certaines algues n'ont jamais révélé cette capacité de synthétiser la nitrate-réductase. Son absence dans un échantillon ne signifie pas non plus que les besoins en azote soient satisfaits par une forme d'azote plus réduite, telle que l'ammonium. En effet, toujours en culture, on a pu constater qu'une algue carencée en azote (ammonium insuffisant par rapport aux besoins métaboliques) possède une activité de nitrate-réductase relativement élevée, même lorsque le nitrate est totalement absent du milieu. D'autre part, les estimations de prise de nitrate par mesure de l'activité de l'enzyme indiquent des valeurs généralement inférieures à celles obtenues par mesures directes (disparition du nitrate du milieu ou incorporation dans les cellules de nitrate marqué à l'isotope ^{15}N). Il semble aussi que les pertes d'activité diffèrent fortement en fonction de variantes dans les protocoles de mesure. Une parfaite standardisation préalable de la méthode apparaît donc absolument nécessaire si l'on veut comparer des résultats obtenus à des périodes et en des lieux différents (voir revue de Syrett, *in* Platt, 1981).

3.7.4. Nitrogénase

Cette enzyme impliquée dans la fixation de l'azote moléculaire est également inductible et, comme elle agit également sur l'acétylène, c'est par la réduction de l'acétylène qu'on mesure habituellement son activité.

L'activité, lorsqu'elle existe, décroît et tend à disparaître lorsque les besoins en azote sont satisfaits par des apports de nutrilités (nitrates, nitrites et ammonium). Cette possibilité rencontrée uniquement chez certaines bactéries, dont les cyanobactéries, est plus répandue dans les eaux douces que dans les eaux marines car l'activité de l'enzyme est inhibée par les ions sulfates. La mesure de son activité peut être utilisée comme un indicateur de besoins en azote qui ne peuvent être entièrement satisfaits par les seuls nutrilités (Stewart, 1973).

3.7.5. Enzymes agissant sur l'urée

Depuis une vingtaine d'années on a constaté également par des observations sur des cultures d'algues unicellulaires, comme sur le phytoplancton naturel, que de nombreux microphytes peuvent utiliser l'urée comme source d'azote et quelquefois avec une efficacité proche de celle observée pour l'ammonium et supérieure à celle constatée pour le

nitrate. Or les concentrations d'urée sont loin d'être négligeables dans les aires soumises à pollution, ou à certains stades de la succession des populations animales. C'est pourquoi on a essayé d'utiliser les activités de deux enzymes impliquées dans l'hydrolyse de l'urée : uréase et ATP/amidolyase, comme indices de cette prise spécifique. La situation, là aussi, est complexe : tout d'abord les souches étudiées (bactéries et algues unicellulaires) synthétisent l'une ou l'autre de ces enzymes ou sont incapables de telles synthèses ; l'ATP/amidolyase serait rencontrée chez les Chlorophyta principalement, l'uréase au contraire chez les Diatomées et les Dinoflagellés. D'autre part, l'uréase est fréquente chez les bactéries des eaux douces et l'est moins chez les bactéries marines. La présence d'uréase ou d'ATP/amidolyase dans un échantillon naturel est aussi la preuve d'un apport significatif d'urée dans le système, puisque les populations sont adaptées à en tirer parti (Mc Carthy, *in* Morris, 1980 ; Bonin et Maestrini, *in* Platt, 1981 ; Syrett, *in* Platt, 1981).

3.7.6. Phosphatases et nucléotidases

Les phosphatases (ou phosphomonoestérases) sont des enzymes qui permettent d'hydrolyser un ester phosphaté ou de transférer un phosphate d'une molécule organique à une autre molécule. Elles interviennent à différents niveaux du métabolisme et sont donc universellement rencontrées dans les cellules. Mais on a constaté que certains microorganismes présentent une forte augmentation de leur activité phosphatasique lorsqu'ils sont mis au contact d'esters phosphatés en l'absence de phosphore minéral ; ces microorganismes sont capables d'utiliser pour leur croissance les phosphates de l'ester comme source unique de phosphore. L'apparition d'une activité de ces phosphatases complémentaires (phosphatases alcalines) est un phénomène inductible. Elle se produit lorsqu'il y a carence en phosphore cellulaire ; elle diminue progressivement lorsque la cellule carencée est transférée dans un milieu riche en phosphore inorganique. Ces observations ont amené plusieurs auteurs à considérer cette activité comme un indice de la carence en phosphore et un grand espoir avait été mis dans cette méthode entre 1975 et 1980. Cependant, les résultats obtenus restent fortement dépendants des conditions de milieu et aussi des espèces présentes dans l'écosystème (certaines souches sont incapables de montrer une telle adaptation). Par ailleurs, l'apparition et la disparition de l'activité sont des processus relativement lents ; il en résulte une latence ou une rémanence dans les réponses, si bien qu'il semble difficile à l'heure actuelle de s'appuyer uniquement sur cet indicateur pour définir si le phosphore est le premier facteur limitant de la croissance à un moment donné (Bonin et Maestrini, *in* Platt, 1981).

Ammerman et Azam (1985) ont démontré aussi l'existence chez les bactéries marines d'une 5'-

nucléotidase, capable d'hydrolyser le phosphate des adénylates libérés par les cellules ; ce phosphate est alors susceptible de constituer un apport complémentaire de phosphore aux microorganismes. Contrairement à celle de la phosphatase, l'activité de la 5'-nucléotidase ne semble pas limitée par la présence de phosphate minéral extracellulaire et de ce fait, la présence de cette enzyme ne peut non plus être considérée comme un indicateur de la carence en phosphore des populations.

3.7.7. Système ETS

Nous avons vu au paragraphe 3.2. que les systèmes de transports d'électrons (ETS) assurent les transferts d'énergie couplés à la synthèse des molécules d'ATP et que leur activité est directement liée à la vie. Le système d'analyse peut être appliqué à un échantillon contenant différents types de cellules. Le protocole d'analyse est assez simple, même si différentes variantes ont été utilisées (voir revue de Packard, 1985). Pour ces analyses, tous les réactifs sont apportés en excès et les conditions de la réaction étant optimales, on mesure le potentiel respiratoire maximal, considérablement plus élevé que l'activité respiratoire réelle *in situ*, telle qu'elle peut être mesurée directement par la consommation d'oxygène. Cette méthode, très élégante dans son principe, a eu des applications tout à fait spectaculaires qui ont permis notamment de mesurer la respiration globale dans des eaux océaniques situées au-dessous de la couche euphotique et l'impact de cette respiration sur le bilan des échanges de CO₂ entre les différents milieux de notre planète.

Elle présente cependant des difficultés d'application qui sont de deux types : la première touche à la variabilité des résultats, liée à la diversité des protocoles employés qui peut faire osciller les réponses dans un rapport de 1 à 10, d'où la difficulté de comparer les résultats d'auteurs travaillant avec des méthodes différentes ; la deuxième difficulté est d'avantage conceptuelle. En effet, il est très difficile d'étalonner cette méthode de manière à obtenir une estimation indirecte de la respiration réelle *in situ*, hormis certaines situations trophiques tout à fait comparables, caractérisées par des populations de compositions très voisines et de stades physiologiques identiques. Le coefficient de conversion, qui traduit le rapport entre la respiration théorique maximale évaluée à partir de la mesure de l'ETS et la respiration réelle, diffère en effet assez fortement entre les populations autotrophes et hétérotrophes et, au sein de certains de ces grands groupes nutritionnels, en fonction des espèces étudiées et de leur taux de croissance. Le fait que l'on ait pu mesurer des activités chez les cellules déjà mortes et que certaines enzymes impliquées dans la respiration aient pu être observées dans des filtrats d'où toutes les cellules avaient été retirées, vient encore compliquer la signification de ce type d'analyse. Sauf cas très particulier, la mesure de l'activité ETS ne

peut donc permettre que des comparaisons globales de l'activité respiratoire potentielle et c'est pourquoi certains auteurs n'hésitent pas à affirmer que la mesure de l'ETS est surtout une forme d'estimation de la biomasse totale et ne permet qu'assez exceptionnellement de préjuger de l'activité respiratoire réelle de cette biomasse *in situ* (Brugeaille *et al.*, 1987).

3.8. Microcalorimétrie

Toutes les formes de métabolisme sont accompagnées d'une déperdition calorifique, puisque les rendements accompagnant les transformations d'énergie ou les transferts des éléments dans les principaux cycles biochimiques (photosynthèse, catabolisme respiratoire) n'atteignent jamais cent pour cent. La microcalorimétrie s'appuie sur cette réalité ; les microcalorimètres sont des appareils aussi parfaitement isolés que possible sur le plan thermique et où toute variation de la température, même légère, est mesurée par un jeu de thermopiles. Cette méthode, a priori très séduisante car très simple dans son principe, a le défaut de n'apporter que peu d'information sur les différentes formes du métabolisme puisqu'elle est fondée sur un sous-produit commun, la chaleur, quels que soient les systèmes métaboliques mis en jeu et les organismes qui en sont à l'origine.

C'est précisément à cause de cette particularité que la microcalorimétrie a été surtout employée pour étudier des systèmes où il est très difficile de procéder à une séparation physique des organismes et où, par obligation bien souvent, on doit se contenter d'une information globale, même si l'on sait qu'elle est imparfaite. Fréquemment utilisée pour l'étude des sols et des sédiments (Mortensen *et al.*, 1973 ; Pamatmat et Findlay, 1983), elle l'a été plus rarement pour celle de la colonne d'eau, bien qu'elle ait servi quelquefois lors de l'examen d'écosystèmes simplifiés en culture (Scott et Marlow, 1982).

La base de l'interprétation en calorimétrie est le thermogramme qui est la courbe d'exportation de chaleur en fonction du temps. L'allure de cette courbe dépend de nombreux facteurs parmi lesquels on peut citer : (1) le degré d'oxygénation qui est à l'origine ou non de développement de métabolismes anaérobie et fermentatif ; (2) la nature des populations de microorganismes en place dans le système au début de l'expérience ; (3) la densité de la biomasse ; (4) la température initiale du milieu (Karl, 1986).

Dans ces conditions, il est évident que la qualité des informations apportées par l'analyse du thermogramme sera d'autant moins bonne que la population en place est elle-même moins bien connue aux plans taxinomique et physiologique.

Un autre handicap de cette méthode réside dans le fait qu'elle nécessite quelquefois des temps d'incubation assez longs (de l'ordre de quelques

heures à quelques jours) pour la mise initiale en équilibre thermique qui précède nécessairement toute expérience et pour l'incubation proprement dite. Il en résulte en cours d'expérience une modification souvent importante de la composition spécifique initiale et donc de l'activité, autant d'artéfacts dont l'incidence est variable et qu'il est difficile de corriger. Il en résulte aussi une variabilité dans les réponses dont il convient de connaître l'amplitude en procédant à l'étude simultanée d'aliquotes d'un même échantillon, ce qui alourdit d'autant la mise en oeuvre expérimentale et le coût inhérent à ce type d'étude.

C'est pourquoi, bien souvent, compte tenu de ses imperfections et de ses contraintes, la calorimétrie est considérée comme permettant une première approche de l'étude d'un milieu pour lequel l'accès méthodologique est difficile, mais les résultats doivent être complétés par ceux fournis par des techniques d'analyse plus précises ou plus spécifiques, chaque fois que cela est possible.

4. CROISSANCE ET PRODUCTION

Il existe souvent des confusions lorsque l'on emploie les mots "croissance" et "production". En effet, on peut définir le taux de croissance comme l'augmentation relative de la biomasse par unité de temps, mais dans les milieux naturels toujours complexes où coexistent plusieurs espèces, de multiples facteurs agissent sur la croissance réelle de chacune des espèces et aussi sur les déperditions de biomasse concomitantes. Cela signifie que comparer des biomasses dans le temps revient à mesurer une croissance apparente (k) qui est elle-même l'effet résultant des synthèses (μ) minorée de l'ensemble des pertes (λ). La croissance apparente est généralement très inférieure à la croissance réelle et l'on a la relation $k = \mu - \lambda$. Plusieurs techniques sont maintenant utilisées pour essayer de déterminer ces croissances (ou productions) réelles et apparentes.

4.1. Echanges de molécules simples entre les microorganismes et leur environnement

On retrouve ici comme dans les expériences microcalorimétriques envisagées ci-dessus des échanges liés à l'activité globale de l'écosystème. En effet la mesure de l'activité métabolique globale d'un écosystème ou d'une population peut s'appuyer soit sur un phénomène global, commun à tous les métabolismes, qui est la déperdition de chaleur, soit sur l'intensité des transferts de molécules simples (exportation ou importation) entre les peuplements et l'espace périphérique ; c'est le cas des flux de CO_2 et d' O_2 qui résultent pour l'essentiel des échanges gazeux dus aux processus respiratoire et photosynthétique. En fait toutes les molécules, tous les éléments biogènes nécessaires aux

synthèses, ou libérés dans le milieu à la mort des cellules peuvent être considérés ici ; il en est ainsi de l'azote et du phosphore dont les concentrations sous leurs formes dissoutes traduisent le degré de trophie du système et donc sa capacité de croissance. Mais ce sont surtout les échanges d'O₂ et de CO₂ qui sont étudiés dans ce but (Bender *et al.*, 1987).

Si on ne considère que les glucides simples, les volumes des deux gaz échangés au cours de chacun des deux processus (respiration et photosynthèse) sont identiques. Il en résulte que le quotient photosynthétique (O₂ libéré/CO₂ fixé) et le quotient respiratoire (CO₂ libéré/O₂ fixé) sont égaux à 1. En pratique cependant, on constate que les valeurs de ces deux rapports trouvées chez les populations naturelles plurispécifiques sont souvent assez éloignées de l'unité (Williams *et al.*, 1979). Ces variations sont dues à des facteurs divers qui jouent séparément : (1) synthèses, ou au contraire dégradations, de lipides et protides à côté de celles concernant les sucres simples ; (2) respiration fonctionnant sur l'oxygène des nitrates et des sulfates et non seulement sur l'oxygène dissous ; (3) apport de CO₂ dans le milieu par des processus fermentatifs en plus de celui fourni par la respiration ; (4) photosynthèse due à certains procaryotes (bactéries vertes, bactéries pourpres) qui, ne possédant pas le photosystème II, ne procèdent pas à la photolyse de l'eau et ne libèrent donc pas d'oxygène ; (5) prise de composés différemment oxygénés (NO₃⁻ et NH₄⁺) comme sources d'azote par les producteurs primaires, d'où, pour une même production, variation de la quantité d'O₂ rejeté en fonction du substrat azoté absorbé. C'est pourquoi il est souvent nécessaire de procéder au dosage de ces deux gaz dissous si l'on veut employer efficacement cette méthodologie.

Le dosage de ΣCO_2 (somme de toutes les formes de carbone inorganique en solution) peut être effectué par titrimétrie, utilisation de rayons infrarouges, estimation du pH et de l'alcalinité (Van Cleve *et al.*, 1979 ; Aminot et Chaussepied, 1983 ; Karl, 1986). Celui de l'oxygène dissous l'est aussi par plusieurs techniques titrimétriques (méthode de Winkler ou emploi d'électrodes polarographiques). La méthode de Winkler, surtout depuis qu'elle a été optimisée par Carpenter, est reconnue comme très fiable (Aminot et Chaussepied, 1983). Mentionnons aussi les progrès considérables accomplis récemment dans la fabrication des microélectrodes (miniaturisation et amélioration de la sensibilité) qui les rendent utilisables maintenant pour des études très fines sur de toutes petites distances, à l'interface eau-sédiment par exemple (Revsbech et Jorgensen, 1986).

Même si les échanges d'O₂ et de CO₂ résultent de deux transferts opposés qui fonctionnent simultanément, il est possible d'orienter le métabolisme (catabolique ou photoautotrophe) en agissant sur son environnement. Les échanges sont alors davan-

tage représentatifs de l'intensité de la voie métabolique qui reste fonctionnelle.

Par exemple, la comparaison des concentrations en O₂ dissous observées dans deux flacons contenant un échantillon d'eau de même nature, mais l'un à l'obscurité et l'autre à la lumière, permet de définir les productions nette et brute du système. La première est mesurée par l'augmentation de la concentration en O₂ dans le "flacon clair". La seconde s'obtient en additionnant la production nette à la respiration ; or cette dernière est mesurée par la diminution de la concentration en O₂ dans le "flacon sombre".

De même, l'ajout d'antibiotiques spécifiques permet de limiter le métabolisme d'une partie des microorganismes présents dans l'échantillon et donc de mesurer l'activité respiratoire des microorganismes restant actifs car peu ou pas sensibles à l'antibiotique utilisé. Mais cela entraîne une modification importante de l'état initial de l'écosystème (perturbation des échanges) et nous avons vu (4.5.4.) que l'emploi des antibiotiques demandait toujours un fort esprit critique lors de l'analyse des résultats.

Dans ce type d'études, il ne faut pas oublier non plus que la concentration d'une molécule ou d'un ion dans l'eau est l'effet résultant de toutes les actions physiques, chimiques et non seulement biologiques qui s'appliquent au système. Ainsi la lumière agit-elle sur la matière organique par photooxydation et non seulement par photosynthèse. La turbulence facilite la dissolution ou au contraire l'évasion de gaz dissous, selon les concentrations initiales dans l'eau.

Enfin, mentionnons que c'est sur ce principe de la variation des concentrations des éléments de base que l'on essaie de quantifier à grande échelle les productions des masses d'eau océaniques et lacustres afin de mieux préciser les grands cycles biogéochimiques (Johnson *et al.*, 1979 ; Taylor *et al.*, 1992).

4.2. Mesure globale de la prise de substrats marqués

4.2.1. Principe de la méthode

Le principe général consiste à marquer la molécule nécessaire à la croissance par un élément repérable (isotope stable ou radioactif) dont on peut mesurer la quantité retenue dans la biomasse microbienne après un temps d'incubation déterminé (Parsons et Strickland, 1962). Cependant, pour que la prise ("uptake") soit assez bien représentative de la croissance, il faut que certaines conditions soient remplies : (1) la molécule doit intervenir dans le métabolisme et pour cela avoir accès au milieu intracellulaire donc pouvoir franchir le plasmalemme ; (2) la prise de substrat tout au long de l'incubation doit rester faible comparée à la quantité totale de substrat initialement disponible ; (3) le métabo-

lisme de l'organisme ne doit pas être modifié par la présence de cet élément inhabituel (isotope de masse atomique légèrement différente) ou bien l'on doit connaître son action sur les vitesses de réactions pour procéder ensuite aux corrections nécessaires ; (4) "l'effet de paroi" dû à l'enceinte elle-même qui entoure l'échantillon durant l'incubation doit être soit évalué et corrigé, soit considéré comme négligeable ; (5) les conditions générales de l'expérience (durée d'incubation, lumière, température, richesse en éléments nutritifs, etc.) doivent être parfaitement définies et contrôlées. En effet si ces conditions ne sont pas rigoureusement notées et maintenues constantes, on risque de comparer de pseudo-répliquats, d'où des erreurs supplémentaires liées cette fois-ci au protocole expérimental lui-même.

Ce qui est encore plus fondamental c'est de savoir que la nature de l'information apportée par ces incubations diffère grandement selon la quantité de substrat comportant l'élément marqué ajoutée au milieu en début d'incubation (voir revue générale de Wright et Burnison, *in* Costerton et Colwell, 1979).

En effet, dans la plupart des conditions naturelles et écologiques, la vitesse de prise d'un substrat nécessaire à la croissance répond à un transfert actif :

$$V = f(S_n + A)/t \quad (1)$$

où V est la vitesse de prise de l'élément marqué exprimée en unité pondérale absorbée par unité de volume de culture et par unité de temps

f est la fraction de l'isotope prélevée dans le milieu durant le temps t et que l'on peut mesurer (dans un compteur à scintillation liquide si l'isotope est émetteur de rayonnements β , ou par un spectrographe de masse si l'isotope est stable).

S_n est la concentration naturelle du substrat initialement présente dans le milieu

A est la concentration de substrat ajoutée au milieu et qui contient une fraction de l'isotope caractéristique que l'on veut doser.

Le transfert et l'utilisation du substrat par l'organisme sont le fait d'activités enzymatiques et l'on peut donc leur appliquer la loi de Michaelis-Menten selon laquelle

$$V = V_{\max} S/(K_s + S) \quad (2)$$

où K_s (constante de demi saturation) et V_{\max} (vitesse maximale de prise) sont des constantes pour un système bien défini et où

$$S = S_n + A \quad (3)$$

Plusieurs cas peuvent se présenter :

4.2.2. Mesure de potentiels

On choisit $A \gg S_n$ si bien que S_n et K_s deviennent négligeables. Ainsi ($S \approx A \approx K_s + S$), d'où un rap-

port $S/(K_s + S)$ voisin de 1 et par suite dans l'équation (2) V est voisin de V_{\max} .

Dans ce cas c'est une vitesse maximale de prise ou de transformation que l'on mesure, celle qui correspond à une saturation de tous les systèmes métaboliques.

Cependant il n'est pas du tout assuré que dans le milieu la concentration de substrat en place permette cette saturation. La mesure de la prise de l'isotope par la biomasse donne donc ici une valeur bien supérieure à celle que l'on trouverait si l'on n'avait pas ajouté A . Avec ce principe on mesure un optimum d'activité, un potentiel lié plus à la quantité d'enzymes présentes qu'à l'activité initiale *in situ* de ces enzymes. Et si l'on mesure une quantité de molécules d'enzymes, on mesure en fait une biomasse (et on se rapproche des procédés présentés au paragraphe 3.7).

4.2.3. Mesure d'activités réelles

On choisit cette fois-ci $A \ll S_n$ d'où $S \approx S_n$, ce qui permet d'établir à partir de l'équation (1) transformée :

$$t/f = S_n/V = T \quad (4)$$

T correspond au temps demandé par une population microbienne pour la prise d'une quantité de substrat égale à celle de la concentration initiale du milieu. C'est le temps de renouvellement de l'élément dans la biomasse ("turnover time").

Et puisque S_n n'est pratiquement pas augmenté par l'apport A , cette valeur T est bien représentative des transferts qui s'effectuent réellement *in situ*.

Encore faut-il que la mesure de l'isotope soit possible. Compte tenu des contraintes de sensibilité des méthodes, cela ne se rencontre que sous deux conditions : ou bien l'apport A ne représente qu'une très faible quantité mais dispose cependant d'une forte charge relative en isotope caractéristique (forte activité spécifique) ; ou bien la concentration S_n est déjà naturellement très élevée si bien que A est de toute façon très réduit par rapport à S_n et son apport reste négligeable en valeur relative.

Ainsi, dans les mesures de photosynthèse selon la méthode de Steemann Nielsen (1952), l'apport de $H_{14}CO_3^-$ aux échantillons en incubation est-il toujours faible par rapport aux quantités de bicarbonate présent initialement dans l'eau (de l'ordre de une à deux millimoles dans la plupart des eaux marines). Les mesures de prise de carbone inorganique traduisent donc bien une activité réelle, telle qu'elle se produit naturellement dans le milieu.

En revanche, pour de nombreuses eaux oligotrophes, l'apport de NO_3^- marqué au ^{15}N n'est pas négligeable, comparé aux concentrations naturelles faibles et la nature de la réponse est moins aisée à interpréter. Dans ce cas, on mesure quelque chose qui se situe entre l'activité réelle telle qu'elle existe bien *in situ* et une activité potentielle, de toute façon supérieure, qui serait celle des systèmes de

prise de NO_3^- s'ils étaient entièrement saturés (Mc Carthy, *in* Platt, 1981).

4.2.4. Concentrations croissantes de substrat

On peut aussi faire des études comparées de prises de substrats dans des aliquotes auxquelles on ajoute des concentrations croissantes de substrat (A variable). Cette méthode ("transport kinetics" des auteurs anglo-saxons) permet d'établir une courbe expérimentale en reliant tous les points. Puis en utilisant une transformation linéarisante, par exemple celle de Lineweaver et Burk, on obtient une droite. La transformation de Lineweaver-Burk est traitée dans la plupart des ouvrages de biochimie générale, par exemple celui de Lehninger (1973). Bien que plus complexe que les autres, puisqu'elle nécessite des incubations simultanées pour un même échantillon, la méthode des concentrations croissantes a l'avantage de permettre la détermination de T et de Sn, deux valeurs essentielles correspondant respectivement au temps de renouvellement et à la concentration initiale de la molécule dans le milieu.

4.2.5. Limites de la méthode des substrats marqués

Signalons cependant que, même dans ce dernier cas, des incertitudes de diverses natures persistent lorsque l'on applique cette méthode à des milieux naturels contenant un grand spectre de molécules. En effet, si nous reprenons l'exemple du $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ et de la photosynthèse, la situation reste simple puisque l'ion HCO_3^- est le seul utilisé pour la photosynthèse. Mais lorsque l'on étudie l'hétérotrophie, il n'y a aucune garantie que la croissance du microorganisme s'appuie sur un seul substrat (glucose ou acide aminé bien déterminé, par exemple). Cette situation serait même tout à fait exceptionnelle dans un milieu complexe, si tant est qu'elle puisse exister. On sait que les microorganismes des milieux naturels consomment un très grand nombre de molécules différentes, même s'ils le font avec des efficacités diverses. Les mesures qui s'appuient sur la consommation d'un seul substrat ne reflètent donc pas l'intégralité de la prise réelle des substrats vraiment disponibles *in situ*. Certes l'emploi d'un mélange de substrats marqués diminue sans doute cette erreur, mais il ne peut jamais la supprimer tout à fait.

Dans tous les cas, on doit aussi se poser la question de savoir si la prise mesurée correspond à la prise totale. En effet, une partie du produit marqué, après avoir été absorbée, est métabolisée et éventuellement dégradée pendant le temps que dure l'incubation. Il en résulte une perte d'élément marqué, par respiration, "exsudation" ou "excrétion", et qui est d'autant plus importante a priori que l'incubation est elle-même plus longue. Le rapport isotope fixé/isotope fixé + isotope libéré hors de la cellule a été largement utilisé pour mesurer l'efficacité d'assimilation d'un substrat, donc en définitive la

croissance de l'organisme. Encore faut-il que le substrat fixé et la molécule libérée, qui chacun possèdent l'élément marqué, soient de nature différente pour être aisément repérables.

Par exemple, il est en pratique impossible de faire la distinction dans le $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ dissous, entre celui qui a été libéré et celui initialement présent dans le milieu, les deux pouvant être repris indifféremment par le microorganisme dans une phase ultérieure. Dans ce cas, il faudra établir un protocole mettant en jeu des modifications de l'environnement des échantillons ou faire diverses analyses complémentaires : comparaison en présence et en absence de lumière, incubations de durées différentes, emploi complémentaire de différents traceurs d'une même activité (libération d' O_2 ou prise de CO_2 par exemple, Grande *et al.*, 1989). Mais le résultat obtenu reste toujours soumis à des incertitudes. C'est ainsi que, dans les mesures de photosynthèse, la comparaison des "blancs" et des "noirs" (flacons à la lumière et à l'obscurité) est délicate puisque l'on connaît l'existence d'une fixation de bicarbonates à l'obscurité due aux β -carboxylations et au métabolisme dit en C4 (voir revue de Carpenter et Lively, *in* Falkowski, 1980). Il en résulte que la plupart des mesures de photosynthèse ne correspondent pas à la production brute (prise totale de substrat) ni à la production nette (prise effective de substrat conservé par la cellule) mais bien à quelque chose qui est intermédiaire sans qu'on puisse avec certitude le situer entre les deux extrêmes (Peterson, 1980).

En revanche il est possible de suivre assez bien le devenir d'atomes de carbone marqué liés à des molécules de sucre consommées par un hétérotrophe : ces atomes de carbone peuvent être libérés sous forme de CO_2 (respiration) ou de molécules organiques ou, au contraire, fixés dans les molécules constitutives de la cellule et donc contribuer directement à la croissance.

Mentionnons cependant qu'une méthode appliquée à l'étude du plancton, dite de "dilution isotopique", employée par Glibert *et al.* (1982) avec de l'ammonium marqué au ^{15}N et étendue depuis à d'autres formes d'azote dissous (NO_3^- , NO_2^- , urée), permet de faire la distinction entre la prise et l'excrétion d'une molécule par les organismes. Le principe général en est le suivant : si l'incubation n'est pas trop longue et si le métabolisme qui met en jeu cette molécule n'est pas trop rapide (ce qui est le cas pour l'azote), on peut vérifier que durant l'incubation, le traceur s'accumule dans les cellules alors que d'autres molécules, de même nature mais non marquées, sont libérées. Ces dernières molécules viennent diluer les molécules marquées dissoutes et encore présentes dans le milieu et cette dilution est représentative du flux de régénération. Connaissant ainsi à la fois le flux de régénération et le flux brut d'entrée dans les cellules, il est possible par différence de calculer la prise nette de la molécule azotée par les algues et autres microorganismes.

Signalons enfin que les méthodes de mesure de la prise par les cellules de substrats marqués aux isotopes radioactifs sont devenues, dans certains cas, suffisamment sensibles pour qu'elles puissent être appliquées à des cellules isolées (Rivkin et Seliger, 1981).

4.3. Fixation des éléments marqués par des molécules particulières

Compte tenu des difficultés liées aux méthodes, développées précédemment, de prise globale de substrat, on essaie de plus en plus de mesurer l'accumulation de l'élément marqué dans des molécules fonctionnelles ou constitutives de la cellule.

4.3.1. Chlorophylle *a* et pigments végétaux

Nous avons vu (2.4.2) que la chlorophylle *a* est un assez bon indicateur de la biomasse végétale, tout au moins entre certaines limites. La durée de vie des chlorophylles est de l'ordre de quelques heures. Si donc l'on incube un échantillon végétal en présence de $H^{14}CO_3^-$, il est possible de retrouver une partie du carbone radioactif dans les molécules de chlorophylle elles-mêmes. Par suite, si l'on incube un échantillon complexe contenant photoautotrophes et hétérotrophes divers, la prise de radioactivité par la chlorophylle deviendra un bon indicateur de la croissance des végétaux et d'eux seuls (Redalje et Laws, 1981 ; Goericke et Welschmeyer, 1993). L'intérêt d'une telle méthode est qu'elle donne aussi une information sur le taux de croissance réelle et non pas apparente. En effet, même si la force de broutage limite l'augmentation de la biomasse végétale totale, le rapport $^{14}C/^{12}C$ dans la chlorophylle n'en est pas affecté et il est d'autant plus élevé que la prise de CO_2 radioactif, donc la synthèse de la chlorophylle, ou encore la croissance, est plus rapide. Le principe de cette méthode a été appliqué aussi, moins fréquemment mais avec succès, aux pigments caroténoïdes spécifiques de grands taxons du phytoplancton, et cela afin de déterminer les croissances réelles des principaux groupes d'algues dans les échantillons d'eau naturels (Gieskes et Kraay, 1989).

4.3.2. Acides ribonucléiques et désoxyribonucléiques

Puisque les ARN et les ADN sont des constituants vitaux de tous les organismes, leur taux de synthèse est également un bon indicateur de la croissance réelle. La prise de thymidine tritiée ou d'adénine tritiée par les hétérotrophes répond à ce principe dans la mesure où ces molécules sont ensuite régulièrement et uniformément intégrées dans les chaînes d'acides nucléiques. L'une ou l'autre des deux molécules marquées peut être utilisée.

Signalons cependant que l'adénine est incorporée dans l'ADN et l'ARN tandis que la thymidine

l'est dans l'ADN seulement, et que l'adénine est utilisée par un éventail très large de microorganismes (bactéries, levures, microalgues) alors que la thymidine l'est par les bactéries seulement, encore que ces points soient discutés (Fuhrman *et al.*, 1986 ; Rivkin, 1986). De plus, la thymidine permettrait une meilleure définition du taux réel de division (Moriarty, 1984). La méthode à la thymidine semble la plus fréquemment employée aujourd'hui si l'on se limite à l'étude de la croissance des bactéries. Pour les avantages, les limites et les difficultés d'emploi de chacune de ces deux méthodes on peut se référer aux articles de Fuhrman et Azam (1980), Karl et Winn (1984), Karl (1986) et Riemann et Bell (1990) et Torreton (1991).

4.3.3. Protéines

Cette méthode consiste à fournir un acide aminé, la leucine, marqué au tritium, qui est incorporé dans les protéines durant leur synthèse. Elle ne s'applique donc qu'aux hétérotrophes osmotrophes, plus particulièrement les bactéries, et dans la mesure où ceux-ci sont capables de prendre la leucine dans le milieu (Kirchman *et al.*, 1986). Il a été vérifié que la proportion de bactéries susceptibles de prélever la leucine est élevée (50 %), que la plus grande partie de la prise (90 %) est incorporée dans les protéines et qu'une partie seulement (20 %) de ces protéines est dégradée ; mais ce dernier pourcentage est toutefois susceptible de varier en fonction de la durée d'incubation.

4.4. Fréquence des divisions chez les organismes unicellulaires : indices mitotiques

En simplifiant grandement, on peut établir ainsi le principe sur lequel est fondée cette méthode : si l'on connaît la vitesse de doublement d'une cellule d'une espèce donnée et si le volume moyen des cellules appartenant à deux générations successives reste inchangé, la vitesse de doublement donne une bonne appréciation du taux réel de croissance (Guillard, *in* Stein, 1973).

Cette méthode a été appliquée tout d'abord sur des algues unicellulaires (Dinophycées notamment) chez qui les états mitotiques ou post-mitotiques sont aisément reconnaissables (Swift et Durbin, 1972 ; Weiler et Eppley, 1979). D'une manière générale, ce principe est aisément applicable aux organismes eucaryotes parce que la synthèse d'ADN s'y réalise à un moment bien précis du cycle de division et parce que les noyaux y sont bien individualisés : en effet, on distingue après chaque mitose une phase de croissance initiale (G1), une phase de synthèse de l'ADN (S), une deuxième phase de croissance (G2) et la mitose proprement dite (M). Une diminution de la température qui entraîne un ralentissement du métabolisme affecte toutes les phases. Au contraire, une carence en éléments biogènes, en facteurs de crois-

sance, et en lumière chez les photoautotrophes affecte essentiellement la phase G1 qui peut s'allonger considérablement. S'il y a carence, la proportion de cellules en cours de division (phases S, G2 et M) par rapport à la totalité des cellules diminue et ce rapport est donc représentatif du taux de division.

L'analyse devient plus difficile lorsque l'on étudie des procaryotes où la synthèse d'ADN est moins concentrée dans une période du cycle et où il n'existe pas de noyaux individualisés. La méthode a cependant été appliquée avec succès par Hagström *et al.* (1979) et est encore utilisée depuis lors pour mesurer la croissance des bactéries, des cyanobactéries et des prochlorophytes. Dans ce cas, les cellules qui ont doublé leur charge en ADN peuvent être discriminées à l'aide de méthodes précédemment décrites mettant en jeu la fluorescence induite (orange d'acridine ou DAPI), la microscopie, avec éventuellement analyse d'image, ou la cytofluorimétrie (Carpenter et Chang, 1988 ; Vaultot et Parzensky, 1992).

Cependant, les calculs doivent être toujours soumis à une solide interprétation si l'on veut connaître les taux de croissance réels (McDuff et Chisholm, 1982 ; Vaultot, 1992). Ces méthodes demandent donc une grande expérience personnelle. L'un de leurs atouts principaux est qu'elles ne demandent aucune incubation.

4.5. Suppression de l'action des consommateurs

4.5.1. Principe

L'une des causes importantes des différences observées entre les mesures de croissance apparente et de croissance réelle réside dans la perte de biomasse des populations de microorganismes due à la consommation par les niveaux supérieurs.

En effet, et cela est particulièrement vrai pour les bactéries, le nombre et la taille des microorganismes dans les milieux naturels ne dépendent pas uniquement de la richesse du milieu. La densité des microorganismes n'est donc pas uniquement pilotée en amont par la "ressource" (concentrations des nutriments = "bottom-up" des auteurs anglo-saxons) mais l'est aussi en aval par les déperditions dues à l'activité alimentaire des consommateurs ("top-down").

On peut donc envisager de supprimer une bonne part des déperditions en éliminant du milieu les brouteurs. Encore faut-il qu'un certain nombre de postulats soient satisfaits : (1) la densité des organismes doit être limitée fortement par le broutage, les autres causes de pertes étant de moindre importance et le contrôle par la "ressource" restant d'un impact limité, ce qui est loin d'être toujours admis (Billen *et al.*, 1990 ; Psenner et Sommaruga, 1992) ; (2) les taux de croissance spécifique des microorganismes ne doivent pas être trop affectés par l'élimi-

nation des brouteurs ; en d'autres termes le retrait des brouteurs, source d'excrétions diverses et d'éléments biogènes qui peuvent être repris par les micro-organismes, ne doit pas affecter grandement la ressource disponible, mais cela aussi est loin d'être toujours vérifié. Malgré ces difficultés d'application, au niveau des concepts mêmes et des pratiques expérimentales, cette méthode par élimination des consommateurs est toujours fort employée aujourd'hui.

4.5.2. Filtrations sélectives

Dans certains systèmes écologiques eutrophes et mésotrophes, les microorganismes sont de taille nettement plus faible que celle de leurs prédateurs. Une séparation des deux types de populations (proies et prédateurs) est donc envisageable par filtration sélective. Cependant, dans de nombreuses situations écologiques, généralement caractérisées par l'oligotrophie, on trouve des bactéries, des microflagellés prédateurs, des petites algues procaryotes et eucaryotes dans les mêmes classes de taille (Johnson et Sieburth, 1982). Cette séparation physique de microorganismes aux métabolismes différents par passage au travers d'un crible devient alors franchement impossible. De plus, la garantie de passage ou de rétention de particules vivantes au travers d'un filtre est loin de répondre à des lois simples et cela d'autant plus que l'on travaille avec des organismes de petites dimensions (Brock, 1983 ; Li, 1986)

4.5.3. Dilutions

La difficulté précédente est en partie levée si, au lieu d'éliminer les prédateurs, on diminue leur activité. Pour cela on dilue, de l'ordre de 5 à 20 fois, un petit volume d'échantillon naturel. (contenant tous les microorganismes et leurs prédateurs) dans un volume plus abondant d'une eau de même origine mais dont on a éliminé tous les organismes par passage sur un filtre aux pores de 0,2 µm.

Dans ces conditions, proies et prédateurs sont moins abondants, d'un facteur identique correspondant au taux de dilution ; par contre les substances dissoutes nutritives et les éléments biogènes présents initialement dans le milieu et nécessaires à la croissance des microorganismes ont une concentration inchangée. La dispersion plus grande des proies et des prédateurs diminue leur possibilité de rencontre et donc la destruction des microorganismes par broutage ; il en résulte que le taux de croissance mesuré se rapproche du taux de croissance réel. On a constaté par ailleurs que le taux de croissance mesuré est en relation directe et positive avec le rapport des volumes eau filtrée/eau non filtrée (Landry et Hassett, 1982).

Certaines critiques cependant peuvent être formulées à l'encontre de cette méthode : (1) on considère ici que les prédateurs consomment leurs proies

en proportion directe de la densité de ces proies ; or il est vérifié que l'ingestion n'est pas une fonction linéaire de la concentration en particules, en particulier pour les très faibles et les très fortes densités ; (2) on admet que tous les microorganismes sont retirés par filtration sur filtre de 0,2 μm , ce qui ne semble pas être une règle absolue, notamment dans les eaux oligotrophes (Li, 1986).

On s'aperçoit toutefois que malgré leurs défauts intrinsèques, des études comparatives mettant en jeu les deux méthodes (dilution et filtration sélective) ont permis d'assez bonnes corrélations positives (Krössbacher *et al.*, 1992). Il y a en général sous-estimation des taux de croissance avec la méthode de filtration sélective, par suite d'une diminution de l'apport de nutriments, puisqu'il y a disparition de l'excrétion par les prédateurs. Il y a au contraire tendance à la surestimation du taux de croissance avec la méthode de dilution par suite de la diminution de la densité des proies, égale au facteur de dilution, d'où une compétition plus réduite entre les microorganismes pour la prise de substrat. La durée de l'expérimentation peut aussi intervenir sur les différences observées.

4.5.4. Inhibitions sélectives des métabolismes

On utilise dans ce cas des substances toxiques ou antibiotiques pour ralentir ou arrêter les processus métaboliques d'un groupe de microorganismes présents dans l'écosystème.

Nous avons vu (3.5) que le DCMU arrête très rapidement les processus photosynthétiques chez tous les microorganismes photoautotrophes eucaryotes et procaryotes qui possèdent les photosystèmes I et II. Certains antibiotiques peu sélectifs agissent sur un large spectre de procaryotes. D'autres, tel le cycloheximide, sont des inhibiteurs de la synthèse des protéines chez les eucaryotes. De cette manière il est donc possible, tout au moins en théorie, de fractionner les activités métaboliques appartenant aux grandes composantes (bactéries, microalgues, protozoaires) d'un écosystème microbien. La grande difficulté d'emploi de cette méthode réside dans le fait que l'action des antibiotiques n'est pas aussi spécifique *in situ* qu'elle apparaît *in vitro*. De nombreux facteurs agissent sur cette spécificité (densité des microorganismes, origine des populations microbiennes, teneur en sels, charge en nutriments, durée d'action du toxique, etc...)

Li et Dickie (1985) puis Sanders et Porter (1986) pensent que la réussite de l'emploi de ces inhibiteurs dépend surtout des conditions de l'environnement et du protocole expérimental : par exemple l'inhibition de la synthèse des protéines chez les procaryotes par le chloramphénicol laisse intactes les protéines déjà en place. De ce fait, les systèmes de prise active de substrat, liés à la présence et à la concentration d'enzymes dites de transfert ne seront pas trop perturbés dans un premier temps. Par contre, l'action inhibitrice de l'antibiotique se mani-

festera ensuite, lorsque le non renouvellement des protéines retiendra directement sur le nombre de molécules d'enzymes disponibles et affectera donc la vitesse d'absorption. Autre difficulté : on constate que le cycloheximide présente une grande variabilité dans son action, agissant par exemple contre certaines bactéries ou ne freinant pas l'activité phagotrophe de certains ciliés ou l'activité photosynthétique des microalgues eucaryotes (Rachiq *et al.*, 1991), ce qui va exactement à l'encontre du but recherché. Enfin, ces poisons antibactériens, dits sélectifs, ne pourront faire la différence entre les cyanobactéries photoautotrophes et les bactéries hétérotrophes, puisque ces deux groupes de microorganismes appartiennent à l'ensemble des procaryotes.

Il en résulte que l'on doit travailler avec la plus grande prudence lorsque l'on décide d'utiliser ces inhibiteurs pour mesurer les croissances intrinsèques des microorganismes (Iturriaga et Zsolnay, 1981 ; Sanders et Porter, 1986).

5. CONCLUSION

Pour évaluer les capacités de croître et de se multiplier des microorganismes, leur activité métabolique et leur production, l'hydrobiologiste dispose d'un grand éventail de méthodes dont nous n'avons pourtant pas dressé le catalogue exhaustif.

Cette multiplicité est une conséquence, et de la diversité des objectifs que l'on souhaite atteindre, et du fait qu'aucune méthode ne peut présenter tous les avantages sans avoir ni défauts ni inconvénients. Pour l'écologue, la modicité du coût, la simplicité de mise en oeuvre, l'utilisation possible *in situ* ou à bord d'un navire sont aussi des qualités à prendre en considération. Par ailleurs, plusieurs méthodes largement éprouvées au laboratoire, en biochimie et microbiologie notamment, ne sont pas adaptées à l'étude *in situ* d'un milieu dont la complexité rend délicate, voire franchement impossible, l'interprétation des résultats et ce même lorsque leur adaptation est techniquement possible.

Pour ces diverses raisons, il est vivement conseillé de recourir à l'emploi simultané de plusieurs techniques (Amblard, 1983 ; Bratbak, 1985) ; en effet, même si les divergences plus ou moins marquées que l'on constate entre les résultats peuvent semer le trouble, cette confrontation ne manque jamais d'apporter un complément d'informations, fort utile pour mieux comprendre l'écosystème étudié et faire ainsi avancer la connaissance.

Enfin, comme le soulignent très justement Maestrini *et al.* (sous presse), le choix des méthodes ne peut être fondé sur la routine, la mode ou le prestige dont elles jouissent momentanément du fait de leur sophistication ou de leur nouveauté, mais doit être fait en fonction de la nature même du problème que l'on se propose de résoudre.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient C. Amblard, M.C. Bonin, G. Bourdies, C. Grenz, P. Lelong, Y. Martin et E. Vacelet pour la lecture critique du manuscrit.

6. RÉFÉRENCES

- Ahn Y.H., A. Bricaud, A. Morel, 1992 - Light backscattering efficiency and related properties of some phytoplankters. *Deep-Sea Res.*, **39** : 1835-1855.
- Aiken J., G.F. Moore, P.M. Holligan, 1992 - Remote sensing of oceanic biology in relation to global change climate. *J. Phycol.*, **28** : 579-590.
- Amblard C., 1983 - Intérêts du dosage de l'ensemble des nucléotides adényliques pour l'estimation de la biomasse des populations phytoplanctoniques lacustres (Lac Pavin, France). *J. Plankton Res.*, **5** : 723-738.
- Ambard C., 1986 - Les nucléotides adényliques : intérêts pour l'étude de la biomasse, de l'activité métabolique et de la structure des peuplements phytoplanctoniques lacustres. *Thèse doct. Univ. Clermont-Ferrand*, 317 pp.
- Aminot A., M. Chaussepied (eds), 1983 - *Manuel des analyses chimiques en milieu marin*. Publ. CNEXO, Brest, 395 pp.
- Ammerman J.W., F. Azam, 1985 - Bacterial 5'-nucleotidase in aquatic ecosystems: A novel mechanism of phosphorus regeneration. *Science*, **227** : 1338-1340.
- Atkinson D.E., 1968 - The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry*, **7** : 4030-4034.
- Atkinson D.E., 1971 - Adenine nucleotides as stoichiometric coupling agents in metabolism and as regulatory modifiers. *In* : *Metabolic pathways*. H. Vogel (ed.), Academic Press, N.Y., pp. 1-21
- Bender M., K. Grande, K. Johnson, J. Marra, P.J. LeB. Williams, J. Sieburth, M. Pilson, C. Langdon, G. Hitchcock, J. Orchard, C. Hunt, P. Donaghay, K. Heineemann, 1987 - A comparison of four methods for determining plankton community production. *Limnol. Oceanogr.*, **32** : 1085-1098.
- Berland B.R., D.J. Bonin, P.L. Laborde, S.Y. Maestrini, 1972 - Variations de quelques facteurs estimatifs de la biomasse, et en particulier de l'ATP, chez plusieurs algues marines planctoniques. *Mar. Biol.*, **13** : 338-345.
- Bianchi M., D. Marty, J.C. Bertrand, P. Caumette, M. Gauthier et coll. (eds), 1989 - *Microorganismes dans les écosystèmes océaniques*. Masson, Paris, 447 pp.
- Billen G., P. Servais, S. Becquevort, 1990 - Dynamics of bacterioplankton in oligotrophic and eutrophic aquatic environments: Bottom-up or top-down control ? *In* : *Fluxes between trophic levels and through the water-sediment interface*. D.J. Bonin, H.L. Golterman (eds), *Hydrobiologia*, **207** : 37-42.
- Bohlool B.B., E.L. Schmidt, 1980 - The immunofluorescence approach in microbial ecology. *In* : *Advances in microbial ecology*. M. Alexander (ed.), Plenum Press, N.Y., vol. **4** : 203-241.
- Bomsel J.L., A. Pradet, 1967 - Étude des adénosines-5-mono, di et triphosphates dans les tissus végétaux. II. Evolution in vivo de l'A.T.P., de l'A.D.P. et de l'A.M.P. dans les feuilles de blé en fonction de différentes conditions de milieu. *Physiol. vég.*, **5** : 223-236.
- Boucher N., D. Vaultot, F. Partensky, 1991 - Flow cytometric determination of phytoplankton DNA in cultures and oceanic populations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **71** : 75-84.
- Brand L.E., R.R.L. Guillard, L. Murphy, 1981 - A method for the rapid and precise determination of acclimated phytoplankton reproduction rates. *J. Plankton Res.*, **3** : 193-201.
- Bratbak G., 1985 - Bacterial biovolume and biomass estimations. *Appl. envir. Microbiol.*, **49** : 1488-1493.
- Bratbak G., M. Heldal, S. Norland, T.F. Thingstad, 1990 - Viruses as partners in spring bloom microbial trophodynamics. *Appl. envir. Microbiol.*, **56** : 1400-1405.
- Brock T.D., 1983 - *Membrane filtration. A user's guide and reference manual*. Publ. Sci. Techn. Inc., Madison, Wisconsin : 381 pp.
- Bugeaille M., J.C. Relexans, E. His, R.G. Lin, 1987 - Activité des systèmes transporteurs d'électrons (ETS) et biomasses de dix phyto-planctones marins cultivés in vitro. *C.R. Acad. Sci. Paris, sér. III*, **304** : 351-354.
- Carpenter E.J., J. Chang, 1988 - Species-specific phytoplankton growth rates via diel DNA synthesis cycles. I. Concept of the method. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **43** : 105-111.
- Ceccaldi H.J., 1981 - Evolution des concepts concernant l'utilisation des méthodes de la physiologie et de la biochimie en Océanographie et en Biologie marine. *Océanis*, **7** : 489-509.
- Cochlan W.P., J. Wikner, G.F. Stewart, D.C. Smith, F. Azam, 1993 - Spatial distribution of viruses, bacteria and chlorophyll a in neritic, oceanic and estuarine environments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **92** : 77-87.
- Costerton J.W., R.R. Colwell (eds), 1979 - *Native aquatic bacteria: enumeration, activity and ecology*. Amer. Soc. Testing Materials, Baltimore, 214 pp.
- Culien J.J., E.H. Renger, 1979 - Continuous measurement of the DCMU-induced fluorescence response of natural phytoplankton populations. *Mar. Biol.*, **53** : 13-20.
- Cunningham A., 1990 - A low-cost, portable flow cytometer specifically designed for phytoplankton analysis. *J. Plankton Res.*, **12** : 149-160.
- Daley R.J., J.E. Hobbie, 1975 - Direct counts of aquatic bacteria by a modified epifluorescence technique. *Limnol. Oceanogr.*, **20** : 875-882.
- Daumas R.A., M. Fiala, 1969 - Evaluation de la matière organique vivante dans les eaux marines par la mesure de l'adénosine triphosphate. *Mar. Biol.*, **3** : 243-246.
- Davis W.M., D.C. White, 1980 - Fluorometric determination of the adenosine nucleotide derivatives as measures of the microfouling, detrital, and sedimentary microbial biomass and physiological status. *Appl. environ. Microbiol.*, **40** : 539-548.
- Descolas-Gros C., 1980 - Use of track autoradiography in oceanography : evaluation of phytoplankton species productivity. *J. Plankton Res.*, **2** : 23-32.
- Descolas-Gros C., L. Oriol, 1992 - Variations in carboxylase activity in marine phytoplankton cultures. β -carboxylation in carbon flux studies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **85** : 163-169.
- Dodson A.N., W.H. Thomas, 1964 - Concentrating plankton in a gentle fashion. *Limnol. Oceanogr.*, **9** : 455-456.
- Douglas D.J., 1984 - Microautoradiography-based enumeration of photo-synthetic picoplankton with estimates of carbon-specific growth rates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **14** : 223-228.
- Dutton R.J., G. Hitton, H. Koopman, 1983 - Malachite-green-INT (MINT) method for determining active bacteria in sewage. *Appl. envir. Microbiol.*, **46** : 1263-1267.

- Estep K.W., F. MacIntyre, E. Hjørleifsson, J. McN. Sieburth, 1986 - MacImage: a user-friendly image-analysis system for the accurate mensuration of marine organisms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **33** : 243-253.
- Falkowski P.G. (ed.), 1980 - *Primary productivity in the sea*. Plenum Press, N.Y., 531 pp.
- Fasham M.J.R., 1984 - *Flows of energy and materials in marine ecosystems. Theory and practice*. Plenum Press, N.Y., 733 pp.
- Francisco D.E., R.A. Mah, A.C. Rabin, 1973 - Acridine orange epifluorescence technique for counting bacteria in natural waters. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, **92** : 416-421.
- Furhman J.A., F. Azam, 1980 - Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia, Antarctica and California. *Appl. envir. Microbiol.*, **39** : 1085-1095.
- Fuhrman J.A., H.W. Ducklow, D.L. Kirchman, J. Hudak, G.B. McManus, J. Kramer, 1986 - Does adenine incorporation into nucleic acids measure total microbial production? *Limnol. Oceanogr.*, **31** : 627-636.
- Furnas M.J., 1990 - *In situ* growth rates of marine phytoplankton : approaches to measurement, community and species growth rates. *J. Plankton Res.*, **12** : 1117-1151.
- Furuya K., 1982 - Measurement of phytoplankton standing stock using an image analyzer system. *Bull. Plankton Soc. Japan*, **29** : 131-132.
- Furuya K., W.K.W. Li, 1992 - Evaluation of photosynthetic capacity in phytoplankton by flow cytometric analysis of DCMU-enhanced chlorophyll fluorescence. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **88** : 279-287.
- Ganf G.G., S.J.L. Stone, R.L. Oliver, 1986 - Use of protein to carbohydrate ratios to analyse for nutrient deficiency in phytoplankton. *Aust. J. mar. Freshw. Res.*, **37** : 183-197.
- Gieskes W.W.C., G.W. Kraay, 1989 - Estimating the carbon-specific growth rate of the major algal species groups in eastern Indonesian water with ¹⁴C labeling of taxon-specific carotenoids. *Deep-Sea Res.*, **36** : 1127-1139.
- Glibert P.M., F. Lipschultz, J.J. McCarthy, M.A. Altabet, 1982 - Isotope dilution models of uptake and remineralization of ammonium by marine plankton. *Limnol. Oceanogr.*, **27** : 639-650.
- Goericke R., N.A. Welschmeyer, 1993 - The chlorophyll-labeling method : measuring specific rates of chlorophyll *a* synthesis in cultures and in the open ocean. *Limnol. Oceanogr.*, **38** : 80-95.
- Gonzalez J.M., C.A. Suttle, 1993 - Grazing by marine nanoflagellates on viruses and virus-sized particles : ingestion and digestion. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **94** : 1-10.
- Grande K.D., P.J. LeB. Williams, J. Marra, D.A. Purdie, K. Heinemann, R.W. Eppley, M.L. Bender, 1989 - Primary production in the North Pacific gyre : a comparison of rates determined by the ¹⁴C, O₂ concentration and ¹⁸O methods. *Deep-Sea Res.*, **36** : 1621-1634.
- Hallegraeff G.M., 1977 - A comparison of different methods used for the quantitative evaluation of biomass of freshwater phytoplankton. *Hydrobiologia*, **55** : 145-165.
- Hagstrom A., U. Larsson, L.P. Horstedt, S. Normark, 1979 - Frequency of dividing cells, a new approach to the determination of bacterial growth rates in aquatic environments. *Appl. envir. Microbiol.*, **37** : 805-812.
- Harris G.P., 1984 - Phytoplankton productivity and growth measurements: past, present and future. *J. Plankton Res.*, **6** : 219-237.
- Head E.J.H., L.R. Harris, 1992 - Chlorophyll and carotenoid transformation and destruction by *Calanus* spp. grazing on diatoms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **86** : 229-238.
- Heldal M., S. Norland, O. Tumor, 1985 - X-ray microanalytic method for measurement of dry matter and elemental content of individual bacteria. *Appl. envir. Microbiol.*, **50** : 1251-1257.
- Hellebust J.A., J.S. Craigie (eds), 1978 - *Handbook of phyco-logical methods. Physiological and biochemical methods*. Cambridge Univ. Press, 511 pp.
- Hinga K.R., P.G. Davis, J. McN. Sieburth, 1979 - Enclosed chambers for the convenient reverse flow concentration and selective filtration of particles. *Limnol. Oceanogr.*, **24** : 536-540.
- Hitchcock G.L., 1983 - An examination of diatom area: volume ratios and their influence on estimates of plasma volume. *Plankton Res.*, **5** : 311-324.
- Hobbie J.E., P.J. le B. Williams (eds), 1984 - *Heterotrophic activity in the sea*, Plenum Press, N.Y., 569 pp.
- Holm-Hansen O., C.R. Booth, 1966 - The measurement of adenosine triphosphate in the ocean and its ecological significance. *Limnol. Oceanogr.*, **11** : 510-519.
- Iturriaga R., A. Zsolnay, 1981 - Differentiation between auto- and heterotrophic activity : Problems in the use of size fractionation and antibiotics. *Bot. mar.*, **24** : 399-404.
- Jannasch H.W., G.E. Jones, 1959 - Bacterial populations in sea water as determined by different methods of enumeration. *Limnol. Oceanogr.*, **4** : 128-139.
- Johnson K.S., R.M. Pytkowicz, C.S. Wong, 1979 - Biological production and the exchange of oxygen and carbon dioxide across the sea surface in Stuart Channel, British Columbia. *Limnol. Oceanogr.*, **24** : 474-482.
- Johnson P.W., J. McN. Sieburth, 1979 - Chroococcoid cyanobacteria in the sea : A ubiquitous and diverse phototrophic biomass. *Limnol. Oceanogr.*, **24** : 928-935.
- Johnson P.W., J. McN. Sieburth, 1982 - *In situ* morphology and occurrence of eucaryotic phototrophs of bacterial size in the picoplankton of estuarine and oceanic waters. *J. Phycol.*, **18** : 318-327.
- Jonge V.N. de, 1980 - Fluctuations in the organic carbon to chlorophyll *a* ratios for estuarine benthic diatom populations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **2** : 345-353.
- Karl D.M., 1980 - Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology. *Microb. Rev.*, **44** : 739-796.
- Karl D.M., 1986 - Determination of *in situ* microbial biomass, viability, metabolism and growth *In: Bacteria in nature*, J.S. Poindexter, E.R. Leadbetter (eds), Plenum Press, pp. 85-176.
- Karl D.M., C.D. Winn, 1984 - Adenine metabolism and nucleic acid synthesis: Applications to microbial oceanography. *In: Heterotrophic activity in the sea*, J.E. Hobbie, P.J. leB Williams (eds), Plenum Press, N.Y., pp. 197-215.
- Kirchman D.L., S.Y. Newell, R.E. Hodson, 1986 - Incorporation versus biosynthesis of leucine: Implications for measuring rates of protein synthesis and biomass production by bacteria in marine systems. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **32** : 47-59.
- Kovala P.E., J.D. Larrance, 1966 - Computation of phytoplankton cell numbers, cell volume, cell surface and plasma volume per liter, from microscopical counts. *Dep. Oceanogr., Univ. Wash., Seattle, Spec. Rep.* **38** : 80 pp.
- Krossbacher M., A. Alfreider, R. Psenner, 1992 - A methodological comparison of bacterial growth and production measurements. *Arch. Hydrobiol., Beih. Ergebn. Limnol.*, **37** : 63-72.
- Landry M.R., R.P. Hassett, 1982 - Estimating the grazing impact of marine micro-zooplankton. *Mar. Biol.*, **67** : 283-288.

- Leftley J.W., D.J. Bonin, S.Y. Maestrini, 1983 - Problems in estimating marine phytoplankton growth, productivity and metabolic activity in nature: An overview of methodology. *Oceanogr. mar. Biol., Ann. Rev.*, **21** : 23-66.
- Le Gal Y., 1988 - *Biochimie marine*. Masson, Paris, 285 pp.
- Lehninger A.L., 1973 - *Biochimie. Bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires*. Flammarion, Paris, 1088 pp.
- Li W.K.W., 1986 - Experimental approaches to field measurements: Methods and interpretation. In : *Photosynthetic picoplankton*, T. Platt, W.K.W. Li (eds), *Can. Bull. Fish. aquat. Sci.*, **214** : 251-286.
- Li W.K.W., P.M. Dickie, 1985 - Metabolic inhibition of size-fractionated marine plankton radiolabeled with amino acids, glucose, bicarbonate, an phosphate in the light and dark. *Microb. Ecol.*, **11** : 11-24.
- Lorenzen C.J., 1966 - A method for the continuous measurement of *in vivo* chlorophyll concentrations. *Deep-Sea Res.*, **13** : 223-227.
- Lorenzen C.J., 1967 - Determination of chlorophyll and pheo-pigments: spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.*, **12** : 343-346.
- Mackas D., R. Bohrer, 1976 - Fluorescence analysis of zooplankton gut contents and an investigation of diel feeding patterns. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, **25** : 77-85.
- Madariaga I. de, I. Joint, 1992 - A comparative study of phytoplankton physiological indicators. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, **158** : 149-165.
- Maddux W.S., J.W. Kanwisher, 1965 - An *in situ* particle counter. *Limnol. Oceanogr.*, **10** suppl. : R162-R168.
- Maestrini S.Y., A. Sournia, A. Herbrand, sous presse - Measuring phytoplankton production in 1992 and coming years : a dilemma ? In : *Measurement of primary production from the molecular to the global scale*. W.K.W. Li, S.Y. Maestrini (eds), ICES Mar. Sci. Symp.
- Mantoura R.F.C., C.A. Llewellyn, 1983 - The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, **151** : 297-314 .
- Mayzaud P., S.A. Poulet, 1978 - The importance of the time factor in the response of zooplankton to varying concentrations of naturally occurring particulate matter. *Limnol. Oceanogr.*, **23** : 1144-1154.
- Mc Duff R.E., S.W. Chisholm, 1982 - The calculation of *in situ* growth rates of phytoplankton populations from fractions of cells undergoing mitosis : a clarification. *Limnol. Oceanogr.*, **27** : 783-788.
- Moal J., J.F. Samain, J.F. Le Coz, J.Y. Daniel, 1985 - Protéines, glucides et lipides particuliers : aspects méthodologiques. *Océanis*, **11** : 487-502.
- Moal J., V. Martin-Jézéquel, R.P. Harris, J.F. Samain, S.A. Poulet, 1987 - Interspecific and intraspecific variability of the chemical composition of marine phytoplankton. *Oceanol. Acta*, **10** : 339-346.
- Moriarty D.J.W., 1975 - A method for estimating the biomass of bacteria in aquatic sediments and its application to trophic studies. *Oecologia*, **20** : 219-229.
- Moriarty D.J.W., 1984 - Measurements of bacterial growth rates in some marine systems using the incorporation of tritiated thymidine into DNA. In : *Heterotrophic activity in the sea*. J.E. Hobbie, P.J. leB Williams (eds), Plenum Press, N.Y., pp. 217-231.
- Morris I. (ed.), 1980 - *The physiological ecology of phytoplankton*. Blackwell Sci. Publ., Oxford, 625 pp.
- Mortensen U., B. Noren, I. Wadso, 1973 - Microcalorimetry in the study of the activity of microorganisms. *Bull. Ecol. Res. Comm.* (Stockholm), **17** : 189-197.
- Neveux J., M. Panouse, 1987 - Spectrofluorometric determination of chlorophylls and pheophytins. *Arch. Hydrobiol.*, **109** : 567-581.
- Olson R.J., D. Vulot, S.W. Chisholm, 1985 - Marine phytoplankton distributions measured using shipboard flow cytometry. *Deep-Sea Res.*, **32** : 1273-1280.
- Omori M., T. Ikeda, 1984 - *Methods in marine zooplankton ecology*. John Wiley & Sons, New York, 332 pp.
- Packard T.T., 1985 - Measurement of electron transport activity of microplankton. *Adv. aquat. Microbiol.*, **3** : 207-261 .
- Pamatmat M.M., S. Findlay, 1983 - Metabolism of microbes, nematodes, polychaetes and their interactions in sediment, as detected by heat flow measurements. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **11** : 31-38.
- Parsons T.R., J.D.H. Strickland, 1962 - On the production of particulate organic carbon by heterotrophic processes in sea water. *Deep-Sea Res.*, **8** : 211-222.
- Parsons T.R., Y. Maita, C.M. Lalli, 1984 - *A manual of chemical and biological methods for seawater analysis*. Pergamon Press, Oxford, 173 pp.
- Peterson B.J., 1980 - Aquatic primary productivity and the ¹⁴C-CO₂ method : a history of the productivity problem. *Ann. Rev. Ecol. System.*, **11** : 359-385.
- Platt T., ed., 1981 - Physiological bases of phytoplankton ecology. *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.*, **210** : 346 p.
- Porter K.G., Y.S. Feig, 1980 - The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, **25** : 943-948.
- Proctor L.M., Fuhrman J.A., 1991 - Roles of viral infection inorganic particle flux. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **69** : 133-142.
- Psenner R., R. Sommaruga, 1992 - Are rapid changes in bacterial biomass caused by shifts from top-down to bottom-up control ? *Limnol. Oceanogr.*, **37** : 1092-1100.
- Rachiq S., C. Amblard, G. Bourdier, 1991 - Hétérotrophie algale : effets de la gentamycine et de la cycloheximide sur les activités hétérotrophes et photosynthétiques des bactéries et des algues. *Rev. Sci. Eau*, **4** : 343-361.
- Raimbault P., G. Slawyk, 1991 - A semi-automatic, wet-oxidation method for the determination of particulate organic nitrogen collected on filters. *Limnol. Oceanogr.*, **36** : 405-408
- Raymont E.G., 1980 - *Plankton and productivity in the oceans. 1. Phytoplankton*. Pergamon Press, Oxford, 489 pp.
- Redalje D.G., E.A. Laws, 1981 - A new method for estimating phytoplankton growth rates and carbon biomass. *Mar. Biol.*, **62** : 73-79.
- Redfield A.C., B.H. Ketchum, F.A. Richards, 1963 - The influence of organisms on the composition of sea-water. In : *The sea. Ideas and observations on progress in the study of the seas*, M.N. Hill (ed.), Interscience Publ., New York, vol. 2, pp. 26-77.
- Revsbech N.P., B.B. Jorgensen, 1986 - Microelectrodes : their use in microbial ecology. *Adv. Microbiol. Ecol.*, **9** : 293-352 .
- Richards F.A., T.G. Thompson, 1952 - The estimation and characterization of plankton populations by pigment analysis. II. A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments. *J. mar. Res.*, **11** : 156-172.
- Riemann B., R.T. Bell, 1990 - Advances in estimating bacterial biomass and growth in aquatic systems. *Arch. Hydrobiol.*, **118** : 385-402.
- Rivkin R.B., 1986 - Incorporation of tritiated thymidine by

- eucaryotic microalgae. *J. Phycol.*, **22** : 193-198.
- Rivkin R.B., H.H. Seliger, 1981 - Liquid scintillation counting for ^{14}C uptake of single algal cells isolated from natural samples. *Limnol. Oceanogr.*, **26** : 780-785.
- Romano J.C., 1975 - Les adénosines-5'-phosphates (ATP, ADP, AMP) chez des algues phytoplanctoniques. Rôle pour la mesure indirecte de la biomasse. *C.R. Acad. Sci. Paris*, sér. D, **281** : 1027-1030.
- Salaun R., G. Bertru, 1987 - Influence des teneurs en phosphate sur les contenus intra et extracellulaires en composés adényliques. *Arch. Hydrobiol.*, **109** : 511-518.
- Samuelsson G., G. Oquist, 1977 - A method for studying photosynthetic capacities of unicellular algae based on *in vivo* chlorophyll fluorescence. *Physiol. Plant.*, **40** : 315-319.
- Sanders R.W., K.G. Porter, 1986 - Use of metabolic inhibitors to estimate protozooplankton grazing and bacterial production in a monomictic eutrophic lake with an anaerobic hypolimnion. *Appl. env. Microbiol.*, **52** : 101-107.
- Sathyendranath S., 1986 - Remote sensing of phytoplankton: a review, with special reference to picoplankton. In : *Photosynthetic picoplankton*. T. Platt, W.K.W. Li (eds), *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.*, **214** : 561-583.
- Scott J.M., J.A. Marlow, 1982 - A microcalorimeter with a range of 0.1 - 1.0 calories. *Limnol. Oceanogr.*, **27** : 585-590.
- Shapiro H.M., 1985 - *Practical flow cytometry*. Allan Liss Inc. Publ., N.Y., 295 pp.
- Sheldon R.W., T.R. Parsons, 1967 - *A practical manual on the use of the Coulter Counter in marine science*. Coulter Electronic Sales Co Publ., Toronto, 66 pp.
- Sheldon R.W., F. Rassoulzadegan, 1987 - A method for measuring plankton production by particle counting. *Mar. Microb. Food Webs*, **2** : 29-44.
- Sieburth J. McN., V. Smetacek, J. Lenz, 1978 - Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnol. Oceanogr.*, **23** : 1256-1263.
- Sieracki M.E., P.W. Johnson, J. McN. Sieburth, 1985 - The detection, enumeration and sizing of aquatic bacteria by image analysis epifluorescence microscopy. *Appl. env. Microbiol.*, **49** : 799-810.
- Siegh M.A. (ed.), 1987 - *Microbes in the sea*. Ellis Horwood Ltd, Chichester, 241 pp.
- Sournia A. (ed.), 1978 - *Phytoplankton manual*. UNESCO, Paris, 337 pp.
- Steedman H.F. (ed.), 1976 - *Zooplankton fixation and preservation*. UNESCO, Paris, 350 pp.
- Stemann Nielsen E., 1952 - The use of radio-active carbon (C^{14}) for measuring organic production in the sea. *J. Cons. perm. int. Explor. Mer*, **18** : 117-140.
- Stein J.R. (ed.), 1973 - *Handbook of phycollogical methods. Culture methods and growth measurements*. Cambridge Univ. Press, 448 pp.
- Stewart W.D.P., 1973 - Nitrogen fixation. In : *The biology of blue-green algae*. N. Carr, B.A. Whitton (eds), Blackwell Scientific Publ., Oxford, pp. 260-278.
- Strehler B.R., J.R. Totter, 1952 - Firefly luminescence in the study energy transfer mechanisms. I. Substrate and enzyme determination. *Arch. Biochem. Biophys.*, **40** : 28-41.
- Suttle C.A., A.M. Chan, M.T. Cottrell, 1991 - Use of ultrafiltration to isolate viruses from seawater which are pathogens of marine phytoplankton. *Appl. env. Microbiol.*, **57** : 721-726.
- Swift E., E.G. Durbin, 1972 - The phased division and cytological characteristics of *Pyrocystis* spp. can be used to estimate doubling times of their populations in the sea. *Deep-Sea Res.*, **19** : 189-198.
- Taylor A.H., A.J. Watson, J.E. Robertson, 1992 - The influence of the spring phytoplankton bloom on carbon dioxide and oxygen concentrations in the surface waters of the northeast Atlantic during 1989. *Deep-Sea Res.*, **39** : 137-152.
- Torretton J.P., 1991 - Importance des bactéries hétérotrophes aérobies dans une lagune eutrophe tropicale (Lagune Ebrié, Côte d'Ivoire). Biomasse, production, exportation. Thèse Doct. Univ. Aix-Marseille II, 246 pp., Travaux et Documents microédités, 1992, ORSTOM ed., Paris, n° 86.
- Van Cleve K., P.I. Coyne, E. Goodwin, C. Johnson, M. Kelley, 1979 - A comparison of four methods for measuring respiration in organic materials. *Soil Biol. Biochem.*, **11** : 237-246.
- Van Vambeke F., 1988 - Numération et taille des bactéries planctoniques au moyen de l'analyse d'images couplée à l'épifluorescence. *Ann. Inst. Pasteur, Microbiol.*, **139** : 261-272.
- Vaulot D., 1992 - Estimate of phytoplankton division rates by the mitotic index method: the fmax approach revisited. *Limnol. Oceanogr.*, **37** : 644-649.
- Vaulot D., F. Partensky, 1992 - Cell cycle distributions of prochlorophytes in the northwestern Mediterranean Sea. *Deep-Sea Res.*, **39** : 727-742.
- Verity P.G., C.Y. Robertson, C.R. Tronzo, M.G. Andrews, J.R. Nelson, M.E. Sieracki, 1992 - Relationships between cell volume and the carbon and nitrogen content of marine photosynthetic nanoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, **37** : 1434-1446.
- Vernet M., C.J. Lorenzen, 1987 - The relative abundance of pheophorbide *a* and pheophytine *a* in temperate marine waters. *Limnol. Oceanogr.*, **32** : 352-358.
- Vollenweider R.A. (ed.), 1974 - *A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments*. Blackwell Sci. Publ., Oxford, 225 pp.
- Waterbury J.B., S.W. Watson, R.R.L. Guillard, L.E. Brand, 1979 - Widespread occurrence of a unicellular, marine, planktonic cyanobacterium. *Nature (Lond.)*, **277** : 293-294.
- Weiler C.S., R.W. Eppley, 1979 - Temporal pattern of division in the dinoflagellate genus *Ceratium* and its application to the determination of growth rate. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, **39** : 1-24.
- Wetzel R.G., 1983 - *Limnology*. Saunders College Publ., Philadelphia, 767 pp.
- Wiggins B.A., M. Alexander, 1985 - Minimum bacterial density for bacteriophage replication : Implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems. *Appl. env. Microbiol.*, **49** : 19-23.
- Williams P.J. LeB., R.C.T. Raine, J.R. Bryan, 1979 - Agreement between the ^{14}C and oxygen methods of measuring phytoplankton production: reassessment of the photosynthetic quotient. *Oceanol. Acta*, **2** : 411-416.
- Yentsch C.S., D.W. Menzel, 1963 - A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. *Deep-Sea Res.*, **10** : 221-231.
- Yentsch C.S., C.M. Yentsch, 1979 - Fluorescence spectral signatures: The characterization of phytoplankton populations by the use of excitation and emission spectra. *J. mar. Res.*, **37** : 471-483.

