

Université des Sciences et Technologies de Lille

Ecole Doctorale des Sciences pour l'Ingénieur de Lille

THESE

pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université des Sciences et Technologies de Lille

Discipline : Instrumentation et Analyses Avancées

présentée par

Mohamed BOUZIANE



Etude physico-chimique de l'accumulation de métaux lourds

par les lichens

*Impacts sur les voies de biosynthèse et interprétation
du mécanisme de tolérance chez Diploschistes muscorum*

Soutenue publiquement le 10 février 2006 devant le jury :

Mme C. VAN HALUWYN, Professeur, Université du Droit et de la Santé, Lille

Rapporteur

Mr M. DRAOUI, Professeur, Université Mohamed V de Rabat, Maroc

Rapporteur

Mr P. LEGRAND, Professeur, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq

Mr B. MERNARI, Professeur, Université d'El Jadida, Maroc

Mr D. CUNY, Maître de Conférences, Université du Droit et de la Santé, Lille

Mr A. SEMMOUD, Maître de Conférences HDR, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq

Mr J.P. HUVENNE, Professeur, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq

Je dédie cette thèse à mes parents mais aussi à mes frères et sœurs qui m'ont toujours soutenu dans mes choix.

Merci pour votre aide, vos conseils et vos encouragements qui restent des termes trop faibles pour décrire leurs apports.

Merci pour tout l'amour que vous me donnez.

Remerciements

Remerciements

Savoir remercier ses proches et ses collaborateurs à la hauteur du soutien et des services qu'ils vous ont accordés, est une tâche difficile et j'espère n'oublier personne.

Je tiens tout d'abord à exprimer mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur Jean-Pierre HUVENNE, pour l'accueil qu'il m'a réservé au sein de son équipe et pour ses nombreuses idées fructueuses, ses conseils judicieux dans un domaine qui m'était inconnu et ses encouragements. Qu'il soit assuré de toute ma reconnaissance.

Un énorme merci à Monsieur Ahmed SEMMOUD pour sa disponibilité, pour sa pédagogie et surtout pour ses qualités humaines qui seraient bien trop longues à énumérer. Merci de me faire l'honneur d'être membre de ce jury.

Comment dire ma gratitude à Monsieur Mustapha DRAOUI, Professeur à la Faculté de Pharmacie de l'Université Mohamed V de Rabat, pour l'intérêt qu'il a manifesté pour ce travail. Sa gentillesse, sa rigueur, sa compétence et ses connaissances dans le domaine de la chimie resteront pour moi un exemple. Je suis très sensible à l'honneur qu'il me fait en acceptant d'être parmi le jury de cette thèse et d'avoir en plus rapporté ce travail.

Merci à Madame le Professeur Chantal VAN HALUWYN pour sa maîtrise et sa passion de la lichénologie, transformant cette science en véritable plaisir, et surtout pour m'avoir constamment soutenu et encouragé. J'ai beaucoup apprécié ses remarques pertinentes et ses suggestions auxquelles je prêtai la plus grande attention. Merci d'avoir accepté de rapporter de ce travail de recherche. Merci pour la récolte du *Diploschistes muscorum* de Merlimont et du *Solorina crocea*.

Merci à Monsieur le Docteur Damien CUNY pour avoir accepté de juger ce travail ainsi que l'intérêt qu'il a toujours marqué pour mon travail. Nos discussions conceptuelles et techniques m'ont souvent été très utiles. Je lui suis reconnaissant pour ses conseils avisés, le soutien et la confiance qu'il m'a accordés tout au long de ces années de recherche ainsi que pour les précieux documents bibliographiques.

Je suis très honoré que Monsieur Pierre LEGRAND, Professeur à l'Université des Sciences et Technologies de Lille, ait accepté d'examiner ce travail. Qu'il soit assuré de toute ma reconnaissance.

Un merci chaleureux à Monsieur Bouchaïb MERNARI pour faire partie de ce jury malgré un emploi du temps très chargé ainsi que l'intérêt qu'il a toujours marqué pour les activités du laboratoire.

Qu'il me soit permis d'exprimer ma respectueuse reconnaissance et ma sincère gratitude à Monsieur Salah-Eddine GUESMI du Laboratoire de Chimie de Coordination et Analytique d'Eljadida (Maroc) pour m'avoir soulagé dans mon travail aux moments où j'en avais le plus besoin mais aussi pour ces conseils éclairés et les connaissances scientifiques dans le domaine de la chimie de coordination qu'il m'a transmis.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur Bernard SOMBRET, Ingénieur de recherche au Laboratoire LASIR, qui m'a beaucoup aidé pour la réalisation et l'interprétation des spectres Infrarouge.

Mes recherches m'ont fait découvrir de nombreux laboratoires où j'ai reçu un accueil chaleureux. Je tiens à remercier pour leur compétence et leur gentillesse les équipes qui m'ont accueilli.

Merci à Monsieur le Professeur D. Couturier du Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire, pour son sympathique accueil au sein de son équipe et pour ses conseils avisés en ce qui concerne la séparation des substances lichéniques. Un grand merci à Monsieur Philippe HERIN, qui a toujours su se rendre disponible pour la mise au point des différents techniques chromatographiques de séparation des acides lichéniques par HPLC ou sur colonne ouverte. Merci pour son amitié tout simplement.

Au centre commun de masse de l'université des Sciences et Technologies de Lille, Monsieur Guy RICART m'a fait partager ce domaine. Je le remercie pour la réalisation et l'interprétation des spectres de masse.

Merci à Monsieur Bagdad OUDDANE du laboratoire de Chimie Analytique et Marine pour les dosages des cations par ICP-AES. Je le remercie particulièrement pour sa gentillesse, sa patience et ses qualités humaines innombrables.

Parce qu'un laboratoire est aussi un lieu de vie, de sociabilité et de convivialité, il faut également citer tous ceux qui ont contribué à rendre ces trois années inoubliables : Maazouz, Waiss, Pascal, Christophe, Yves, Mouloud, Ludo, Cyril, Jean-Noël, Mohamed, Denis, Malika, Joël, Zeggari, Séverine, Lionel et Alexandra.

En fait, je tiens à adresser un grand merci global à tout le monde au laboratoire, personnels et enseignants. Que toutes ces personnes soient assurées de ma sincère gratitude.

Merci à tous mes amis pour leur fidélité en amitié et leur joie de vivre.

Que tous mes amis de longue date ou plus récents trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	13
CHAPITRE I :.....	17
PRESENTATION GENERALE DES LICHENS ET DE LEURS POTENTIALITES	
BIOINDICATRICES.	17
I.1	Généralités sur la biosurveillance de la qualité de l'air par les lichens..... 18
I.1.1	Morphologie des lichens. 18
I.1.2	Chimie des lichens. 21
I.1.2.1	Substances contenues dans les cellules 21
I.1.2.2	Substances contenues dans les membranes 21
I.1.2.3	Substances rejetées à l'extérieur des cellules. 22
I.1.3	Principales voies de biosynthèse des substances lichéniques..... 22
I.1.3.1	Voie de l'acétyl-polymalonyle. 23
I.1.3.2	Voie de l'acide Mévalonique. 27
I.1.3.3	Voie de l'acide Shikimique. 29
I.1.4	Importance des substances lichéniques 30
I.1.5	Caractéristiques spécifiques des lichens 31
I.1.6	Usage des lichens pour la biosurveillance de la qualité de l'air (Garrec & Van Haluwyn (2002)).... 32
I.1.6.1	La biosurveillance végétale. 32
I.1.6.2	Définition des concepts 34
I.1.6.3	Intérêts et limites des méthodes de biodétection par rapport aux méthodes physico-chimiques 36
I.1.6.4	Principes de la biosurveillance lichénique..... 37
I.2	Spéciation chimique des éléments dans un organisme vivant. 40
I.3	Stress oxydatif 44
I.3.1	Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO). 44
I.3.2	Mécanismes de détoxification des ERO..... 45
CHAPITRE II.....	50
ETUDE ANALYTIQUE DE LA BIOACCUMULATION DES METAUX LOURDS	
PAR LE DIPLOSCHISTES MUSCORUM.	50
II.1	Description des sites étudiés. 51
II.1.1	Site métallifère. 51
II.1.2	Sites témoins 53
II.2	Description de l'espèce étudiée 55
II.2.1	Systématique du <i>Diploschistes muscorum</i> (scop) R. Sant..... 55
II.2.2	Réactions colorées..... 56

II.2.3	Développement du <i>Diploschistes muscorum</i>	57
II.3	Mécanismes d'absorption des éléments traces métalliques par les lichens	59
II.3.1.1	Le piégeage des particules	59
II.3.1.2	Adsorption extracellulaire	61
II.3.1.3	Absorption intracellulaire	62
II.4	Détermination des éléments traces dans les thalles lichéniques.	63
II.4.1	Récoltes des lichens	63
II.4.2	Préparation des thalles	63
II.4.3	Analyse par Spectrométrie d'Emission Atomique ICP-AES	64
II.4.4	Résultats du dosage des éléments traces.	66
II.4.5	Dosage élémentaire des thalles lichéniques.	67
II.5	Etude de modèles moléculaires et leurs réactivités vis-à-vis des métaux traces.	70
II.5.1	Le spectre infrarouge	70
II.5.2	Théorie de la spectroscopie vibrationnelle.....	70
II.5.3	Description d'un spectromètre IRTF.....	73
II.5.4	Spectrométrie d'absorption dans l'infrarouge moyen.....	76
II.5.5	Analyse des polluants atmosphériques.....	77
II.5.6	Spectrométrie de réflexion dans l'infrarouge moyen.....	78
II.5.7	Réflexion totale atténuée (ATR).....	78
II.5.8	Etude des interactions molécules modèles-zinc.	80
II.5.8.1	Modèles moléculaires	81
II.5.8.2	Application aux composés lichéniques.....	92
II.5.9	Evaluation des capacités d'accumulation du zinc par les substances lichéniques.....	100
II.5.10	Etude de l'accumulation du zinc par le <i>Diploschistes muscorum</i>	103
II.5.10.1	Analyse par IRTF d'un lichen témoin et d'un lichen métallifère.	103
II.5.10.2	Evolution des spectres IRTF d'un lichen témoin en fonction de la concentration en zinc.	105
II.5.10.3	Etude de l'échange cationique chez le <i>Diploschistes muscorum</i>	106
CHAPITRE III :		112
IMPACTS DES METAUX LOURDS SUR LES VOIES DE BIOSYNTHESE DES SUBSTANCES LICHENIQUES CHEZ LE DIPLOSCHISTES MUSCORUM.		112
III.1	Protocole d'extraction des substances lichéniques	113
III.2	Stress chimique et perturbation du métabolisme secondaire chez le <i>Diploschistes muscorum</i>.	116
III.2.1	Chromatographie sur couche mince.....	116
III.2.1.1	Description de la technique	116
III.2.1.2	Choix de la phase mobile.....	121

III.2.1.3	Révélation.....	121
III.2.1.4	Résultats	121
III.2.2	Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	124
III.2.2.1	Principe.....	124
III.2.2.2	Conditions d'analyse	125
III.2.2.3	Appareillage	125
III.2.2.4	Spectre d'absorption.....	128
III.2.2.5	Programme d'élution.....	129
III.2.2.6	Calcul des indices de rétention Ir.....	130
III.2.2.7	Résultats	130
III.2.3	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.....	140
III.2.3.1	Description de la technique	140
III.2.3.2	Partie expérimentale	141
III.2.4	Bilan.....	143
III.3	Stress oxydatif, production et localisation des oxalates	144
III.3.1	Origine des groupements fixateurs de métaux.....	144
III.3.2	Lavage à l'eau acidifiée du thalle lichénique.	146
III.3.3	Localisation des oxalates par ATR diamant	148
III.3.4	Origine et devenir des oxalates au sein du thalle lichénique.	150
III.3.5	Dosage enzymatique des oxalates et de l'acide ascorbique.....	152
III.3.5.1	Dosage enzymatique des oxalates (Lartillot et Vogel (1983)).....	152
III.3.5.2	Résultats	152
III.3.5.3	Dosage enzymatique de l'acide ascorbique (Deneke et al (1978)).....	153
III.3.5.4	Résultats	155
III.3.6	Conclusion.....	156
III.4	Adaptation du <i>Diploschistes muscorum</i> à la pollution métallique.....	156
III.4.1	Caractérisation des composés chlorophylliens par HPLC (Kranter <i>et al</i> (2002))	157
III.4.1.1	Extraction	157
III.4.1.2	Conditions de séparation	157
III.4.1.3	Résultats	157
III.4.2	Mesures du taux de dégradation de la chlorophylle a et des teneurs des chlorophylles.....	160
III.4.2.1	Extraction	160
III.4.2.2	Calcul du taux de dégradation de la chlorophylle a.....	160
III.4.2.3	Mesures des teneurs des chlorophylles et des caroténoïdes.....	161
III.4.3	Résultats.....	161
III.4.3.1	Taux de dégradation de la chlorophylle a.....	161
III.4.3.2	Teneurs en chlorophylles et en caroténoïdes.....	164

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES..... 168
BIBLIOGRAPHIE..... 173

Index des figures

Fig. 1: Voies métaboliques conduisant à la formation des substances lichéniques (Howell <i>et al</i> (2003))	23
Fig. 2: Acide orsellinique	24
Fig. 3: Acide β -orsellinique	24
Fig. 4: Acide lécanorique	24
Fig. 5: Acide barbatique	25
Fig. 6: Voie de biosynthèse des depsidones proposée par Elix <i>et al</i> (1987 a)	26
Fig. 7: Acide physodique	27
Fig. 8: Acide psoromorique	27
Fig. 9: Voie de biosynthèse de l'acide mévalonique (Fahselt (1994))	28
Fig. 10: Voie de biosynthèse de l'acide pulvinique et ses dérivés	29
Fig. 11: Principaux effets des polluants chez les végétaux – Interférence des divers paramètres	33
Fig. 12: Présentation des concepts de la biosurveillance de la qualité de l'air en fonction des niveaux d'organisation biologique et de lisibilité des effets	34
Fig. 13: Mode de capture d'éléments du sol	41
Fig. 14: Voies de capture et d'incorporation d'éléments dans un organisme vivant (Frausto da Silva & Williams (2001))	42
Fig. 15: Etapes de transfert d'un élément M, à travers les membranes (Frausto da Silva & Williams (2001))	43
Fig. 16: Formation des Espèces Réactives de l'Oxygène	44
Fig. 17: Voies de détoxification des éléments traces ; (A) : cycle eau-eau, cycle d'ascorbates-glutathion, (D) : mécanisme de détoxification par le catalase. DHA : déhydroascorbate, DHAR : déhydroascorbate réductase, Fd : ferredoxine, GR : glutathion réductase	48
Fig. 18: Localisation et description de la zone métallifère étudiée (Sterckeman <i>et al</i> (2002))	52
Fig. 19 : Localisation des sites témoins. Les deux sites sont notés en vert. (Mappy 2005)	54
Fig. 20 : <i>Diploschistes muscorum</i> (Scop) R. Sant. prélevés sur le site d'Ecault (1) et sur le site d'Auby (2)	55
Fig. 21 : <i>Cladonia chlorophaea</i> du site d'Auby	58
Fig. 22 : <i>Cladonia foliacea</i> du site d'Auby	58
Fig. 23 : <i>Diploschistes muscorum</i> récolté sur le site d'Ecault parasitant un <i>Cladonia chlorophaea</i>	58
Fig. 24 : <i>Diploschistes muscorum</i> du site d'Auby parasitant un <i>Cladonia foliacea</i>	58
Fig. 25 : Source à plasma à couplage inductif (d'après Fassel (1978))	65
Fig. 26 : Courbe d'énergie potentielle en fonction du déplacement (modèle harmonique)	72
Fig. 27 : Courbe d'énergie potentielle en fonction du déplacement (modèle anharmonique)	73
Fig. 28 : Schéma d'un interféromètre de Michelson éclairé par une source monochromatique	74
Fig. 29 : Comparaison entre interférogrammes et spectres optiques ; A : pour une source formée de deux rayonnements, B : pour une source continue	76
Fig. 30 : Réflexion totale à l'interface de deux milieux d'indices différents	79
Fig. 31 : Différentes formes géométriques des cristaux utilisés pour réaliser des mesures	80
Fig. 32 : Formules développées des modèles moléculaires	82
Fig. 33 : Spectres IRTF de l'acide benzoïque et du benzoate de zinc	83
Fig. 34 : Spectres IRTF de l'acide salicylique et du salicylate de zinc	84
Fig. 35 : Spectres IRTF d'acide 3,5 dihydrobenzoïque et 3,5 dihydrobenzoate de zinc	85
Fig. 36 : Spectres IRTF d'acide gallique et du gallate de zinc	86
Fig. 37 : Spectres IRTF d'acide oxalique et d'oxalate de zinc	87
Fig. 38 : Spectres IRTF d'acide ascorbique et d'ascorbate de zinc	88
Fig. 39 : Structures des complexes de cuivre proposées par Stevenson ; A : Formation liaisons hydrogène, B Attraction électrostatique, C : Formation d'une liaison métal-ligand et D : Formation d'un chélate	90
Fig. 40 : Structures d'oxalate et de salicylate de titane proposées par Weisz <i>et al</i> (2002)	91
Fig. 41 : Structure d'ascorbate de zinc proposée par Ünalerğlu <i>et al</i> (2002)	91
Fig. 42 : Formules développées des composés lichéniques	92
Fig. 43 : Spectres IRTF de l'acide usnique et du complexe acide usnique-zinc	93
Fig. 44 : Spectres IRTF de l'atranorinee et du complexe atranorinee-zinc	94
Fig. 45 : Spectres IRTF de l'orcinol et de l'orcinolate de zinc	95
Fig. 46 : Spectres IRTF d'acide lécanorique et du lécanorate de zinc	96
Fig. 47 : Spectres IRTF de l'acide orsellinique et de l'orsellinate de zinc	97
Fig. 48 : Structure proposée du complexe acide usnique-zinc similaire à celle du complexe acide usnique-cuivre proposée par Takani <i>et al</i> (2002)	98
Fig. 49 : Structure proposée du complexe atranorine-zinc	99
Fig. 50 : Structure proposée du complexe orcinolate de zinc	99
Fig. 51 : Teneur en zinc fixé par des substances lichéniques	100
Fig. 52 : Teneur en zinc fixé par l'acide usnique et l'acide oxalique dans deux milieux différents	101

Fig. 53 : Spectres IRTF du lichen d'Auby et du lichen d'Ecault -----	104
Fig. 54 : Spectres IRTF du lichen d'Ecault mis en contact avec des solutions de nitrate de zinc -----	106
Fig. 55 : Teneur en zinc fixé par le <i>Diposchistes muscorum</i> et teneurs en éléments libérés par le thalle lichénique d'Ecault -----	107
Fig. 56 : Distribution des cations divalents en fonction du potentiel d'ionisation I_2 et du rapport z/r -----	108
Fig. 57 : Courbes des constantes de stabilité des ions divalents avec différents ligands : (▲) éthylènediamine, (□) glycine, (○) cystéine, (●) oxalate (Frausto da Silva & Williams (2001)) -----	110
Fig. 58 : Conforations structurales de trois complexes de : A) bis-éthylènediamine de cuivre (tetragonal) ; B) bis-éthylènediamine de zinc (terahedrale) ; C) dihydro bis-éthylènediamine de nickel (octahedral) -----	111
Fig. 59 : Schéma du protocole d'extraction successive (Draoui <i>et al</i> (2002)) -----	115
Fig. 60 : Schéma de base d'un détecteur photodensitométrique -----	120
Fig. 61 : CCM dans l'éther de pétrole/éther 4/6 (V/V) sur une plaque phase normale révélée par UV à 254 nm des fractions A : extrait au n-hexane ; B : extrait au dichlorométhane ; C : extrait à l'acétate d'éthyle ; D : extrait au méthanol ; E : extrait méthanol-eau 20/80, extraits successifs du <i>Diplochistes muscorum</i> récolté sur le site d'Auby -----	122
Fig. 62 : Distribution des spots de l'extrait (B) au dichlorométhane du lichen d'Auby sur deux plaques de polarités différentes ; élution dans le mélange toluène\dioxane\ acide acétique : 27/7/1 (V/V) -----	123
Fig. 63 : Distribution des spots de l'extrait au dichlorométhane du lichen d'Auby et ceux de Merlimont sur une plaque phase inverse ; élution dans le mélange : acétate d'éthyle/toluène/méthanol/eau : -----	124
Fig. 64 : Schéma général d'un appareil de chromatographie liquide à haute performance -----	126
Fig. 65 : Schéma des transitions électroniques entre les différents orbitales moléculaires -----	128
Fig. 66 : Acide solorinique -----	130
Fig. 67 : Chromatogrammes de l'extrait au dichlorométhane du lichen métallifère et du lichen témoin -----	131
Fig. 68 : Spectres UV de l'acide orsellinique, méthyl-orsellinate, acide diploschistesique, acide 2'-O deméthylpsoromique, acide lécanorique, acide fumarprotocétrarique, orcinyllécanorate, acide psoromique, l'acide 4-O-hypoprotocétrarique, de l'atranorine et de la chloroatranorin extraits par le dichlorométhane du <i>Dilposchistes muscorum</i> récolté sur le site de Merlimont -----	136
Fig. 69 : Spectres UV de l'acide orsellinique, méthyl-orsellinate, acide diploschistesique, acide lécanorique, acide fumarprotocétrarique et de l'acide barbatique extraits par le dichlorométhane du <i>Dilposchistes muscorum</i> récolté sur le site d'Auby -----	137
Fig. 70 : Chromatogrammes et spectre UV de l'acide lécanorique décarboxylé et de l'acide orsellinique -----	139
Fig. 71 : Spectre de masse enregistré en électrospray négative de l'extrait au dichlorméthane du lichen témoin de Merlimont -----	142
Fig. 72 : Fragmentation des composés de l'extrait au dichlorométhane par infusion de l'extrait au dichlorométhane du lichen de Merlimont -----	142
Fig. 73 : Schéma simplifié de la fixation du métal M de part et d'autre d'une membrane -----	146
Fig. 74 : Spectres infrarouge du lichen métallifère d'Auby ; A : avant lavage à l'eau acide, B : après lavage à l'eau acide (HCl 0,1 M) -----	147
Fig. 75 : Spectres infrarouge des oxalates de calcium de zinc et de plomb -----	147
Fig. 76 : Spectres infrarouge du lichen métallifère enregistrés par la technique ATR sur deux faces différentes : face médullaire en rouge et face corticale supérieure en vert -----	149
Fig. 77 : Catabolisme de l'acide L-ascorbique -----	151
Fig. 78 : Taux d'oxalates contenus dans les thalles des lichens témoins (Merlimont et Ecault) et métallifère d'Auby -----	153
Fig. 79 : Taux d'acide L-ascorbique contenu dans les talles des lichens témoins (Merlimont et Ecault) et métallifère d'Auby -----	155
Fig. 80 : Chromatogramme de l'extrait au DMSO du lichen métallifère d'Auby -----	158
Fig. 81 : Chromatogramme de l'extrait au DMSO du lichen témoin de Merlimont -----	158
Fig. 82 : Spectre UV-Vis de l'extrait au DMSO du lichen témoin de Merlimont enregistré entre 390 nm et-160	
Fig. 83 : Taux de dégradation de la chlorophylle exprimé par le rapport des densités optiques (D_{0435}/D_{0415}) -----	162
Fig. 84 : Taux de chlorophylles a et b du lichen témoins (Merlimont et Ecault) et du lichen métallifère d'Auby -----	164
Fig. 85 : Teneurs des caroténoïdes totales chez le lichen d'Auby et les deux lichens témoins -----	166
Fig. 86 : Densité optique des caroténoïdes primaires ; β carotène 478 nm, lutien 461 nm, violaxanthine 455 nm, neoxanthine 453 nm -----	167

Index des tableaux

Tableau 1: Différents types morphologiques des thalles lichéniques (Van Halluywn & Lerond (1993)) -----	20
Tableau 2: Constantes de stabilité (K_{ML}) des complexes alcalinoterreux et de la première série métaux de transition avec différents ligands de types carboxylate, phosphate, et sulfate 1:1 ($T = 25^{\circ}C$), Chemical Society (1964) -----	42
Tableau 3: Affinité de certains métaux envers les groupements de surfaces où $K=[MA^+]/[M^{2+}][A^+]$ A étant un groupement de surface -----	43
Tableau 4 : Mécanismes de production et de détoxification des ERO et leur localisation au sein des cellules végétales -----	46
Tableau 5 : Principales espèces parasitées par <i>Diploschistes muscorum</i> (Cuny <i>et al</i> (1997)) -----	57
Tableau 6 : Comparaison entre les teneurs en éléments, mesurées par ICP-AES, d'un lichen pollué (site d'Auby) et de deux lichens témoins (site d'Ecault et Merlimont). Les teneurs sont exprimées en mg/kg du lichen sec -----	68
Tableau 7 : Attribution des bandes IRTF des différents groupements de l'acide benzoïque et du benzoate de zinc -----	83
Tableau 8 : Attribution des bandes IRTF des différents groupements de l'acide salicylique et du salicylate de zinc -----	84
Tableau 9 : Attribution des bandes IRTF des différents groupements d'acide 3,5 dihydrobenzoïque et du 3,5 dihydrobenzoate de zinc -----	85
Tableau 10 : Attribution des bandes IRTF des différents groupements d'acide gallique et du gallate de zinc -----	86
Tableau 11 : Attribution des bandes IRTF des différents groupements d'acide oxalique et d'oxalate de zinc -----	87
Tableau 12 : Attribution des bandes IRTF des différents groupements d'acide ascorbique et d'ascorbate de zinc -----	88
Tableau 13 : Attribution des bandes IRTF des différents groupements de l'acide usnique et du complexe acide usnique-zinc -----	93
Tableau 14 : Attribution des bandes IRTF des différents groupements d'atranorine et du complexe atranorine-zinc -----	94
Tableau 15 : Attribution des bandes IRTF des différents groupements de l'orcinol et de l'orcinolate de zinc -----	95
Tableau 16 : Attribution des bandes IRTF des différents groupements de l'acide lécanorique et du lécanorate de zinc -----	96
Tableau 17 : Attribution des bandes IRTF des différents groupements de l'acide orsellinique et de l'orsellinate de zinc -----	97
Tableau 18 : Attribution des bandes IRTF des différents groupements du lichen métallifère (Auby) et du lichen témoin (Ecault) -----	104
Tableau 19 : Séparation des espèces chimiques -----	109
Tableau 20 : Rayons ioniques de différents cations mono et divalents -----	110
Tableau 21 : Indices de polarité des solvants utilisés pour l'extraction successive -----	114
Tableau 22 : caractéristiques des plaques CCM ordinaire et HPTLC -----	119
Tableau 23 : Longueurs d'onde d'absorption maximale de certains chromophores -----	128
Tableau 24 : Evolution de la composition de solvants de la phase mobile en fonction du temps -----	129
Tableau 25 : Temps de rétention (t_r) et indices de rétention expérimentaux (Ir_{exp}) et théoriques ($Ir_{théo}$) des acides lichéniques calculés à partir de l'acide benzoïque ($t_r = 14, 38$ minutes) et l'acide solorinique ($t_r = 60$ minutes) -----	132
Tableau 26 : Structures semi-développées des acides lichéniques contenus dans le lichen d'Auby et dans celui de Merlimont -----	133
Tableau 27 : Longueurs d'onde (λ_{max}) théoriques et expérimentales des différents acides lichéniques du <i>Diploschistes muscorum</i> témoin et métallifère -----	138
Tableau 28 : Fragments caractéristiques des composés lichéniques de l'extrait au dichlorométhane du lichen d'Auby -----	143
Tableau 29 : Temps de rétention des composés chlorophylliens extraits par le DMSO (Tr mesurés) comparés avec ceux donnés par Kranner <i>et al</i> (2002) (Tr références) -----	159

INTRODUCTION GENERALE

Dans le nord de la France, aux environs de Douai, de nombreux sites présentent une pollution séculaire provenant de l'industrie de traitement des minerais de plomb et de zinc.

Initié et cofinancé par le Conseil Régional du Nord-Pas-de-Calais, avec l'aide financière de l'Union Européenne (FEDER) et du Ministère de l'Education Nationale et de la Recherche, le programme de recherches concertées (PRC) s'est intéressé à la zone contaminée par les éléments traces autour de deux fonderies à Auby et à Noyelles-Godault (dans le Nord 59, et dans le Pas-de-Calais 62). Dès 1994, différentes équipes se sont associées pour mener des investigations sur la nature des contaminants, leurs mécanismes de transfert et leur impact sur les organismes vivants, y compris l'homme. Les deux sources majeures de pollution sont les retombées atmosphériques d'éléments traces et les dépôts de scories liées aux activités d'extraction minière. Les principaux émetteurs industriels ont été Métaleurop et Umicore.

Métaleurop a été installée en 1894 à Noyelles Godault. Cette usine a été reconstruite après la guerre de 14-18 par la société Pennaroya. En 2001, cette entreprise a produit 105 000 tonnes de plomb et 100 000 tonnes de zinc (Drire (2002)). Elle exploite des minerais contenant essentiellement du sulfate de plomb (Galène), du sulfate de zinc (Blende) et du sulfate de cuivre. Ces éléments sont souvent associés à d'autres métaux comme Fe, Cu, Bi, Sb, As, Ge, In, Ag...etc. En 2001, les émissions atmosphériques de cette usine ont atteint 18 tonnes de plomb, 26 tonnes de zinc et 823 kilogrammes de cadmium. D'après la Drire, les émissions atmosphériques de Métaleurop avaient diminué, avant sa fermeture, de 90 % en 75 ans.

Umicore, installée en 1869 à Auby, produit essentiellement du zinc. La production annuelle en 2001 a atteint 254 000 tonnes de zinc. Les minerais exploités contiennent essentiellement la Blende (ZnS), la Smithsonite ($ZnCO_3$), l'Hémimorphite ou Calamine ($Zn_4Si_2O_7(OH)_2 \cdot H_2O$). Les émissions atmosphériques sont estimées à 0,06 tonnes par an de zinc (Drire (2002)).

Plusieurs équipes de recherche se sont associées dans le cadre du programme PRC pour apporter des informations sur l'état de contamination de la zone d'étude par les éléments traces métalliques et les possibilités de dépollution des friches industrielles de cette zone. L'une des méthodes originales de détection développée au sein du Laboratoire de Cryptogamie et de Botanique de Lille 2, consiste à utiliser la végétation métallophyte locale et notamment les lichens pour évaluer les niveaux de contamination aux alentours des deux usines émettrices de métaux.

L'usage traditionnel des lichens est une bien longue histoire; ils ont été utilisés comme fourrage pour les animaux, comme agents tinctoriaux notamment pour les lainages et bien d'autres usages industriels et médicaux. Cependant, leur application potentielle qui nous intéresse dans ce travail concerne la biosurveillance et la détection des effets de pollution. Ces effets sont observés à de nombreux niveaux à partir des modifications communautaires (modification de la structure du peuplement végétal), morphologiques, physiologiques,

cellulaires et moléculaires. Ainsi les modifications communautaires ont rendu possible la quantification des niveaux de pollution liés aux activités anthropiques à partir du concept de l'indice de pureté atmosphérique IAP (Cuny (1999)). Les altérations moléculaires, biochimiques et cellulaires permettent la détection précoce des atteintes sur l'organisme. Ces modifications appelées biomarqueurs évaluent un état de santé, un stress général ou particulier. Ils conduisent à une hiérarchisation des différents sites étudiés et une mise en évidence de phénomènes d'altération par rapport à une zone de référence. Un autre concept important, dit bioaccumulation, très employé dans des études environnementales, consiste à étudier l'accumulation de substances présentes dans un biotope dans un organisme. Une large gamme d'espèces lichéniques fait l'objet d'études de bioaccumulation.

L'objectif de cette thèse est de contribuer à une meilleure compréhension de l'impact des polluants atmosphériques sur un lichen dans les conditions de terrain pour en évaluer les performances bioindicatrices d'un lichen résistant. Il s'agit de comprendre les mécanismes impliqués dans la fixation des métaux, les impacts de ces métaux sur les voies métaboliques de biosynthèse des substances lichéniques ainsi que le comportement des deux partenaires symbiotiques vis-à-vis de ces pathogènes.

La première partie aborde la modélisation de la complexation des métaux par les composés lichéniques, en utilisant des modèles moléculaires simples et des acides lichéniques commerciaux et de synthèse, structurellement très proches des composés lichéniques de l'espèce étudiée. Cette approche vise à collecter des informations spectroscopiques sur les groupements fonctionnels des modèles et de les transférer sur l'ensemble des molécules de l'écotype étudié. La faisabilité de cette méthode par infrarouge a été prouvée par Gossart (2001) au LASIR. Les changements spectraux sont appliqués à l'interprétation des spectres (IRTF) des thalles lichéniques soumis à des perturbations naturelles ou provoquées par les métaux lourds. Ainsi nous avons étudié l'évolution des spectres IRTF d'un lichen témoin en fonction de la concentration du métal ajouté. Un autre volet de cette partie a été consacré à la quantification de la fixation du métal par les molécules modèles et aux échanges cationiques entre le thalle et le milieu environnant.

La deuxième partie traite, d'une part, de l'identification des métabolites secondaires de la communauté bryolichénique (*Diploschistes muscorum*) de la région d'Auby et celles qui prolifèrent sur deux sites témoins du littoral (très spécifique aux lichens) par différentes techniques basées sur des méthodes standardisées en lichénologie, et d'autre part, des réponses biologiques de ce lichen face à cette pollution métallique. Nous avons étudié les niveaux de concentration des structures anioniques impliquées dans la fixation des éléments traces, leurs localisations au sein du thalle lichénique et les processus qui permettent de produire ces structures au sein du *Diploschistes muscorum*.

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'étude du comportement du partenaire algal en présence de pathogènes métalliques et à l'évaluation de la contribution de l'algue symbiotique

aux mécanismes de bioaccumulation des métaux et à l'augmentation de la longévité de cette espèce dans le site métallifère d'Auby. La toxicité des éléments traces métalliques à l'encontre de l'algue affecte des composés vitaux pour l'espèce, les composés chlorophylliens. Dans un premier temps, nous avons séparé les chlorophylles et les caroténoïdes par HPLC. Ensuite, une étude de la dégradation de la chlorophylle a été nécessaire pour évaluer les dommages causés par les éléments traces métalliques sur cette espèce. Le dosage des chlorophylles et des caroténoïdes effectué simultanément avec l'étude précédente permet de connaître les réponses biologiques du *Diploschistes muscorum* face à la présence de xénobiotiques.

CHAPITRE I :

PRESENTATION GENERALE DES LICHENS ET DE LEURS POTENTIALITES BIOINDICATRICES.

I.1 Généralités sur la biosurveillance de la qualité de l'air par les lichens.

I.1.1 Morphologie des lichens.

Un lichen est un organisme issu d'une association symbiotique entre un champignon hétérotrophe, appelé mycosymbiote, pratiquement toujours un champignon ascomycète, qui représente plus de 90 % de la biomasse lichénique, et une algue autotrophe, appelée photosymbiote, c'est une algue verte (phycosymbiote) ou/et une cyanobactérie (cyanosymbiote). Les deux partenaires sont intimement liés à l'intérieur du champignon par le suçoir (encore appelé haustorium) par lequel transitent les différents éléments nutritifs. La nature de la relation entre les deux partenaires dépend du type du photosymbiote, de la morphologie du thalle et de la position taxonomique des espèces. On peut observer soit des simples contacts, soit des pénétrations de type intragélatineux, intrapariétal ou intracellulaire.

Un lichen est donc une structure autonome, et cette association lichénique apporte des propriétés que les deux partenaires n'ont pas individuellement.

La quasi-totalité des champignons des lichens appartiennent aux ascomycètes supérieurs (99% des cas), plus précisément aux loculomycètes, pyrénomycètes et discomycètes. Il existe cependant quelques genres, groupant une trentaine d'espèces, de lichens dont le champignon est un basidiomycète. La plupart sont tropicaux et affines des téléphoracées appartenant à la flore tempérée froide. Les champignons des lichens sont plus spécifiques et chaque espèce de lichen correspond à une espèce spéciale de champignon.

Les algues des lichens (appelées gonidies) sont, dans la plupart des cas, des chlorophycées (environ 80% des lichens). On retrouve les genres *trebouxia* et *cystococcus* comme principaux représentants de ces gonidies. Dans 20 % des lichens, ce sont des cyanophytes.

Les lichens font partie des thallophytes (végétaux dépourvus de tiges, feuilles et racines), le thalle lichénique a une morphologie différente de celle de l'algue ou du champignon qui le compose. Généralement le thalle lichénique est formé d'un cortex supérieur, formé d'hyphes enchevêtrées assez fortement serrées, une couche algale, une zone médullaire constituée d'hyphes peu serrées, inséparables du substrat. On peut trouver aussi un cortex périphérique (appelé inférieur) et des fausses racines appelées rhizines qui permettent au thalle d'adhérer au substrat. On distingue six types de thalles pouvant comporter plusieurs catégories et d'autres formes de transition avec d'autres types. Nous nous limitons à la présentation schématique (Tableau 1) donnée par Van Halluywn & Lerond (1993). Les caractéristiques principales des thalles lichéniques sont énumérées ci-dessous :

1- Thalles crustacés : ils forment une croûte fortement adhérente au substrat, plus de 80 % des lichens ont des thalles crustacés.

2- Thalles squamuleux : formés de petites écailles qui se chevauchent partiellement. La partie de l'écaille décollée du substrat commence à différencier un cortex inférieur. Ces thalles sont intermédiaires entre les thalles crustacés et les thalles foliacés.

3- Thalles foliacés : donnent des lames plus aux moins lobées facilement séparables du substrat auquel elles sont parfois fixées par des rhizines. En coupe microscopique, ils présentent toujours un cortex supérieur et un cortex inférieur. Certains thalles foliacés n'adhèrent au substrat que par une petite zone (crampon) souvent située au centre de la face inférieure, et la face supérieure présente une légère dépression (ombilic) ; ce sont les thalles foliacés ombiliqués.

4- Thalles fruticuleux : non appliqués sur le substrat auquel ils n'adhèrent que par une surface très réduite, ils sont plus aux moins buissonnants, relativement ramifiés, à section ronde ou aplatie.

5- Thalles composites : ils présentent un thalle primaire plus aux moins foliacé-squamuleux, plus aux moins adhérent au substrat, et un thalle secondaire dressé, plus ou moins ramifié, développé dans un second temps sur le thalle primaire.

6- Thalles gélatineux : ils contiennent des cyanobactéries réparties dans toute l'épaisseur du thalle (pas de stratification dorsi-ventrale). A l'état sec ils sont noirs, coriaces et friables. En présence d'eau ils gonflent pour donner des masses gélatineuses.

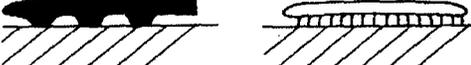
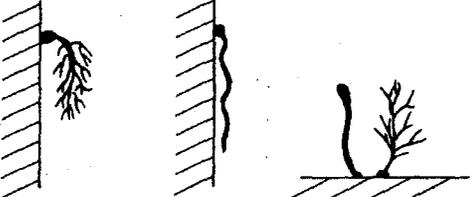
RELATIONS AVEC LE SUBSTRAT	DESCRIPTION GÉNÉRALE
<p>Thalle très adhérent au substrat → non séparable de celui-ci, sauf par petits fragments</p>  <p>Thalle</p> <p>Substrat</p> <p>endosubstratique (dans le substrat); seuls sont visibles les organes habituellement portés par le thalle</p>  <p>Thalle</p> <p>Substrat</p> <p>épisubstratique (sur le substrat)</p>	<p>THALLES CRUSTACÉS</p> <p>(cf. tab. X.6 : thalle crustacé de <i>Lecidella elaeochroma</i>) Face inférieure non visible car soudée ou même incorporée au substrat</p> <p>* LIMITE DU THALLE : nette { lobes rayonnants (surface bien définie sur le substrat) → ligne sombre ou zonations ± colorées ou non → hypothalle le plus souvent noir, parfois feutré → rebord net</p> <p>imprécise { surface non nettement définie sur le substrat)</p> <p>* ASPECT DE LA SURFACE : ± continu fendillé compartimenté (compartiments bien distincts) largeur décroissante des « compartiments » du thalle 1,5 mm aréolé verruqueux granuleux lépreux 0,1-0,2 mm</p>
<p>Thalle épisubstratique ± fortement appliqué sur le substrat; le bord du thalle est généralement ± redressé et de ce fait non adhérent. Souvent une petite partie de la surface inférieure adhère au substrat.</p> 	<p>THALLES SQAMULEUX</p> <p>(cf. chap. X, clé n° 2 : thalle squamuleux de <i>Psora decipiens</i>)</p> <p>Petites squamules ou écailles rapprochées ou imbriquées à la manière des tuiles d'un toit. On peut déjà différencier une face supérieure d'une face inférieure, notamment sur le bord des squamules. Transition entre thalles crustacés et foliacés.</p>
<p>Thalle toujours épisubstratique, adhérent au substrat mais toujours détachable tout au moins en grande partie.</p>  <p>appliqué au substrat par toute la face inférieure qui peut être nue, tomenteuse ou pourvue de rhizines.</p>  <p>appliqué au substrat par un point de fixation central (ombilic). Face inférieure nue, tomenteuse, pulvérulente ou garnie de rhizines.</p>	<p>THALLES FOLIACÉS</p> <p>(cf. chap. X, clés partielles d'espèces, <i>Parmelia</i> : thalle foliacé de <i>Parmelia caperata</i>) Différenciation très nette entre face supérieure et face inférieure</p> <p>* THALLES FOLIACÉS TYPES : en forme de lames, lobes ou lanières simples ou divisés</p> <p>* THALLES FOLIACÉS OMBILICÉS : — largeur ou diamètre supérieurs à la hauteur — simples (monophylles) ou composés de plusieurs lobes ou lames (polyphylles)</p>
<p>Thalle adhérent uniquement au substrat par une extrémité; pendant, étalé ou dressé.</p> 	<p>THALLES FRUTICULEUX</p> <p>(cf. chap. X, clés partielles d'espèces, <i>Usnea</i> : thalle fruticuleux de <i>Usnea subfloridana</i>)</p> <p>— en forme de tiges ou lanières ± ramifiées ou non — dans la majorité des cas la longueur est supérieure à la largeur — section du thalle ronde à ± plate — couleur uniforme du thalle; rarement différenciation entre face supérieure et face inférieure; excepté pour des espèces communes comme <i>Evernia prunastri</i>, <i>Pseudevernia furfuracea</i>...</p>
<p>Thalle formé de deux parties bien distinctes : — thalle primaire ± adhérent au substrat; crustacé, squamuleux ou ± foliacé. — thalle secondaire fruticuleux et dressé développé secondairement sur le thalle primaire.</p>	<p>THALLES COMPLEXES OU COMPOSITES</p> <p>(cf. chap. X, clés partielles d'espèces, <i>Cladonia</i> : thalle composite de <i>Cladonia fimbriata</i>)</p> <p>deux genres principaux : <i>Cladonia</i> : thalle secondaire = podétions simples ou ramifiés, couverts de squamules ou non <i>Stereocaulon</i> : thalle secondaire = pseudopodétions ramifiés et couverts de squamules</p>
	<p>THALLES GÉLATINEUX</p> <p>Lichens à cyanobactéries; noirs et cassants à l'état sec; pulpeux-gélatineux à l'état humide. Aspect particulier dû à la cyanobactérie.</p>

Tableau 1: Différents types morphologiques des thalles lichéniques (Van Halluywn & Lerond (1993))

I.1.2 Chimie des lichens.

Les substances lichéniques se subdivisent en trois catégories (Ozenda & Clauzade (1970)) : i) les produits contenus dans les cellules qu'on trouve habituellement chez les champignons, les algues ainsi que dans le règne végétal comme les protéines, acides aminés, caroténoïdes, polysaccharides ...etc. ii) des produits localisés dans les membranes iii) d'autres produits extracellulaires qui sont très spécifiques aux lichens.

I.1.2.1 Substances contenues dans les cellules

- Constituants du protoplasme :

- Des constituants minéraux : sels minéraux, eau.
- Des constituants organiques : représentés principalement par des protéines, des acides nucléiques, des lipides complexes auxquels s'ajoutent des substances jouant un rôle catalytique (enzymes, acide ascorbique ou vitamine C synthétisé par le champignon, vitamine B et D), composés chlorophylliens et caroténoïdes.

- Produits d'accumulation :

- Des pigments caroténoïdes solubles dans des gouttelettes d'huile.
- Des lipides se trouvant dans les hyphes, les gonidies et à l'intérieur des spores.
- Des glucides et substances voisines : amidon, glycogène, polyols voisins des glucides, surtout le mannitol.
- Des protides et acides nucléiques.

I.1.2.2 Substances contenues dans les membranes

- Constituants des gonidies.

La composition chimique des gonidies est encore mal connue. Les membranes gonidiales renferment surtout de la cellulose associée à des sels de calcium, à de la callose et à des composés pectiques.

- Constituants des hyphes.

- Des minéraux : les lichens qui s'établissent sur des substrats riches en métaux tels que le zinc, cuivre, fer...etc., accumulent des composés provenant de ces derniers dans les membranes de leurs hyphes.
- Des glucides : cellulose, hémicellulose ; lichénine et isolichénine, amyloïdes et callose pour certains lichens.
- Des composés rares chez les lichens : composés pectiques, chitine.

I.1.2.3 Substances rejetées à l'extérieur des cellules.

- Oxalate de Calcium :

Rejeté sous forme de minuscules cristaux à l'extérieur des hyphes. Ces cristaux abondent dans la médulle, plus rarement dans le cortex supérieur. Généralement, l'oxalate de calcium est plus abondant dans les lichens crustacés que chez les macrolichens et surtout les lichens gélatineux. L'oxalate de calcium est considéré comme un déchet. Néanmoins, il pourrait favoriser la nutrition minérale du lichen en solubilisant certaines substances, notamment les oxydes de fer ; il réduirait l'évaporation d'eau et enfin serait utilisé par les gonidies comme source de carbone.

- Lipides : rejetés sous forme de minuscules gouttelettes d'huile.

- Substances lichéniques :

Ces dernières désignent des substances appartenant à des familles chimiques très diverses, mais reliées spécialement aux lichens, bien que certaines se retrouvent, au moins sous une forme voisine, chez quelques champignons non lichénisés ou chez des plantes supérieures.

I.1.3 Principales voies de biosynthèse des substances lichéniques.

Les métabolites primaires constituent les précurseurs essentiels de formation des métabolites secondaires. Chez les lichens, le point de départ de la majorité des molécules du métabolisme secondaire est l'Acétyl Coenzyme A (Acétyl-CoA), qui dans certains cas, s'associe avec le Malonyl Coenzyme A (Malonyl-CoA) pour donner des terpènes ou des stéroïdes. Toutefois, l'Acétyl-CoA est souvent dirigé vers la formation des chaînes aliphatiques (le terme chaînes aliphatiques désigne des composés secondaires et non pas des acides gras) qui donnent une large variété de produits comme l'acide usnique et de nombreux esters phénoliques caractéristiques des lichens.

D'autres composés secondaires sont synthétisés par la voie du phosphate pentose ainsi qu'à partir des Amino-acides. L'acide pulvinique et ses dérivés sont les résultats de cette voie de synthèse.

Les substances lichéniques sont issues de trois voies métaboliques (Fig. 1) :

- 1- Voie de l'acide Schikimique qui donne des Acides Pulviniques.
- 2- Voie de l'acide Mévalonique qui donne les Terpènes et des Caroténoïdes.
- 3- Voie de l'Acétyle-polymalonyle qui donne l'Anthraquinone, l'Acide Usnique et les Acides Orselliniques.

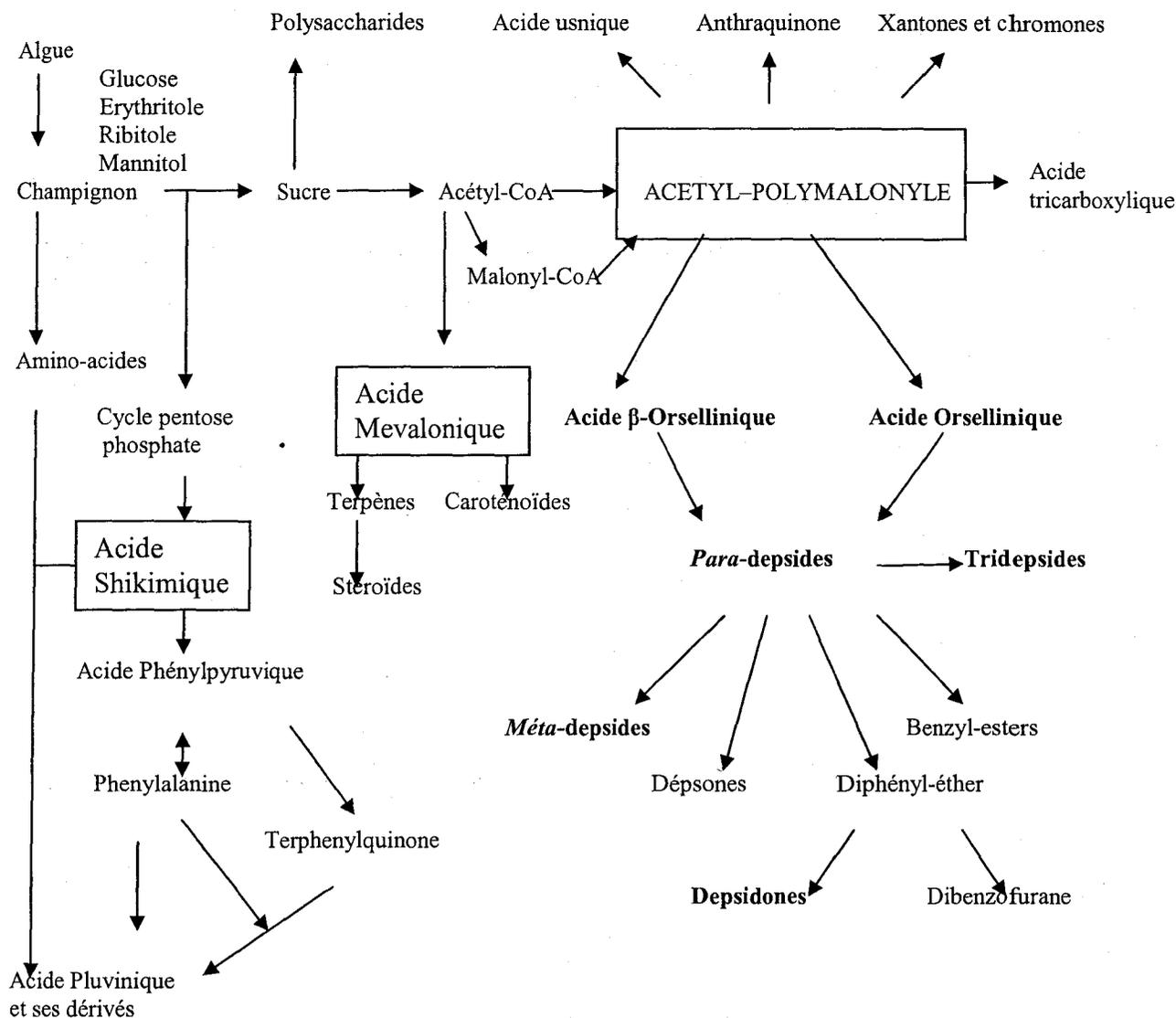


Fig. 1: Voies métaboliques conduisant à la formation des substances lichéniques (Howell *et al* (2003))

I.1.3.1 Voie de l'acétyl-polymalonyle.

La voie de l'acétyl-polymalonyle donne des esters phénoliques substitués appelés dépsides et des esters et éthers phénoliques appelés dépsidones. Ils forment la famille la plus importante et la plus spécifique des lichens. Toutes ces substances sont incolores, mais donnent des réactions colorées très nettes.

Ces substances dérivent toutes de deux diphénols, l'orcinoïl et le β-orcinoïl, ou plus exactement de l'acide orsellinique (Fig. 2) produit par un orsellinate synthétase qui a été caractérisé chez *Penicillium madriti* (Gaucher & Shepherd (1968)). L'acide orsellinique et ses dérivés conduisent à la formation des dépsides de la famille de l'orcinoïl. Un autre complexe enzymatique similaire au premier donne l'acide β-orsellinique (Fig. 3) et ses dérivés qui donneront par la suite les β-dépsides.

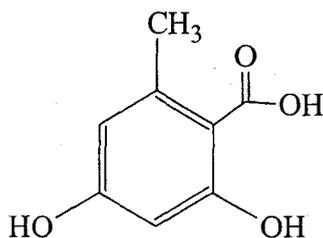


Fig. 2: Acide orsellinique

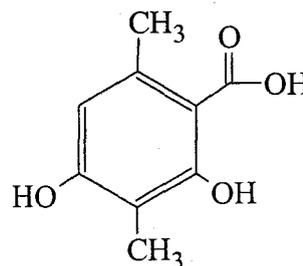


Fig. 3: Acide β -orsellinique

Les depsides

Les depsides sont formés à partir de composés monocycliques (acides orselliniques et ses dérivés). On distingue deux sous-familles de depsides, les *para*-depsides formés à partir des composés monocycliques et les *méta*-depsides issus des *para*-depsides (Fig. 1).

L'équilibre dynamique entre un *para*-depside et un *méta*-depside a été étudié par Elix & Gaul (1986). Ces auteurs ont pu établir un lien entre le *para*-scrobuculin et le *méta*-scrobuculin. Le *méta*-depside est formé à partir du *para*-depside par un C-hydroxylation du deuxième cycle, suivi par une migration Acyle entre les groupements oxygène en position ortho du deuxième cycle.

Généralement les depsides se répartissent en deux types, selon le monomère de base, en depsides dérivés de l'orcinol et depsides dérivés du β orcinol.

- Les depsides dérivés de l'orcinol.

Les polyphénols de cette famille sont issus de l'acide orsellinique. L'acide lécanorique (Fig. 4) est l'un des plus importants de ce groupe, il résulte d'une condensation de deux acides orselliniques. On le retrouve chez les *Diploschistes scruposus*, *psora scalaris* et beaucoup de *Parmelia*.

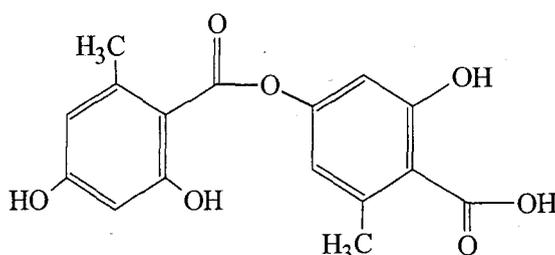


Fig. 4: Acide lécanorique

- Les depsides dérivés du β -orcinol.

Le plus simple est l'acide barbatique (Fig. 5) surtout fréquent chez les *Cladonia*, dérivant de deux acides β -orselliniques et une méthylation du -OH externe du premier noyau.

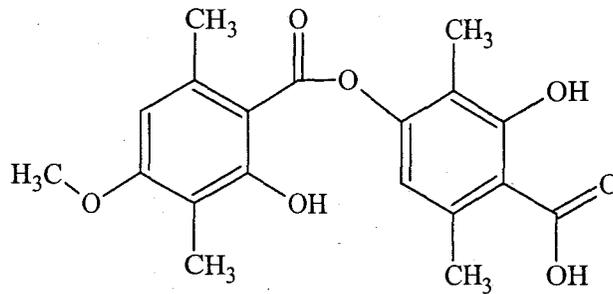


Fig. 5: Acide barbatique

On connaît dans cette sous-famille une dizaine de composés dont :

- L'atranorine présent chez le *lécanora atra*, *evernia prunastri* et plusieurs *Cladonia*.
- L'acide thamnolique.
- L'acide baeomycitique.

Les depsidones

Les depsidones dérivent de la cyclisation oxydative des depsides qui est en fait une déhydrogénation intramoléculaire. Selon Elix *et al* (1987 a), les depsidones dérivent des para-depsides qui, transformés en *mé*ta-depsides, mèneront par la suite à la formation des depsidones correspondants (Fig. 6). Vicente & Légaz (1988) ont proposé une voie métabolique générant l'acide fumarprotocétrarique à partir de l'atranorine.

On distingue deux types de depsidones : les depsidones issus de l'orcinol et ceux issus du β orcinol.

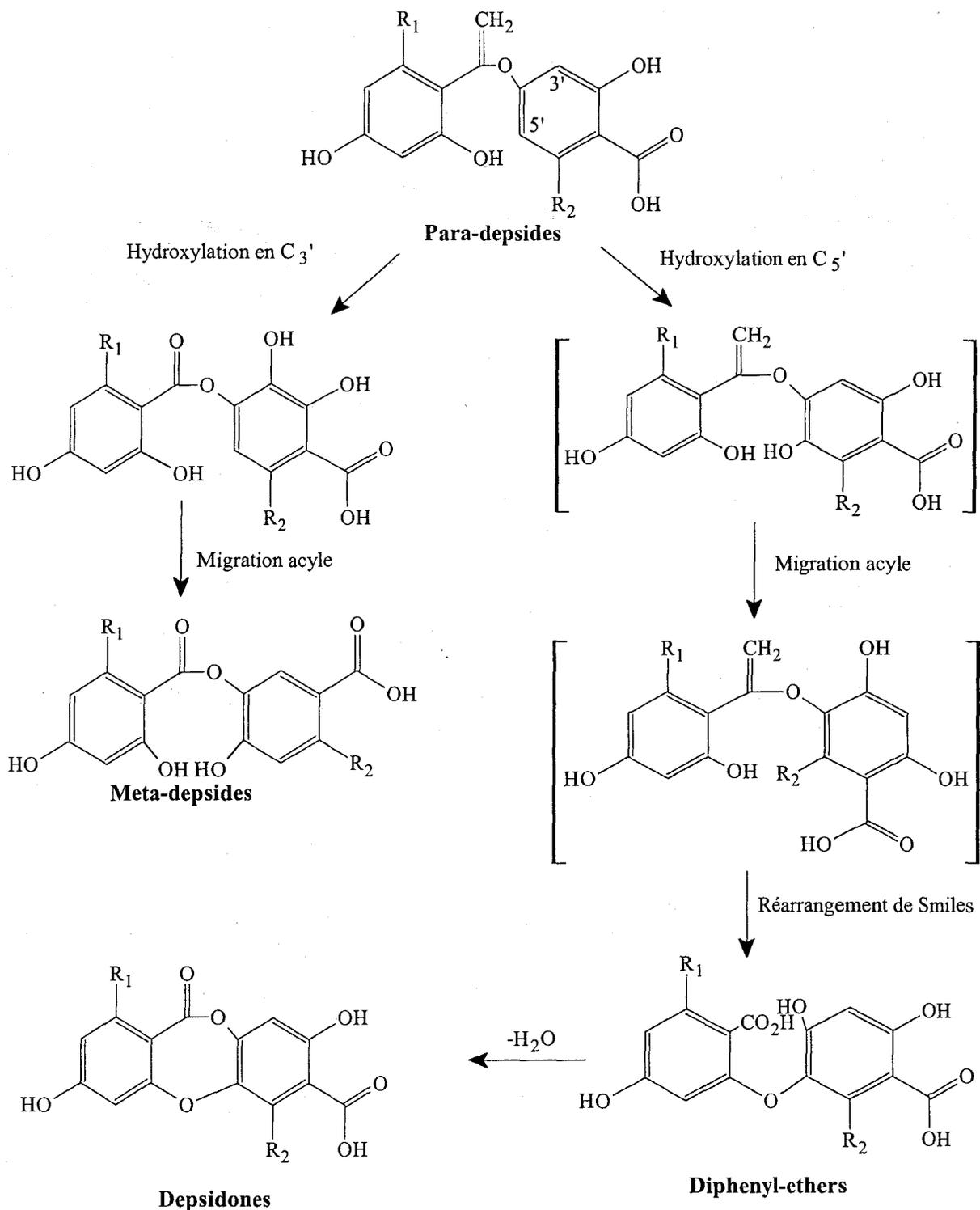


Fig. 6: Voie de biosynthèse des depsidones proposée par Elix *et al* (1987 a)

- Les Depsidones dérivés de l'orcinol.

Dans cette sous-famille on distingue une dizaine, parmi lesquels l'acide physodique (Fig. 7) de *Parmelia physodes*, l'acide lobarique de certains *lobaria* et l'acide aletronique de divers *parmelia*.

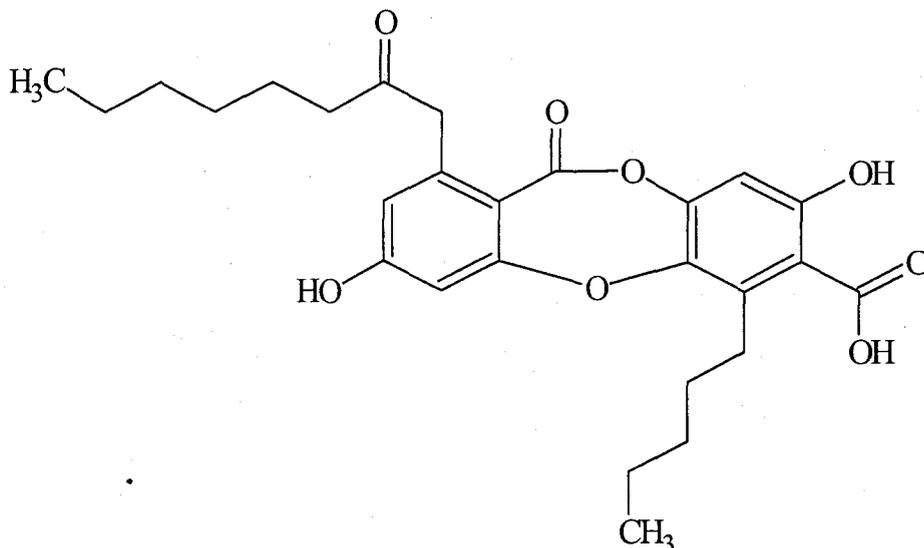


Fig. 7: Acide physodique

- Les Depsidones dérivés du β -orcinol.

Les molécules de cette sous-famille présentent presque toutes un $-\text{CHO}$ à la place du CH_3 voisin du $-\text{O}-\text{CH}_3$ dans le premier noyau. Le plus simple est l'acide psoromorique (Fig. 8), on peut citer aussi l'acide protocétrarique de *Parmelia caperata* et l'acide fumarprotocétrarique de nombreux *Cladonia*.

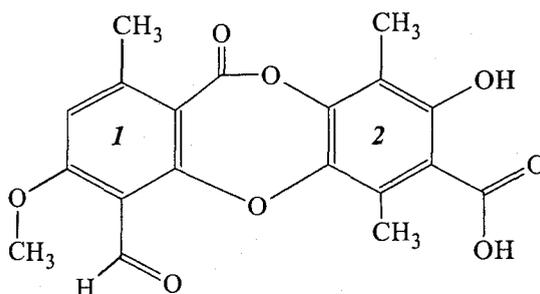


Fig. 8: Acide psoromorique

D'autres composés, proches structurellement des depsides et des depsidones, sont formés à partir des *para*-depsides comme par exemple les tridepsides, les depsones, les dibenzofuranes et les benzyl-esters.

L'acide usnique est synthétisé aussi par cette voie à partir d'une cyclisation d'une chaîne à neuf atomes de carbone et une condensation de deux méthylphloroacétophénones.

I.1.3.2 Voie de l'acide Mévalonique.

Beaucoup de métabolites de cette voie de synthèse sont utilisés au sein du métabolisme primaire, comme par exemple les chaînes phytol (C-20) de la chlorophylle. L'unité de base de cette voie est l'acide mévalonique formé à partir de trois molécules d'acétyl-CoA. Cet acide est ensuite phosphorylé et décarboxylé en présence d'ATP conduisant ainsi à la formation de deux isomères, le pyrophosphate d'isopentényle (C-5) et le pyrophosphate de diméthylallyle (C-5). Ces derniers sont transformés en géranyl-pyrophosphate (C10) qui va se condenser

pour donner les différents composés, en l'occurrence les diterpènes, caroténoïdes, triterpènes et les stéroïdes (Fig. 9).

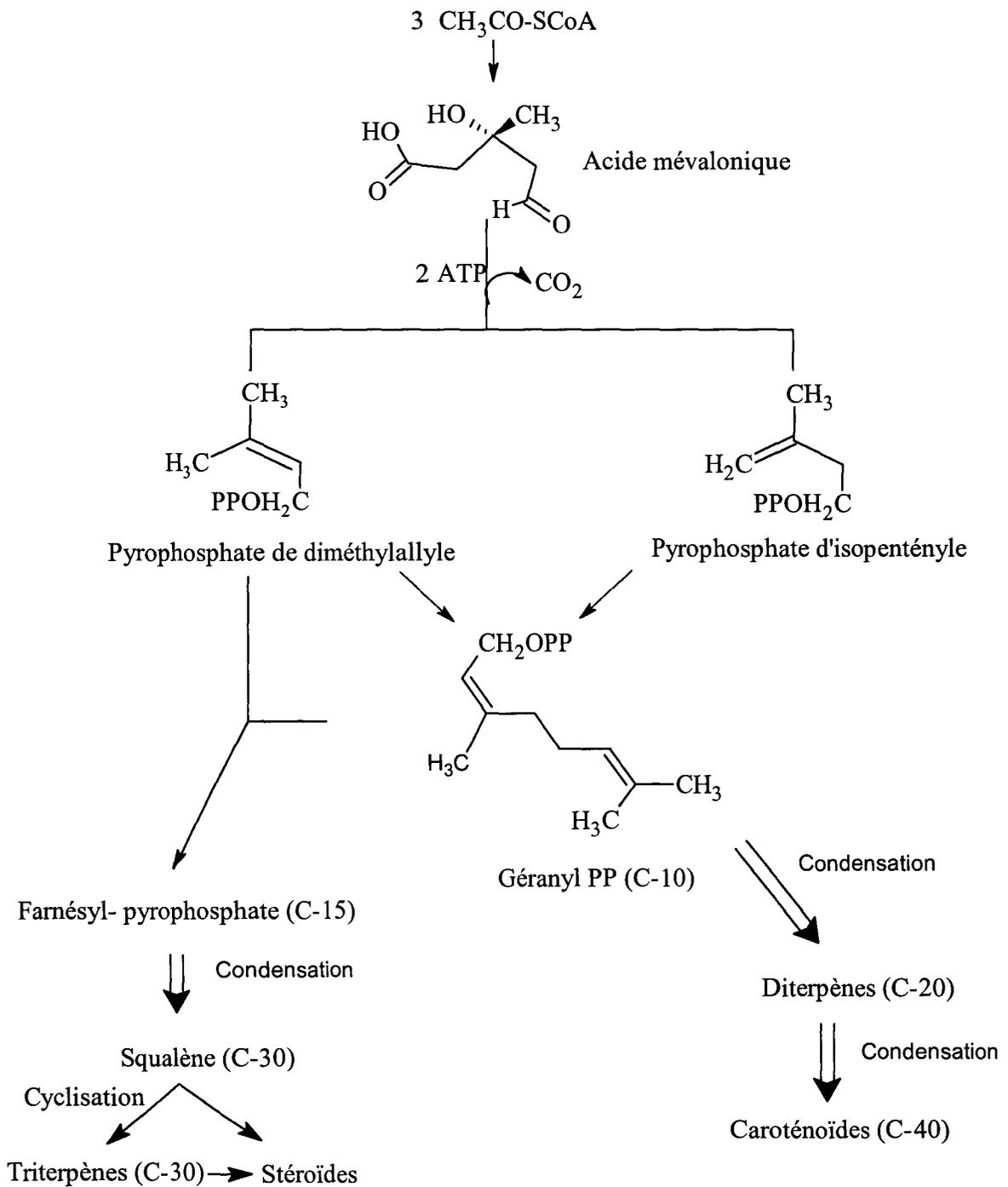


Fig. 9: Voie de biosynthèse de l'acide mévalonique (Fahselt (1994))

1.1.3.3 Voie de l'acide Shikimique.

L'acide pulvinique, ses dérivés, colorés en jaune, et les Terphénylquinones, colorés en rouge et pourpre, sont le résultat de cette voie de synthèse. Le phosphoénolpyruvate, formé par la voie d'Embden-Meyrthof, et l'érythrose-4-phosphate formé par la voie du pentose-phosphate conduisent à la formation d'acide shikimique. L'addition à cet acide d'un phosphoénolpyruvate donne l'acide phénylpyruvique. Le rapprochement de deux molécules d'acide phénylpyruvique donne une structure à trois noyaux, l'acide polyporique. Par un réarrangement moléculaire on aboutit à une structure avec un hétérocycle caractéristique de l'acide pulvinique et de ses dérivés (Fig. 10). La condensation de la phénylalanine, formée à partir de l'acide phénylpyruvique par une transamination, donne aussi des acides pulviniques.

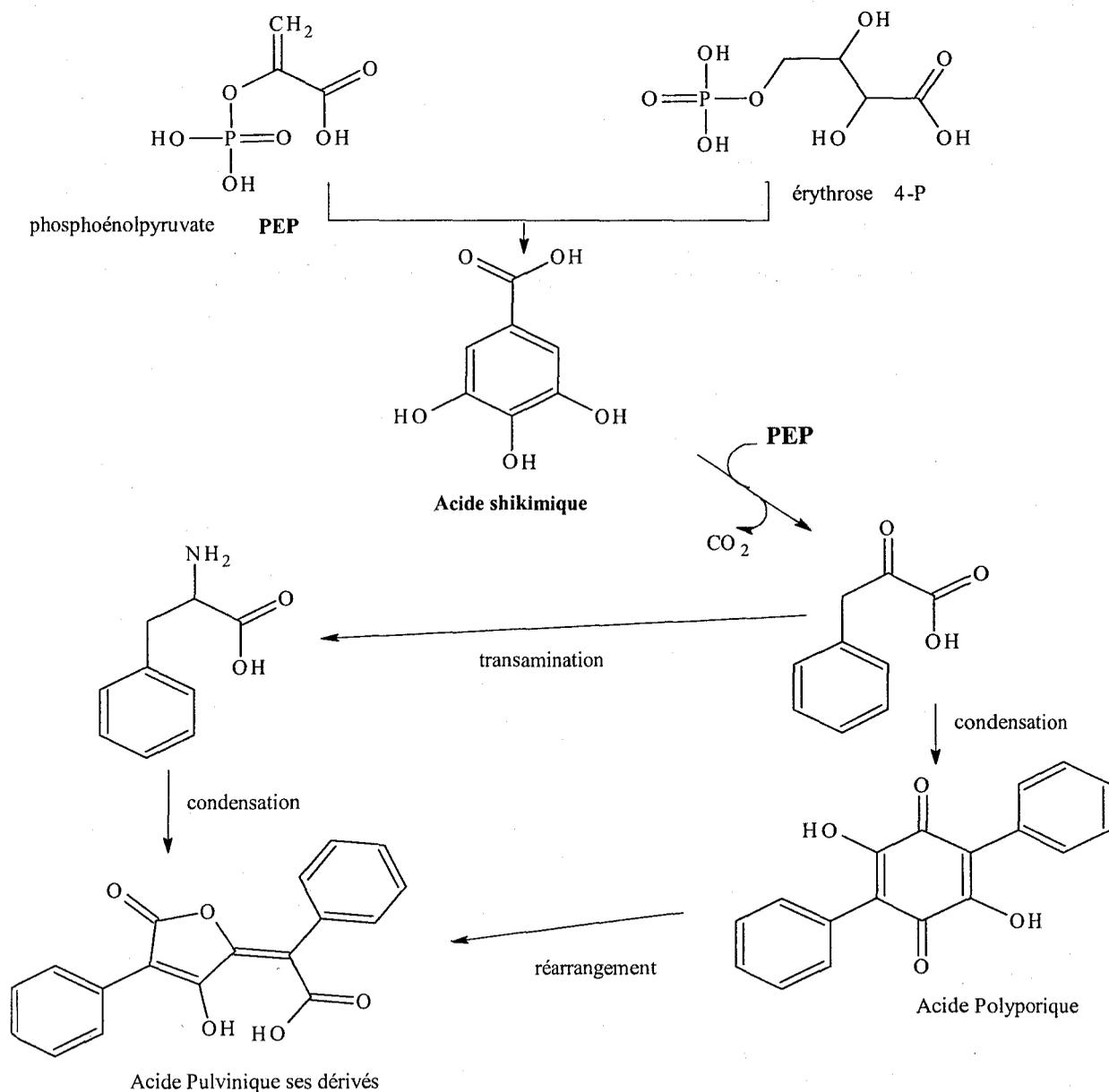


Fig. 10: Voie de biosynthèse de l'acide pulvinique et ses dérivés

D'autres composés (dérivés de l'acide pulvinique) comme l'arthonin et l'hypothallin, trouvés respectivement chez les *Arthonia endicheri* et *Schismatoma hypothalinium*, ont comme précurseurs des amino-acides.

I.1.4 Importance des substances lichéniques

Les lichens constituent des espèces symbiotiques spéciales grâce aux caractéristiques qui leur sont octroyées par les substances lichéniques. On peut résumer ces caractéristiques des substances lichéniques comme suit :

- Hydrophobie : les substances lichéniques participent au maintien de l'équilibre hydrique du thalle en limitant l'évaporation de l'eau à la surface du lichen en contrôlant les voies de transfert à l'intérieur du thalle.
- Propriétés chélatantes : les substances lichéniques contribuent à la protection par chélation des métaux lourds essentiellement présents dans le milieu. Cette propriété sera détaillée plus loin.
- Absorption des radiations lumineuses : on observe une variation de l'intensité de la coloration des thalle de *Xanthoria parietina* en fonction de l'ensoleillement. Les thalles exposés au soleil sont particulièrement colorés, les formes d'ombre étant d'un gris-orangé plus au moins terne. C'est une variation photochimique de la parietine, pigment orange du cortex supérieur, qui provoque une modification de la coloration du thalle. La parietine assure la protection de l'algue associée (*Trebouxia*) contre les radiations lumineuses.
- Conversion des radiations lumineuses : certaines substances lichéniques présentes sur le cortex supérieur, tel que l'atranorine, peuvent absorber des radiations n'intervenant pas dans la photosynthèse et les rendent alors utilisables par le photosymbiote.
- Régularisation de l'activité du photosymbiote : les substances lichéniques régulent l'activité photosynthétique de l'algue selon des mécanismes encore mal connus. La couche algale est maintenue dans une épaisseur uniforme tout au long de la vie du thalle.
- Propriétés antibiotiques : elles sont un facteur de compétitivité des lichens envers les autres végétaux. les substances lichéniques inhibent la germination des graines (ce n'est pas une règle générale, dans certains cas elles peuvent stimuler la germination).

- Propriétés antiherbivores : les lichens produisant l'acide pulvinique et ses dérivés développent les meilleures défenses contre les herbivores invertébrés.
- Utilisations industrielles et médicales : A travers les âges, l'homme tire profit des propriétés olfactives (odeur de Chypre et cuir de Russie extraits à partir de l'*Evernia prunastri* et du *Pseudoevernia furfuracea*), tinctoriales chez « les lichens à orseille » (Karmous *et al* (1997)) issues des substances lichéniques. Les lichens constituent également un outil de détermination et une base taxonomique ; ainsi les réactions colorées des substances lichéniques avec des réactifs tels que le chlore, la potasse et la paraphénylènediamine contribuent à l'identification des espèces. Enfin l'activité biologique des composés lichéniques trouve plusieurs applications médicales. Un exemple de l'intérêt de l'ethnopharmacologie est la mousse d'Islande (*Cetraria islandica*) connue traditionnellement pour soulager les ulcères d'estomac et du duodénum (Kartnig (1987)) dont l'activité a été confirmée par l'évaluation *in vitro* d'un de ses composés majoritaires ; l'acide protolichestérinique.

I.1.5 Caractéristiques spécifiques des lichens

Les lichens sont de remarquables exemples d'organismes poïkilohydriques, c'est-à-dire dont l'état hydrique varie passivement avec les conditions environnementales attenantes. Les cas contraires sont les organismes homéohydriques qui peuvent réguler la teneur en eau de leurs organes (feuilles, aiguilles...) de façon plus ou moins constante. Tous les organismes poïkilohydriques (lichens, bryophytes, fougères, certaines plantes vasculaires primitives) se dessèchent rapidement et par conséquent, la disponibilité en eau joue un rôle déterminant pour leur survie et leur distribution (Nash (1996)). Après une période de pluie le lichen stocke l'eau qui lui permet de faire fonctionner les deux partenaires pendant un certains temps. Selon Lallement *et al* (1986) la photosynthèse est optimale de 100 à 200 % du poids sec chez les lichens à chlorophycée, 200 à 400 % chez les lichens hétéromères à cyanobactérie et 500 à 1000 % chez *Collema* (lichen homéomère à *Nostoc*). En période de sécheresse, quand la teneur en eau est réduite à environ 20 % de son poids sec, le lichen se rétracte et devient inactif. Les organismes poïkilohydriques utilisent la pluie comme principale source d'eau. Les lichens puisent d'autres sources d'eau, telles que le brouillard ou la rosée.

La croissance des lichens est très lente à cause de quatre facteurs i) l'environnement défavorable dans lequel ils vivent ii) la production de composés secondaires qui consomment 40% du carbone fixé par l'algue iii) la pauvreté en nutriments iv) le faible rendement de la photosynthèse de l'algue. Le taux de croissance ne dépasse pas généralement 1mm/an pour les crustacés et 2mm/an pour les foliacés. De ce fait, les lichens ont une grande longévité qui peut atteindre 300 ans dans des climats tempérés et 3000 ans dans des climats arctiques.

Les lichens se développent sur des substrats très variés en fonction de leurs caractéristiques propres. On peut les rencontrer souvent sur les écorces, les rochers, la terre ou encore sur les tuiles, le béton, les métaux, le verre, le cuir, les os ou le carton. Le type de substrat peut influencer sur la structure du thalle. Les lichens crustacés présentent une structure différente selon qu'ils croissent sur des rochers calcaires, sur le sol ou sur les feuilles, le bois ou l'écorce.

Cette relation entre le substrat et le lichen est conditionnée par les caractères physico-chimiques du premier. Les caractères physiques et mécaniques concernent la dureté et hétérogénéité de la roche et la structure histologique et la porosité de l'écorce. Certains lichens comme *rhizocarpon oedri* ou *tremolecia atrata* peuvent être spécialement liés aux rochers riches en métaux.

I.1.6 Usage des lichens pour la biosurveillance de la qualité de l'air (Garrec & Van Haluwyn (2002)).

I.1.6.1 La biosurveillance végétale.

La biosurveillance de la qualité de l'air est utilisée de deux manières différentes selon les situations auxquelles on est confronté.

L'approche **passive** consiste à utiliser des végétaux sur place. Cette approche a l'avantage de pouvoir suivre l'évolution de la pollution sur une période donnée dans des conditions stationnelles (climat...etc.) et des facteurs propres au végétal (variabilité génétique). L'inconvénient majeur de cette approche reste le choix limité des sites, des espèces et de leur environnement.

L'approche **active** consiste à mettre en place pendant une période donnée des végétaux génétiquement sélectionnés et cultivés dans des conditions standardisées. L'utilisation de cette approche implique la perte d'informations rétroactives reliées à la durée de pollution et des paramètres stationnels et génétiques.

Il est essentiel de connaître les modes d'entrée des polluants dans les végétaux ainsi que leur effets afin de mieux comprendre la biosurveillance végétale.

Les deux voies principales d'entrée des polluants dans le végétal sont les stomates et la cuticule. Il faut aussi prendre en considération d'autres voies de pénétration telles que les bourgeons, les cicatrices foliaires, les lenticelles, l'écorce ou les blessures, sans oublier le dépôt de certains polluants sur les pollens.

La pénétration des polluants dans le végétal est gouvernée par divers paramètres inhérents aux polluants, à la plante et au milieu environnant (Fig. 11).

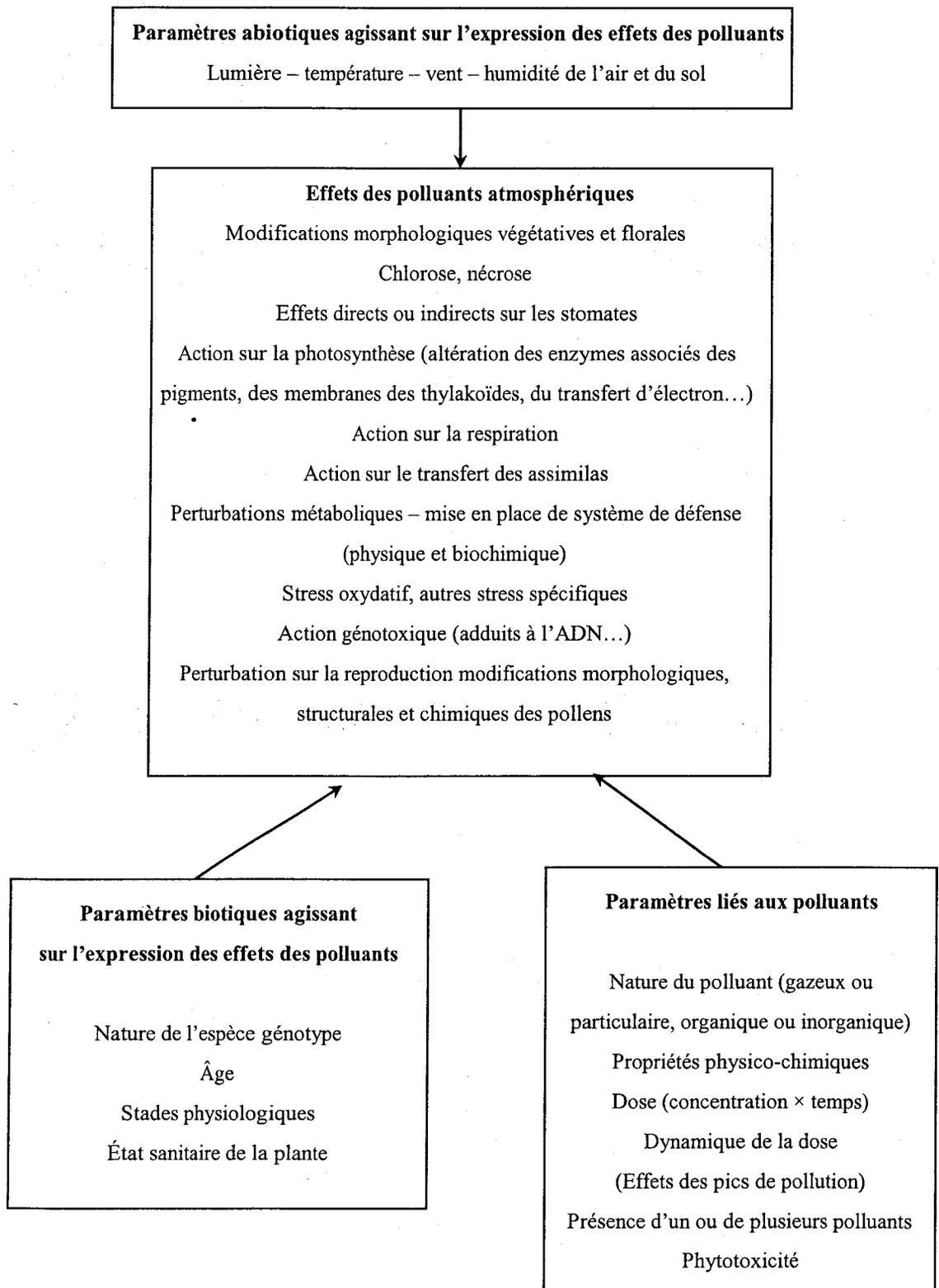


Fig. 11: Principaux effets des polluants chez les végétaux – Interférence des divers paramètres

1.1.6.2 Définition des concepts

Le terme de biosurveillance recouvre bien des acceptions et sera précisé lorsqu'on aura défini les quatre concepts qu'elle englobe et qui sont : biomarqueurs, bioindicateurs, biointégrateurs et bioaccumulateurs.

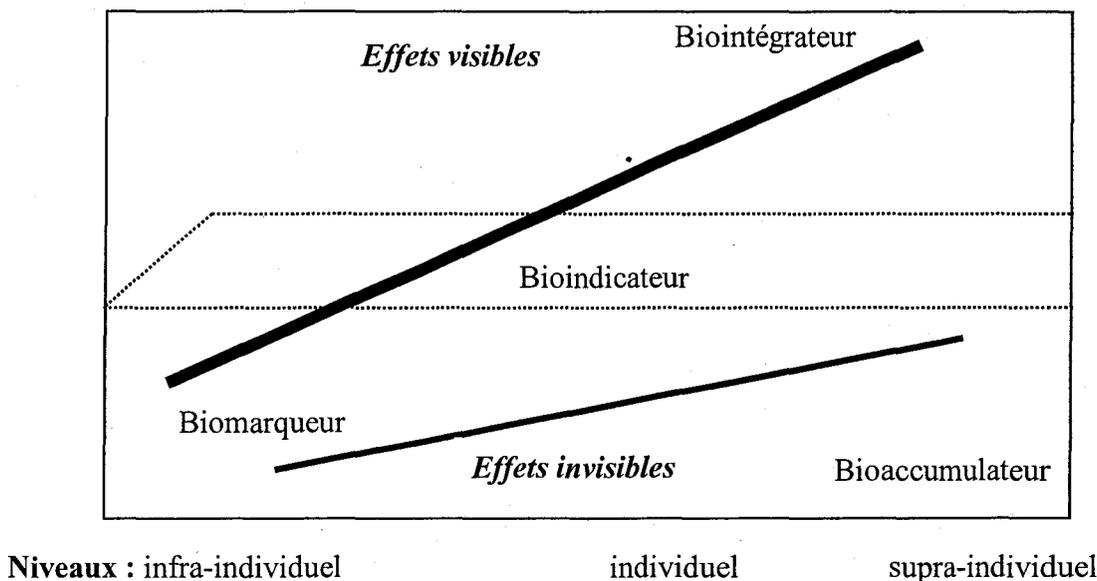


Fig. 12: Présentation des concepts de la biosurveillance de la qualité de l'air en fonction des niveaux d'organisation biologique et de visibilité des effets

► Biomarqueur

Il se situe au niveau infra individuel : altérations moléculaires, biochimiques, cellulaires ou physiologiques non visibles. Selon Lagadic *et al* (1997), un biomarqueur est un changement observable ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire ou physiologique qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant.

Le biomarqueur évalue un état de santé, un stress général ou particulier. Il permet une hiérarchisation des différents sites étudiés et une mise en évidence de phénomènes d'altération par rapport à une zone de référence.

Les modifications des paramètres utilisables chez les lichens comme biomarqueurs sont nombreuses. Il s'agit des modifications ultra-structurales, de perturbation de respiration (ATP) et de la photosynthèse (fluorescence de la chlorophylle, dégradation de la chlorophylle, mesure de l'activité photosynthétique), perturbation des systèmes enzymatiques (liée notamment au stress oxydant : catalase, super-oxyde dismutase, peroxydase, glutathion réduit/glutathion oxydé), évaluation de la perte de l'intégrité membranaire (Cuny (2002)).

➤ **Bioaccumulateur**

Selon Ramade (1993), la bioaccumulation est un phénomène par lequel une substance, présente dans un biotope, s'accumule et/ou pénètre dans un organisme même si elle n'a aucun rôle métabolique, voire si elle est toxique à ce dernier.

Cette substance se retrouve dans l'organisme à des concentrations supérieures aux concentrations moyennes observées dans l'air.

L'équilibre dynamique qui caractérise la bioaccumulation dépend de la plante, de sa biomasse et de la vitesse de métabolisation du polluant ou de sa vitesse de dépôt (le soufre, l'azote, le chlore sont rapidement métabolisables).

Une large gamme d'espèces lichéniques fait l'objet d'études de bioaccumulation. Chez les lichens épiphytes (se développant sur des écorces des arbres) on trouve les espèces *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes*, *Parmelia caperata*, *Parmelia sulcata*, *Pseudoevernia furfuracea*, *Xantoria parietina*.

Les lichens fruticuleux semblent préférables aux lichens foliacés car ils sont facilement détachables du substrat et moins soumis à un apport provenant du substrat. Des espèces saxicoles telles que la *Lecanora muralis* (se développant sur des pierres tombales de nature siliceuse) sont préconisées pour ce type d'études (Matschullat *et al* (1999))

➤ **Bioindicateur**

Un bioindicateur est considéré comme « un simple relais ne faisant référence qu'aux effets observables au niveau de l'individu se traduisant par des altérations morphologiques, tissulaires ou physiologiques (croissance et reproduction).

Cette méthode visuelle, qui ne tient compte que des polluants fortement toxiques et des végétaux « sensibles », est une méthode rapide simple et économique.

L'utilisation des lichens en tant que bioindicateurs est très restreinte et limitée à l'étude de la disparition de certaines espèces. L'observation visuelle des nécroses thallines en cas de pollution n'est pas un paramètre à prendre en considération car d'autres facteurs climatiques peuvent intervenir pour déclencher une nécrose. En outre les concentrations atmosphériques de certains polluants gazeux tels que le SO₂ ne sont pas capables d'induire des nécroses.

➤ **Biointégrateur**

La définition d'Echaubard (1995) concernant le monde animal peut être transposée au monde végétal « toute disparition ou apparition d'une espèce, toute modification de l'abondance relative d'une espèce, toute modification de la structure du peuplement végétal d'un écosystème signifie donc une modification de l'environnement de cette espèce » ;

Ce concept de biointégrateur se rapproche de ceux « d'indicateurs écologiques » ou de « végétaux sentinelles » développé par Blandin (1986) « pour une population ou un ensemble de populations qui par ses caractéristiques qualitatives et/ou quantitatives témoigne de l'état

d'un système écologique et qui par des variations de ses caractéristiques, permet de détecter d'éventuelles modifications de ce système ».

Les lichens sont certainement un matériel de choix dans ce domaine. Ces organismes « sentinelles de l'environnement » se caractérisent par une sensibilité **différentielle** à la pollution atmosphérique. Cette propriété est à l'origine de combinaisons d'espèces originales traduisant des gammes de concentrations en polluants ou un niveau de la qualité de l'air. Cette propriété est mise à profit pour dresser des échelles de sensibilités reliant la diversité lichénique avec soit les concentrations en SO₂, soit l'intensité de pollution (par le fluor, photo-oxydants ou composés azotés), soit le degré d'acidophilie ou de nitrophilie, soit la qualité globale de l'air (Kricke & Loppi (2002) ; Van Haluwyn & Van Herk (2002)).

➤ **Biosurveillance**

L'ensemble de ces concepts, définis auparavant, permet de mieux comprendre le sens de la biosurveillance.

« L'utilisation des réponses à tous les niveaux d'organisation biologique (moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique, tissulaire, morphologique, écologique) d'un organisme ou d'un ensemble d'organismes pour prévoir et/ou révéler une altération de l'environnement et pour en suivre l'évolution »

Cette définition rejoint les conceptions de Nimis (1999 a, b) qui fait référence à une situation **témoin** considérée comme « naturelle », ce qui permet de relier le degré d'altération à une normalité.

Les biomarqueurs végétaux, les végétaux bioindicateurs et les biointégrateurs dont les processus biologiques sont perturbés par des polluants, fournissent des informations sur les doses des polluants atmosphériques en fonction du temps. Les végétaux bioaccumulateurs donnent des informations directement reliées aux concentrations des polluants dans l'air.

1.1.6.3 Intérêts et limites des méthodes de biodétection par rapport aux méthodes physico-chimiques

Les principaux points d'intérêt peuvent être résumés de la façon suivante :

- Méthodes simples, rapides et peu onéreuses avec un faible coût d'investissement, une faible infrastructure, et une facilité d'entretien et de suivi.
- Possibilité de restructuration du réseau de plantes. Le nombre de stations peut être important.
- Possibilité de densifier à faible coût les réseaux de capteurs physico-chimiques.
- Possibilité de détecter des polluants nouveaux ou accidentels non pris en compte par les capteurs en place.
- Possibilité de réaliser des cartographies :

- Pour des informations générales : localisation et niveau de pollution, études des « panaches ».
- Pour entreprendre des études préliminaires : emplacements de nouvelles stations de mesure.
- Pour suivre l'évolution de la pollution suite à de nouvelles voies de circulation, de nouveaux quartiers, de nouvelles industries...
- Pour vérifier de nouvelles législations sur la qualité de l'air, de nouveaux plans de circulation...
- Pour guider une politique de protection, d'orientation ou d'amélioration des espaces verts et des parcs urbains.
- Pour des études sur les risques encourus par les populations fragiles.

Les points limites de ces méthodes de biodétection végétale sont essentiellement liés à la nature biologique du « détecteur » :

- Disponibilité non permanente des plantes liée au climat ou au cycle de végétation.
- Possibilité d'artefact avec d'autres stress biotiques ou abiotiques.
- Difficulté de remonter aux concentrations en polluants dans l'atmosphère.
- Temps de réponse et seuil parfois élevés.

Les méthodes de biodétection végétales ne sont pas concurrentes des méthodes physico-chimiques, mais avant tout complémentaires.

1.1.6.4 Principes de la biosurveillance lichénique

Il est recommandé d'utiliser un échantillon de référence pour garantir la qualité des analyses. L'agence internationale de l'énergie atomique dispose d'échantillons de lichens pour les éléments traces métalliques (réf. IAEA-336). Le « Bureau Communautaire de Référence » de l'Union Européenne (Standards, Measurements and Testing Programme) dispose également d'un lichen de référence : il s'agit de *Pseudoevernia furfuracea* (réf. CRM 482, Quevauviller *et al* (1996)).

Les éléments telluriques, piégés par le thalle lichénique, peuvent influencer les mesures des éléments traces atmosphériques. Pour cela, il est conseillé de calculer le facteur d'enrichissement (FE) (Bargagli (1989)). Pour ce faire, on rapporte la quantité d'un élément donné elt_X par rapport à la quantité d'un élément de référence elt_{ref} , à la fois dans le thalle et dans le sol.

$$FE = \frac{[eltX_{lichen}] / [eltref_{lichen}]}{[eltX_{sol}] / [eltref_{sol}]}$$

Généralement on rapporte aux concentrations d'éléments telluriques Al, Ti, Sc, Th, Zr, Si. Le thorium est un bon élément car il est stable et idéal pour les dosages en ICP-MS.

En cas de pollution organique et en raison de la volatilité et de l'instabilité de certains composés, il est important de garder les échantillons à froid depuis la récolte jusqu'à l'analyse et de les stocker à l'abri de la lumière.

➤ **En bioaccumulation**

En bioaccumulation Mukherjee et Nuorteva (1994) ont mis au point un indice de pollution pour chaque site (Equation 1). Ces auteurs ont dosé sept éléments (Al, Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Zn).

$$S_j = \sum_{i=1}^7 K_{ij} \quad (EQ. 1)$$

où :

S_j = indice de pollution du site j

K_{ij} = teneur du contaminant i pour le site j.

$$K_{ij} = \frac{X_{ij} - X_i}{X_i}$$

où :

X_{ij} = moyenne du contaminant i dans le site j.

X_i = moyenne du contaminant i de tous les sites.

Cet indice permet d'évaluer l'étendue des retombées d'une source précise. Il permet d'attribuer des valeurs positives élevées sous les retombées, des valeurs négatives dans des zones non soumises aux retombées.

Sur la base des concentrations des éléments traces d'un ensemble de sites choisis, on peut évaluer le degré d'altération d'un site (Nimis & Bargagli (1999) ; Bargagli & Nimis (2002)). Selon ces auteurs, les concentrations d'éléments traces métalliques dans un lichen sont comparées par rapport au bruit fond (12 stations ont été sélectionnées sur le territoire italien).

Quand on ne dispose pas de telles données, on comparera les valeurs observées par rapport à celles d'un ou de plusieurs sites éloignés de toute source de pollution.

Une autre méthode a été élaborée par Carballeira *et al* (2000). Elle consiste à calculer un facteur de contamination (CF) afin d'évaluer l'état d'un écosystème et d'en suivre l'évolution à partir d'un niveau de référence.

$$CF_b = C_b/BL_b \quad \text{ou} \quad CF_a = C_a/BL_a$$

où :

CF : facteur de contamination du biotope (CF_b) ou de l'environnement (air, eau, sol) (CF_a).

C : concentration du contaminant dans le biotope (C_b) ou dans l'environnement (C_a).

BL : niveau de contamination de référence du biotope (BL_b) ou de l'environnement (BL_a)

En l'absence de données sur le niveau de contamination de référence, il est possible de calculer un facteur de correction de façon diachronique.

$$CF = C_{b2}/C_{b1}$$

où :

C_{b1} : concentration du polluant à un temps 1 ou dans un site 1.

C_{b2} : concentration du polluant à un temps 2 ou dans un site 2.

➤ En bioindication/biointégration

Certaines méthodes quantitatives préconisent le calcul d'indices de Pureté Atmosphérique (IAP ou *Index of Atmospheric Purity*), de la qualité de l'air, de pollution atmosphérique ou de diversité lichénique, à partir de formules mathématiques incluant différents paramètres relatifs à la flore lichénique. Cet indice, combinant le nombre d'espèces dans une station avec leur sensibilité envers des stress environnementaux, notamment la pollution de l'air (Kricke & Loppi (2002)), est calculé suivant l'Equation 2.

$$IAP = \frac{n}{100} \left(\sum_{i=1}^n \frac{f \cdot Q}{n} \right) \quad (EQ. 2)$$

où

n = nombre d'espèces

Q = degré de toxiphobie

f = fréquence de chaque espèce

Les valeurs de l'indice qui dépendent des caractères de la flore lichénique locale, ne sont comparables que dans une même région. Cet indice, utilisé en Europe et ailleurs dans le monde, a subi un grand nombre de modifications et d'améliorations comme les détaillent Kricke & Loppi (2002) notamment en Allemagne et en Suisse. Ces développements de l'IAP ont en effet conduit à l'introduction de la fréquence lichénique en utilisant des grilles d'échantillonnage fixées aux troncs des arbres. La fréquence pour chaque espèce de lichens est lue sur une grille d'échantillonnage de 20 × 50 cm, constituée de 10 carrés de 10 × 10 cm. Elle correspond au nombre de carrés dans lesquels l'espèce est trouvée (Equation 3). Dans le cas d'une espèce rare ou seule, dont les thalles sont situés juste à côté de la grille, celle-ci peut être considérée et la fréquence de 1 lui est attribuée (Kricke & Feige (2002)).

$$IAP_{18} = \sum_{i=1}^n f_i \quad (EQ. 3)$$

où

n = nombre d'espèces

f = fréquence de chaque espèce i

➤ Biomarqueurs lichéniques

González *et al* (1996) ont établi un indice de pollution atmosphérique (IP) prenant en compte différents biomarqueurs lichéniques (Equation 4) :

$$IP = \left(\frac{\text{phaéoph.a}}{\text{chl.a}} + \frac{S_T}{S_F} \right) \times \left(\frac{MDA_T}{MDA_F} + \frac{HPCD_T}{HPCD_F} \right) \quad (EQ. 4)$$

où :

phaéoph.a : teneur en phaéophytine a.

chl.a : teneur en chlorophylle a.

S_T et S_F : teneur en soufre dans les lichens transplantés (T) et dans les lichens témoins (F).

MDA_T et MDA_F : teneur en malondialdéhyde dans les lichens transplantés et témoins.

$HPCD_T$ et $HPCD_F$: teneur en conjugués diènes dans les lichens transplantés et témoins.

I.2 Spéciation chimique des éléments dans un organisme vivant.

L'étude de la spéciation chimique d'un élément dans un système donné passe généralement par les étapes suivantes :

- 1- Isolation des composés présents dans ce système.
- 2- Analyse de la composition chimique du système.
- 3- Description des structures des composés.
- 4- Etude de leurs propriétés spectrales et cinétiques.

Parmi les difficultés qui se posent à la spéciation des éléments dans un organisme vivant on trouve le mode d'incorporation d'éléments dans un matériel végétal. Pour cela, il faut connaître les différentes combinaisons éléments-unités moléculaires et leurs stabilités thermodynamiques dans les conditions cellulaires. Puisque on ne peut pas désigner avec certitude la gamme de composés produits par l'organisme, on peut étudier des « modèles » conçus pour décrire les liaisons entre les éléments disponibles. Les différents modèles organiques doivent inclure l'ensemble des donneurs potentiels (O, N, S).

L'incorporation d'un élément par voie cinétique commence par la formation d'un complexe, suivie d'un passage à travers les membranes cellulaires en changeant de partenaire (ou de ligand) pour aboutir à une insertion finale dans un site organique.

➤ Aspects généraux de capture et de rejet des éléments

Les plantes s'approprient les éléments de leur environnement proche (sol, air...). La capture de certains éléments, M, implique une série de réactions comme le montre la Figure ci-après :

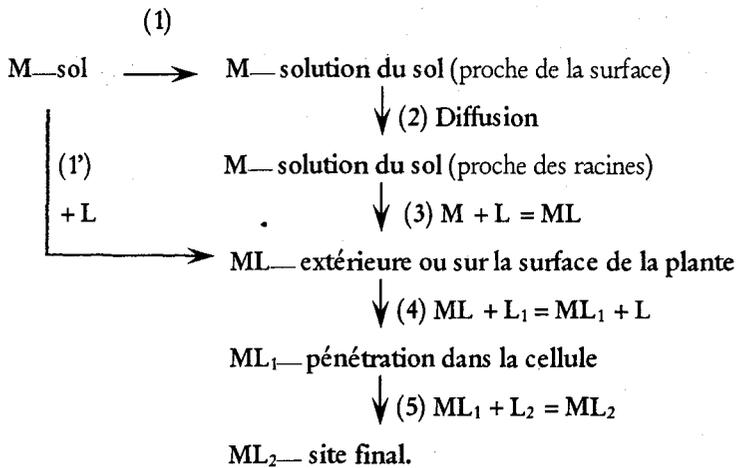


Fig. 13: Mode de capture d'éléments du sol

L'étape 1 dépend simplement de la solubilité du minéral, contenant l'élément M, dans l'eau. En cas de besoin, le végétal envoie un agent complexant L pour solubiliser et capturer l'élément M. Certaines plantes acidifient le sol avoisinant pour favoriser l'assimilation des éléments.

Le processus de diffusion de l'étape 2 dépend de la nature des espèces chimiques contenant l'élément M, de la distance par rapport au plant et de la nature physico-chimique du sol. Les étapes 3, 4, 5 sont des réactions de complexation sous contrôle thermodynamique ou cinétique. L'étape 5, gouvernée par un processus cinétique, assure l'irréversibilité de capture d'un élément et prend ainsi la forme d'une barrière pour une éventuelle diffusion : le complexe final ML_2 est stable (Fig. 13). Dans certains cas (Fe^{3+} , MoO_4^{2-} , NO_3^- , SO_4^{2-} , O_2 , N_2) on peut avoir des réactions d'oxydo-réduction qui peuvent être irréversibles.

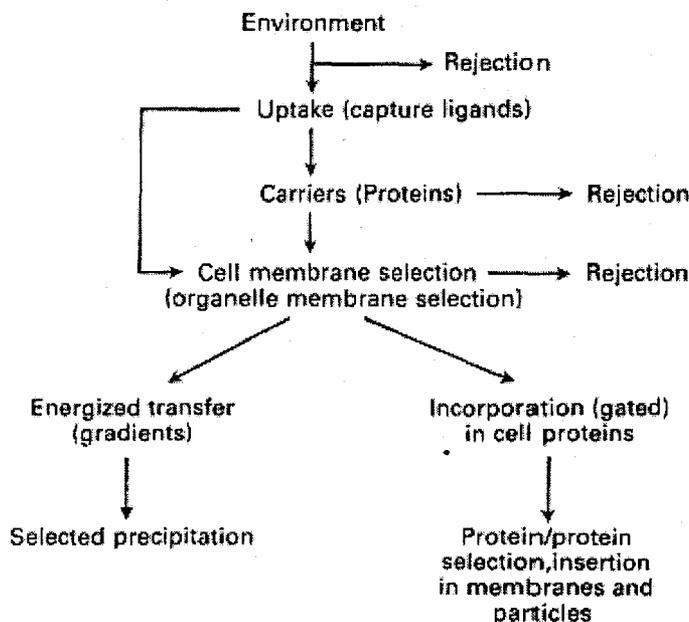


Fig. 14: Voies de capture et d'incorporation d'éléments dans un organisme vivant (Frausto da Silva & Williams (2001))

Les mécanismes de capture ne sont pas vraiment spécifiques, tout au moins pour les premières étapes, ce qui implique une compétition entre éléments. Le premier critère de sélection est basé sur la concentration et les types de liaisons entre les éléments et leurs matrices.

En raison de la faible affinité des éléments essentiels envers les groupements de surface (carboxylates, sulfates, phosphates, etc.), la sélectivité demeure assez faible. L'affinité des alcalino-terreux et des éléments de transition de la première série, représentée par la constante de stabilité des complexes (Tableau 2), laisse apparaître une faible sélectivité. Cependant les métaux de transition donnent des complexes plus ou moins stables à cause des orbitales vides dans leurs structures.

	$\log K_{ML}$									
	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Sr^{2+}	Ba^{2+}	Mn^{2+}	Fe^{2+}	Co^{2+}	Ni^{2+}	Cu^{2+}	Zn^{2+}
Acetate	1.25	1.24	1.19	1.15	1.40	—	1.46	1.43	2.23	1.57
Malonate	1.95	1.85	(1.25)	1.34	(2.3)	(2.5)	2.98	3.30	5.55	2.97
Phosphate	1.60	1.33	1.0	—	2.58	—	2.18	2.08	3.2	2.4
Pyrophosphate	5.4	4.9	(4.7)	(4.6)	—	—	6.1	6.98	7.3	(5.1)
Methylphosphate	1.52	1.49	—	—	2.19	—	2.00	1.91	—	2.16
Sulfate	2.20	2.31	2.3	2.3	2.0	2.3	2.47	2.40	2.4	2.3
Thiosulfate	1.84	1.98	2.04	2.21	1.95	2.17	2.05	2.06	—	2.30

Tableau 2: Constantes de stabilité (K_{ML}) des complexes alcalinoterreux et de la première série métaux de transition avec différents ligands de types carboxylate, phosphate, et sulfate 1:1 ($T = 25^\circ C$), Chemical Society (1964)

Par conséquent, beaucoup de plantes (et spécialement les lichens qui possèdent des groupements énolates et qui font de ces végétaux un matériel de choix pour l'étude de la pollution par les métaux lourds) peuvent concentrer des éléments sur leurs surfaces. Le tableau 3 montre la constante de stabilité K_s de quelques éléments en fonction des espèces végétales. Ces éléments peuvent parfois être toxiques s'ils sont excessivement concentrés.

Ion	Espèces	Organe ou tissu	log K
K^+	<i>Hordeum vulgare</i> (orge)	Racines	1.68
K^+	<i>Zea mays</i> (maïs)	Tissu de feuille	1.42
K^+	<i>Elodea densa</i> (l'élodée)	Feuille (entière)	1.00
Rb^+	<i>Hordeum vulgare</i> (orge)	Racines	1.77
Rb^+	<i>Zea mays</i> (maïs)	Tissu de feuille	1.82
Sr^{2+}	<i>C. alpestris</i> (lichen)	Poudre	1.95
Ni^{2+}	<i>U. muhlenbergii</i> (lichen) (pKa = 5.40)	Poudre	3.30
Cu^{2+}	Canne à sucre	Feuille	1.87
Zn^{2+}	Canne à sucre	Feuille	1.95
Mn^{2+}	Canne à sucre	Feuille	1.79

Tableau 3: Affinité de certains métaux envers les groupements de surfaces où $K = [MA^+]/[M^{2+}][A^+]$ A étant un groupement de surface

Les cellules procaryotes comportent deux membranes ; une membrane externe qui est très sélective vis-à-vis d'un grand nombre d'espèces chimiques, et une membrane interne (cytoplasmique) qui synthétise des molécules capables de fixer les éléments et de les transférer vers les cellules.

Les mécanismes de capture d'éléments sont cinétiquement et/ou thermodynamiquement contrôlés. Etant donné que l'incorporation d'un élément M fait appel à des partenaires (ligands) différents, les formes sous lesquelles se trouve l'élément M sont différentes de part et d'autre des membranes (Fig. 15).

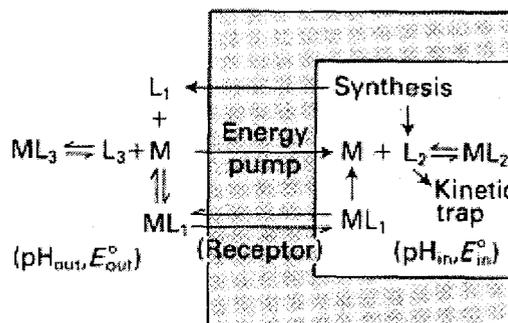


Fig. 15: Etapes de transfert d'un élément M, à travers les membranes (Frausto da Silva & Williams (2001))

I.3 Stress oxydatif

I.3.1 Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO).

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont des formes partiellement réduites de l'oxygène atmosphérique. Elles sont appelées aussi radicaux libres bien qu'elles n'en soient pas toutes. Elles sont formées par une excitation de l'oxygène pour former l'anion superoxyde O_2^- , le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et le radical hydroxyle OH^\cdot (Fig. 16)

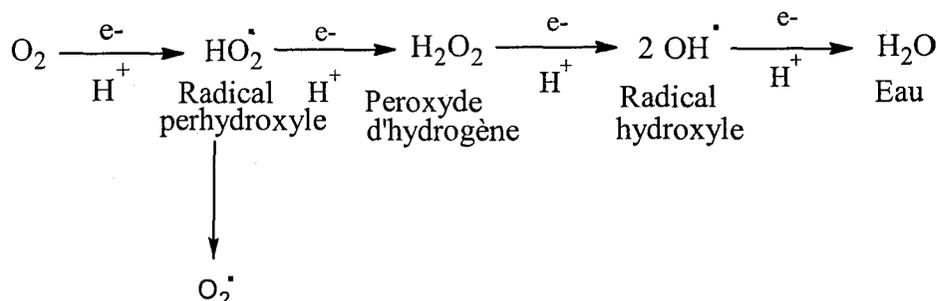


Fig. 16: Formation des Espèces Réactives de l'Oxygène

Ces formes chimiques sont très réactives et tendent à céder ou à associer un électron au cours de réactions d'oxydoréduction. Ces ERO sont capables d'oxyder divers composés cellulaires et peuvent conduire à une destruction oxydative de la cellule.

Il existe plusieurs sources potentielles dans la cellule qui produisent les ERO. Certaines espèces sont produites par les métabolismes normaux, comme celui de la photosynthèse chez les cellules chlorophylliennes, la chaîne de transport des électrons au sein du chloroplaste ou l'activité oxygénase de la Rubisco de l'anion superoxyde. Plus généralement, l'activation de l'oxygène peut se produire au niveau des chloroplastes, des mitochondries, du réticulum endoplasmique, des peroxysomes et des parois (Cossu *et al* (1997)), Vangronsveld *et al* (1997)). Récemment de nouvelles sources d'ERO ont été identifiées, notamment la NADPH oxydase, amine oxydase.

Dans des conditions normales de croissance, la production des ERO dans les cellules est faible ($240 \mu M s^{-1} O_2^-$ et $0,5 \mu M H_2O_2$ dans le chloroplaste d'après Polle (2001)). Plusieurs types de stress perturbent l'homéostasie des cellules et stimulent la production des ERO ($240-720 \mu M s^{-1} O_2^-$ et $5-15 \mu M H_2O_2$).

Parmi les types de stress qui conduisent à la formation des ERO chez les plantes, nous citons :

- ✓ dessiccation
- ✓ stress salin
- ✓ refroidissement
- ✓ choc thermique
- ✓ métaux lourds

- ✓ radiations UV
- ✓ polluants atmosphériques (exemple le SO₂)
- ✓ déficience alimentaire

I.3.2 Mécanismes de détoxification des ERO

L'augmentation des ERO peut constituer une menace pour la cellule. Néanmoins, ces ERO agissent également comme des messagers pour l'activation des systèmes de défense. Face à l'augmentation des ERO, la cellule active ces mécanismes de détoxification des ERO. Elle produit des composés appelés **antioxydants** pour convertir les radicaux libres en forme non toxique comme l'eau ou l'oxygène. Le Tableau 4 regroupe les mécanismes de production et de détoxification des ERO chez les plantes.

Mécanisme	Localisation	ERO
Production		
Photosynthèse ET et PSI ou II	Chl	O ₂ ⁻
Respiration ET	Mit	O ₂ ⁻
Glycolate oxydase	Per	H ₂ O ₂
Chlorophylle excitée	Chl	O ₂ ⁻
NAPDH oxydase	PM	O ₂ ⁻
β-oxydation des acides gras	Per	H ₂ O ₂
Oxalate oxydase	Apo	H ₂ O ₂
Xanthine oxydase	Per	O ₂ ⁻
Peroxydases, Mn ²⁺ et NADH	CW	H ₂ O ₂ , O ₂ ⁻
Amine oxydase	Apo	H ₂ O ₂
Antioxydant		
Superoxyde dismutase	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	O ₂ ⁻
Ascorbate peroxydase	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	H ₂ O ₂
Catalase	Per	H ₂ O ₂
Glutathion peroxydase	Cyt	H ₂ O ₂ , ROOH
Peroxydases	CW, Cyt, Vac	H ₂ O ₂
Thioredoxine peroxydase	Chl, Cyt, Mit	H ₂ O ₂
Acide ascorbique	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	H ₂ O ₂ , O ₂ ⁻
Glutathion	Chl, Cyt, Mit, Per, Apo	H ₂ O ₂
α-Tocophérol	Membranes	ROOH, O ₂ ⁻
Caroténoïdes	Chl	O ₂ ⁻
Abréviations : Apo : apoplast, Chl : chloroplaste, CW : paroi cellulaires, Cyt : cytosol, ET : transport d'électron, Mit : mitochondrie, Per : peroxysome, PM : membrane plasmique, PS : photosystème, Vac : vacuole.		

Tableau 4 : Mécanismes de production et de détoxification des ERO et leur localisation au sein des cellules végétales

L'équilibre entre le SOD et l'APX dans la cellule est crucial car il détermine l'état d'équilibre entre les radicaux superoxydes et les peroxydes d'hydrogène. Cet équilibre est important pour prévenir la formation des radicaux hautement toxiques, les radicaux hydroxyles.

Les différences d'affinité de l'APX (de l'ordre du μM) et le catalase (de l'ordre de mM) pour le H₂O₂ fait que ces deux antioxydants réagissent différemment vis-à-vis de ce radical.

En effet, l'APX agit comme un messager pour activer les systèmes de défense, alors que le catalase élimine l'excès de H_2O_2 durant un stress.

Les antioxydants se répartissent dans différents compartiments de la cellule. Le SOD est rencontré fréquemment dans le chloroplaste, le cycle d'ascorbate glutathion du chloroplaste, le cytosol, la mitochondrie, l'apoplast et les peroxisomes. Le GPX et le CAT sont présents dans les peroxisomes. L'APX présent à différents compartiments de la cellule joue un rôle déterminant dans le contrôle du niveau des ERO en vue de sa grande affinité envers ces radicaux. Le catalase est présent uniquement dans les peroxisomes mais il reste un antioxydant préformant pour la détoxification des ERO. Lopez-Huertas *et al* (2000) ont remarqué une prolifération des peroxisomes durant un stress induit, conduisant ainsi à l'augmentation des CAT.

L'acide ascorbique et le glutathion, qui abondent au niveau du chloroplaste et autres compartiments cellulaires (5-20 mM en acide ascorbique et 1-5 mM en glutathion) jouent un rôle essentiel dans la défense contre le stress oxydatif (Noctor & Foyer (1998)).

Les SOD jouent un rôle crucial dans la détoxification des ERO. Ces antioxydants agissent en première ligne de défense en convertissant le radical O_2^- en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Le CAT, l'APX et GPX agissent sur ce radical pour le convertir en O_2 (Fig. 17). L'APX et le GPX requiert un ascorbate ASA et/ou un glutathion GSH pour la régénération des cycles (A), (B) et (C).

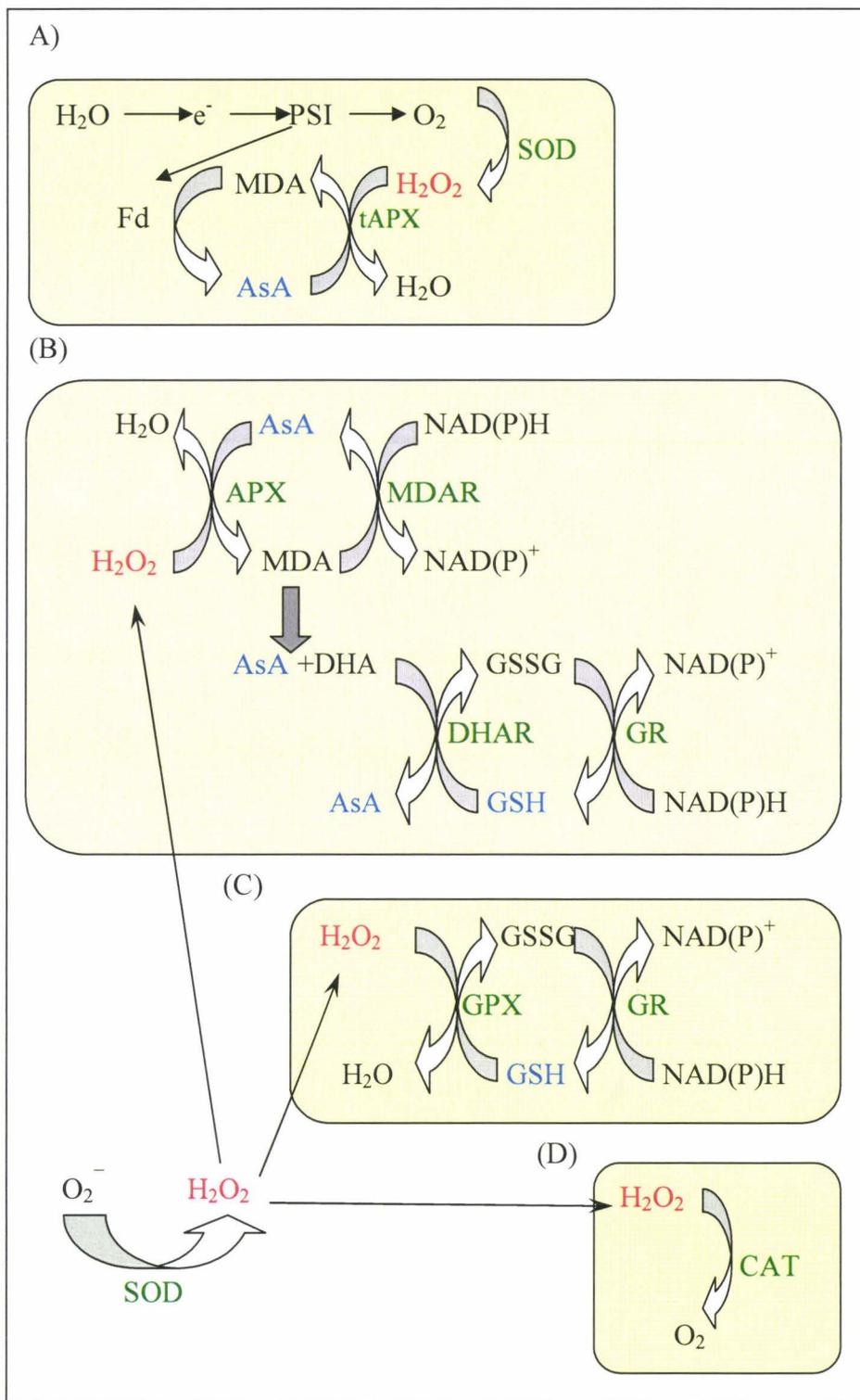


Fig. 17: Voies de détoxification des éléments traces ; (A) : cycle eau-eau, cycle d'ascorbates-glutathion, (D) : mécanisme de détoxification par le catalase. DHA : déhydroascorbate, DHAR : déhydroascorbate réductase, Fd : ferredoxine, GR : glutathion réductase

Les éléments traces sont reconnus comme pouvant générer, plus ou moins directement, un stress oxydant au sein des organismes vivants. Les éléments traces non essentiels perturbent de nombreux processus chez les végétaux : fonctionnement des chloroplastes, assimilation du soufre, augmentation l'activité de certains enzymes par exemple, le cadmium

augmente l'activité de l'enzyme malique, de la glutamates-oxaloacétate aminotransférase (Chugh *et al* (1992)).

De nombreux travaux établissent un lien direct entre les éléments traces métalliques et le stress oxydatif chez les plantes supérieures. Costa & Spritz (1997) ont étudié les effets du cadmium chez les *Lupinus albus*. Ils ont montré un effet délétère sur les pigments chlorophylliens mais aussi sur les membranes par l'augmentation de la concentration du malondialdéhyde.

Les travaux chez les lichens montrent que les éléments traces métalliques ont de nombreux effets toxiques. Ils atteignent les différentes voies métaboliques comme la photosynthèse, la respiration...etc. (Garty 1985, Chettri *et al* 1998, Nash 1996). Selon Brown & Beckett (1985), les atteintes membranaires par les éléments traces seraient la première cause de leur toxicité.

CHAPITRE II

ETUDE ANALYTIQUE DE LA BIOACCUMULATION DES METAUX LOURDS PAR LE *DIPLOSCHISTES MUSCORUM*.

II.1 Description des sites étudiés.

Au cours du siècle dernier, la région Nord-Pas-de-Calais a connu un développement considérable des activités sidérurgiques, métallurgiques et minières. Si toutefois une meilleure connaissance de la toxicité des métaux et de leur impact sur l'écosystème et la santé humaine a permis de limiter les rejets dans l'environnement, cette région doit encore, à ce jour, gérer un lourd héritage. La région Nord-Pas-de-Calais figure toujours parmi celles les plus touchées par les rejets d'éléments traces métalliques d'origine industrielle. Trois principaux secteurs sont actuellement à l'origine d'émission de métaux dans l'atmosphère : les centrales thermiques, les incinérateurs d'ordures ménagères et les industries de transformation de métaux non ferreux.

Les travaux et les recherches mis en place dans le cadre du programme de recherches concertées visent à réhabiliter de nombreuses friches industrielles.

Nos prélèvements de lichens sont issus de la zone d'étude située à Noyelles-Godault au nord/nord-ouest de Douai, où sont implantées deux industries de première fusion de métaux non ferreux. Ces industries comportent des ateliers de fonderie de plomb et de zinc. Le site métallifère, situé à proximité de l'usine Umicore, a subi des dépôts ponctuels et incontrôlés de scories provenant de l'extraction minière. La contamination des sols environnants résulte aussi d'émissions de poussière de dérivés peu solubles d'éléments traces.

L'étude de l'impact des métaux lourds et l'évaluation des capacités bioaccumulatrices d'une communauté bryolichénique dépendent des caractères de la flore lichénique locale et ne sont comparables que dans une même région. Deux sites ont été sélectionnés pour cette étude dans la région Nord-Pas-de-Calais, il s'agit de la forêt domaniale d'Ecault et du site de Merlimont. Ces deux réserves naturelles sont situées sur le littoral à une distance d'environ 150 km à l'ouest du site métallifère.

II.1.1 Site métallifère.

Le bois des Asturies (Fig. 18) est situé dans le nord de la France à Auby (région du Nord Pas-de-Calais). Ce site, situé à proximité de l'usine Umicore, a une surface de 15 000 m². Il est délimité par une voie de chemin de fer à l'ouest, la départementale D420 à l'est et par deux propriétés au nord et au sud. Ce terrain se situe en zone urbanisée et reçoit les retombées atmosphériques des deux sites industriels cités au chapitre I (paragraphe I.1.1). Les champs agricoles et jardins particuliers attenants sont susceptibles de recevoir les mêmes doses de polluants que les sites industriels.

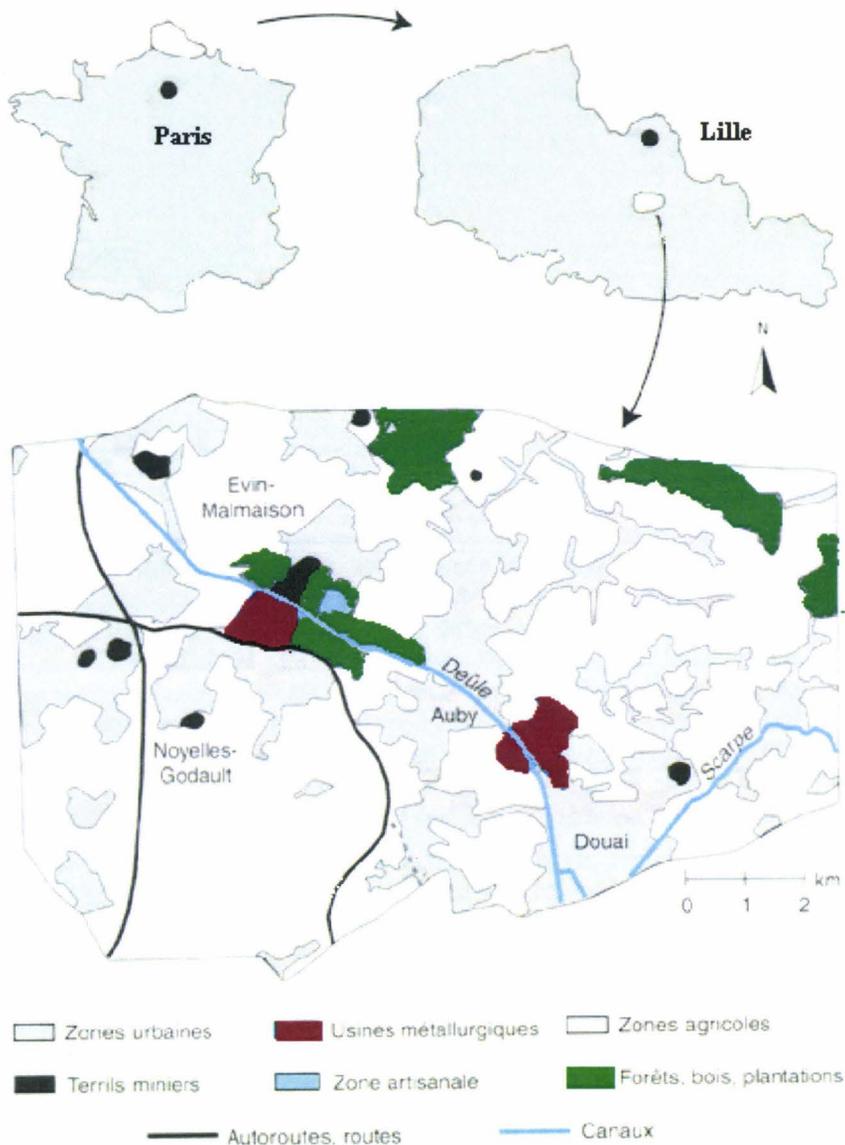


Fig. 18: Localisation et description de la zone métallifère étudiée (Sterckeman *et al* (2002))

L'importance de ce site réside aussi dans le fait qu'il a été la cible de dépôts de scories, liés aux activités d'extraction minière. Les résidus d'extraction sont extrêmement toxiques pour la végétation locale, et seules des plantes très spécialisées, dites métalphytes, ont pu coloniser ces terrains calaminaires. Cuny (1999) a répertorié les végétaux présents sur ce site. On retrouve des métalphytes absolus (i.e végétaux liés exclusivement aux sols métallifères) : *Armeria maritima* Wild. Subsp. *halleri* (Wallr.) Rothm., *Cardaminopsis halleri* (L.) Hayek, *Silene vulgaris* (Moench) Garcke subsp. *vulgaris* var. *humilus* Schubert et des végétaux (dits pseudo-métalphytes) qui ne sont pas nécessairement liés à la présence de métaux dans les sols : *Arrhenatherum elatius* (L.) Beauv. ex J et C. Presl, *Argostis capillaris* L. et *Calamagrostis epigeios* (L.) Rothy (Van Haluwyn *et al* (1995)).

II.1.2 Sites témoins

Les deux sites témoins faisant l'objet de notre étude sont situés sur le littoral. Les deux sites sont proches : environ 50 km les séparent. Par contre, ils sont à une distance d'environ 150 km à l'ouest du site métallifère (Fig. 19)

Forêt d'Ecault :

Ce site se trouve au sein d'une forêt domaniale dans le massif dunaire d'Ecault qui s'étend sur près de 5 kilomètres. Le site a subi des aménagements importants et est référencé comme réserve naturelle. Ce site est la propriété du Conservatoire de l'espace littoral.

Un autre facteur intéressant de ce site est la flore bryolichénique importante qui s'y développe. Ce massif se situe en bord de mer, à environ 140 km à l'ouest du site métallifère. Il présente des caractéristiques climatiques différentes de celles qui existent à l'intérieur des terres.

Site de Merlimont

Ce site, situé entre l'agglomération de Merlimont et la station de Berck sur la Côte d'Opale, s'étend sur 800 ha. Il est la propriété de l'État, de la commune de Merlimont et du Conservatoire de l'espace littoral et des rivages lacustres. Il a été érigé en réserve biologique sur sa partie domaniale en 1985. Ce site est caractérisé par une diversité de végétation, des comportements du sable, des sols dus au vent ou à l'action anthropique et aux modifications du régime d'écoulement des eaux qui en résultent. Ce vaste complexe dunaire formé par de nombreuses dépressions humides et inondées, dunes vives externes, dunes internes boisées, vastes plaines marécageuses, abrite des espèces végétales très variées.

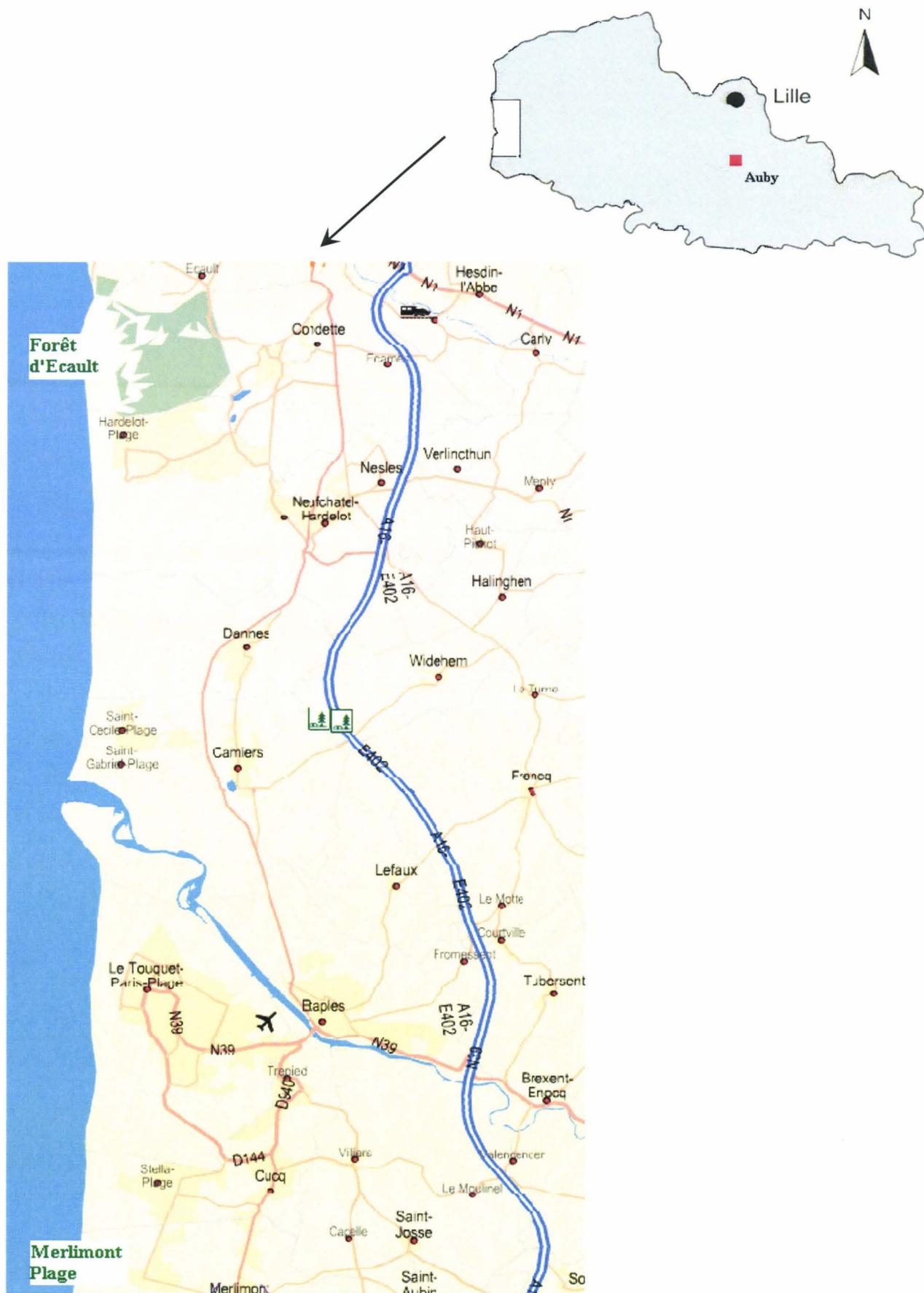


Fig. 19 : Localisation des sites témoins. Les deux sites sont notés en vert. (Mappy 2005)

II.2 Description de l'espèce étudiée

Le *Diploschistes muscorum* (Scop) R. Sant a un thalle crustacé, à surface inégale, à aréoles nettement délimitées planes à légèrement convexes, de couleur gris bleuâtre à gris verdâtre (en raison de la présence d'un voile algal). Cette espèce est dépourvue de rhizines ; la face corticale inférieure est en contact direct avec le substrat. Les thalles sont facilement détachables du substrat, la face inférieure du thalle est souvent constituée d'une sorte de plancher associant le substrat et les hyphes fongiques.

Les apothécies sont nombreuses, plus ou moins enfoncées dans le thalle, à bord thallin épais, à rebord propre, mince et légèrement strié. Le disque noir est parfois pruineux

Sur les trois sites, ce lichen se développe en colonie, mais chaque thalle a une surface délimitée, facilement repérable à sa couleur claire et à sa forme circulaire bien régulière.

Les lichens témoins, se développant sur un sable dunaire, présentent des formes de coquillages (Fig. 20).

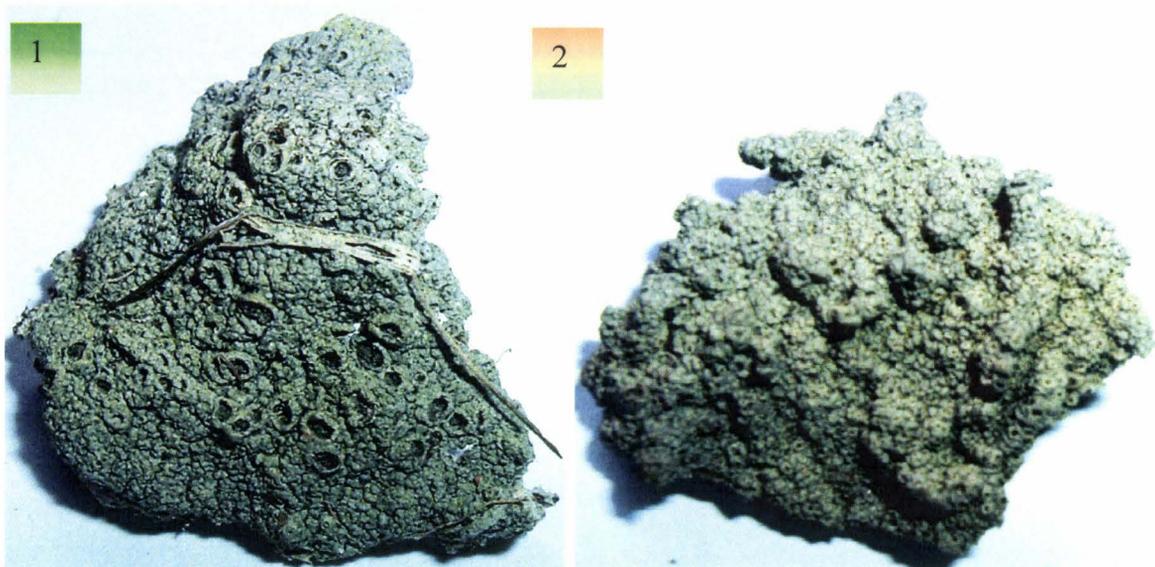


Fig. 20 : *Diploschistes muscorum* (Scop) R. Sant. prélevés sur le site d'Ecault (1) et sur le site d'Auby (2)

II.2.1 Systématique du *Diploschistes muscorum* (scop) R. Sant.

Règne	Fungi
Division	Ascomycota
Classe	Ascomycètes
Ordre	Graphidales
Famille	Thelotremataceae
Genre	<i>Diploschistes</i> Norman
Espèce	<i>Diploschistes muscorum</i> (scop) R. Sant.
Sous-espèce	<i>Diploschistes muscorum</i> (scop) R. Sant. ssp. <i>muscorum</i>

Selon Lumbsch (1989) et Guderley *et al* (1997), les espèces du genre *Diploschistes* Norman, issu des *thelotrematacea*, avec un photobionte *trebouxia*, peuvent survivre dans des climats arides ou semi-arides. Ces espèces possèdent une diversité géographique très importante (Lumbsch & Elix (2003)).

Dans le nord de la France, le *Diploschistes muscorum* est observé essentiellement sur les dunes du littoral (dunes Dewelf et Marchand, Ambleteuse, Etaples, Mont Saint-Frieux), sur des terrils miniers (Harnes, Estevelles) et sur des pelouses métallicoles (Mortange-du-nord, Auby) (Cuny (1999)). Cette espèce a été retrouvée également sur deux sites faisant l'objet de notre étude, il s'agit des dunes de Merlimont et Ecault.

II.2.2 Réactions colorées

Les caractéristiques morphologiques sont un premier critère d'identification des lichens mais il est souvent indispensable de compléter cette identification par des réactions macrochimiques sur le cortex voire la médulle ainsi que par un examen microscopique.

Les réactions thallines encore utilisées aujourd'hui datent des travaux de taxonomie de Nylander (1866). On notera que les symboles (K, C, P) des réactifs ne correspondent pas à ceux qu'utilise la chimie, mais sont spécifiques à la lichénologie.

Les principaux réactifs utilisés sont les suivants :

- **K** : la potasse (KOH), en solution saturée à environ 10%. Elle provoque l'apparition d'une teinte pourpre, due à la formation de quinones, sur les lichens contenant les substances du groupe de la pariétine, et une teinte violette aux apothécies rouges de certains *Cladonia* contenant l'acide rhodocladonique. Le thalle gris de *lecanora subcircinata* est coloré également en rouge vif par ce réactif ; la nature de cette réaction chimique n'est pas exactement connue.
- **C** : hypochlorite de sodium (NaClO), solution fraîche à conserver à l'abri de la lumière. Les teintes orangées, roses ou carmin obtenues sont dues le plus souvent à des groupements hydroxyles en position « méta », un oxydant doux comme l'hypochlorite donne alors lieu à la formation de quinones colorées. Cette réaction ne se produit qu'après action préalable de la potasse, qui libère un groupement OH par hydrolyse d'un pont ester de depsidone ; la réaction est alors notée KC.

Ces réactifs chimiques réagissent avec les métabolites déposés sur le thalle, en surface (cortex) mais également sur la médulle : il faut donc gratter la surface du thalle avec une lame de rasoir pour découvrir la médulle.

Le *Diploschistes muscorum* réagit avec ces trois réactifs. Les colorations obtenues sont notées ci-dessous.

<i>Test K</i>	<i>Test C</i>	<i>Test KC</i>
+ (rouge)	+ (jaune)	+ (rouge)

Le *Diploschistes muscurum* est caractérisé par la présence de métabolites de la voie de l'acétyl-polymalonyl. Au cours de ce travail, nous avons pu identifier un ensemble d'acides lichéniques chez cette communauté bryolichénique (voir chapitre III).

II.2.3 Développement du *Diploschistes muscurum*

L'espèce étudiée a adopté la stratégie de développement basé sur le parasitisme évoqué au chapitre I. Selon Cuny *et al* (1997) ; Friedl (1989 a,b) le *Diploschistes muscurum* parasite presque exclusivement des thalles de *Cladonia*. Les spores éjectées à partir des apothécies doivent nécessairement se déposer sur un thalle *Cladonia* où elles se développent à la surface du cortex. Les hyphes d'ancrage atteignent la couche algale. Les cellules fongiques entrent en contact avec les algues du *Cladonia*, la symbiose s'installe alors entre le mycosymbiote du *Diploschistes muscurum* et le photobionte du *Cladonia*.

Galun (1988) a défini sept stades dans la formation du thalle. Cet auteur a décrit l'enveloppement des cellules algales par le champignon après le troisième stade. C'est un stade sorédial où on peut observer une structure en pelote (Van Haluwyn & Lerond (1993)). Ces pelotes se rejoignent et forment le thalle du *Diploschistes muscurum*. Le stade final du parasitisme est atteint lorsque l'on voit apparaître des apothécies. La forme de l'hôte disparaît au détriment de celle du *Diploschistes muscurum*. Au cours de l'évolution du parasitisme, il se peut que le *Diploschistes muscurum* change de photobionte. Friedl (1987 b) a observé dans les premiers stades de développement la présence de *Trebouxia irrugaralis*, alors que chez les adultes, il a mis en évidence un *Trebouxia schowmani*. Les mécanismes d'échange entre mycosymbiote et les différents photobiontes sont encore mal connus. Le point commun entre ces espèces *Cladonia*, est la présence d'acide fumarprotocétrarique. L'étude menée par Cuny *et al* (1997) sur la germination des spores isolées des thalles de *Diploschistes muscurum* (récoltés à Saint Frieux) montre que celle-ci est significativement influencée par la présence d'acide fumarprotocétrarique. Les espèces *Cladonia* parasitées par le *Diploschistes muscurum* sont citées dans le tableau 5.

Espèces	Acides lichéniques
<i>Cladonia chlorophaea</i> (Florke ex Sommerf.) Sprengel (Fig. 21)	Acide fumarprotocétrarique
<i>Cladonia coniocraea</i> (Florke) Sprengel	Acide fumarprotocétrarique, Acide usnique
<i>Cladonia foliacea</i> (Huds.) Willd (Fig. 22)	Acide fumarprotocétrarique, Atranorine
<i>Cladonia furcata</i> (Huds.) Shradler	Acide fumarprotocétrarique, Atranorine
<i>Cladonia pocillum</i> (Ach.) O.J. Rich	Acide fumarprotocétrarique, Atranorine
<i>Cladonia rangiformis</i> Hoffm.	Acide fumarprotocétrarique, Atranorine
<i>Cladonia subulata</i> (L) Weber ex Wigg	Acide fumarprotocétrarique

Tableau 5 : Principales espèces parasitées par *Diploschistes muscurum* (Cuny *et al* (1997))



Fig. 21 : *Cladonia chlorophaea* du site d'Auby



Fig. 22 : *Cladonia foliacea* du site d'Auby



Fig. 23 : *Diploschistes muscorum* récolté sur le site d'Ecault parasitant un *Cladonia chlorophaea*



Fig. 24 : *Diploschistes muscorum* du site d'Auby parasitant un *Cladonia foliacea*

II.3 Mécanismes d'absorption des éléments traces métalliques par les lichens

Les lichens sont utilisés depuis une quarantaine d'années pour suivre la contamination de l'environnement par les éléments traces métalliques. La majorité des éléments de la classification périodique a été recherchée dans les lichens.

Les lichens sont d'excellents bioaccumulateurs d'éléments puisque les concentrations trouvées dans leurs thalles peuvent être directement corrélées avec celles de leur environnement (Pilegrand (1979) ; Sloof (1995) ; Jeran *et al* (1996) ; Reis *et al* (1999)). Cependant cette propriété de bioaccumulation n'est pas identique chez toutes les espèces. De nombreux articles montrent que plusieurs paramètres physiologiques des lichens peuvent être affectés par l'accumulation de polluants atmosphériques métalliques ou gazeux. Les principaux changements sont la dégradation des chlorophylles et de leurs concentrations (Garty *et al* (1993)), la diminution d'ATP (Silberstein *et al* (1996) ; Garty (2001)), la baisse du taux de respiration et de photosynthèses (Deltoro *et al* (1999) ; Häffner *et al* (2001)), la diminution de l'intégrité des membranes cellulaires (Garty *et al* (1998) ; Tarhanen *et al* (1999) ; Garty *et al* (2003)), la production d'éthylène (Garty *et al* (1997) ; Garty *et al* (2003)) et la peroxydation des lipides membranaires (Ganzález & Pignata (2000) ; Carreras & Pignata (2001)). Néanmoins certaines espèces tolèrent des quantités supérieures aux concentrations toxiques pour d'autres espèces. Des teneurs en éléments traces ont été observées chez des espèces lichéniques en relation avec la pollution industrielle comme le zinc (90000 ppm) chez le *Diploschistes bryophilus* en Belgique, le cadmium (350 ppm) chez le *Verrucaria nigrescences* aux Etats unis et également du plomb (3215 ppm), accumulées en zone urbaine de Leeds en Grande Bretagne (Déruelle & Lallement (1983)). La capacité d'accumulation des espèces est différente en fonction de l'élément (Garty *et al* (1996)). Cette propriété de bioaccumulation a fait l'objet de nombreuses études de diagnostic environnemental, aussi bien dans le cas des contaminations venant du sol que de l'atmosphère.

Les lichens opèrent comme des résines échangeuses d'ions. Ils absorbent les ions métalliques extracellulaires issus de l'eau de pluie et/ou du sol et relarguent des protons ou des ions métalliques de faible affinité de liaison (Richardson & Nieboer (1981) ; Richardson (1992)).

Trois mécanismes sont classiquement avancés en ce qui concerne l'absorption et l'accumulation d'éléments chimiques dans les lichens (Garty (2001)) ; Bargagli & Mikhialova (2002)) : le piégeage des particules contenant des éléments chimiques, l'adsorption extracellulaire et l'absorption cellulaire.

II.3.1.1 Le piégeage des particules

Les éléments traces peuvent être acheminés vers le thalle par des échanges gazeux avec l'atmosphère, avec l'eau (de ruissellement ou de la solution du sol) et à partir du substrat. Au cours du développement du thalle, les hyphes fongiques parcourent les interstices entre les particules du sol. Ces dernières se trouvent alors emprisonnées au sein du thalle à cause de l'enchevêtrement des hyphes fongiques (Brown & Beckett (1985) ; Garty *et al* (1979)). Ces particules peuvent être également à la surface du thalle en cas de pollution atmosphérique par des

poussières (Brown (1987)). Ces particules prennent place dans les espaces libres (qui constituent 18 % chez le *Xanthorai parietina* d'après Collins & Farrar (1978) de la trame fongique médullaire. Selon Nash (1996), ce mécanisme est à l'origine des teneurs élevées en éléments traces chez certains lichens *in situ*.

Les voies d'altération des particules font intervenir des acides lichéniques ou des acides organiques comme l'acide oxalique ou l'acide citrique. Tobin *et al* (1994) ont mis en évidence l'action de certains composés extracellulaires, chez des champignons non lichénisés, pour déplacer et mettre en solution les éléments comme par exemple des produits soufrés (enzymes de dégradation), l'acide oxalique, des polysaccharides, la mélanine extracellulaire.

Certains lichens (en particulier les lichens crustacés) peuvent coloniser différents types de substrats (voir chapitre I). Ces végétaux arrivent à s'incruster sur des rochers (feldspath, quartz, granite...etc.) grâce à leurs caractéristiques spécifiques. Jie Chen *et al* (2000) ont cité les différents effets physiques et chimiques qui permettent de désagréger les rochers et d'altérer les particules.

Les effets physiques qui peuvent désagréger les rochers sont :

- i- Pénétration des hyphes dans les interstices intergranulaires.
- ii- Contraction et rétraction du thalle sous l'effet de l'alternance des états secs et humides.
- iii- Cristallisation des sels secondaires secrétés par le lichen qui exerce une pression permettant de séparer des grains minéraux ou des fragments de rochers du substrat.
- iv- Les lichens qui poussent dans des climats froids peuvent désagréger les substrats par le passage de la phase liquide à la phase solide (expansion) de l'eau contenue dans le thalle.
- v- Incorporation des fragments minéraux dans le thalle.

L'action chimique des lichens sur les rochers est caractérisée par différents mécanismes de solubilisation des éléments minéraux ; parmi ces mécanismes :

- i- Action de l'acide carbonique formé par la dissolution du CO₂ de respiration dans l'eau contenue dans le thalle. Cet acide accentue la solubilisation des minéraux en diminuant le pH au sein du thalle et de son environnement proche. Selon Jones & Wilson (1985) c'est une des formes géochimiques d'altération des minéraux qu'on peut rencontrer dans des climats tropicaux.
- ii- Action de l'acide oxalique sécrété par le mycosymbiote ; il est admis que l'acide oxalique joue un rôle crucial dans la dissolution des particules chez plusieurs espèces. Cependant, Jones & Wilson (1985) précisent que l'on ne peut pas généraliser cette forme de dissolution des particules à tous les lichens, car il existe des espèces qui ne produisent pas l'acide oxalique, mais peuvent sécréter d'autres acides organiques comme l'acide citrique ou l'acide gluconique.

- iii- Mécanisme d'*alcalinolyse*, cité par Creveled (1981). Il s'agit des composés azotés comme l'ammoniaque, qui peuvent stimuler la dissolution de certains composés lichéniques et accélérer l'altération des minéraux.

L'altération des particules peut être une source secondaire d'éléments. Les éléments acheminés du substrat vers le thalle, par le mécanisme de piégeage de particules, dépendent surtout des caractères physico-chimiques du substrat. Une étude réalisée par Weed & Norton (1991) sur des extraits liquides d'un lichen colonisant des rochers en grès, montre la présence des structures oxalates-fer. Sur des rochers en basalte, les lichens accumulent le magnésium et le fer (Iskandar & Syers (1972)). La désagrégation des roches granitiques, riches en aluminium, montre la transformation de la biotite en hydroxy-aluminium vermiculite (Pierto *et al* (1994)). Sur des roches en calcaire colonisées par *C. callopsisma*, *Diploschistes ocellatus*, *Squamarina oleosa* et *Protoblastemia testacea*, la calcite a considérablement diminué à cause de l'activité de l'acide oxalique (Ascaso *et al* (1982)). Cette étude a montré également qu'à l'interface du thalle du *Diploschistes ocellatus* avec le rocher, la calcite a complètement disparu.

II.3.1.2 Adsorption extracellulaire

Les éléments ainsi libérés après altération des particules (d'origine substratique ou atmosphérique) pourront se répartir dans les différents compartiments du thalle. Le mycobionte assure la distribution des éléments dans le thalle et notamment vers l'algue qui reçoit une nutrition spécifique (Clark *et al* (2001)). Les parois constituent un lieu privilégié où coexistent plusieurs mécanismes d'adsorption et de libération de métaux (Nieboer *et al* (1978)). L'adsorption des éléments est un phénomène qui évolue dans le temps, il existe toujours des échanges entre la paroi et la matrice environnante. Ces parois sont composées de chitine à des concentrations variables selon l'espèce (Boissière (1968)). La chitine sert de « squelette » où vont s'insérer des polysaccharides associés à des protéines, de la mélanine et des lipides. Les fibres de la chitine sont enrobées d'une matrice de composés β -1.3 et β -1.6 glucane associée à un chitosane (Lallement *et al* (1986)). Les hydrophobines (possédant plusieurs rôles physiologiques, notamment le maintien de l'équilibre hydrique au sein du thalle lichénique ou encore la participation à l'établissement de la symbiose) forment un « manteau » protéique à la surface des parois (Honegger (1998)).

Les parois fongiques et algales ont les mêmes propriétés d'échanges d'ions. Gadd (1993), présente une gamme de sites d'échanges potentiels dont disposent les parois fongiques. Il s'agit des groupements carboxyliques, amines, hydroxyliques, phosphates et sulfhydryles. Les sites chargés négativement sont destinés à la fixation des cations sous forme échangeable (Nieboer *et al* (1978) ; Brown (1984)). Les sites carboxyliques et hydrocarboxyliques (Nieboer *et al* (1978)) et la chitine (Galun *et al* (1982)) forment des complexes métal-ligand.

Richardson *et al* (1985) ont observé que le plomb est beaucoup plus retenu par le mycobionte que par le photobionte du *Cladonia cristatella*. Ces auteurs ont conclu que la chitine a une contribution importante à l'adsorption des éléments. Pour Brown (1987) les sites

carboxyliques et hydrocarboxyliques participent de manière plus importante que les autres sites à l'adsorption pariétale des éléments métalliques.

Le mécanisme d'adsorption extracellulaire est purement physico-chimique, indépendant de la température, rapide, et ne met pas en jeu de l'énergie. Une étude par microscope électronique, mentionnée par Chettri *et al* (1997), révèle l'accumulation des métaux lourds au niveau de l'espace séparant la paroi et la membrane cellulaire.

Les échanges nécessitent la présence d'eau comme milieu de transfert. Ils s'effectuent soit entre cations et protons, soit entre cations et ions déjà fixés, à condition que ces derniers possèdent moins d'affinité pour le ligand. Ces échanges peuvent s'établir aussi entre cations ayant une faible affinité pour le ligand mais étant présents à forte concentration (Purvis (1996)).

Puckett *et al* (1973) ont étudié la compétitivité entre éléments chez les lichens. Ces auteurs présentent la séquence suivante : Fe III >> Pb > Cu >> Ni, Zn > Co. Cette séquence, étant en accord avec le mécanisme de capture de cations impliquant l'échange d'ions modifié par la formation de complexe de métaux, est similaire à celle trouvée par Ruhling & Tyler (1970) chez les mousses. Antonelli *et al* (1998) ont suivi l'adsorption du cadmium, du chrome, du cuivre, du plomb et du zinc chez *Evernia prunastri*, en prenant en compte les constantes d'équilibre de l'adsorption. Ces auteurs décrivent la séquence suivante : Pb >> Zn > Cd \approx Cu \approx Cr. Par contre si l'on prend en compte la concentration, cette séquence se présente comme suit : Cu >> Pb > Cd > Cr > Zn.

II.3.1.3 Absorption intracellulaire

Contrairement au mécanisme d'adsorption extracellulaire, le passage intracellulaire fait appel à un autre mécanisme moins rapide nécessitant de l'énergie (Nash (1996)). L'absorption intracellulaire est caractérisée par une sélectivité envers les cations. Les transports membranaires sont régis par l'affinité du cation pour le transporteur (Brown (1976)). Pour cet auteur l'affinité du *Cladonia rangiformis* exposé à différentes solutions de plomb, cuivre, zinc, nickel et cobalt est indépendante de la concentration externe. Par contre Puckett *et al* (1973) ont remarqué qu'il y a une relation entre l'affinité et la concentration externe chez *Umbilicaria muhlenbergii*.

L'absorption d'un élément peut être inhibée par d'autres éléments. Plusieurs auteurs ont cité des mécanismes de compétition. Ainsi Brown (1976) observe que lorsqu'il y a un mélange de cations à la même concentration (1mM), l'absorption individuelle de chaque élément diminue. Ces mécanismes peuvent impliquer, non seulement des éléments traces, mais aussi des macro-éléments.

Des études sur l'absorption du cadmium chez les espèces lichéniques du genre *Peltigra* montrent que le magnésium inhibe l'absorption intracellulaire de cadmium d'une manière plus importante que le calcium (Beckett & Brown (1984) ; Brown & Beckett (1984))

Wells & Brown (1990) ont montré qu'en présence de calcium, les cations extracellulaires peuvent intervenir dans le mécanisme d'absorption intracellulaire du cadmium chez la mousse *Rhytidiadelphus squarosus*. Ces auteurs ont remarqué que le calcium semble inhiber l'absorption du cadmium, et suggèrent que les échanges transmembranaires sont contrôlés par le calcium.

Pour Brown & Avalos (1993) l'absorption intracellulaire chez le lichen *Peltigra membranacea* exposé à des concentrations croissantes de cadmium, n'est pas reliée aux systèmes de transport transmembranaires (impliquant le calcium). Selon ces auteurs le calcium est impliqué d'une manière indirecte dans l'absorption du cadmium, en vertu de son rôle dans le maintien de l'intégrité membranaire et en tant que messenger intracellulaire impliqué dans l'interprétation des signaux environnementaux. De plus, ils ont observé que le taux de cadmium intracellulaire est fortement corrélé au taux de cadmium fixé sur les sites d'échanges des parois cellulaires.

Branquinho *et al* (1997) ont exposé des lichens à différentes concentrations de plomb. Leurs travaux montrent une pénétration simultanée du plomb et du magnésium dans les cellules. Ils ont remarqué aussi que le plomb intracellulaire n'a pas causé de dommages des membranes cellulaires mais il a surtout une influence sur les processus physiologiques des lichens comme par exemple les réactions de la photosynthèse (diminution du rapport f_v/f_m fluorescence variable / fluorescence maximale).

Budd (1988) a montré que l'absorption membranaire du zinc chez *Neurospora vasinfesta* se fait selon deux systèmes : le premier caractérisé par une faible affinité et un deuxième caractérisé par une forte affinité. La mise en fonction de l'un des deux systèmes est très dépendante de la concentration extérieure. Le système à forte affinité fonctionne en cas de faible concentration extérieure en zinc.

II.4 Détermination des éléments traces dans les thalles lichéniques.

II.4.1 Récoltes des lichens

Le *Diploschistes muscorum*, abondant sur les régions du Nord et du Pas-de-Calais, a été récolté dans le site d'Auby considéré comme très pollué en raison de la proximité de deux sources de pollution que nous avons mentionnées à la partie II. 1.

Le lichen a été recueilli également sur deux sites considérés comme non pollués (réserves naturelles). Lors du prélèvement sur ces différents sites un examen précis est apporté pour homogénéiser l'apparence visuelle des échantillons : couleur, taille ...etc. Ils ont été immédiatement placés dans des boîtes en plastique transparent soigneusement fermées.

II.4.2 Préparation des thalles

Les lichens sont nettoyés manuellement afin d'enlever les débris de sol. De l'eau distillée a été pulvérisée sur les lichens collectés pour retirer leurs substrats et éliminer les débris de feuilles, les poussières ou les insectes. Ils sont ensuite minutieusement nettoyés sous microscope.

Les thalles ont été immergés dans de l'eau distillée pour éliminer les particules trouvées à la surface et conserver uniquement les éléments chimiques accumulés dans le thalle. Après que l'excédent d'eau ait été retiré, les échantillons destinés au dosage des éléments chimiques ont été

placés dans une étuve à 100°C (Gombert & Asta (1998)) pendant une heure. Les thalles destinés à l'analyse des paramètres biologiques ont été séchés dans une étuve à 45°C.

II.4.3 Analyse par Spectrométrie d'Emission Atomique ICP-AES

La spectrométrie d'émission atomique est basée sur l'atomisation et l'excitation d'éléments qui passent à des états énergétiques supérieurs. La relaxation rapide des espèces excitées (atomes ou ions) s'accompagne de l'émission dans l'ultraviolet et le visible de spectres de raies qui peuvent être utilisés pour l'analyse qualitative ou quantitative des éléments. La spectrométrie d'émission atomique possède plusieurs avantages par rapport aux méthodes d'absorption de flamme et électrothermiques, notamment le faible niveau d'interférences, qui dépend directement de la température de travail. Cette technique offre la possibilité d'analyser simultanément plusieurs éléments dans de très petits échantillons. La sensibilité est très élevée pour la plupart des éléments, notamment avec les sources à plasma.

Le plasma est défini comme étant un mélange gazeux conducteur d'électricité contenant une concentration appréciable de cations et d'électrons. La concentration des deux espèces est telle que la charge nette est proche de zéro. Dans le plasma à argon, les ions d'argon et les électrons sont les espèces conductrices principales, bien que des cations d'échantillons soit également présents en faible quantité. Dès leur formation, les ions d'argon sont capables d'absorber assez de puissance d'une source externe pour maintenir la température à une valeur (qui peut atteindre 10 000°K) telle que toute ionisation ultérieure entretienne indéfiniment le plasma. On utilise trois types de plasmas à haute température (Sacks (1981)) : le plasma à couplage inductif (ICP, *Inductively Coupled Plasma*), le plasma à courant continu (DCP, *Direct Current Plasma*) et le plasma induit par micro-onde (MIP, *Microwave induced plasma*). On ne s'intéressera dans ce paragraphe qu'à la source à plasma à couplage inductif (ICP).

La figure 25 représente une source de plasma à couplage inductif, appelée aussi *Torche*. Elle est constituée de trois tubes coaxiaux de quartz (le diamètre du tube le plus large est d'environ 2,5 cm). Une bobine d'induction refroidie par eau entoure le sommet de ce tube ; elle est alimentée par un générateur de fréquences radio capable de fournir une puissance de 0,5 à 2 kW à une fréquence de 27 ou 41 MHz. L'ionisation du flux d'argon est amorcée par la décharge d'une bobine Tesla. Les ions et les électrons ainsi créés interagissent avec le champ magnétique variable (schématisé par la boucle H à la figure 25) produit par la bobine I. Cette interaction contraint les ions et les électrons à décrire une trajectoire circulaire ; un échauffement par effet Joule résulte de leur résistance à ce mouvement. Le cylindre extérieur est refroidi par un flux tangentiel d'argon, comme l'indique la flèche en spirale. Des améliorations ont été apportées à la conception de la torche en la faisant tourner de 90 degrés, si bien qu'elle est alignée horizontalement par rapport au spectromètre.

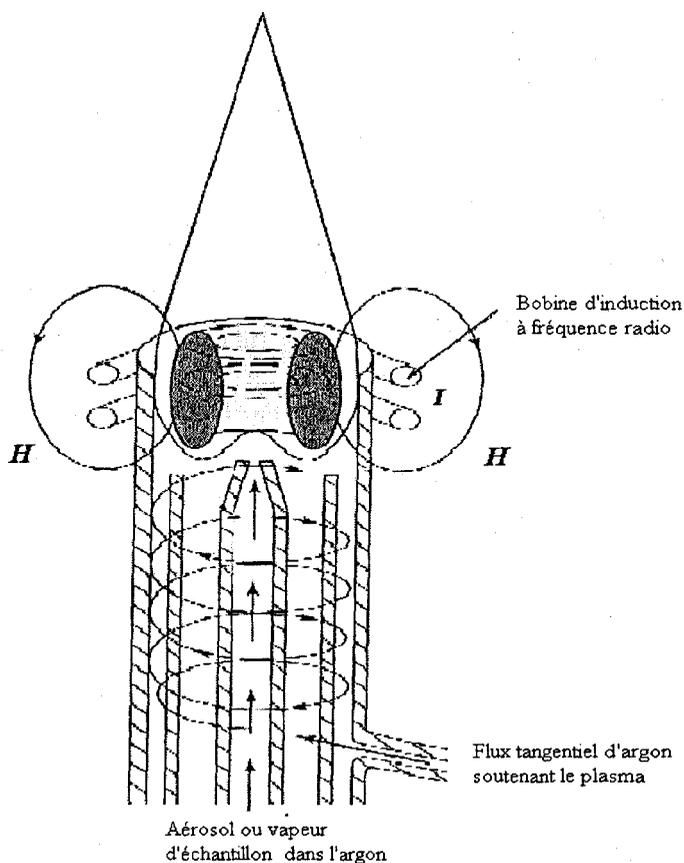


Fig. 25 : Source à plasma à couplage inductif (d'après Fassel (1978))

Le rayonnement émis par le centre du plasma passe par un système optique et un système de détection et de traitement de signal qui permettent les déterminations qualitatives et quantitatives des éléments. L'introduction de l'échantillon constitue souvent la plus grande source de bruit de la technique ICP (Browner & Boorn (1984)). Les dispositifs d'introduction des échantillons les plus employés sont des nébuliseurs. L'échantillon est nébulisé dans un nébuliseur à flux croisé par un courant d'argon et les fines gouttelettes qui en résultent sont transportées dans le plasma. Il est également possible de produire des aérosols à l'aide d'un nébuliseur à ultrasons.

Cette technique, comme la plupart des techniques physico-chimiques, est une méthode comparative basée sur des courbes d'étalonnage réalisées quotidiennement avec des solutions contenant des quantités connues des éléments à doser.

Le protocole des dosages des éléments traces métalliques dans les lichens est identique à celui utilisé pour les sols (norme AFNOR X 31-151 (1996))

Les dosages ont été effectués sur un Varian, Axial view, Liberty Série II. La mise en solution a été effectuée par une attaque acide à « l'eau régale » ; une masse de 250 mg du lichen séché et broyé a été mise en contact avec un mélange d'acide chlorhydrique (3,5 ml) à 34 %, d'acide nitrique (2 ml) à 69 % et de l'eau bidistillée (1 ml). Le mélange est porté à une température de 60°C pendant 2 jours ; les échantillons sont ensuite filtrés à l'aide d'un papier filtre sans cendre. Les solutions obtenues sont placées dans des fioles jaugées en verre et le volume est ajusté à 50 ml par l'eau bidistillée.

II.4.4 Résultats du dosage des éléments traces.

Avant d'aborder l'étude des éléments traces au sein des thalles lichéniques, nous rappelons les résultats de la caractérisation physico-chimique du sol de la zone d'étude. Les premiers travaux du programme PRC (Sterckman *et al* (2002)), avaient pour but d'inventorier les contaminants des sols aux environs des fonderies de Noyelles-Godault et d'Auby, d'évaluer leur mobilité en profondeur et de rechercher les facteurs qui l'influencent. Les recherches ont porté sur les métaux contaminants notoires que sont le cadmium (Cd), le plomb (Pb) et le zinc (Zn) mais également sur des éléments susceptibles d'être générés par les procédés industriels, comme l'antimoine (Sb), l'argent (Ag), l'arsenic (As), le bismuth (Bi), le chrome (Cr), le cobalt (Co), le cuivre (Cu), l'étain (Sn), l'indium (In), le mercure (Hg), le nickel (Ni), le sélénium (Se), le thallium (Tl), le thorium (Th) et l'uranium (U). Cette étude a permis de faire un premier diagnostic de la contamination. Les résultats confirment la contamination en Cd, Pb et Zn des sols agricoles avoisinant l'usine de Noyelles-Godault. Les teneurs en surface peuvent atteindre 21 mg/kg pour le cadmium, 1132 mg/kg pour le plomb et 1378 mg/kg pour le zinc. Les concentrations de Ag, Sb, Hg, Se, Bi, As, Cu, Tl peuvent atteindre plusieurs fois à quelques dizaines de fois les concentrations normales enregistrées dans un site témoins. De très fortes corrélations sont constatées entre le Cd, le Pb et le Zn, contaminants majeurs des sols. On trouve également de bonnes corrélations entre les contaminants qualifiés de mineurs (Ag, As, Bi, Cu, Hg, In, Sb, Sn, Tl) et les contaminants majeurs. L'analyse en profondeur montre que l'essentiel de la contamination se trouve dans les 30 premiers centimètres, mais que certains contaminants (Cd et Zn) peuvent être retrouvés à des profondeurs de l'ordre de 2 mètres dans le cas des sols contaminés en surface.

L'analyse présentée par Cuny (1999) sur les caractéristiques physico-chimiques du sol d'Auby (site de prélèvement bryolichénique), montre une hétérogénéité qui pourrait s'expliquer par l'utilisation de ce site. Les matériaux industriels, déposés sur ce site de manières incontrôlées et plus ponctuelles, ont amplifié ce phénomène. Cet auteur a mis en évidence les rôles joués par la matière organique, premièrement dans la fixation des métaux et deuxièmement dans la régulation du pH et par conséquent de la biodisponibilité des éléments traces. Le dosage des éléments traces dans ce site a révélé que les concentrations moyennes du plomb (6886,5 mg/Kg) du zinc (23 480,8 mg/kg) et du cadmium (209,8 mg/kg) dépassent les seuils d'urgence fixés par la norme Afnor NF U 44-041. Pour Cuny (1999) les variables édaphiques sont donc impérativement à prendre en considération dans l'élaboration de l'échelle de diagnostic de la contamination des sols à l'aide des communautés bryolichéniques. L'analyse réalisée par Denayer *et al* (1999) sur des sols pollués au Nord-Pas-de-Calais a montré des corrélations entre la flore bryophytique terricole et les paramètres édaphiques (pH, MO¹, N², C/N³, CEC⁴, teneur en Pb, Cd et Zn). Il existe une corrélation entre ces végétations bryophytiques et les teneurs en plomb, zinc et cadmium contenues dans le sol. Ces bryophytes sont classées en plusieurs catégories en fonction du niveau

¹ Taux de matière organique

² Teneur en azote total

³ Rapport carbone azote

⁴ Capacité d'échange cationique

de contamination du sol sur lequel elles évoluent. La même démarche a été poursuivie par Cuny *et al* (2003) qui ont étudié des groupes de végétation bryophytiques et lichéniques dans des sites de la région Nord-Pas-de-Calais, présentant des niveaux de pollution graduels. Ils ont classé les espèces en fonction des paramètres édaphiques des sols. Certaines espèces très tolérantes aux métaux traces (e.g. *Diploschistes muscurum*, *Stereocaulon nanodes*) sont reliées à des sols très contaminés. Des espèces, présentant une tolérance intermédiaire, prolifèrent sur des sols moins pollués, d'autres espèces acidophiles sont reliées à des sols acides. Selon ces auteurs, cette démarche peut aider à l'élaboration d'échelles de bioindication.

II.4.5 Dosage élémentaire des thalles lichéniques.

L'analyse élémentaire a portée sur les principaux métaux contaminants que sont le zinc (Zn), le plomb (Pb), le cadmium (Cd), le cuivre (Cu), le nickel (Ni), le chrome (Cr) et l'argent (Ag) mais également des éléments essentiels comme le calcium (Ca), le sodium (Na), le potassium (K) et le magnésium (Mg). Les résultats du dosage sont présentés dans le tableau suivant :

	Zn	Pb	Cd	Cu	Ni	Cr	Ag	Ca	Na	K	Mg
Lichen d'Auby	36200	3040	161,4	283,2	29	19,2	7,8	16079,6	3977,8	1810,6	765,8
Lichen d'Ecault	800	36	1	12,2	1	1	1,2	16392	915,2	145	484
Lichen de Merlimont	400	12	1	9,4	1	1	1	13170	674,4	78,8	334,4

Tableau 6 : Comparaison entre les teneurs en éléments, mesurées par ICP-AES, d'un lichen pollué (site d'Auby) et de deux lichens témoins (site d'Ecault et Merlimont).
Les teneurs sont exprimées en mg/kg du lichen sec

Il paraît évident que les teneurs élémentaires du lichen d'Auby dépassent largement celles des deux lichens témoins. Les concentrations en zinc (36200 mg/kg), et en plomb (3040 mg/kg) confirment la contamination de cette végétation bryolichénique par ces métaux. Le taux de zinc présente une valeur jusqu'à 45 fois supérieure à celle du témoin (Ecault). La concentration en plomb atteint une valeur environ quatre-vingts fois supérieure à celle du lichen d'Ecault. Les teneurs des autres éléments traces comme le cadmium, le nickel, le cuivre, le chrome et l'argent sont aussi très élevées par rapport aux valeurs enregistrées pour les lichens témoins.

Les éléments essentiels sont également très concentrés dans le lichen contaminé par rapport aux témoins. Leurs teneurs peuvent atteindre 1810,6 mg/kg pour le potassium (soit 12 fois plus que le lichen d'Ecault), 3977,8 mg/kg pour le sodium (soit 4 fois plus que le lichen d'Ecault) et 765,8 mg/kg pour le magnésium (soit 1,5 fois plus que le lichen d'Ecault). La quantité de calcium est quasiment la même dans le lichen d'Auby et celui d'Ecault.

Les concentrations du plomb et du zinc enregistrées par Sarret *et al* (1998) sur le *Diploschistes muscorum* prélevé sur le site d'Auby sont en bon accord par rapport à nos résultats. Ces valeurs sont de l'ordre de 2900 mg/kg de plomb et 32500 mg/kg de zinc. L'hétérogénéité du sol d'Auby, suite à des dépôts incontrôlés et ponctuels de résidus industriels, est à l'origine de cette légère disparité entre les teneurs en éléments traces mesurées sur ce site.

D'autre part les taux d'éléments traces dans le lichen d'Auby étaient toujours supérieurs à ceux du sol du même site. Sterckman *et al* (2002) ont remarqué une pénétration en profondeur du zinc et du cadmium (qui peut atteindre 2 mètres) dans le cas des sols contaminés en surface. Le caractère hydrophobe des substances lichéniques contribue à la rétention des éléments au sein du thalle, et préserve ces éléments contre des pluies acides ou contre une éventuelle lixiviation.

Le *Diploschistes muscorum* fait partie des végétaux hyperaccumulateurs de métaux ; ce concept d'hyperaccumulation a été défini par Brooks *et al* (1997), en se basant sur des concentrations de nickel trouvées généralement chez des espèces non accumulatrices de métaux. Ce principe a été appliqué sur d'autres métaux lourds.

Ces éléments, accumulés en grande quantité par cette communauté bryolichénique, n'ont pas mis en jeu la survie de cette espèce. Malgré la toxicité des éléments accumulés et l'exposition continuelle à ces métaux, cette espèce continue à proliférer sur le site calaminaire d'Auby.

II.5 Etude de modèles moléculaires et leurs réactivités vis-à-vis des métaux traces.

II.5.1 Le spectre infrarouge

Le domaine de l'infrarouge correspond aux radiations de nombres d'onde compris entre environ 12800 et 10 cm^{-1} , ou des longueurs d'onde comprises entre 0,78 et 1000 μm . Généralement, on partage l'infrarouge en trois domaines : l'infrarouge proche (domaine des nombres d'onde compris entre 12800 et 4000 cm^{-1}), moyen (domaine des nombres d'onde compris entre 4000 et 200 cm^{-1}) et le lointain (domaine des nombres d'ondes compris entre 200 et 10 cm^{-1}).

Les techniques et les applications des méthodes basées sur les 3 régions du spectre infrarouge diffèrent considérablement.

Les mesures dans le proche infrarouge sont effectuées par des photomètres ou des spectrophotomètres et sont fréquemment exploitées pour l'analyse quantitative des matériaux industriels, relatifs à l'agriculture, ou encore des opérations de contrôle.

Jusqu'au début des années 80 les appareils du domaine de l'infrarouge moyen, étaient des appareils dispersifs à réseaux de diffraction, réservés à l'analyse qualitative organique et à la détermination de structures. L'apparition de spectromètres à transformée de Fourier, à partir des années 80, a élargi le champ d'application du moyen infrarouge. Cette technique est actuellement exploitée dans l'analyse quantitative des échantillons complexes, par spectrométrie d'absorption. On utilise aussi cette région du spectre dans certaines applications microscopiques de surface ainsi que dans l'analyse des solides par réflexion diffuse.

L'infrarouge lointain, a rencontré plusieurs difficultés expérimentales liées à la faible intensité des sources de rayonnement adaptées à ce domaine ; ce phénomène s'est aggravé lorsqu'il a fallu utiliser des filtres pour éviter que les rayonnements des ordres supérieurs diffractés par le réseau n'atteignent le détecteur. On a pu pallier ce phénomène grâce à la génération des spectromètres à transformée de Fourier qui ont rendu le domaine de l'infrarouge lointain plus accessible aux chimistes.

II.5.2 Théorie de la spectroscopie vibrationnelle

➤ Modèle harmonique

Une molécule ayant un moment dipolaire permanent dont l'amplitude change lorsque la molécule vibre est susceptible d'absorber des radiations lumineuses si l'oscillation du vecteur champ électrique de la lumière est en phase avec un des modes de vibrations de cette molécule. De la même manière, la rotation d'une molécule autour de son centre de masse conduit à une variation périodique du dipôle qui est à l'origine d'une interaction avec l'onde. Il en résulte que les espèces homonucléaires comme O_2 , N_2 ou Cl_2 n'absorbent pas au cours de la rotation et de la vibration.

Dans la suite, nous présentons les vibrations isolées que l'on peut représenter par un modèle mathématique simple, celui de l'oscillateur harmonique. Dans cette approche classique de la théorie vibrationnelle. La molécule est considérée être formée de deux atomes A et B reliés entre eux par un ressort.



La fréquence de vibration du ressort est donnée par l'équation 5 :

$$\nu_m = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (EQ. 5)$$

avec μ la masse réduite $\mu = \frac{m_A \times m_B}{m_A + m_B}$, m_A et m_B étant les masses respectives des atomes A et B et k la constante de rappel du ressort.

Cette équation de la mécanique classique ne décrit pas correctement le mouvement de particules de dimensions atomiques. Ainsi par exemple, la quantification des énergies de vibration moléculaire n'apparaît pas dans cette équation. Cependant, on peut utiliser le concept de l'oscillateur harmonique simple pour résoudre l'équation d'onde de la mécanique quantique (équation de Schrödinger). Les solutions de cette équation sont de la forme suivante :

$$E = \left(v + \frac{1}{2} \right) \times \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (EQ. 6)$$

Avec v le nombre quantique de vibration, et h la constante de Plank.

En portant l'équation 5 dans l'équation 6 on trouve :

$$E = (v + 1/2) \times h \times \nu_m \quad (EQ. 7)$$

Les niveaux d'énergies permises sont représentés dans le diagramme d'énergie potentielle illustré sur la Fig. 26.

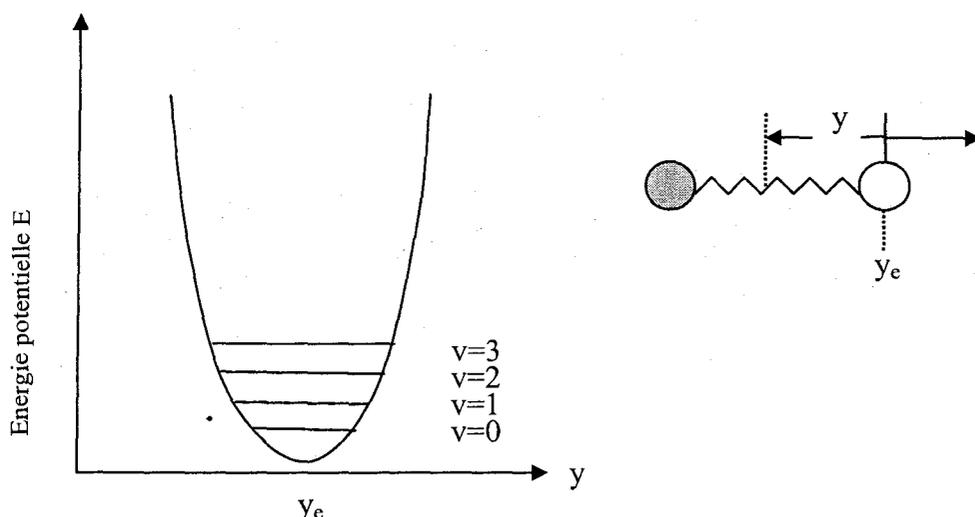


Fig. 26 : Courbe d'énergie potentielle en fonction du déplacement (modèle harmonique)

Les transitions entre les niveaux de vibrations peuvent être induites par l'absorption d'un rayonnement dont l'énergie est exactement égale à la différence entre les états quantiques de vibration et dont la vibration entraîne une variation du dipôle.

➤ *Modèle anharmonique.*

La description des vibrations de la molécule par le modèle harmonique est loin d'être parfaite si on prend en considération les forces de répulsion de Coulomb entre les deux atomes ; l'énergie potentielle doit donc augmenter plus rapidement que ne le prévoit le modèle harmonique. En pratique, l'anharmonicité affecte les niveaux énergétiques ; les niveaux d'énergie les plus élevés se rapprochent et donc les transitions vibrationnelles correspondantes ont des énergies relativement plus faibles. La force de rappel et l'énergie potentielle se voient donc diminuer par rapport aux prévisions du modèle harmonique lorsque la distance interatomique tend vers celle à laquelle la dissociation se produit.

En mécanique quantique, la courbe d'énergie potentielle se présente sous la forme anharmonique représentée sur la Fig. 27. Les niveaux d'énergie permis sont obtenus par la formule de Morse pour la construction de l'hamiltonien de vibration et la résolution de l'équation de Schrödinger.

Dans une molécule diatomique, l'énergie potentielle d'interaction entre les deux atomes peut être modélisée par la formule de Morse :

$$E = A \left[1 - e^{-a(r_2 - r_1)} \right]^2 \quad (\text{EQ. 8})$$

où A et a sont des constantes, r_2 la distance entre les deux atomes à un instant donné et r_1 la distance à l'équilibre.

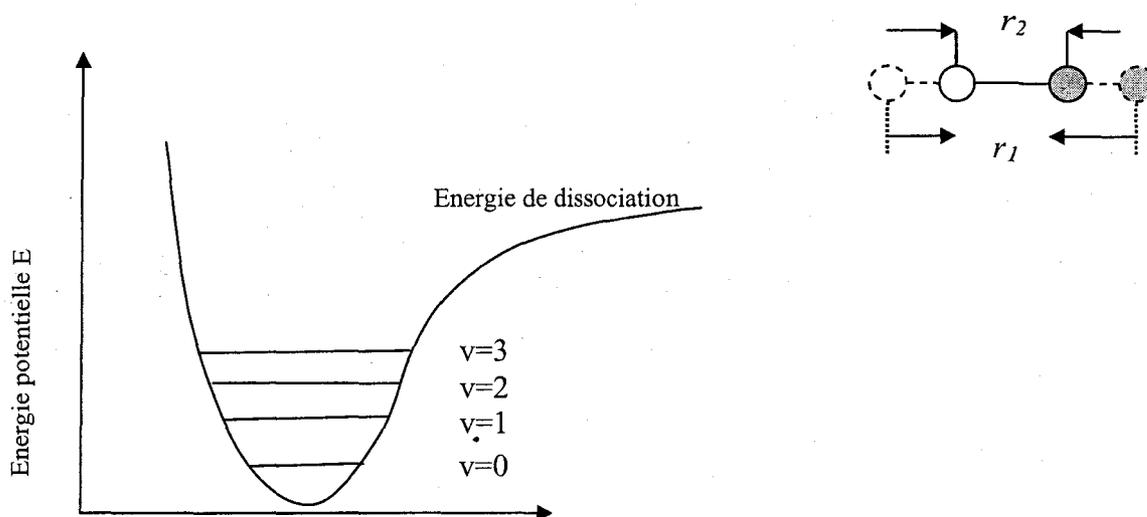


Fig. 27 : Courbe d'énergie potentielle en fonction du déplacement (modèle anharmonique)

La solution de l'équation de Schrödinger pour l'oscillateur anharmonique est :

$$E = h\nu_e \left(v + \frac{1}{2} \right) - h\nu_e \chi_e \left(v + \frac{1}{2} \right)^2 \quad (EQ. 9)$$

où ν_e est le nombre d'onde de vibration à l'équilibre i.e. pour une vibration infinitésimale (en cm^{-1}) et χ_e désigne la constante d'anharmonicité.

➤ Vibrations moléculaires

Dans une molécule, les positions relatives des atomes varient en permanence. Ce phénomène est le résultat du grand nombre de modes de vibration des liaisons de la molécule. Dans le cas d'une molécule diatomique ou triatomique simple, il est facile de définir le nombre et la nature de ces vibrations et de les relier aux énergies d'absorption. Par contre si on considère une molécule contenant un plus grand nombre d'atomes, l'analyse devient plus difficile.

Les vibrations peuvent être classées en deux catégories : les vibrations d'élongation symbolisées ν (stretching) et les vibrations de déformation angulaire symbolisées δ (bending). Une vibration d'élongation correspond à une variation de la distance interatomique dans la direction de l'axe de la liaison entre les atomes.

Généralement, les élongations sont situées dans une gamme de nombres d'onde supérieure à celle des déformations et la majorité des vibrations fondamentales des molécules organiques se trouve dans l'infrarouge moyen.

II.5.3 Description d'un spectromètre IRTF

Les éléments principaux d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier sont :

- Une source lumineuse : en moyen infrarouge on utilise un globalar. Il est constitué d'un bâtonnet en carbure de silicium (SiC) et fonctionne à des températures de l'ordre de 1500°C.
- Un dispositif permettant de générer les interférences : l'interféromètre de Michelson pour l'IRTF.
- Un système de présentation de l'échantillon : ce système dépend de la technique spectroscopique employée. Pour l'étude, des accessoires de transmission et de réflexion totale atténuée (ATR) ont été utilisés.
- Un ou plusieurs capteurs photosensibles : le spectromètre utilisé comporte un détecteur DTGS (Deuterium Triglycine Sulfate) qui est un matériau pyroélectrique. Ce détecteur détecte les variations de température et les transforme en variations d'intensité.

Dans le cadre de cette étude, tous les spectres IRTF ont été effectués sur un ThermoNicolet Avatar 360 FTIR.

➤ **Interférométrie : l'interféromètre de Michelson**

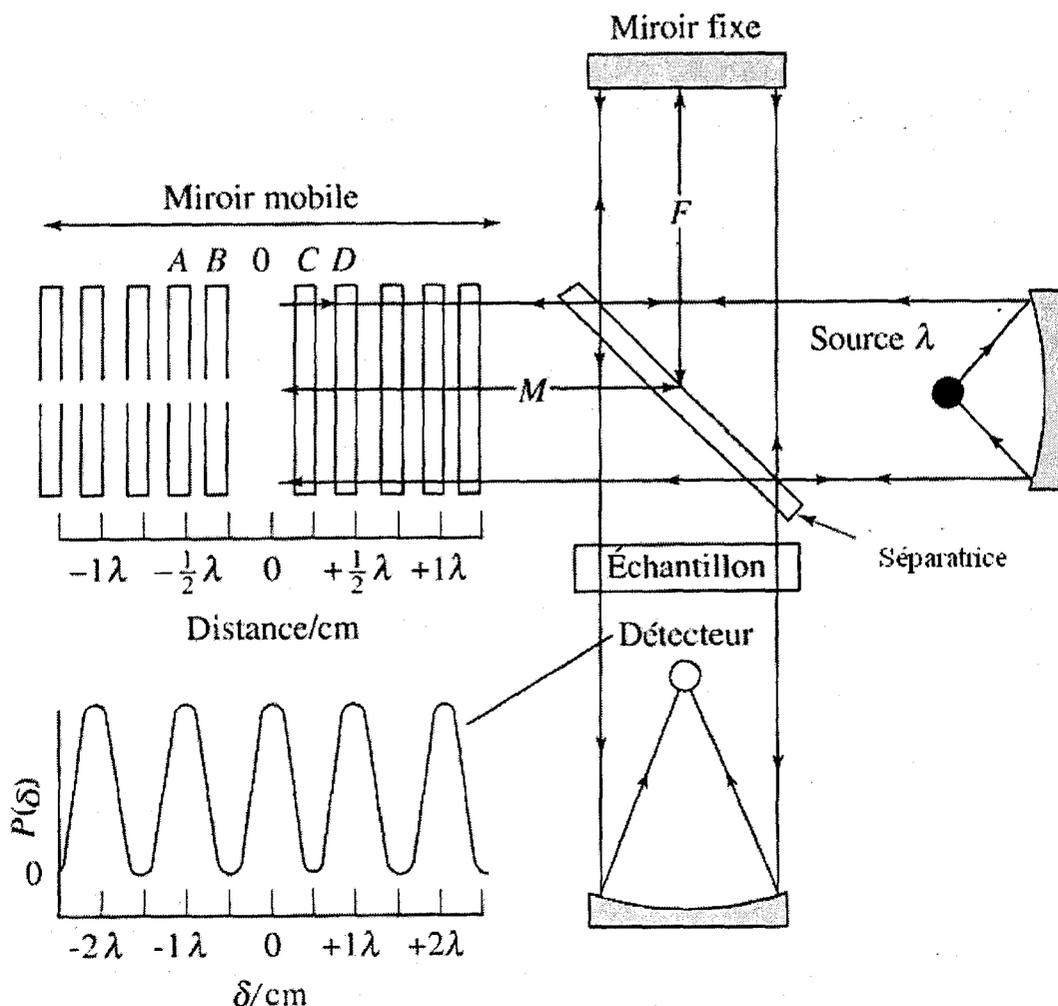


Fig. 28 : Schéma d'un interféromètre de Michelson éclairé par une source monochromatique

L'interféromètre de Michelson (Fig. 28) consiste en 2 miroirs et une séparatrice. Lorsque le rayon lumineux entre dans l'interféromètre, il atteint la séparation à 45° d'angle. La

séparatrice laisse passer 50 % du rayonnement vers le miroir mobile et le reste vers le miroir fixe. Les faisceaux jumeaux ainsi formés sont réfléchis dans le même axe par les deux miroirs et renvoyés sur la séparatrice, ce qui a pour effet de diriger la première moitié de chaque faisceau vers le détecteur après sa traversée de l'échantillon et l'autre moitié vers la source. Seules les deux moitiés traversant l'échantillon sont utilisées à des fins analytiques.

Le déplacement du miroir mobile fait varier de manière prévisible l'intensité du rayonnement. Lorsque les deux miroirs sont équidistants par rapport à la séparatrice (position 0 Fig. 28), les deux parties du faisceau sont en phase ; l'intensité est alors maximale.

La différence de trajet des deux faisceaux, $2(M - F)$ est appelée retard δ . Le graphique de l'intensité mesurée par le détecteur en fonction de δ est appelé interférogramme. Dans le cas d'une lumière monochromatique de nombre d'onde ν , l'interférogramme a l'allure d'un cosinus (Fig. 28). La fréquence du rayonnement qui atteint le détecteur après avoir traversé le interféromètre de Michelson est généralement plus basse que celle de la source.

L'onde de l'interférogramme est, en théorie, fonction de la fréquence du signal f et du temps t .

La fréquence du signal au détecteur peut être donnée par la relation suivante

$$f = \frac{2\nu_M}{c} \nu$$

Où ν est la fréquence du rayonnement ν_M est la vitesse du miroir mobile et c la vitesse de la lumière

En pratique l'équation l'onde de l'interférogramme doit être modifiée pour tenir compte que, normalement l'interféromètre ne partage pas le rayonnement de la source en deux parties rigoureusement égales et que les réponses du détecteur et de l'amplificateur dépendent de la fréquence. Il est dès lors utile d'introduire une nouvelle variable $B(\bar{\nu})$ qui dépend non seulement de l'onde de l'interférogramme, mais qui tient également compte de ces facteurs. On peut donc écrire l'équation de l'onde de l'interférogramme sous la forme

$$P(\delta) = B(\bar{\nu}) \cos 2\pi\delta\bar{\nu} \quad (EQ. 10)$$

Cette dernière relation donne la valeur du signal de l'interférogramme en fonction du retard et du nombre d'onde du signal optique incident. Les symboles entre parenthèse soulignent qu'une des puissances se rapporte au domaine des fréquences et l'autre, au domaine temporel.

Par le même procédé, pour une source formée de deux rayonnements de nombres d'onde $\bar{\nu}_1$ et $\bar{\nu}_2$, les interférogramme (Fig. 29-A) peuvent être décrits par deux termes qui correspondent respectivement à chaque nombre d'onde (équation 11) :

$$P(\delta) = B_1(\bar{\nu}) \cos 2\pi\delta\bar{\nu}_1 + B_2(\bar{\nu}) \cos 2\pi\delta\bar{\nu}_2 \quad (EQ. 11)$$

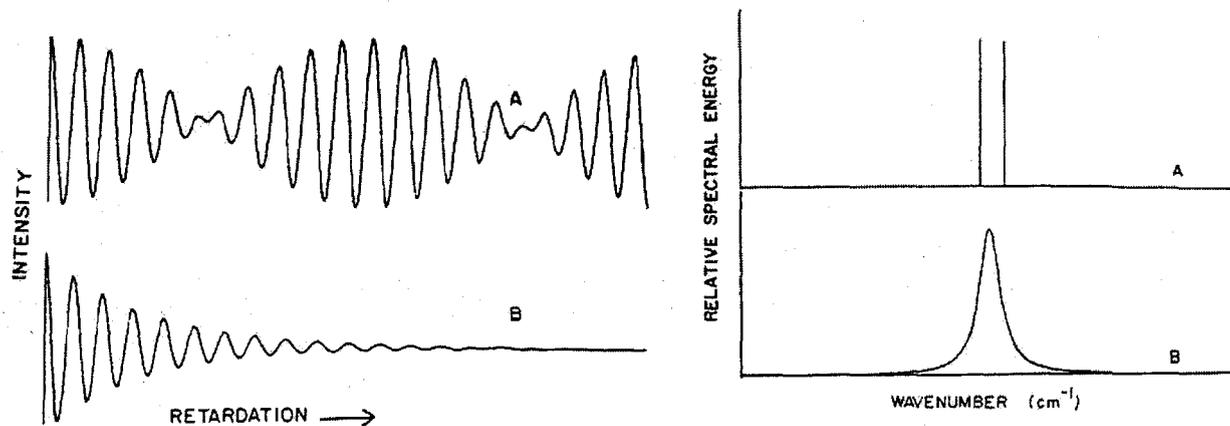


Fig. 29 : Comparaison entre interférogrammes et spectres optiques ; A : pour une source formée de deux rayonnements, B : pour une source continue

L'intéfégramme d'une source continue, tel que celui de la figure 29-B, peut être représenté par une somme infinie de termes en cosinus, à savoir :

$$P(\delta) = \int_{-\infty}^{+\infty} B(\bar{\nu}) \cos 2\pi\bar{\nu}\delta d\bar{\nu} \quad (EQ. 12)$$

La transformée de Fourier de cette intégrale s'écrit :

$$B(\bar{\nu}) = \int_{-\infty}^{+\infty} P(\delta) \cos 2\pi\bar{\nu}\delta d\delta \quad (EQ. 13)$$

Le calcul complet d'une transformée de Fourier nécessite le traitement numérique des parties réelles (cosinus) et imaginaires (sinus) ; nous avons présenté ici que la composante réelle qui est suffisante dans le cas des fonctions réelles et paires. La spectroscopie par transformée de Fourier consiste à enregistrer $P(\delta)$ en fonction δ (EQ.12) et ensuite à transformer mathématiquement cette relation en une autre qui donne $B(\bar{\nu})$ en fonction de $\bar{\nu}$ (EQ. 13).

II.5.4 Spectrométrie d'absorption dans l'infrarouge moyen

La spectroscopie d'absorption et de réflexion dans l'infrarouge moyen constitue un outil majeur de détermination de la structure des molécules organiques et biochimique. Pour ces deux techniques, la préparation de l'échantillon est souvent l'opération la plus difficile et la plus longue de l'analyse.

On peu mesurer des spectres d'un gaz ou d'un liquide, dont la température d'ébullition est peu élevée par spectrométrie d'absorption, en l'introduisant dans une cellule cylindrique équipée de fenêtres adéquates où règne une pression réduite. Il existe une grande variété de cellule de ce type, la longueur de leur trajet optique allant de quelques centimètres à plus de dix mètres. Les trajets les plus longs sont obtenus par un jeu de surfaces internes réfléchissantes qui force le rayon à effectuer de nombreux allers et retours avant de sortir de la cellule. La mesure du spectre infrarouge de substance en solution est une méthode commode si on dispose de solvants transparents dans le domaine spectral étudié.

Quand on dispose de peu d'échantillons ou en l'absence de solvant approprié, il est courant de mesurer le spectre du liquide pur. En général, on presse une goutte de liquide déshydraté entre deux lames (la couche obtenue a une épaisseur d'environ 0,01 mm). Les deux lames collées par capillarité sont ensuite placées dans le faisceau. Il est clair que cette méthode ne conduit pas à des résultats reproductibles ; les spectres obtenus conviennent néanmoins aux études qualitatives.

Les solides sont dispersés dans une matrice solide ou liquide pour en mesurer le spectre. L'utilisation de cette technique implique le broyage du solide jusqu'à l'obtention de particules dont les dimensions des particules sont inférieures à la longueur d'onde du rayonnement utilisé afin d'éviter les effets de diffusion du rayonnement.

Une technique courante de manipulation d'échantillons solides consiste à les disperser dans une pastille solide de bromure de potassium KBr ou d'autres halogénures alcalins. Les halogénures alcalins possèdent la propriété de fluer à froid lorsqu'on les soumet à une pression suffisante après les avoir réduits en une poudre suffisamment fine. Pour utiliser cette technique, on mélange environ un milligramme de l'échantillon finement broyé avec 100 milligrammes d'une poudre sèche de bromure de potassium.

Les pastilles de KBr fournissent des spectres d'excellente qualité pour de nombreuses molécules. En tant que solide ionique, KBr est pratiquement transparent dans tout le domaine infrarouge (jusqu'à 400 cm^{-1}). L'iodure de césium CsI est parfois utilisé pour son domaine de transparence plus étendu (jusqu'à 200 cm^{-1}).

Lorsque le solide n'est pas soluble dans un solvant approprié et qu'il est impossible de le mettre sous forme de pastille, on peut le disperser dans une huile minérale ou un hydrocarbure fluoré (comme par exemple l'huile de paraffine dite Nujol) ou un polymère halogéné, le fluorolube. Les mesures d'absorbance sont effectuées grâce à un dispositif étalon, valable dans tout le domaine infrarouge. On compare simplement l'intensité du rayonnement ayant traversé la cellule à celui du faisceau de référence ne contenant pas la cellule.

II.5.5 Analyse des polluants atmosphériques.

La prolifération des lois relatives aux polluants atmosphériques a exigé la mise au point de méthodes sensibles, rapides et spécifiques pour l'analyse de nombreux composés chimiques. La spectroscopie d'absorption dans l'infrarouge a montré sa supériorité par rapport à toute autre méthode.

Cette méthode consiste à analyser un échantillon étalon d'air contenant cinq espèces chimiques dont le monoxyde de carbone, le méthyléthylcétone, le méthanol, l'oxyde d'éthylène, et le chloroforme par des photomètres infrarouge. Ces photomètres contiennent des cellules à gaz dont le trajet optique est de 20 mètres.

Le photomètre à filtre, portable (son poids est de 9 kilogrammes) est conçu pour permettre l'analyse quantitative de différentes molécules organiques dans l'atmosphère. La source est un filament de nichrome enroulé sur un barreau en céramique. Le détecteur est un système

pyroélectrique. Une série de filtres interférentiels interchangeable couvre la région du spectre comprise entre 3000 et 750 cm^{-1} . Chaque filtre est adapté à l'analyse d'une molécule spécifique.

L'OSHA (*Occupational Safety and health administration*) a fixé un seuil minimum pour plus de quatre cents espèces chimiques. Les spectres d'absorption de plus de la moitié de celles-ci rendent possible leur analyse à l'aide de photomètres ou de spectrophotomètres.

II.5.6 Spectrométrie de réflexion dans l'infrarouge moyen

La spectroscopie infrarouge par réflexion a de nombreuses applications et plus particulièrement dans le domaine des échantillons solides difficiles à manipuler, tels que les films de polymère, les fibres, les caoutchoucs, les aliments, les produits agricoles, et bien d'autres encore. Les spectres de réflexion, bien qu'ils ne soient pas identiques aux spectres d'absorption correspondants, leurs sont toutefois semblables et fournissent les mêmes types d'informations.

Il existe quatre types de phénomène de réflexion d'un rayonnement :

- 1- La réflexion spéculaire.
- 2- La réflexion diffuse.
- 3- La réflexion interne.
- 4- La réflexion totale atténuée (ATR)

Nous ne porterons notre attention que sur la réflexion totale atténuée, car c'est la technique la plus utilisée par rapport aux autres techniques de réflexion.

II.5.7 Réflexion totale atténuée (ATR)

Une grande variété de possibilités d'échantillonnages est à la disposition de l'analyste. La méthode est parfois dictée par la nature de l'échantillon mais des choix sont la plupart du temps possibles. Le mode de présentation des échantillons conditionne la validation d'une analyse quantitative par la répétabilité, la sensibilité et la spécificité des informations spectrales.

La transmission nécessite bien entendu que les échantillons soient relativement transparents dans la région spectrale d'analyse. L'atténuation du faisceau suit plus au moins la loi de Beer-Lambert. La précision des informations obtenues est améliorée par ajustement de la concentration et/ou du chemin optique. Des ordres de grandeurs typiques pour ce dernier sont le micromètre dans le cas liquides, le mètre voire plus dans le cas des gaz. Pour les matériaux biologiques qui sont souvent riches en eau, le chemin optique permettant de compenser les absorptions du solvant est typiquement inférieur à 10 μm (Dong *et al* (1990)).

Une meilleure compréhension des composantes optiques passe par la connaissance de leurs champs proches. Celui-ci se situe à une distance de l'ordre de grandeur de la longueur d'onde de la radiation utilisée. Le champ proche comporte à la fois une partie évanescente et une partie propagative qui ne peuvent pas être physiquement dissociées. Le terme évanescent signifie que les ondes restent confinées au voisinage de l'objet qui leur a donné naissance. Toute perturbation de l'objet qui a donné naissance aux ondes évanescentes modifie fortement celles-ci. C'est cette

caractéristique que l'on utilise pour réaliser des capteurs. Parmi les systèmes optiques qui permettent la création d'un champ évanescent, citons à titre d'exemple la microscopie en champ proche et intéressons-nous à la réflexion totale représentée à la Figure 30.

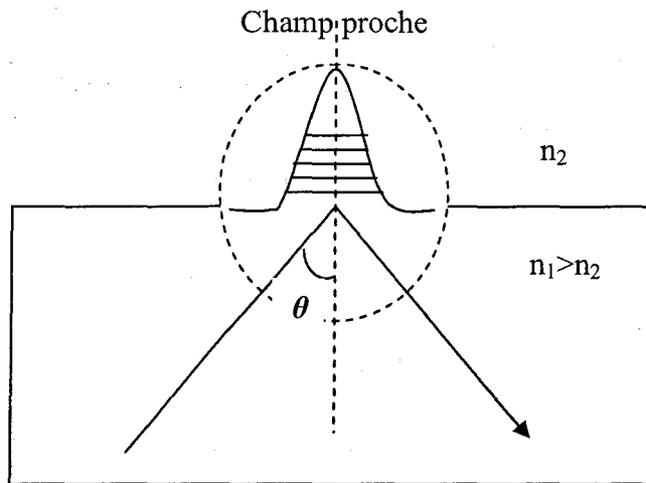


Fig. 30 : Réflexion totale à l'interface de deux milieux d'indices différents

Les lois de Snell-Descartes établissent l'existence de la réflexion totale lors du passage d'une onde plane d'un milieu d'indice n_1 à un milieu d'indice n_2 moins réfringent. L'écriture des champs E et H ainsi que leurs équations de continuité au voisinage des interfaces permettent les descriptions du champ en fonction de l'angle d'incidence et de la profondeur.

La profondeur de pénétration d_p traduit la rapidité de la décroissance du champ évanescent :

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi\sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2}} \quad (EQ. 14)$$

Avec

θ : l'angle d'incidence,

λ : longueur d'onde,

n_1 et n_2 : les indices de réfraction des milieux 1 et 2.

Une réflexion à l'interface sélénium de zinc (ZnSe)/eau à la longueur d'onde de $10 \mu\text{m}$ correspond à une profondeur de pénétration de l'ordre de $0,9 \mu\text{m}$, ce qui permet d'apprécier le confinement du champ évanescent.

➤ Pratique

Une application très importante consiste à réaliser des mesures spectroscopiques par réflexion totale. Le milieu d'indice élevé est en général un cristal tel que le sélénium de zinc ZnSe. La quantité de lumière réfléchie dépend de l'absorption (due à des transitions

vibrationnelles) du matériau en contact optique à l'intérieur duquel les ondes évanescentes ont pénétré. Cette radiation réfléchie transporte un spectre de transmission de l'échantillon.

Pour des études concernant les protéines, les systèmes d'ATR permettent de compenser les interférences dues aux absorptions des solvants (Fu *et al* (1994)). Les résultats obtenus dépendent néanmoins de nombreux paramètres. La longueur d'onde, par exemple, influe sur l'intensité, ce qui permet de réaliser des profils en profondeur d'un matériau. Il existe donc des systèmes aux géométries très variées : ART plat, cylindrique...etc (Fig. 31).

L'utilisation de fibres optiques permet de délocaliser le compartiment échantillon du spectromètre. Une sonde présente un avantage indéniable sur les méthodes d'échantillonnage traditionnelles. Des mesures *in situ* peuvent ainsi être effectuées au sein même de systèmes très variés.

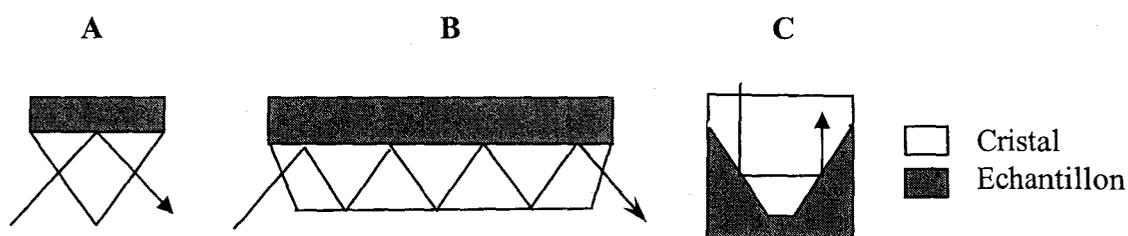


Fig. 31 : Différentes formes géométriques des cristaux utilisés pour réaliser des mesures en IRTF-ATR

Parmi les matériaux utilisés dans l'infrarouge et permettant la réalisation de fibres, seuls les verres chalcogénures transmettent quasiment toute la gamme du moyen infrarouge. Ces fibres peuvent être couplées à un cristal du type de la figure 31-C permettant des mesures par ATR (Dupuy *et al* (1995)). Aux pertes intrinsèques du matériau s'ajoutent celles dues au couplage avec le spectromètre et le rendement total d'une sonde est toujours inférieur à 10 %. Un tel système n'améliore donc en aucun cas la sensibilité d'une mesure difficile.

Un autre type d'application connu sous le FEWS (*fibres optic evanescent wave spectroscopy*) consiste à utiliser les fibres optiques elles mêmes comme éléments de réflexion interne. Cela n'est possible que lorsque l'indice de réfraction de la fibre est plus élevé que celui du milieu analysé comme dans le cas des analyses sanguines.

II.5.8 Etude des interactions molécules modèles-zinc.

Des études antérieures (Cuny (1999) ; Sarret *et al* (1998)) réalisées sur le *Diploschistes muscorum* ont montré que ce dernier produit de nouveaux métabolites, uniquement en milieu contaminé, en réponse à la pollution métallique afin de diminuer la toxicité des éléments traces et les immobiliser au niveau extracellulaire. Les molécules supposées impliquées dans ce mécanisme sont les métabolites secondaires (voir chapitre I). Ces molécules, caractérisées par une complexité structurale, comportent une multitude de sites fonctionnels, dont des groupements hydrocarboxyliques et carboxyliques qui semblent plus impliqués dans la fixation

des éléments au sein du thalle lichénique. La complexité structurale des substances lichéniques laisse supposer l'intervention d'autres processus dans l'interaction métal-substances lichéniques. Ces processus peuvent se résumer en quatre points essentiels :

- 1- Interactions avec d'autres hétéroatomes tels que l'azote, le soufre et le phosphore.
- 2- Phénomènes d'absorption physique.
- 3- Saturation de la coordination du métal dans une structure type chélate.
- 4- Processus physiologiques : métabolisation d'éléments, incorporation cellulaire (Energie, pH ...), réponse biologique à la présence de pathogènes...etc.

Dans ce cas de figure, et pour mieux comprendre l'interaction entre les métaux et les substances lichéniques, nous avons choisi la modélisation de cette interaction en sélectionnant des molécules commerciales. Cette approche, développée au sein du laboratoire LASIR (Gossart (2001)), a permis de caractériser l'interaction entre métal et acides humiques (principaux représentants de la matière organique du sol).

Notre choix s'est porté sur des modèles représentant soit des fragments d'acides lichéniques, soit des molécules très proches structuralement des substances lichéniques, soit des acides lichéniques commerciaux. Le choix de ces molécules est basé sur la présence des groupements carboxyliques et/ou phénoliques, et ne prétend pas directement l'interaction *in vivo* entre un métal et un lichen. Toutefois, cette approche permettra d'envisager différentes origines possibles d'une interaction et de valider l'IRTF comme technique de caractérisation.

II.5.8.1 Modèles moléculaires

Dans un premier temps nous avons étudié des molécules simples présentant des structures aromatiques sur lesquelles sont greffés des groupements carboxyliques et hydroxyliques ; il s'agit de l'acide benzoïque, l'acide salicylique, l'acide gallique, l'acide 3-5 dihydroxybenzoïque, ainsi que des molécules simples produites au cours des processus biologiques et qui abondent au niveau extra et intracellulaire comme l'acide oxalique ou l'acide ascorbique (Fig. 32).

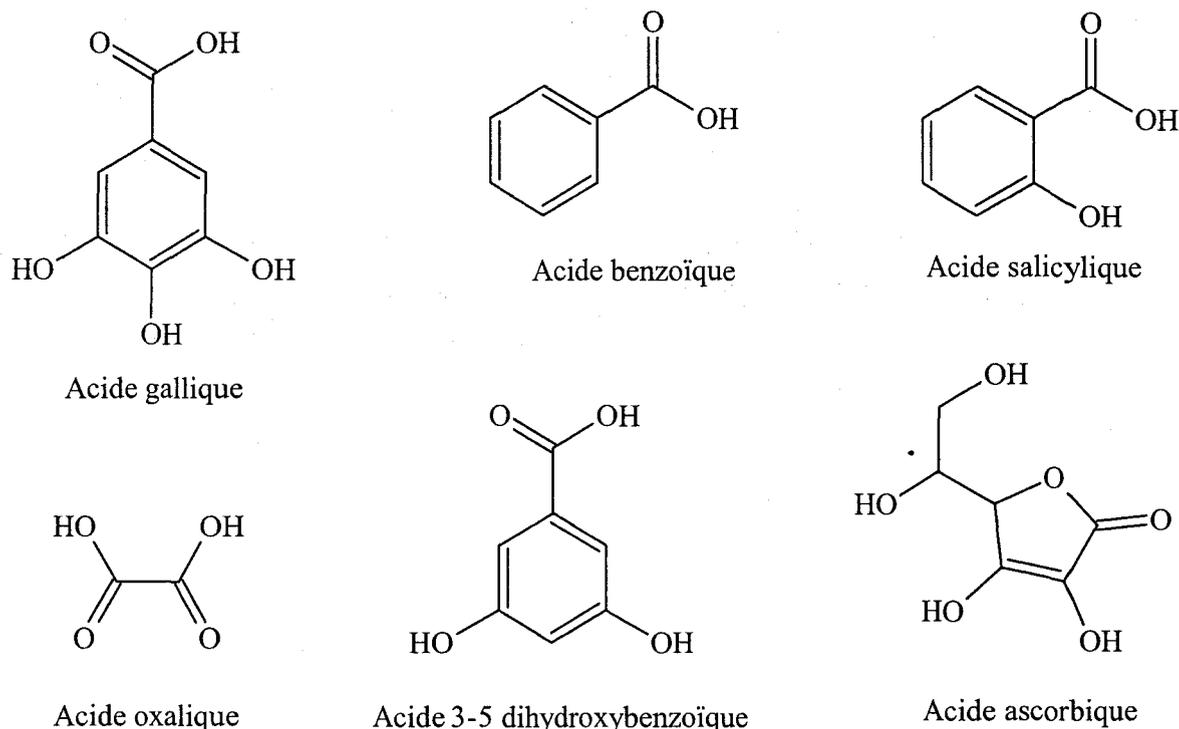


Fig. 32 : Formules développées des modèles moléculaires

Nous avons étudié les interactions entre les molécules modèles et le zinc en raison de l'abondance de ce métal dans les thalles lichéniques. Selon Araujo *et al* (2005) la déprotonation du groupement carboxylique de l'acide gallique augmente légèrement l'affinité envers l'oxyde de titane. Pour toutes les molécules étudiées, nous avons procédé à une neutralisation des sites OH et COOH. L'ajout du nitrate de zinc au mélange permet la précipitation des sels de zinc. Après filtration et séchage à 100°C, les sels de zinc sont mis sous forme de pastilles. Ils sont ensuite analysés par IRTF et comparés à leur forme acide.

Les spectres des molécules modèles et de leurs sels de zinc sont présentés dans les figures 33 à 38. Les interprétations spectrales des bandes principales sont présentées dans les tableaux 7 à 12.

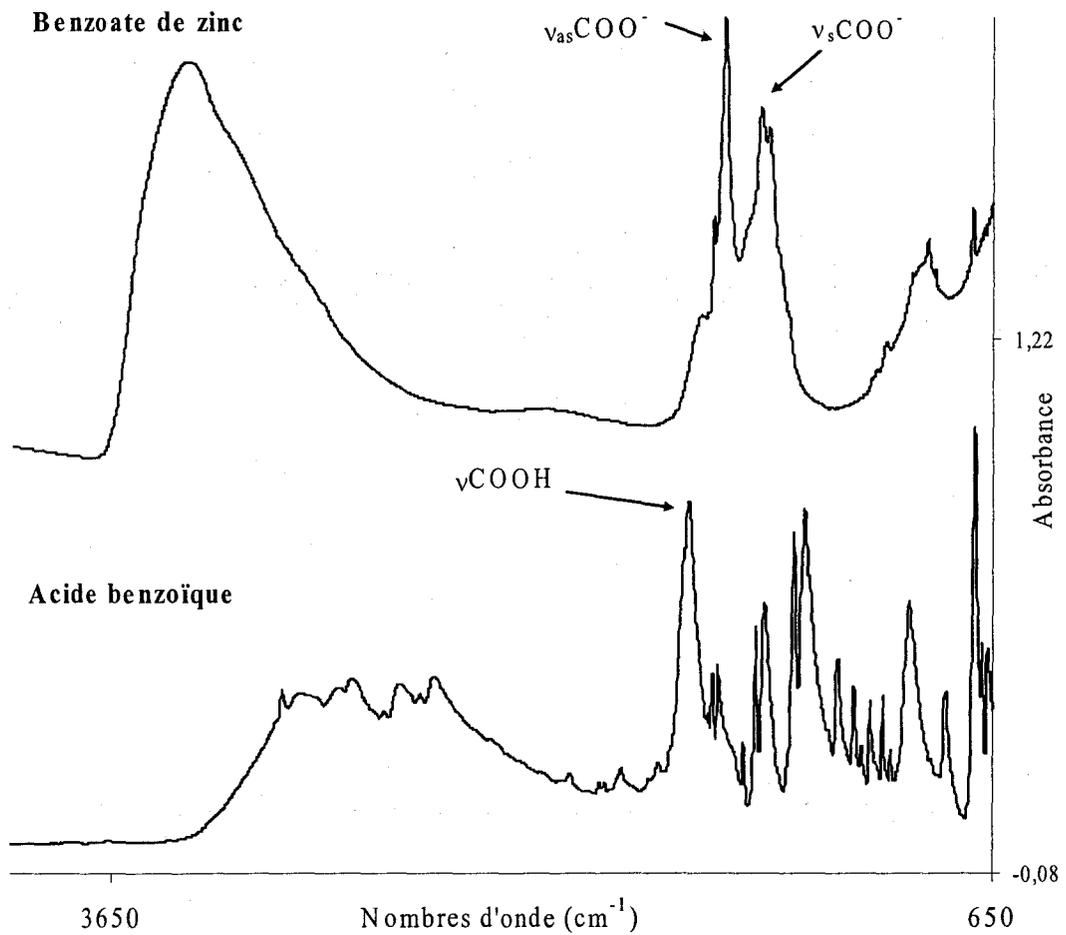


Fig. 33 : Spectres IRTF de l'acide benzoïque et du benzoate de zinc

<i>Acide benzoïque</i>		<i>Benzoate de zinc</i>	
Nombres d'onde (cm ⁻¹)	Modes de vibration	Nombres d'onde (cm ⁻¹)	Modes de vibration
1685	ν(C=O) COOH	1600	ν(C-C)
1600	ν(C-C)	1561	ν _{as} (COO ⁻)
1494	ν(C-C)	1437	ν _s (COO ⁻)
1291, 1270	ν(C-O)	1000	δ(C-H)
1179, 1072, 1026	δ(C-H)		

Tableau 7 : Attribution des bandes IRTF des différents groupements de l'acide benzoïque et du benzoate de zinc

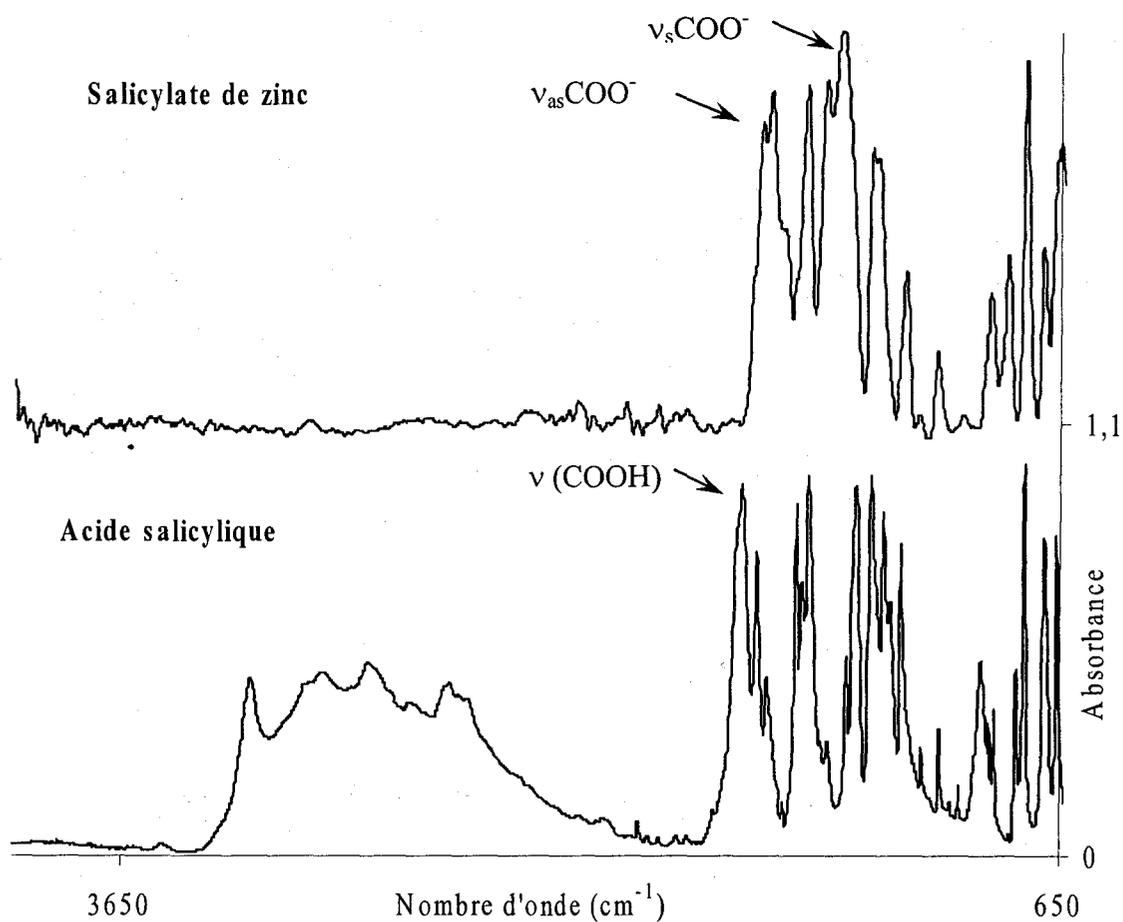


Fig. 34 : Spectres IRTF de l'acide salicylique et du salicylate de zinc

<i>Acide salicylique</i>		<i>Salicylate de zinc</i>	
Nombres d'onde (cm ⁻¹)	Modes de vibration	Nombres d'onde (cm ⁻¹)	Modes de vibration
1660	v(C=O) COOH	1570	v _{as} (COO ⁻)
1600	v(C-C)	1450	v _s (COO ⁻)
1484	v(C-C), v(C=C)	1140, 1040	δ(C-H)
1382	δ(O-H)		
1250	v(C-O) COOH		
1160, 1090, 1030	δ(C-H)		

Tableau 8 : Attribution des bandes IRTF des différents groupements de l'acide salicylique et du salicylate de zinc

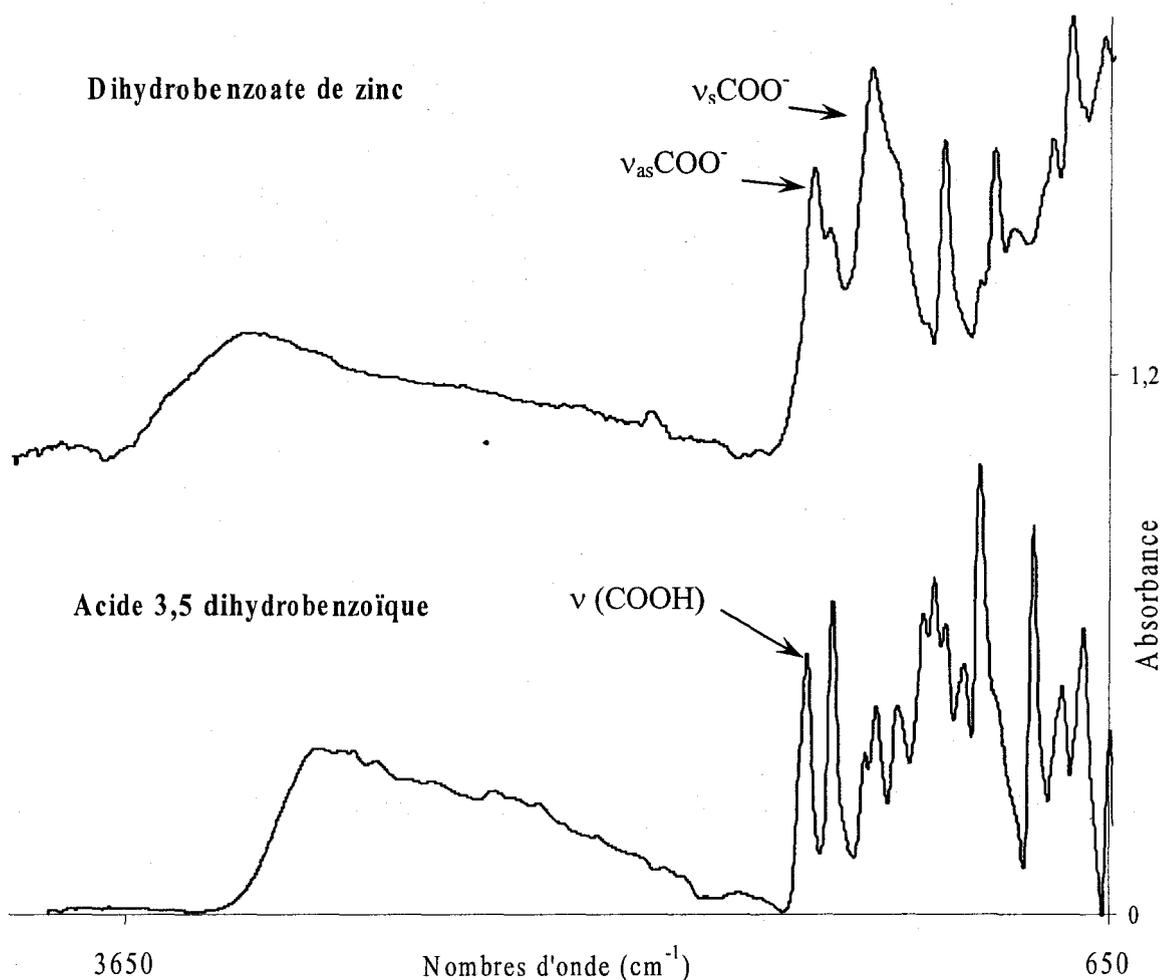


Fig. 35 : Spectres IRTF d'acide 3,5 dihydrobenzoïque et 3,5 dihydrobenzoate de zinc

<i>Acide 3,5 dihydrobenzoïque</i>		<i>3,5 dihydrobenzoate de zinc</i>	
Nombres d'onde (cm ⁻¹)	Modes de vibration	Nombres d'onde (cm ⁻¹)	Modes de vibration
1697	ν(C=O) COOH	1547	ν _{as} (COO ⁻)
1600	ν(C-C)	1375	ν _s (COO ⁻)
1484	ν(C-C), ν(C=C)	1151, 1038, 1000	δ(C-H)
1335	δ(O-H), δ(φ-O-H)		
1263	δ(φ-O)		
1163, 1080, 1047, 1005	δ(C-H)		

Tableau 9 : Attribution des bandes IRTF des différents groupements d'acide 3,5 dihydrobenzoïque et du 3,5 dihydrobenzoate de zinc

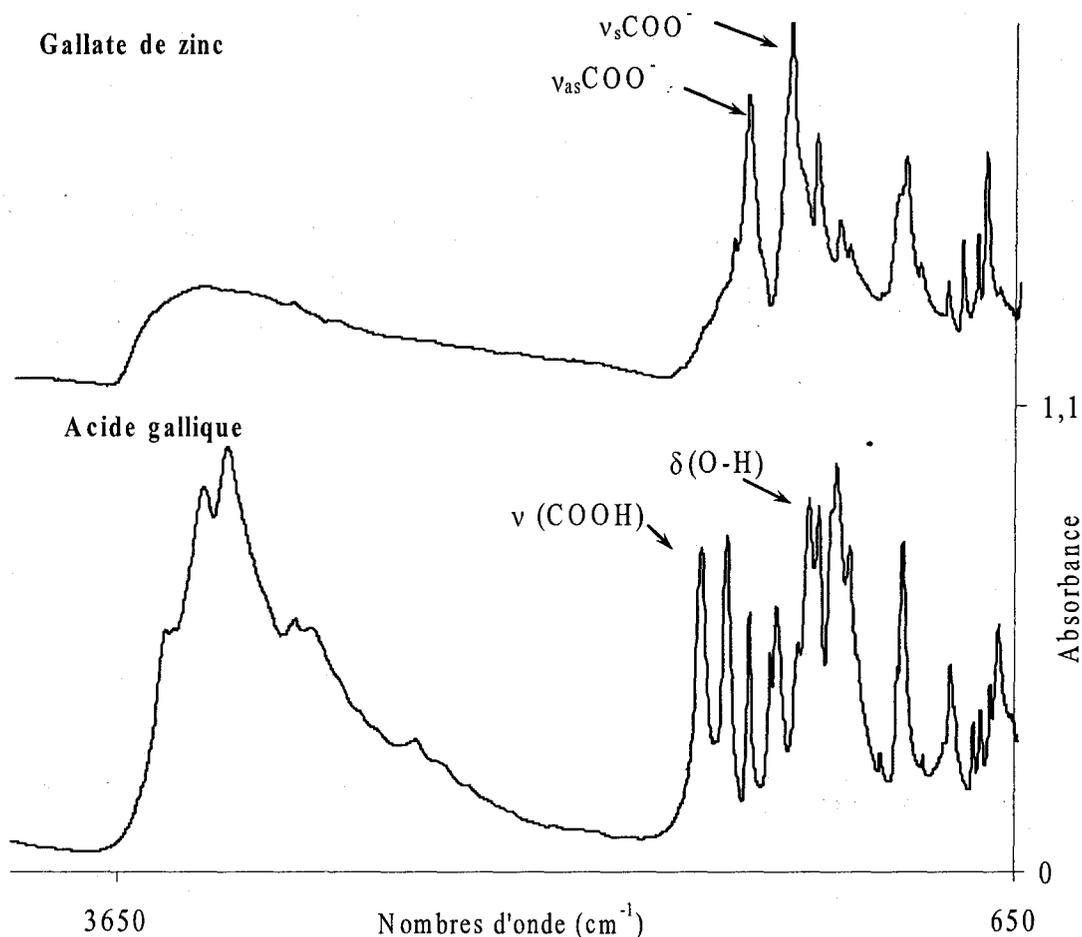


Fig. 36 : Spectres IRTF d'acide gallique et du gallate de zinc

<i>Acide gallique</i>		<i>Gallate de zinc</i>	
Nombres d'onde (cm ⁻¹)	Modes de vibration	Nombres d'onde (cm ⁻¹)	Modes de vibration
1703	v(C=O) COOH	1546	v _{as} (COO ⁻)
1617	v(C-C)	1403	v _s (COO ⁻)
1540	v(C-C), v(C=C)	1237	δ(C-H) plane, v(C-O)
1341	δ (O-H) plane	1018, 1215	δ(C-H) plane
1234	v(φ-O), v(C-O)		
1251	v(C-O)		
1202	v(C-O) plane		
1099, 1045	δ(C-H) aromatique		
1027	δ(C-H) plane		

Tableau 10 : Attribution des bandes IRTF des différents groupements d'acide gallique et du gallate de zinc

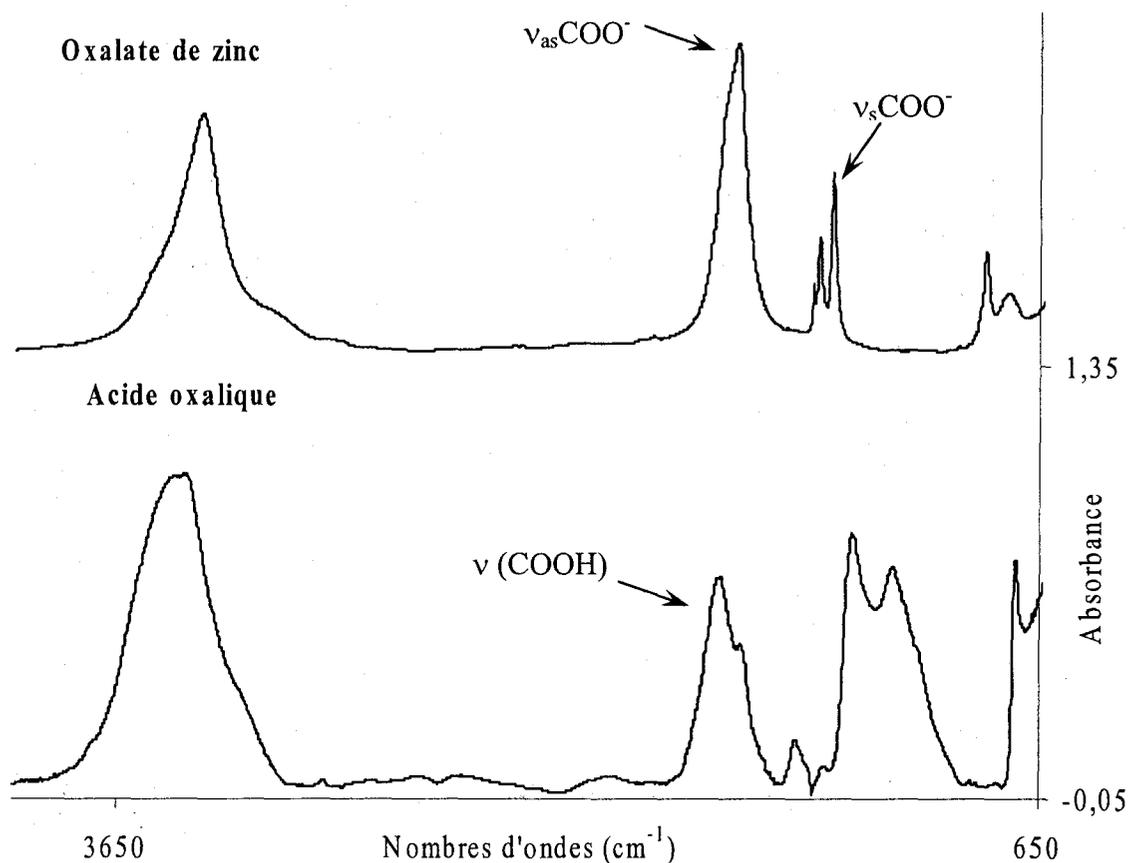


Fig. 37 : Spectres IRTF d'acide oxalique et d'oxalate de zinc

<i>Acide oxalique</i>		<i>Oxalate de zinc</i>	
Nombres d'onde (cm ⁻¹)	Modes de vibration	Nombres d'onde (cm ⁻¹)	Modes de vibration
1684	v(C=O) COOH	1631	v _{as} (COO ⁻)
1620	v(C-C)	1384,1363	v(C-C), v(C=C)
1437	v(C-C), v(C=C)	1318	v _s (COO ⁻)
1252	v(C-O), δ (O-C=O)		

Tableau 11 : Attribution des bandes IRTF des différents groupements d'acide oxalique et d'oxalate de zinc

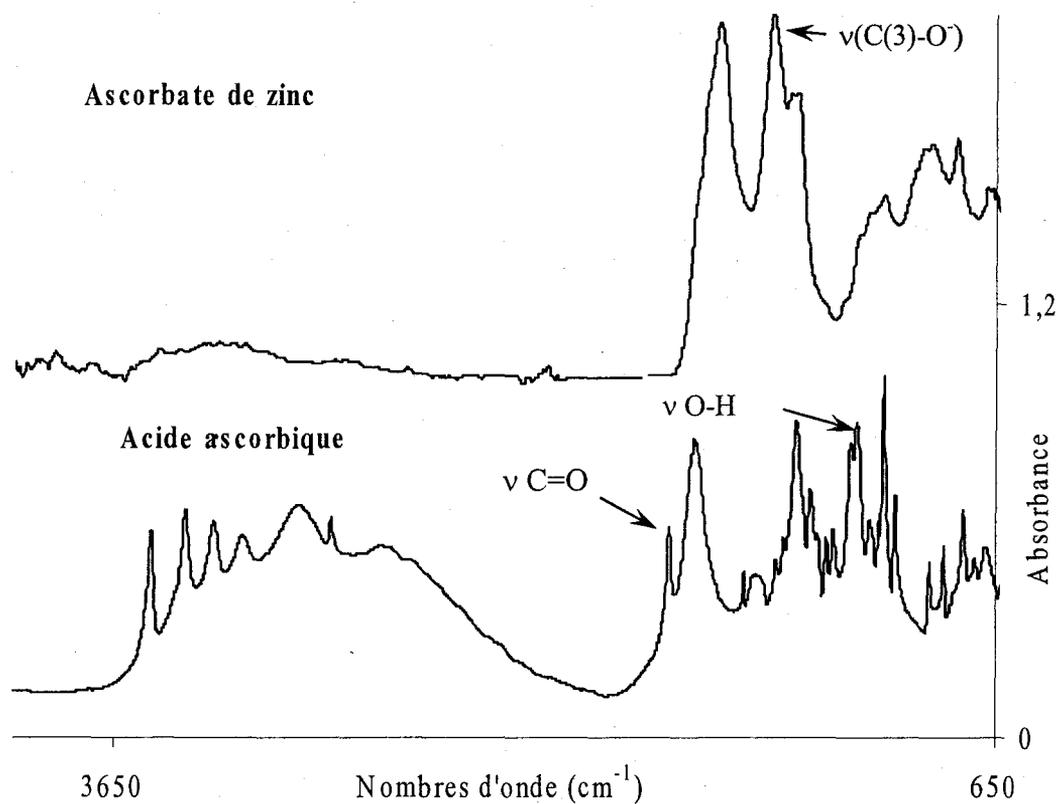


Fig. 38 : Spectres IRTF d'acide ascorbique et d'ascorbate de zinc

<i>Acide ascorbique</i>		<i>Ascorbate de zinc</i>	
Nombres d'onde (cm ⁻¹)	Modes de vibration	Nombres d'onde (cm ⁻¹)	Modes de vibration
1760	v(C=O)	1590	v(C=C)
1670	v(C=C)	1399	v(C(3)-O)
1120-1140	v(C-O) aromatique, v(C-C) aromatique, v(O-H) aliphatique, v(C-O) aliphatique		

Tableau 12 : Attribution des bandes IRTF des différents groupements d'acide ascorbique et d'ascorbate de zinc

L'interaction étudiée se situe au niveau des fonctions COOH et OH. Les vibrations d'élongation $\nu(\text{C}=\text{O})$ des groupements COOH sont visibles sur la zone spectrale de 1650-1750 cm^{-1} . Les vibrations de déformation $\delta(\text{O}-\text{H})$ des groupements phénoliques et alcooliques apparaissent vers 1300 cm^{-1} . Le passage de la forme acide à la forme sel est caractérisé par la disparition des bandes carboxyliques (COOH) au profit des bandes carboxylates (COO^-) symétriques et antisymétriques. Les évolutions spectrales des formes phénoliques et alcooliques avant et après salification se caractérisent surtout par la disparition des vibrations de déformation $\delta(\text{O}-\text{H})$. Cependant, aucune apparition des vibrations de type Zn-O n'est visible dans la gamme spectrale étudiée. Néanmoins, d'après l'étude du complexe d'ascorbate de zinc par IRTF, RMN et rayons X, réalisée par Ünalerğlu *et al* (2002), on peut attribuer la bande vers 1399 cm^{-1} (Tableau 12) dans le spectre d'ascorbate de zinc aux vibrations d'élongation $\nu(\text{C}(3)-\text{O}^-)$ (Fig. 38). Selon ces mêmes auteurs, les vibrations $\nu(\text{C}(2)-\text{O}^-)$ du groupement OH adjacent se situent aux alentours de la même zone que $\nu(\text{C}(3)-\text{O}^-)$ et peuvent être masquées par cette dernière. De plus, nous avons remarqué la disparition de la bande carbonyle après salification, ceci laisse supposer l'implication de ce groupement dans la fixation du zinc.

La complexation des éléments traces dépend de plusieurs paramètres dont l'affinité des sites réactionnels pour former des liaisons métal-ligand stables. Ces liaisons peuvent prendre plusieurs formes. Des structures de complexes du cuivre avec des molécules aromatiques contenant un groupement COOH (e.g. acide benzoïque) ont été proposées par Stevenson (1994). La complexation peut s'établir par :

- Formation de simples liaisons hydrogène en milieu aqueux (Fig. 39, A)
- Attraction électrostatique entre deux espèces chimiques ayant deux charges opposées (Fig. 39, B).
- Formation d'une liaison métal-ligand (Fig. 39, C).
- Formation d'un chélate en cas de présence d'un autre groupement OH ou COOH (Fig. 39, D).

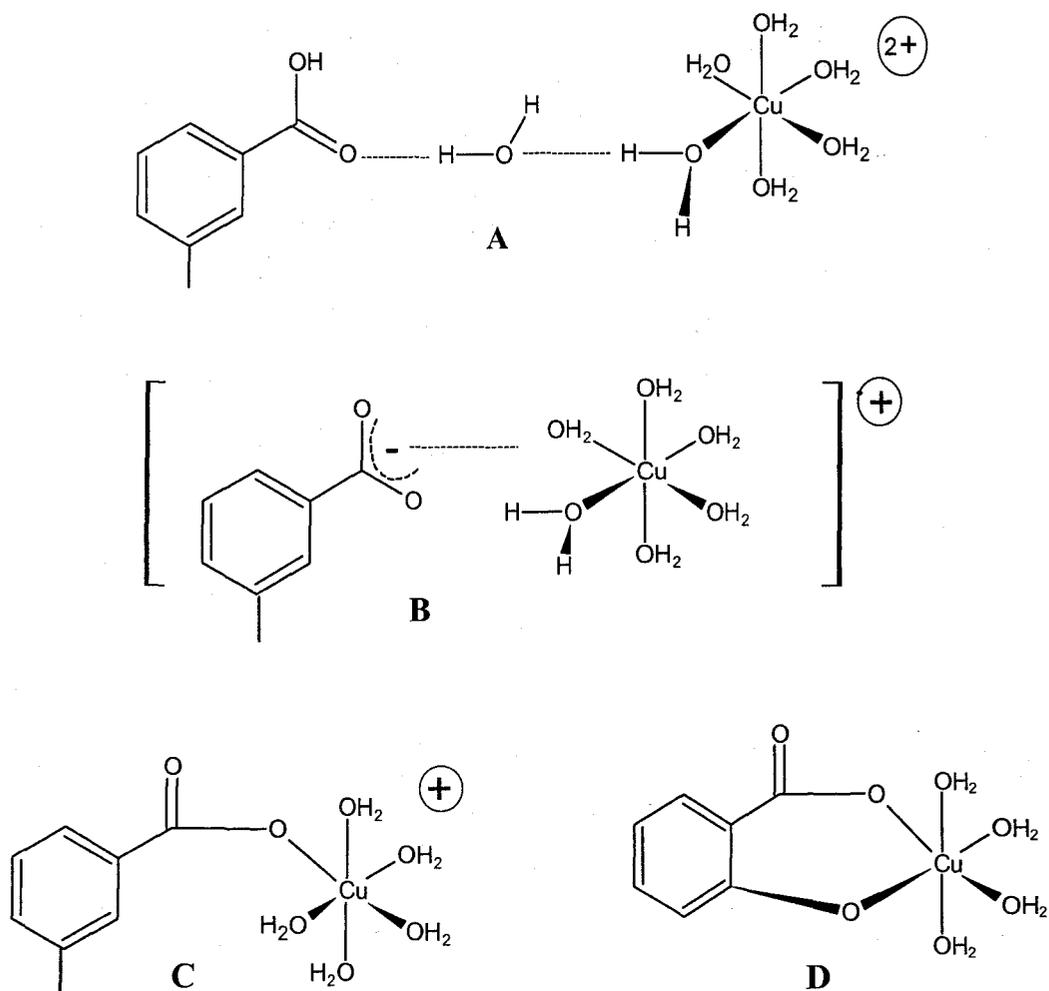


Fig. 39 : Structures des complexes de cuivre proposées par Stevenson ; A : Formation liaisons hydrogène, B Attraction électrostatique, C : Formation d'une liaison métal-ligand et D : Formation d'un chélate

Selon Stevenson (1994), les structures C et D sont beaucoup plus stables que les structures A et B, et représentent les structures prédominantes de la complexation des éléments dans des macro-molécules (e.g. acide humique).

Weisz *et al* (2002) ont proposé des structures d'oxalate de titane et de salicylate de titane basées sur l'analyse des spectres infrarouge (des formes acides et des formes sels) et des courbes isothermes de Langmuir. Les structures d'oxalates et de salicylates de titane les plus stables, décrites par ces auteurs, sont illustrées sur la figure 40.

Ces auteurs ont étudié aussi par infrarouge la réversibilité de la réaction de chimisorption en mettant en contact simultanément l'oxyde de titane avec des solutions d'oxalates et de salicylates (les rapports oxalate/salicylate sont : 0,01 ; 0,1 ; 10 et 100, pH 3,7). L'évolution des spectres infrarouge en fonction des rapports oxalate/salicylate a montré la disparition graduelle de certaines bandes caractéristiques des salicylates au profit d'autres bandes oxalates. Le remplacement des ligands oxalates par des ligands salicylates a été incomplet dans le cas inverse.

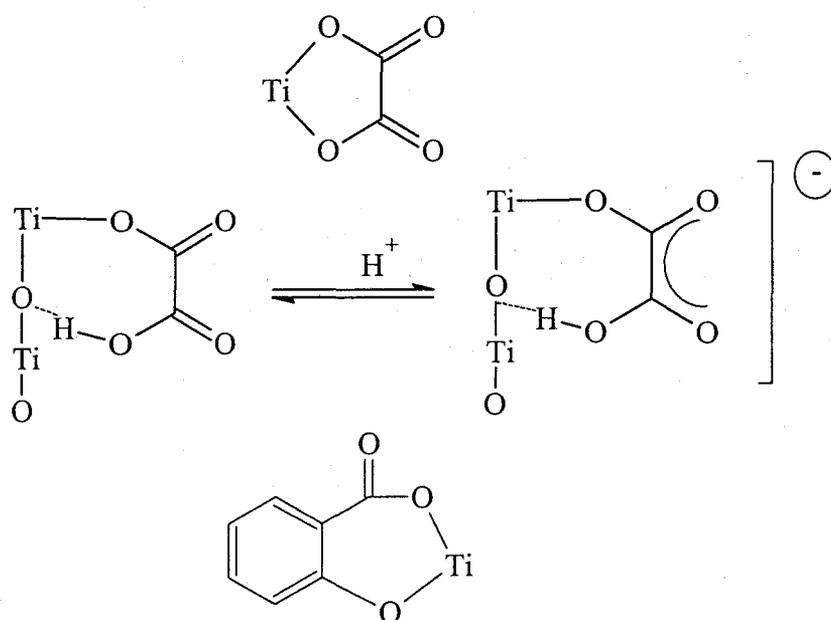


Fig. 40 : Structures d'oxalate et de salicylate de titane proposées par Weisz *et al* (2002)

La caractérisation du complexe d'ascorbate de zinc, formé à partir d'un mélange de sulfate de zinc ZnSO₄, 7H₂O, l'acide ascorbique et d'hydroxyde de baryum Ba(OH)₂, H₂O, a été bien détaillée par Ünalerğlu *et al* (2002), leurs analyses par RMN, rayons X et infrarouge ont montré que le zinc se fixe sur les groupements OH adjacents du cycle aromatique (Fig. 41).

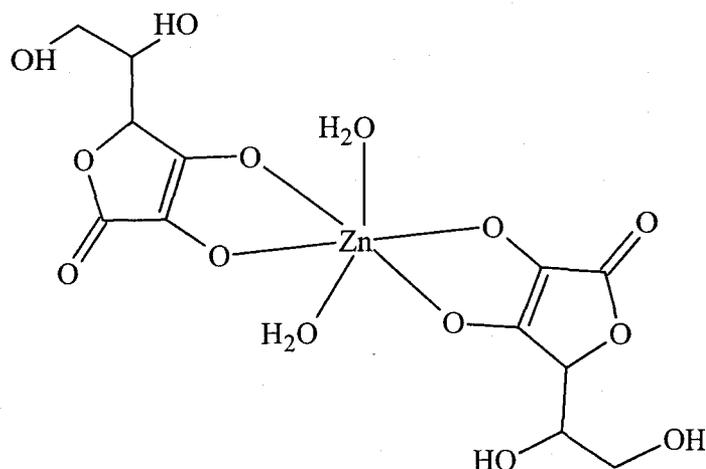


Fig. 41 : Structure d'ascorbate de zinc proposée par Ünalerğlu *et al* (2002)

II.5.8.2 Application aux composés lichéniques.

Les molécules lichéniques qui nous ont servi de modèles d'étude sont celles qui correspondent à la voie de biosynthèse de l'acetyl-polymalonyle du *Dilposchsites muscorum* (voir Chap. I, § I.2.3). Il s'agit de l'orcinol, l'acide usnique et l'atranorine (Société Sigma). L'acide orsellinique et l'acide lécanorique décarboxylé (Fig. 42) nous ont été fournis par le Laboratoire de Chimie Thérapeutiques de l'Université de Droit et de Santé de Lille II.

Les spectres des acides lichéniques et de leurs sels de zinc sont présentés dans les figures 43 à 47. Les interprétations spectrales des bandes principales sont présentées dans les tableaux 13 à 17.

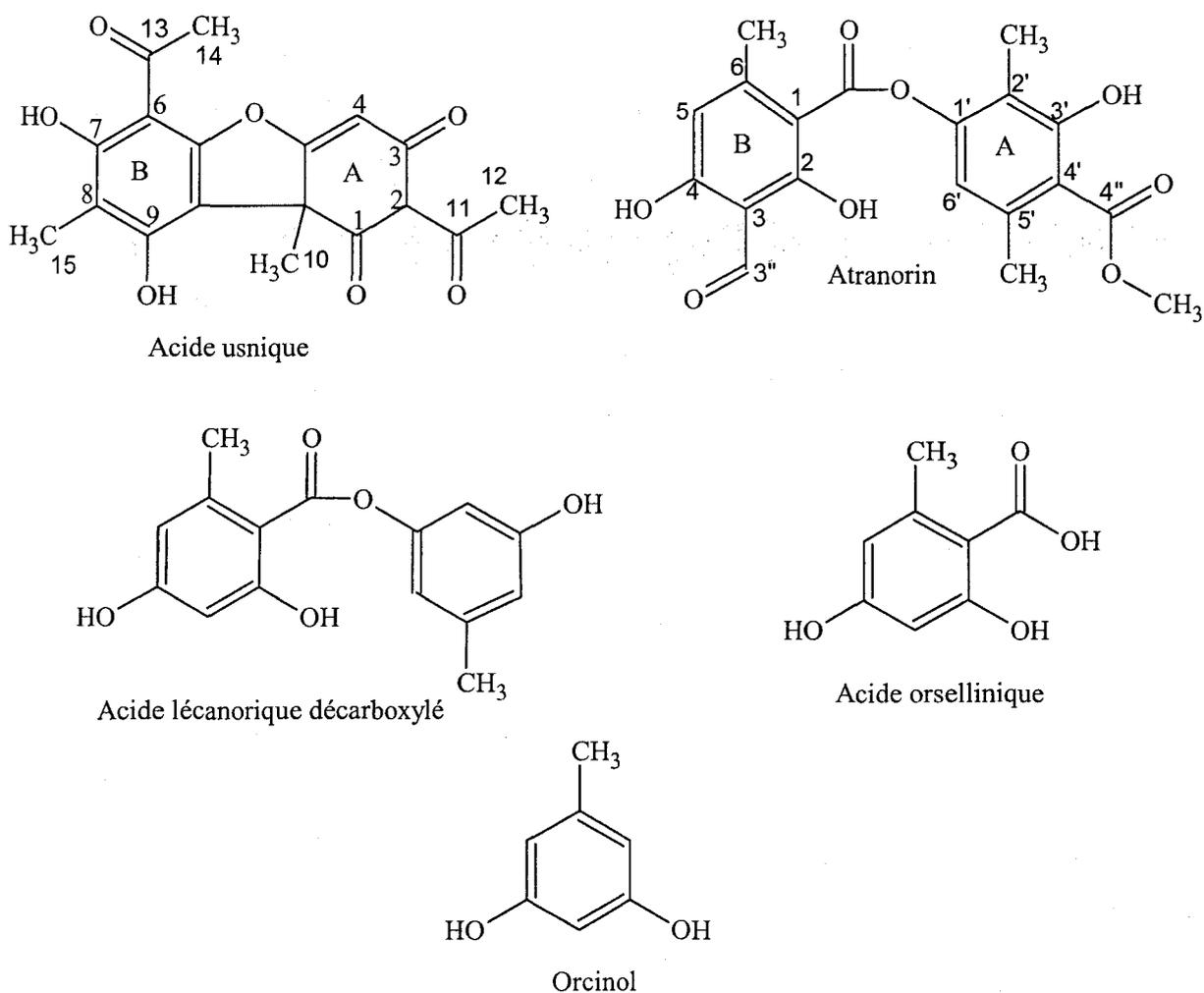


Fig. 42 : Formules développées des composés lichéniques

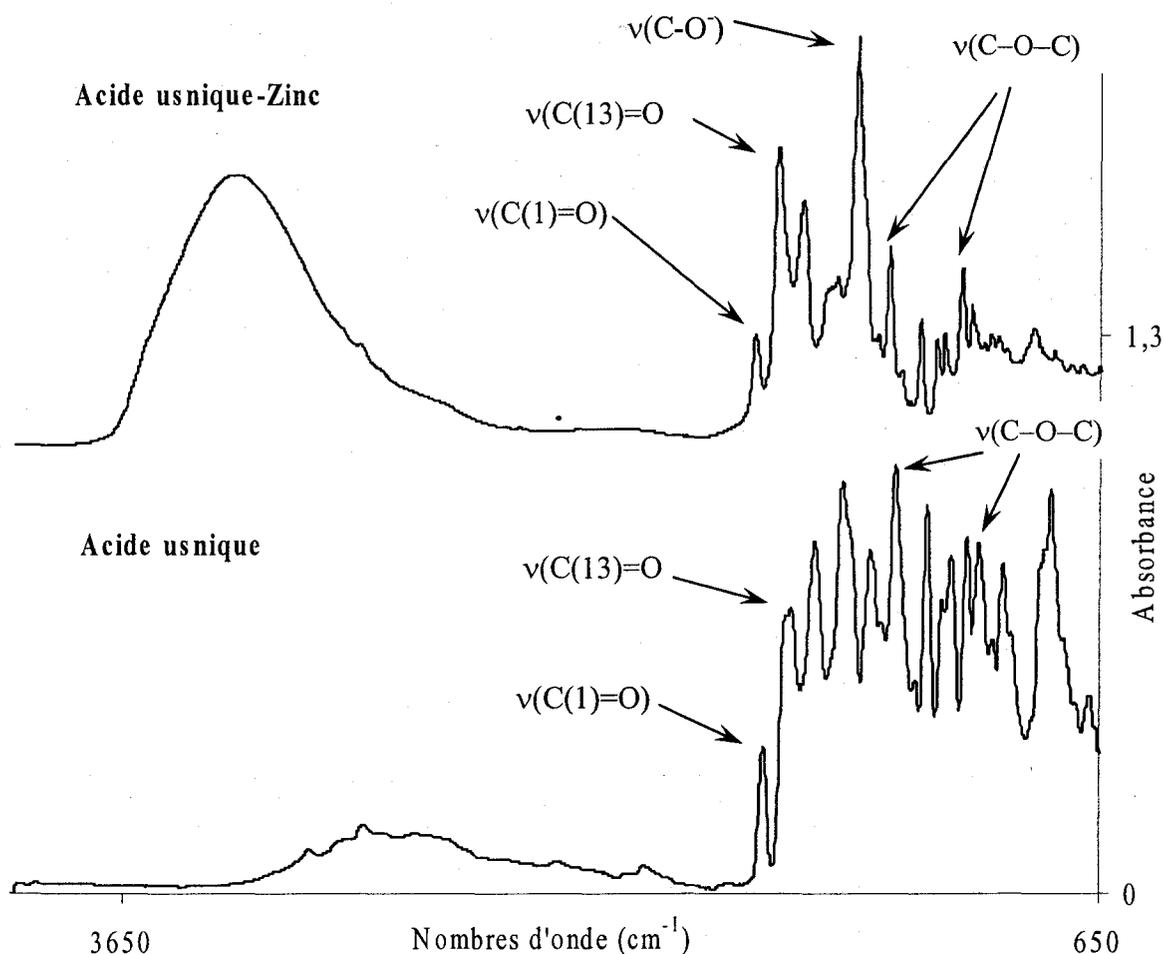


Fig. 43 : Spectres IRTF de l'acide usnique et du complexe acide usnique-zinc

<i>Acide usnique</i>		<i>Sel de zinc</i>	
Nombres d'onde (cm ⁻¹)	Modes de vibration	Nombres d'onde (cm ⁻¹)	Modes de vibration
1688	v(C(1)=O) cétone cyclique conjuguée	1699	v(C(1)=O)
1622	v(C(13)=O) cétone aromatique	1630	v(C(13)=O)
1532	v(C=C) aromatique	1555	v(C=C) aromatique
1450	δ (CH ₂ , CH ₃)	1447	δ (CH ₂ , CH ₃)
1286	v(C-O-C) antisymétrique	1384	v(C-O ⁻)
1184	δ(OH) aromatique	1286	v(C-O-C) antisymétrique
1065	v(C-O-C) symétrique	1190	δ(OH) aromatique
		1065	v(C-O-C) symétrique

Tableau 13 : Attribution des bandes IRTF des différents groupements de l'acide usnique et du complexe acide usnique-zinc

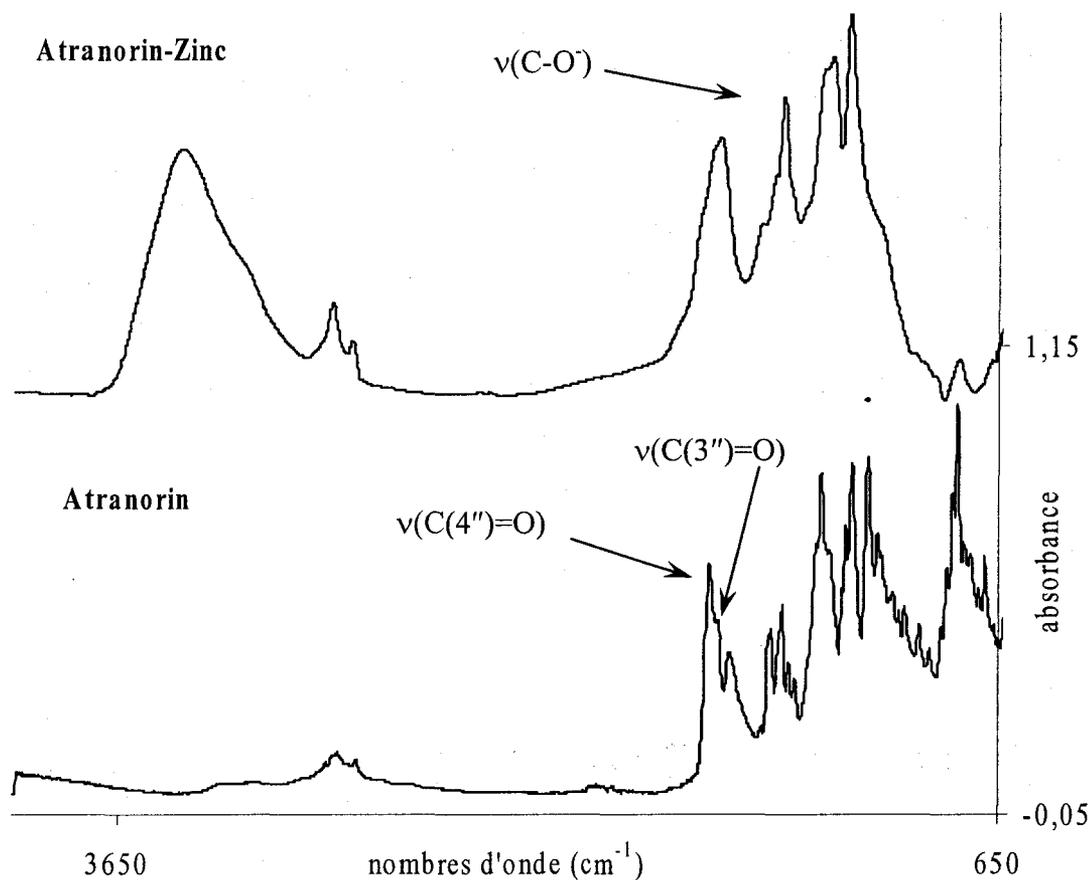


Fig. 44 : Spectres IRTF de l'atranorine et du complexe atranorine-zinc

<i>Atranorine</i>		<i>Sel de zinc</i>	
Nombres d'onde (cm ⁻¹)	Modes de vibration	Nombres d'onde (cm ⁻¹)	Modes de vibration
1648	v(C(4'')=O) méthyl-ester	1600	v(C=C)
1620	v(C(3'')=O) aldéhyde	1456	δ (CH ₂ , CH ₃)
1584	v(C=C)	1384	v(C-O ⁻)
1442	δ (CH ₂ , CH ₃)	1247	v(C-O-C) antisymétrique
1266	v(C-O) méthyl-ester		
1244	v(C-O-C) antisymétrique		
1181	δ(OH) aromatique		
1108	v(C-O-C) symétrique		

Tableau 14 : Attribution des bandes IRTF des différents groupements d'atranorine et du complexe atranorine-zinc

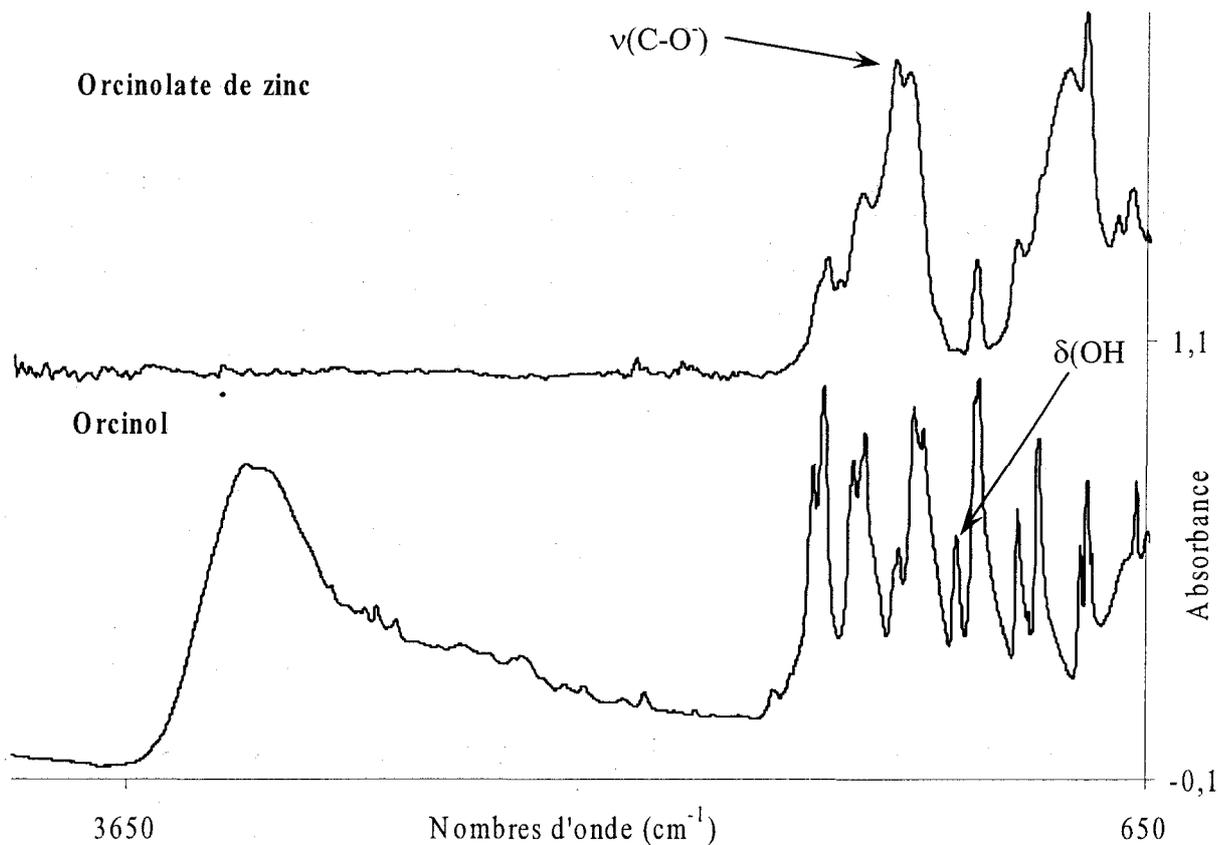


Fig. 45 : Spectres IRTF de l'orcinol et de l'orcinate de zinc

<i>Orcinol</i>		<i>Orcinate de zinc</i>	
Nombres d'onde (cm ⁻¹)	Modes de vibration	Nombres d'onde (cm ⁻¹)	Modes de vibration
1630, 1598	v(C=C) aromatique	1620, 1590	v(C=C) aromatique
1305	v(C-O)	1388	v(C-O)
1207	δ(OH) aromatique	1153	v(C-O)
1146	v(C-O)	831, 689	δ(C-H)
844, 677	δ(C-H)		

Tableau 15 : Attribution des bandes IRTF des différents groupements de l'orcinol et de l'orcinate de zinc

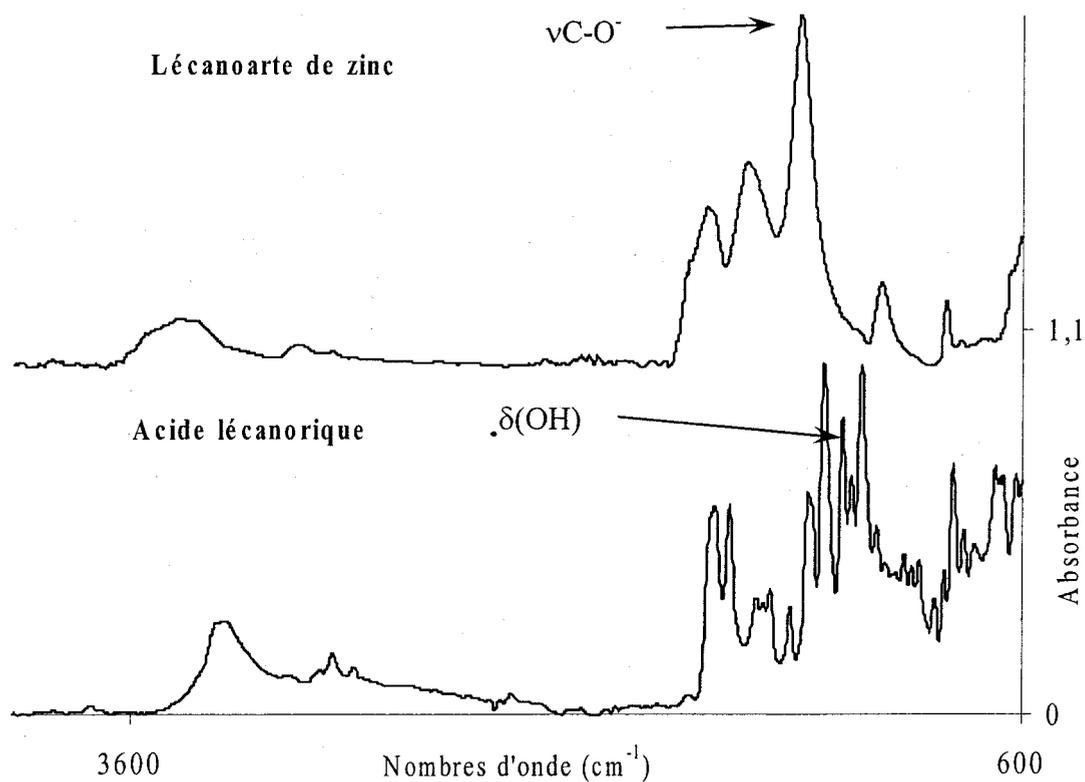


Fig. 46 : Spectres IRTF d'acide lécanorique et du lécanorate de zinc

<i>Acide lécanorique</i>		<i>Lécanoarte de zinc</i>	
Nombres d'onde (cm ⁻¹)	Modes de vibration	Nombres d'onde (cm ⁻¹)	Modes de vibration
1580, 1640	ν(C=C) aromatique	1650	ν(C=C) aromatique
1260	ν(C-O-C) antisymétrique	1350	ν(C-O ⁻)
1197	δ(OH) aromatique	856	δ(C-H)
1146	ν(C-O-C) symétrique		
833	δ(C-H)		

Tableau 16 : Attribution des bandes IRTF des différents groupements de l'acide lécanorique et du lécanorate de zinc

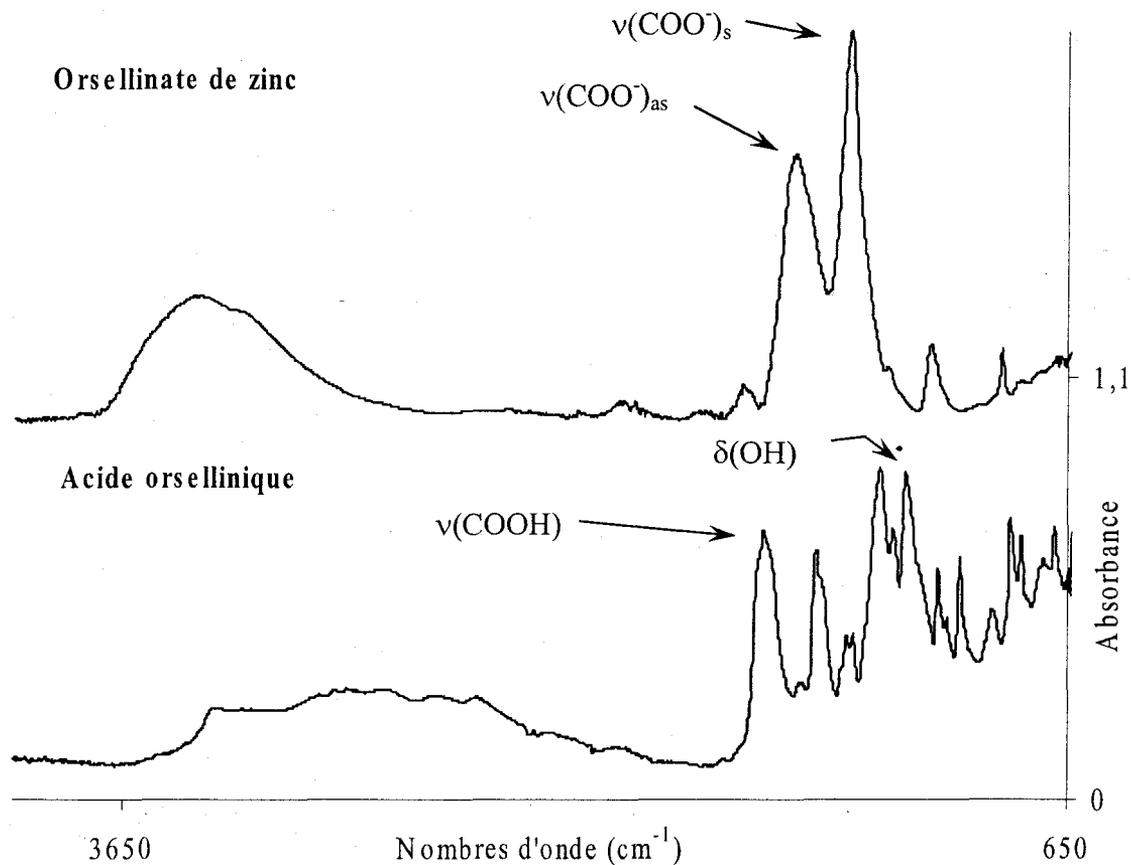


Fig. 47 : Spectres IRTF de l'acide orsellinique et de l'orsellinate de zinc

<i>Acide orsellinique</i>		<i>Orsellinate de zinc</i>	
Nombres d'onde (cm ⁻¹)	Modes de vibration	Nombres d'onde (cm ⁻¹)	Modes de vibration
1620	v(C=O) COOH	1530	v(COO ⁻) _{as}
1460	v(C-C)	1350	v(COO ⁻) _s
1162	δ(OH) aromatique	867	δ(C-H)
837, 694	δ(C-H)		

Tableau 17 : Attribution des bandes IRTF des différents groupements de l'acide orsellinique et de l'orsellinate de zinc

Les spectres des sels des composés lichéniques sont moins résolus par rapport à leurs formes "acides". La complexation de ces molécules engendre des groupements avec des voisinages variés, générant ainsi des bandes larges.

Certains groupements cétoniques du cycle A de l'acide usnique, comme par exemple C(3)=O et C(11)=O qui apparaissent respectivement vers 1716 et 1676 cm^{-1} (Edwards *et al* (2003)), ne sont pas visibles car ils sont en équilibre déplacés vers les formes « énols ». Les vibrations $\nu(\text{C}(1)=\text{O})$ et $\nu(\text{C}(13)=\text{O})$ sont décalées d'à peu près 10 cm^{-1} dans le spectre du sel de zinc par rapport à leurs positions dans le spectre de l'acide usnique. Ce décalage confirme l'implication de ces groupements dans la complexation du zinc (Takani *et al* (2002))

Les groupements OH sont aussi impliqués dans la fixation du zinc. Ceci se traduit par la diminution de l'intensité de la bande OH dans le spectre d'acide usnique et par l'apparition des vibrations $\nu(\text{C}-\text{O}^-)$ vers 1384 cm^{-1} .

D'après Takani *et al* (2002) les groupements C(1)=O, C(11)=O (énol), C(7)-OH et C(13)=O sont mis en jeu dans la complexation du métal par l'acide usnique. Ces auteurs ont décrit une structure polymérique du complexe acide usnique-cuivre. Transposée au complexe de zinc, la structure peut être proposée sur la figure 48.

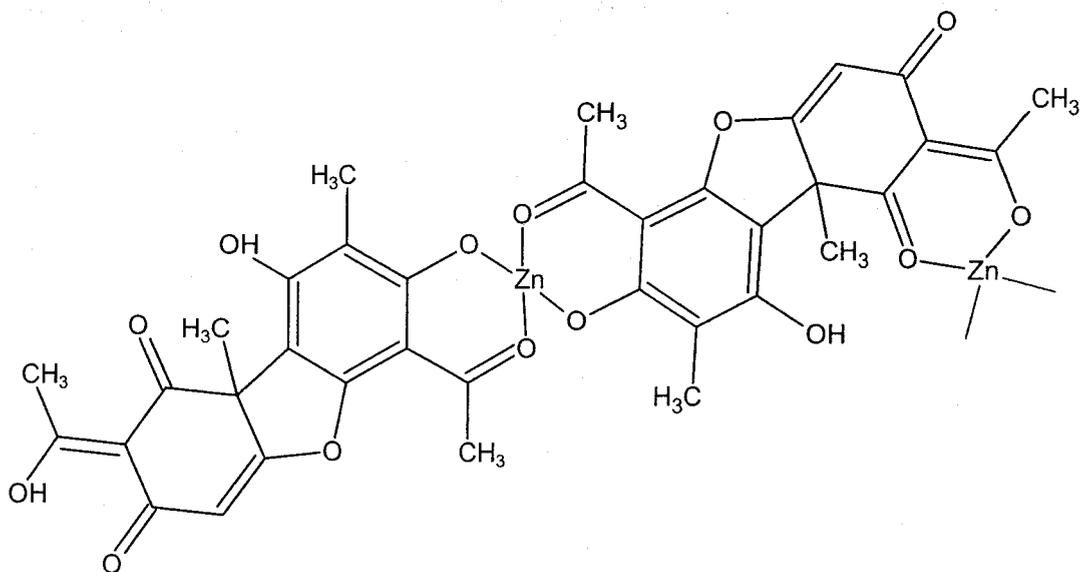


Fig. 48 : Structure proposée du complexe acide usnique-zinc similaire à celle du complexe acide usnique-cuivre proposée par Takani *et al* (2002)

La complexation de l'atranorine a apporté beaucoup de perturbations spectrales (Fig. 44). En effet, nous avons constaté la disparition de bandes relatives aux vibrations des groupements OH et C=O (d'aldéhyde et des esters) et l'apparition de la bande $\nu(\text{C}-\text{O}^-)$ vers 1384 cm^{-1} . Ces données spectrales montrent l'implication du groupement ester C(4")=O du cycle A, de l'aldéhyde C(3")=O du cycle B ainsi que les groupements phénoliques adjacents (C(3')-OH et

C(4)-OH). Par conséquent on peut s'attendre à une structure polymérique du complexe atranorine-zinc similaire à celle de l'acide usnique-zinc comme illustré sur la figure 48.

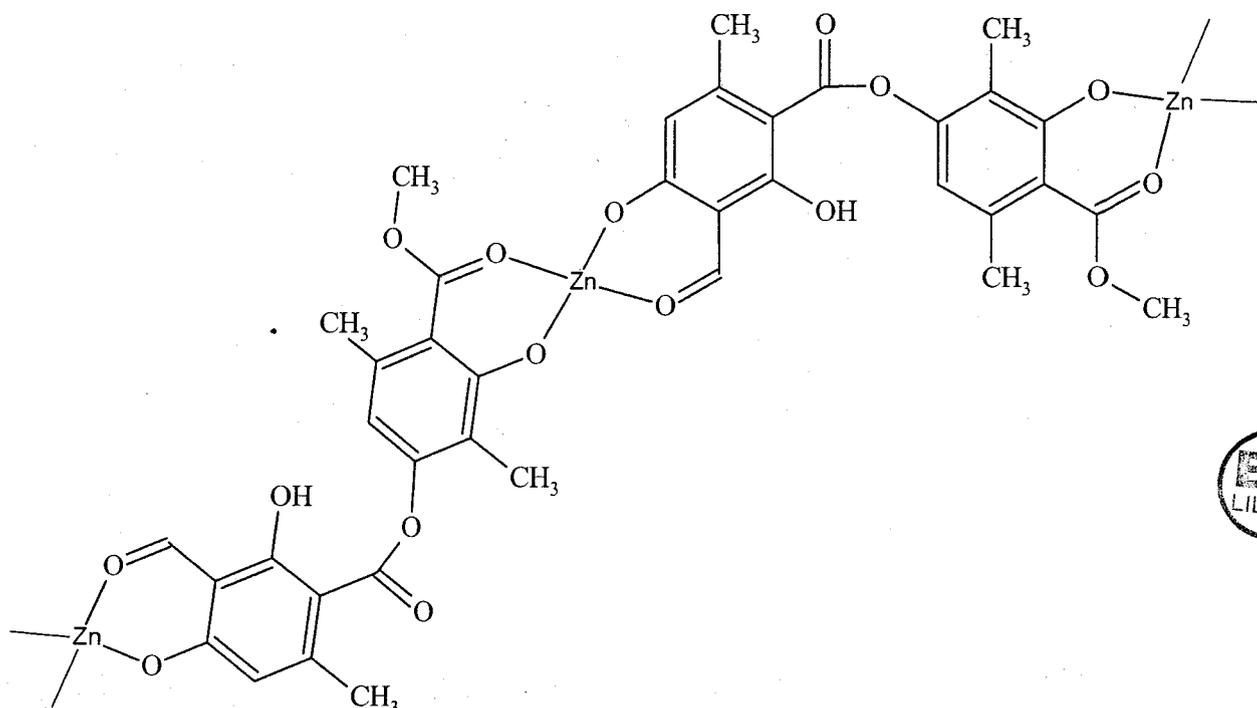


Fig. 49 : Structure proposée du complexe atranorine-zinc

Le passage de la forme protonée à la forme sel de l'orcinol est caractérisé par la disparition totale des bandes relatives aux vibrations de déformation OH au profit de la bande relative aux vibrations d'élongation du groupement C-O⁻. La position des groupements hydroxyliques de l'orcinol ne permet pas d'envisager une structure en forme de chélate. La structure de ce complexe peut être proposée selon la forme illustrée dans la figure 50.

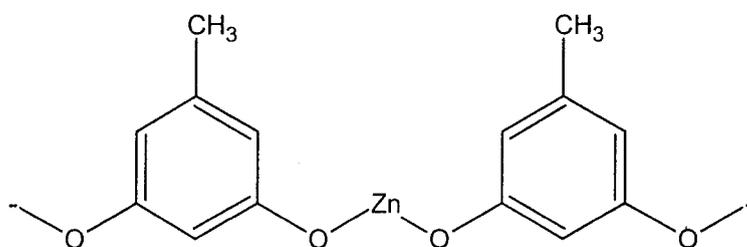


Fig. 50 : Structure proposée du complexe orcinolate de zinc

La complexation de l'acide lécanorique s'est traduite par la fixation du zinc au niveau des groupements OH, puisque les bandes relatives à ces groupements ont disparu et la bande relative aux vibrations C-O⁻ est apparue vers 1345 cm⁻¹ (Fig. 46).

Les groupements réactionnels de l'acide lécanorique se trouvent à des positions éloignées les unes par rapport aux autres, et de ce fait, on peut envisager une structure polymérique du complexe lécanorate de zinc. Les bandes larges de ce complexe résultent des voisinages variés

des groupements réactionnels dans ce complexe par rapport à la structure latérale de l'acide lécanorique. D'autres bandes caractéristiques de ce type de depside (bandes C-O-C symétrique et antisymétrique) sont masquées dans le complexe lécanorate de zinc.

Le complexe orsellinate de zinc est caractérisé par la disparition des bandes relatives aux vibrations d'élongation C=O du groupement COOH vers 1620 cm^{-1} et de déformation du groupement OH vers 1162 cm^{-1} et par l'apparition des bandes COO⁻ symétrique (1530 cm^{-1}) et antisymétrique (1350 cm^{-1}).

II.5.9 Evaluation des capacités d'accumulation du zinc par les substances lichéniques

Après avoir étudié les groupements fixateurs de métaux par IRTF, à travers les différentes perturbations spectrales apportées aux molécules modèles et aux acides lichéniques par complexation avec le zinc, nous nous sommes orientés vers la quantification de la fixation du zinc par ces molécules.

L'étude a porté sur quelques molécules étudiées auparavant, à savoir, l'acide usnique, l'acide lécanorique, l'acide orsellinique et l'acide oxalique.

Le principe de l'incubation est le suivant : à une masse d'acide, on ajoute une solution de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10g/l de Zn^{2+}). La quantité de zinc ajoutée est calculée de telle façon à fournir à chaque groupement fonctionnel 4 atomes de zinc. Après précipitation du sel, le mélange est filtré, et le filtrat est ensuite analysé par ICP-AES. Les résultats sont présentés sous forme d'histogramme (Fig. 51).

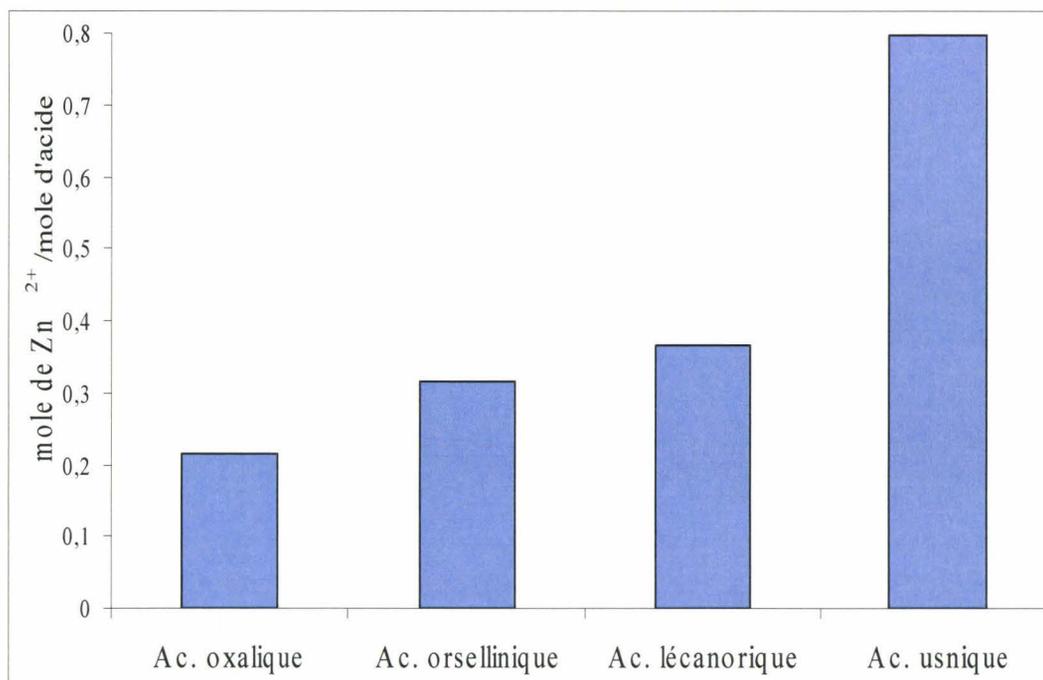


Fig. 51 : Teneur en zinc fixé par des substances lichéniques

La quantité de zinc fixée par l'acide usnique est supérieure à celles fixées par les autres molécules (Fig. 51). Les teneurs en zinc fixées sont corrélées aux nombres de groupements susceptibles de capter les cations métalliques. Les teneurs en zinc fixées par ces molécules sont inférieures à celles estimées pour former les structures (polymériques et chélates) proposées auparavant. Les groupements réactionnels ne sont pas tous mis en jeu au niveau de la complexation du zinc puisqu'on retrouve en solution une concentration supérieure à celle qu'on pouvait atteindre si la complexation avait eu lieu selon les modèles proposés. On peut évoquer :

- la mise en solution partielle des complexes de zinc formés
- des réactions de complexation monophasés où tous les sites actifs n'y participent pas.

Afin d'étudier l'effet de la déprotonation des sites réactionnels par NaOH sur la fixation du zinc, les acides lichéniques sont mis en solution avec de la soude en quantité nécessaire pour neutraliser tous les sites carboxyliques et hydroxyliques avant l'ajout de la solution de zinc.

En raison des faibles quantités d'acide lécanorique et d'acide orsellinique dont nous disposons, seuls l'acide usnique et l'acide oxalique ont subi une incubation dans une solution de zinc dans deux milieux différents (avec et sans ajout de NaOH). L'histogramme de la figure 52 représente les quantités fixées par les deux molécules dans deux milieux différents.

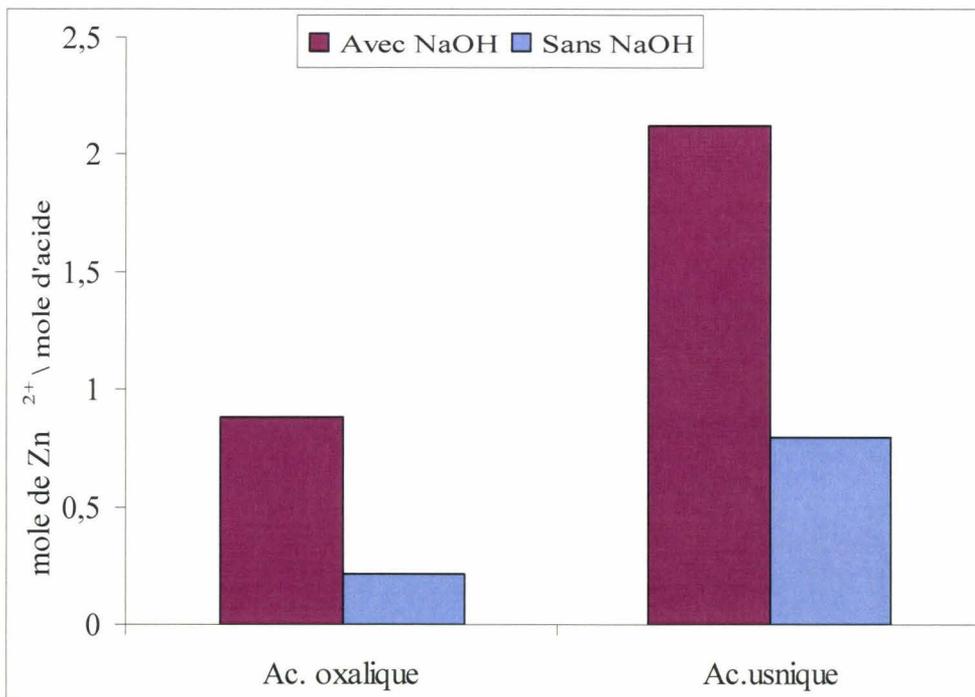
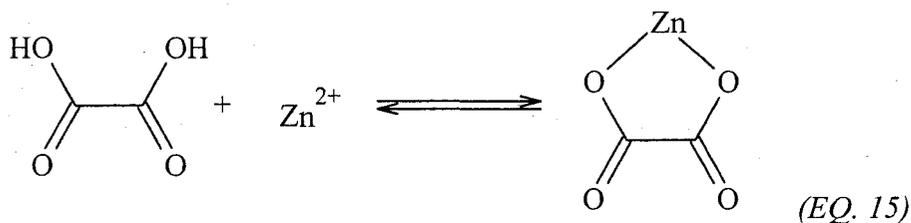


Fig. 52 : Teneur en zinc fixé par l'acide usnique et l'acide oxalique dans deux milieux différents

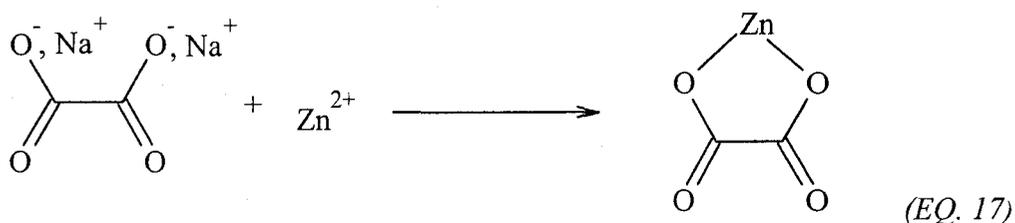
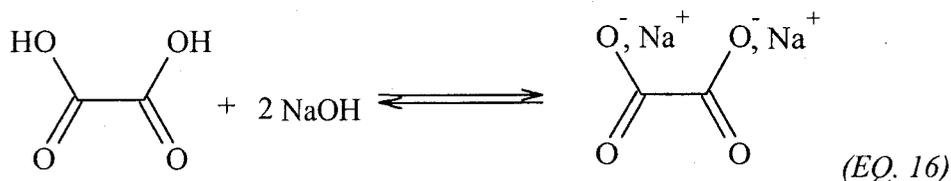
La neutralisation des sites réactionnels par NaOH augmente la quantité de zinc fixée par les deux molécules (Fig. 52). Les teneurs en zinc ont augmenté de 76% pour l'acide oxalique et 63% pour l'acide usnique.

En l'absence de NaOH, un cation de zinc est attribué à 5 molécules d'acide oxalique ; en d'autres termes, 80% d'acide oxalique est resté intact alors que seul 20% d'acide oxalique a pu fixer le zinc selon l'équation 15 :



De la même manière, un cation de zinc est attribué à une molécule d'acide usnique, donc 50% d'acide usnique a formé un complexe acide usnique-zinc (1:2) stable selon la structure donnée à la figure 48.

En présence du NaOH, un cation de zinc est attribué à une molécule d'acide oxalique, et deux cations de zinc sont reliés à une molécule d'acide usnique. Les sites réactionnels susceptibles de fixer le zinc dans les deux molécules ont totalement réagi avec le zinc. La neutralisation des sites OH par NaOH facilite la fixation du zinc car l'échange cation-cation est plus facile que l'échange cation-proton (EQ. 16, 17) d'après une étude réalisée par Gossart (2001).



II.5.10 Etude de l'accumulation du zinc par le *Diploschistes muscorum*

II.5.10.1 Analyse par IRTF d'un lichen témoin et d'un lichen métallifère.

Les thalles du *diposchistes muscorum* métallifère et témoin (Ecault) sont soumis à l'analyse par IRTF. Ces lichens sont nettoyés, séchés à 80°C à l'étuve, broyés et mis en forme de pastilles avec KBr. Les spectres des thalles témoin et métallifère ainsi que leurs interprétations principales sont illustrés respectivement sur la figure 53 et le tableau 18.

Le spectre du lichen témoin est caractérisé par une bande large entre 1620-1680 cm^{-1} en raison d'un chevauchement de plusieurs bandes relatives aux groupements COOH, COO^-_{as} , C=O, ...etc. (Fig. 53). Les voisinages distincts des groupements fonctionnels du lichen contribuent à l'amplification de ce phénomène.

Le lichen d'Auby est caractérisé par la prédominance des groupements COO^-_{as} . La bande relative à ce groupement, située vers 1650 cm^{-1} , est plus résolue dans le lichen métallifère par rapport au lichen témoin. L'intensité de cette bande est supérieure à celle du lichen témoin. Ce qui vérifie que le nombre de sites COOH impliqués dans des liaisons avec les cations métalliques est plus élevé dans ce lichen d'Auby par rapport au thalle non métallifère. L'épaule observé vers 1720 cm^{-1} peut être attribué aux vibrations d'élongation $\nu(\text{C}=\text{O})$ du groupement COOH. Malgré la contamination du lichen d'Auby par les éléments traces métalliques, celui-ci contient encore des sites réactionnels capables de fixer les cations métalliques. Face à cette pollution métallique le *Diploschistes muscorum* produit des métabolites contenant essentiellement des groupements COOH pour complexer les éléments traces.

Les groupements phénoliques contribuent également à la fixation des métaux, et ceci est visible à travers l'intensité élevée des groupements C-O dans le lichen d'Auby par rapport au lichen d'Ecault.

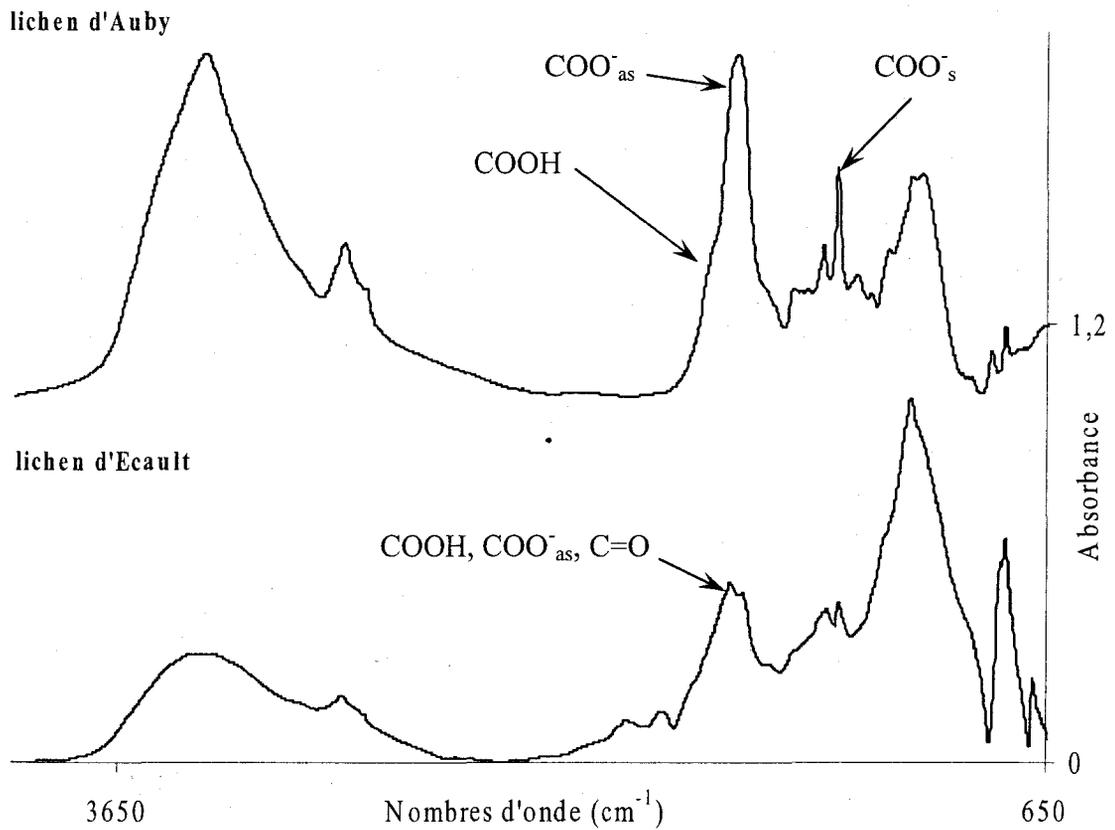


Fig. 53 : Spectres IRTF du lichen d'Auby et du lichen d'Ecault

<i>Lichen témoin (Ecault)</i>		<i>Lichen métallifère (Auby)</i>	
Nombres d'onde (cm ⁻¹)	Modes de vibration	Nombres d'onde (cm ⁻¹)	Modes de vibration
3500	δ(OH) phénolique, aliphatique	3500	δ(OH) phénolique aliphatique
2940	ν(CH ₂) antisymétrique	2940	ν(CH ₂) antisymétrique
2870	ν(CH ₂) symétrique	2870	ν(CH ₂) symétrique
1620-1700	ν(C=O) COOH, ν(COO ⁻) _{as} , ν(C=C), ν(C=O)	1710	ν(C=O) COOH
		1650	ν(COO ⁻) _{as}
1360	ν(C-O)	1360	ν(C-O)
1320	ν(COO ⁻) _s	1320	ν(COO ⁻) _s
1090	ν(C-O-C), silicates	1090	ν(C-O-C), silicates
780	Silicates, δ(N-H)	780	Silicates, δ(N-H)

Tableau 18 : Attribution des bandes IRTF des différents groupements du lichen métallifère (Auby) et du lichen témoin (Ecault)

II.5.10.2 Evolution des spectres IRTF d'un lichen témoin en fonction de la concentration en zinc.

Nous avons également suivi l'évolution des spectres IRTF en fonction de la concentration en métal ajoutée au lichen non exposé aux métaux (Ecault). A une masse de 250 mg du lichen séché et broyé, on ajoute 40 ml de solutions de nitrate de zinc de 10 g/l, 20g/l et 50g/l pendant 24 heures. Après filtration et séchage, la partie solide est analysée par IRTF. Les spectres sont regroupés dans la figure 54.

Les spectres du lichen d'Ecault mis en contact avec des solutions de nitrate de zinc de concentrations croissantes (Fig. 54) confirment l'implication des sites COOH dans la fixation des éléments métalliques. L'intensité des groupements COO⁻ augmente en fonction de la concentration en zinc ajoutée.

Les sites COOH mis en jeu dans des liaisons avec le zinc augmentent avec la concentration en zinc ajoutée. Il faut noter aussi la diminution progressive de l'intensité de la bande COOH en fonction de la concentration.

Les sites OH sont également impliqués dans la fixation du zinc puisque l'intensité des raies de vibrations ν_{C-O} (caractéristiques d'une liaison C-O-Métal) augmente avec la concentration en zinc. L'intensité de ces raies de vibrations augmente de la même manière que celle des groupements COO⁻.

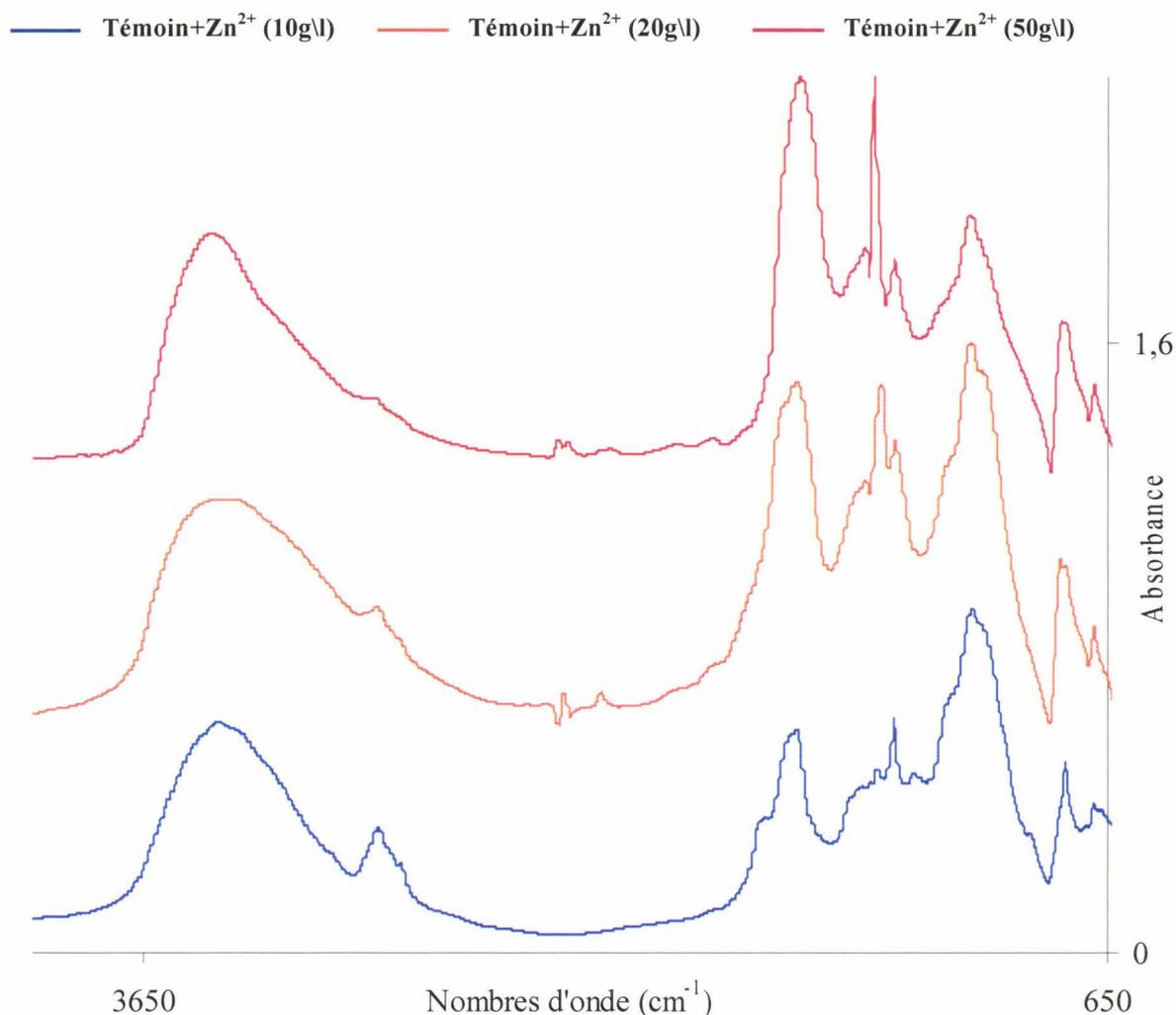


Fig. 54 : Spectres IRTF du lichen d'Ecault mis en contact avec des solutions de nitrate de zinc

N.B. les spectres IRTF enregistrés sur le lichen d'Ecault mélangé avec des solutions de zinc de concentrations inférieures 10 g/l ne sont pas modifiés par rapport au spectre du lichen témoin.

II.5.10.3 Etude de l'échange cationique chez le *Diploschistes muscorum*.

L'étude de l'échange cationique entre le zinc et les éléments contenus dans le thalle du lichen d'Ecault est réalisée par la mise en contact de 100 mg du lichen avec 10 ml de solution de zinc de 6 et 9 moles de Zn^{2+} par gramme de lichen, pendant 3 heures. Le filtrat est analysé par ICP-AES. Les teneurs des cations (Ca, Na, K, Mg, Cu, Pb) libérés après fixation du zinc sont présentées dans la figure 55.

L'analyse des résultats de l'échange cationique (Fig. 55) montre deux faits intéressants :

- 1- Les concentrations du zinc fixé par le lichen d'Ecault augmentent légèrement en fonction de la concentration initiale de zinc. Ce qui s'explique par l'incorporation de ce cation dans des sites bien spécifiques.

2- L'échange s'effectue entre cations puisque la quantité de zinc fixé est quasiment égale à la somme des cations libérés. Le zinc fixé a surtout remplacé des cations de calcium.

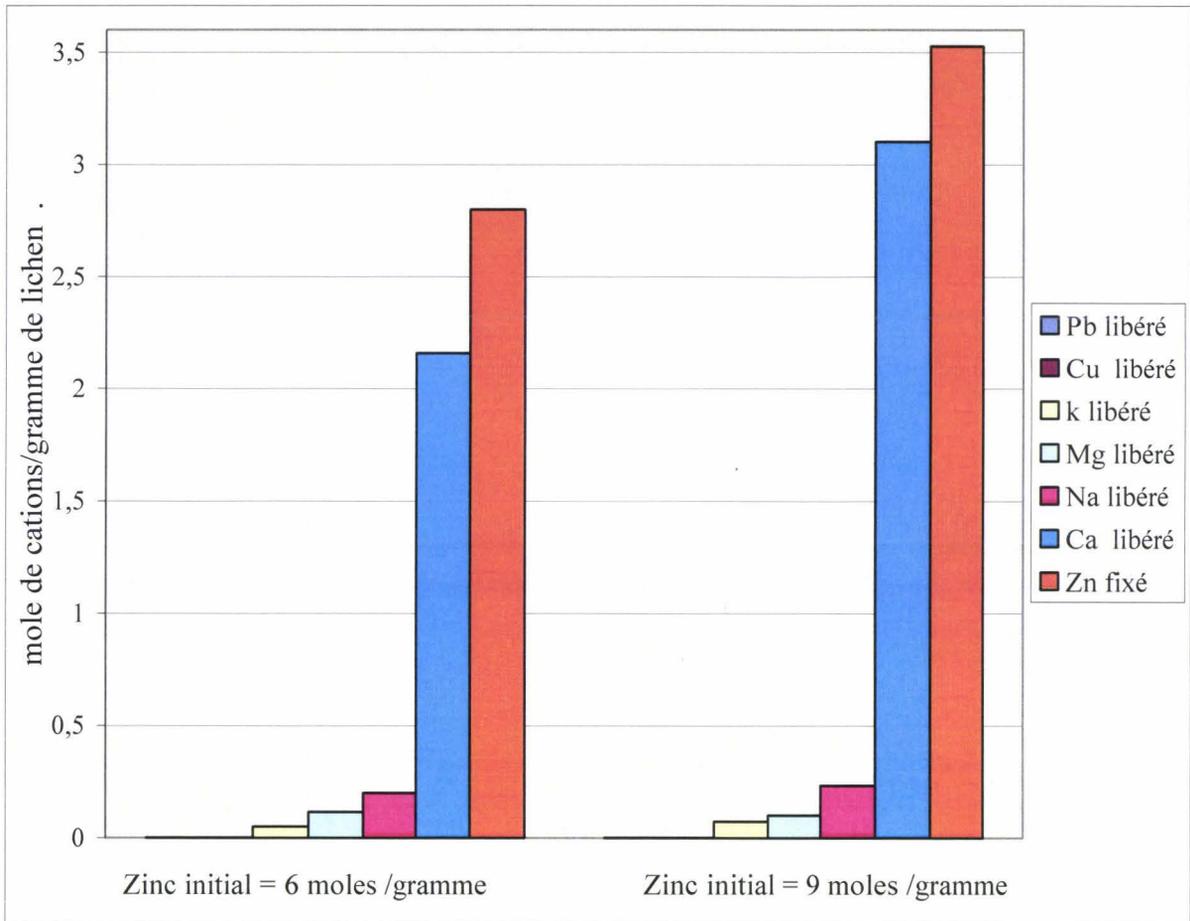


Fig. 55 : Teneur en zinc fixé par le *Diploschistes muscorum* et teneurs en éléments libérés par le thalle lichénique d'Ecault

Le zinc arrive donc à déloger surtout les cations de calcium puisque les teneurs de zinc fixées par le *Diploschistes muscorum* sont à peu près égales aux teneurs de calcium libérées.

Il faut souligner à ce propos que les lichens agissent comme des résines échangeuses d'ions. Ils absorbent les ions métalliques extracellulaires issus de l'eau de pluie et/ou du sol et relarguent des protons ou des ions métalliques de faible affinité de liaison (Richardson & Nieboer (1981) ; Richardson (1992)).

D'après Paul *et al* (2003) la fixation du manganèse au sein du thalle d'*Hypogimnia physodes* cause un largage du calcium et magnésium. Cet échange cationique se passe au niveau des membranes corticales et des matrices polysaccharides. Dans la médulle, le manganèse est incorporé dans les cristaux d'oxalate de calcium et surtout au niveau des jeunes hyphes. Cet échange cationique peut s'effectuer aussi au niveau des complexes mettant en jeu des acides lichéniques.

La fixation des cations dans des systèmes biologiques est influencée par des facteurs de sélection. Dans ce qui suit nous présentons un aperçu sur les critères principaux de sélection cationiques.

En chimie de coordination, la stabilité des liaisons cations-agents chélatants dans les complexes mononucléaires suit certaines règles et les différents ions métalliques ont des sites de fixations préférentiels, impliquant des atomes donneurs d'électrons ainsi que des géométries préférentielles. Néanmoins, la stabilité des complexes formés reste considérablement indépendante du ligand. Cette stabilité est souvent liée à des séquences qui dépendent fortement des cations mis en jeu au cours de réactions de complexation. Afin d'expliquer cette relation, une approche basée sur le potentiel ionique où le rapport z/r (z est la charge ionique et r le rayon ionique) est avancée. Le rapport z/r est relatif au potentiel d'ionisation I_n de l'élément M en M^{n+} (pouvoir accepteur d'électrons de M^{n+}).

La courbe de I_2 en fonction de z/r pour les ions divalents (Fig. 56) permet de séparer ces ions en trois classes (Ahrlund *et al* (1958), Pearson (1963)).

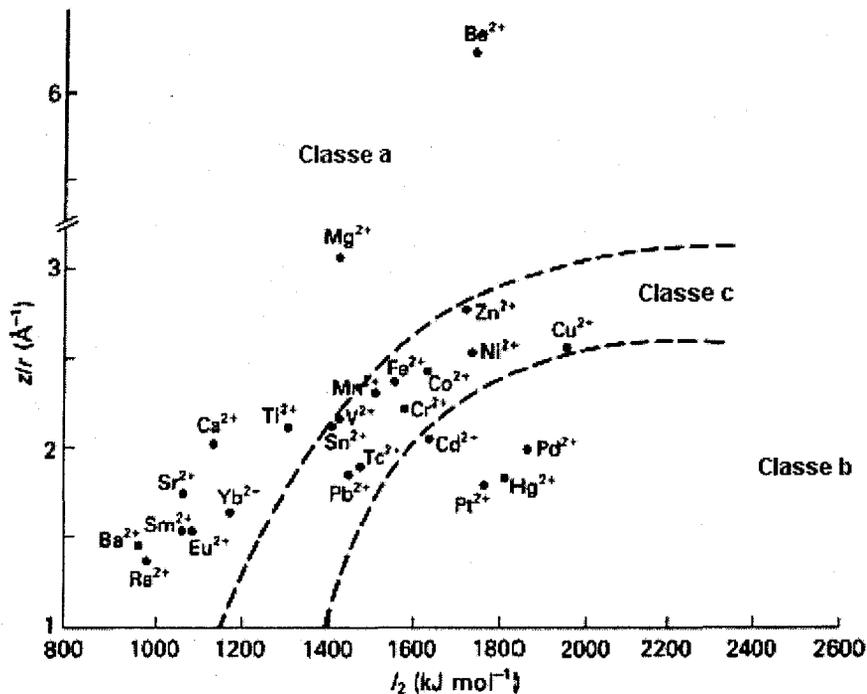


Fig. 56 : Distribution des cations divalents en fonction du potentiel d'ionisation I_2 et du rapport z/r

Ce concept a été généralisé à un certain nombre d'espèces chimiques qu'on appelle communément « acide » et « base ». Ces espèces sont classées en trois groupes en se basant sur l'affinité des atomes des ligands pour les atomes accepteurs et les ions (Ahrlund *et al* (1958), Pearson (1963)). Le tableau 19 illustre les trois classes d'acides et de bases.

class (a)	class (c)	class (b)
Acides		
H ⁺ , Li ⁺ , Na ⁺ , K ⁺ , Be ²⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , BF ₃ , BCl ₃ , B(OR) ₃ , Al ³⁺ , AlCl ₃ , Al(CH ₃) ₃ , Sc ³⁺ , Ti ⁴⁺ , VO ²⁺ , Cr ³⁺ , Fe ³⁺ , Co ³⁺	Fe ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Rh ³⁺ , B(CH ₃) ₃ , R ₃ C ⁺ , Pb ²⁺ , Sn ²⁺	Cu ⁺ , Ag ⁺ , Au ⁺ , Cd ²⁺ , Hg ²⁺ , Pt ²⁺ , Pt ⁴⁺ , MoO ₂ ²⁺ , Pd ²⁺
Bases		
NH ₃ , RNH ₂ , N ₂ H ₄ , H ₂ O, OH ⁻ , O ²⁻ , ROH, RO ⁻ , CO ₃ ²⁻ , SO ₄ ²⁻ , ClO ₄ ⁻ , F ⁻	C ₆ H ₅ NH ₂ , N ₃ ⁻ , N ₂ , Br ⁻ , Cl ⁻	H ⁻ , R ⁻ , C ₂ H ₄ , C ₆ H ₆ , CN ⁻ , CO, SCN ⁻ , R ₃ P, R ₂ S, RSH, RS ⁻ , I ⁻

Tableau 19 : Séparation des espèces chimiques

Toutefois d'autres paramètres sont à prendre en considération dans cette sélection comme par exemple la sélection par la charge des ions, la sélection par la taille de l'ion, la sélection en fonction de la nature des hétéroatomes des ligands et la sélection par la géométrie de coordination.

En conditions naturelles, plusieurs mécanismes opèrent très souvent conjointement et leurs études séparées n'est qu'une façon de faciliter la compréhension de ces mécanismes.

➤ *Sélection par la charge*

Dans des milieux aqueux aérés, les éléments de transition de la première série, du scandium jusqu'au fer, ont généralement un degré d'oxydation de +3. Les éléments du cobalt jusqu'au zinc ont un degré d'oxydation de +2. Les anions à faible charge se lient habituellement avec des cations fortement chargés. Les cations trivalents s'approprient des ligands comme R₂N⁻, RO⁻ et F⁻. Les ligands F⁻ ne participent pas dans les systèmes biologiques à la capture des cations. Les anions RN⁻, sont faiblement concentrés à pH = 7 (pKa de R₂NH est élevé). Les anions RO⁻, qui se trouvent en milieux biologiques sous formes d'hydroxamates, enolates, phenolates etc., conviennent à la capture de ligands trivalents (Fe³⁺, V³⁺, Mn³⁺). Les cations trivalents arrivent parfois à déloger les cations bivalents.

A l'intérieur des cellules, les ligands RS⁻ jouent un rôle important dans la fixation des cations trivalents. Il faut prendre en considération les phénomènes de compétitions des anions O²⁻ et S²⁻ qui conduisent à la formation des complexes polynucléaires ou des précipités.

➤ *Sélection par la taille des ions.*

La taille des ions mis en jeu dans des liaisons est un facteur de sélection très intéressant. Il dépend souvent du rapport z/r (si on ne tient pas compte d'autres facteurs comme la covalence de

la liaison, l'encombrement stérique etc.). La stabilité (qui peut être représentée par les séquences ci-dessous) des complexes des alcalins et des alcalino-terreux de mêmes valences varie en sens inverse des rayons atomiques des cations (Tableau 20) : $Li^+ > Na^+ > K^+ > Rb^+ > Cs^+$; $Be^{2+} > Mg^{2+} > Ca^{2+} > Sr^{2+} > Ba^{2+}$.

Ion	Li ⁺	Na ⁺	K ⁺	Rb ⁺	Cs ⁺	Be ²⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Sr ²⁺	Ba ²⁺
Rayon (Å)	0,6	0,95	1,33	1,48	1,69	0,4	0,65	1,00	1,13	1,35

Tableau 20 : Rayons ioniques de différents cations mono et divalents

La sélection par complexation basée sur la taille est largement utilisée pour des systèmes biologiques. Ainsi les métabolites synthétisés possèdent des cavités qui ne peuvent fixer que des cations particuliers avec des tailles spécifiques. Le magnésium par exemple est fixé plus facilement que le calcium par des ligands de type porphyrine (i.e chlorophylle) à cause de sa taille (Tableau 20).

➤ **Sélection en fonction de la nature des atomes des ligands**

Ce mécanisme est basé sur l'affinité des ions de la classe a pour les ligands à oxygène. Les cations de la classe b forment préférentiellement des liaisons avec des ligands à azote ou à soufre.

La stabilité des complexes de métaux de transition avec des ligands contenant des atomes donneurs d'électrons augmente avec la polarité des sites contenant ces hétéroatomes. La stabilité en fonction des hétéroatomes suit la séquence suivante :

Ligands (oxygène) < Ligands (azote) < Ligands (soufre)

La figure 57 illustre les constantes de stabilité d'une série de ligands avec des cations divalents.

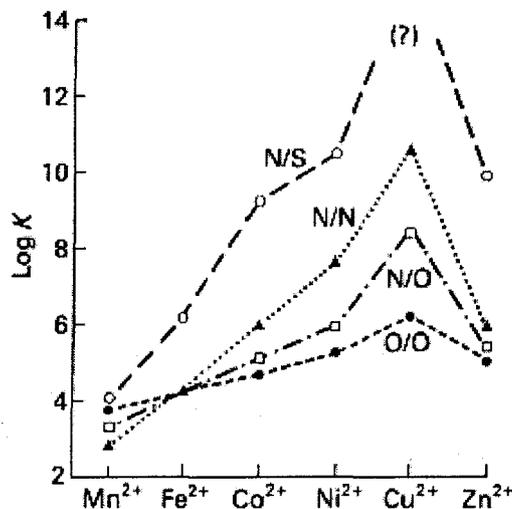


Fig. 57 : Courbes des constantes de stabilité des ions divalents avec différents ligands : (▲) éthylènediamine, (□) glycine, (○) cystéine, (●) oxalate (Frausto da Silva & Williams (2001))

Ce type de sélectivité dans des les milieux biologiques necessite le contrôle des concentrations du ligand et du metal.

➤ *Sélection en fonction de la géométrie de coordination*

Certains complexes ont des structures bien particulières et certains métaux préfèrent des géométries spécifiques. Le cuivre II possède une capacité élevée à former des liaisons stables (à pH = 7) avec l'azote des peptides. Ceci provient du fait que le cuivre forme surtout des complexes selon des géométries carrées (planes). Le zinc quant à lui, préfère des géométries tétrahédriques. La figure 58 montre trois conformations structurales du cuivre, zinc et du nickel avec l'ethylènediamine.

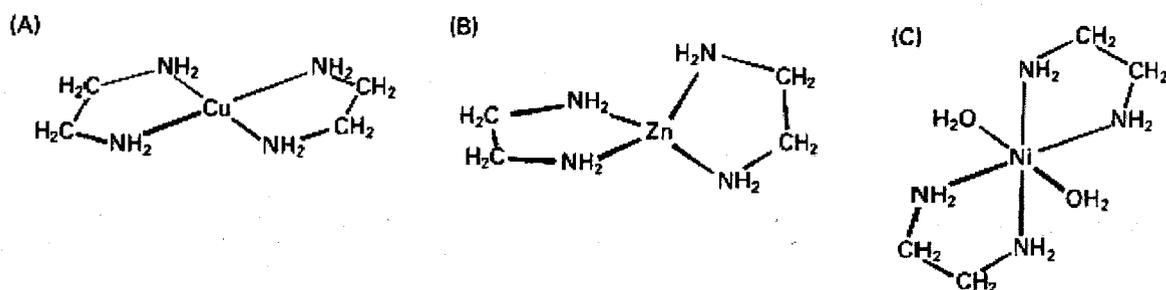


Fig. 58 : Conforations structurales de trois complexes de : A) bis-ethylènediamine de cuivre (tetragonal) ; B) bis-ethylènediamine de zinc (terahedrale) ; C) dihydro bis-ethylènediamine de nickel (octahedral)

D'autres exemples peuvent être évoqués dans cette sélection géométrique des ions trivalents, comme celui de Mn^{3+} et Fe^{3+} . Le premier préfère des sites carrés, alors que le second se trouve surtout dans des structures tétrahédriques ou octahédrique. (i.e superoxyde dismutase- Mn^{3+} (rouge), superoxyde dismutase- Fe^{3+} jaune).

D'autres facteurs sont mis en jeu dans la sélection des éléments dans les milieux biologiques comme la **sélection par les états de spin** : pour les éléments de transition, ce facteur permet d'accroître la sélectivité. Notons que le changement de l'état de spin affecte la taille de l'ion. Ainsi, on s'attend à ce que des ligands forts (contenant des atomes d'azote ou de soufre) se lient avec des cations à spin bas selon la séquence suivante : $Co^{3+} > Mn^{3+} > Fe^{3+}$. Les ligands RO^- se lient à des ions divalents à spin bas selon l'ordre suivant : $Fe^{2+} > Co^{2+} > Mn^{2+}$.

Sous certaines conditions, et dans le but de générer des fonction biologiques (ou chimiques spéciales), des sites qui ne sont pas vraiment spécifiques peuvent capturer des éléments parmi d'autres qui sont plus disponibles. Certaines espèces ont parfois recours à un **contrôle de la concentration de ligands ou de cations** pour favoriser la fixation d'autres éléments.

CHAPITRE III :

**IMPACTS DES METAUX LOURDS SUR LES VOIES DE
BIOSYNTHESE DES SUBSTANCES LICHENIQUES CHEZ LE
*DIPLOSCHISTES MUSCORUM***

L'étude des substances lichéniques a suscité beaucoup d'intérêt dans plusieurs domaines (voir chapitre I) et notamment en bioindication lichénique. Les investigations effectuées dans ce domaine sont très nombreuses et révèlent l'interaction de ces substances avec le milieu environnant. En effet, la présence des acides lichéniques au niveau extracellulaire constitue une première ligne de défense contre l'invasion des polluants atmosphériques et surtout celle des éléments traces métalliques. Ces substances possèdent des groupements capables de fixer les cations métalliques à l'extérieur des cellules et de diminuer leurs effets délétères. Pour comprendre l'impact des cations métalliques sur le métabolisme secondaire chez le *Diploschistes muscorum*, il a été nécessaire d'identifier les diverses substances produites par ce métabolisme. Compte tenu de la diversité des substances lichéniques étudiées, le protocole d'extraction successive basé sur des solvants de polarité croissante nous a permis d'isoler les grandes familles de molécules. Ainsi, l'identification des métabolites de chaque fraction est rendue facile par les techniques chromatographiques.

La séparation des acides lichéniques a été améliorée par le développement des techniques d'identification employées en se basant sur des méthodes standards en lichénologie. Grâce à ces méthodes, l'identification des composés synthétisés par le métabolisme secondaire est devenue rapide. Parmi les méthodes employées pour l'étude des métabolites secondaires, nous citons : le test de couleurs de Nylander (1866), la technique de microcristallisation développée par Asahina (1941) et la chromatographie sur papier (Wachtmeister (1952)

Les chromatographies sur couche mince (CCM) et liquide à haute performance (HPLC), incontournables en lichénologie, sont deux techniques de choix pour la détermination des acides lichéniques. Plusieurs méthodes standards, utilisant ces deux techniques, ont été développées (Culberson (1972), Culberson & Johnson (1972), Elix *et al* (1987 b), Feige *et al* (1993) et Yoshimura *et al* (1994)).

III.1 Protocole d'extraction des substances lichéniques

Du fait des différences de polarité et de solubilité des substances lichéniques (Huneck et Yoshimura (1996)) l'extraction successive nous a paru la plus judicieuse. Dans ce but le n-hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle, méthanol et le mélange méthanol-eau 20/80 sont utilisés pour couvrir un champ de polarité le plus large possible (Draoui *et al* (2002)). Les indices de polarité de ces solvants figurent sur le tableau 21. Ce mode d'extraction est largement décrit dans la bibliographie. Les solvants d'extraction quant à eux varient d'une publication à l'autre. Afin de pouvoir isoler des quantités suffisantes de substances lichéniques pour leur identification, nous avons réalisé une extraction à partir de quantités importantes de lichen (50 grammes du lichen métallifère et 14 grammes de Merlimont).

Solvants	n-Hexane	Dichlorométhane	Acétate d'éthyle	Méthanol	Eau
Indice de polarité	0	3,1	4,4	6,6	9

Tableau 21 : Indices de polarité des solvants utilisés pour l'extraction successive

Le lichen séché et broyé est mélangé à un volume d'hexane suffisant pour couvrir le lichen (le rapport liquide-solide est de 3 ml/g). Le filtrat est stocké à une température de 5°C à l'abri de la lumière. Cette opération permet d'extraire les cires et les huiles essentielles. La phase solide est soumise à une extraction par un solvant moyennement polaire, le dichlorométhane. Les molécules qu'on peut extraire par ce solvant sont des molécules polaires se trouvant à la surface du tissu végétal comme des acides triterpéniques et les molécules ayant un groupement hydroxyle méthylé. Au cours de la troisième opération, nous avons utilisé de l'acétate d'éthyle pour extraire des molécules moins polaires et des molécules avec un mono-sucre lié et dont la polarité est intermédiaire entre les extraits du dichlorométhane et le méthanol. Ce dernier est utilisé en vue d'extraire les hétérosides hydroxylés avec une chaîne osidique. Un mélange méthanol-eau 20/80 est employé pour extraire des molécules solubles dans l'eau. Après élimination du méthanol par évaporation, la solution est traitée à nouveau par l'acétate d'éthyle. Le protocole d'extraction successive est schématisé sur la figure 59.

Le rendement d'extraction global est de 12,4 %. Le rendement de la fraction extraite par le dichlorométhane a atteint 5 %. Cette fraction, contenant des métabolites secondaires déposés sur le tissu végétal, se prêtera mieux au travail lichénochimique visant à isoler les produits lichéniques en quantité suffisante pour l'identification.

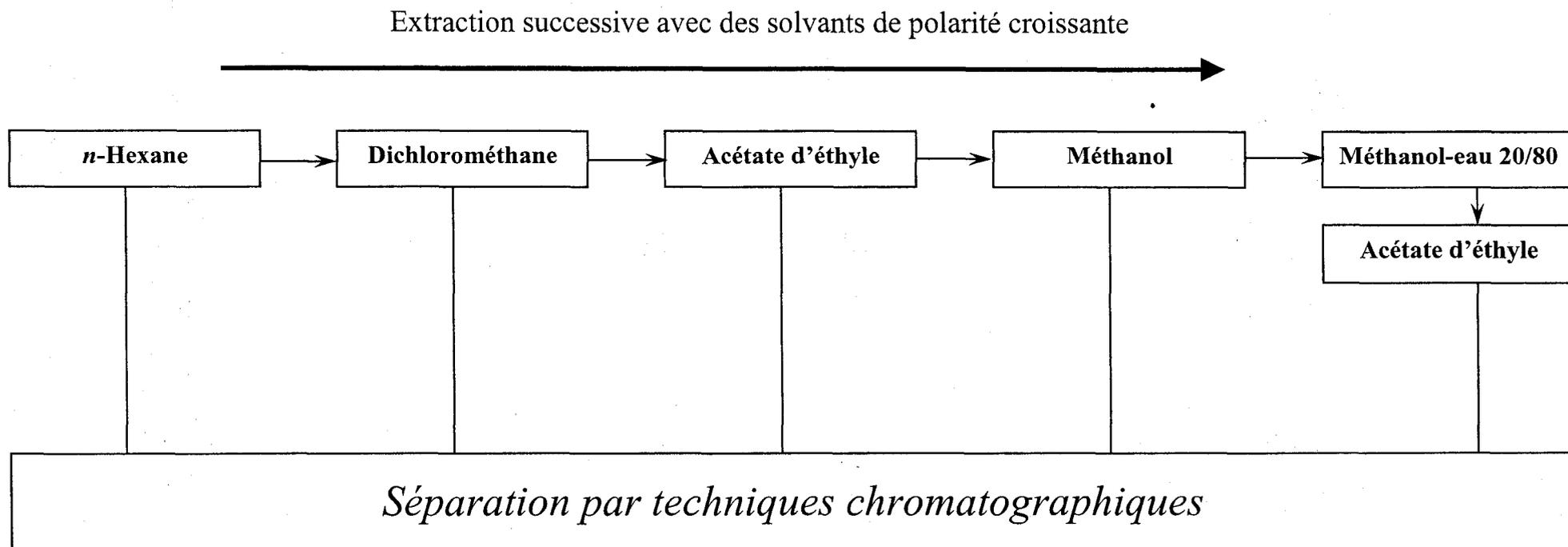


Fig. 59: Schéma du protocole d'extraction successive (Draoui *et al* (2002))

III.2 Stress chimique et perturbation du métabolisme secondaire chez le *Diploschistes muscorum*

III.2.1 Chromatographie sur couche mince

III.2.1.1 Description de la technique

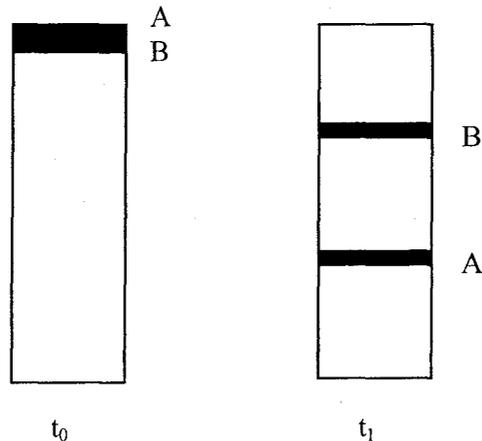
Les méthodes chromatographiques sont des méthodes de séparation mettant en jeu différents processus physicochimiques. L'origine de l'efficacité des techniques chromatographiques réside incontestablement dans le fait que les constituants du mélange à résoudre entrent dans une suite continue d'un nombre considérable d'équilibres entre deux phases :

- L'une fixe, appelée phase stationnaire,
- L'autre dite mobile qui parcourt la première avec une vitesse déterminée,

Il en résulte que chaque constituant du mélange s'équilibre entre les deux phases et se trouve finalement entraîné par la phase mobile avec une vitesse qui lui est propre.

En conséquence, si le temps de migration de la phase mobile est déterminé, chaque constituant du mélange parcourt une certaine distance sur la phase stationnaire du fait de sa vitesse propre. Dans ces conditions, on parle de **chromatographie de développement**.

Dépôt du mélange A+B :



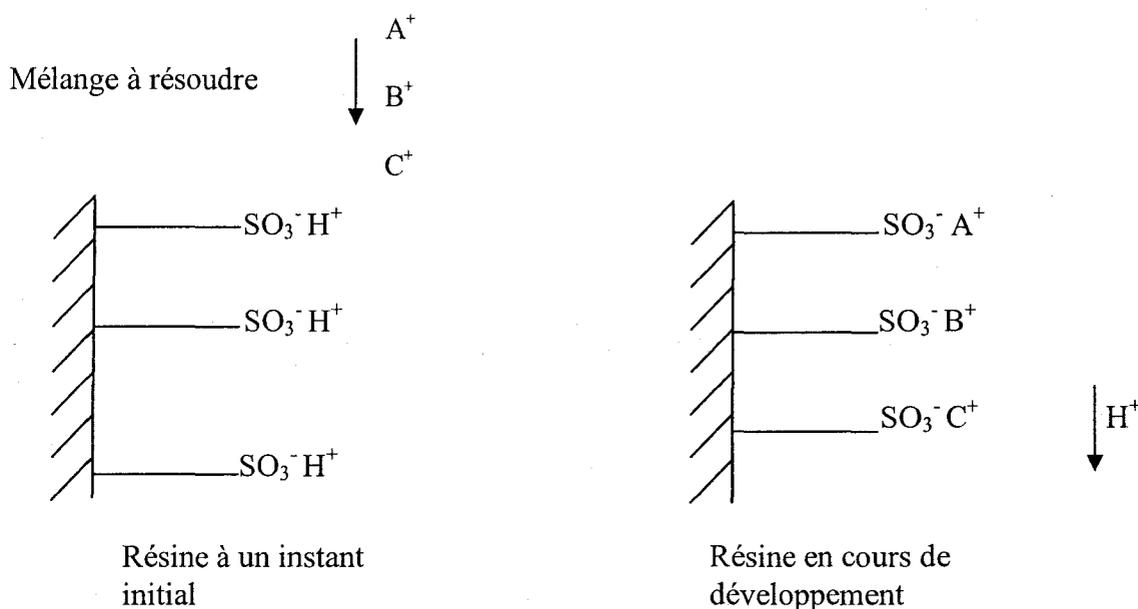
L'autre alternative consiste à fixer la distance de migration, par exemple toute la longueur d'une colonne remplie de phase stationnaire. Il en résulte, alors, des temps de sortie différents pour chacun des composés. Ce deuxième procédé, appelé **chromatographie d'éluion**, est le plus utilisé à l'heure actuelle.

Les chromatographies sont classées en fonction des phénomènes physicochimiques qui sont à la base de la séparation.

- 1- Chromatographie de partage : le phénomène repose sur le fait que deux corps ne se partagent pas de façon identique entre deux phases. Après équilibre, les rapports de leur

solubilité dans les deux phases c'est-à-dire leurs coefficients de partage ne sont pas égaux.

- 2- Chromatographie d'absorption : l'absorption est due à des forces de cohésion notamment aux forces de Van der Waals et aux interactions polaires. Elles ne sont pas spécifiques et leur nature précise est rarement connue.
- 3- Chromatographie d'échange d'ions : dans ce cas la phase stationnaire a des propriétés d'échangeurs d'ions, c'est une macromolécule ou une résine portant des groupements fonctionnels acides ou basiques qui permettent l'échange de certains de leurs ions avec ceux de même signe contenus dans le mélange à chromatographier.



La phase mobile est une solution aqueuse de sels d'acides ou de bases. Les coefficients de répartition entre phases sont dans ce cas, appelés coefficients d'échange d'ions.

- 4- Chromatographie d'exclusion-diffusion : la phase stationnaire est un gel ou un réseau macromoléculaire exerçant un véritable effet de tamis vis-à-vis de grosses molécules, celles-ci migrent plus vite que les molécules de faibles masses moléculaires qui peuvent diffuser librement dans la phase stationnaire alors que les premières ne le peuvent pas.
- 5- Chromatographie par formation de paires d'ions : ce type de chromatographie permet la séparation d'ions ou d'entités ionisables. La phase stationnaire contient un ion de charge opposée à ceux que l'on veut séparer, ces derniers donnent ensuite avec le précédent ion une paire d'ions qui passe dans la phase mobile. De nature différente, les solutés à séparer donnant des paires d'ions, n'ont pas les mêmes caractéristiques d'extractibilité.
- 6- Chromatographie d'affinité : c'est une chromatographie qui met à profit des interactions spécifiques et réversibles entre la substance à analyser et des composés spécifiques (ou ligand) le plus souvent de nature protéique. Les interactions résultent du fait que les

composés à résoudre et les ligands ont des structures complémentaires du point de vue stérique et présentent de plus des interactions électrostatiques

En réalité une chromatographie ne résulte pas d'un seul procédé physicochimique ; à l'effet principal s'ajoutent d'autres phénomènes secondaires qui peuvent améliorer ou diminuer les performances de la chromatographie. Par exemple, en chromatographie de partage liquide-liquide, lorsqu'on utilise comme support inerte la silice, il y a superposition de l'effet d'absorption sur la silice qu'on ne peut annuler totalement et de l'effet de partage.

III.2.1.1.1 Séparation par chromatographie sur couche mince (CCM)

La séparation par chromatographie sur couche mince CCM est réalisée sur une plaque de verre (ou d'aluminium, de polymère ou sur baguette de quartz) recouverte d'une fine couche de phase stationnaire ; les substances à séparer sont déposées à la surface de ce film solide. On plonge l'extrémité inférieure de la plaque dans une cuve, contenant le solvant de migration.

Suivant la nature des phases stationnaires et mobiles, la séparation est due :

- soit à un phénomène d'absorption,
- soit à un phénomène de partage,
- ou à la superposition des deux phénomènes.

III.2.1.1.2 Notion de Rf

Chacun des constituants migre avec une vitesse qui dépend de son coefficient de partage. A la fin de l'opération et après révélation, chaque substance se présente sous forme d'un spot en principe circulaire et symétrique. On introduit la notion de Rf (*Rat of Flow*) par la relation suivante :

$$Rf = \frac{\text{Distance parcourue par la substance}}{\text{Distance parcourue par le front de solvant}}$$

Les distances sont mesurées à partir du centre du dépôt initial du mélange jusqu'au centre du spot de la substance après migration.

III.2.1.1.3 Appareillage

De nombreuses substances peuvent être utilisées comme phases stationnaires polaires :

- silice (absorption-partage),
- alumine (absorption-partage),
- poudre de cellulose (partage),
- terre siliceuse de diatomées (Kieselguhr) (absorption-partage),
- diéthylaminoéthylcellulose (échange d'ions),

- polyamide (partage).

Comme phases stationnaires peu polaires, on utilise des silices greffées :

- alkyle (C2, C8, C18) (partage),
- diphényle (partage),

ou des celluloses acétylées 10, 20, 30, 40 % (partage) ;

ou même des phases stationnaires chirales :

- silices greffées C18 imprégnées d'un sélecteur chiral ou des silices imprégnées de cyclodextrines (cavités à spécificité chirale),
- cellulose modifiée.

Les caractéristiques technologiques de ces phases dépendent du type de chromatographie sur couche mince ou haute performance HPTLC (*High Performance Thin Layer Chromathography*).

En HPTLC le diamètre moyen des grains a une distribution homogène qui améliore la sensibilité de la méthode. Le tableau 22 illustre les caractéristiques des plaques utilisées pour les deux techniques.

	CCM ordinaire	CCM haute performance : HPTLC
Diamètre moyen des grains	10 à 30 μm	3 à 10 μm
Epaisseur de la couche active	250 μm	100 à 200 μm
Homogénéité des grains	Distribution assez large du diamètre des grains.	- Distribution étroite - Grains sphériques
Distances de migration maximales sur la plaque	12 à 15 cm	5 à 7 cm

Tableau 22 : caractéristiques des plaques CCM ordinaire et HPTLC

Il existe deux méthodes de développement des plaques CCM :

- Par capillarité : on peut développer les plaques en cuve classique en mode vertical ou horizontal ou en cuve automatique où l'on définit au préalable la distance de migration, la température de séchage et la possibilité de réaliser des gradients d'éluion c'est-à-dire des distances de plus en plus grandes à chaque étape (le développement étant réalisé en plusieurs étapes).

Cette technique améliore la reproductibilité des Rf.

- Par la méthode en flux forcé : c'est une approche technologique particulière de la chromatographie, en effet si les mécanismes de séparation sont identiques, le mode de circulation de la phase mobile est différent.
- la couche mince est pressurisée, le solvant est poussé sous pression (<50 bars) dans la phase stationnaire ; la technique est surtout utilisée pour les plaques HPTLC dont la

faible granulométrie diminue la vitesse de la phase mobile et limite l'usage des procédés par capillarité,

- la chromatographie planaire circulaire et anti-circulaire. La technique utilise une force centrifuge. Elle est recommandée pour la chromatographie dont le développement dans des conditions normales donne un Rf proche de 0.

III.2.1.1.4 Détection

La détection se fait par deux méthodes : la détection visuelle et la détection instrumentale. On distingue trois types de détections visuelles :

- 1- Détection chimique : directe pour les composés colorés et par pulvérisation d'un réactif capable de réagir avec les molécules séparées pour donner des substances colorées ou fluorescentes.
- 2- Détection physique : sous lumière UV à 254 nm sur une phase stationnaire imprégnée d'un indicateur de fluorescence. Le composé absorbe les photons incidents et inhibe la fluorescence émise par l'indicateur présent dans la phase stationnaire. L'observation se fait aussi à 366 nm sur une phase stationnaire dépourvue d'indicateur de fluorescence. Les molécules naturellement fluorescentes (ou qui l'ont été rendues par réactions chimiques) sont détectables par fluorescence directe.
- 3- Détection biologique : après mise en œuvre de réactions antigène-anticorps.

La détection instrumentale fait appel à des détecteurs et permet une identification et une quantification plus précises que la détection visuelle. On utilise trois types de détecteurs :

- 1- des détecteurs densitométriques (Fig. 60) : photodensitomètres-scanner qui permettent la mesure de la lumière absorbée ou réfléchiée lors de la lecture des taches dans le domaine de l'UV ou du visible,

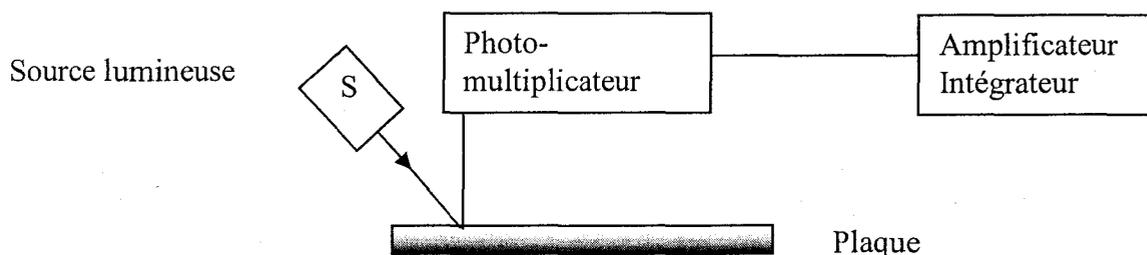


Fig. 60: Schéma de base d'un détecteur photodensitométrique

- 2- des détecteurs par spectrométrie de masse après remise en solution de la tache,
- 3- des capteurs de radio-isotopes.

III.2.1.2 Choix de la phase mobile

La composition des différentes fractions obtenues au cours des séparations peut être comparée par la CCM. Pour ce faire, nous avons utilisé des plaques en phase normale, gel de silice 60 F₂₅₄, couche 0,2 mm (Merck), et des plaques en phase inverse, RP 18 F_{254s}, couche 0,15 mm (Merck).

Afin d'optimiser la séparation, nous avons testé de nombreux systèmes de solvant (proportion données V/V) notamment :

- Dichlorométhane 100 % ;
- Ether 100 % ;
- Ether de pétrole/éther : 6/4 ;
- Ether de pétrole/éther : 5/5 ;
- Ether de pétrole/éther : 4/6 ;
- Toluène/dioxane/acide acétique : 27/7/1
- Toluène/dioxane : 16/4
- Toluène/acide acétique : 32/3
- Acétate d'éthyle/toluène/méthanol/eau : 10/30/7/0,6
- Acétate d'éthyle/toluène : 7,6/40
- Acétate d'éthyle/toluène/méthanol : 12/34/1,6

III.2.1.3 Révélation

Après évaporation des solvants, une observation systématique des chromatogrammes est faite en lumière visible, ainsi que sous UV, à deux longueurs d'onde différentes (254 et 366 nm). Les taches sont révélées également grâce à une pulvérisation d'une solution aqueuse d'H₂SO₄ à 10 % suivie d'un chauffage au four à environ 120°C pendant 15-30 minutes (White & James (1985)).

III.2.1.4 Résultats

La séparation par CCM des différentes fractions a été réalisée sur une plaque phase normale avec le système de solvant éther de pétrole/éther 4/6 (V/V) sur le *Diploschistes muscorum* récolté sur le site métallifère d'Auby. La figure 61 montre la distribution des spots sur une plaque phase normale des différents extraits avec le mélange éluant éther de pétrole/éther.

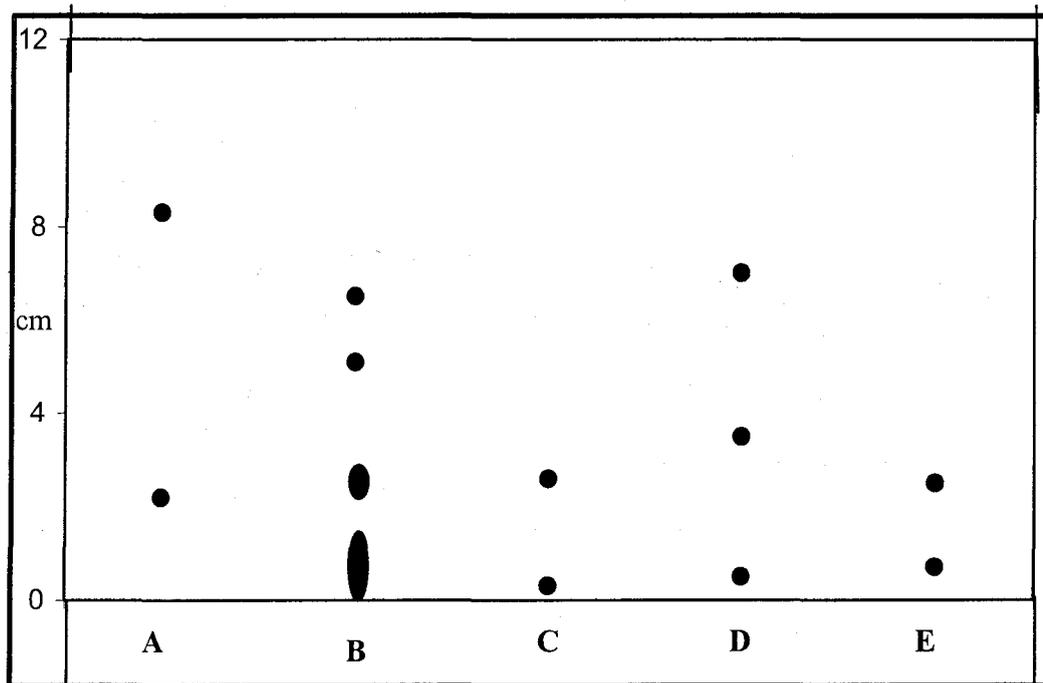


Fig. 61 : CCM dans l'éther de pétrole/éther 4/6 (V/V) sur une plaque phase normale révélée par UV à 254 nm des fractions A : extrait au n-hexane ; B : extrait au dichlorométhane ; C : extrait à l'acétate d'éthyle ; D : extrait au méthanol ; E : extrait méthanol-eau 20/80, extraits successifs du *Diplochistes muscorum* récolté sur le site d'Auby

Les résultats présentés sur la figure 61 nous permettent de constater d'une part, l'efficacité du protocole d'extraction et d'autre part la différence de composition chimique entre les différentes fractions. L'extrait (B) au dichlorométhane contient davantage de spots par rapport aux autres extraits. De ce fait, et compte tenu du pouvoir extractif de ce solvant qui coïncide avec la position des métabolites secondaires au sein du thalle lichénique, nous nous sommes intéressés particulièrement à cet extrait. En outre, la quantité extraite par ce solvant permet d'envisager une séparation des métabolites de cette fraction et de les identifier.

Nous avons essayé par la suite d'optimiser la séparation du même extrait (B) (dichlorométhane) sur deux plaques de polarités différentes. La figure 62 montre la distribution des spots sur deux plaques de polarités opposées de l'extrait au dichlorométhane du lichen d'Auby.

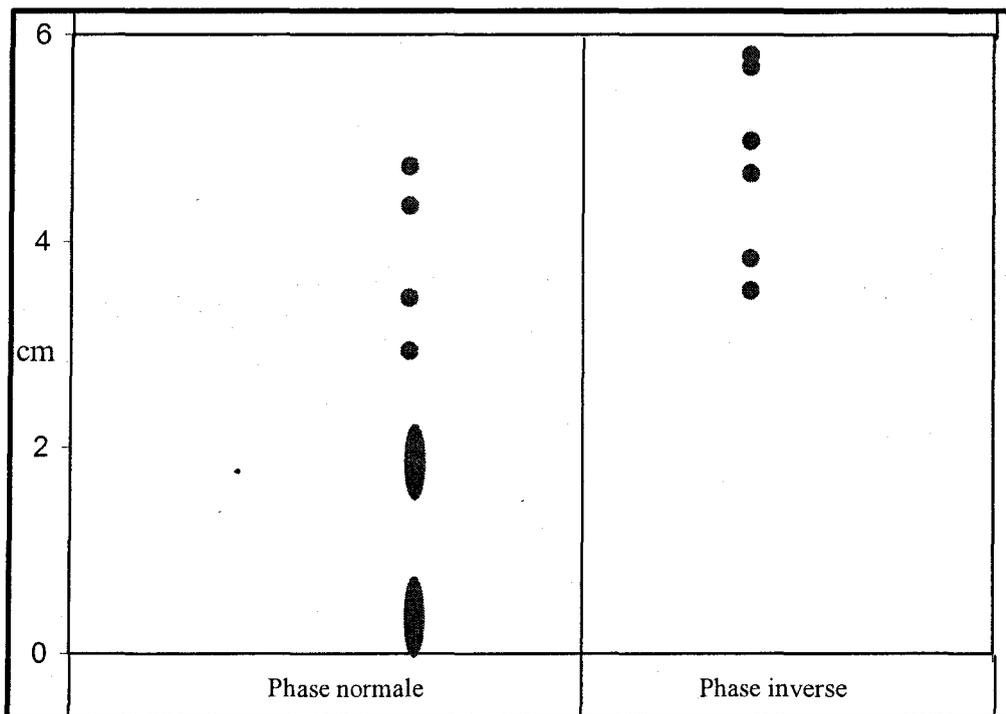


Fig. 62: Distribution des spots de l'extrait (B) au dichlorométhane du lichen d'Auby sur deux plaques de polarités différentes ; élution dans le mélange toluène\dioxane\acide acétique : 27/7/1 (V/V)

On remarque que l'élution des composés de l'extrait au dichlorométhane sur une plaque phase inverse est plus rapide par rapport à celle réalisée sur une plaque phase normale (Fig. 62). Sur cette dernière, deux composés présentent des difficultés de migration. Quant à la séparation sur des plaques phase inverse, elle présente l'inconvénient des distances très proches séparant les différents spots.

Nous avons tenté par la suite d'améliorer les conditions de séparation sur des plaques phase inverse en changeant le mélange éluant. Les résultats optimums ont été observés avec un mélange mis au point par Cuny (1999). Il s'agit de l'acétate d'éthyle/toluène/méthanol/eau : 10/30/7/0,6 (V/V). La distribution des spots de l'extrait au dichlorométhane des lichens d'Auby et de Merlimont est présentée dans la figure 63.



Fig. 63 : Distribution des spots de l'extrait au dichlorométhane du lichen d'Auby et ceux de Merlimont sur une plaque phase inverse ; élution dans le mélange : acétate d'éthyle/toluène/méthanol/eau : 10/30/7/0,6 (V/V)

Ces résultats montrent une différence de composition des extraits au dichlorométhane des deux lichens. Cependant les Rf des différents spots sont encore voisins. Il faut noter aussi l'absence de certains composés par rapport aux résultats enregistrés auparavant avec le mélange éluant toluène\dioxane\acide acétique : 27/7/1 (V/V) (Fig. 62). Il se peut que des spots de composés de polarités voisines soient superposés. Ceci laisse supposer des difficultés de projection de cette séparation à grande échelle par la chromatographie sur colonne ouverte.

III.2.2 Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

III.2.2.1 Principe

La chromatographie liquide à haute performance est une technique moderne parmi les méthodes chromatographiques dont les intitulés sont rassemblés sous le vocable général de chromatographie liquide sur colonne, qui, quel que soit le phénomène physique invoqué (adsorption, partage, échange d'ion...), est assez peu utilisée en raison de la teneur des séparations et de l'absence de détection aisée et rapide.

La mise au point des phases stationnaires de granulométrie fine et homogène a permis d'améliorer l'efficacité de la chromatographie (qui est inversement proportionnelle au carré du diamètre des particules des phases stationnaires) et d'accélérer considérablement la vitesse d'analyse. De plus le couplage à la colonne de chromatographie de détecteurs fonctionnant selon plusieurs principes a permis de simplifier les manipulations.

III.2.2.2 Conditions d'analyse

L'idéal est d'obtenir une résolution élevée en un temps très court et sans perte de charge prohibitive. Cette dernière est définie comme étant la différence de pression entre l'entrée et la sortie de la colonne. Cette perte de charge est donnée par la loi de Darcy.

$$\Delta P = \frac{\eta L V}{K^{\circ}}$$

ΔP représente le perte de charge en barye (1barye = 10^{-1} Pascal),

η viscosité de la phase mobile en poises,

L longueur de la colonne en cm,

V vitesse linéaire de la phase mobile en cm^{-1} ,

K° constante de perméabilité de la colonne en cm^2 .

Ces différentes exigences (résolution élevée, durée d'analyse courte et perte de charge faible) sont contradictoires et les conditions choisies résultent le plus souvent d'un compromis entre ces différents paramètres. Dans le cas d'une résolution trop faible on peut accroître l'efficacité en augmentant la longueur de la colonne. Mais alors, la durée d'analyse augmente ainsi que la perte de charge. On peut aussi diminuer le diamètre des particules mais dans ce cas la perte de charge augmente fortement. Dans le cas d'une chromatographie trop longue, on peut diminuer la durée d'analyse en augmentant la vitesse de la phase mobile mais la perte de charge augmente.

D'un point de vue pratique, l'optimisation d'une analyse par HPLC est difficile à réaliser en raison des multiples paramètres sur lesquels il est possible d'intervenir. On choisira d'abord les conditions chimiques de la séparation telles que la nature et la composition chimique de l'éluant.

III.2.2.3 Appareillage

Le schéma (Fig. 64) présente les différentes composantes d'un appareil de chromatographie liquide à haute performance. L'appareil est constitué de réservoirs de solvants, d'une pompe, d'un appareil pour gradient d'élution, d'injecteurs, d'une colonne et d'un détecteur.

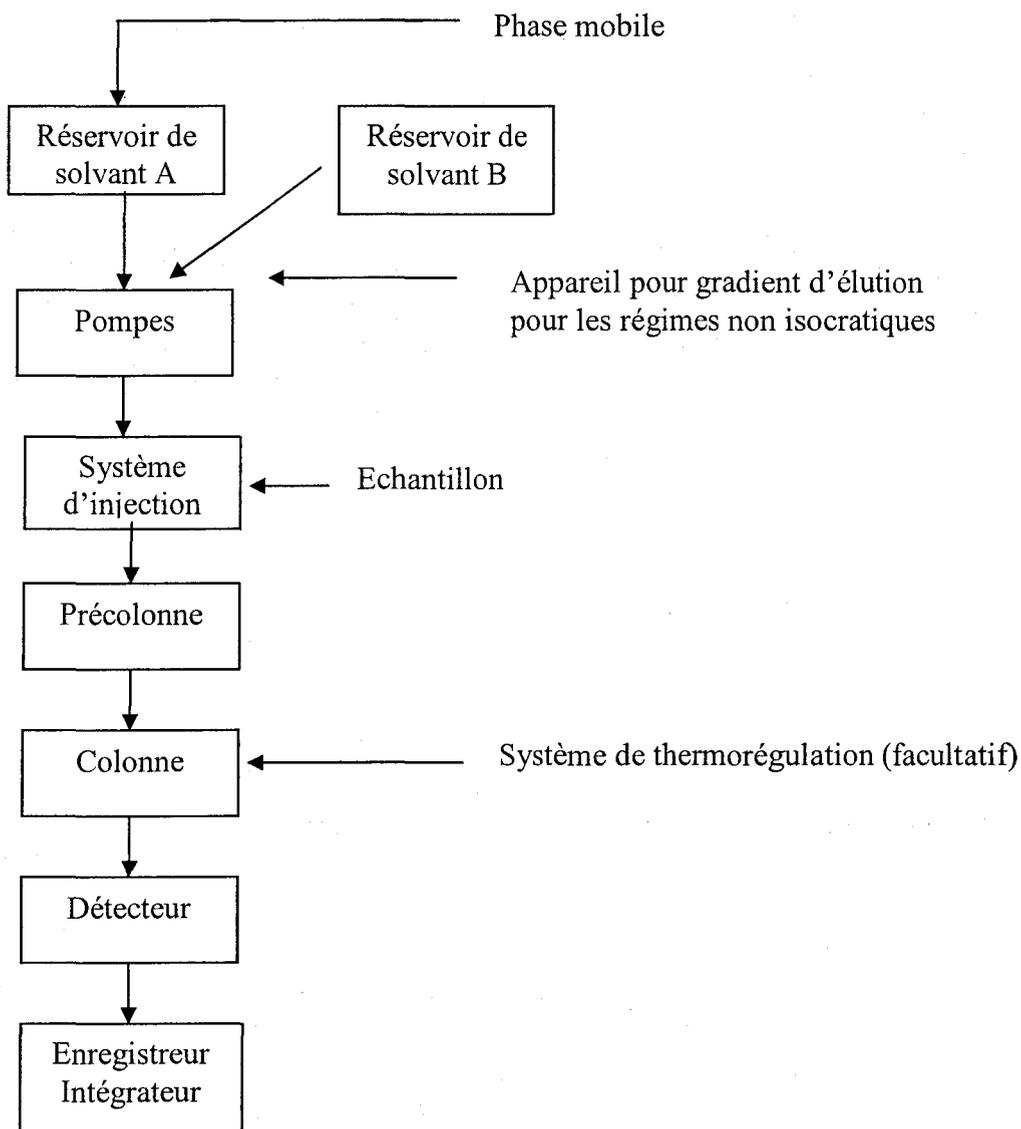


Fig. 64 : Schéma général d'un appareil de chromatographie liquide à haute performance

- 1- **Pompes** : elles doivent permettre à la fois de surmonter la perte de charge supérieure 350 bars et d'obtenir un débit suffisant jusqu'à 10 ml min^{-1} pour les chromatographies à grande vitesse avec des bonnes exactitudes et reproductibilité. Actuellement on utilise les pompes dites seringues où la phase mobile est poussée par un piston qui se déplace à une vitesse constante et les pompes à piston à mouvement alternatif. Les pompes maintiennent un débit constant quelle que soit la pression. Toutefois il est possible de travailler avec un débit variable pour améliorer la séparation d'un mélange.
- 2- **Appareil pour gradient d'élution** : il permet de programmer et de changer la composition de la phase mobile au cours d'une analyse. Le procédé est intéressant pour la séparation de mélanges complexes.
- 3- **Injecteurs** : on distingue deux types d'injecteurs :

- i) l'injecteur à dépôt direct : il est réalisé par injection à l'aide d'une seringue au centre de la colonne à travers un septum. Actuellement, ce système n'est plus utilisé en raison d'une faible reproductibilité.
- ii) la vanne à boucle d'échantillonnage : c'est le système actuellement le plus utilisé. La quantité injectée est très reproductible (volumes injectés entre 10 μ l et 100 μ l). Le système peut être éventuellement automatisé.
- 4- **Colonnes** : elles sont souvent en acier inoxydable ou en verre. Le diamètre intérieur varie de quelques mm à quelques cm. Leur longueur moyenne est de l'ordre de 20 cm (5 à 30 cm). Des microcolonnes capillaires de 3 à 25 cm de longueur et de 0,3 ; 0,5 ou 1 mm de diamètre intérieur sont commercialisées pour simplifier l'interfaçage des systèmes HPLC avec les spectromètres de masse.
- 5- **Détecteurs** : c'est un élément essentiel d'un système de chromatographie HPLC puisqu'il permet de suivre en continu la séparation et de mesurer la concentration instantanée du soluté, il doit être fidèle, sensible, stable, linéaire et de plus présenter un faible temps de réponse, un faible volume mort (volume de la cellule de mesure doit être le plus faible possible) et être exploitable avec un gradient de solvant d'élution.

Les détecteurs à absorptiomètre dans l'UV-visible sont les plus couramment utilisés. Les limites de ce système sont les absorptions propres du solvant et du soluté ; la réponse dépend essentiellement du coefficient d'absorption molaire du soluté ; dans le cas le plus favorable, la quantité minimale détectable est de l'ordre du nanogramme. La réponse du détecteur suit la loi de Beer-Lambert. Il existe plusieurs types d'appareils :

- à longueur d'onde fixe : $\lambda = 254$ nm
- à longueur d'onde variable de 200 à 700 nm
- à barrette de diodes : qui donne la valeur simultanée des intensités lumineuses sur tout le spectre ; on obtient un chromatogramme en trois dimensions.

D'autres détecteurs sont utilisés, comme par exemple les réfractomètres différentiels qui mesurent en continu la différence d'indice de réfraction entre la phase mobile et l'effluent de la colonne, ou encore les fluorimètres qui détectent l'échantillon par fluorescence. Citons, en particulier, comme agent de dérivatisation apportant des supports fluorescents, l'orthophtalaldéhyde et les dérivés dansylés. Des détecteurs électrochimiques sont destinés aux solutés qui sont électroactifs : dérivés nitrés, hydroquinones, amines aromatiques, phénols...etc. la phase éluante doit contenir des électrolytes pour assurer le passage du courant.

III.2.2.4 Spectre d'absorption

Les spectromètres UV/Visible permettent d'obtenir le spectre des composés examinés sous la forme d'un tracé de la transmittance ou de l'absorbance en fonction des longueurs d'ondes repérées en nm.

Afin d'observer une transition électronique, soit dans l'UV soit dans le visible, il faut que la molécule possède des électrons facilement excitables par le rayonnement : il s'agit le plus souvent de molécules organiques insaturées ou d'espèces inorganiques possédant des électrons dans des orbitales d. Les transitions observées, pour les composés les plus courants de la chimie organique, ont pour origine les électrons engagés dans les transitions s ou p et les doublets non liants n des atomes N et O (Fig. 65).

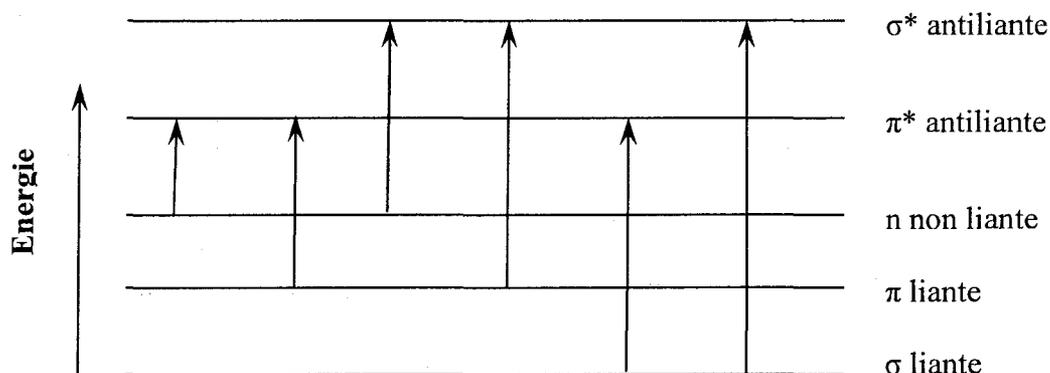


Fig. 65 : Schéma des transitions électroniques entre les différents orbitales moléculaires

Les groupes fonctionnels des composés organiques (cétones, amines, dérivés nitrés...etc.) absorbent dans le domaine de l'UV et le visible. Ils sont appelés (chromophores). Le tableau 23 présente les longueurs d'onde maximale d'absorption (λ_{\max}) de certains groupes fonctionnels.

Chromophore		λ_{\max} (nm)
Nitrite	NO_2^-	230
Ether	-O-	185
Amine	$-\text{NH}_2$	195
Oxime	$-\text{NOH}$	190
Diènes Conjugués	$-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}-$	210-230
Carboxylique	$-\text{COOH}$	205
Nitro	NO_2	210 et 270
Nitrate	NO_3^-	300
Cétone	$>\text{C}=\text{O}$	195 et 280

Tableau 23 : Longueurs d'onde d'absorption maximale de certains chromophores

III.2.2.5 Programme d'élution

L'intérêt qu'a suscité cette technique en lichénologie, provient de son utilisation pour des métabolites qui ne sont pas suffisamment volatiles pour être analysés par chromatographie en phase gazeuse et l'instabilité de certains composés à haute température. Un autre avantage de cette technique est sa sensibilité élevée par rapport à la chromatographie sur couche mince. Plusieurs auteurs ont travaillé sur l'utilisation et le développement de méthodes capables de séparer le plus grand nombre de métabolites possibles (Culberson C.F. (1972) ; Culberson C.F. & Ahmadjian (1980)). Huovinen *et al* (1982, 1985)) et Huovinen (1986, 1987) ont décrit une méthode standard pour des lichens du genre *Cladonia*. Finalement, Feige *et al* (1993) ont mis au point une méthode standard pour l'identification des composés lichéniques. Ces auteurs ont identifié plus de 300 substances lichéniques.

Au cours de ce travail nous avons utilisé le programme d'élution établi par Feige *et al* (1993). La colonne mise en œuvre est une colonne Spherisorb 5 ODS (Alltech), de longueur 250 mm, de diamètre 4,5 mm et le diamètre des grains est de 4,5 μ m. Le mélange d'élution est constitué par le mélange : méthanol-eau contenant 1 % d'acide *o*-phosphorique. Le programme d'élution dure 70 minutes. Le tableau ci-après donne l'évolution des pourcentages méthanol-eau (phase mobile) en fonction du temps.

<i>Méthanol</i>	<i>Eau</i>	<i>Temps en minutes</i>	<i>Débit en ml/minutes</i>
30 %	70 %	0	0,7
70 %	30 %	14	0,7
99 %	1 %	44	0,7
99 %	1 %	61	0,7
30 %	70 %	70	0,7

Tableau 24 : Evolution de la composition de solvants de la phase mobile en fonction du temps

L'appareil utilisé au cours de ce travail est un appareil Varian ProStar muni d'un détecteur UV à barrette de diodes DAD (*Diode Array Detector*) (modèle 330) qui balaye une zone de 190 à 800 nm ; un passeur d'échantillon automatique (modèle 410) et un système de pompage (modèle 230)

III.2.2.6 Calcul des indices de rétention I_r

Les indices de rétention sont calculés à partir de deux standards internes injectés avec l'échantillon à analyser, il s'agit de l'acide benzoïque et l'acide solorinique (Fig. 66) extrait du lichen *solorina crocea*.

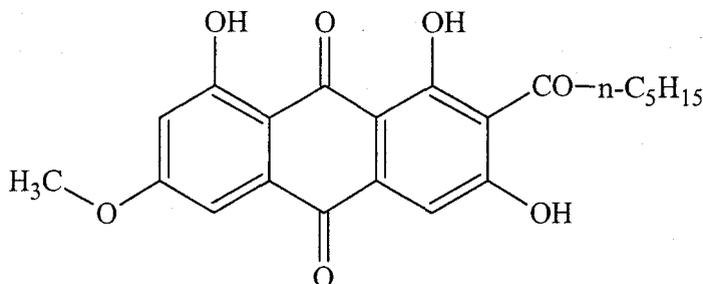


Fig. 66 : Acide solorinique

L'usage des standards internes permet de corriger les déplacements des temps de rétention et de comparer les valeurs des indices de rétention obtenus avec des colonnes ayant des historiques différents. Cet indice est calculé selon la formule suivante :

$$I_r = \frac{t_r \text{ du pic} - t_r \text{ de l'acide benzoïque}}{t_r \text{ de l'acide solorinique}} \times 100 \quad (\text{EQ. 18})$$

avec t_r temps de rétention

L'acide benzoïque est utilisé comme standard interne car il élué rapidement. L'acide solorinique quant à lui est utilisé en vue de son caractère hydrophobe (élution très lente) (Huovinen *et al* (1985)).

III.2.2.7 Résultats

Les chromatogrammes obtenus sur l'extrait au dichlorométhane du lichen d'Auby et celui de Merlimont sont donnés dans la figure 67. La reproductibilité de ces résultats est stable en fonction du temps ; les chromatogrammes enregistrés après 1 ; 6 et 12 mois de stockage de l'extrait au dichlorométhane à l'abri de la lumière et à une température inférieure à 5°C sont identiques.

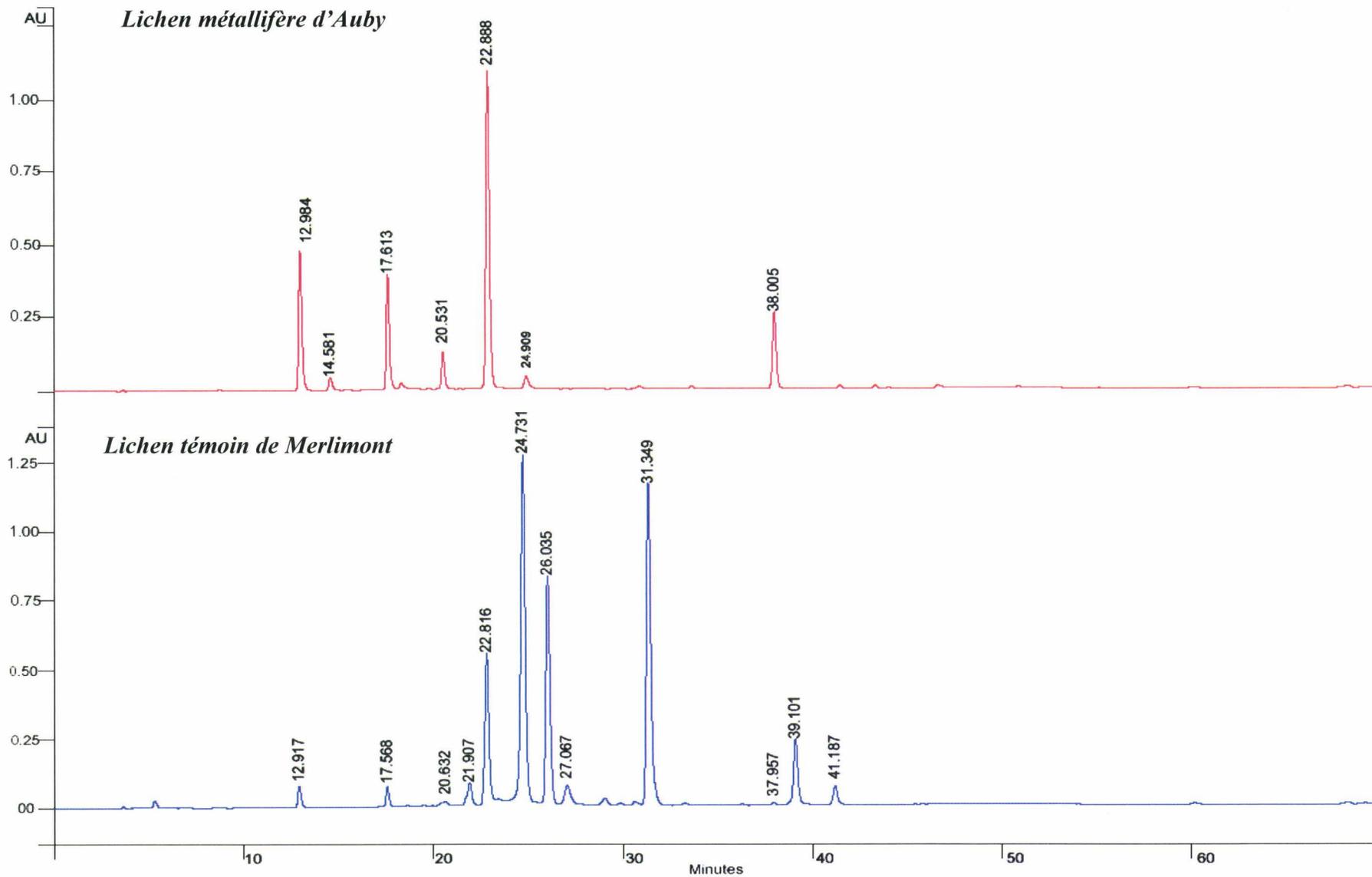


Fig. 67 : Chromatogrammes de l'extrait au dichlorométhane du lichen métallifère et du lichen témoin

Les chromatogrammes confirment les résultats obtenus par chromatographie sur couche mince (phase inverse). Les constituants chimiques des deux lichens ne sont pas les mêmes. Néanmoins, certains composés sont présents dans les deux lichens mais à des concentrations variables. Ainsi les composés possédant un temps de rétention (t_r) de 12,9 minutes, 17,6 minutes, 20,5 minutes, 22,8 minutes et 38 minutes sont très concentrés dans le lichen métallifère par rapport au lichen témoin. À l'inverse, le composé à $t_r = 24,9$ minutes est très concentré dans le lichen témoin par rapport à celui d'Auby.

D'autres composés (comme ceux possédant des t_r de 21,9 minutes, 26 minutes, 27 minutes, 31 minutes, 39,1 minutes et 41,1 minutes) sont totalement absents dans le lichen métallifère.

L'identification de ces différents composés a été effectuée par comparaison des indices de rétention expérimentaux et théoriques (donnés par Fiege *et al* (1993)). Le tableau récapitulatif (Tableau 25) ci-après regroupe les temps de rétention, les indices de rétention expérimentaux et théoriques ainsi que la nature de chaque composé. Les structures de ces composés sont données dans le tableau 26.

	t_r en minutes	Ir exp	Ir théo	Acides lichéniques	Natures des composés
Lichen témoin (Merlimont)	12,91	-2,45	-2	Acide orsellinique	monocyclique
	17,56	5,30	5	Méthyl-orsellinate	monocyclique
	20,63	10,42	10	Acide diploschitésique	Depside
	21,9	12,53	13	Acide 2'-O-déméthyl-psoromique	Depsidone
	22,81	14,05	14	Acide lécanorique	Depside
	24,73	17,25	17	Acide fumarprotocétrarique	Depsidone
	26,03	19,42	18	Orcinyl-lécanorate	Depside
	27,06	21,13	20	Acide psoromique	Depsidone
	31,34	28,27	28	Acide 4-O méthyl hypoprotocétrarique	Depsidone
	38	39,37	37	Acide barbatique	Depside
	39,11	41,22	38	Atranorine	Depside
	41,18	44,67	42	Chloroatranorine	Depside
Lichen métallifère (Auby)	12,98	-2,33	-2	Acide orsellinique	monocyclique
	17,58	5,33	5	Méthyl-orsellinate	monocyclique
	20,53	10,25	10	Acide diploschitésique	Depside
	22,88	14,17	14	Acide lécanorique	Depside
	24,9	17,53	17	Acide fumarprotocétrarique	Depsidone
	38	39,37	37	Acide barbatique	Depside

Tableau 25 : Temps de rétention (t_r) et indices de rétention expérimentaux (Ir exp) et théoriques (Ir théo) des acides lichéniques calculés à partir de l'acide benzoïque ($t_r = 14, 38$ minutes) et l'acide solorinique ($t_r = 60$ minutes)

	<ul style="list-style-type: none"> ➤ R= H : Acide orsellinique (1) ➤ R= CH₃ : Méthyl-orsellinate (2)
	<ul style="list-style-type: none"> ➤ R', R'', R'''= H : Acide lécanorique (3) ➤ R'=OH, R'', R'''= H : Acide diploschistesique (4) ➤ R', R'', R'''= CH₃ : Acide barbatique (5)
	<ul style="list-style-type: none"> ➤ R1, R4, R5=H ; R2=CH₃ ; R3= C₇H₇O : Orcinyl-lécanorate (6) ➤ R1= CHO ; R2, R3, R5= CH₃ ; R4=H : Atranorine (7) ➤ R1= CHO ; R2, R3, R5= CH₃ ; R4=Cl : Chloroatranorine (8)
	<ul style="list-style-type: none"> ➤ R'1= CHO ; R'2=CH₃ ; R'4, R'6, R'7=H ; R'3=COOH R'5=C₃H₅O₃ (fumarate) : Acide fumarprotocétrarique (9) ➤ R'1= CHO ; R'2, R'5, R'6 =CH₃ ; R'3 = COOH : Acide 4-O-hypoprotocétrarique (10) ➤ R'1= CHO ; R'2= COOH ; R'3, R'4, R'6, R'7 =H ; R'5=CH₃ : Acide 2'-O deméthylpsoromique (11) ➤ R'1= CHO ; R'2= COOH ; R'3, R'4, R'6=H ; R'5, R'7 =CH₃ : Acide psoromique (12)

Tableau 26 : Structures semi-développées des acides lichéniques contenus dans le lichen d'Auby et dans celui de Merlimont

Les indices de rétention expérimentaux coïncident parfaitement avec ceux donnés par Feige *et al* (1993). Selon ces auteurs, les composés monocycliques éluent rapidement et possèdent des indices de rétention compris entre -3 et +5, alors que les depsidones, ayant une hydrophobicité variable, ont des indices Ir compris entre -1 et +43. Les depsides, possédant des ramifications sous forme de courtes chaînes aliphatiques, éluent rapidement, tandis que ceux avec des ramifications plus longues éluent lentement (e.g l'acide superlatolique Ir = 59, chaîne aliphatique de 7 carbones). Certains composés, caractéristiques du *Diploschistes muscorum* comme l'acide lécanorique, l'acide diploschistesique et l'acide fumarprotocétrarique, ont été mis en évidence chez cette communauté bryolichénique récoltée sur la région Nord Pas-de-Calais par Cuny (1999).

L'analyse de ces résultats révèle un comportement assez spécial du *Diploschistes muscorum*, face à la pollution par les éléments traces. Ainsi nous avons constaté quatre faits intéressants :

- 1- Accumulation des composés monocycliques (tableau 26, composés 1 et 2) au sein du thalle exposé aux métaux.
- 2- Accumulation de depsides simples dans ce même lichen (métallifère) formés par un rapprochement de deux molécules monocycliques d'acide orsellinique comme l'acide lécanorique (tableau 26 composé 3) ou l'acide diploschistéique (tableau 26 composé 4) ou encore l'acide barbatique (tableau 26 composé 5) formé par deux molécules d'acide β -orsellinique.
- 3- Absence quasi-totale des molécules plus élaborées du métabolisme secondaire dans le lichen d'Auby, à savoir les depsides ayant plusieurs ramifications par rapport aux depsides simples (tableau 26 composés 6, 7 et 8) et les depsidones.
- 4- Absence de molécules intermédiaires entre les composés monocycliques et depsidones dans le lichen métallifère par rapport au témoin. Parmi ces molécules, l'atranorine (tableau 26 composé 7) formé par le méthyl β -orcinol carboxylate et l'acide haematomnique (Mateos *et al* (1991)) et qui peut donner l'acide fumarprotocétrarique (Vicente & Légaz (1988)).

En conséquence, la complexation des métabolites, précurseurs de formation de composés plus élaborés du métabolisme secondaire, a bloqué ce métabolisme aux premières étapes élémentaires. Les processus de biogenèse des métabolites secondaires du *Diploschistes muscorum* sont largement influencés par cette pollution métallique. Les éléments traces métalliques ont provoqué un stress chimique chez le *Diploschistes muscorum*.

MacGillivray & Helleur (2000) ont étudié le comportement chimique par chromatographie en phase gazeuse des lichens *Caldonia mitis* et *Cladonia rangiformis* exposés *in vitro* à des radiations lumineuses (visible et/ou UV). Une légère diminution des concentrations de l'atranorine et de l'acide rangiformique a été observée chez ces deux lichens. Ils ont ensuite analysé la composition des métabolites secondaires de l'*Usnea dasypoga* collecté sur des sites présentant des niveaux d'ozone croissants. Une augmentation de la concentration de l'acide salazinique, connu par son rôle antioxydant, a été enregistrée sur les sites les plus contaminés. Une augmentation suivie d'une diminution des teneurs en acides gras sont également observées chez le même lichen. L'augmentation des teneurs en acides gras est due à une production de ces composés pour réparer ou prévenir d'éventuels dommages membranaires. Les teneurs en acides gras aux niveaux d'ozone les plus élevés présentent une corrélation avec les teneurs en acide salazinique.

Ces auteurs suggèrent que la production d'acide salazinique diminue l'effet de l'ozone sur les acides gras. Et finalement, ces auteurs ont étudié l'influence de SO₂ sur le lichen *Alectoria sarmentosa*. Une diminution considérable de la concentration en alectosarmentin (substance lichénique dérivée du dibenzofurane) a été observée à proximité des zones les plus contaminées.

Il est établi qu'un stress peut augmenter la production des acides de défense correspondants ou diminuer les niveaux normaux d'acides qui réagissent ou se décomposent suite à un stress (Rikkinen (1995) ; Silberstein *et al* (1996)). Les substances lichéniques peuvent être utilisées comme biomarqueurs à travers les perturbations chimiques causées par un stress.

➤ *Spectroscopie dans l'Ultraviolet*

Certains composés possèdent des temps (et indices) de rétention très proches, ce qui peut parfois poser des difficultés d'interprétation. L'identification des composés lichéniques nécessite souvent le recours à d'autres techniques d'analyse comme la spectroscopie de masse, la résonance magnétique nucléaire (RMN) ou la spectroscopie UV. La HPLC-UV a l'avantage de fournir les spectres UV grâce au détecteur UV visible (spectromètre à barrette de diodes). Yoshimura *et al* (1994) ont étudié par cette technique les spectres UV de 80 composés lichéniques extraits de 15 espèces lichéniques. Une autre étude plus détaillée a été réalisée par Huneck & Yoshimura (1996). Cette étude a porté sur plus de 800 substances lichéniques caractérisées par différentes techniques (RMN, UV, HPLC-SM, IR, TLC).

Nos spectres enregistrés simultanément avec les chromatogrammes des extraits au dichlorométhane sont donnés dans la figure 68 pour le lichen témoin, et dans la figure 69 pour le lichen d'Auby. Nous avons regroupé dans le tableau 27 les différentes longueurs d'onde maximales (λ_{max}) expérimentales et celles données par la littérature (λ_{max} théoriques).

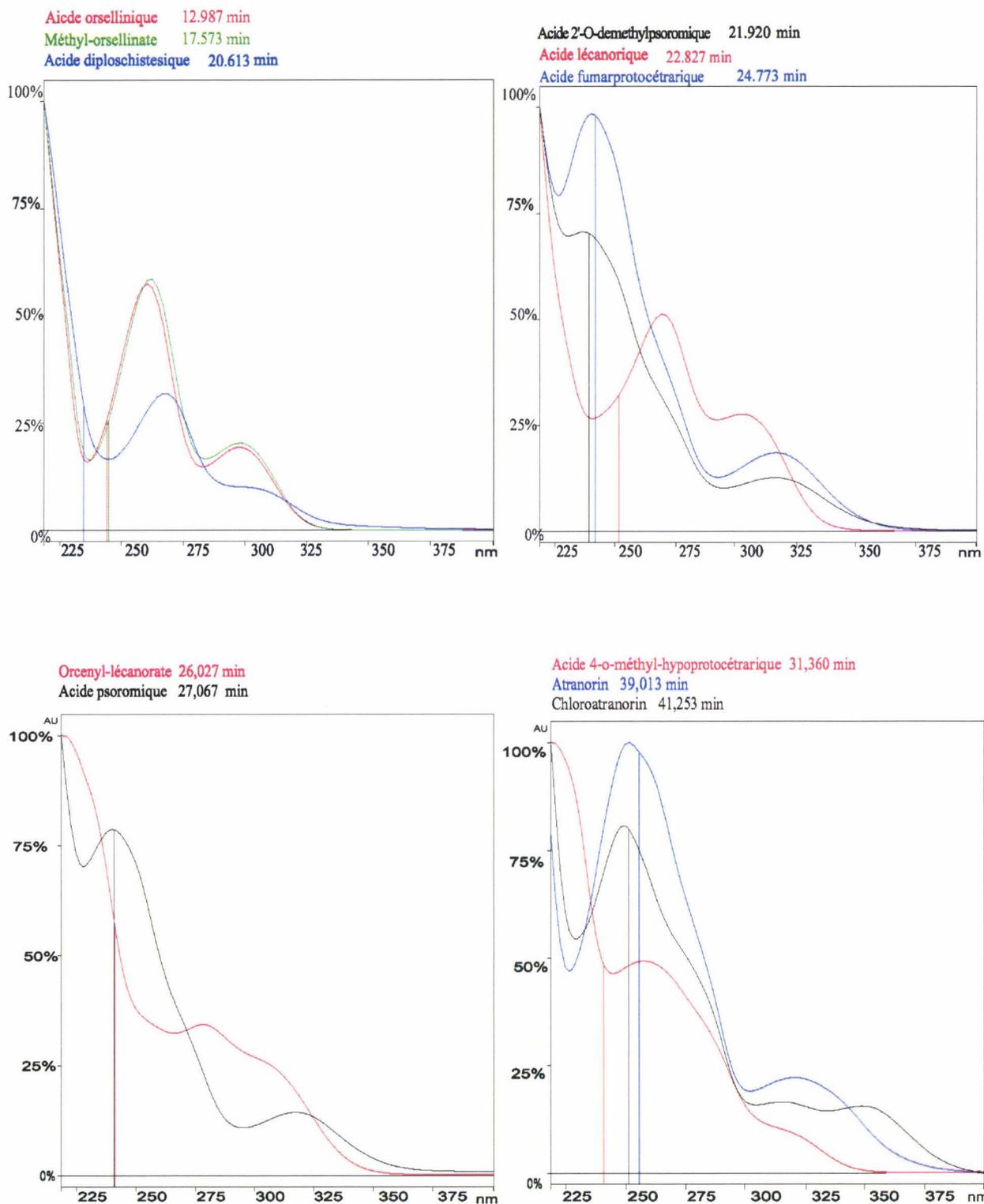


Fig. 68 : Spectres UV de l'acide orsellinique, méthyl-orsellinate, acide diploschistesique, acide 2'-O deméthylpsoromique, acide lécanorique, acide fumarprotocétrarique, orcenyl-lécanorate, acide psoromique, l'acide 4-O-hypoprotocétrarique, de l'atranorine et de la chloroatranorin extraits par le dichlorométhane du *Diploschistes muscorum* récolté sur le site de Merlimont

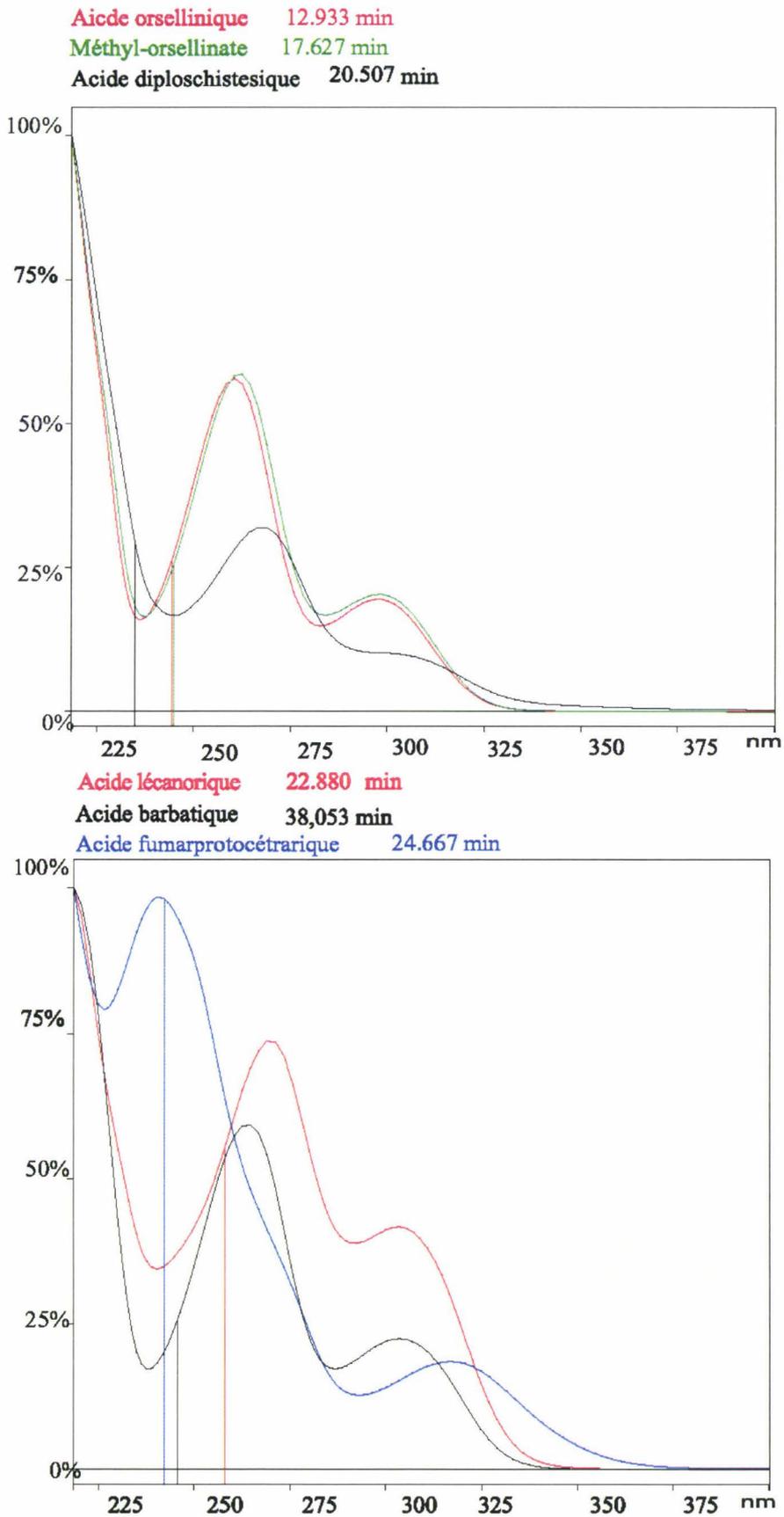


Fig. 69 : Spectres UV de l'acide orsellinique, méthyl-orsellinate, acide diploschistesique, acide lécanorique, acide fumarprotocétrarique et de l'acide barbatique extraits par le dichlorométhane du *Dilposchsites muscorum* récolté sur le site d'Auby

	Acides lichéniques	λ_{\max} exp	λ_{\max} théoriques
<i>Lichen témoin</i> (Merlimont)	Acide orsellinique	214 262 300	212 262 300
	Méthyl-orsellinate	214 261 300	218 262 300
	Acide diploschitésique	214 270 306	212 270 308
	Acide 2'-O-deméthyl-psoromique	214 240 318	--- --- ---
	Acide lécanorique	212 270 304	212 270 302
	Acide fumarprotocétrarique	210 238 320	212 240 318
	Orcinyl-lécanorate	218 277 302	--- --- ---
	Acide psoromique	214 240 318	211 240 318
	Acide 4-O méthyl hypoprotocétrarique	218 260 314	217 264 312
	Acide barbatique	216 265 310	214 276 310
	Atranorine	214 251 260 321	210 252 262 320
	Chloroatranorine	214 249 318 353	212 250 314 350
	<i>Lichen métallifère</i> (Auby)	Acide orsellinique	214 262 300
Méthyl-orsellinate		214 261 300	218 262 300
Acide diploschitésique		214 277	212 270 308
Acide lécanorique		212 270 304	212 270 302
Acide fumarprotocétrarique		210 238 320	212 240 318
Acide barbatique		216 265 310	241 276 310

Tableau 27 : Longueurs d'onde (λ_{\max}) théoriques et expérimentales des différents acides lichéniques du *Diploschistes muscorum* témoin et métallifère

Les allures des spectres UV des composés monocycliques et des depsides sont similaires (en faisant abstraction au léger décalage bathochromique que présentent les depsides). Par contre les spectres UV des depsidones sont différents par rapport aux premiers. Les spectres de l'acide lécanorique et de l'acide fumarprotocétrarique, ayant des temps de rétention très proches, sont différenciables. Certains depsides sont faciles à identifier car leurs spectres UV présentent des particularités (bandes supplémentaires et épaulements) par rapport aux depsides simples. L'atranorine, dont le spectre UV est cité plusieurs fois dans la littérature, et la chloroatranorine (Fig. 68, tableau 27) font partie de ces composés qui présentent des spectres spécifiques.

La substitution du cycle benzénique de l'acide lécanorique par un OH (donnant l'acide diploschitésique) provoque une augmentation de la polarité. La diminution du t_r de l'acide diploschitésique est une conséquence directe de cette augmentation de la polarité. Ceci n'a pas donné de changement notable au niveau spectral. L'estérification de l'acide orsellinique, donnant le méthyl-orsellinate, n'a pas donné de modifications spectrales mais la diminution de polarité par passage de la forme «acide» à la forme «ester» a augmenté le t_r de méthyl-orsellinate par rapport à l'acide orsellinique. Un comportement similaire est observé pour l'acide psoromique et l'acide 2'-O-deméthyl-psoromique, qui sont structuralement très proches et dont les spectres UV sont quasi identiques, leurs temps (et indices) de rétention sont éloignés.

Les deux techniques d'identification (comparaison des indices de rétention et la spectroscopie UV) sont complémentaires.

➤ *Injection des acides lichéniques de synthèse*

Nous avons effectué une injection, avec le même programme d'élution utilisé pour l'extrait au dichlorométhane, de l'acide orsellinique et de l'acide lécanorique décarboxylé synthétisés au Laboratoire de Chimie Thérapeutiques de l'Université de Droit et de Santé de Lille II.

Le but de cette expérience était de confirmer la présence ou l'absence de ces composés dans la fraction extraite par le dichlorométhane. Les chromatogrammes et spectres UV de ces deux composés sont illustrés dans la figure 70.

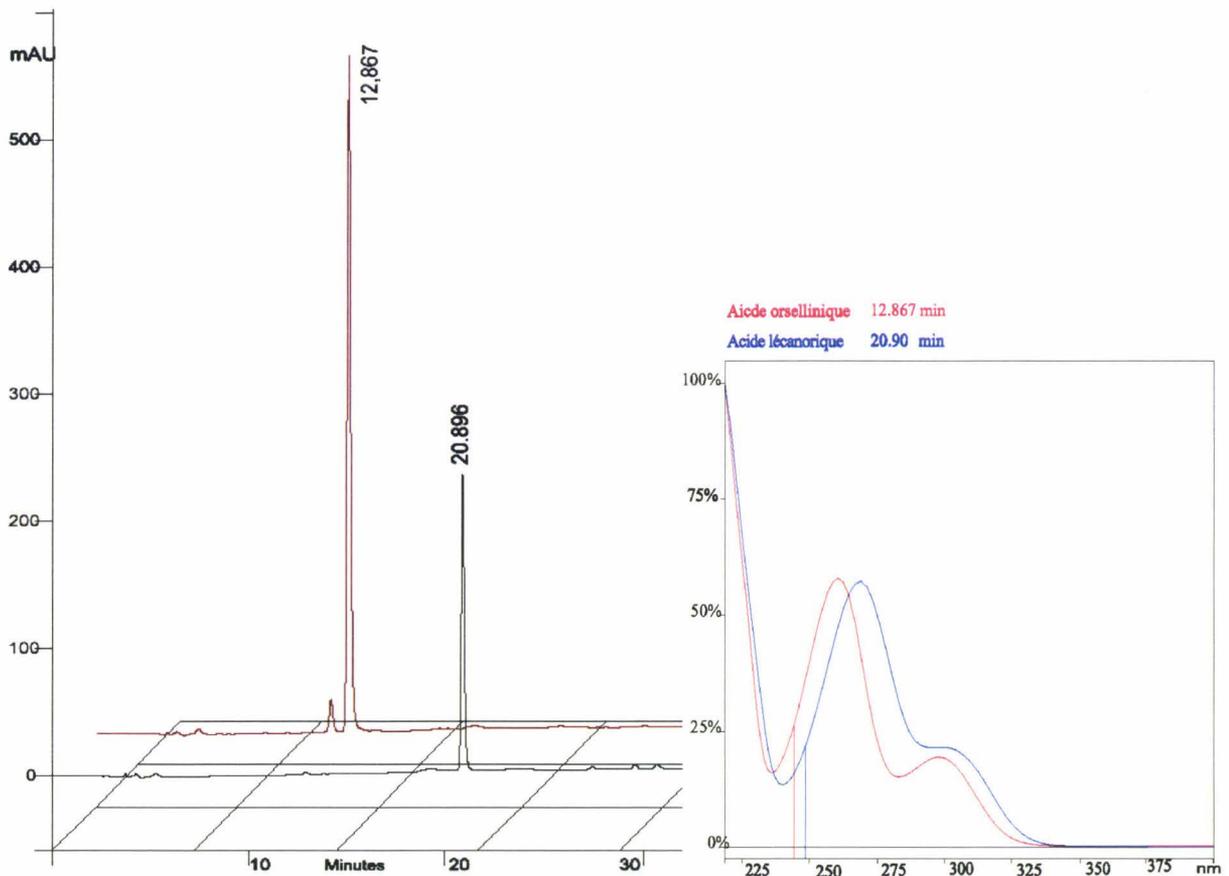


Fig. 70 : Chromatogrammes et spectre UV de l'acide lécanorique décarboxylé et de l'acide orsellinique

Le temps de rétention de l'acide orsellinique coïncide avec celui obtenu auparavant dans la fraction du dichlorométhane. Le temps de rétention de l'acide lécanorique décarboxylé est légèrement inférieur à celui de l'acide lécanorique présent dans le *Diploschistes muscorum*. Cette différence peut être expliquée par l'absence de la fonction COOH dans l'acide lécanorique de synthèse. Les spectres UV des composés de synthèse sont pratiquement identiques à ceux des acides orsellinique et lécanorique du *Diploschistes muscorum*.

III.2.3 Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.

L'analyse réalisée par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectroscopie de masse (CLHP-SM) a pour but d'apporter une confirmation à l'identification réalisée auparavant par calcul des indices de rétention et par spectroscopie UV.

III.2.3.1 Description de la technique

Ce couplage se développe de plus en plus mais il est plus délicat à réaliser qu'avec la chromatographie en phase gazeuse. En effet, d'une part les substances sont peu volatiles et d'autre part il est nécessaire d'éliminer le solvant d'éluion. Pour se faire, trois possibilités sont avancées :

- 1- réaliser une vaporisation sélective du soluté,
- 2- réduire le débit de la phase mobile en utilisant des systèmes de déviation comme en GC-SM.
- 3- Utiliser des microcolonnes (longueur de l'ordre de 10 cm, diamètre inférieur à 1 mm) fonctionnant avec de très faibles débits (quelques $\mu\text{l}/\text{minute}$) et un volume d'injection de l'ordre de 1 μl qui permettent d'introduire la totalité de l'effluent chromatographique dans le spectromètre de masse.

Pour éviter la décomposition de l'échantillon lors de la vaporisation et de l'ionisation, on utilise des techniques d'ionisation dans le spectromètre de masse à pression atmosphérique : électrospray (ESI) et ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). Cette dernière méthode est moins sensible que l'électrospray mais elle reste complémentaire de la première et le plus souvent ces deux sources d'ionisation équipent en standard les appareils.

- **Interface électrospray** : elle permet d'ioniser sous l'effet d'un champ électrique les composés en solution. L'effluent chromatographique est introduit dans un champ électrique de quelques kV par un capillaire. Des gouttelettes chargées se forment. Leur taille diminue progressivement au fur et à mesure de l'évaporation du solvant jusqu'au moment où les gouttes explosent en ionisant les solutés. Les ions sont accélérés vers l'analyseur et les molécules neutres sont éliminées. Cette source est intéressante pour la détection de composés polaires.
- **Interface APCI** : elle nécessite le passage des composés à analyser en phase gazeuse. L'ionisation est réalisée par protonation ou déprotonation mais aussi par substitution nucléophile. Ces réactions chimiques sont initiées par une décharge dans la source génératrice d'électrons. La technique est intéressante pour la détection de molécules moyennement polaires.

Une interface permet le transfert des ions de la source sous pression atmosphérique vers l'analyseur qui est sous un vide de l'ordre de 10^{-5} Torr.

L'analyseur sépare les ions en fonction du rapport masse/charge. Parmi les analyseurs les plus faciles à utiliser on retrouve les quadripôles et surtout les triples quadripôles LC-MS-MS dont le principe de fonctionnement est le même qu'en chromatographie en phase gazeuse. Il est aussi possible d'utiliser un analyseur à trappe d'ions et un spectromètre de masse à temps de vol. Dans cette dernière technique, les ions formés sont accélérés et la mesure du temps mis par ces ions pour parcourir une certaine distance permet de les trier en fonction de leur rapport m/z . La technique a considérablement évolué et l'introduction de techniques particulières comme l'accélération orthogonale ou les systèmes de multiréflexion ont fourni un regain d'intérêt à ce type d'analyseur. Sa rapidité d'exploitation des données est supérieure à celle du quadripôle ; aussi cet appareil est utilisé pour le couplage à des chromatographies liquides à haute performance. Le spectromètre à temps de vol est surtout adapté à l'analyse des peptides, des protéines et des polysaccharides. Les analyseurs à trappe d'ions et à temps de vol sont plus sensibles en mode balayage qui permet d'obtenir un spectre de masse sur une gamme m/z définie. Par contre le spectromètre quadripolaire est intéressant en mode filtrage sélectif qui est très utilisé en analyse quantitative.

III.2.3.2 *Partie expérimentale*

Les spectres de masse sont obtenus avec spectromètre de masse de type triple quadripole (Quatro II, Micromass) couplé à une interface HPLC Hewlett-Packard 1100 d'une colonne analytique C18, 2x250 mm, remplie avec des particules de taille 5 μ m et chauffée à 40°C.

L'échantillon est dilué dans un mélange méthanol et 1% d'acide trifluoroacétique (TFA). Nous avons utilisé les mêmes conditions d'analyse (programme d'élution et solvants) décrites dans la partie III.2.2.5.

La colonne est directement reliée au détecteur UV et, sans aucune partition, au spectromètre équipé d'une source électronébulisation avec une assistance pneumatique, dont le potentiel capillaire est de 3,2 kV et d'une température de 120°C. L'azote est utilisé comme gaz de nébulisation et de séchage avec des débits respectifs de 15-20 et 300-400 L/h. Un spectre en mode balayage est acquis en 3 s de 250 à 500 u . L'argon est utilisé comme gaz de collision à une pression de 2,5-3 mbar. L'énergie de collision est optimisée en enregistrant les spectres fils de l'ion parent à différentes énergies de collision (15-45 eV).

Lorsque le spectromètre n'est pas couplé au chromatographe, la source est maintenue à 70°C. Les échantillons de concentration variant de 8 à 30 pmol/ μ L dans un mélange méthanol/eau avec 0,1% TFA sont infusés à 5 μ L/min grâce à une pousse seringue (modèle 11, Harvard Apparatus, South Matick MA, USA).

La figure 71 représente le spectre de masse enregistré en électrospray négative de l'extrait au dichlorométhane du lichen témoin, et la figure 72 montre la fragmentation du même mélange extrait par technique d'infusion.

temoin sans et 20mg/ml mech 1ul ds 350ul me af 1% cr.35 ce:

31MRTMION 1(0.792) Sm(Mh, 1x0.50)

Scan ES-
5.48e6

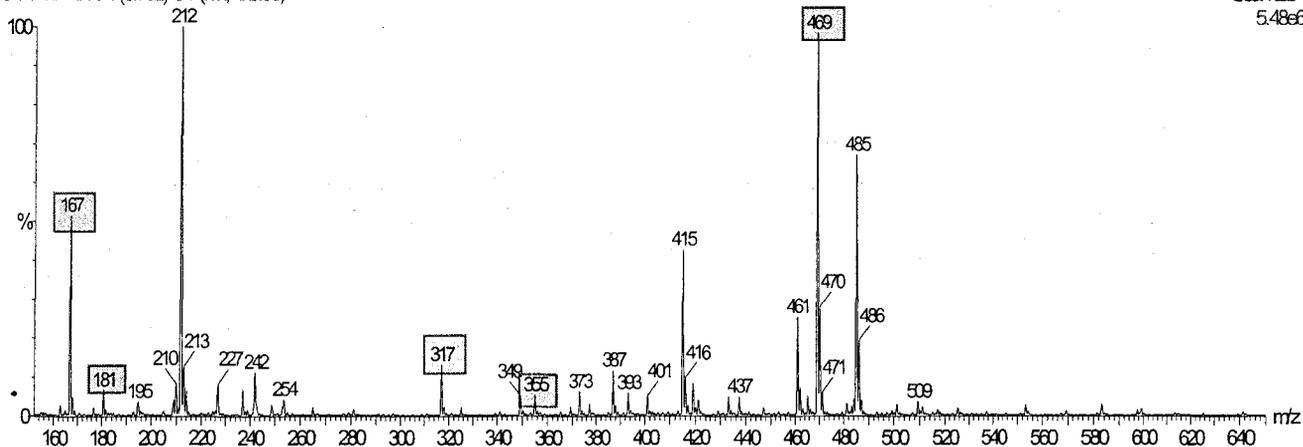


Fig. 71 : Spectre de masse enregistré en électrospray négative de l'extrait au dichlorométhane du lichen témoin de Merlimont

5apBouziane4 #66-73 RT: 0.61-0.67 A/ 8 SE: 14 0.49-0.55, 0.86-0.91 NL: 1.72E4
T: + cFullms [45.00-550.00]

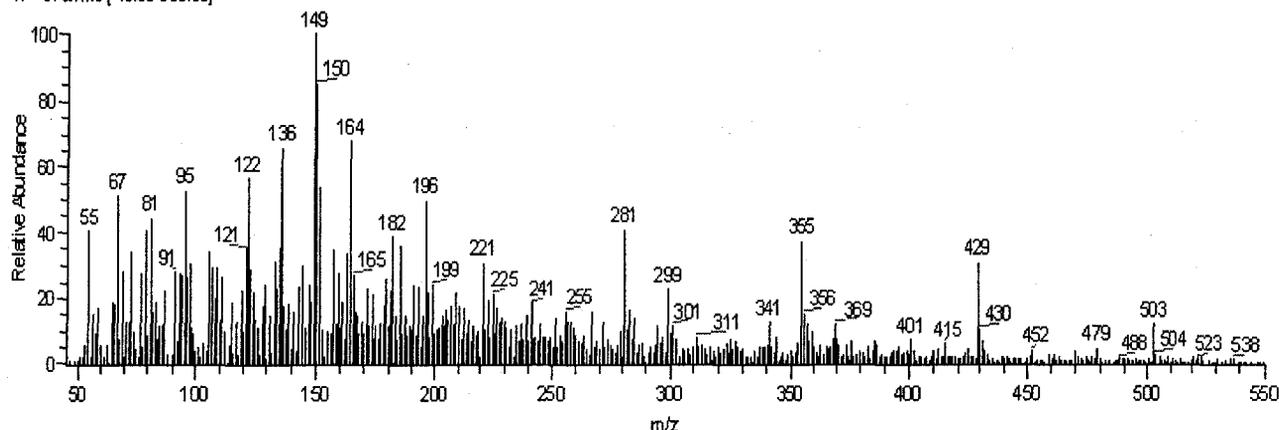


Fig. 72 : Fragmentation des composés de l'extrait au dichlorométhane par infusion de l'extrait au dichlorométhane du lichen de Merlimont

Le spectre de masse enregistré en électrospray négative de l'extrait au dichlorométhane du lichen de Merlimont (Fig. 71) confirme l'identification réalisée auparavant par calcul des indices de rétention et par spectroscopie UV. Ainsi, les masses moléculaires de certains composés lichéniques mis en évidence par cette technique, notamment celles de l'acide orsellinique (MM : 168 uma), du méthyl-orsellinate (MM : 182 uma), de l'acide lécanorique (MM : 318 uma), de l'acide fumarprotocétrarique (MM : 472 uma) et de l'acide 4-O-méthyl-hypoprotocétrarique (MM : 356 uma), coïncident parfaitement avec les masses moléculaires des acides lichéniques étudiés (Tableau 26).

La fragmentation (Fig. 72) nous a permis d'identifier les fragments caractéristiques de l'acide orsellinique, du méthyl-orsellinate, de l'acide lécanorique, de l'atranorine et de la chloroatranorine du lichen métallifère. Le tableau 28 regroupe ces fragments.

Composés lichéniques	m/z
Acide orsellinique	95 ; 122 ; 150
Méthyl-orsellinate	95 ; 122 ; 150
Acide lécanorique	95 ; 122 ; 150
Atranorine	136 ; 164 ; 196
Chloroatranorine	136 ; 164 ; 196

Tableau 28 : Fragments caractéristiques des composés lichéniques de l'extrait au dichlorométhane du lichen d'Auby

Ces résultats sont comparés avec ceux donnés par Huneck & Yoshimura (1996). L'injection de composés purs comme l'acide orsellinique et l'atranorine nous a permis de confirmer la présence de ces composés dans l'extrait au dichlorométhane du lichen témoin.

L'acide orsellinique, le méthyl-orsellinate et l'acide lécanorique possèdent les mêmes fragments car ils sont très proches structuralement. Leur abondance dans le spectre de masse s'explique par le fait qu'ils constituent « les maillons » essentiels de la formation de l'ensemble des composés issus de la voie de biosynthèse de l'acétyle-polymalonyle. Le même raisonnement peut s'appliquer à des composés intermédiaires entre les composés monocycliques et les molécules les plus élaborées du système comme l'atranorine et la chloroatranorine.

Les résultats de l'analyse par CLHP-SM du lichen métallifère n'ont pas été concluants. La présence de plusieurs fragments majoritaires (inconnus) a rendu difficile l'interprétation des spectres de masse. L'extrait au dichlorométhane contient certainement des composés autres que les substances lichéniques et dont la concentration est probablement plus élevée dans le lichen métallifère par rapport à celle des lichens témoins. Il pourrait s'agir de chaînes longues d'acides gras extraits par le dichlorométhane.

III.2.4 Bilan

L'extraction par des solvants de polarité croissante semble être un bon moyen pour séparer les grandes familles de molécules. Les résultats de la séparation de chaque extrait montrent une disparité entre les composés des différentes fractions.

L'utilisation du dichlorométhane est intéressante car ce solvant nous a permis d'extraire une quantité plus élevée de composés lichéniques par rapport aux autres extraits. De plus, son pouvoir extractif coïncide avec la position des métabolites secondaires au sein du thalle lichénique. La séparation par CCM a démontré que cet extrait contient davantage de spots par rapport aux autres extraits.

La séparation par CCM de l'extrait au dichlorométhane révèle une différence de composition et de polarité des métabolites du lichen témoin et du lichen métallifère. Néanmoins, certains spots sont très rapprochés (polarités voisines), ce qui peut poser des difficultés de séparation à grande échelle par colonne ouverte car il se peut que certains composés éluent simultanément.

L'emploi de la HPLC-UV est un choix judicieux car c'est une technique plus précise que la CCM (résolution élevée) et parce qu'elle offre la possibilité d'identifier des acides lichéniques par des méthodes standardisées en lichénologie. Ainsi nous avons pu identifier les acides lichéniques présents dans le thalle du *Diploschistes muscorum* par calcul des indices de rétention et par spectroscopie UV. Les résultats de la séparation par cette technique confirment ceux trouvés par CCM en terme de polarité et de composition chimique.

Afin d'enlever toute ambiguïté d'identification des composés séparés par HPLC, le lichen témoin (contenant davantage de composés par rapport au lichen d'Auby) a été soumis à l'examen de la spectroscopie de masse couplée à la chromatographie liquide. Grâce à cette technique, nous avons confirmé la présence des composés trouvés par HPLC-UV.

Sur le site d'Auby, le *Diploschistes muscorum* est caractérisé par une accumulation de composés monocycliques et de depsides simples (précurseurs de formation de molécules plus développées du métabolisme secondaire). La pollution métallique a bloqué le métabolisme secondaire. Elle a également empêché la formation de composés plus élaborés du métabolisme secondaire chez la communauté bryolichénique qui prolifère sur le site calaminaire d'Auby.

III.3 Stress oxydatif, production et localisation des oxalates

III.3.1 Origine des groupements fixateurs de métaux.

La connaissance de la localisation des divers éléments traces au sein du thalle permet d'obtenir des résultats plus pertinents que le dosage des éléments totaux. Ces résultats permettent d'étudier l'impact des éléments traces sur la physiologie du lichen ainsi que les mécanismes de tolérance développés par cette communauté bryolichénique. La technique étudiée est l'élution séquentielle (Brown & Brown (1991), Branquinho & Brown (1994)).

Les éléments traces dosés au sein du thalle peuvent provenir aussi bien du sol que de l'atmosphère. L'élution séquentielle réalisée par Cuny (1999), en utilisant différents solvants (H₂O, EDTA, NiCl₂, HNO₃-HCl) pour déplacer successivement les cations fixés à différents compartiments du thalle lichénique, a montré qu'une phase résiduelle contient la majorité du zinc accumulé par le *Diploschistes muscorum*. Cette phase est représentée essentiellement par des particules de substrats emprisonnées par le thalle lichénique ainsi que des éléments fixés par des sites actifs de certaines molécules. D'autres fractions de cette phase sont stockées sous forme insoluble (sels métalliques).

Les résultats de l'élution séquentielle (Cuny (1999)) montrent que le cadmium accumulé par le *Diploschistes muscorum* se situe préférentiellement au sein des cellules (Garty (1993)). Le zinc se situe au contraire au niveau des sites pariétaux membranaires extracellulaires. L'exposition des thalles lichéniques *in vitro* aux solutions de zinc confirme cette répartition du zinc dans le lichen étudié, ce qui peut exclure un éventuel phénomène de compétition entre le zinc et le cadmium.

Le plomb se répartit équitablement entre les fractions intra et extracellulaires. Cela suggère qu'il est assez mobile au sein du thalle. Les conditions de pH à l'intérieur du thalle permettent donc de mettre en solution une fraction du plomb.

Le cuivre est principalement adsorbé sur les sites extracellulaires. Cuny (1999) suggère, comme pour le plomb, qu'une partie importante de cuivre pourrait être sous forme de Cu^{2+} .

En général, la fixation des éléments par les végétaux est un phénomène compliqué. Si on considère une surface organique immergée dans un milieu aqueux (par exemple les racines dans le sol), la fixation d'un élément M pour former un complexe est basée sur le facteur $K_{ML} \times [\text{ion libre}]$ (K_{ML} étant la constante de stabilité du complexe ML formé par le métal M et le ligand L).

La sélectivité de fixation des éléments est influencée, entre autres, par la présence de groupements fonctionnels contenant des atomes donneurs d'électrons (O, N, S). Pour les métaux alcalins, les ligands contenant des atomes d'oxygène augmentent la fixation de ces métaux alors que les groupements contenant des atomes d'azote et de soufre contribuent plus que les premiers à la fixation des métaux de transition (Frausto da Silva & Williams (2001)). Les ligands à oxygène abondent au niveau des parois tandis que les ligands contenant l'azote et/ou le soufre sont accumulés au niveau des membranes et du cytoplasme et sont destinés à la fixation des éléments traces pour protéger la cellule. Les éléments qui passent à travers la membrane forment des liaisons plus stables que ceux fixés à la surface.

Dans le cas des cellules procaryotes, si on considère le cas où les parois sont saturées en ligands à oxygène et la membrane en ligands contenant de l'oxygène, de l'azote et du soufre, et si la solution externe est riche en macroéléments (K, Na, Ca, Mg) de sorte que la concentration de ces éléments dépasse celle des ligands, alors la surface se comporte comme une résine échangeuse d'ions (Ca/Mg).

D'autres ions peuvent traverser la paroi par simple diffusion. Les éléments traces peuvent être complexés au niveau extracellulaire ou changer de ligand pour pouvoir atteindre la membrane. A l'intérieur des cellules, on peut trouver, en plus des ligands avec un oxygène donneur d'électrons, une variété de groupements avec des atomes d'azote et de soufre destinés à la fixation des éléments traces métalliques pour protéger la cellule des dommages causés par ces éléments.

Deux aspects importants sont à prendre en considération dans l'étude détaillée de la fixation individuelle des éléments (Frausto da Silva & Williams (2001)) :

- 1- Il y a des différences fondamentales entre les conditions intra et extracellulaires qui concernent les concentrations d'ions, les potentiels redox (E°) et les pH (Fig. 73). A l'extérieur des cellules, la concentration des ions métalliques peut être plus élevée que celle des ligands de surface alors qu'à l'intérieur des cellules et dans la membrane, le contraire est tout à fait vrai ; c'est-à-dire que la concentration des ligands les plus forts, qui est sous contrôle métabolique, est légèrement supérieure à celle des éléments traces. Cela suppose que la production de ces ligands et le contrôle du transport sont régis par la concentration du métal.

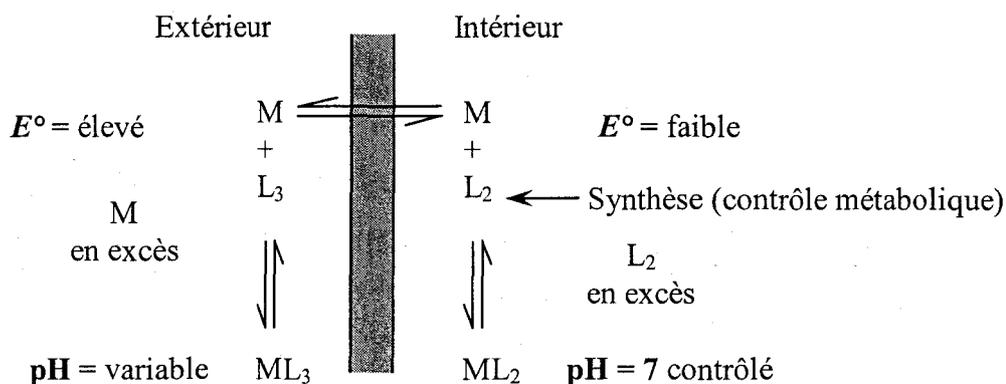


Fig. 73 : Schéma simplifié de la fixation du métal M de part et d'autre d'une membrane

- 2- A l'équilibre, les constantes de stabilité qui sont employées pour décrire la liaison métal-ligand ne présentent pas de stabilité stoechiométrique. On utilise des constantes dites effectives qui prennent en compte la compétition proton-métal et métal-métal ainsi que la compétition entre ligands présents vis-à-vis du métal.

Les cellules des lichens ont un comportement particulier comme illustré sur le tableau 3 (chapitre I). Les parois fongiques présentent, en plus des ligands à oxygène (essentiellement COOH et OH) qui sont plus impliqués dans la fixation des cations (Brown (1987)), une gamme importante de ligands avec des atomes d'azote, de phosphore et de soufre.

L'analyse par l'IRTF présentée au chapitre II montre une grande contribution des groupements COO^- à la fixation des métaux. Ces groupements sont abondants dans les métabolites extracellulaires comme les acides lichéniques et les oxalates.

III.3.2 Lavage à l'eau acidifiée du thalle lichénique.

Au regard des teneurs en métaux lourds fixés au niveau extracellulaire, nous nous sommes intéressés à l'étude des mécanismes de fixation de ces métaux à l'extérieur des cellules du *Diploschistes muscorum*.

Les acides lichéniques sont doués de propriétés chélatantes des éléments traces comme le montrent plusieurs publications. Cependant les teneurs de ces métabolites dans le thalle lichénique ne permettent pas d'expliquer cette capacité du *Diploschistes muscorum* à accumuler des quantités importantes d'éléments traces.

En se basant sur le caractère hydrophobe des acides lichéniques, nous avons procédé à un lavage à l'eau légèrement acide (HCl 0,1 M) des thalles lichéniques d'Auby pour éliminer les substances solubles dans cette solution et évaluer leur contribution à la fixation des éléments traces. Nous avons analysé par infrarouge les thalles du *Diploschistes muscorum* avant et après le lavage à l'eau acide. Les spectres du lichen d'Auby, enregistrés entre 400 et 4000 cm^{-1} , sont regroupés dans la figure 74.

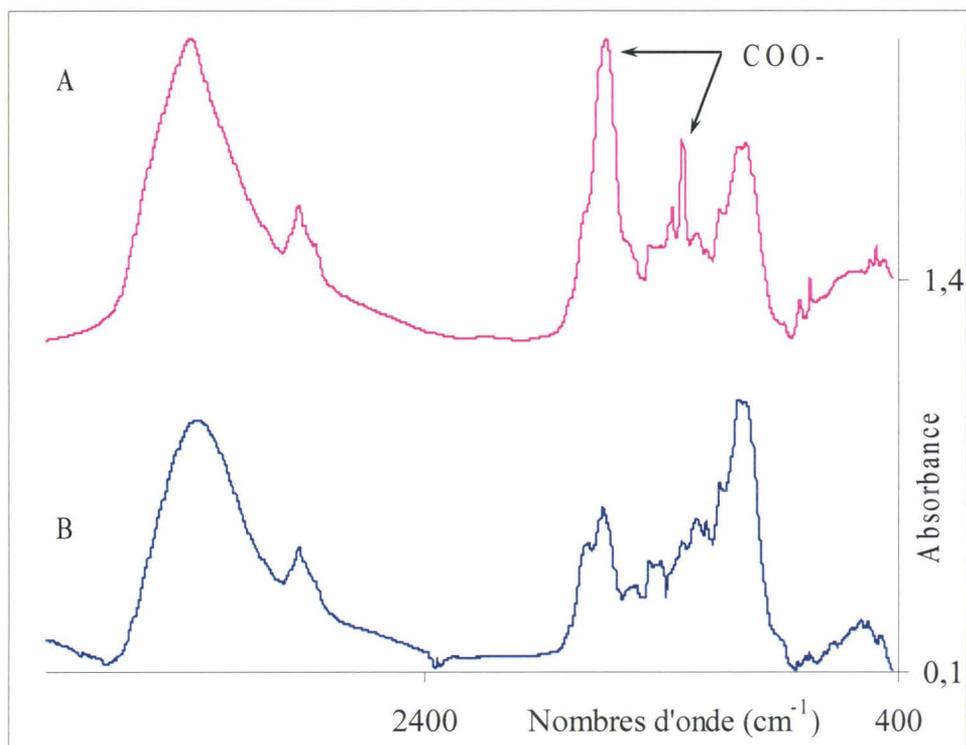


Fig. 74 : Spectres infrarouge du lichen métallifère d'Auby ; A : avant lavage à l'eau acide, B : après lavage à l'eau acide (HCl 0,1 M)

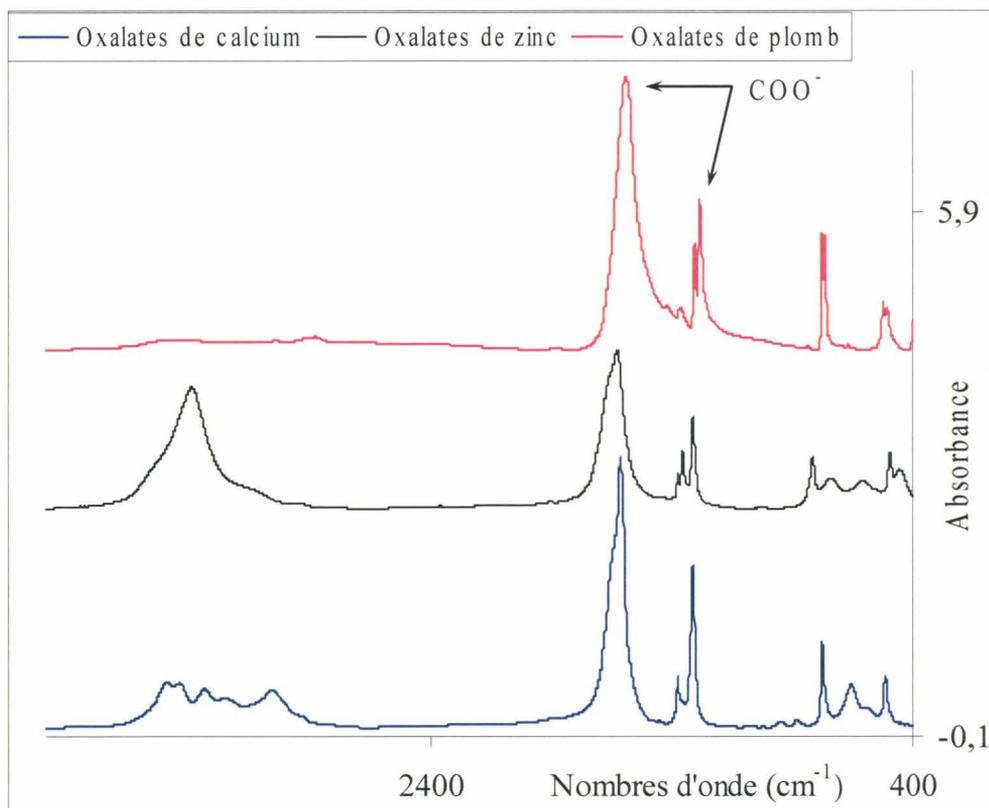


Fig. 75 : Spectres infrarouge des oxalates de calcium de zinc et de plomb

Les spectres du *Diploschistes muscorum* révèlent une chute de l'intensité des bandes relatives aux groupements carboxylates après le lavage à l'eau acide (Fig. 74). Les substances

solubles dans l'eau acide contiennent essentiellement des groupements carboxylates. Ces substances contribuent d'une manière importante à la fixation du zinc.

Nous nous sommes basés sur les résultats d'analyse réalisées par Sarret *et al* (1998) sur le *Diploschistes muscorum* d'Auby par EXAFS (*Extended X ray Absorption Fine Structure*) pour attribuer les principales bandes des spectres infrarouge du lichen d'Auby avant et après lavage à l'eau acide. Ces résultats révèlent un environnement oxygéné pour les atomes de zinc accumulés par ce lichen. Ces auteurs ont abouti à la thèse des oxalates de métaux comme forme prédominante chez cette communauté bryolichénique. Ainsi les bandes à 1650 cm^{-1} , 1370 cm^{-1} et 1320 cm^{-1} , 829 cm^{-1} et 781 cm^{-1} sont attribuées respectivement aux vibrations $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{as}}$, $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{s}}$, $\nu(\text{C}-\text{C})$ des oxalates (Eduards & Russell (1998)). L'intensité de ces bandes a considérablement diminué après le lavage à l'eau acide. La présence des oxalates dans le lichen métallifère a été confirmée par les spectres d'oxalates de métaux (Ca, Zn et Pb). Les bandes relatives aux groupements des oxalates, retrouvées dans les spectres des oxalates de métaux (Fig. 75), coïncident parfaitement avec celles du lichen d'Auby.

Sarret *et al* (1998) ont choisi différents ligands dont le citrate, la cystéine et l'oxalate pour modéliser la complexation du zinc chez le *Diploschistes muscorum*. L'utilité de ces ligands comme modèles d'étude réside dans le fait qu'ils sont solubles dans l'eau (Jones (1988)). Mathyse *et al* (1977) ont observé une augmentation de la concentration en oxalate et malate chez quelques écotypes résistants comme par exemple *Silen cucubalus*, *Rumex acetosa* et *Thlaspi alpestre*.

Sarret *et al* (1998) ont observé une concentration importante d'acide oxalique chez le thalle de *Diploschistes muscorum* d'Auby par rapport au thalle témoin de Saint-Frieux. Selon ces auteurs, les spectres EXAFS du lichen métallifère et de l'oxalate de zinc dihydraté se rapprochent. Ces résultats montrent que l'environnement de zinc est principalement formé de groupes carboxyles. Le zinc, étant un élément de transition, forme préférentiellement des complexes avec des ligands oxygénés et se fixe surtout sur des sites COOH (Nieboer & Richardson (1980)).

III.3.3 Localisation des oxalates par ATR diamant

Nous avons analysé par infrarouge par ATR diamant (Fig. 31-A) le lichen métallifère. L'analyse a été réalisée sur des thalles minutieusement nettoyés de tous débris végétaux et grains de sable. Les faces inférieure et supérieure du thalle, c'est-à-dire la médulle (puisque le *Diploschistes muscorum* ne possède ni cortex inférieur ni rhizines) et le cortex supérieur ont été analysés par cette technique. Les spectres enregistrés entre $550\text{ et }4000\text{ cm}^{-1}$ sont donnés dans la figure 76.

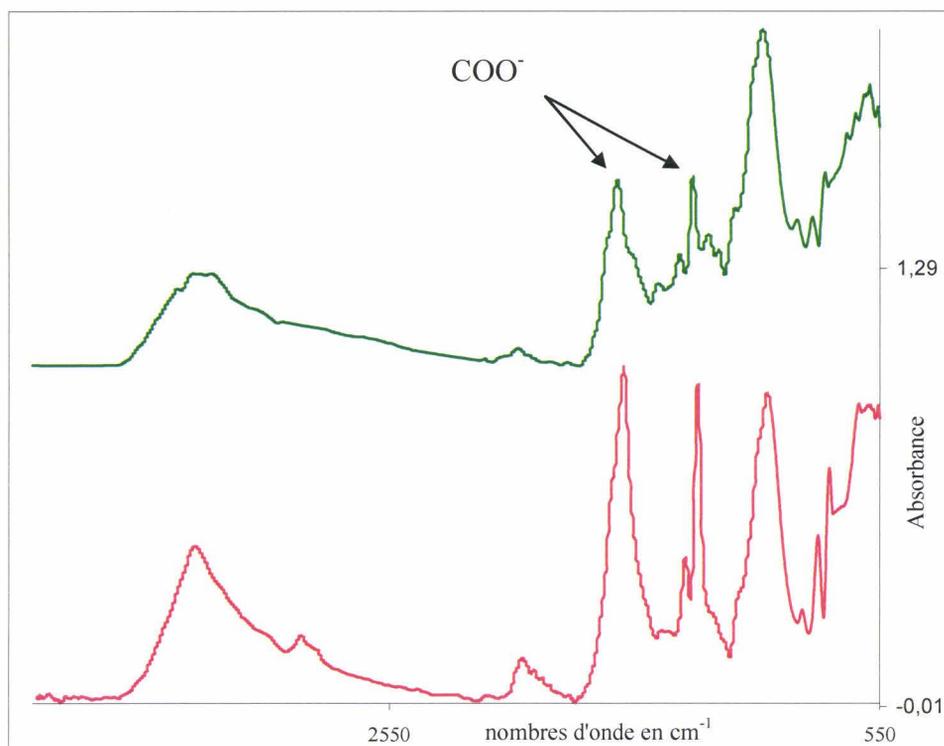


Fig. 76 : Spectres infrarouge du lichen métallifère enregistrés par la technique ATR sur deux faces différentes : face médullaire en rouge et face corticale supérieure en vert

Sur les spectres (Fig. 76) nous constatons la présence des oxalates dans le cortex inférieur et dans la médulle. Les bandes attribuées aux oxalates (vers 1650 cm^{-1} , 1370 cm^{-1} et 1320 cm^{-1} , 829 cm^{-1} et 781 cm^{-1} correspondant aux vibrations $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{as}}$, $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{s}}$, $\nu(\text{C}-\text{C})$ des oxalates) apparaissent sur les deux spectres. Ces bandes sont très intenses au niveau médullaire par rapport au cortex supérieur.

Les oxalates sont accumulés dans le thalle du *Diploschistes muscorum* au niveau médullaire à l'interface sol pollué-thalle lichénique. Ceci permet au lichen étudié d'immobiliser les éléments traces métalliques au niveau extracellulaire et de bloquer leurs incorporations au sein du thalle en diminuant ainsi leur biodisponibilité.

Ces résultats sont en accord avec les résultats de la spéciation des métaux dans le thalle lichénique. La production des oxalates constitue, en plus de leur rôle nutritionnel, un moyen de défense efficace contre l'agression de xénobiotiques et un mécanisme de tolérance développé par cette communauté bryolichénique.

L'étude réalisée par Paul *et al* (2003) sur deux espèces tolérantes, *Hypogimnia physodes* et *Lecanora conizaeides*, mises en contact avec des solutions de MnCl_2 , montre que le manganèse est immobilisé au niveau extracellulaire dans les cortex inférieur et supérieur et au niveau de la matrice polysaccharide entre les hyphes. Le partenaire algal ne fixe pas beaucoup de manganèse par rapport au partenaire fongique. Ce dernier protège le photobionte contre l'invasion du manganèse. D'après la même étude, la fixation du manganèse cause un largage du calcium et magnésium chez *Hypogimnia physodes*. Cet échange cationique se passe au niveau des

membranes corticales et des matrices polysaccharides. Dans la médulle, le manganèse est incorporé dans les cristaux d'oxalate de calcium et surtout au niveau des jeunes hyphe.

Ces auteurs n'ont pas exclu la participation de certaines substances lichéniques comme l'acide fumarprotocétrarique, l'acide norstictique et l'acide psoromique à la fixation du métal. Le pouvoir complexant de ces substances est du à la présence de groupements hydroxyles en position *ortho* avec un groupement aldéhyde adjacent.

III.3.4 Origine et devenir des oxalates au sein du thalle lichénique.

Les oxalates sont produits par plusieurs organismes vivants notamment par les microorganismes, les algues, les plantes supérieures, les champignons et certains animaux. Ils se trouvent généralement sous forme de sels de calcium insolubles. Chez les lichens les oxalates sont secrétés à l'extérieur des cellules sous une forme non toxique, stable et non diffusable à l'intérieur des cellules (Horner & Wagner 1995). Les oxalates possèdent plusieurs rôles :

- protéger le lichen,
- constituer une réserve importante de calcium,
- agir comme un collecteur de radiations,
- réfléchir certaines radiations inutiles.

L'acide oxalique du lichen est produit par le partenaire fongique et sa biosynthèse ne nécessite pas une grande énergie par rapport aux autres composés lichéniques (Sollins *et al* (1981)). Les oxalates de calcium prennent deux formes : oxalate de calcium monohydrate $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ou oxalate de calcium dihydrate $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot (2+x) \text{H}_2\text{O}$.

Les oxalates sont présents à différents compartiments des lichens et leur spéciation dépend, entre autres, de la présence de calcium ou du type de stress auquel ils sont exposés. Modenesi *et al* (1998) et Caviglia *et al* (1999) ont remarqué que les oxalates de calcium sont déposés chez certaines espèces foliacées à la surface des thalles exposés à un stress oxydatif causé par des radiations lumineuses. Selon Weber (1962) et Modenesi *et al* (1998), la présence d'oxalates à la surface du thalle protège le partenaire algal des radiations intenses de la lumière. Ces auteurs s'accordent sur le fait que ce rôle de protection est dû à l'augmentation de la surface spécifique par déposition des cristaux d'oxalates sur le cortex supérieur.

L'acide oxalique permet aussi une acidification de l'environnement très proche de l'hyphe qui entraîne une solubilisation de nombreux éléments (Fe, Al, K, P ...etc.) (Dutton & Evans (1996)).

Les lichens participent au processus biochimique de la pédogenèse par complexation des éléments (Syres & Iskandar (1973)). Ce processus inclue l'action des oxalates et des composés polyphénoliques du lichen comme l'acide lécanorique observé en quantité élevée (20-30 %) chez des lichens proliférant sur des monuments à Borobudur (Seshadri & Subramanian (1949)).

L'acide oxalique joue aussi un rôle de détoxification des éléments traces métalliques. Ainsi la spéciation du cuivre chez *Acarospora rugulosa* Körber et *Lecidea theroides* Sommerf a

montré que le cuivre est principalement sous forme d'oxalate de cuivre au niveau médullaire (Purvis (1984)).

Plusieurs voies de biosynthèse des oxalates ont été proposées. D'après Hodgkinson (1977), ces voies incluent :

- 1- le clivage des isocitrates.
- 2- l'hydrolyse des oxaloacétates.
- 3- l'oxydation des glycolates/glycoxylates.
- 4- le clivage oxydatif de l'acide L-ascorbique.

Des études récentes ont montré que le clivage de l'acide L-ascorbique constitue une source importante d'oxalates (Horner (2000) ; Keates (2000) et Kostman (2001)). En effet, l'ascorbate apoplastique constitue la première ligne de défense contre les espèces réactives de l'oxygène (Sharma & Davis (1997)). Chameides (1989) ont montré que l'acide ascorbique extracellulaire joue un rôle déterminant dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène produites suite à une exposition à l'ozone dans la membrane cellulaire.

L'acide ascorbique synthétisé à l'intérieur des cellules est transporté au niveau extracellulaire à travers les membranes (Horemanes *et al* (2000)). Davey *et al* (2000) ont donné une revue complète sur la chimie et les métabolismes de l'acide ascorbique. Selon ces auteurs le catabolisme de l'acide L-ascorbique conduit à la formation des oxalates, des L-threonates et des tartrates. La formation des oxalates apoplastiques à partir de l'acide L-ascorbique se fait par l'oxalate oxydase. Le clivage de l'acide L-ascorbique au niveau des C₂/C₃ donne des oxalates et des L-threonates. Ces derniers sont oxydés en L-tartrates. Les espèces accumulatrices des oxalates ne présentent pas toujours une accumulation des L-tartrates.

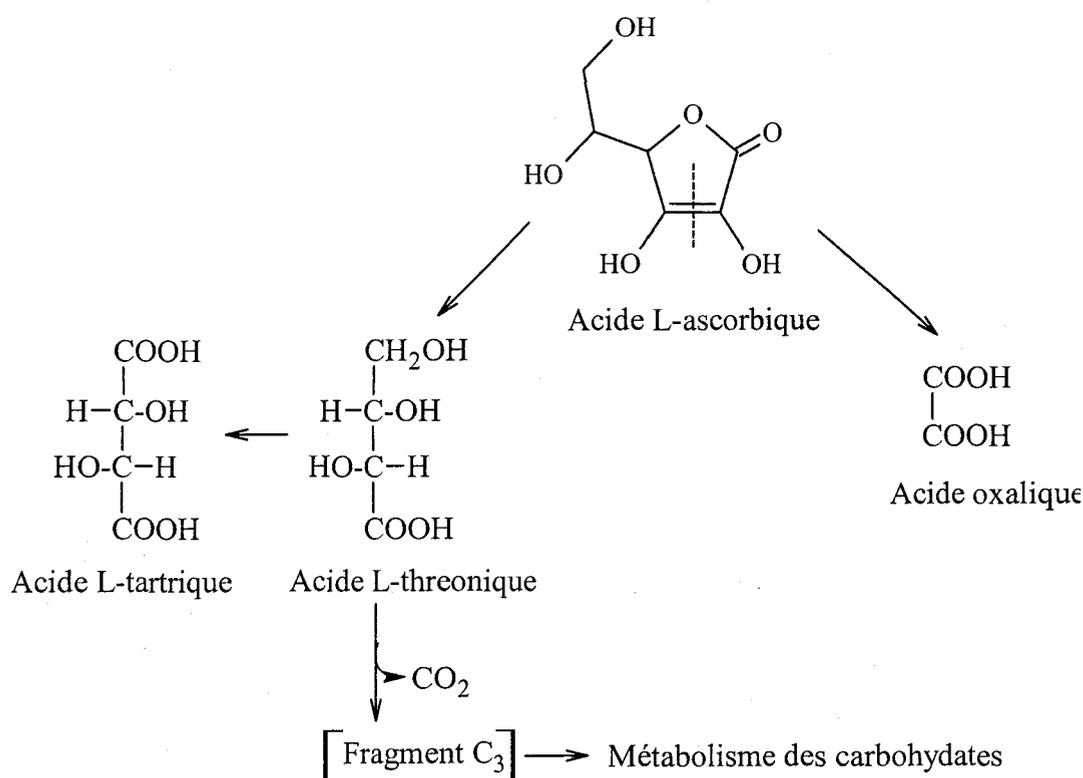


Fig. 77 : Catabolisme de l'acide L-ascorbique

Afin d'expliquer la relation entre le stress oxydatif et la déposition des oxalates, Gaviglia & Modenesi (1999) proposent l'accumulation de l'acide ascorbique et des glycoxylates suite à un stress oxydatif. Ces deux composés constituent, selon ces auteurs, les précurseurs majeurs de l'acide oxalique.

III.3.5 Dosage enzymatique des oxalates et de l'acide ascorbique.

III.3.5.1 Dosage enzymatique des oxalates (Lartillot et Vogel (1983))

Dans un tube à essai on introduit 10 mg de lichen broyé et 10 ml d'acide chlorhydrique 0,1 N. Le mélange est ensuite agité pour dissoudre l'oxalate, et les particules en suspension sont éliminées par centrifugation. Ensuite cette solution est diluée au 1/10 dans HCl 0,1N.

L'acide oxalique est extrait par précipitation par le sulfate de calcium en milieu hydroalcoolique. Il est ensuite oxydé par l'oxalate oxydase. Le peroxyde d'hydrogène formé en présence de peroxydase, oxyde le couple diéthylaniline/méthyl-3-benzothiazolinone-2 hydrazone qui donne un colorant bleu violacé, dont le maximum d'absorbance se situe à 590 nm.

Dans des tubes à hémolyse on introduit :

	C	C+E	Blanc
- Dilution chlorhydrique HCl 0,1N	0,1 ml	0,1 ml	---
- Etalon oxalates	---	0,1 ml	0,1ml
- Eau distillée	0,1 ml	---	0,1 ml
- Solution de diéthylaniline pH = 3 à 4	1 ml	1 ml	1 ml
- Solution de méthyl3 benzothiazolinone-2 hydrazone	0 ml	1 ml	1 ml
- Solution glycérolée stabilisée d'oxalates oxydase et peroxydase	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml

Les solutions sont mélangées et placées au bain-marie à 37°C pendant 15 minutes. Soit $A_{(C)}$ et $A_{(C+E)}$ les absorbances respectives des tubes C et C+E. Le pourcentage d'acide oxalique anhydre contenu dans le lichen est donné par la formule suivante :

$$\% \text{ d'oxalates} = A_{(C)} \times 2,25 \times \text{facteur de dilution} / A_{(C+E)} - A_{(C)}$$

III.3.5.2 Résultats

Les quantités d'oxalates contenues dans les thalles lichéniques témoins et métallifère (calculées en moyenne sur 3 essais) sont reportées sur la figure 78 en mmoles par gramme de lichen.

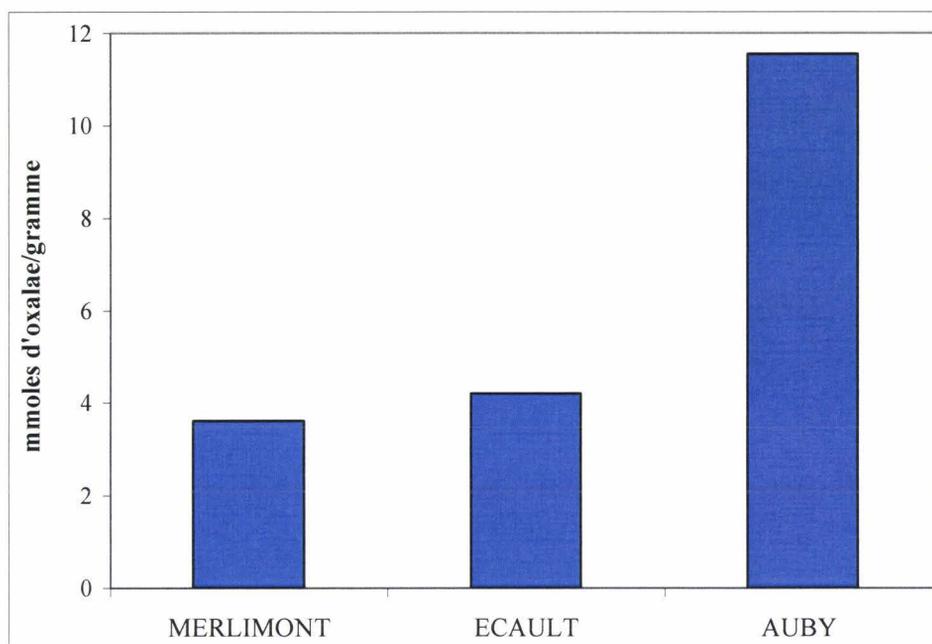


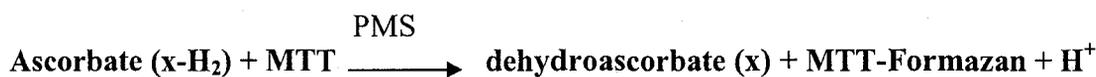
Fig. 78 : Taux d'oxalates contenus dans les thalles des lichens témoins (Merlimont et Ecault) et métallifère d'Auby

La concentration globale d'oxalates dans le lichen d'Auby est trois fois supérieure à celles des lichens témoins. Le taux d'oxalate enregistré chez le lichen d'Auby a atteint 11,55 mmoles/gramme alors que les taux d'oxalate des lichens témoins n'ont pas dépassé 4,2 mmoles/gramme de lichen (Ecault) et 3,61 mmoles/gramme (Merlimont). Ces valeurs sont en accord avec les résultats trouvés par Sarret *et al* (1998). La production d'oxalates constitue un moyen de défense chez ce lichen. La chélation des éléments traces au niveau extracellulaire sous forme d'oxalates permet de diminuer la biodisponibilité de ces éléments. De plus la production des oxalates en abondance au niveau médullaire à l'interface sol pollué-thalle lichénique protège le lichen contre l'invasion des éléments traces. La biosynthèse des oxalates en abondance chez le *Diploschistes muscorum* constitue un mécanisme de tolérance chez cette communauté bryolichénique.

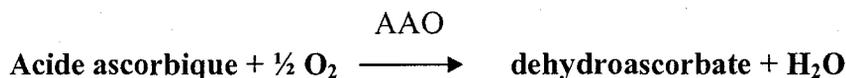
La production des oxalates est sûrement le moyen déterminant qui a permis à ce végétal de survivre dans un milieu très pollué. L'impact des éléments traces sur la biosynthèse des oxalates a certainement des conséquences sur les sources majeures de ces oxalates, et notamment sur celle de l'acide ascorbique. L'étude de la production de l'acide ascorbique doit apporter beaucoup d'informations sur les perturbations métaboliques causées par les éléments traces sur le *Diploschistes muscorum*.

III.3.5.3 Dosage enzymatique de l'acide ascorbique (Deneke *et al* (1978))

L'acide ascorbique et ses formes réduites (ascorbate(x-H₂)) réduisent le MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5diphenyltetrazolium bromide) en MTT-Formazan C₁₈H₁₇N₅S, qui possède un maximum d'absorbance en 587 nm, en présence du 5-methylphenazinium methosulfate (PMS) à pH = 3,5.



La méthode du dosage de l'acide ascorbique dans un mélange (contenant les formes réduites de cet acide) consiste tout d'abord, à une oxydation de cet acide par l'ascorbate oxydase (AAO), en présence de l'oxygène, en dehydroascorbate qui ne réagit pas avec le MTT et le PMS.



• La quantité d'acide ascorbique est déduite par la différence d'absorbance du MTT-Formazan dans le mélange qui contient toutes les formes d'ascobates et la solution dépourvue d'acide ascorbique.

Le kit du dosage (L-Ascorbic acid Colorimetric method, R-biopharm Roche, Cat. No.10 409 677 035) contient :

- 1- Solution 1 : MTT, phosphate de sodium/citrate (pH = 3,5).
- 2- Spatules d'ascorbate oxydase.
- 3- Solution de PMS.

L'extraction des ascorbates est effectuée par l'acide *meta*-phosphorique (1,5 % w/v, pH = 3,5-4 ajusté par KOH (10 M)).

Dans deux tubes à essai on mélange :

	Blanc	Echantillon
Solution 1	1 ml	1 ml
Eau bidistillée	1,5 ml	1,5 ml
Extrait d'acide <i>meta</i> -phosphorique	0,1	0,1
Spatule d'ascorbate oxydase	1 spatule	-

Les solutions sont mélangées et mises au bain-marie à 37 °C pendant 6 minutes. On note A_{1S} et A_{1B} les absorbances respectives de l'échantillon et du blanc à 578 nm. On ajoute ensuite 0,1 ml de PMS et on met les solutions dans le bain-marie pendant 15 minutes à 37 °C. On mesure les absorbances A_{2S} et A_{2B} de l'échantillon et du blanc.

La concentration d'acide ascorbique est donnée par la formule suivante :

$$C = 0,2814 \times \Delta A$$

Avec

C : la concentration d'acide ascorbique en grammes d'acide ascorbique par litre d'échantillon et
 ΔA la différence d'absorbance : $\Delta A = (A_{2S} - A_{1S}) - (A_{2B} - A_{1B})$

III.3.5.4 Résultats

Les teneurs d'acide ascorbique mesurées dans les thalles métallifère et témoins sont reportées sur la figure 79.

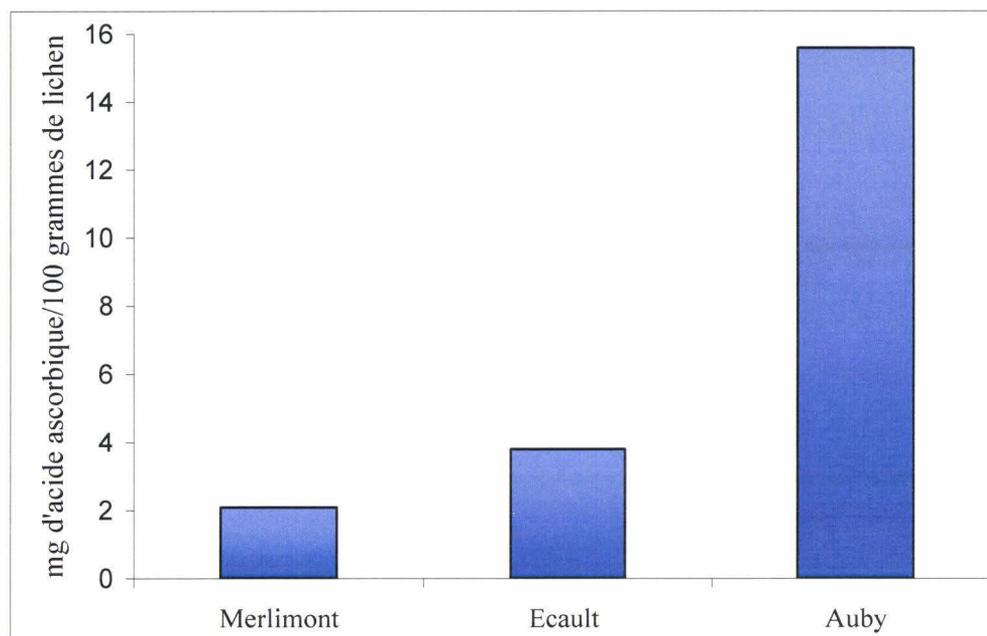


Fig. 79 : Taux d'acide L-ascorbique contenu dans les talles des lichens témoins (Merlimont et Ecault) et métallifère d'Auby

Le taux d'acide ascorbique trouvé chez le lichen d'Auby a atteint 15,6 mg/100 grammes de lichen, soit 4 fois plus que celui du lichen d'Ecault (3,8 mg d'ascorbate/100 grammes de lichen et 7 fois plus que celui de Merlimont (2,1 mg d'ascorbate/ 100 grammes de lichen). Ces résultats présentent une corrélation avec ceux du dosage des oxalates. L'acide ascorbique constitue donc une source importante des oxalates chez le *Diploschistes muscorum*.

La voie de biosynthèse de l'acide ascorbique a été largement influencée par la pollution métallique tout autant que celle des oxalates puisque leurs concentrations dépassent les teneurs enregistrées dans les conditions normales.

Le stress oxydatif causé par les éléments traces métalliques provoque une accumulation des antioxydants. Comme le compartiment extracellulaire est le plus exposé à la pollution métallique, les antioxydants extracellulaires sont produits en abondance à ce niveau pour limiter les dégâts causés par les éléments traces. Plusieurs paramètres de stress ont été étudiés par Cuny *et al* (2002), comme par exemple i) le taux de potassium (relié à la perte de l'intégrité membranaire) ii) la concentration du malondialdéhyde iii) glutathion iv) superoxydedismutase. Cette étude a révélé que les métaux lourds (Pb, Zn et Cd) ont causé un stress oxydatif chez le *Diploschistes muscorum* d'Auby. Ces auteurs ont mis en évidence des atteintes membranaires accompagnées d'une augmentation des teneurs du superoxydedismutase et glutathion. La production des antioxydants pour la détoxification des radicaux libres a limité les dommages causés par ces derniers suite à l'exposition du lichen d'Auby aux métaux lourds.

L'acide ascorbique possède donc un double rôle. D'une part, il agit, comme un antioxydant et un agent de détoxification des espèces réactives de l'oxygène, il contribue également à la biosynthèse de la zéaxanthine, caroténoïde connu par sa participation à la détoxification des espèces réactives de l'oxygène à travers la régénération de α -tocophérol (Demmig-Adams & Adams (1994)), agent protecteur des membranes thylacoïdales (Foyer (1992)). D'autre part, il constitue une source importante d'oxalates qui sont des chélatants performants des éléments traces au niveau extracellulaire.

III.3.6 Conclusion

Les groupements fixateurs des éléments traces métalliques sont en grande partie des fonctions carboxyliques. Le lavage à l'eau acide a révélé une grande contribution de ces groupements à la fixation des métaux. Les oxalates de métaux sont les formes prédominantes chez le *Diploschistes muscorum*. Les structures anioniques oxalates, caractérisées par infrarouge par la technique ATR, sont observées avec beaucoup d'intensité à l'interface sol pollué-thalle lichénique.

La production des oxalates en abondance au niveau médullaire est stimulée par la pollution métallique. Cette accumulation des oxalates est reliée au stress oxydatif causé par les métaux lourds. Ce stress provoque l'augmentation des antioxydants dont l'acide ascorbique qui constitue d'une part un bon agent de détoxification des espèces réactives de l'oxygène, et d'autre part une source importante d'oxalates. Les teneurs enregistrées par les dosages enzymatiques des oxalates et de l'acide ascorbique présentent une corrélation.

L'accumulation des oxalates et des antioxydants, dont l'acide ascorbique, permet de protéger le partenaire algal, plus vulnérable à différentes formes de stress, contre l'invasion des métaux lourds. Cette protection que procure le partenaire fongique à l'algue permet certainement à ce dernier de fonctionner normalement dans ce milieu très contaminé.

Les impacts des métaux sur le partenaire fongique sont importants. La composition chimique des composés produits au niveau du champignon lichénique a complètement changé chez le *Diploschistes muscorum* d'Auby par rapport aux lichens témoins. Les éléments traces ont perturbé le métabolisme secondaire, ont provoqué une augmentation des oxalates et de leurs précurseurs dont l'acide ascorbique. Ces métaux auront probablement des effets importants sur le partenaire algal.

III.4 Adaptation du *Diploschistes muscorum* à la pollution métallique.

Les algues des lichens sont très sensibles à plusieurs formes de pollution et sont plus vulnérables que les champignons à la présence de pathogènes. La dégradation de la chlorophylle observée chez beaucoup de lichens est reliée à la présence de métaux (Garty *et al* (1985)). Plusieurs expériences récentes ont confirmé que les métaux lourds produisent des effets délétères sur le partenaire algal. Toutefois, certains lichens sont capables de se développer dans des

conditions de pollution drastiques comme par exemple *Cladonia pleurota* qui prolifère sur un site connu par ces dépôts de scories provenant de l'extraction métallique.

L'expérience réalisée par Von Arb & Brunold (1990) sur plusieurs stations de Bienne en Suisse, où des *Parmelia sulcata* ont été transplantés, a montré que certains lichens exposés à la pollution ont produit des quantités élevées de chlorophylle par rapport aux lichens se développant sur des stations où la qualité de l'air est meilleure.

III.4.1 Caractérisation des composés chlorophylliens par HPLC (Kranner *et al* (2002))

III.4.1.1 Extraction

Les acides lichéniques peuvent détruire les composés chlorophylliens durant l'extraction, c'est pour cette raison qu'il est préconisé d'ajouter le CaCO_3 ou MgCO_3 pour neutraliser les acides.

L'extraction peut être effectuée par différents solvants comme l'acétone, l'éthanol (96%) ou le diméthylsulfoxyde (DMSO). Au cours de ce travail, nous avons utilisé la procédure adoptée par Kranner *et al* (2002) : dans un tube Eppendorf, on mélange 50 mg de lichen, 50 mg de CaCO_3 et 1 ml de DMSO (100%). Après centrifugation (pendant 5 minutes à 20°C) et décantation, le surnageant est mélangé à 1 ml d'éthanol 96% et centrifugé pendant 5 minutes. Cette opération est reprise deux à trois fois jusqu'à ce que l'extrait devienne limpide.

III.4.1.2 Conditions de séparation

- Solvant A : acétonitrile/eau/méthanol : 100/10/5 (v/v/v)
- Solvant B : acétone/acétate d'éthyle : 2/1 (v/v)
- Colonne : Spherisorb ODS 5 (250 × 4,6 mm), diamètre des particules 5 µm.
- Débit : 1ml/min
- Gradient d'élution : linéaire de 10 à 70 % de la solution B pendant 18 minutes et stable à 70% pendant 4 min.
- Détection : 440 nm

III.4.1.3 Résultats

Les chromatogrammes de l'extrait au DMSO du lichen métallifère (Auby) et témoin (Merlimont) sont reportés sur les figures 80 et 81.

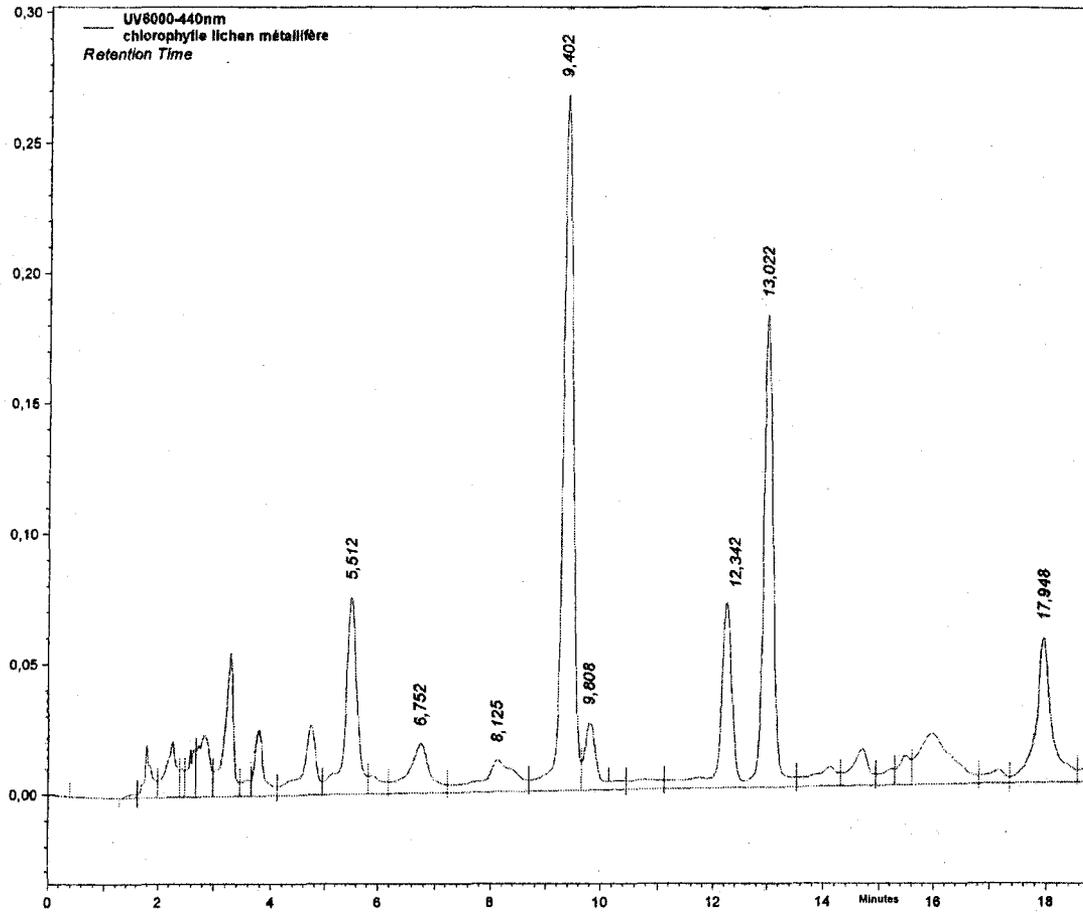


Fig. 80 : Chromatogramme de l'extrait au DMSO du lichen métallifère d'Auby

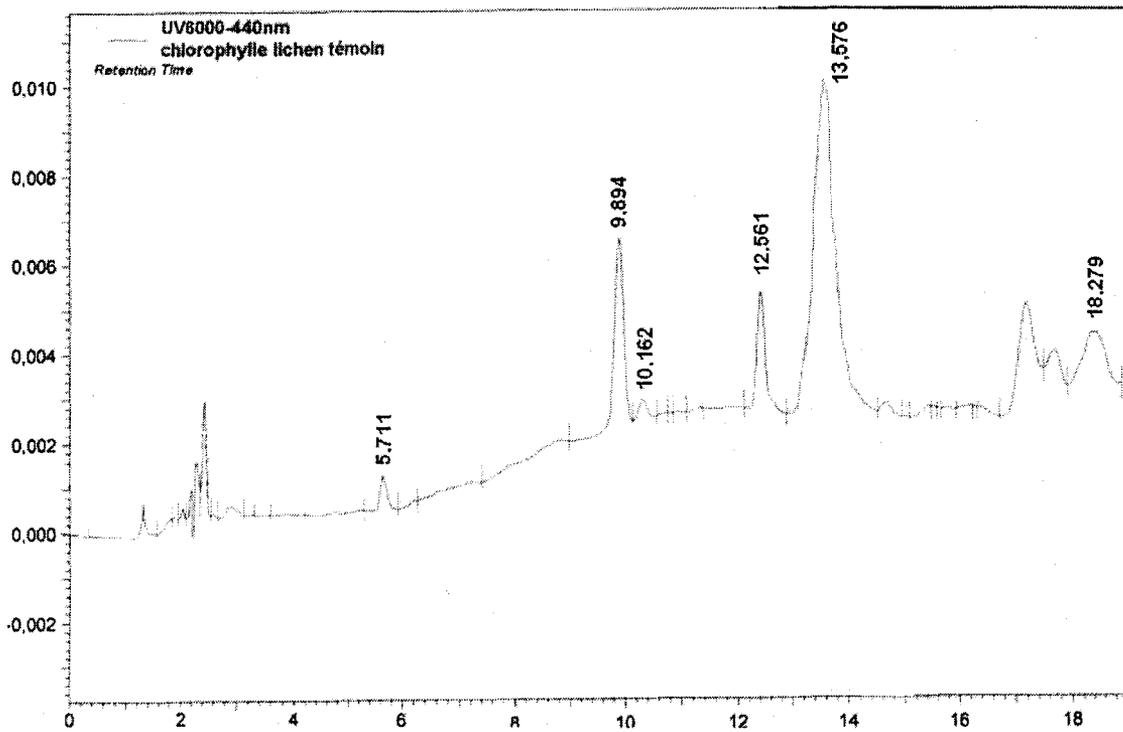


Fig. 81 : Chromatogramme de l'extrait au DMSO du lichen témoin de Merlimont

Les temps de rétention des chlorophylles et des caroténoïdes extraits par le DMSO coïncident avec ceux donnés par Kranner *et al* (2002) comme illustré sur le tableau 29.

Composés	Temps de rétention Tr (références) (en minutes)	Tr (mesurés) (en minutes)	
		Lichen d'Auby	Lichen de Merlimont
Néaxanthine	4,807	5,512	5,711
Violaxanthine	5,769	6,752	-
Anthéaxanthine	7,5	8,125	-
Lucéine	8,846	9,402	9,894
Zéaxanthine	9,23	9,808	10,162
Chlorophylle b	10,961	12,342	12,561
Chlorophylle a	12,5	13,022	13,576
βcarotène	17,307	17,948	18,279

Tableau 29 : Temps de rétention des composés chlorophylliens extraits par le DMSO (Tr mesurés) comparés avec ceux donnés par Kranner *et al* (2002) (Tr références)

Cette étude nous a permis d'identifier les composés chlorophylliens produits par l'algue du *Diploschistes muscorum*. Nous constatons qu'il n'y a pas de dommages apparents sur les chlorophylles du lichen exposé à la pollution métallique. Les concentrations des caroténoïdes sont plus élevées dans le lichen métallifère que dans le lichen témoin et dépassent, dans le cas de la Lucéine, les concentrations des chlorophylles a et b. Ces caroténoïdes produits au niveau du chloroplaste possèdent un caractère antioxydant (Asada & Takahashi (1987)). Ceci montre d'une part, que le stress oxydatif a pu atteindre le partenaire chlorophyllien et d'autre part, que l'algue produit des antioxydants pour lutter contre la formation des radicaux libres. La formation des radicaux libres entraîne une photoinhibition. Cette dernière est irréversible. Certaines plantes vont développer un système de protection qui consiste à transformer la violaxanthine (xanthophylle) en zéaxanthine qui possède un spectre d'absorption fortement semblable à celui de la chlorophylle.

Cette méthode de caractérisation n'a pas pu apporter des informations quantitatives sur le taux de dégradation des chlorophylles et par conséquent sur les effets des métaux lourds sur l'algue. Il nous a paru judicieux de calculer les taux de dégradation de la chlorophylle et de doser les composés chlorophylliens de cette communauté bryolichénique.

III.4.2 Mesures du taux de dégradation de la chlorophylle a et des teneurs des chlorophylles.

III.4.2.1 Extraction

A une quantité de lichen séché et broyé, on ajoute 5 ml de diméthylsulfoxyde (DMSO) et 10 à 20 mg de carbonate de calcium CaCO_3 . Selon Ronen & Galun (1984) l'incubation doit durer 40 minutes à l'obscurité. La suspension est ensuite centrifugée pendant 5 min et les absorbances sont enregistrées à 665, 649, 480, 435 et 415 nm.

N.B. Compte tenu de la photosensibilité des caroténoïdes et des chlorophylles, nous avons réalisé l'extraction à l'abri de la lumière.

III.4.2.2 Calcul du taux de dégradation de la chlorophylle a.

Le taux de dégradation de la chlorophylle a (dit aussi taux de phaéophytinisation) qui exprime le passage de la chlorophylle a à la phaéophytine (forme dégradée de la chlorophylle a) est donné par le rapport des densités optiques à 435 nm et 415 nm puisque le spectre de la chlorophylle a (Fig. 82) présente un maximum à 435 nm et celui de la phaéophytine à 415 nm (Barnes *et al* (1992)).

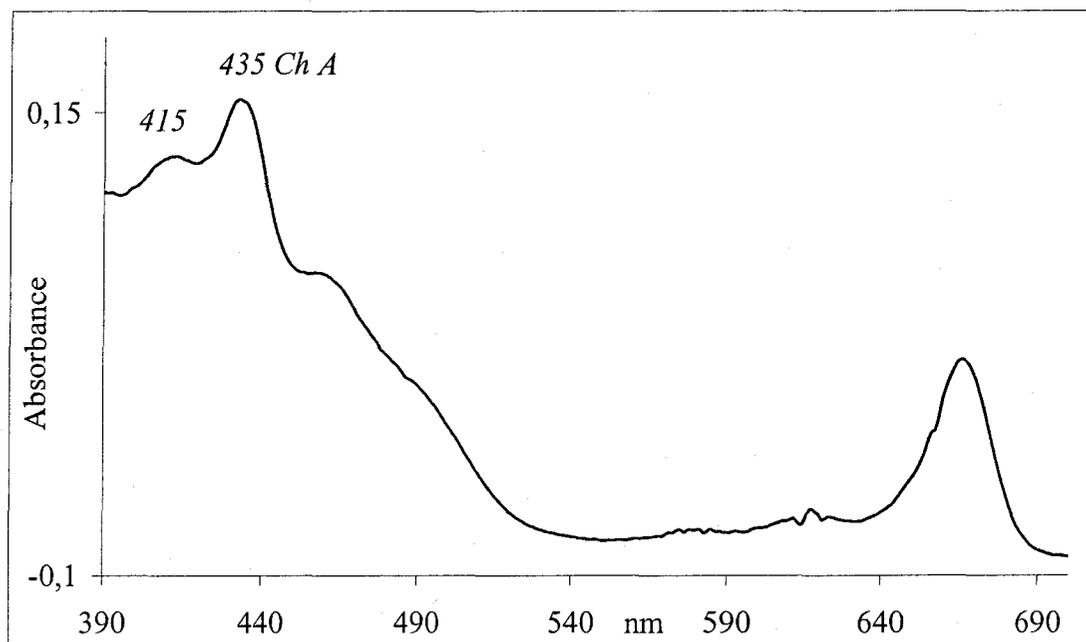


Fig. 82 : Spectre UV-Vis de l'extrait au DMSO du lichen témoin de Merlimont enregistré entre 390 nm et 700 nm

III.4.2.3 Mesures des teneurs des chlorophylles et des caroténoïdes.

Les teneurs de la chlorophylle a et b et des caroténoïdes sont calculées par les équations suivantes (Wellburn (1994)) :

$$C_{(a)} = 12,19 A_{665} - 3,45 A_{649} \quad \text{EQ. 19}$$

$$C_{(b)} = 21,99 A_{649} - 5,32 A_{665} \quad \text{EQ. 20}$$

$$C_{(c)} = (1000 A_{480} - 2,14 C_{(a)} - 70,16 C_{(b)}) / 220 \quad \text{EQ. 21}$$

Avec

$C_{(a)}$, $C_{(b)}$ et $C_{(c)}$ les concentrations respectives de la chlorophylles a, de la chlorophylle b et caroténoïdes.

A_{480} , A_{665} et A_{649} les densités optiques respectives à 480 nm, à 665 nm et à 649 nm.

Les valeurs des coefficients dans les équations 19, 20 et 21 sont telles qu'elles permettent de calculer les concentrations des chlorophylles et caroténoïdes à partir absorbances spécifiques de ces composés.

III.4.3 Résultats

III.4.3.1 Taux de dégradation de la chlorophylle a.

Les valeurs des rapports des densités optiques (Do_{435}/Do_{415}), reportées sur la figure 83 sont calculées à partir de la moyenne de 5 valeurs enregistrées pour chaque lichen.

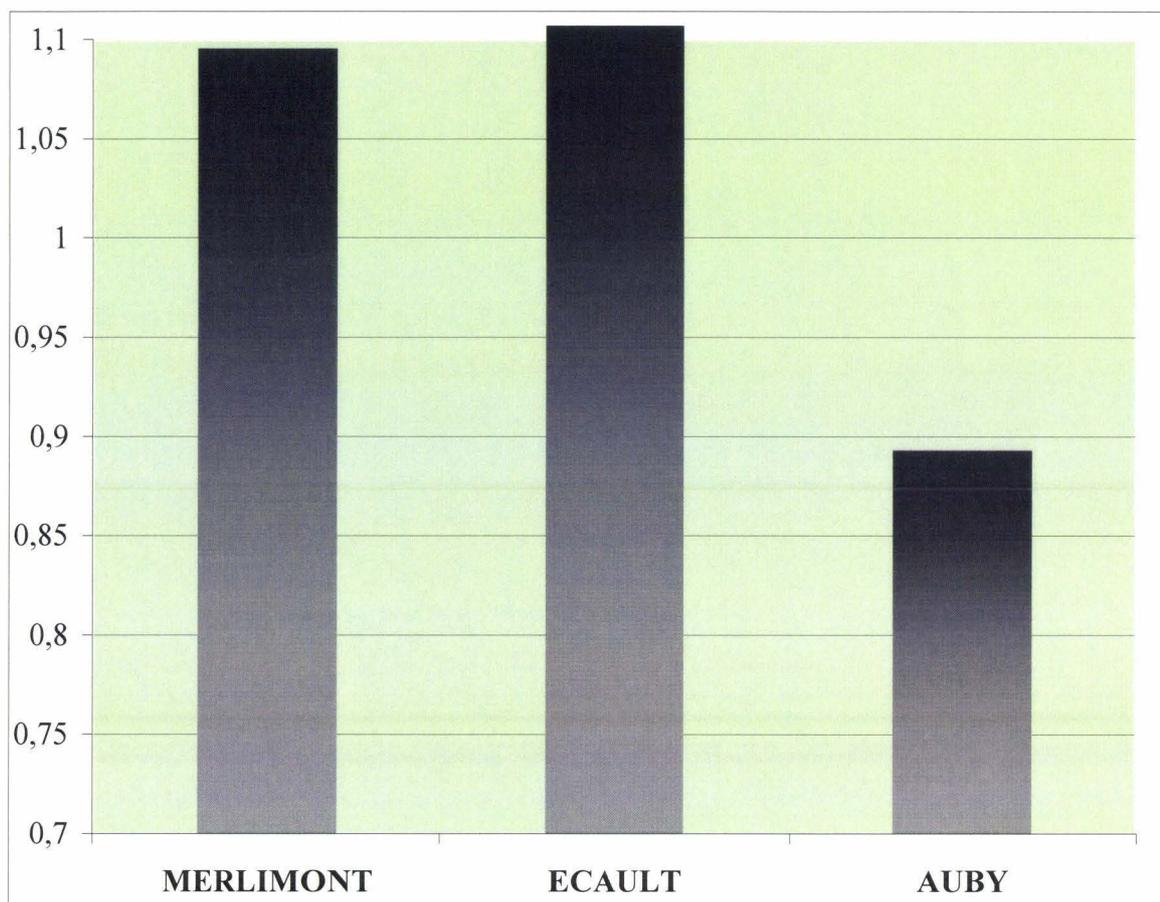


Fig. 83 : Taux de dégradation de la chlorophylle exprimé par le rapport des densités optiques (Do₄₃₅/Do₄₁₅)

Les rapports des densités optiques montrent une légère dégradation de chlorophylle a chez le *Diploschistes muscorum* à Auby par rapport aux lichens témoins.

Le taux de phaéophytinisation a atteint 0,9, 1,09 et 1,107 respectivement pour le *Diploschistes muscorum* d'Auby, Merlimont et Ecault.

Le rapport Do₄₃₅/Do₄₁₅ est généralement compris entre 0,7 (en cas de dégradation totale de la chlorophylle a) et 1,4 pour des cultures *in vitro*. La dégradation de la chlorophylle a n'a pas encore atteint des seuils qui peuvent mettre en jeu la survie de l'espèce à Auby.

Les métaux lourds sont parmi les pathogènes qui peuvent avoir des effets délétères sur les lichens et a fortiori sur les algues symbiotiques. La dégradation de la chlorophylle des lichens *in vivo* observée auparavant a été reliée à la présence des métaux lourds (Garty *et al* (1985)). Des études récentes, réalisées sur des lichens sous conditions contrôlées, ont montré que les métaux lourds produisent des effets physiologiques sur le partenaire algal. Par exemple, la composition de la chlorophylle est altérée par les métaux comme l'ont montré Chettri *et al* (1998) ; Bačkor & Zetíkova (2003). L'augmentation du taux de cuivre intracellulaire du photobionte *trébouxia erici* a provoqué une dégradation de la chlorophylle a, des caroténoïdes et un dysfonctionnement du photosystème II (Bačkor & Váczi (2002) et Bačkor *et al* (2004)).

Hauck *et al* (2003) ont exposé *Hypogymnia physodes* à des solutions de MnCl₂ (0,1, 0,5 et 1 mM). Cette étude a montré que le manganèse provoque une dégradation des chlorophylles a et

b. Ces auteurs ont exposé ce même lichen à des solutions de i) MnCl_2 (1mM), CaCl_2 (1mM) ii) MnCl_2 (1mM) MgCl_2 (1mM). Ils ont remarqué que le fait de mélanger le manganèse avec le calcium et le magnésium diminue la dégradation de la chlorophylle par rapport au manganèse seul. Ce phénomène a été expliqué par la capacité du calcium et du magnésium à diminuer la fixation du manganèse au sein du thalle de *Hypogymnia physodes*. Ils ont remarqué également que l'ajout de FeCl_3 à MnCl_2 diminue aussi la dégradation de la chlorophylle et ont conclu que le manganèse cause une déficience en fer chez le *Hypogymnia physodes*. Le fer est requis pour la conversion de la protoporphyrine IX à la protochlorophyllide dans le métabolisme de biosynthèse de la chlorophylle (Horst (1988), Beale (1999)). L'accumulation de protoporphyrine IX et la dégradation simultanée de la chlorophylle par le manganèse sont connues chez les cyanobactéries et chez les plantes vasculaires (Csatorday et (1984), Clairmont (1986)).

Hauck *et al* (2002) ont étudié le rapport Mg/Mn et ont trouvé une corrélation entre la dégradation de la chlorophylle et la diminution de ce rapport. Le manganèse déplace probablement le magnésium de la chlorophylle. L'affinité des métaux lourds pour la férrodoxine (produite au niveau des stromas thylacoïdaux) provoque une diminution de la chlorophylle par un déplacement de l'ion Mg^{2+} conduisant ainsi à la formation de la phaéphytine (McQuattie & Schier (2000)).

Chez le *Diploschistes muscorum*, les quantités élevées de métaux lourds n'ont pas causé des dommages qui peuvent altérer complètement la chlorophylle. Nous pensons que ce lichen a développé un mécanisme de tolérance au niveau du partenaire algal qui permet à cette espèce de continuer à proliférer dans le site calaminaire d'Auby.

Généralement le photobionte est considéré comme plus sensible aux métaux lourds que le mycobionte. Cette sensibilité détermine celle du lichen. Cependant, certains algues symbiotiques ont développé un mécanisme de tolérance vis-à-vis des éléments traces (Reed & Gadd (1989) et Venkataraman *et al* (1992)).

Le mécanisme de tolérance chez les algues des lichens est encore mal connu. Chez certaines plantes, ce processus induit la production des peptides (dits aussi phytochélatines) pour fixer les métaux lourds (Grill *et al* (1987)) permettant ainsi une détoxification et une homéostasie. Gekeler *et al* (1989) ont isolé des algues de la *Chlorella fusca* des complexes de cadmium constitués de peptides phytochélatine, (γ -Glu-Cys)-n-Gly, n est compris entre 2 et 5. L'impact des métaux lourds sur la biosynthèse des phytochélatines suit cette séquence : $\text{Hg} > \text{Ag} > \text{Cu} > \text{Pb} > \text{Zn}$ (Grill *et al* (1987)).

Bulter *et al* (1980) ont observé la formation de complexes organométalliques par l'algue du *Chlorella vulgaris*. Ces complexes, abondants au niveau de l'environnement proche des cellules algales, agissent comme une barrière qui fixe les métaux lourds chez des cellules tolérantes et protègent ainsi le métabolisme cellulaire de l'invasion des pathogènes.

III.4.3.2 Teneurs en chlorophylles et en caroténoïdes.

La teneur en chlorophylles est un paramètre important qui permet de comprendre l'impact des éléments traces sur le partenaire algal ainsi que la réponse biologique de ce dernier à la pollution métallique. Compte tenu de la dégradation de la chlorophylle a chez le *Diploschistes muscorum*, on pourrait s'attendre à une diminution des teneurs en chlorophylles a et b du patenaire algal du lichen métallifère par rapport au photobionte non exposé à la pollution.

Contrairement à toute attente, les teneurs des composés chlorophylliens sont très élevées dans le lichen d'Auby par rapport aux lichens témoins comme le montre la figure 84.

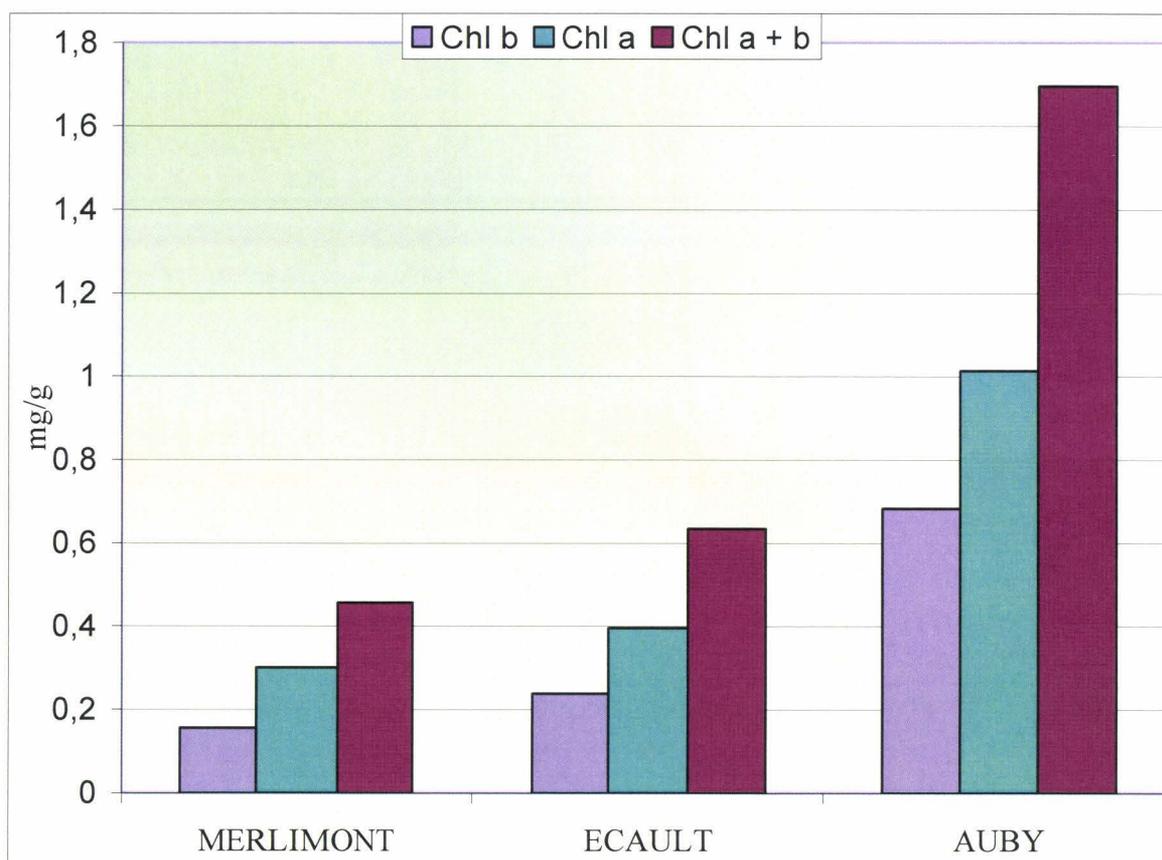


Fig. 84 : Taux de chlorophylles a et b du lichen témoins (Merlimont et Ecault) et du lichen métallifère d'Auby

La teneur en chlorophylle a dans le lichen métallifère est de l'ordre de 1 mg/g soit 60% de plus que le taux enregistré à Ecault (0,4 mg/g) et 70% de plus que le taux enregistré à Merlimont (0,3 mg/g). La concentration de chlorophylle b est de l'ordre de 0,7 mg/g à Auby alors que celle d'Ecault est de l'ordre de 0,24 mg/g et 0,16 mg/g à Merlimont soit 66 % et 78 % d'augmentation à Auby par rapport à Ecault et à Merlimont.

La bioindication lichénique est largement utilisée dans plusieurs champs expérimentaux notamment pour la photosynthèse, les teneurs des composés chlorophylliens (Garty (1985)) ou l'accumulation des polluants atmosphériques comme SO₂ (Pilegaard (1979), Nieboer & Richardson (1981)). Des études sur l'inhibition de la photosynthèse et la diminution de la

concentration en chlorophylles ont été réalisées *in vitro* en présence de SO₂ (Grace *et al* (1985)), NO₂ (Nash (1976)) ou l'ozone (Ross & Nash (1983)). Ces études ont montré que ces polluants ont des impacts sur la physiologie du lichen.

Il existe une multitude de publications concernant l'impact des métaux lourds sur les lichens et plus particulièrement sur le partenaire algal. Plusieurs travaux traitant les atteintes physiologiques produites par les éléments traces métalliques chez les algues lichéniques ont été réalisés y compris l'étude des concentrations des chlorophylles.

Les métaux lourds peuvent dégrader la chlorophylle s'ils arrivent à pénétrer dans les cellules algales. Ils provoquent un dysfonctionnement dans le métabolisme de biosynthèse de la chlorophylle où ils peuvent déplacer l'ion Mg²⁺ de la chlorophylle pour former la phaeophytine (voir partie III.4.3.1).

Les lichens possèdent des comportements variés. Les algues symbiotiques présentent une sensibilité variable aux métaux lourds. Chettri *et al* (1998) ont remarqué que le cuivre provoque une diminution des teneurs de chlorophylles du *Cladonia convoluta* à partir de 175 µg/g de cuivre accumulé par cette espèce alors que l'accumulation de 1600 µg/g de cuivre n'a pas causé une diminution des chlorophylles chez le *Cladonia rangiformis*.

Certaines algues lichéniques tolèrent des quantités élevées de métaux et gardent leurs concentrations en chlorophylles inchangées (voire même plus élevées dans certains cas) par rapport aux mêmes algues se développant loin des sources de pollution.

Von Arb & Brunold (1990) ont étudié les réponses physiologiques *in situ* du *Parmelia sulcata*, une espèce plutôt résistante à la pollution, soumise à différents niveaux de pollution atmosphérique (SO₂, NO_x et métaux lourds notamment Pb, Cd, Cu et Zn) dans la ville et la périphérie de Bienne (Suisse). Ces auteurs ont déterminé son taux de croissance, sa photosynthèse nette et brute, l'émission des assimilats de carbone, sa respiration dans le noir et son contenu en protéine et en chlorophylle. Le taux de croissance maximal était sept fois plus élevé par rapport au taux minimal enregistré dans les sites les plus pollués du centre ville. Le contenu de la chlorophylle le plus élevé a été enregistré au centre de la ville. Il a été, au maximum, quatre fois plus faible dans les sites de la banlieue. Le pourcentage des assimilats de carbone émis par les cellules algales vers le mycobionte a été, au centre ville, jusqu'à 15 fois plus bas que dans les autres sites. Les autres paramètres n'ont pas différencié significativement entre les 13 sites étudiés. La pollution atmosphérique a beaucoup influencé le taux de croissance du *Parmelia sulcata* (Lawrey & Hale (1979)). Le transfert des assimilats de carbone de l'algue vers le champignon, observé aussi par Fields & Clair (1984), joue un rôle déterminant quant aux effets de la pollution atmosphérique sur les lichens. L'augmentation inattendue de la chlorophylle est attribuée à une fertilisation due à la présence de l'azote (NO₂) émis par les industries et le trafic autoroutier à Bienne (Holopainen (1983), Kauppi & Mikkonen (1980)).

Chez le *Diploschistes muscorum*, nous pensons que c'est le même mécanisme qui a causé cette augmentation des chlorophylles puisque le lichen métallifère prolifère dans une zone urbanisée et reçoit les retombées atmosphériques des deux sites industriels ainsi que les dépôts

atmosphériques provenant de la départementale D420, alors que les lichens témoins poussent dans deux réserves naturelles loin de toute source de NO_x.

Cette production élevée des chlorophylles constitue une réponse biologique à la phaéophytinisation causée par les éléments traces. Ceci est un autre mécanisme de tolérance développé par ce lichen et plus précisément au niveau de l'algue du *Diploschistes muscorum*, pour compenser la dégradation de chlorophylle.

Les concentrations des caroténoïdes trouvées chez le *Diploschistes muscorum* (Fig. 85) sont corrélées avec celles des chlorophylles. Les teneurs de ces pigments restent élevées dans le lichen contaminé par rapport aux deux lichens non exposés à la pollution métallique.

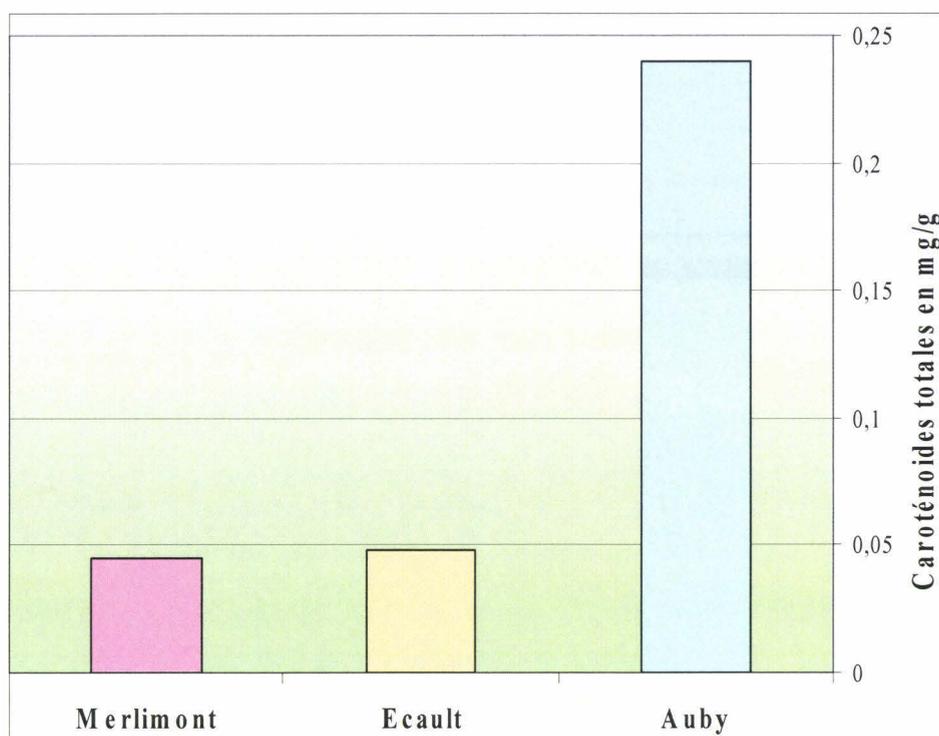


Fig. 85 : Teneurs des caroténoïdes totales chez le lichen d'Auby et les deux lichens témoins

Les mesures des densités optiques des pigments majeurs (β carotène 478 nm, lutéine 461 nm, violaxanthine 455 nm et neoxanthine 453 nm) (Wellburn (1994)) démontrent un comportement similaire à celui des chlorophylles (Fig. 86).

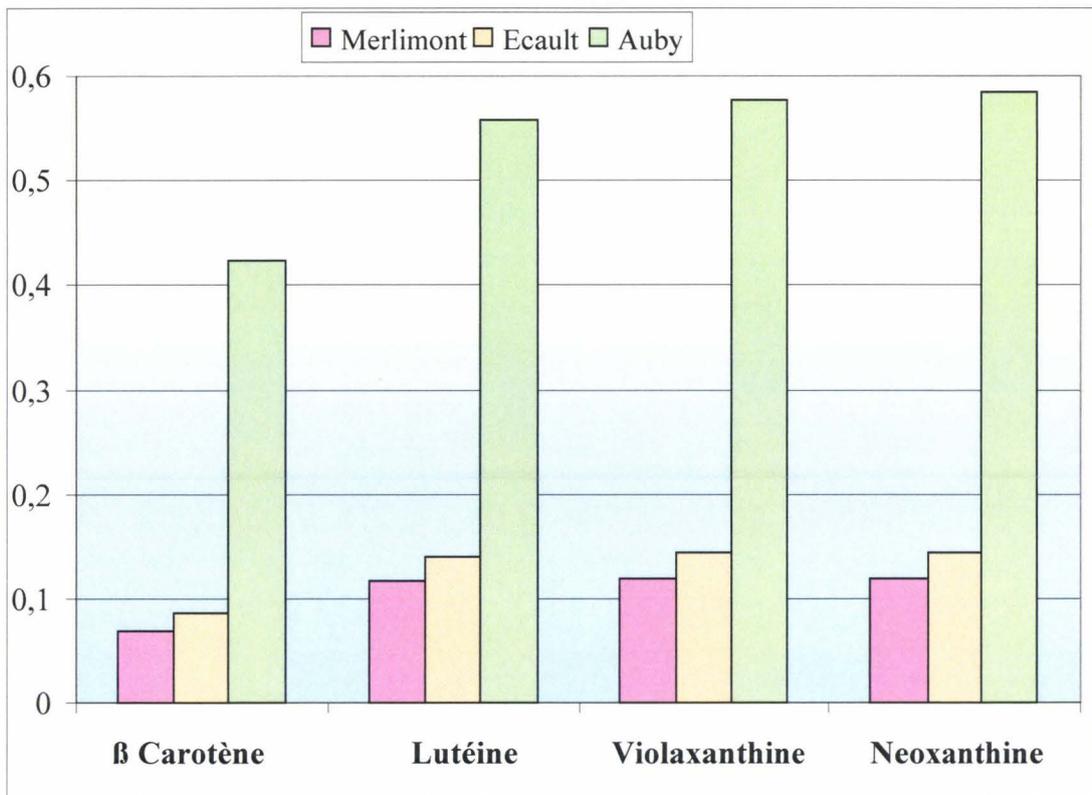


Fig. 86 : Densité optique des caroténoïdes primaires ; β carotène 478 nm, lutéine 461 nm, violaxanthine 455 nm, neoxanthine 453 nm

Les caroténoïdes participent à l'activité photosynthétique chez les végétaux. Ils contribuent à la protection des chlorophylles en réduisant la photo-oxydation des ces derniers (Adams *et al* (1993)).

Ra *et al* (2005) ont remarqué une augmentation des concentrations des chlorophylles et des caroténoïdes chez *Platismatia glauca* dans une zone polluée industrielle à Seattle aux Etats-Unis. Ces auteurs ont proposé un effet stimulant des polluants atmosphériques (NO_x, SO₂ et CO₂) dans l'augmentation du taux de composés chlorophylliens. L'azote issu de l'atmosphère joue un rôle important dans ce phénomène. L'accroissement de l'activité photosynthétique augmente avec le taux de chlorophylle et ce taux augmente avec la disponibilité de l'azote dans les tissus.

Ces auteurs ont remarqué une augmentation du taux de carbone fixé par le *Platismatia glauca* exposé à la pollution et ont relié ceci à l'activité photosynthétique accrue de ce lichen.

Dans la communauté du *Diploschistes muscorum* la fixation du carbone est utilisée pour alimenter, en grande partie, le métabolisme des composés chlorophylliens. Nous pensons que le carbone fixé alimente d'autres métabolismes comme celui des ascorbates et des oxalates.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Au delà des modifications des communautés bryolichéniques terricoles qui avaient permis de mettre au point une échelle de bioestimation de la contamination des sols, Cuny (1999) avait constaté des modifications cellulaires et chimiques du *Diploschistes muscorum* en relation avec le mécanisme de tolérance développé par cette espèce.

Notre travail avait pour objectif d'identifier analytiquement les molécules présentes dans le *Diploschistes muscorum* exposé aux éléments traces métalliques afin d'interpréter son comportement accumulateur et les impacts des métaux lourds sur les voies de biosynthèse.

Nous avons analysé par ICP-AES les teneurs en métaux (éléments traces et macroéléments) contenus dans les thalles métallifères et témoins. Les résultats de cette analyse démontrent l'accumulation d'une quantité élevée d'éléments dans les thalles d'Auby par rapport aux thalles témoins. En plus des dépôts atmosphériques qui se sont amassés sur ce site pendant plusieurs années, le site métallifère a subi des dépôts ponctuels et incontrôlés de scories provenant des activités d'extraction minière. Les résidus d'extraction sont extrêmement toxiques pour la végétation locale. Le *Diploschistes muscorum* fait partie des espèces métallophytes qui prolifèrent sur ce site calaminaire. Il a développé une résistance surprenante à l'agression par les métaux lourds.

Les acides lichéniques pourvus de sites potentiels de fixation des éléments traces métalliques (en grande partie des COOH et OH) contribuent à l'accumulation des métaux lourds. Afin d'étudier la réactivité de ces molécules vis-à-vis des métaux, nous avons étudié les spectres IRTF de modèles moléculaires, dont les structures se rapprochent de celles des acides lichéniques, avant et après complexation avec le zinc. Les perturbations spectrales apportées aux sites actifs ont été projetées aux macromolécules lichéniques. Les résultats de l'analyse spectrale des acides lichéniques du commerce (acide usnique, orcinol, atranorine) et des acides lichéniques spécifiques au *Diploschistes muscorum*, synthétisés dans le cadre de l'étude, acide lécanorique décarboxylé et acide orsellinique, confirment l'implication des sites COOH et OH dans la fixation des métaux. Ainsi, nous avons remarqué la disparition des bandes relatives à ces groupements au profit des bandes relatives aux vibrations des groupements carboxylates et phénolates confirmant le passage de la forme « acide » à la forme « sel ». L'examen de la littérature portant sur l'ensemble des molécules étudiées nous a permis de proposer des structures stables des complexes formés.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la quantification de l'accumulation du zinc par les acides lichéniques et par le thalle lichénique. Dans un premier temps, nous avons analysé les quantités de zinc fixées par quelques molécules lichéniques. Cette étude a révélé que l'acide usnique a fixé beaucoup plus de zinc que les autres molécules et que les quantités de métal fixées varient proportionnellement au nombre de sites actifs présents dans chaque molécule.

En accord avec les observations faites sur les molécules modèles, Les spectres IRTF du lichen témoin (Ecault) et du lichen métallifère ont révélé une augmentation de l'intensité des bandes COO⁻ du lichen d'Auby par rapport au lichen d'Ecault. Le nombre de sites COO⁻

impliqués dans des liaisons métalliques est plus élevé par rapport au lichen non exposé aux métaux lourds.

Le lichen d'Ecault a été pollué au laboratoire par le zinc et les teneurs des éléments libérés ont été mesurées par ICP-AES afin de pouvoir déterminer la quantité du métal fixé, la nature et les concentrations des cations relargués. Nous avons constaté que les cations Ca^{2+} libérés sont remplacés par des cations de zinc. De plus les spectres IRTF de ce même lichen mis en contact avec des solutions de zinc de concentrations croissantes montrent que le nombre de sites COO^- impliqués dans des liaisons métalliques augmente avec la concentration de zinc ajoutée. Le zinc arrive donc à déloger les macroéléments et surtout les cations Ca^{2+} des sites COO^- . Nous avons attribué ce phénomène à une sélectivité de la fixation du zinc favorisée par la taille et la concentration extérieure de celui-ci.

Nos recherches se sont ensuite orientées vers l'identification des métabolites secondaires et l'impact des métaux sur la voie de biosynthèse de ces composées.

L'extraction des constituants lichéniques a été étudiée d'une manière systématique en faisant varier la polarité des solvants et des mélanges de solvants pour obtenir une vision la plus exhaustive possible des molécules complexantes des métaux. Le protocole d'extraction que nous avons employé (destiné généralement à l'extraction des molécules à visée médicinale) permet de séparer les grandes familles de molécules. L'emploi de solvants de polarité croissante permet d'extraire des métabolites de différents compartiments du thalle lichénique. Notre intérêt pour les métabolites secondaires déposés sur la surface du tissu végétal a amené à focaliser notre travail sur l'extrait au dichlorométhane.

La séparation par chromatographie sur couche mince de l'extrait au dichlorométhane, après une mise au point de conditions optimales de résolution, a montré deux faits intéressants :

- Il existe une différence de composition et de polarité des métabolites du lichen témoin et du lichen métallifère.
- Certains spots sont très rapprochés (polarités voisines), ce qui peut poser des difficultés de séparation à grande échelle par colonne ouverte.

Grâce à l'analyse de l'extrait au dichlorométhane par HPLC-UV et l'emploi de méthodes standardisées, nous avons pu identifier les métabolites secondaires du *Diploschites muscorum*. La comparaison des valeurs expérimentales et théoriques des indices de rétention et des longueurs d'ondes d'absorption maximales (λ_{max}) a apporté des informations précises sur la nature des acides lichéniques. Deux autres techniques ont été utilisées pour confirmer la présence de ces molécules dans les thalles du *Diploschites muscorum*, il s'agit de l'injection des acides lichéniques de synthèse par HPLC-UV et la séparation par CLHP-SM.

Les résultats présentés montrent que les polluants métalliques à des concentrations réelles de terrain affectent significativement la chimie du lichen *Diploschites muscorum*. L'interprétation de ces résultats a révélé un blocage du métabolisme secondaire puisque les composés les plus élaborés du processus métabolique sont totalement absents dans le lichen métallifère. Contrairement au lichen d'Auby, le lichen témoin contient des métabolites

structurellement très développés ainsi que des molécules intermédiaires entre les molécules monocycliques et les dépsidones. Les métaux lourds ont causé une perturbation du métabolisme secondaire qu'on qualifie de stress chimique.

Afin de comprendre la capacité d'accumulation des éléments traces métalliques développée par cette espèce et après avoir écarté la possibilité de la production de métabolites secondaires hautement réactifs vis-à-vis des métaux lourds, nous avons essayé de trouver un lien avec des molécules de faibles poids moléculaires produites par ce lichen.

L'analyse des spectres IRTF du lichen métallifère après un lavage à l'eau acide a montré que les groupements COOH sont impliqués dans le mécanisme de tolérance aux métaux chez cette communauté bryolichénique. Ceci est en accord avec les résultats antérieurs établissant un environnement oxygéné pour les atomes de zinc chez le *Diploschites muscorum* d'Auby (Sarret *et al* (1998), Cuny (1999)) et plus particulièrement, que les oxalates sont les ligands principaux pour les atomes de zinc. Nous avons ensuite prouvé l'accumulation des structures anioniques oxalates par *Diploschites muscorum* par comparaison des spectres IRTF de ce lichen et ceux des oxalates de métaux (Ca, Pb, Zn) et puis par dosage des oxalates.

Afin de préciser l'origine de ces oxalates, nous nous sommes intéressés à l'acide ascorbique en se basant sur un constat bibliographique récent. Effectivement les teneurs de l'acide ascorbique sont corrélées avec celles des oxalates dans les thalles témoins et métallifères. Ceci permet d'avancer l'hypothèse de l'acide ascorbique, produit en quantité élevée suite au stress oxydatif causé par les métaux lourds, constitue une source importante d'oxalates.

Le partenaire algal n'est pas épargné par les effets des éléments traces métalliques à Auby. Ainsi nous avons constaté une dégradation de la chlorophylle a de l'algue symbiotique exposée aux métaux. En revanche, cette dégradation ne met pas en jeu la survie de l'espèce à Auby puisque les teneurs des chlorophylles et des caroténoïdes sont plus élevées dans le lichen de ce site que dans les lichens témoins. Cette augmentation inattendue des concentrations des composés chlorophylliens constitue une réponse biologique à l'agression par les métaux lourds et une contribution au mécanisme de tolérance développé par cette espèce.

Les lichens dépendent du milieu environnant pour assurer leur nutrition. Le *Diploschites muscorum* d'Auby prolifère dans un milieu contaminé par différents polluants, notamment des polluants gazeux comme le NO_x et le CO₂. La métabolisation de ces composés permet d'alimenter le processus métabolique des chlorophylles et des caroténoïdes.

Nous n'excluons pas la possibilité d'utiliser le dioxyde de carbone fixé pour alimenter d'autres métabolismes comme ceux à l'origine de la production de l'acide ascorbique et de l'acide oxalique.

L'un des écueils de ce travail était la séparation de quantités élevées de composés lichéniques par chromatographie sur colonne. L'emploi de nouvelles stratégies de séparation basées sur des solvants offrant une large de gamme polarité est en cours.

Nous avons commencé une étude sur la réactivité radicalaire de deux molécules (acide oxalique et l'acide 3,5 dihydrobenzoïque) par voltamétrie cyclique pour déterminer le potentiel

standard des molécules mises en jeu dans la complexation des éléments traces métalliques et accéder aux caractéristiques thermodynamiques des sites actifs.

Les résultats obtenus sont concluants car on a remarqué que le zinc mélangé avec ces deux molécules se lie tout d'abord avec des ligands oxalates et ensuite avec les ligands 3,5 dihydrobenzoïque. L'utilisation d'autres molécules lichéniques devra apporter des informations sur la nature des liaisons que forme le zinc avec les différents ligands et les cinétiques des réactions de complexation.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Adams III W.W., Demming-Adams B. & Lange O.L., 1993**, Carotenoid composition and metabolism in green and blue-green lichens in the fields, *Oecologia*, 94, 576-584.
2. **Ahrland S., Chatt J. & Davies N.R., 1958**, The relative affinities of ligand atoms for acceptor molecules and ions, *Quarterly Review*, 12, 265-76.
3. **Antonelli M.A., Ercole P. & Campanella L., 1998**, Studies about the absorption on lichen *Evernia prunastri* by enthalpimetric measurements, *Talanta*, 45, 1039-1047.
4. **Araujo P.Z., Morando P.J. & Blesa M.A., 2005**, Interaction of Catechol and Gallic Acid with Titanium Dioxide in Aqueous Suspensions. 1. Equilibrium Studies, *Langmuir*, 21, 3470-3474.
5. **Asada K. & Takahashi M., 1987**, Production and scavenging of active oxygens in *chloroplasts*, in Kyle D.J., Osmond C.B., Arntzen C.J. (eds), *Photoinhibition*, Elsevier, Amsterdam, 227-287.
6. **Asahina Y., 1941**, Chemismus der Cladonien unter besonderer Berücksichtigung der japanischen arten, 2, Untergattung *Caldonia* (Hill) Wed, *Jpn. Bot.*, 17, 620-630.
7. **Ascaso C., Galvin J. & Rodriguez-Pascual C., 1982**, The weathring of calcareous rocks by lichen, *Pedobiologia*, 24, 219-256.
8. **Bačkor M. & Váczi P., 2002**, Copper tolerance in the lichen photobiont *Trebouxia erici* (Chlorophyta), *Environmental and experimental botany*, 48, 11-20.
9. **Bačkor M. & Zetkova J., 2003**, Effects of copper, cobalt and mercury on the chlorophyll content of lichens *Cetraria islandica* and *Flavocetraria cucullata*, *Journal of Hattori Botany Laboratory*, 93, 175-187.
10. **Bačkor M., Fahselt D. & Wu C.T., 2004**, Free proline content is positively correlated with copper tolerance of the lichen photobiont *Trebouxia erici* (Chlorophyta), *Plant Science*, 167, 151-157.
11. **Baker A.J.M & Brooks R., 1989**, Terrestrial higher plants which hyper-accumulate metallic elements, a review of their distribution, ecology and phytochemistry, *Biorecovery*, 1, 81-126.
12. **Bargagli R. & Nimis P.L., 2002**, Guidelines for the use of epiphytic lichens as biomonitors of atmospheric deposition of trace elements. In : Nimis, P.L., C. Scheidegger, and P.A. Wolseley, (eds). *Monitoring with Lichens-Monitoring Lichens*, NATO Science Series IV. Earth and Environmental Sciences. Vol. 7. Kluwer Academic Publishers. 408.
13. **Bargagli R. & Mikhailova I., 2002**, Accumulation of inorganic contaminants, in : Nimis, P.L., Scheidegger, C. et Wolseley, P.A. (eds.), *Monitoring with lichens - Monitoring lichens*, Kluwer Academic Publishers, NATO Science Series, p. 65-84.
14. **Bargagli R., 1989**, Determination of metal deposition patterns by epiphytic lichens. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 18, 249-256.
15. **Beale S.I., 1999**, Enzymes of chlorophyll biosynthesis, *photosynth. Res.*, 60, 43-73.
16. **Beckett R.P. & Brown D.H., 1984**, The relationship between cadmium uptake and heavy metal tolerance in the lichen genus *Peltigra*, *New phytologist*, 97, 301-311.
17. **Blandin P., 1986**, Bio-indicateurs et diagnostic des systèmes écologiques. *Bulletin d'Ecologie*, 17, 215-307.
18. **Boissière J.C., 1968**, La chitine chez quelques lichens : mise en évidence localisation, *Bulletin de la société botanique de France*, Colloque sur les lichens, 11-17 novembre, Paris, 141-150.
19. **Branquinho C. & Brown D.H., 1994**, A new method for studying the cellular location of lead in lichens, *The lichenologist*, 26(1), 83-90.

20. Branquinho C., Brown D.H., Máguas C. & Catarino F., 1997, Lead (Pb) uptake and its effects on membrane integrity and chlorophyll fluorescence, *Environmental and experimental botany*, 38, 165-179.
21. Brooks R., Lee J., Reeves R.D. & Jaffré T., 1997, Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants, *Journal of geochemical exploration*, 7, 49-77.
22. Brown D.H., 1982, Uptake of mineral elements and their uses in pollution monitoring, in A.F. Dyer and J.G. Duckett (eds), *Experimental biology of bryophytes*, academic press, New York, 229-255.
23. Brown D.H. & Beckett R.P., 1985, Minerals and lichens : acquisition localization and effects, in : *surface physiology of lichens*, Vicente C., Brown D.H. et Legaz M.E (eds), Universidad complutense de Madrid, Madrid, 127-149.
24. Brown D.H. & Avalos A., 1993, The role of calcium in intracellular cadmium uptake by the lichen *Peltigera membranacea*, *Annals of botany*, 71, 467-473.
25. Brown D.H. & Beckett R.P., 1984, Uptake and effect of cations on lichen metabolism, *The lichenologist*, 16, 173-188.
26. Brown D.H. & Brown R.M., 1991, Mineral cycling and lichen, the physiological basis, *The lichenologist*, 23(3), 293-309.
27. Brown D.H., 1976, Mineral uptake by lichens, in : *lichenology process and problems*, Brown D.H. Hawsworth D.L. & Baily R.H. (eds), Academic press, New York, 419-439.
28. Brown D.H., 1987, The location of mineral elements in lichen implication for metabolism, *Bibliotheca lichenologica*, 25, 361-375.
29. Browner R.F. & Boorn A.W., 1984, Sample introduction : the achilles heel of atomic spectroscopy, *Analytical Chemistry*, 56, 786A-798A.
30. Budd K., 1988, A high-affinity system for the transport of zinc in *Neocosmospora vasinfecta*, *Experimental mycology*, 12, 195-200.
31. Bulter M., Haskew A.E.J. & Young M.M., 1980, Copper tolerance in the green algae, *Chlorella vulgaris*, *Plant cell Environment*, 3, 119-126.
32. Carballeira A. Carral E. Puente X. & Villares R., 2000, Regional-scale monitoring of coastal contamination. Nutrients and heavy metals in estuarine sediments and organisms on the coast of Galicia (northwest Spain) : in Conti ME, Botrè F. The control of marine pollution : Current status and future trends, special issue of *International Journal of Environment and Pollution (IJEP)*, 13, 534-572.
33. Carreras H.A. & Pignata M.L., 2001, Comparaison among air pollutants, meteorological conditions and some chemical parameters in the transplanted lichen *Usnea amblyoclada*. *Environmental Pollution*, 111, 45-52.
34. Caviglia A.M. & Modenesi P., 1999, Oxidative stress and ascorbic acid contents in *Parmotrema reticulatum* and *Parmelia sulcata* thalli, *The Lichenologist*, 31 (1), 105-110.
35. Chameides W.L., 1989, The chemistry of ozone deposition to plant leaves : Role of ascorbic acid, *Environmental Science & Technology*, 23, 595-600.
36. Chemical Society, 1964, Stability constants, The Chemical Society Special Publications, Nos 17 and 25. *The Chemical Society*, London.
37. Chettri M.K., Cook C.M., Vardaka E., Sawidis T. & Lanaras T., 1998, The effect of Cu, Zn and Pb on the chlorophyll content of the lichens *Cladonia convoluta* and *Cladonia rangiformis*, *Environmental and experimental botany*, 39, 1-10.

38. Chettri M.K., Sawidis T., Zachariadis G.A. & Stratis J.A., 1997, Uptake of heavy metals by living and dead *Cladonia thalli*, *Environmental botany*, 37, 39-52.
39. Chugh L.K., Gupta V.K. & Sawhney S.K., 1992, Effect of cadmium on enzymes os nitrogen metabolism in pea seedling, *phytochemistry*, 31(2), 395-400.
40. Clairmont K.B., Hagar W.G. & Davis E.A., 1986, Manganese toxicity to chlorophyll synthesis in tobacco callus, *Plant physiology*, 80, 291-293.
41. Clark B.M., St Clair L.L., Mangelson N.F, Rees L.B., Grant P.G. & Bench G.S., 2001, Characterisation of Mycobiont adaptations in the foliose lichen *Xanthoparmelia Chlorochroa* (Parmaliaceae), *American journal of Botany*, 88, 1742-1749.
42. Collins C.R. & Farrar J.F., 1978, Sructural resistance to mass transfert in the lichen *Xanthoria parietina*, *New phytologist*, 82, 159-168.
43. Cossu C., Doyotte A., Jacquin M.C. & Vasseur P., 1997, Mécanismes de formation des espèces réactives de l'oxygène, in : *Biomarqueurs en écotoxicology aspects fondamentaux*, Lagadic L., Caquet T., Amirad J.C. & Ramade F.(eds), Masson, Paris, 125-148.
44. Costa G. & Spritz E., 1997, Influence of cadmium on soluble carbohydrates free amino acids protein content of in vitro cultured lupinus albus, *Plant Science*, 128, 131-140.
45. Creveled M., 1981, in : *Epilithic lichen communities in the alpines zone of southern Norway*, Gantner Verlag K.G., Vaduz, 48-55.
46. Csatorday K., Gombos Z. & Szalontai B., 1984, Mn²⁺ and Co²⁺ toxicity in chlorophyll biosynthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 81, 476-478.
47. Culberson C.F. & Ahmadjian V., 1980, Artificial reestablishment of lichens. II. Secondary products of resynthesized *Cladonia cristatella* and *Lecanora chrysoleuca*. *Mycologia*. 72, 90-109.
48. Culberson C.F., & Johnson A., 1976, A standardized two dimensional This Layer chromatographic Methods for Lichen Products, *Journal of chromatography*, 128, 253-259.
49. Culberson C.F., 1972, Improved conditions and new data for the identification of lichen products by the standardized this layer chromatographic method, *Journal of chromatography*, 72(1), 13-125.
50. Cuny D., 1999, Thèse, les impacts communautaires, physiologiques et cellulaires des éléments traces métalliques sur la symbiose lichénique, mise en évidence de mécanismes de tolérances chez le *Diploschistes muscorum* (Scop) R. Sant., Université de Lille II, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Lille.
51. Cuny D., Denayer F.O., De Foucault B., Schumacker R., Colein P. & Van Haluwyn C., 2003, Patterns of metal soil contamination and changes in terrestrial cryptogamic communities, *Environmental Pollution*, 129, 289-297.
52. Cuny D., Pignata, M-L., Kranner I., & Beckett R.P., 2002, Biomarkers for membrane damage and pollution-induced oxidative stress, in : *lichens*. In : *Monitoring with Lichens - Lichen Monitoring*. In P L Nimis, C Scheidegger and P A Purvis, pp 97-110. Dordrecht : Kluwer Academic.
53. Cuny D., Van Haluwyn C., Caron B., & Languereau F., 1997, Stimulation of ascospore germination by fumarprotocetraric acid in *Diploschistes muscorum* (Scop) R. Sant. (Lichenized ascomycotina), *Nova Hedwigia*, 64 (1-2), 103-110.
54. Davey M.W., Van Montagu M., Inzé D., Sanmartin M., Kanellis A., Smirnoff N., Benzie I.J.J., Strain J.J., Favell D. & Fletcher J., 2000, Plant L-ascorbic acid : chemistry, Function, metabolism, bioavailability and effects of processing, *Journal of the science of food and agriculture*, 80, 825-860.

55. Deltoro V.I., Gimeno C., Catalayud A., & Barreno E., (1999), Effects of SO₂ fumigation on photosynthetic CO₂ gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence emission and antioxydantenzymes in the lichens *Evernia prunastri* and *Ramalina farinacea*, *Physiologia Plantarum*, 105, 648-654.
56. Demmig-Adams B. & Adams III W.W., 1992, Photoprotection and other responses of plants to light stress, *Annual review of plant physiology and molecular biology*, 43, 599-626.
57. Denayer F.O., Van Haluwyn C., de Foucault B., Schumacker R. & Colein P., 1999, Use of bryological communities as a diagnostic tool of heavy metal soil contamination (Cd, Pb, Zn) in northern France, *Plant Ecology*, 140, 191-201.
58. Deneke U., Michal G. & Beutler H.O., 1978, Neue Methode zur Bestimmung von Vitamin C in Lebensmitteln, *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 74, 400-403.
59. Déruelle G. & Lallement R., 1983, Les Lichens témoins de la pollution. Vuibert, Paris
60. Dong A., Huang P., Caughey W.S., 1990, Protein secondary structures in water from the second derivative amide I infrared spectra, *Biochemistry*, 29, 3303-3308.
61. Draoui M., Cherkaoui N., Ismaili H., Idrissi O.B., Taoufik J. & Zahid A., 2002, *Proc., International Conference on Plant-Helt-Environment*, May 2002, Rabat-Maroc.
62. DRIRE, 2002, L'industrie au regard de l'environnement en 2001. DRIRE, Douai.
63. Dupuy N., Huvenne J.P., Legrand P. & Le Boulout R., 1995, Application du couplage fibre optique/IRTF pour la classification des huiles végétales par analyse en composantes principales des spectres infrarouges, *Spectra Anal.*, 186, 36-41.
64. Dutton M.V. & Evans C.S., 1996, Oxalate production by fungi its role in pathogenicity and ecology in the soil environment, *Canadian journal of microbiology*, 42, 881-895.
65. Échaubard M., 1995, Les animaux comme indicateurs biologiques de pollution, in : *Proceedings of Marqueurs biologiques de pollution*; 21-22 septembre 1995; Chinon, 335-358.
66. Edwards H.G.M. & Russell N.C., 1998, Vibrational spectroscopic study of iron(II) and iron(III) oxalates, *Journal of Molecular Structure*, 44, 223-231.
67. Edwards H.G.M., Newton E.M., Wynn-Williams D.D., 2003, Molecular structural studies of lichen substances II : atranorine, gyrophoric acid, fumarprotocetraric acid, rhizocarpic acid, calycin, pulvinic dilactone and usnic acid, *Journal of molecular structure*, 651-653, 27-37.
68. Elix J.A. & Gaul K.L., 1986, *Australian Journal of Chemistry*, 39, 316-324.
69. Elix J.A., Jenie U.A & Parker J.L., 1987 a, *Australian Journal of Chemistry*, 40, 2031-2036.
70. Elix J.A., Johnston J. & Parker J.L., 1987 b, A computer Program for the Rapid Identification of Lichen Substances, *Mycotaxon*, 31, 89-99.
71. Fahselt D., 1994, Secondary biochemistry of lichens, *Symbiosis*, 16, 117-165.
72. Fassel V.A., 1978, Quantitative elemental analyses by plasma emission spectrophotometry, *Science*, 202, 183-191.
73. Feige G.B., Lumbsch H.T., Huneck S. & Elix J.A., 1993, The identification of lichen substances by a standandardized high-performance liquid chromatography method, *Journal of chromatography*, 646, 417-427.
74. Fields R.D. & Clair L.L., 1984, The effect of SO₂ on photosynthesis and carbohydrate transfer in the tow lichens : *Collema polycarpon* and *Parmelia chlorochroa*, *American journal of botany*, 71, 986-998.
75. Frausto da Silva J.J.R. & Williams R.J.P., 2001, The biological chemistry of the elements – the inorganique chemistry of life (second edition), Oxford University press inc., New York.

76. Friedl T., 1987a, Thallus development and phycobionts of the parasitic lichen *Diploschistes muscorum*, *The Lichenologist*, 19(2), 183-191.
77. Friedl T., 1987b, Aspects of thallus development in the parasitic lichen *Diploschistes muscorum*, *Bibliotheca Lichenologica*, 25, 95-97.
78. Fu F.N., Deoliveira D.B., Trumble W.R., Sarkar H.K. & Singh B.R., 1994, Secondary Structure Estimation of Proteins Using the Amide III Region of Fourier Transform Infrared Spectroscopy : Application to Analyze Calcium-Binding-Induced Structural Changes in Calsequestrin, *Applied Spectroscopy*, 48, 1432-1441.
79. Gadd G.M., 1993, Interactions of fungi with toxic metals, *New phytologist*, 124, 25-60.
80. Galun M., 1988, The fungus alga relation, in : *CRC Handbook of lichenology*, Galun M. (eds.) Boca Raton CRC press, Vol. I, 147-158.
81. Galun M., Keller P., Malki D., Feldstein H., Galun E., Siegel S.M. & seigel B.Z., 1982, Removal of uranium (VI) from solution by fungal biomass and fungal wall-related biopolymers, *Science*, 219, 285-286.
82. Garrec J.P. & Van Haluwyn C., 2002, Biosurveillance végétale de la qualité de l'air, Lechevalier, Paris.
83. Garty J., 1993, Lichens as biomonitors for heavy metal pollution, in : plants as biomonitors indications for heavy metals in the terrestrial environment, Market B. (eds), VCH, Weinheim, 193-263.
84. Garty J., 2001, Biomonitoring atmospheric heavy metals with lichens : theory and application. *Critical Reviews in Plants Sciences*, 20, 309-371.
85. Garty J., Cohen Y. & Kloog N., 1998, Airborne elements cell membranes, and chlorophyll in transplanted lichens, *J. Environ. Qual*, 27, 973-979.
86. Garty J., Dalun M. & Kessel M., 1979, Localization of heavy metals and other elements accumulated in the lichen thallus, *New phytologist*, 82, 159-168.
87. Garty J., Karary Y. & Harel J., 1993, The impact of air pollution on the integrity of cell membranes and chlorophyll in the lichen *Ramalina duriaei* (De Not.) Bagl. transplanted to industrial sites in Israel, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 24, 455-460.
88. Garty J., Kauppi M. & Kauppi A., 1996, Accumulation of airborne elements from vehicles in transplanted lichens in urban sites, *Journal of Environmental Quality*, 25(2), 265-272.
89. Garty J., Kauppi M., & Kauppi A., 1997, The production of stress ethylene relative to the concentration of heavy metals and other elements in the lichen *Hypogymnia physodes*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 2404-2408.
90. Garty J., Ronen R. & Galun M., 1985, Correlation between chlorophyll degradation and the amount of same elements in the lichen *Ramalina duriaei* (De Not.) Jatta, *Environmental and experimental botany*, 25, 67-74.
91. Garty J., Tomer S., Levin T., Lehr H., 2003, Lichens as biomonitors around a coal-fired power station in Israel, *Environmental Research*, 91, 186-198.
92. Gaucher G.M. & Shepherd M.G., 1968, Isolation of orsellinic acid synthase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 32, 664-671.
93. Gaviglia A.M. & Modenesi P., 1999, Oxydatif stress and ascorbic acid contents in *Parmelia sulcata* thalli, *The lichenologist*, 31(1), 105-110.
94. Gekeler W., Grill E., Winnaker E.L. & Zenk M.H., 1989, Survey of the plant kingdom from the ability to bind heavy metals through phytochélatins, *Z. Naturforsch. C Biosc.*, 44, 361-369.

95. Gombert S. & Asta J., 1998, The effect of refuse incinerator fumes on the lead and cadmium content of experimentally exposed corticolous lichens, *Water Air and Soil Pollution*, 40, 104-129.
96. González C.M. & Pignata M.L., 2000, Chemical response of transplanted lichen *Canomaculina pilosa* to different emission sources of air pollutants. *Environmental Pollution*, 110, 235-242.
97. González C.M., Casanovas S.S. & Pignata M.L., 1996, Biomonitoring of air pollutants from traffic and industries employing *Ramalina ecklonii* (Spreng.) Mey. and Flot. in Cordoba, Argentina, *Environmental Pollution*, 91, 269-277.
98. Gossart P., 2001, Thèse, Contribution à l'étude des interactions de la matière organique des sols avec les métaux lourds Etude structurale et analytique de molécules modèles, Université des Sciences et Technologies de Lille, Lille.
99. Grace B., Gillespie T.J. & Puckett K.J., 1985, Uptake of gaseous sulphur dioxide by the lichen *Cladonia rangiferina*, *Canadian journal of botany*, 63, 797-805.
100. Grill E., Winnacker E.L. & Zenk M.H., 1987, Phytochelatins, a class of heavy metal-peptides from plant, are functional analogous to metallothioneines. *Proc. Natl. acad., USA*, 84, 439-443.
101. Guderley R., Lumbsch H.T. & Feige G.B., 1997, *Ingvariella*, a new genus in the *Thelotrema* family (lichenized Ascomycotina), *Nova Hedwigia*, 64, 147-154.
102. Häffner E., Lomský B., Hynek V., Hällgren J.E., Batič F. & Pfanz H., 2001, Air pollution and lichen physiology. Physiological responses of different lichens in a transplanted experiment following an SO²-gradient. *Water, Air, and Soil Pollution*, 131, 185-2001.
103. Hauck M., Mulack C. & Paul A., 2002, Manganese uptake in the epiphytic lichens *Hypogymnia physodes* and *Lecanora conizaeoides*, *Environmental and Experimental Botany*, 48, 107-117.
104. Hauck M., Paul A., Gross S. & Raubuch M., 2003, Manganese toxicity in epiphytic lichens : chlorophyll degradation and interaction with iron and phosphorus, *Environmental and experimental botany*, 49, 181-191.
105. Hodgkinson A., 1977, Oxalic acid in biology and medicine, Academic press, London.
106. Holopainen T., 1983, Ultrastructural changes in epiphytic lichens *Byoria capillaris* and *Hypogymnia physodes* growing near a fertilizer plant and a pulp mill in central Finland, *Ann. Bot. Fenn.*, 20, 169-185.
107. Honegger R., 1998, The lichen symbiosis-what is so spectacular about it ?, *The lichenologist*, 33(3), 193-212.
108. Horemans N., Foyer C.H., Potters G. & Asard H., 2000, Ascorbate function and associated transport systems in plants, *Plant physiol. Biochem.*, 38, 531-540.
109. Horner H.T. & Wagner B.L., 1995, Calcium oxalate formation in higher plants, in S.R. Khan (eds), *Calcium Oxalate in Biological Systems*, p. 53-72, CRC Press, Florida.
110. Horner H.T., Kausch A.P. & Wagner B.L., 2000, Ascorbic acid : a precursor of oxalate in crystal idioblasts of *Yucca Torreyi* in liquid root culture, *International journal plant science*, 161, 861-868.
111. Horst W.J., 1988, The physiology of manganese toxicity, in R.D. Graham, J. Hannam, N.C. Uren (eds), *Manganese toxicity in soils and plant*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 175-188.
112. Howell G.M., Edwards Emma M., Newton David D. & Wynn-Williams S., 2003, Molecular structural studies of lichen substances II : atranorine, gyrophoric acid, fumarprotocetraric acid, rhizocarpic acid, calycin, pulvinic dilactone and usnic acid, *Journal of Molecular Structure*, 651-653, 1, 27-37.

<http://www.flechten-im-ruhrgebiet.de/Bioindikation/bioindikation.htm>.

113. Huneck S. & Yoshimura I., 1996, Identification of Lichen Substance, Springer - Verlag, Berlin.
114. Huovinen K., 1986, Chromatographic studies on the aromatic lichen substances in *Cladonia*, Section Unicales, Helsinki.
115. Huovinen K., 1987, A standard HPLC method for the analyses of aromatic lichen compounds, *Bibl lichenol*, 25, 457-466.
116. Huovinen K., Hultunen R. & Schantz M., 1982, A standardized HPLC method for the analysis of lichen compounds from genus *Cladonia* (lichen-forming ascomycetes), *Planta medica*, 45, 152-159.
117. Huovinen K., Hultunen R. & Schantz M., 1985, A high performance liquid chromatographie method for the genera *Cladonia*, *Acta pharm fenn*, 94, 99-112.
118. Iskandar I.K. & Syers J.K., 1972, Metal-complex formation by lichen compounds, *Journal of soil science*, 23, 255-265.
119. Jeran Z., Jaëimoviæ R., Batiè F., Smodi B. & Wolterbeek H.Th., 1996, Atmospheric heavy metal pollution in Slovenia derived from results for epiphytic lichens. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 354, 681-687.
120. Jones D. & Wilson M.J., 1985, Chemical activity of lichens in mineral surfaces, *International Biodeterioration*, 21(2), 99-104.
121. Jones D., 1988, Lichens and pedogenesis, in *CRC Handbook of lichenology, Vol III, Galun* (eds), *CRC Press, Boca Raton*, 109-124.
122. Karmous T., Ayed N. & Nowik W., 1997, Caractérisation par chromatographie des lichens tinctoriaux de Tunisie, *Analisis*, 25 (9-10), 321-329
123. Kartnig T., 1987, *Cetraria islandica* Islandisches Moos. *Z Phytother* (8) : 127-130 Nash III, T.H. (1996). *Lichen biology*, Cambridge University Press, p 303.
124. Kauppi M. & Mikkonen A., 1980, Floristic versus single species analysis in the use of epiphytic lichens as indicators of air-pollution in boreal forest region, northern Finland, *Flora*, 169, 255-281.
125. Keates S.A., Tarlyn N., Loewus F.A. & Franceschi V.R., 2000, L-ascorbic acid and L-galactose are sources of oxalic and calcium oxalate in *Pistia stratiotes*, *Phytochemistry*, 53, 433-440.
126. Kostman T.A., Tarlyn N.M., Loewus F.A. & Franceschi V.R., 2001, Biosynthesis of L-ascorbic acid and conversion of carbons 1 and 2 of L-ascorbic acid to oxalic acid occurs within individual calcium oxalate crystal idioblasts, *plant physiology*, 125, 634-640.
127. Kranner I., Beckett R. & Varma A., 2002, Protocols in Lichenology - Culturing, Biochemistry, Ecophysiology and Use in Biomonitoring, in : *Kranner, I., Beckett, R., Varma, A.* (eds), *Springer Verlag, Berlin*.
128. Kricke R. & Feige G.B., 2002, Presentation and comparison of bioindication methods used by selected european countries,
129. Kricke R. & Loppi S., 2002, Bioindication : the I.A.P. approach, in : Nimis, P.L., Scheidegger, C. & Wolseley, P.A. (eds.), *Monitoring with lichens - Monitoring lichens*, Kluwer Academic Publishers, NATO Science Series, p. 21-37.
130. Lagadic L., Caquet T. & Amiard J.C., 1997, Biomarqueurs en ecotoxicologie : principes et définitions. In : Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F. biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Masson, paris, 1-9.
131. Lallement R., Boissière J.C., Boissière M.C., Leclerc J.C., Velly J. & Wagner J., 1986, La symbiose lichénique approche nouvelle, *Bulletin de la société botanique de France*, 133, 41-80.

132. Lartillot S. & Vogel C., 1983, Feuilletts de biologie, *Ibid*, 24(135), 51-52.
133. Lawrey J.D. & Halle M.E., 1979, Lichen growth responses to stress induced by automobile exhaust pollution, *Science* (Washington, D.C.), 204, 423-424.
134. Lopez-Huertas E., Charlton W.L., Johnson B., Graham I.A. & Baker A., 2000, Stress induces peroxisome biogenesis genes. *EMBO J.* 19, 6770-6777.
135. Lumbsch H.T. & Elix J.A., 2003, The lichen genus *Diploschistes* (*Thelotremataceae*) in Australia, *Bibliotheca Lichenologica*, 86, 119-128.
136. Lumbsch H.T., 1989, Die holarktischen Vertreter der Flechtengattung *Diploschistes* (*Thelotremataceae*), *Journal of Hattori Botany Laboratory*, 66, 133-196.
137. MacGillivray T. & Helleur R., 2001, Analysis of lichens under environmental stress using TMAH thermochemolysis-gas chromatography, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 58-59, 465-480.
138. Mateos J.L., Conde E., Miranda C., Vicente C., 1991, Regulation mechanism of phenolic production in the lichen *Himantormia lugubris*, as deduced from the analysis of metabolite accumulation, *Plant science*, 77, 1-9.
139. Mathyse W., 1977, The role of malate oxalate and mustard oil glucosides in the evolution of zinc resistance in herbage plants, *Physiologia plantarum*, 40, 130-136.
140. Matschullat J., Scharnweber T., Garbe-Schönberg D., Walther A. & Wirth V., 1999, Epilithic lichens - atmospheric deposition monitors of trace metals and organohalogenes. *Journal of Air and Waste Management Association*, 49, 1201-1211.
141. McQuattie C. & Schier G.A., 2000, Response of sugar maple (*Acer saccharum*) seedling to manganese. *Can. J. For. Res.*, 30, 456-467.
142. Modenesi P., Piana M. & Piana D., 1998, Surface features in *Parmelia sulcata* (Lichens) thalli growing in shaded exposed habitats, *Nova hedwigia*, 66, 535-547.
143. Mukherjee A.B. & Nuorteva P., 1994, Toxic metals in forest biota around the steel works of Rautaruukki Oy, Raahе, Finland. *Science of the Total Environment*, 151, 3, 191.
144. Nash III T.H., 1996, Nutrients influences elemental accumulation of minerals cycling, in : *lichen biology*, Nash III T.H. (eds.), Cambridge University Press, Cambridge, 136-153.
145. Nash T.H., III, 1976, Sensitivity of lichens to NO₂ fumigations, *Bryologist*, 79, 103-106.
146. Nieboer E. & Richardson D.H.S., 1980, The replacement of the non-descript term heavy metals by biologically and chemically significant classification of metals ions, *Environmental Pollution*, B1, 3-26.
147. Nieboer E. & Richardson D.H.S., 1981, Lichens as monitors of atmospheric deposition, in Atmospheric pollution in natural water, S.J. Eisenreich (eds). *Ann Arbor Science publication*, Ann Arbor, 112-153.
148. Nieboer E., Richardson D.H.S. & Tomassini F.D., 1978, Mineral uptake and release by lichens an overview, *The bryologist*, 81, 226-246.
149. Nimis P.L. & Bargagli R., 1999, Linee guida per l'utilizzo dei licheni epifiti come bioaccumulatori di metalli in traccia. In : Piccini C, Salvati S. *Proc. Workshop «Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio Nazionale»*, Roma 26-27 novembre 1998. A.N.P.A, Roma, 279-287.
150. Nimis P.L., 1999 a, Linee-guida per la bioindicazione degli effetti dell'inquinamento tramite la biodiversità dei licheni epifiti, in : Piccini C. & Salvati S., editor. *Proc. Workshop, «Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio Nazionale »*; 26-27 November 1998; Roma; 267-277.
151. Nimis P.L., 1999 b, The future of the bio-indication with lichens. *International Lichenological Newsletter*, 32.

152. Noctor G. & Foyer C., 1998, Ascorbate and glutathione : keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249–279.
153. Nylander W., 1866, Hypochlorite of lime and hydrate of potash : tow new criteria in the study of lichens, *Journal of the Linnean Society London botany*, 9, 358-365.
154. Ozenda P. & Clauzade G., 1970, Les Lichens, étude biologique et flore illustrée, Masson.
155. Paul A., Hauck M. & Fritz E., 2003, Effects of manganese on element distribution and structure in thalli of the epiphytic lichens *Hypogymnia physodes* and *Lecanora conizaeoides*, *Environmental and Experimental Botany*, 50, 113-124.
156. Pearson R.G., 1963, Hard and soft acids and bases, *Journal of the American Chemical Society*, 85, 3533-3539.
157. Pietro B., Rivas T. & Silva B., 1994, Colonization by lichen of granite dolmens in Galicia (NW Spain), *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 34, 47-60.
158. Pilegaard K., 1979, Heavy metals in bulk precipitation and transplanted *Hypogymnia physodes* and *Dicranoweisia cirrata* in the vicinity of a Danish steelworks. *Water, Air, and Soil Pollution*, 11, 77-91.
159. Polle A., 2001, Dissecting the superoxide dismutase–ascorbate peroxidase–glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis, *Plant Physiology*, 126, 445-462.
160. Puckett K.J., Neiboer E., Gorzynski M.J. & Richardson D.H.S., 1973, Ion-exchange process, *New Phytology*, 72, 329-342.
161. Purvis O.W., 1984, the occurrence of copper oxalate in lichens growing on copper sulphide-bearing rocks in Scandinavia, *The lichenologist*, 16, 197-204.
162. Purvis O.W., 1996, Interactions of lichens with metals, *Science progress*, 79, 283-309.
163. Quevauviller P., Herzig R. & Muntau H., 1996, Certified reference material of lichen (CRM 482) for the quality control of trace element biomonitoring, *The Science of the Total Environment*, 187, 143-152.
164. Ramade F., 1993, Dictionnaire encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'environnement. p 832, *Ediscience internationale*, Paris.
165. Reed R.H. & Gadd G.M., 1989, Metal tolerance in eukaryotic and prokaryotic algae, in : Shaw A.J.(eds), heavy metal tolerance in plants : *Evolutionary aspects*, CRC press, Boca Raton, 105-118.
166. Reis M.A., Alves L.C., Freitas M.C., Van Os, B. & Wolterbeek H.Th., 1999, Lichens (*Parmelia sulcata*) time response model to environmental elemental availability. *The Science of the Total Environment*, 232, 105-115.
167. Richardson D.H.S. & Nieboer E., 1981, Lichens and pollution monitoring, *Endeavour*, 5, 127-133.
168. Richardson D.H.S., 1992, Pollution Monitoring with Lichens, *Naturalists' Handbooks*, 19, Richmond Publishing Co. Ltd., Slough, 76 p.
169. Richardson D.H.S., Kiang S., Ahmadjian V., Neiboer E., 1985, Lead and uranium uptake by lichens, in D.H.Brown (eds), *Lichen physiology and cell biology*, plenum press, 227-245.
170. Rikkinen J., 1995, What's behind the pretty colours? A study on the photobiology of lichens, *Bryobrothera*, 4, 1-239.
171. Ronen R. & Galun M., 1984, Pigment extraction from lichen with dimethylsulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation, *Environmental and experimental botany*, 24, 239-245.
172. Ross L. & Nash T.H., III, 1983, Effect of O₃ on gross photosynthesis of lichens, *Environmental and experimental botany*, 23, 71-77.

173. **Ruhling A. & Tyler G., 1970**, Sorption and retention of heavy metals in the woodland moss *Hylocomium splendens* (Hedw.), *Br et Sch. Oikos*, 21, 92-97.
174. **Sacks R.D., 1981**, Treatise on analytique chemistry, 2^e éd., P.J., Elving, E.J., Meehan, I.M., Kothoff (eds), Part I, Vol 7, Chapitre 6, New York : Wiley.
175. **Sarret G., Manceau A., Cuny D., Van Haluwyn C., Deruelle S., Hazemann J.L., Soldo Y., Eybert-Bérard L. & Menthonnex J.J., 1998**, Mechanism of lichen resistance to metallic pollution, *Environmental Science & Technology*, 32, 3325-3330.
176. **Seshadri T. R. & Subramanian S.S., 1949**, A lichen *Parmelia tinctorum* on a Java monument, *Journal of Scientific and Industrial Research*, 8, 170-71.
177. **Sharma Y.K. & Davis R., 1997**, The effects of ozone on antioxidant responses in plants, *Free Radical Biology and Medicine*, 23, 480-488.
178. **Silberstein L., Siegel B.Z., Siegel S.M., Mukhtar A. & Galun M., 1996**, Comparative studies on *Xanthoria parietina*, a pollution-resistant lichen, and *Ramalina duriaei*, a sensitive species. I. Effects of air pollution on physiological processes, *The Lichenologist*, 28, 355-365.
179. **Sloof J.E., 1995**, As quantitative biomonitors for atmospheric trace-element deposition, using transplants. *Atmospheric Environment*, 29, 11-20.
180. **Sollins P.M., Cromack K., Fogel R. & Li C.Y., 1981**, Role of low-molecular-weight organic acids in the iorganic nutrition of fungi and higher plants, in *The fungal community. Its organization and role in the ecosystem* (D.T. Wcklow & G.D. Carrol (eds)), New York and Basel : Marcel dekker ; Inc, 607-619.
181. **Sterckeman T., Douay F., Proix N. & Fourrier H., 2002**, Contamination des sols vers la profondeur à Noyelles-Godault et Auby, in : *Les éléments traces métalliques dans les sols, approches fonctionnelles et spatiales*, D. Baize et M. Tercé (Coord.), INRA (eds), Paris, chapitre 14, 237-254.
182. **Stevenson F. J., 1994**, Humus chemistry, genesis, composition, reactions, 2nd ed., John Wiley, New York.
183. **Takani M., Yajima T., Masuda H. & Yamauchi O., 2002**, Spectroscopic and structural characterization of copper(II) and palladium(II) complexes of a lichen substance usnic acid and its derivatives. Possible forms of environmental metals retained in lichens, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 91, 139-150.
184. **Tarhanen S., Metssarinne S., Holopainen T. & Oksanen J., 1999**, Membrane permeability response of lichen *Bryoria fuscescens* to wet deposited heavy metals and acid rain, *Environmental Pollution*, 104, 121-129.
185. **Ünalerğlu C., Zümreoğlu-Karan B. & Mert Y., 2002**, Zinc ascorbate : a combined experimental and computational study for structure elucidation, *Journal of molecular structure*, 605, 227-233.
186. **Van Haluwyn C. & Lerond M., 1993**, Guide des lichens, Lechevalier, Paris.
187. **Van Haluwyn C. & Van Herk C.M., 2002**, Bioindication : the Community Approach. In : Nimis, P.L. et al. (eds) : *Monitoring with Lichens-Monitoring Lichens*. NATO Science Series, IV, vol. 7. Kluwer, Dordrecht, pp. 39-64.
188. **Van Haluwyn C., Langerau F. & Cuny D., 1995**, Quelques lichens se développant sur *Armeria maritima* Wild. Subsp. *halleri* (Wallr.) Rothm., *Documents Mycologiques*, 25 (98-100), 459-464.
189. **Vangronsveld J., Mocquot B., Mench M. & Clijsters H., 1997**, Biomarqueurs de stress oxydant chez les végétaux, in : *Biomarqueurs en écotoxicology aspects fondamentaux*, Lagadic L., Caquet T., Amirad J.C. & Ramade F.(eds), Masson, Paris, 165-184.
190. **Vankataraman L.V., Suvarnalatha G. & Manoj G., 1992**, Uptake, accumulation and toxicity of heavy metals in algae, *Phykos*, 31, 173-195.

191. **Vicente C. & Légaz M.E., 1988**, Lichen enzymology, in : *CRC Handbook of lichenology*, Galun M. (eds), Boca Roton CRC Press, Vol. I, 239-281.
192. **Von Arb C. & Brunold C., 1990**, Lichen physiology and air pollution. I. Physiological responses of in situ *Parmelia sulcata* among air pollution zones within Biel, Switzerland, *Canadian journal of botany*, 68, 35-42.
193. **Wachtmeister C.A., 1952**, Studies on the chemistry of lichens. I, Separation of depside components by paper chromatographie. *Acta chem. Scand.*, 6, 818-825.
194. **Weber W.A., 1962**, Environmental modification and lichen taxonomy of the crustose lichens. *Svensk bitanische tidskrift*, 56, 293-333.
195. **Weed R. & Norton S.A., 1991**, Siliceous crusts, quartz rinds and biotic weathering of sandstone in the cold desert of Antarctica, in : *Diversity of environmental biochemistry*, Berthelin J. (eds), Developments in geochemistry 6 Elsevier, Amsterdam, 327-339.
196. **Weisz A.D., Rodenas L.G., Morando P.J., Regazzoni A.E. & Blesa M.A., 2002**, FTIR study of the adsorption of single pollutants and mixtures of pollutants onto titanium dioxide in water : oxalic and salicylic acids, *Catalysis Today*, 76, 103-112.
197. **Wellburn A.R., 1994**, The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as total carotenoids using various solvents with spectrophotometers of different resolution, *Journal of plant physiology*, 144, 307-313.
198. **Wells J.M. & Brown D.H., 1990**, Ionic control of intracellular and extracellular cadmium uptake by the moss *Rhytidiadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst, *New Phytologist*, 116, 541-553.
199. **White F.J. & James P.W., 1985**, A new guide to microchemical techniques for the identification of lichen substances, *British lichen society bulletin*, 57, 1-41.
200. **Yoshimura I., Kinoshita Y., Yamamoto Y., Huneck S. & Yamada Y., 1994**, Analysis of Secondary Metabolites from Lichen by High Performance Liquid Chromatography with a Photodiode Array Detector, *Phytochemical Anal*, 5, 197-205.

Etude physico-chimique de l'accumulation de métaux lourds par les lichens

Impacts sur les voies de biosynthèse et interprétation du mécanisme de tolérance chez Diploschistes muscorum

Résumé Le comportement accumulateur des métaux lourds chez *Diploschistes muscorum* a été étudié analytiquement via des molécules modèles et des acides lichéniques structuralement proches des molécules spécifiques à cette espèce. Par IRTF, les changements spectraux observés chez ces modèles ont été utilisés pour interpréter la complexation des métaux par l'ensemble des molécules du *Diploschistes muscorum*. La quantification de la fixation du métal, effectuée par ICP-AES sur les mêmes modèles moléculaires, a été appliquée par la suite au thalle lichénique. L'ajout du zinc aux thalles non pollués montre que ce métal occupe des sites spécifiques. La taille de l'ion Zn^{2+} favorise l'échange entre ce dernier et les macroéléments du lichen. Après extraction de diverses familles de molécules, à différents compartiments du thalle lichénique, les métabolites secondaires (extraits par le dichlorométhane) ont été identifiés par des techniques chromatographiques. L'interprétation de ces résultats révèle des modifications profondes du processus métabolique du lichen métallifère. Les métabolites de faible poids moléculaire, comme l'acide oxalique, jouent un rôle clef dans la fixation des métaux lourds. Leur abondance au niveau médullaire (à l'interface sol pollué-thalle lichénique), prouvée par le dosage enzymatique et par IRTF, limite les effets toxiques de ces pathogènes. Nous n'avons détecté qu'une faible dégradation de la chlorophylle A dans le lichen métallifère par rapport au lichen témoin. L'augmentation de la production des chlorophylles et des caroténoïdes, favorisée par la métabolisation de l'azote et du dioxyde de carbone atmosphériques, permet de compenser la dégradation de la chlorophylle. L'ensemble de ces deux observations constitue une contribution au mécanisme de tolérance développé par le *Diploschistes muscorum*.

Mots clés : accumulateur, *Diploschistes muscorum*, IRTF, métabolites secondaires, mécanisme de tolérance, acide oxalique, chlorophylle.

Physico-chemical study of the accumulation of heavy metals by the lichens

Impacts on the pathways of biosynthesis and interpretation of the mechanism of tolerance at Diploschistes muscorum

Abstract The *Diploschistes muscorum* accumulating behaviour of heavy metals was analytically studied with molecular models and lichenic acids structurally closed to the specific molecules of this species. The observed spectral changes by FTIR for these models were used to interpret the complexation of metals by the whole molecules of *Diploschistes muscorum*. The quantification of the fixation of the metal was carried out by ICP-AES on the same molecular models and then applied to the thallus. The addition of zinc to the unpolluted thalli shows that this metal take up of the specific sites. The size of the ion of Zn^{2+} favours the exchange between the later and the macro-elements of the lichen. After extraction of various families of molecules, in various compartments of the thallus, the secondary metabolites (extracted by the dichloromethan) were separated and identified thanks to chromatographic techniques. The interpretation of these results reveals deep changes of the metabolic process of the metalliferous lichen. The low molecular weight metabolites, such as oxalic acid, play a predominant role in the fixation of heavy metals. Their abundance at the medullar level (in the polluted soil-thallus interface), proved by enzymatic titration and FTIR, limits toxic effects. We have detected a low degradation of chlorophyll A in the metalliferous lichen compared to the uncontaminated lichen. The increase of the production of chlorophylls and carotenoids, favoured by the metabolisation of nitrogen and CO_2 atmospheric, enables to compensate the degradation of chlorophylls. These two observations seems to be a contribution the mecanism of tolerance developed by the *Diploschistes muscorum*.

Keywords: accumulating, *Diploschistes muscorum*, FTIR, secondary metabolites, mechanism of tolerance, oxalic acid, chlorophyll.

Discipline : Instrumentation et Analyses Avancées, USTL, 59655 Villeneuve d'Ascq, France.

Laboratoire : Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman, LASIR, CNRS UMR 8516, USTL, Villeneuve d'Ascq.

