

**ÉTUDE DE L'HOMÉOSTASIE DES MICRONUTRIMENTS
DE LA FIXATION D'AZOTE AU SEIN DE LA SYMBIOSE
LICHÉNIQUE EN FORÊT BORÉALE**

par

Romain Darnajoux

Thèse présentée au Département de chimie en vue
de l'obtention du grade de docteur ès sciences (Ph.D.)
FACULTÉ DES SCIENCES, UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Juillet 2015

Le 21 juillet 2015

*le jury a accepté la thèse de monsieur Romain Darnajoux
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Jean-Philippe Bellenger
Directeur de recherche
Département de chimie

Docteur Anne Morel-Kraepiel
Évaluateur externe
Princeton University

Professeur Serge Lacelle
Évaluateur interne
Département de chimie

Professeur Olivier Bolduc
Évaluateur interne
Département de chimie

Professeur Yves Dory
Président-rapporteur
Département de chimie

À ma mère

SOMMAIRE

L'azote est un des éléments les plus importants dans la nature. Sa disponibilité limite la productivité d'un grand nombre d'écosystèmes naturels, et influencera sans doute de manière importante leurs réponses aux changements climatiques globaux. La première source d'azote dans les écosystèmes non anthropisés est la fixation biologique de l'azote. Ce processus repose sur un groupe de métallo-enzymes spécifiques, les nitrogénases, dont le cofacteur métallique contient soit du fer et un atome de molybdène, soit du fer et un atome de vanadium, soit uniquement du fer. A ce jour, seule la nitrogénase au molybdène est prise en considération dans la dynamique de l'azote dans les écosystèmes, et ce malgré de nombreux indices indiquant que la nitrogénase au vanadium pourrait avoir un rôle important. Est-ce que la nitrogénase au vanadium est utilisée dans les écosystèmes naturels et quelles sont les conditions favorisant son utilisation ?

Nous avons cherché à répondre à ces questions à l'aide d'un modèle symbiotique tripartite, un lichen, association entre une algue, un champignon et une cyanobactérie fixatrice d'azote. Nous avons tout d'abord développé une méthode d'étude des contenus en métaux des différents symbiotes, puis nous avons étudié la répartition et la régulation du vanadium au sein des différents symbiotes dans différentes conditions environnementales. Nous avons pu démontrer que dans ce modèle, le vanadium possède toutes les caractéristiques d'un micronutriment essentiel à la fixation d'azote. Nous avons également démontré que la disponibilité du molybdène ainsi que les températures, telles que rencontrées en milieux boréaux, seraient deux facteurs importants contrôlant l'utilisation de la V-Nase.

Les résultats présentés dans cette étude apportent une meilleure compréhension de la gestion des métaux cofacteurs de la nitrogénase au sein de la symbiose lichénique. Mais ils permettent surtout de remettre en question le paradigme de l'hégémonie du molybdène sur la fixation biologique de l'azote. Ainsi, la fixation d'azote en milieu continental repose sur un ensemble hétérogène d'enzymes, ce qui autorise aux organismes fixateurs d'azote une grande flexibilité vis-à-vis des paramètres environnementaux comme les

basses températures. Cela leur permet également une meilleure adaptation au stress métallique résultant de carences en micronutriments, notamment celle en molybdène. Ces résultats invitent également à réévaluer les modèles biogéochimiques liant les cycles des micronutriments aux cycles des macronutriments, particulièrement celui de l'azote.

Mots clés : Forêt boréale ; Fixation d'azote ; Nitrogénase ; Vanadium ; Cyanobactérie ; Cyanolichen ; *Peltigera aphthosa* ; *Anabaena variabilis*.

REMERCIEMENTS

Mes remerciements iront tout d'abord à mon maître de thèse, le Professeur Jean-Philippe Bellenger, qui a su m'inspirer et m'aspérer dans le monde de la biogéochimie, et ainsi me permettre de réunir trois passions qui sont au cœur de mon esprit scientifique, la biologie, la chimie et les sciences de la terre. Les trois années passées ont été non seulement l'occasion de me perfectionner par moi-même dans de nombreux domaines, grâce à la latitude que me laissait le prof. Bellenger, mais également d'apprendre à ses côtés le métier de la recherche ; de l'expérience à la paillasse jusqu'aux demandes de bourses et de subventions, en passant par l'enrichissante expérience du débat avec les reviewers et de la réécriture perpétuelle du même article scientifique. Je pense avoir trouvé en la personne du prof. Bellenger plus qu'un chef de laboratoire, mais bien un mentor pour ma future carrière scientifique.

Je souhaiterais particulièrement remercier les organismes canadiens de subvention de la recherche, sans qui cette étude n'aurait pas pu voir le jour, à savoir le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada, ainsi que la Chaire de Recherche du Canada.

Je souhaiterais remercier les membres de mon jury ; le Dr Anne Morel-Kraepiel, qui a bien accepté de relire ma thèse, et de faire le déplacement jusqu'à Sherbrooke pour assister à ma soutenance, le prof. Yves Dory, qui fut le président à la fois de mon jury et de mon comité d'encadrement, le prof. Serge Lacelle, qui a toujours été disponible pour m'apporter son support et son expérience lorsque j'en avais besoin, ainsi que le prof. Olivier Bolduc, qui a accepté de faire partie de mon jury en temps que membre expert.

Je souhaiterais remercier chaleureusement le professeur François Lutzoni et le docteur Jolanta Miadlikowska, de l'université de Duke pour leur aide, leurs support et leurs accueil pendant ces années d'étude

Je souhaite remercier tout les membres du département de chimie de l'université de Sherbrooke, particulièrement son directeur le Prof. Armand Soldera, ainsi que le prof. Guillaume Belanger, qui a accepté d'être membre de mon jury d'examen général. Je remercie la prof. Gessie Brisard pour ses commentaires quant à la forme de mon manuscrit. Je souhaiterais également remercier tous les autres professeurs du département, ainsi que Jean-Marc Chapuzet, Solange Thériault et le personnel de la faculté des sciences pour leurs supports administratifs.

Je souhaiterais également exprimer mes remerciements à René Gagnon, qui n'a jamais été avare de son temps pour répondre à mes questions, pour partager ses connaissances et pour me transmettre son expertise sur les machines et les méthodes analytiques.

Je remercie tous les camarades du laboratoire Bellenger, et je leurs souhaite une bonne réussite dans leurs études ainsi qu'une bonne continuation dans notre beau domaine qu'est la recherche de la connaissance. Je remercie particulièrement Lounès Haroune, avec qui j'ai partagé quatre ans de dévouement solitaire à la recherche, épicés épisodiquement par des pics d'activités sociales intenses dont il a souvent été le compagnon indispensable. Je remercie également Raphaël Cassoulet, pour ses traits d'humour très particulier, mais peut être avant tout pour ses goûts en matière d'animation japonaise qui m'ont permis de renouveler et de rendre moins mauvais mon répertoire nippon.

Je remercie Frédérique Chopin et Georges Brassens pour le support musical qu'ils m'ont apporté durant mes longues nuits de rédaction et de traitements de données.

Je sors maintenant quelque peu de l'université, pour me rapprocher un peu plus de ma vie personnelle. Sur le chemin, je souhaiterais remercier grandement tous mes amis de France et d'ailleurs, pour leur amitié fidèle malgré la distance. Merci aussi pour être venu me voir de ce côté de l'atlantique. Je pourrais énumérer les noms, mais je prendrais trop de place et le risque d'en oublier. Je vais donc simplement remercier toutes les personnes

qui sont venues à mon mariage, et bien plus encore celles qui n'ont pas pu venir, au motif que je ne les avais pas prévenues (*mea culpa*).

Un pas de plus, je me rapproche, et je voudrais remercier mon plus vieil ami, Florian Collonge, le *témoin* et le complice de mes frasques adolescentes. Malgré nos parcours qui divergent, énormément, se sont maintenant 17 ans de vie qui nous unissent cette année.

Je vois maintenant ma porte, et j'en profite pour remercier ma famille, proche et éloignée, pour leurs affections et leurs supports. Particulièrement, je voudrais remercier mon père, Georges Darnajoux, qui m'a donné l'amour de la science, ainsi que la question « Pourquoi ? », question qu'il n'a jamais cessé d'alimenter durant mon enfance. Je voudrais remercier ma sœur, Julie, et sa famille, José, Lillian et Estéban, pour leurs supports et également pour leur compréhension de mon absence, de ne pas pouvoir partager leur quotidien et tous les événements importants de leurs vies. A charge de revanche !

Je suis sur le pas de la porte, et je m'arrête pour remercier celle qui m'a donné plus que n'importe qui pour que j'arrive là où j'en suis aujourd'hui, et sans qui je resterais toujours un peu seul, ma mère Catherine Darnajoux, qui m'a toujours supporté, au propre comme au figuré, pour que je réussisse.

Enfin, j'ouvre la porte après cette journée de travail qui a duré plus de trois ans, et tu es là. Tu m'as attendu et tu m'as rejoint, toi, Kim Bernadac, la femme de ma vie. Je ne pense pas que je puisse trouver des mots qui ne soient pas vains pour te remercier de ce que tu m'apportes. Alors je ne m'étendrais pas plus, et je conclurais ces trois ans, et ces trois pages, par ces trois vers¹...

四 心 秋
疊 の 近
半 寄 る き
や

TABLES DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	II
REMERCIEMENTS	IV
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XII
LISTE DES TABLEAUX.....	XIV
LISTE DES FIGURES	XVI
LISTE DES ÉQUATIONS.....	XIX
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE 1. MISE EN CONTEXTE THÉORIQUE.....	4
1.1. L'écosystème boréal	4
1.1.1. Généralités	4
1.1.2. Conditions climatiques de l'écosystème boréal.....	6
1.2. Biogéochimie des écosystèmes boréaux	6
1.2.1. Le cycle du carbone dans l'écosystème boréale	6
1.2.2. Le cycle de l'azote en forêt boréale	7
1.2.3. Modification anticipée due au changement climatique	10
1.3. La fixation biologique de l'azote.....	12
1.3.1. Théorie de la fixation d'azote	12
1.3.2. Nitrogénases alternatives	15
1.3.3. Effet de facteurs abiotiques sur la fixation d'azote.....	16
1.4. Les Nases dans les écosystèmes	18
1.4.1. La disponibilité en micronutriments dans les écosystèmes	18
1.4.2. Occurrence des gènes de nitrogénases alternatives dans les écosystèmes	19

1.4.3.	Hétérogénéité de ratio R dans les sols	19
1.5.	Homéostasie des métaux de la FBN	21
1.5.1.	Principe général de la gestion homéostatique des nutriments	21
1.5.2.	Stratégie d'acquisition des métaux essentiels à la FBN	23
1.6.	Biologie et physiologie des fixateurs d'azotes	26
1.6.1.	Organismes fixateurs d'azote.....	26
1.6.2.	Description des cellules cyanobactériennes.....	26
1.6.3.	La symbiose lichénique	29
1.6.4.	<i>Peltigera aphthosa</i> (L.) Willd.....	31
1.7.	Question de recherche	34
 CHAPITRE 2. MATÉRIELS ET MÉTHODES		36
2.1.	Description des échantillonnages de lichens	36
2.1.1.	Espèces de lichens prélevées pour cette étude.....	36
2.1.2.	Échantillonnage du Nord Québec	37
2.1.3.	Échantillonnage du Fjord du Saguenay.	39
2.1.4.	Autres régions du monde échantillonnées	40
2.1.5.	Conservation et nettoyage des thalles de lichen	42
2.2.	Techniques de séparation des symbiontes du lichen	42
2.2.1.	Séparation des photobiontes algal par centrifugation sur gradient de Percoll®	43
2.2.2.	Dissection anatomique des cephalodia contenant les cyanobiontes (Nostoc sp.).....	44
2.3.	Méthode d'isolation des symbiontes du lichen <i>Peltigera aphthosa</i> s.l.	45
2.3.1.	Description des milieux d'isolation et de culture	45
2.3.2.	Isolation de <i>Coccomyxa peltigera</i> sur milieu sélectif solide	47
2.3.3.	Isolation de <i>Nostoc</i> sp. en milieu liquide à partir des cephalodia.....	47
2.3.4.	Caractérisation des souches isolées	48
2.4.	Méthode de culture des cyanobactéries et algues unicellulaires	48
2.4.1.	Notes préliminaires	48
2.4.2.	Suivi de croissance et prélèvement des échantillons	49

2.5.	Méthodes de lavage des métaux extracellulaires.....	58
2.5.1.	Description de la procédure de lavage.....	58
2.5.2.	Comparaison de différentes méthodes de lavage du thalle de lichen	59
2.6.	Analyses élémentaires dans les matrices biologiques	61
2.6.1.	Note préliminaire	62
2.6.2.	Minéralisation des matrices organiques.....	62
2.6.3.	Analyse élémentaire par spectrométrie de masse à torche plasma (ICPMS).....	67
2.6.4.	Caractéristiques de la méthode et contrôle qualité	74
2.7.	Méthodes utilisées pour l'évaluation de l'activité de fixation biologique de l'azote	77
2.7.1.	Test de réduction de l'acétylène	77
2.7.2.	Test de réduction de l'acétylène par spectroscopie d'absorption laser dans un résonateur optique en anneau (ARACAS)	79
2.7.3.	Préparation des échantillons de lichen pour l'analyse du $\delta^{15}\text{N}$	81
2.8.	Méthodes statistiques.....	81
2.8.1.	Méthodes de statistiques multivariées utilisées	81
2.8.2.	Procédure pour les données manquantes et inférieures à la limite de détection de la méthode (LDM).....	83
2.8.3.	Cas particulier des données compositionnelles	84
2.8.4.	Logiciel statistiques utilisés	86

**CHAPITRE 3. CARACTÉRISATION DES CONTENUS EN MÉTAUX DES
CYANOLICHENS BORÉAUX PRÉLEVÉS DANS LE NORD-QUÉBEC.88**

3.1.	Notes préliminaires.....	88
3.1.1.	Auteurs et affiliations.....	88
3.1.2.	Introduction de l'article	88
3.1.3.	Participation de chaque auteur.....	89
3.2.	Determination of elemental baseline using peltigeralean lichens from Northeastern Canada (Québec): Initial data collection for long term	

monitoring of the impact of global climate change on boreal and subarctic areas in Canada.....	90
3.2.1. Abstract:.....	90
3.2.2. Introduction.....	91
3.2.3. Materials and methods.....	92
3.2.4. Results and discussion.....	96
3.2.5. Conclusions.....	103
3.2.6. Acknowledgements.....	103
3.3. Synthèse de l'article.....	104

CHAPITRE 4. HOMÉOSTASIE DU VANADIUM AU SEIN DU LICHEN

<i>PELTIGERA APHTHOSA</i> (L.) WILLD.	105
4.1. Notes préliminaires.....	105
4.1.1. Auteurs et affiliations.....	105
4.1.2. Introduction de l'article.....	105
4.1.3. Participation de chaque auteur.....	106
4.2. Is vanadium a biometal for boreal cyanolichens?.....	107
4.2.1. Abstract.....	107
4.2.2. Introduction.....	107
4.2.3. Materials and Methods.....	110
4.2.4. Results and discussions.....	112
4.2.5. Conclusions.....	118
4.2.6. Acknowledgment.....	119
4.3. Synthèse de l'article.....	120

CHAPITRE 5. MISE EN ÉVIDENCE D'UNE ACTIVITÉ DE LA NITROGÉNASE AU VANADIUM DANS LES ÉCOSYSTÈMES NATURELS.....

5.1. Notes préliminaires.....	121
5.1.1. Auteur et affiliations.....	121
5.1.2. Introduction de l'article.....	121
5.1.3. Participation de chaque auteur.....	122

5.2. Alternative nitrogenases contribute to biological nitrogen fixation in boreal cyanolichens	123
5.2.1. Abstract.....	123
5.2.2. Introduction:.....	123
5.2.3. Materials and Methods.....	125
5.2.4. Results and discussion	127
5.2.5. Conclusion	136
5.2.6. Acknowledgments	138
5.3. Synthèse de l'article	138
CHAPITRE 6. EFFET DE LA TEMPÉRATURE SUR L'ACTIVITÉ DES NITROGÉNASES <i>IN VIVO</i>.	140
6.1. Notes préliminaires.....	140
6.1.1. Auteurs et affiliations.....	140
6.1.2. Introduction de l'article	140
6.1.3. Participation de chaque auteurs	141
6.2. Temperature dependency of molybdenum and vanadium nitrogenases activity in <i>Anabeana variabilis</i>	142
6.2.1. Abstract.....	142
6.2.2. Introduction:.....	143
6.2.3. Materials and Methods.....	144
6.2.4. Results and discussions.....	146
6.2.5. Acknowledgment.....	153
6.3. Synthèse de l'article:	153
CONCLUSION GÉNÉRALE	154
RÉFÉRENCES.....	157
ANNEXES.....	176

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA	Milieu Arnon et Allen
ACD	Analyse Canonique Discriminante
ACP	Analyse en Composante Principale
ADL	Analyse Discriminante Linéaire
ARA	Acetylene reduction Assay, test de réduction de l'acétylène
ARACAS	Acetylene Reduction Assay by Cavity Ring-down Absorption Spectroscopy, test de réduction de l'acétylène par spectroscopie d'absorption laser dans un résonateur optique en anneau
BBM	Bold Basal's Medium, Milieu de base de Bold
Chl _a	Chlorophylle-a
Clr	Centered log-ratio, log-ratio centré
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse
DO	Densité optique
EDTA	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
FBN	Fixation biologique de l'azote
GMT	Grade Métaux Trace
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HEPA	High Efficiency Particulate Air,
HNO ₃	Acide nitrique
ICPMS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Spectrométrie de masse à torche plasma
IPCC	Intergouvernemental Panel on Climate Change, Groupe d'experts Intergouvernemental sur le réchauffement climatique (GIEC)
LDI	Limite de détection instrumentale
LDM	Limite de détection de la méthode
m _a	Masse atomique
MM	Mélange Métaux
MQ	Eau Milli-Q®
MRC	Matériel de Référence Certifié

Nase	Nitrogénase
Rédox	Oxydoréduction
s.l.	sensu lato
sp.	Espèce
UV	ultraviolet

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Détails des prélèvements au Nord-Québec (2.1.2)	38
Tableau 2 : Détails des prélèvements dans le Fjord-du-Saguenay (Québec).....	39
Tableau 3: Détails des prélèvements de la chronoséquence suédoise	41
Tableau 4 : Détails des prélèvements dans le reste du monde.....	42
Tableau 5 : Composition du tampon isotonique utilisé dans le processus d'extraction de Gasulla et al. 2010. ¹⁵⁰	43
Tableau 6 : Composition du milieu Arnon and Allen (AA).	45
Tableau 7 : Composition du milieu Bold Basal 4N (BBM4N).....	46
Tableau 8 : Suivi de la concentration en chlorophylle-a pour un même échantillonnage de <i>Anabaena variabilis</i> en fonction du temps de conservation à -80°C avant l'extraction.....	51
Tableau 9 : Pourcentage d'écart entre la valeur de DO ₇₂₀ (sans unité) avant et après une dilution par 2	52
Tableau 10 : Contenu cellulaire d' <i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 en fonction de la croissance.....	55
Tableau 11 : Paramètres cellulaires et activité d' <i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 en fonction de la croissance.....	56
Tableau 12 : Résumé des caractéristiques d' <i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 lors des différentes phases de croissance. Les valeurs en gras sont celles qui seront utilisées.....	57
Tableau 13 : Détails des procédures de minéralisation des échantillons.....	63
Tableau 14: Comparaison des méthodes de minéralisation par micro-onde et par DigiPREP.....	66
Tableau 15 : Caractéristique de la méthode d'analyse élémentaire.....	69
Tableau 16 : Description des gammes d'étalonnage.....	73
Tableau 17 : Pourcentage de récupération et répliquabilité pour les matrices utilisées.....	75
Tableau 18. Baseline concentrations of elements detected from this study compared to previous studies in pristine areas of the world.....	102
Tableau 19: Content and ratio of vanadium (V) and titanium (Ti) for different compartments of <i>P. aphthosa</i>	115

Tableau 20. Summary of literature review (Annexe 3 - 3.1 - Table S1) for BNF in cryptogamic cover (soil, moss, lichens, epiphytes).	136
Tableau 21. Estimation of N fixation ($\mu\text{g}_{\text{N}}\cdot\text{g}_{\text{lichens}}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) when considering Mo-only contribution ($\text{C}_2\text{H}_4\text{:}^{15}\text{N Mo} = 3:1$) or estimation of alternative Nase activity with ISARA ($\text{C}_2\text{H}_4\text{:}^{15}\text{N alt} = 1:1$).....	137
Tableau 22. Nitrogenase activation energy for Mo-grown and V-grown cultures of <i>Anabaena variabilis</i>	149

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Carte des principales forêts mondiales	4
Figure 2. Zones bioclimatiques de végétation au Québec.	5
Figure 3. Carte des dépôts d'azote inorganique total au Québec	9
Figure 4. Structure protéique de la nitrogénase.	13
Figure 5. Cycle catalytique de la nitrogénase.	14
Figure 6. Carte de la présence des gènes de Nase alternatives et de limitation en Mo reporté dans la littérature.	20
Figure 7. Illustration du principe d'homéostasie	21
Figure 8. Schématisation du modèle de Droop avec l'internalisation du nutriment et l'assimilation de ce nutriment dans la matière organique nouvellement formée.....	22
Figure 9. Description schématique des différentes phases de croissance chez les cyanobactéries.....	27
Figure 10. Vue macroscopique et microscopique de la structure du thalle de <i>Peltigera aphthosa</i> s.l.	32
Figure 11. Carte du monde des sites de prélèvement de cyanolichens pour cette étude.	36
Figure 12. Sites de prélèvement du nord-Québec.....	37
Figure 13 : Apparence typique du mélange après centrifugation selon le processus d'extraction de Gasulla et al. 2010 ¹⁵³ (gauche) et confirmation de la pureté de Coccomyxa après l'extraction (droite, microscopie conventionnelle grossissement X1000)	44
Figure 14 : Identification et vérification de la pureté de la culture de Coccomyxa isolé du thalle de <i>P.aphthosa</i>	47
Figure 15 : Photographie au microscope optique de colonies de <i>Nostoc</i> isolées des cephalodia de <i>Peltigera aphthosa</i> (grossissement X400).....	48
Figure 16 : Évolution de la densité cellulaire, du contenu en chlorophylle-a et du ratio chlorophylle-a sur OD ₇₂₀ en fonction de la croissance.	54
Figure 17 : Contenu en métaux des thalles de lichen en fonction du lavage subit.	60
Figure 18 : Suivi des métaux indicateurs de dommages cellulaires en fonction des lavages effectués.....	61

Figure 19 : Suivi du standard L1CH3N pour A) P, B) V, C) Mo, D) Fe.....	76
Figure 20 : Évolution de la constante de fuite de C ₂ H ₄ de l'ARACAS en fonction de la température	80
Figure 21 : Évaluation de l'interférence entre le signal de l'éthylène (ppbv C ₂ H ₄) et le CO ₂ par d'ajouts successifs de CO ₂	81
Figure 22. Sampling sites in Québec and comparisons of Fe, Al, Ti, V, and Cr contents along transects.....	93
Figure 23. Correlations among elements and the effect of bioclimatic zones and species on data structure.....	98
Figure 24. Element contents for four lichen-forming species.....	100
Figure 25. Distribution of metals within <i>P. aphthosa</i> thalli from Québec, Canada.	113
Figure 26. Cellular response of <i>Anabaena variabilis</i> to increasing extracellular vanadium concentration.....	117
Figure 27. Metals in cyanolichens.....	128
Figure 28. Nase utilization in cyanolichens collected along a 365 year old chronosequence based on ISARA analysis.....	129
Figure 29. Nase metal cofactors in cyanolichens collected along a 365-year chronosequence.....	131
Figure 30. Linear regression of Mo and V in nitrogen fixing part, i.e., cephalodia (CEP) of lichen thallus in non-heavily contaminated sites of the boreal biome.....	133
Figure 31. Nase metal cofactors in cyanolichens collected along a 365 years chronosequence.....	134
Figure 32. Ethylene production rates by <i>Anabaena variabilis</i> as a function of temperature measured by ARACAS.....	146
Figure 33. Temperature dependency of acetylene reduction for Mo-grown (white circle) and V-grown cultures (black circle).	148
Figure 34. Arrhenius plot of Nase activity for Mo-grown (white circles) and V-grown (black circles) cultures of <i>Anabaena variabilis</i>	150
Figure 35. Estimation of N ₂ fixation as a function of temperature (white circles) and V-grown (black circles) cultures of <i>Anabaena variabilis</i>	152

Figure 36. Localisation (stars) of the sampling sites in Québec, Canada, Alaska, USA, and Siberia, Russia; as well as a picture of the tri-membered lichen <i>Peltigera aphthosa</i> taken in the field.....	189
Figure 37. Comparison of metals content in ppm ($\mu\text{g}_{\text{metal}}\cdot\text{g}_{\text{dryweight}}^{-1}$) between unwashed lichens, (i.e., exposition) (UWT), Ox/EDTA-washed lichen thalli (WT) and cephalodia (CEP).	190

LISTE DES ÉQUATIONS

Équation [1.1] Équation bilan de la fixation d'azote par la Mo-nitrogénase	13
Équation [1.2] Équation bilan de la fixation d'azote par la V-nitrogénase	15
Équation [1.3] Expression différentielle du quota cellulaire en nutriment	20
Équation [1.4] Expression du taux de croissance spécifique au quota	20
Équation [1.5] Relation entre taux de croissance et quota cellulaire en élément limitant en régime permanent	20
Équation [2.1] Équation de détermination spectroscopique de la chlorophylle-a chez les cyanobactéries	46
Équation [2.2] Équation de détermination spectroscopique de la chlorophylle-a chez les algues	46
Équation [2.3] Équation de détermination spectroscopique de la chlorophylle-b chez les algues	46
Équation [2.4] Équation de détermination spectroscopique de la concentration en caroténoïdes chez les algues	46
Équation [2.5] Équation bilan de réduction de l'acétylène lors du test de réduction de l'acétylène	77
Équation [2.6] Équation bilan de la fabrication de l'acétylène	78
Équation [2.7] Relation entre la quantité de matière et la concentration (ppmv) de l'éthylène produit par unité de temps lors du test de réduction de l'acétylène	79
Équation [2.8] Transformation log-ratio centré	85

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'azote est un des éléments les plus importants dans la nature. On le retrouve dans un grand nombre de molécules impliquées dans l'activité des organismes, comme les protéines et l'acide désoxyribonucléique (ADN). Les relations étroites entre l'azote et le carbone, deux éléments couplés dans la plupart des molécules retrouvées dans la biosphère, font que l'azote est également un élément clé dans le cycle biogéochimique du carbone.² L'azote est ainsi connu pour limiter la productivité primaire d'un grand nombre d'écosystèmes naturels.^{3,4} Ce phénomène de couplage entre les deux grands cycles biogéochimiques a des implications importantes sur le devenir des écosystèmes dans le cadre des changements climatiques présents et à venir.³

La première source d'azote dans les écosystèmes non anthropisés est la fixation biologique de l'azote.^{5,6} Ce processus, repose sur un groupe de métallo-enzymes spécifiques, les nitrogénases, rencontré uniquement chez quelques procaryotes.⁷ Le cœur métallique de cette enzyme peut contenir soit un atome de molybdène, soit un atome de vanadium, soit un atome de fer.⁸ On retrouve les gènes de toutes les nitrogénases dans différents environnements, du climat tropical au climat boréal.⁹⁻¹¹ Or à ce jour, seule la nitrogénase au molybdène est prise en considération dans la dynamique de l'azote dans les écosystèmes.¹² Ainsi, une des questions abordées dans cette étude sera de déterminer si la nitrogénase au vanadium pourrait également être active au sein des écosystèmes.

De nombreux indices indiquent que la nitrogénase au vanadium pourrait avoir un rôle important ; le molybdène est le micronutriment essentiel le moins présent dans la croûte terrestre¹³ et il est souvent reporté comme limitant la fixation biologique de l'azote dans de nombreux écosystèmes.¹⁴⁻¹⁷ Le vanadium lui est cinquante fois plus présent que le molybdène dans la croûte terrestre.¹³ Ainsi, la nitrogénase au vanadium pourrait avoir un rôle de support de la fixation d'azote lorsque le molybdène est limitant.

Également, le comportement des nitrogénases vis-à-vis de la température diffère grandement. La présence de molybdène inhibe l'activation des gènes de la nitrogénase au vanadium.¹⁸ Or cette inhibition est levée en dessous de 18°C,¹⁹ ce qui est intéressant si l'on considère le fait que la moyenne des températures à la surface de la planète est aux alentours de 15°C.²⁰ De plus, alors que la nitrogénase au molybdène est la plus efficace à température ambiante, des expériences in vitro ont démontré que cela n'est plus vrai à basses températures.²¹ Si ces résultats étaient toujours valables chez des organismes vivants, cela remettrait en cause l'hégémonie du molybdène dans les modèles du cycle de l'azote dans les écosystèmes terrestres. Cela serait particulièrement intéressant dans les écosystèmes boréaux, où la température moyenne de la saison de croissance est inférieure à 15°C.²²

Afin de répondre à ces questions fondamentales, nous avons utilisé un modèle symbiotique tripartite, le lichen, association entre une algue, un champignon et une cyanobactérie fixatrice d'azote.²³ Ce modèle possède toutes les caractéristiques importantes pour réussir cette étude. Les lichens sont ubiquitaires des régions boréales et subpolaires²⁴, caractérisées par de basses températures annuelles. Également, les lichens n'ont pas de racines ni de cuticule et ils reposent principalement sur la déposition atmosphérique pour leurs apports en métaux,²⁵ ce qui les rend potentiellement plus prompts à la limitation en micronutriments. Or les micronutriments, particulièrement ceux de la fixation d'azote, sont connus pour être régulés très finement au sein des organismes diazotrophes.²⁶ Ainsi, nous avons fait l'hypothèse de travail que l'homéostasie des micronutriments au sein de la symbiose lichénique devrait être représentative de ses activités métaboliques, particulièrement pour la fixation biologique de l'azote.

Nous avons donc développé une méthode d'étude des contenus en métaux des différents organismes constituant la symbiose lichénique. Nous avons ensuite étudié la répartition et la régulation des micronutriments de la photosynthèse et de la fixation d'azote, particulièrement du vanadium, dans différentes conditions environnementales afin de caractériser la gestion du vanadium chez les fixateurs d'azotes de la forêt boréale.

Le premier chapitre de cette thèse détaille les données de la littérature afin de familiariser le lecteur avec la théorie et l'état des connaissances générales et spécifiques qui sont essentielles à la compréhension de cette étude. Le deuxième chapitre présente les méthodes biologiques, analytiques et statistiques qui ont été développées et utilisées pendant cette étude et les chapitres trois à six présentent les résultats obtenus sous forme d'articles insérés.

CHAPITRE 1. MISE EN CONTEXTE THÉORIQUE

1.1. L'écosystème boréal

1.1.1. Généralités

La forêt boréale représente 17% de la totalité des terres émergées, mais elle stocke à elle seule 30% du carbone (C) organique des écosystèmes continentaux.²⁷ La forêt boréale représente 50% des forêts mondiales et s'étend sur plus de 16 millions de kilomètres carrés. Elle couvre la partie circumpolaire de l'hémisphère nord, principalement en Russie, au Canada et en Alaska (Figure 1).

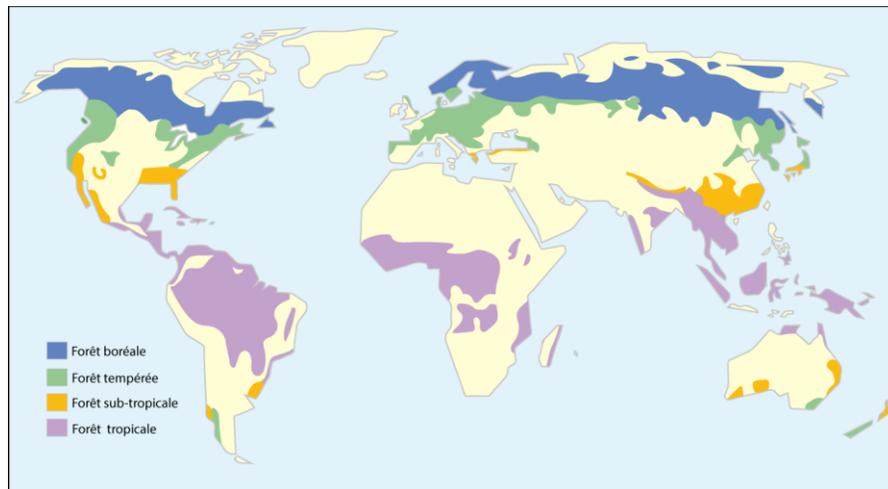


Figure 1. Carte des principales forêts mondiales

La forêt boréale est majoritairement peuplée de gymnospermes résineux de la famille des pins (*Pinus sylvestris*, *Pinus banksiana*), des sapins (*Abies balsamea*) et des épicéas (*Picea abies*, *Picea glauca*, *Picea mariana*) pour les arbres à feuilles persistantes et de mélèze (*Larix* sp.) à feuillage caduque. Quelques angiospermes telles que l'aulne (*Alnus glutinosa*, *Alnus crispa*), le bouleau (*Betulaceae* sp.) et le peuplier (*Populus* sp.) sont présentes dans la partie méridionale. La forêt boréale est majoritairement dominée par 15 espèces d'arbres et d'arbustes.²⁷⁻²⁹ De

nombreux arbustes de la famille des *Ericaceae* sont présents en fin de succession. Également, de nombreux cryptogames comme les mousses et les lichens jouent un rôle essentiel dans cet écosystème, notamment en tant qu'espèce pionnière.^{24,30}

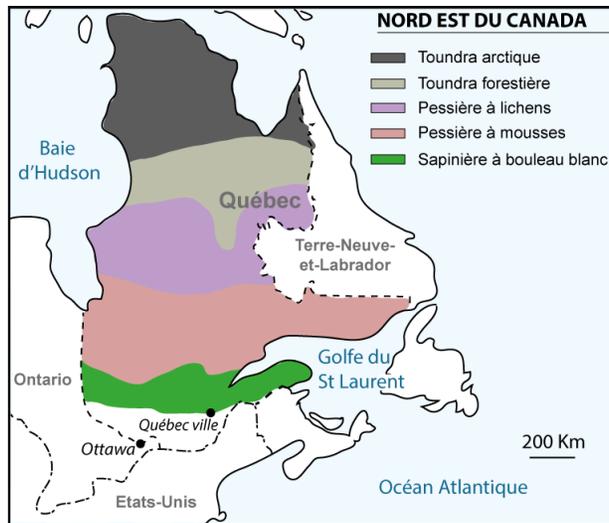


Figure 2. Zones bioclimatiques de végétation au Québec.

L'écosystème boréal possède un paysage caractérisé par de nombreux lacs, des tourbières et plusieurs types de domaines bioclimatiques de végétation, allant de la sapinière au sud jusqu'à la toundra forestière au nord (Figure 2). Ce paysage est également caractérisé par les vestiges de nombreux feux de forêt naturels, phénomène permettant une régénération de la forêt,³¹ ainsi que des attaques d'insectes parasites décimant de nombreuses parties plus ou moins grandes de peuplement.²⁸

La forêt boréale est également l'habitat de nombreux animaux emblématiques, comme parmi les grands mammifères l'ours noir (*Ursus americanus*), l'orignal (*Alces americanus*), le cerf de virginie (*Odocoileus virginianus*), le loup (*Canis lupus*) et le lynx (*Lynx canadensis*) pour ne citer qu'eux, ainsi que le castor (*Castor canadensis*) dans de nombreux plans d'eau et beaucoup d'espèces d'oiseaux.

La forêt canadienne elle représente 309 Mha, soit 21 à 27% de toutes les forêts boréales, et 8% des forêts mondiales.³² 54% de la forêt boréale canadienne est exploitée³² directement ou indirectement par l'industrie sylvicole et l'industrie du tourisme, représentant plus de 4% du produit intérieur brut du Québec.³³

1.1.2. Conditions climatiques de l'écosystème boréal

La forêt boréale est caractérisée par de très basses températures pour un espace encore peuplé de végétaux, avec des moyennes annuelles de l'ordre de 1°C à la limite sud et -7 °C à la limite nord.^{22,34,35} Également, la saison de croissance en forêt boréale est courte par rapport aux autres biomes pour la plupart des espèces (< 5 mois), et est caractérisée par des moyennes de températures également faibles (de moins de 10°C à 15°C) tandis que les températures hivernales peuvent atteindre -40°C. Les précipitations sont similaires entre les deux limites et aux alentours de 500 mm annuelles,²² majoritairement sous forme de neige.

1.2. Biogéochimie des écosystèmes boréaux

« Les forêts précèdent les peuples, les déserts les suivent »

François-René de Châteaubriant, écrivain

1.2.1. Le cycle du carbone dans l'écosystème boréale

1.2.1.1. Stock de C dans le biome boréale

Le biome boréal représente plus de 30% du carbone organique terrestre.²⁷ Cela représente 50% du stock mondial forestier en carbone, alors que la forêt tempérée et la forêt tropicale ne représente que 14% et 37%, respectivement.²⁷ Le contenu en carbone dans la végétation ne représente pas plus d'un cinquième du stock total de carbone de l'écosystème,³⁶ la plus grosse partie étant stockée dans les sols. Les zones boréales et arctiques représentent une réserve de 1700 Pg C est stockée majoritairement (88%) dans le pergélisol et dans les tourbières, avec 191

Pg C dans les 30 premiers centimètres de sol, et 496 Pg C dans le premier mètre.^{37,38} Les 1000 Pg C restants se retrouvent principalement dans les dépôts de tourbes et les couches profondes (jusqu'à 3 m).

1.2.1.2. L'écosystème boréal, un puits de C

D'un point de vue global, l'écosystème boréal est actuellement considéré comme un puits de carbone, ce qui signifie qu'il stocke plus de C grâce à la production primaire de biomasse, qu'il n'en consomme par respiration aérobie. Ainsi, la quantité de C fixé chaque année est de l'ordre de 0.4-0.6 Pg.an⁻¹.²⁹ En forêt boréale canadienne, on estime que 28 Tg.an⁻¹ sont fixés dans les parties aménagées, en raison de 17 Tg.an⁻¹ en produits forestiers récupérés, dont 58% du C restera piégé en produit du bois, et 11 Tg.an⁻¹ qui sont introduits nouvellement dans l'écosystème.³²

Le cycle du C dans l'écosystème est caractérisé par des variations régionales provenant de l'occurrence de perturbation (feux de forêt, attaques d'insectes, prélèvements de bois, coupes forestières), qui font osciller les écosystèmes régionaux entre producteur de C et puits de C. Également, la végétation de la forêt boréale évolue en termes de successions végétales qui possèdent chacune différentes caractéristiques en termes de bilan C, suivant le temps passé depuis la dernière perturbation.^{27,32}

1.2.2. Le cycle de l'azote en forêt boréale

La quantité d'azote (N) dans les sols en forêt boréale est importante (~10000 kg.ha⁻¹). Paradoxalement N est l'élément considéré comme limitant la productivité de la biomasse végétale en forêt boréale,³⁹ car il est présent principalement sous formes organiques récalcitrantes (en association avec des substances humiques, acides aminés, etc...)^{40,41} non directement utilisables par les organismes. Ainsi, pour pouvoir se développer, les organismes doivent utiliser des formes de N rapidement recyclables mais généralement moins abondantes; ou bien du N nouvellement entré dans l'écosystème.^{30,42,43}

En climat boréal, N entre dans l'écosystème par deux sources principales. La première voie d'entrée est par l'entremise de la déposition atmosphérique, généralement d'un N anthropique provenant de la combustion des énergies fossiles, ainsi que de l'industrie et de l'agriculture (engrais azoté).⁴⁴ La deuxième voie d'entrée est la voie naturelle ; l'ionisation de l'azote par la foudre, mécanisme minoritaire, et la fixation biologique de N (FBN),⁶ qui est le mécanisme qui va nous intéresser particulièrement pendant cette étude et qui sera détaillé en partie 1.2.3.2.

Les principaux acteurs de la FBN en climat boréal sont les cyanobactéries (*Cyanobacteria*), organismes capable de photosynthèse, vivant libres, en association avec des bryophytes, ou même en symbioses complexes avec des champignons, les cyanolichens.^{23,45} Une autre catégorie de fixateurs, les fixateurs non-symbiotiques hétérotrophiques qui dégradent la matière organique pour l'acquisition du C,¹² ont leur activité limitée par les faibles températures des écosystèmes boréaux. Il existe également des fixateurs d'azote symbiotiques appartenant à la famille des actinomycètes (*Frankia* sp.) associés à des plantes supérieures (*Alnus* sp.), mais leur nombre est relativement réduit en comparaison et ils sont principalement présents à la limite sud de l'écosystème.³⁵

1.2.2.1. Bilan de N dans la forêt boréale

Les bilans de N en forêt boréale sont difficiles à déterminer. Les accumulations nettes en azote reportées dans la littérature sont de l'ordre de 3 à 3.5 kg N.ha⁻¹.an⁻¹.^{30,46,47} La déposition atmosphérique de N, qui représente entre 0.25 kg N.ha⁻¹.an⁻¹ au nord et 10 kg N.ha⁻¹.an⁻¹ dans le sud dans les forêts du Québec (Figure 3),⁶ ne permet pas toujours d'expliquer la totalité de l'accumulation de N.⁴⁷

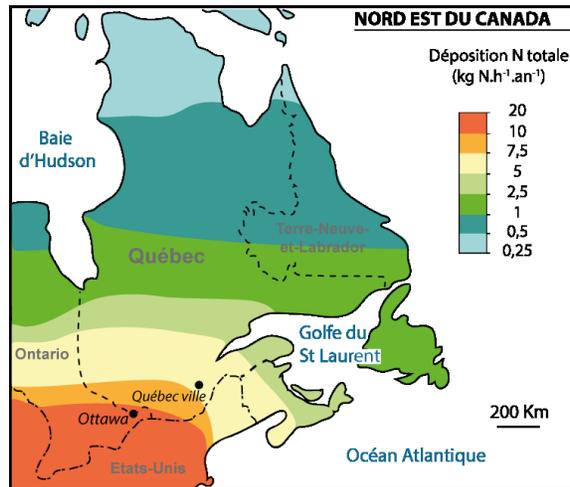


Figure 3. Carte des dépôts d'azote inorganique total au Québec

Adapté de Galloway *et al.* 2004⁶

Jusqu'en 2002, le rôle des cryptogames (mousses, cyanolichens, fixateurs de N épiphytes) était peu considéré dans le cycle de N. En 2002 Deluca *et al.*³⁰ a démontré que la FBN par les cyanobactéries associées aux mousses (bryophytes) pouvait représenter un apport substantiel entre 1.5 à 2 kg N.ha⁻¹.an⁻¹ en forêt boréale et plus récemment le rôle des cryptogames sur la FBN a été réévalué à 46% de la fixation totale en milieu continental.⁴⁸

1.2.2.2. Régulation de N en forêt boréale

Le lien entre les apports de N et la croissance des végétaux n'est pas aussi direct qu'on pourrait le penser. Ainsi, Gundale *et al.*⁴⁹ ont montré l'existence d'un phénomène de compensation entre l'apport d'azote par déposition et l'apport d'azote par FBN. L'azote déposé est intercepté par les tapis de mousse, couvrant la plupart du sol en forêt boréale, qui vont diminuer leurs FBN, plus coûteuses énergétiquement que cet azote déposé. Ainsi, une augmentation de l'apport d'azote atmosphérique (jusqu'à plus de 12 kg N.ha⁻¹.an⁻¹) provenant des activités humaines n'influencera pas la quantité de N apportée à la forêt boréale.⁴⁹ Des ajouts de N plus importants tendent à faire diminuer la biomasse de mousse, diminuant la présence des organismes fixateurs de N. Cela pourra modifier la capacité de l'écosystème à acquérir son propre azote par FBN, ainsi que sa résilience.⁵⁰

L'importance de la FBN en forêt boréale augmente progressivement avec la succession végétale. Elle atteint un maximum à mi-succession (200-300 ans)^{43,51} puis décline en fin de succession.⁵² À ce jour, aucune étude n'a encore fait le lien direct entre le N fixé par les mousses et sa redistribution au reste de l'écosystème.

Un autre mécanisme semble avoir un grand rôle dans la régulation de N en forêt boréale ; la symbiose ectomycorhizienne. Cette symbiose entre le système racinaire d'un arbre et des champignons⁵³ accroît significativement l'absorption des nutriments. Le champignon, qui recycle le N organique, pourrait contrôler et favoriser la disponibilité de N pour les arbres. Une étude récente a montré que les ectomycorhizes allaient souvent privilégier leurs propres apports d'azote aux dépens des arbres en cas de limitation en N, et transmettre N à l'arbre uniquement en cas d'excédent d'azote.⁵⁴

1.2.3. Modification anticipée due au changement climatique

1.2.3.1. Modification climatique

La sphère boréale devrait subir les plus grandes modifications liées au changement climatique. D'après le rapport de l'IPCC,⁵⁵ et celui du consortium OURANOS spécialisé dans la forêt québécoise,⁵⁶ la température pourrait augmenter de +3 à +11°C d'ici à 2100, avec une diminution de la couverture glaciaire et neigeuse de l'ordre de 50 %, et une augmentation des précipitations de l'ordre de 30 %. Ces modifications peuvent avoir plusieurs effets contrastés vis-à-vis de la production primaire en forêt boréale.

1.2.3.2. Réponses de l'écosystème possibles

L'impact du réchauffement climatique sur le bilan C de la forêt boréale est complexe à prédire.⁵⁷ Ainsi, deux hypothèses contradictoires sont trouvées dans la littérature⁵⁸ ; une augmentation des températures, ainsi qu'une augmentation de la concentration en dioxyde de carbone atmosphérique ($[\text{CO}_2]_{\text{atm}}$) pourrait stimuler l'activité des organismes photosynthétiques, et ainsi

avoir une rétroaction négative sur la $[\text{CO}_2]_{\text{atm}}$ en stockant du carbone supplémentaire sous forme de biomasse végétale.⁵⁸ Par contre, une augmentation de la température pourrait également favoriser l'activité enzymatique des microorganismes du sol, et ainsi augmenter la décomposition de la matière organique par la respiration aérobie et anaérobie^{40,59} et ainsi accroître la production de CO_2 , et de méthane (CH_4), gaz 25 fois plus puissant que le CO_2 en termes d'effet de serre sur 100 ans.^{60,61} Si ce rejet de C était plus important que le nouveau C entrant dans la forêt en termes de production primaire, il y aurait un bilan net de rejet de C pour l'écosystème et un phénomène de rétroaction positive sur le $[\text{CO}_2]_{\text{atm}}$.⁶²

Il est également envisagé dans la littérature que la réponse de la production primaire pourrait être contrainte par la disponibilité d'autres nutriments tels que N et P.^{3,63,64} Une température plus élevée pourrait favoriser la fixation d'azote atmosphérique,⁶⁵ ainsi qu'un recyclage plus rapide de la matière organique présent dans le sol^{40,66} et ainsi augmenter la quantité de N disponible dans cet écosystème. Néanmoins, les conditions de température, d'humidité, la compétition pour l'ensoleillement ainsi que la limitation en micronutriments pourraient ne pas permettre une fixation de N suffisante à soutenir la production primaire.^{67,68} Hungate et al⁶⁹ a démontré que la réponse de la fixation d'azote à une augmentation de $[\text{CO}_2]_{\text{atm}}$ montre une diminution de l'activité à long terme, et ce en raison d'une limitation en Mo, micronutriments essentiels à l'activité enzymatique de fixateur d'azote (voir 1.4).

Ainsi, il est indispensable afin de prédire l'évolution des forêts boréales dans les années à venir, de pouvoir évaluer les impacts du changement climatique sur la productivité primaire dans ces écosystèmes. Cela revêt une importance tant d'un point de vue global, avec des implications sur le réchauffement planétaire, que pour la projection de l'économie canadienne dans le futur. Cela doit passer par une meilleure compréhension du cycle de N en forêt boréale, et notamment par une meilleure caractérisation du rôle et de la dynamique des micronutriments essentiels à la fixation de N, qui pourraient ultimement limiter la production végétale.

1.3. La fixation biologique de l'azote

La fixation biologique de l'azote (FBN) est un processus, présent uniquement chez certains procaryotes,⁷ qui permet l'apport de nouveaux composés azotés dans les écosystèmes par réduction de l'azote atmosphérique N₂. Elle est la principale voie d'entrée de l'azote (N) dans les écosystèmes non anthropisés^{5,6} et est donc un mécanisme extrêmement important dans la nature. Cette partie présente les différentes connaissances sur le fonctionnement de la fixation d'azote. Il s'agit d'une réaction similaire en bilan à la réaction Haber-Bosch, qui permet la synthèse des engrais à l'échelle industrielle.

1.3.1. Théorie de la fixation d'azote

1.3.1.1. Structure des nitrogénases

La fixation d'azote par certains micro-organismes se fait par l'intermédiaire d'un complexe enzymatique, la nitrogénase (Nase), constitué de plusieurs sous-unités différentes regroupées en deux métalloprotéines sensibles à l'oxygène, la dinitrogénase, appelée également Mo-Fe protéine dans le cas de la Mo-Nase, et la dinitrogène réductase appelée Fe-protéine.⁸ La structure des deux composants enzymatiques a été élucidée à l'aide de la diffraction des rayons X.⁷⁰ La dinitrogène réductase est une enzyme de masse environ 63000 Da constituée de deux sous-unités γ de masse 30800 constituées d'un seul centre [4Fe-4S] reliant les deux sous-unités ensemble. La dinitrogénase quant à elle est une protéine de masse environ 230000 Da et de structure tertiaire $\alpha_2\beta_2$ constituée de 2 sous-unités alpha ($m_a \sim 50000$ Da) et de 2 sous-unités beta (55000 Da).^{71,72} Elle possède deux types de centre d'oxydoréduction (rédox) ; deux P-cluster avec chacun deux [4Fe-4S] pontés en structure cubane et reliant entre elles les sous-unités α et β , et deux Mo-Fe cofacteurs, site de fixation du substrat (Figure 4).

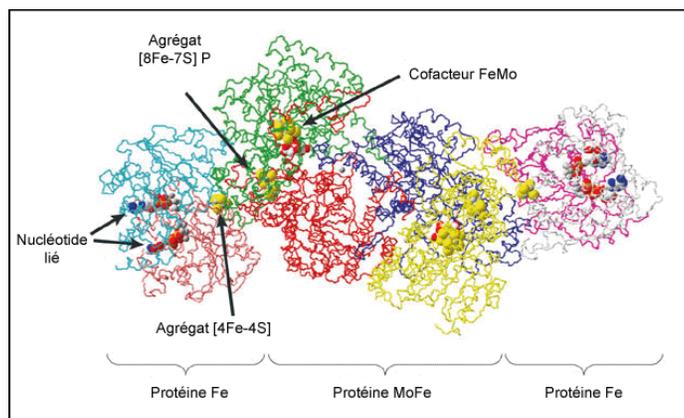


Figure 4. Structure protéique de la nitrogénase.

Adapté de Dixon *et al.*⁷²

1.3.1.2. Mécanismes de la réduction de N_2

La réaction globale de la réduction de l'azote atmosphérique peut être décrite selon l'équation [1.1].



La réaction de fixation se sépare en deux étapes principales ; (i) une première étape où un électron est transféré d'un donneur rédox (ferrédoxine ou flavodoxine) à la Fe protéine, avec fixation de deux magnésium-adénosine triphosphate (Mg-ATP), et la formation du complexe Fe-protéine-MoFe-protéine, et (ii) une seconde étape de réduction de N_2 successivement en NH , NH_2 et finalement NH_3 par transfert d'électrons et de protons au substrat à l'aide de l'hydrolyse des deux ATP et par l'intermédiaire des clusters métalliques, et la séparation du complexe Fe-protéine MoFe-protéine (Figure 5).⁷²

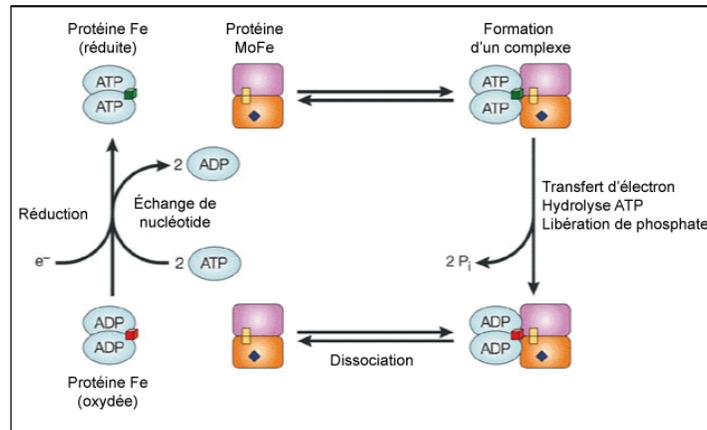


Figure 5. Cycle catalytique de la nitrogénase.

Pour réduire N_2 en NH_3 , le cycle catalytique doit se reproduire successivement avec comme intermédiaires N_2H_2 et N_2H_4 . Adapté de Dixon *et al.*⁷²

Ainsi, deux moles d'ATP sont nécessaires au transfert d'un électron, et donc le cycle catalytique devrait se reproduire 6 fois pour la réduction d'une mole de N_2 en 2 moles de NH_3 . Néanmoins, une proportion importante d'électron est divergée vers la réduction de H^+ en H_2 ,⁷³ donnant la stœchiométrie présentée en équation [1.1]. De nombreux autres substrats ont été démontrés pour les Nases,⁷⁴⁻⁷⁶ notamment l'acide cyanhydrique (HCN), le nitrile (CN), et l'acétylène (C_2H_2), qui est réduit en éthylène (C_2H_4).

1.3.1.3. Suivi de l'activité de la Nase

La manière la plus directe à ce jour de suivre l'activité de la Nase est par enrichissement isotopique du milieu avec du ^{15}N .⁷⁷ En suivant la quantité de ^{15}N incorporée dans un échantillon lors d'une expérience il est possible de quantifier l'activité de l'enzyme. Dans les dernières années, plusieurs problèmes ont été soulevés, notamment l'importance d'équilibrer les milieux avec l'isotope avant expérience⁷⁸ et la présence de N biodisponible dans la plupart des lots de ^{15}N commerciaux.⁷⁹

Du fait du coût élevé de cette méthode, son caractère destructif et la faible sensibilité, l'activité de la Nase est généralement évaluée par réduction de l'acétylène (ARA, pour Acetylene Reduction Assay).⁷⁶ Il s'agit d'incuber l'organisme diazotrophe en présence d'acétylène, un

substrat alternatif à N₂ et d'analyser la quantité de C₂H₄ produite par chromatographie en phase gazeuse (voir 2.7.1.2). L'établissement d'un rapport empirique entre l'activité de réduction du C₂H₂ et celle du N₂ pour une même quantité d'enzyme (R ratio) permet ensuite d'estimer l'activité de fixation de N₂ (voir 1.3.2.1). La simplicité et la sensibilité de l'ARA en font la méthode la plus couramment utilisée pour mesurer la fixation de N, surtout sur le terrain.

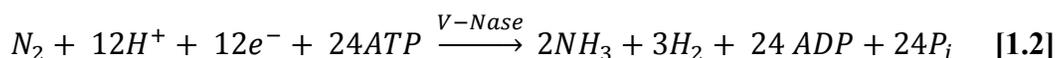
1.3.2. Nitrogénases alternatives

1.3.2.1. Aspect structurel

Trois formes de la Nase ont été identifiées.⁸ La Mo-Nase est présente chez tous les fixateurs de N, et elle est également la mieux caractérisée à ce jour.^{8,72,73,80} Deux autres isozymes ont été découvertes et ont été particulièrement étudiées depuis leurs découvertes dans les années 1980. Elles sont caractérisées par un cofacteur constitué de vanadium (V)⁸¹ et de fer (Fe)⁸² en lieu et place du Mo, et appelées respectivement V-Nase et Fe-only Nase.⁸ Les différences structurales entre la Mo-Nase et les Nases alternatives sont peu nombreuses. Principalement, la présence de deux sous-unités supplémentaires δ dans la V- et la Fe-Fe protéine augmente le poids moléculaire de quelques 20000 Da.⁸

1.3.2.2. Aspect fonctionnel et discrimination des Nases

En termes d'activité, la Mo-Nase est la plus efficace à réduire l'azote à température ambiante,^{21,83} suivent la V-Nase et ensuite la Fe-Nase. Cette différence d'activité se retrouve dans la vitesse de croissance des organismes diazotrophes en condition N limitant.²⁶ Cela pourrait être en partie expliqué par le fait que la Fe-Nase et la V-Nase divergent une plus grande quantité d'énergie cellulaire vers la production de H₂,⁸⁴ comme l'illustre l'équation pour la V-Nase [1.2].



Une autre différence importante d'activité provient de leurs efficacités relatives différentes lors de la réduction de certain substrat. Ainsi, le ratio $C_2H_4 : N_2$ pour Mo (R_{Mo}) est égal environ à 3-4, alors que R_V et le R_{Fe} sont tous deux de l'ordre de 1.⁸⁵ Également, la réduction de C_2H_2 par la V-Nase entraîne une plus grande production d'éthane (C_2H_6) (par réduction de C_2H_4) par rapport à la Mo-Nase.^{86,87} Une autre différence fonctionnelle notable entre les Nases provient d'une discrimination du ^{15}N plus importante par les Nases alternatives. Ainsi, le ratio isotopique de l'azote incorporé par les Nases par rapport au ratio isotopique de l'air ($\delta^{15}N$) est d'environ -2‰ pour la Mo-Nase et de l'ordre de -6 à -7‰ pour les Nases alternatives.⁸⁸

1.3.2.3. Aspect génétique des nitrogénases alternatives

Les gènes codant pour les différentes nitrogénases et leurs régulations ont été caractérisés. Ainsi, la V-Nase et la Fe-Nase ne se différencient pas uniquement par un simple remplacement de l'atome métallique du cofacteur, mais bien par une batterie de gènes indépendants (entre 15 et 20), regroupés en plusieurs opérons.⁷² Chaque opéron est constitué de plusieurs gènes reliés ensemble par un mécanisme de régulation permettant par exemple la synthèse des sous-unités de façon coordonnée et dynamique vis-à-vis des conditions extérieures. Les gènes codant pour les sous-unités de la Mo-Nase sont appelés les gènes Nif, pour « nitrogen fixation », ceux codant pour la V-Nase Vnf pour « vanadium nitrogen fixation » et ceux codant pour la Fe-Nase Anf pour « alternative nitrogen fixation ». Les gènes codant pour les sous-unités structurales α , β , γ et δ sont appelés respectivement pour la V-Nase VnfD, VnfK, VnfH et VnfG.⁸⁹

1.3.3. Effet de facteurs abiotiques sur la fixation d'azote

1.3.3.1. Effet de l'azote

L'azote a un effet inhibiteur sur la fixation d'azote. En effet, la FBN est un processus très coûteux énergétiquement pour les cellules. Ainsi, si de l'azote assimilable est disponible par la cellule, celle-ci va privilégier cette source plutôt que la FBN. La régulation de l'effet de N sur la FBN se fait au niveau génétique soit directement sur les gènes de la Nase,⁷² soit par un système de gène ntr (« nitrogen regulation »).⁹⁰

1.3.3.2. Effet de l'oxygène

La présence d'oxygène (O₂) inhibe l'activité de la Nase de façon définitive.^{71,90} Les deux ensembles enzymatiques sont sensibles à O qui se lie sur les centres rédox [4Fe-4S] et empoisonne le catalyseur. Il existe également chez certains organismes des mécanismes d'inhibition de O sur l'expression des gènes de la Nase,^{72,91} probant certainement un mécanisme d'économie cellulaire en présence de O.

1.3.3.3. Effet des métaux

Les métaux jouent aussi un rôle dans la régulation des Nases. Ainsi, la présence de Mo dans une cellule inhibe l'expression des gènes des autres Nases.¹⁸ Également, le tungstène (W) est un inhibiteur de l'activité Nase, car il peut substituer au Mo lors de la synthèse de la Nase. Cependant l'enzyme ainsi formée est inactive.^{83,92} Le rôle des métaux sera détaillé plus en détails dans la partie « Homéostasie des métaux de la FBN » (1.4.3).

1.3.3.4. Effet de la température

La température a un effet important sur les différentes nitrogénases. Ainsi, la quantité d'énergie divergée vers la production de H₂ devient plus importante à basse température chez la Mo-Nase.²¹ Plus la température augmente, plus la fixation d'azote est importante jusqu'à un optimum d'environ 25°C pour la plupart des organismes.⁶⁵ Les graphiques d'Arrhenius montrent un diagramme biphasique, avec une énergie d'activation d'environ 63 kJ.mol⁻¹ au-dessus du bris de la courbe (environ 21°C) et de 210 kJ.mol⁻¹ en dessous du bris.^{93,94} Ces valeurs semblent dépendre de l'organisme étudié, et pourraient être caractéristiques des légères différences structurales entre les Nases provenant de différentes espèces.⁸ Ainsi, les études sur l'influence de la température chez les cyanobactéries *Nostoc* et *Anabeana variabilis* donnent une énergie d'activation entre 40 et 50 kJ.mol⁻¹.^{95,96} L'origine de ce bris n'a pas été totalement élucidée, mais une étude a montré un lien entre la présence du bris et les lipides intracellulaires,⁹³ indiquant un rôle des lipides dans l'activité de la Nase.

Il a été démontré que la Mo-Nase est plus efficace à 30°C que la V-Nase. Néanmoins, en passant de 30 à 5°C, l'activité de la Mo-Nase diminue 10 fois plus que celle de la V-Nase.²¹ Également, l'inhibition des gènes de la V-Nase par la disponibilité en Mo, existante à température ambiante, est levée en dessous de 14°C.¹⁹ Ainsi, la présence persistante des Nases alternatives chez certains organismes pourrait leur donner un avantage dans les écosystèmes caractérisés par de faibles températures.⁸

Bien que l'effet de la température soit un facteur important pour expliquer la diversité des Nases, aucune étude à ce jour n'a confirmé les résultats obtenus sur des protéines purifiées dans des conditions optimales. Est-ce que la V-Nase est également plus efficace que la Mo-Nase à basse température chez les organismes vivants ? Cela aurait d'importantes implications sur notre compréhension de la FBN dans les écosystèmes

1.4. Les Nases dans les écosystèmes

La FBN en milieu naturel est majoritairement attribuée à la Mo-Nase et les Nases alternatives ont été jusqu'à présent ignorées.¹² Plusieurs études récentes tendent à remettre en question ce paradigme.

1.4.1. La disponibilité en micronutriments dans les écosystèmes

Un problème récurrent dans les écosystèmes aussi bien aquatiques que terrestres est la disponibilité des micronutriments, notamment celle du Mo en milieu continental. Le Mo est le micronutriment le moins présent en milieu continental, alors que le V lui est en proportion 50 à 200 fois plus présent.¹³ De plus, dans les écosystèmes terrestres le Mo, et dans une moindre mesure le V, sont souvent complexés par des molécules organiques de type acides humiques diminuant leurs biodisponibilités.⁹⁷

Plusieurs travaux ont démontré la limitation de la fixation asymbiotique de l'azote par Mo dans des écosystèmes variés (Figure 6), allant de la forêt tropicale du Panama,¹⁴ la forêt tempérée de l'Oregon,¹⁵ et aux forêts du Québec.^{17,98} Une étude réalisée sur des cyanolichens en Oregon a également démontré l'importance de la disponibilité en Mo pour les fixateurs symbiotiques (*Lobaria oregana* et *L. pulmonaria*).¹⁶ De nombreuses études d'ajout de P ont montré que le P limitait également la FBN, néanmoins la présence de traces de Mo dans de nombreux fertilisateurs commerciaux (engrais phosphorés), pourrait partiellement remettre en question les conclusions de ces démonstrations comme étant finalement dues à l'ajout du Mo.¹⁴

1.4.2. Occurrence des gènes de nitrogénases alternatives dans les écosystèmes

Les gènes des Nases alternatives ont été retrouvés dans de nombreux écosystèmes (Figure 6), ainsi que dans de nombreux substrats différents; dans des échantillons d'eau et provenant de pré salé de Caroline du Nord,¹¹ dans des échantillons de bois, de sols, de sédiments provenant de criques ou de mangroves au Brésil, à Porto-Rico et encore en Caroline du Nord,⁹ et également dans le système digestif de termites.⁹⁹ Récemment, une étude métagénétique sur des génomes de symbionte lichénique de la famille *Peltigera* a également démontré l'occurrence des gènes dans des échantillons provenant de La Réunion (France), d'Alaska, de Colombie Britannique, d'Islande et de Caroline du Nord, démontrant la quasi certaine omniprésence des Nases alternatives dans les écosystèmes, du climat tropical au climat sub-boréal.¹⁰

1.4.3. Hétérogénéité de ratio R dans les sols

Bien que les gènes pour les Nases alternatives aient été trouvés dans la nature, à ce jour, aucune démonstration catégorique de l'utilisation des Nases alternatives dans les écosystèmes n'a été faite. Cependant, une méta-analyse des ratios R (rapport de conversion ARA/15N) disponibles dans la littérature a montré une hétérogénéité importante dans les sols. En plus du ratio R = 3 caractéristique de la Mo-Nase, un second ratio R au alentour de 1.5, caractéristique des Nases alternatives, a été fréquemment rapporté, suggérant une utilisation des Nases alternatives dans les sols.⁸⁵

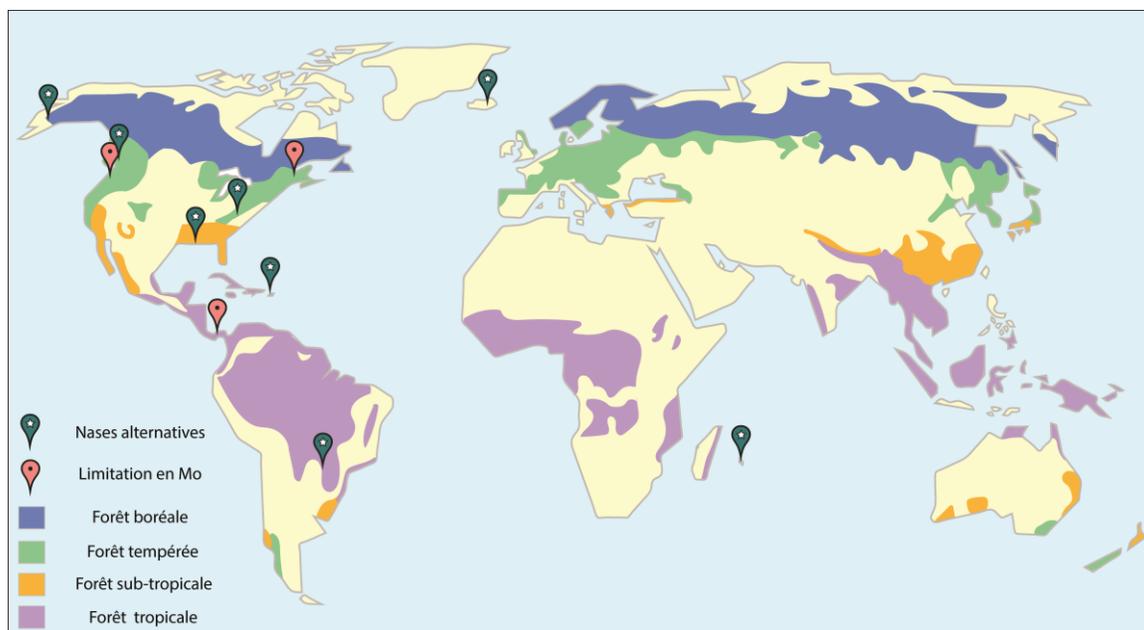


Figure 6. Carte de la présence des gènes de Nase alternatives et de limitation en Mo reporté dans la littérature.

Les données présentées sur cette carte regroupent les informations obtenues dans différents articles en lien avec la limitation en molybdène¹⁴⁻¹⁷ et la présence de gènes de nitrogénases alternatives.⁹⁻¹¹

De nombreux indices supportent donc le rôle des Nases alternatives dans les écosystèmes (voir Figure 6). Néanmoins, les preuves irréfutables de l'utilisation des Nases alternatives dans les écosystèmes restent à être apportées. Le système boréal, caractérisé par de faibles températures annuelles (1.1.1),²² une limitation chronique en N³⁹ et où les cyanobactéries libres ou associées dans les lichens et les mousses jouent un rôle important dans le cycle de N,⁴⁸ représente un modèle de prédilection pour étudier le rôle de la V-Nase en milieu naturel.

1.5. Homéostasie des métaux de la FBN

Cette partie résume les principes et connaissances actuelles sur l'homéostasie des métaux essentiels à la FBN, afin de démontrer que l'étude de l'homéostasie est un outil puissant de caractérisation de l'activité métabolique.

« Dis moi ce que tu manges, je te dirais ce que tu es »

Jean Anthelme Brillat-Savarin, Gastronomes

1.5.1. Principe général de la gestion homéostatique des nutriments

L'homéostasie est le principe fondamental soutenant de nombreux organismes. Il s'agit de la capacité d'un organisme à maintenir des conditions optimales de fonctionnement à l'intérieur de celui-ci, quelques soient les variations des conditions extérieures (Figure 7).

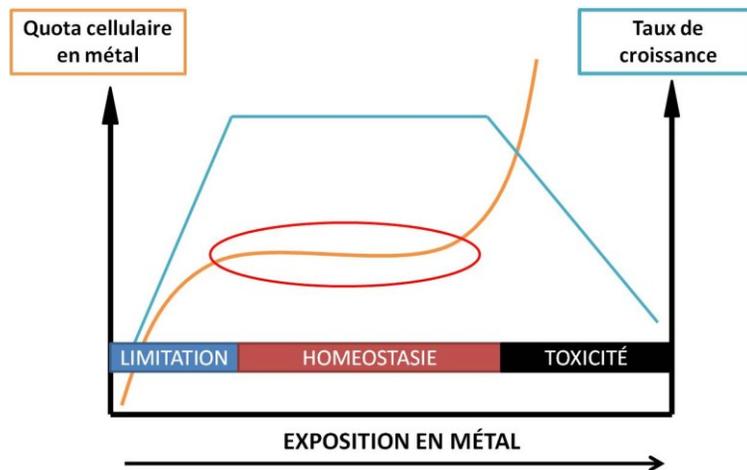


Figure 7. Illustration du principe d'homéostasie

Dans le modèle formulé par Droop en 1973,¹⁰⁰ et repris dans de nombreux écrits,^{101,102} la concentration intracellulaire en nutriment (Q, quantité de nutriment dans les structures cellulaires et stockage du nutriment), peut être exprimée sous forme différentielle comme la différence entre la vitesse d'internalisation du nutriment (V) et la vitesse d'assimilation (synthèse de biomasse) :

$$\frac{dQ}{dt} = V - \mu_{\infty}(Q - Q_{min}) \quad [1.3]$$

Avec :

V : Vitesse d'acquisition du nutriment ($\text{mol}_{\text{nutriment}} \cdot \text{jour}^{-1}$)

μ_{∞} : Taux de croissance pour Q infini (jour^{-1})

Q : Quota cellulaire en nutriment, ($\mu\text{mol}_{\text{nutriment}} \cdot \text{cellule}^{-1}$),

Q_{min} : Q minimal requis par la cellule ($\mu\text{mol}_{\text{nutriment}} \cdot \text{cellule}^{-1}$)

Le taux de croissance (μ) peut être défini proportionnellement à l'excès du nutriment limitant disponible dans la cellule par rapport à son quota minimal requis ($Q_{XS} = Q - Q_{min}$) (équation [1.4]) :

$$\mu \equiv \mu_{\infty} \left(\frac{Q - Q_{min}}{Q} \right) = \mu_{\infty} \left(\frac{Q_{XS}}{Q} \right) \quad [1.4]$$

Lorsque la cellule est dans un état stationnaire (dépendamment des conditions de croissance), nous pouvons définir le quota cellulaire à l'équilibre pour lequel la vitesse d'internalisation du nutriment est égale à l'assimilation du nutriment, et donc $\frac{dQ}{dt} = 0$. Il s'en suit la relation suivante pour une cellule en état stationnaire (équation [1.5], Figure 8).¹⁰³

$$\frac{dQ}{dt} = V - \mu Q = 0 \leftrightarrow V = \mu Q \quad [1.5]$$

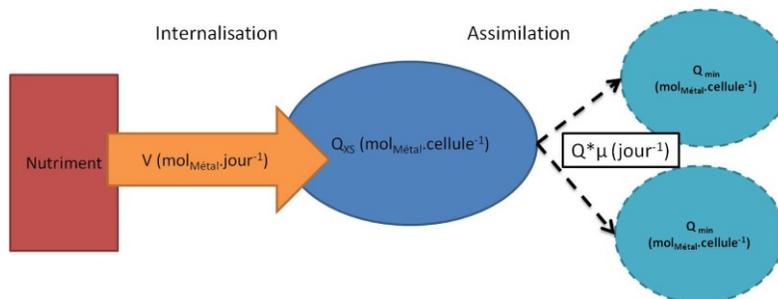


Figure 8. Schématisation du modèle de Droop avec l'internalisation du nutriment et l'assimilation de ce nutriment dans la matière organique nouvellement formée.

Pour une cellule en régime stationnaire, on retrouve l'équation [1.5].

L'importance de ces nutriments pour le fonctionnement de l'organisme et ultimement pour la production primaire est donc primordiale. Ainsi, sécuriser les micronutriments nécessaires relève de la stratégie de survie pour ces organismes.

1.5.2. Stratégie d'acquisition des métaux essentiels à la FBN

1.5.2.1. Le Fer.

Dans les conditions de pH et d'oxydoréduction (rédox) présentes dans la plupart des écosystèmes, le Fe est majoritairement présent sous sa forme non disponible Fe^{3+} , et précipite en solution aqueuse en hydroxyde de Fe(III) ($Fe(OH)_3$). Afin de pouvoir acquérir leur Fe dans ces conditions, la plupart des organismes vivants font appel à des substances appelées sidérophores.¹⁰⁴ Ces molécules de faible poids moléculaire (entre 400 et 2000 Da), synthétisées en condition de limitation en Fe ont une forte affinité pour Fe(III).¹⁰⁵ Elles sont secrétées au voisinage de la bactérie et solubilisent et/ou complexent le Fe. Des récepteurs spécifiques permettent ensuite de contrôler l'entrée des complexes sidérophores-Fe dans la cellule.

1.5.2.2. Mo et V

Le rôle des sidérophores dans le contrôle de l'acquisition de métaux a récemment été étendu au Mo et au V (*A. vinelandii*).²⁶ Ainsi, des récepteurs d'*A. vinelandii* contrôlent l'entrée du Mo et du V à l'aide des sidérophores, permettant ainsi aux bactéries une régulation très fine des apports en micronutriments. Les sidérophores seraient donc des molécules impliquées dans le contrôle de l'acquisition d'un grand nombre de métaux. Ces molécules sont qualifiées de façon générale de métalophores. Tel que mentionné précédemment (1.4.1) le Mo est très peu abondant dans les sols et sa disponibilité est fortement réduite par complexation sur la matière organique et sur les oxydes métalliques. Les métalophores pourraient hypothétiquement avoir un rôle prédominant dans la compétition pour les micronutriments en écosystèmes forestiers, où la sécurisation des micronutriments comme le Fe ou le Mo a une importance particulière pour la fixation de N.⁹⁷

Les systèmes de transports transmembranaires du Mo sont relativement bien caractérisés.^{106,107} Un système de transport du vanadate a également été trouvé pour la première fois chez *Anabaena variabilis*.¹⁰⁸ Néanmoins, aucun lien n'a été démontré entre ces systèmes de transport et de possible molybdophore ou vanadophore à ce jour.

1.5.2.3. La gestion du Mo, V et Fe chez Azotobacter vinelandii

Les bactéries du genre *Azotobacter*, particulièrement *Azotobacter vinelandii* qui possèdent les trois Nases, ont été utilisées dans de nombreuses études sur la fixation d'azote, et peuvent être considérées comme un modèle de fixation asymbiotique terrestre. Une des études les plus complètes réalisées sur la caractérisation de l'homéostasie des métaux de la fixation d'azote a été menée sur ce modèle,²⁶ et permet de bien comprendre les bases et les implications de l'homéostasie. Cette partie a pour but d'illustrer les grands avantages de l'étude de l'homéostasie des métaux en termes de compréhension du fonctionnement métabolique chez les fixateurs de N.

1.5.2.4. Condition de croissance limitante et utilisation des différents métaux

Lorsque la croissance est limitée par N, et la FBN est elle-même limitée par les métaux cofacteurs de la Nase, l'activité diazotrophique et la croissance sont corrélées avec le quota intracellulaire du métal nécessaire à la Nase, montrant que la totalité des métaux de la fixation d'azote intracellulairement est incorporée aux nitrogénases.²⁶ Également, il a été montré que la régulation des différents métaux au sein des fixateurs d'azote est hiérarchisée ; i) la présence de Mo inhibe la synthèse des autres Nases¹⁸ et son acquisition est privilégiée vis-à-vis du V, et ii) l'utilisation de la V-Nase est elle-même privilégiée par rapport à celle de la Fe-Nase.²⁶ Les résultats d'expression des différents gènes correspondant aux différentes Nases confirment également cette hiérarchie.

1.5.2.5. Condition optimale et quota cellulaire

Les taux de croissance maximaux obtenus chez des mutants n'exprimant qu'une ou l'autre des Nases permettent de dériver la quantité de métaux minimale nécessaire pour soutenir cette

croissance optimale (les expériences de Bellenger *et al.* donnent pour un $\mu_{\max, \text{Mo}, 25^\circ\text{C}} = 0.25 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ et $\mu_{\max, \text{V}, 25^\circ\text{C}} = 0.22 \pm 0.1 \text{ h}^{-1}$: $Q_{\min, \text{Mo}} = 4.9 \pm 0.8 \text{ mol}_{\text{Mo}} \cdot \text{mol}_{\text{P}}^{-1}$ et $Q_{\min, \text{V}} = 4.2 \pm 0.3 \text{ mol}_{\text{V}} \cdot \text{mol}_{\text{P}}^{-1}$, correspondant respectivement à $Q_{\min, \text{Mo}} = (7.4 \pm 0.9) \times 10^{-19} \text{ mol}_{\text{Mo}} \cdot \text{cellule}^{-1}$ et $Q_{\min, \text{V}} = (7.6 \pm 0.9) \times 10^{-19} \text{ mol}_{\text{V}} \cdot \text{cellule}^{-1}$).²⁶ Les quotas en métaux sont exprimés en $\text{mol}_{\text{Métaux}} \cdot \text{mol}_{\text{P}}^{-1}$ ou en $\text{mol}_{\text{Mo}} \cdot \text{cellule}^{-1}$ alternativement car le phosphore est principalement constitutif de la cellule, et peut donc être utilisé comme référence de la biomasse cellulaire. Ainsi, un nombre similaire de Nase est présent dans les cellules selon qu'elles sont en culture avec du Mo ou du V. Également, selon l'équation [1.5], il est possible de dériver la vitesse d'absorption optimale du métal limitant en fonction du quota intracellulaire et de la vitesse de croissance optimal, avec des valeurs obtenues chez *A. vinelandii* de $V_{\text{Mo}} = (3.1 \pm 0.4) \times 10^{-21} \text{ mol}_{\text{Mo}} \cdot \text{cellule}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ et $V_{\text{V}} = (2.8 \pm 0.4) \times 10^{-21} \text{ mol}_{\text{V}} \cdot \text{cellule}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Les résultats obtenus permettent de comparer l'efficacité d'utilisation du métal pour la croissance diazotrophique, en termes de quantité de N fixé par unité de métal par unité de temps. Ainsi, à température ambiante, Mo semble être plus efficace à fixer l'azote, avec $96 \pm 23 \text{ mol}_{\text{Nfix.}} \cdot \text{mol}_{\text{Mo}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, suivrait le V avec $76 \pm 16 \text{ mol}_{\text{Nfix.}} \cdot \text{mol}_{\text{Metal}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ et le Fe avec seulement entre 3 et 5 $\text{mol}_{\text{Nfix.}} \cdot \text{mol}_{\text{FeNase}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.^{26,109} En condition de Mo élevé, certains organismes ont la capacité de stocker le Mo à l'intérieur de la cellule dans des protéines particulières,^{110,111} mais aucun système de stockage n'a été référencé pour le V.

L'exemple de l'étude de Bellenger *et al.* 2011²⁶ démontre une partie du potentiel de l'étude de l'homéostasie chez un organisme. La sécurisation des métaux essentiels est un enjeu important pour les être vivants. De fait, la présence d'un métal dans un organisme ainsi que sa régulation sont des indices fiables et constants de l'importance de celui-ci dans le métabolisme de l'organisme. Cela est particulièrement valable pour le V, qui peut être toxique pour les organismes à faible concentration et qui a très peu de rôles métaboliques connus en dehors de la FBN.

1.6. Biologie et physiologie des fixateurs d'azotes

Cette partie introduit certains aspects de la biologie des fixateurs de N. Elle est principalement orientée sur les organismes ubiquitaires du climat boréal, ayant un rôle prépondérant dans le cycle de N, et qui formeront les organismes modèles utilisés pendant cette étude.

1.6.1. Organismes fixateurs d'azote

Les organismes fixateurs d'azote appartiennent à différentes espèces pouvant être regroupées dans différentes familles dont les alphaprotéobactéries, les gammaprotéobactéries, les cyanobactéries et les actinomycètes. Le modèle le plus étudié est sans contestation la gammaprotéobactérie libre *Azotobacter* (*A. vinelandii* et *A. chroococcum*), qui a permis l'identification, la purification et la caractérisation des différentes Nases (voir partie 1.3). Récemment, les cyanobactéries de la famille *Anabaena* (notamment *A. variabilis*) ont également été beaucoup sujettes à étude,^{83,107,112-114} principalement pour leurs capacités photosynthétiques et diazotrophiques, et le fait qu'elles possèdent la V-Nase et des hydrogénases,¹¹⁵ les rendant ainsi intéressantes pour la production de H₂ dans la production de bioénergie.

1.6.2. Description des cellules cyanobactériennes

Les cyanobactéries, autrefois appelées algues bleu-vert, font désormais parties d'un groupe séparé dans le règne des *Eubacteria*, la division des *Cyanobacteria*.¹¹⁶ On retrouve les cyanobactéries sous différentes organisations, d'unicellulaire (*Microcystis aeruginosa*) à filamenteuse (*Oscillatoria* sp.), ainsi qu'en chapelet de cellules (*Anabaena variabilis*). Les cellules cyanobactériennes sont des bactéries photoautotrophes au C et chimioautotrophe à N.¹¹⁷ Elles possèdent donc un appareil photosynthétique (dont l'enzyme Ribulose 1-5 biphosphate carboxylase/oxygénase, RuBisCO) et des pigments photosynthétiques (dont la chlorophylle-a), qui nécessitent de grandes quantités de N dans leur structure. Elles possèdent également suivant les espèces, zéro, une, ou plusieurs Nases.

1.6.2.1. Description de la croissance des cyanobactéries

Les cyanobactéries ont une croissance généralement assez similaire à celle des autres bactéries (Figure 9). Elle consiste en une phase de latence, où les cellules s'adaptent à leur nouveau milieu, une phase de croissance exponentielle causée par les divisions cellulaires successives, et une phase stationnaire où les ressources du milieu limite la croissance et où les déchets des cellules deviennent trop concentrés. Une exception notable avec la croissance des bactéries hétérotrophes réside en ce que la phase exponentielle est raccourcie, et suivi d'une longue phase de croissance linéaire (Figure 9).⁸³ Cette croissance linéaire est attribuée à une limitation en CO₂ dissous, dont la vitesse de renouvellement dans le milieu ne serait plus suffisamment rapide pour soutenir la croissance exponentielle à partir d'une certaine concentration cellulaire. Également, un phénomène d'auto ombrage, où l'intensité lumineuse diminue avec la profondeur dans le milieu, a également une influence en fin de croissance.

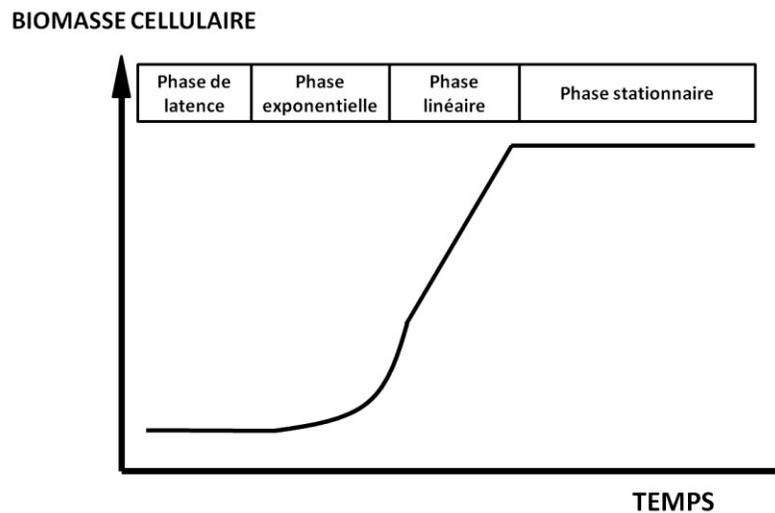


Figure 9. Description schématique des différentes phases de croissance chez les cyanobactéries.

1.6.2.2. Fixation d'azote chez les cyanobactéries

Une particularité des cyanobactéries provient du fait qu'un des sous-produits de la photosynthèse est le dioxygène (O₂), mais que ce dioxygène est un poison pour la Nase, nécessaire à son acquisition de N. Ainsi, les cyanobactéries ont développé différentes stratégies pour pouvoir se protéger. Une première stratégie consiste à séparer temporellement la fixation d'azote et la photosynthèse, avec une activité photosynthétique générant O₂ la journée, et une activité de fixation de l'azote couplée à la respiration, appauvrissant le milieu en O₂ pendant la nuit.¹¹⁸ Une seconde stratégie consiste à séparer spatialement les deux activités, grâce à des cellules spécialisées appelées hétérocystes.¹¹⁹ Ces hétérocystes, caractérisés par une paroi plus épaisse et une absence d'activité photosynthétique donnant lieu à une teneur en oxygène plus basse, qui permet une fixation d'azote optimale, concomitamment à une activité photosynthétique, avec transfert de photo-réductat depuis les cellules végétatives adjacentes.¹²⁰ Une troisième stratégie incluant séparations spatiale et temporelle a été démontrée dans des cellules de *Trichodesmium*.¹²¹ Cependant, la plupart des cyanobactéries associées aux mousses et les symbiontes de cyanolichens sont des cyanobactéries hétérocystiques.^{23,122}

1.6.2.3. *Anabaena variabilis* ATCC 29413

L'organisme qui nous a servi de modèle pour la fixation d'azote est la cyanobactérie *Anabaena variabilis* Kurz ATCC 29413. Il s'agit d'une cyanobactérie hétérocystique de la famille des *Nostocales*, vivant en colonie de 5 à 25 cellules, chaque colonie possédant un ou plusieurs hétérocystes (5 à 10% des filaments). Cette souche particulière, dont le génome a été séquencé récemment,¹¹³ a également été le modèle privilégié de l'étude de la fixation de N chez les cyanobactéries hétérocystiques, grâce à la présence de la V-Nase.^{112,123} Elle possède également de possibles débouchés dans l'industrie des bioénergies^{124,125} du fait de sa production de H₂ et grâce à une température optimale de croissance élevée (>35°C).¹¹³ Un système de transport à haute affinité du Mo et un second pour V ont été caractérisés^{107,108} chez cette souche. Également, une deuxième Mo-Nase a été identifiée dans les cellules végétative d'*Anabaena variabilis* ATCC 29413, ne fonctionnant qu'en condition anaérobique.¹²⁶

Les cyanobactéries représentent un bon modèle pour l'étude de la fixation d'azote alternative, car elles possèdent la V-Nase en plus de la Mo-Nase. Biogéochimiquement parlant, elles représentent le parfait couplage entre le cycle du C et du N, puisqu'elles sont autotrophes aux deux éléments. Particulièrement, on retrouve les cyanobactéries dans différentes associations, dont la symbiose lichénique, qui présente des particularités intéressantes pour notre étude.

1.6.3. La symbiose lichénique

1.6.3.1. Termes généraux

La symbiose lichénique réunit dans un même organisme deux à trois individus appartenant à des règnes du vivant différents, celui des champignons, le symbionte est alors appelé mycobionte, celui des chlorophytes (phycobiontes) et / ou celui des eubactéries (cyanobiontes).²³ La structure végétative où coexistent les partenaires est appelé un thalle. Le partenaire photosynthétique est appelé photobionte, quelque soit sa nature. Il existe une nomenclature basée sur le nombre et la nature du ou des symbiontes constituant le lichen. Ainsi, les lichens constitués de deux symbiontes (champignon / algue, ou champignon / cyanobactérie dans respectivement 85% et 10% des espèces de lichens) sont alors appelés lichen bipartite.²³ La présence d'un cyanobionte peut également donner la dénomination de cyanolichen, celle d'un chlorobionte chlorolichen. Dans 5% des cas, les trois symbiontes sont présents dans une même symbiose qualifiée alors de tripartite.²³

Les lichens sont considérés comme des champignons du point de vue phylogénétique, et leur classification se fait suivant le mycobionte. Les lichens sont également connus pour la production de métabolites secondaires, de petites molécules qui ne sont synthétisées par le mycobionte que lorsqu'il est en symbiose.²³ Ces composés ont un intérêt grandissant dans l'industrie cosmétique et pharmaceutique pour leurs propriétés.^{23,127} Les lichens sont également une source de nourriture pour de nombreux herbivores (caribou, orignal) et de nombreux insectes.^{45,128}

1.6.3.2. Structure du thalle

Les lichens sont classiquement séparés en trois groupes en fonction de leurs morphologies ; les folioses, dont la forme en générale large et plate ressemble à une feuille, les fruticoses, qui possèdent une structure plus épaisse, souvent ramifiée les faisant ressembler à une fructification, et les crustoses, lichens généralement millimétriques assemblés en colonies à la surface de roche, de bois ou d'autre matériel, semblable à une croûte.^{23,45} Le thalle de la majorité des lichens est stratifié, avec une couche de quelques cellules constituées du photobionte enclose dans un réseau d'hyphes (cellules végétatives des champignons). Généralement, la partie supérieure et inférieure du thalle est constituée d'un réseau dense d'hyphes appelé cortex, et la majeure partie du mycobionte se retrouve dans la partie centrale, dans un réseau d'hyphes peu dense appelé médula (Figure 10). Des rhyzines, petites excroissances fongiques ressemblant à des racines et impliquées dans l'attachement et possiblement dans l'acquisition des métaux se retrouvent sous le thallus. La médula et la couche de photobionte sont généralement recouvertes de métabolites secondaires hydrophobes, permettant un passage facilité des gaz malgré une hyper saturation en eau, facilitant ainsi les échanges de gaz lors de la photosynthèse.²³.

La croissance du thalle se fait de façon harmonisée entre les différents symbiontes, avec la croissance des photobiontes contrôlée par celle du mycobionte. Une des particularités des lichens provient du fait qu'ils ne possèdent pas de cuticule cireuse ; ils sont en équilibre hydrique avec le milieu extérieur, on les qualifie de poikilohydrique, et ils vont se dessécher rapidement en atmosphère sèche, et s'hydrater rapidement après un épisode de pluie.²³

1.6.3.3. Gestion des métaux dans la symbiose lichénique

L'absence de cuticule, leurs faibles vitesses de croissance, leurs grandes tolérances aux métaux et leurs distributions géographiques très étendues, font des lichens un matériel de choix pour les études de déposition des polluants atmosphériques.¹²⁹ Ainsi, de nombreuses études ont utilisé les lichens comme bio-moniteurs, et bio-indicateurs de pollution.¹²⁹⁻¹³¹ Les lichens sont connus pour

être résistants à de grandes quantités de métaux (jusqu'à 10000 fois la concentration physiologique), qu'ils peuvent piéger extra cellulièrement. Le rôle des substances lichéniques dans cette résistance est similaire à celui d'un métallophore.¹³²⁻¹³⁵ Plus récemment, le rôle des substances lichéniques a été étendu, montrant ainsi un rôle métabolique des substances lichéniques dans l'homéostasie de certains métaux chez les lichens.¹³⁶

La plus grande partie des apports en métaux essentiels chez les lichens se fait par déposition atmosphérique. Très peu d'études ont été faites sur la gestion des métaux dans la symbiose. On peut noter une étude de Goyal,¹³⁷ qui traite principalement de l'acquisition du Fe par l'intermédiaire des rhyzines. Également, l'acquisition des métaux par dissolution du substrat rocheux a été étudiée.^{138,139} Des études de translocation ont également été menées, et ont montré un transfert des éléments bioactifs (Mn, Mg, P) vers les extrémités actives du lichen.^{140,141} De façon générale, les études sur l'acquisition des métaux par les lichens ont été menées principalement pour comprendre comment le lichen va modifier la qualité de la bio surveillance, et très peu en prenant en considération l'aspect symbiotique du lichen.

1.6.4. *Peltigera aphthosa* (L.) Willd

1.6.4.1. Structure du lichen

Le lichen tripartite *Peltigera aphthosa* (L) Willd s.l. a été le modèle principal de cette étude. Le terme sensu lato (s.l.), au sens large, est utilisé dans le manuscrit pour caractériser l'espèce *Peltigera aphthosa* car une révision systématique de cette espèce laisserait penser qu'elle regrouperait actuellement plusieurs génotypes susceptibles d'être reconnus au rang d'espèce.¹⁴² Il s'agit d'un cyanolichen tripartite, de structure foliose, ubiquitaire des régions boréales et polaires.¹⁴³ Ce lichen est constitué d'un mycobionte, *Peltigera aphthosa* s.l., d'une algue unicellulaire *Coccomyxa peltigera*, et d'une cyanobactérie, *Nostoc* sp., régionalisée dans des petits saccules constitués d'hyphes appelés cephalodia (cephalodium au singulier) (Figure 10). Ce sont ces structures, présentes exclusivement à la surface de son thalle qui lui confèrent son nom vernaculaire, *aphthosa* se rapprochant du terme verrue. Ces structures sont très facilement

détachables du reste du thalle, ce qui permettra une étude facilitée des cyanobactéries symbiotiques et explique en partie ce choix comme modèle pour cette étude.

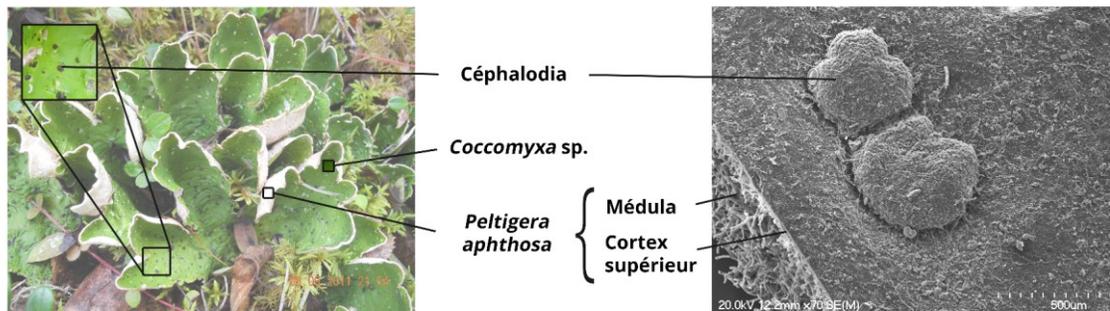


Figure 10. Vue macroscopique et microscopique de la structure du thalle de *Peltigera aphthosa* s.l..

La photo de gauche est une gracieuseté du professeur François Lutzoni (Duke university, NC). La photo de droite a été prise à l'aide d'un microscope électronique à balayage au Centre de Caractérisation des Matériaux de l'Université de Sherbrooke (Qc) sur un échantillon de lichen non traité.

1.6.4.2. Métabolisme de la fixation d'azote chez *P. aphthosa*

La fixation de N a lieu au niveau des cephalodia, où les cyanobactéries sont caractérisées par une haute fréquence d'hétérocystes (20-22%).^{144,145} Presque la totalité du N nouvellement fixé est exporté vers le mycobionte¹⁴⁶ principalement sous forme de NH_4^+ .¹⁴⁷ Une faible quantité du N est perdu dans ce processus et peut être récupérée par l'algue.¹⁴⁸ La fixation d'azote chez *Peltigera aphthosa* s.l. continue dans le noir, même pour des cephalodia excisés. L'énergie nécessaire est trouvée dans des granules de polyglucosides à l'intérieur de la cyanobactérie, et le C dans la fixation non photochimique du CO_2 .¹⁴⁷ De façon intéressante, l'activité de fixation de N n'est pas conservée dans le noir chez la cyanobactérie isolée, indiquant le rôle du champignon dans le maintien de la FBN dans le noir.

La régulation de la fixation d'azote chez le cephalodia par la symbiose semble passer par la glutamine synthase,¹⁴⁷ une enzyme impliquée dans le métabolisme de l'azote et provenant de

l'algue *Coccomyxa* et possiblement du champignon.¹⁴⁷ L'ajout de N a un effet inhibiteur sur le FBN par *P. aphthosa*.¹⁴⁹ La croissance du lichen semble être premièrement limitée par l'acquisition de C, mais une privation de N aura ultimement un effet sur la croissance par l'intermédiaire des chlorophylles, molécule demandeuse en N.^{150,151} Le contenu en N dans chaque symbionte est différent, montrant l'existence d'une fine régulation dans l'allocation du N.¹⁵¹ Plus de recherches restent nécessaires pour mieux appréhender le fonctionnement interne du métabolisme de N chez les lichens tripartites.

Les études portant sur le lichen *Peltigera aphthosa* sont relativement nombreuses, car la symbiose tripartite est un excellent modèle d'étude pour le métabolisme de l'azote et celui du carbone. Le cyanobionte est responsable principalement de la FBN,¹⁴⁶ la couche algale est en charge de la photosynthèse, et le champignon possède un rôle de structure et de protection. L'organisme symbiotique doit donc échanger les nutriments entre les différents symbiontes afin de continuer sa croissance de façon harmonisée. Cela est particulièrement intéressant pour l'étude des micronutriments, car les activités métaboliques propres à chaque symbionte nécessitent des métaux spécifiques (photosynthèse : Mn, Cu, Mg, FBN : Fe, Mo, V). Ainsi, les besoins et les contenus en métaux dans les différents compartiments devraient caractériser leur métabolisme. Néanmoins, les données sur l'homéostasie des métaux, particulièrement ceux de la fixation d'azote au sein de la symbiose lichénique et des cellules cyanobactériennes hétérocystiques restent très épisodiques. Mieux comprendre ces phénomènes est pourtant important pour mieux comprendre la dynamique du N et des micronutriments dans les espaces boréaux, où ces organismes jouent un rôle prédominant.

1.7. Question de recherche

L'écosystème boréal va subir une évolution dont l'issue est incertaine avec les modifications majeures qu'il va endurer avec les changements climatiques (1.2.2.2). La fixation biologique de l'azote est un processus clé dans cet écosystème, et une meilleure compréhension du rôle des nitrogénases alternatives dans ce processus est déterminante pour aider à prédire ces changements.

Les lichens constituent un sujet d'étude très intéressant pour mieux comprendre l'implication de la fixation d'azote alternative dans les écosystèmes boréaux. Les lichens sont des acteurs importants du cycle du carbone et de l'azote en milieu polaire et subpolaire (1.6.3). Le lichen tripartite *Peltigera aphthosa* s.l., ubiquitaire en climat boréal et polaire (1.6.4), est particulièrement bien adapté à une étude de caractérisation du rôle des Nases alternatives car les gènes de la V-Nase ont été mis en évidence chez les cyanolichens de la famille *Peltigera* (1.4.1). Dans un premier temps, nous allons donc chercher à démontrer si la V-Nase a ou non un rôle dans le cycle de N en milieu naturel.

P. aphthosa confine les cyanobactéries dans des cephalodia aisément séparables du reste du thalle (1.6.3.3), ce qui permettra une étude facilitée de l'homéostasie des métaux impliqués dans la fixation de N (1.4.3). Les lichens récupèrent la majorité des métaux essentiels à leurs activités par déposition atmosphérique, et doivent ensuite les gérer au sein de la structure symbiotique (1.6.3.2), mais la répartition de ces métaux dans les différents symbiontes est encore peu étudiée. La dépendance à la déposition atmosphérique les rend également particulièrement prompts à la limitation en Mo (1.4). Or une limitation en Mo pourrait favoriser l'activité des Nase alternatives (1.5.2.3). Notre hypothèse est que le V pourrait jouer un rôle complémentaire au Mo dans la FBN chez les cyanolichens boréaux.

Également, l'écosystème boréal est caractérisé par des températures moyennes pendant la saison de croissance inférieures à 15°C (1.1.1). Or, à cette température la répression génétique du Mo

sur la V-Nase est levée et le V pourrait devenir compétitif vis-à-vis de l'activité de fixation d'azote (1.3.3.3). Nous allons également chercher à déterminer si les faibles températures peuvent favoriser l'activité de la V-Nase *in vivo*, notamment chez les cyanobactéries, composantes primordiales du cycle de l'azote en forêt boréale ?

A l'aide de techniques microbiologiques et d'analyses chimiques, cette étude a cherché à répondre à ces différentes questions pour mieux comprendre le rôle de la fixation alternative de l'azote dans les écosystèmes terrestres.

CHAPITRE 2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Cette partie présente en détails les différentes méthodes chimiques, biologiques, analytiques et statistiques qui ont été utilisées lors de la réalisation de cette étude.

2.1. Description des échantillonnages de lichens

Cette partie détaille la localisation géographique des zones d'échantillonnage de lichens utilisés dans cette étude. Un résumé exhaustif des espèces et du nombre de spécimens est disponible en Tableau 1 à Tableau 4.



Figure 11. Carte du monde des sites de prélèvement de cyanolichens pour cette étude.

2.1.1. Espèces de lichens prélevées pour cette étude

Les espèces de lichens utilisées appartiennent toutes à l'ordre des Peltigerales et au sous-ordre des Peltigerineae ; *Peltigera aphthosa* s.l., *Peltigera neopolydactyla* s.l., et *Peltigera scabrosa* s.l., appartenant à la famille des Peltigeraceae, et l'espèce *Nephroma arcticum*, appartenant à la famille des Nephromataceae. Similairement à *Peltigera aphthosa*, une révision du genre *Peltigera* par Miadlikowska et al.^{142,152} suggère que les sous-espèces du genre *Peltigera* pourraient être reconnues au rang d'espèce à part entière. Comme pour *P.aphthosa*, par soucis de

cohérence avec la taxonomie actuelle, l'appellation *sensu lato* (s.l.), c'est-à-dire « au sens large », a été utilisée pour désigner toutes les espèces du genre *Peltigera* utilisées dans ce manuscrit.

2.1.2. Échantillonnage du Nord Québec

Les échantillons de lichens proviennent d'un échantillonnage réalisé en août 2011 dans le cadre d'un projet plus vaste d'étude de la diversité des champignons endophytes en climat boréal réalisé par l'équipe du professeur François Lutzoni (Duke University, NC, USA) (endobiodiversity.org). L'échantillonnage a été effectué le long d'un transept de 1230 km sud-nord (SN) et le long d'un transept de 1290 km est-ouest (EW) (Figure 12). Un tableau récapitulatif de l'échantillonnage est présenté en Tableau 1

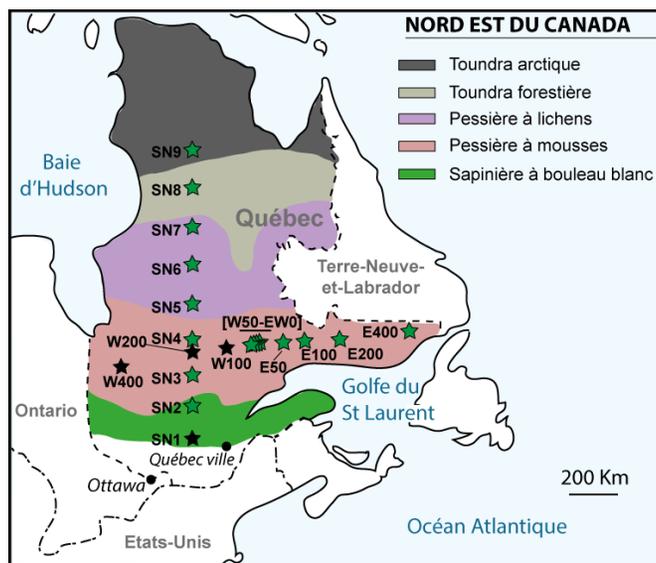


Figure 12. Sites de prélèvement du nord-Québec

Les étoiles vertes représentent les sites échantillonnés. Les étoiles noires représentent les sites visités mais non échantillonnés. Les codes indiqués sont explicités dans le texte.

2.1.2.1. Description du Transept SN

Le transept SN comprend 9 sites d'échantillonnage (depuis le point SN1, 46°46'37"N 72°58'34"W, jusqu'au point SN9, 57°49'36"N 73°11'45"W) équidistants, séparés d'environ 150 km chacun.

Tableau 1 : Détails des prélèvements au Nord-Québec (2.1.2)

Site de prélèvement	Latitude	Longitude	Nombre d'échantillon de <i>N. arcticum</i>	Nombre d'échantillon de <i>P. aphthosa</i> s.l.	Nombre d'échantillon de <i>P. neopolydactyla</i> s.l.	Nombre d'échantillon de <i>P. scabrosa</i> s.l.	Total
Québec							
W400	50.317	-77.519	0	0	0	0	0
W200	50.64	-72.97	0	0	0	0	0
W100	50.823	-70.73	0	0	0	0	0
W50	50.904	-69.565	0	1	1	0	2
W25	50.945	-69.016	0	0	1	0	1
W12,5	50.955	-68.719	0	2	2	1	5
W6	50.966	-68.587	0	3	2	1	6
W3	50.97	-68.511	0	3	1	1	5
W1,5	50.976	-68.435	0	2	1	3	6
EW0	50.979	-68.354	0	1	3	5	9
E50	51.069	-67.171	0	1	0	0	1
E100	51.152	-66.028	2	3	3	2	10
E200	51.303	-63.765	1	3	0	0	4
E400	51.618	-59.15	3	0	0	0	3
SN1	46.777	-72.976	0	0	0	0	0
SN2	48.162	-73.01	0	0	2	1	3
SN3	49.557	-73.037	0	0	2	0	2
SN4	50.964	-73.065	0	1	0	0	1
SN5	52.362	-73.092	2	0	1	4	7
SN6	53.755	-73.12	5	2	1	7	15
SN7	55.138	-73.147	6	1	0	0	7
SN8	56.535	-73.18	8	4	0	4	16
SN9	57.833	-73.205	4	3	0	5	12
Total			31	30	20	34	115

À chaque site, des thalles provenant d'une seule colonie de lichens ont été collectés dans trois sous-sites séparés de 2 km de part et d'autre d'un site central. À l'intérieur de chaque sous-site, les échantillons de lichen ont été prélevés dans trois microsites, séparés de 30 m de part et d'autre d'un site central. Aucun lichen n'a été trouvé sur le site SN1.

2.1.2.2. Description du transept EW

Le transept WE comprend 14 sites d'échantillonnage (depuis le point W400, 50°19'1"N 77°31'8"W, jusqu'au point E400, 51°37'5"N 59°9'1"W) distribués sur deux portions de part et d'autre d'un point central (EW0). Chaque site sur une portion du transept est deux fois plus éloigné que le précédent, jusqu'à une distance de 650 km du point central (pour la portion à l'ouest de EW0, les sites sont nommés W1.5, W3, W6, W12.5, W25, W50, W100, W200 et W400; le chiffre indiquant la distance en miles). Le site W100 ne contenait pas suffisamment de lichens pour cette étude, et aucun lichen de la famille des Peltigerales n'a été trouvé sur les sites W200 et W400. Ainsi, seuls les points jusqu'à W50 sont représentés dans la portion ouest de ce transept. Dans la portion est du transept, seuls les sites E50, E100, E200 et E400 ont pu être échantillonnés.

Aucun sous-site n'a été conçu pour ce transept, néanmoins les sites ont été prélevés en microsites similairement au transept SN.

2.1.3. Échantillonnage du Fjord du Saguenay.

Des échantillons de lichen ont été prélevés au cœur et aux alentours du parc provincial du Fjord du Saguenay Saint-Laurent, régis par la Société des Espace de Plein Air du Québec (SEPAQ) (**Erreur ! Référence non valide pour un signet.**). Le parc est localisé au nord du fleuve Saint-Laurent et au sud du lac Saint-Jean, dans la province de Québec. Les prélèvements ont eu lieu en juillet 2013 sur quatre sites, le long du Fjord du Saguenay. Dans chaque site visité, entre 4 et 6 sous-sites ont été échantillonnés, séparés de 1 à 2 km, couvrant différentes altitudes, couverts

végétaux et substrats. Les thalles de lichen ont été prélevés si possible d'une même colonie, éloignée le plus possible du sentier emprunté.

Tableau 2 : Détails des prélèvements dans le Fjord-du-Saguenay (Québec)

Site de prélèvement	Latitude	Longitude	Nombre d'échantillon de <i>P. aphthosa</i> s.l.
Fjord du Saguenay			
Tadoussac	48,149	-69,743	5
Baie Sainte-Marguerite	48,260	-69,950	5
Baie Éternité	48,304	-70,311	6
Anse à l'Érable	48,349	-70.580	5
Total			21

2.1.4. Autres régions du monde échantillonnées

D'autres spécimens de lichens provenant d'Alaska, de l'Alberta, de Suède et de deux sites en Russie ont également été utilisés lors de cette étude. Ces sites ont été échantillonnés par le professeur François Lutzoni, de Duke University, NC, USA à l'exception des sites de Suède.

2.1.4.1. Échantillonnage de suède

Les échantillons provenant de Suède utilisés dans cette étude ont été prélevés en septembre 2013 par le professeur Jean-Philippe Bellenger de l'université de Sherbrooke, au sein d'une chronoséquence (65°35' - 66°07' N 17°15' - 19°26' E). Cette chronoséquence de feux composée de 12 sites, couvre une période allant de 1647 à 1966 depuis le dernier feu.⁵¹ Cet écosystème est composé majoritairement de pins Sylvestre (*Pinus sylvestris* L.) et d'épicéas communs (*Picea abies* L. (Karst.) avant les feux de forêt. Les lichens d'intérêt y sont retrouvés vivant de façon épiphyte sur les bryophytes couvrant le sol. Des détails supplémentaires sur les caractéristiques de cette chronoséquence sont disponibles dans la littérature.^{41,51}

Tableau 3: Détails des prélèvements de la chronoséquence suédoise

Site de prélèvement	Latitude	Longitude	Année du dernier feu	Nombre d'échantillon de <i>P. aphthosa</i> s.l.
Suède				
Ruttjeheden	65.774	19.106	1647	5
Vaksliden	65.729	18.739	1712	3
Tjadnes	65.791	18.733	1734	3
Guorbåive	65.816	19.049	1831	2
Reivo burn	65.816	19.816	1966	3
Total				16

Des thalles de lichen des espèces *Peltigera aphthosa* et *Nephroma arcticum* ont été prélevés sur 5 des 12 sites (Tableau 3).

2.1.4.2. Échantillonnage en Alaska

Six thalles de lichen de l'espèce *Peltigera aphthosa* s.l. ont été prélevés en août 2011 dans la région de Fairbanks, en Alaska, USA (64°50.37'N 147°43.23'W, Tableau 4).

2.1.4.3. Échantillonnage en Russie

Cinq thalles de lichen de l'espèce *Peltigera aphthosa* s.l. ont été prélevés en juin 2012 dans la réserve de Stolby, territoire de Krasnoyarsk, Russie (55°53.15'N 92°46.22'E).

Un échantillon supplémentaire de l'espèce *Peltigera aphthosa* s.l. a été prélevé en août 2013 dans la région de Khabarovsk, Russie (55°53.15'N 92°46.22'E, Tableau 4).

2.1.4.4. Échantillonnage en Alberta

Cinq thalles de lichen de l'espèce *Peltigera aphthosa* s.l. ont été prélevés en juin 2012 dans le parc naturel « Buffalo National Park », en Alberta, Canada (55°53.15'N 92°46.22'E, Tableau 4).

Tableau 4 : Détails des prélèvements dans le reste du monde.

Site de prélèvement	Latitude	Longitude	Informations	Nombre d'échantillon de <i>P. aphthosa</i> s.l.
Alaska	64.844	-147.723	Fairbanks	6
Russie	55.888	92.773	Krasnoyarsk	5
Alberta	59.391	-122.986	Buffalo National Park	5

2.1.5. Conservation et nettoyage des thalles de lichen

Les thalles de lichen ont été immédiatement séchés après prélèvement, conservés secs dans des sachets en papier brun et à l'abri de la lumière. Les thalles de lichen ont été nettoyés de tout débris organiques étrangers à la symbiose (horizon organique du sol comprenant des débris de feuilles et d'aiguille de pin, partie verte de bryophyte, écorce d'arbre) à l'aide de pince en acier inoxydable, en conservant au maximum les structures du thalle en interaction avec les débris (rhyzines, cortex inférieur).

2.2. Techniques de séparation des symbiotes du lichen

Afin de comparer les contenus en métaux des symbiotes de la symbiose lichénique, les différents symbiotes ont été séparés par des méthodes de centrifugation sur gradient de densité et par dissection anatomique.

2.2.1. Séparation des photobiontes algal par centrifugation sur gradient de Percoll®

La séparation des photobiontes algal des lichens *Peltigera aphthosa* s.l. (*Coccomyxa peltigerae*) et de *Nephroma arcticum* (*Coccomyxa* sp.) a été effectuée selon une modification du protocole d'extraction de Gasulla et al 2010.¹⁵³

500 mg de thalles de lichen ont été préalablement lavés dans l'eau de-ionisée pendant 5 minutes de façon à éliminer les débris à la surface du lichen. Les thalles ont ensuite été disposés dans un mortier, additionnés de 20 mL de tampon isotonique (Tableau 5) et broyés jusqu'à disparition des structures du lichen et l'obtention d'un broyat vert. Le broyat a été filtré sur filtre à café (Sans Nom®, Forme cornet, N°4) et environ 15 mL de filtrat vert-marron à été récupéré. Le filtrat a été centrifugé à 480 g pendant 5 minutes. Après élimination du surnageant, les culots ont été resuspendus dans 2 à 3 mL de tampon isotonique et déposés sur 8-10 mL de Percoll™ (GE Healthcare biosciences AB, Upsalla, Suède) 80% v/v dans le tampon isotonique, et centrifugés à 10,000 x g pendant 10 minutes à 4°C (centrifugeuse Aventi J-251, Beckman coulter, rotor JA 25.15). À la sorti de la centrifugeuse, une couche verte sombre formé au dessus du Percoll™ (Figure 13) a été récupérée à l'aide d'une pipette de 200 µL pour ne pas déstabiliser le gradient. Entre 1 et 2 mL de concentré ont été placés dans un tube Falcon® de 15 mL, additionnés de 5 mL de tampon isotonique pour diluer le Percoll® et agités avant d'être centrifugés à 1000 x g pendant 10 minutes.

Tableau 5 : Composition du tampon isotonique utilisé dans le processus d'extraction de Gasulla et al. 2010.¹⁵³

Composant	Fournisseur	Concentration (mol.L ⁻¹)
Sorbitol	Sigma Life Science, HPLC grade, >99.5%	0.3
HEPES	Sigma Life Science, >99.5%	0.05

Le culot ainsi obtenu a été analysé au microscope afin de s'assurer de la pureté de l'algue isolée (Figure 13). Le culot d'algue a ensuite été soumis à une procédure de lavage des métaux extracellulaires (2.5.1.1), puis a été conservé au réfrigérateur à 4°C jusqu'à son utilisation.

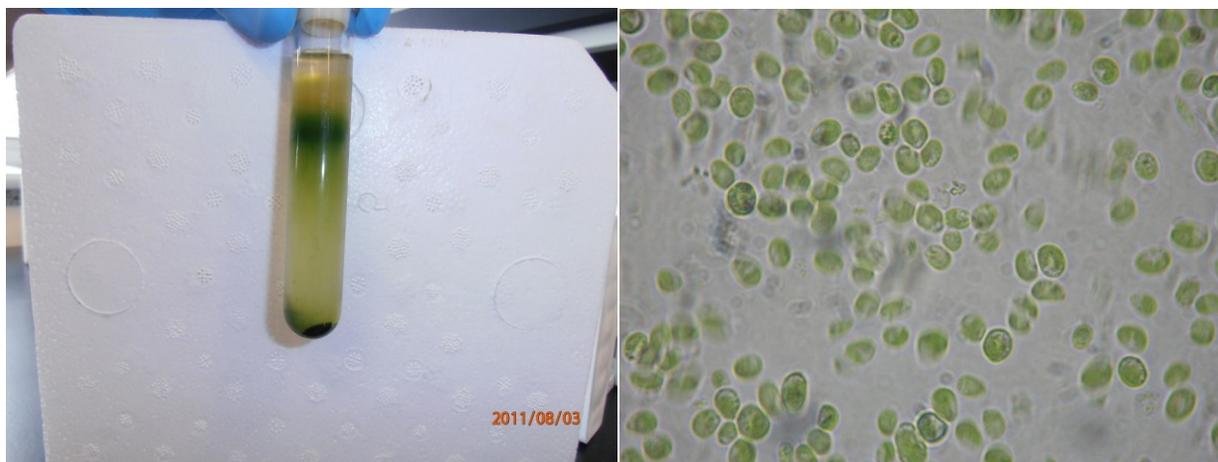


Figure 13 : Apparence typique du mélange après centrifugation selon le processus d'extraction de Gasulla et *al.* 2010¹⁵³ (gauche) et confirmation de la pureté de *Coccomyxa* après l'extraction (droite, microscopie conventionnelle grossissement X1000)

2.2.2. Dissection anatomique des cephalodia contenant les cyanobiontes (*Nostoc* sp.)

La séparation des céphalodia, structure contenant les cyanobactéries (voir 1.6.3 et Figure 10), a été effectuée manuellement. Les cephalodia ont été identifiés à l'œil nu, et séparés du reste du thalle à l'aide de lames de scalpels stériles et de pinces en acier inoxydable. L'usage de gants en nitrile a été employé pour limiter les contaminations lors de la manipulation des thalles de lichen. Les morceaux retirés ont ensuite été nettoyés à la lame de scalpel jusqu'au retrait de toutes les parties vertes (couche algal) et marrons (champignon) labiles. Les cephalodia ainsi récupérés ont été conservés dans un tube Falcon® de 15 mL, puis lavés suivant le protocole décrit en 2.5.1.1 et mis à sécher au four à 70°C avant d'être pesés et analysés (voir 2.6).

2.3. Méthode d'isolation des symbiontes du lichen *Peltigera aphthosa* s.l.

Les isolations des symbiontes du lichen *Peltigera aphthosa* ont été réalisées suivant des modifications de protocoles définis dans « Protocol of Lichenology », chapitre 1.¹⁵⁴ Les images de microscopie ont été prises à l'aide d'un microscope MOTIC BA 210 équipé d'une caméra MOTICAM5 5.0MP et du logiciel Motic ImagePlus 2.0.

2.3.1. Description des milieux d'isolation et de culture

2.3.1.1. Milieu de culture pour cyanobactérie

Tableau 6 : Composition du milieu Arnon and Allen (AA).

Produit	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Fournisseur	Concentration (mol.L ⁻¹)
MgSO ₄ .7H ₂ O	246.48	Sigma-Aldrich ReagentPlus, >99.0%	0.0005
CaCl ₂ (2H ₂ O)	147.01	Sigma-Aldrich ACS, >99%	0.0001
NaCl	58.44	OXOID, Bacteriological grade	0.002
K ₂ HPO ₄	174.18	Sigma-Aldrich ACS, >98%	0.002
MnCl ₂ (4H ₂ O)	197.91	Sigma-Aldrich ReagentPlus	9.00E-06
ZnSO ₄ (7H ₂ O)	287.53	Sigma-Aldrich ReagentPlus, >99.0%	8.00E-07
CuCl ₂ (2H ₂ O)	170.48	Sigma-Aldrich, >99.0%	3.00E-07
CoCl ₂ (6H ₂ O)	237.93	Sigma Life Science, cell culture test	1.70E-07
H ₃ BO ₃	61.83	Sigma Life Science, Bioreagent, >99.5%	4.63E-05
MoO₄Na₂(2H₂O)	241.95	Sigma-Aldrich, >99.5%	1.00E-06
VO₃Na	121.9295	Aldrich chemistry, Trace metal basis, >99.9%	1.00E-06
FeCl ₃ (6H ₂ O)	270.3	Sigma-Aldrich, >99%	8.90E-05
EDTA	372.24	Sigma-Aldrich, ACS, 99-101%	1.09E-04

Seul un des métaux en gras (Mo ou V) a été utilisé à chaque expérience.

Le milieu de culture utilisé pour la croissance des cyanobactéries (*Anabaena variabilis* et *Nostoc sp.*) est un milieu Allen et Arnon¹⁵⁵(Tableau 6) dilué 8 fois.¹¹² Il s'agit d'un milieu adapté à la croissance diazotrophique (ne contenant pas d'azote assimilable). Ce milieu sera nommé AA/8 dans le reste du manuscrit.

2.3.1.2. Milieu de culture minimum pour algue unicellulaire

Toutes les expériences sur l'algue *Coccomyxa aphthosa* ont été effectuées sur milieu minimum Bold basal medium, (Yoshimura 2002) contenant quatre fois la concentration normale du milieu en nitrate ($[\text{NO}_3^-]=1\text{g.L}^{-1}$). Ce milieu sera nommé BBM4N dans le reste du manuscrit.

Tableau 7 : Composition du milieu Bold Basal 4N (BBM4N).

Produit	Masse molaire (g.mol^{-1})	Fournisseur	Concentration (mol.L^{-1})
MgSO ₄ .7H ₂ O	246.48	Sigma-Aldrich ReagentPlus, >99.0%	0.001
CaCl ₂ (2H ₂ O)	147.01	Sigma-Aldrich ACS, >99%	0.0005
NaCl	58.44	OXOID, Bacteriological grade	0.004
K ₂ HPO ₄	174.18	Sigma-Aldrich ACS, >98%	0.002
KH ₂ PO ₄	136.09	Sigma Life Science, biomol grade, >98%	0.002
NaNO ₃ (4X)	84.99	Fisher scientific, BioReagent, >99.0%	0.012
MnCl ₂ (4H ₂ O)	197.91	Sigma-Aldrich ReagentPlus	5.72E-06
ZnSO ₄ (7H ₂ O)	287.53	Sigma-Aldrich ReagentPlus, >99.0%	3.07E-05
CuCl ₂ (2H ₂ O)	170.48	Sigma-Aldrich, >99.0%	6.29E-06
CoCl ₂ (6H ₂ O)	237.93	Sigma Life Science, cell culture test	1.68E-06
H ₃ BO ₃	61.83	Sigma Life Science, Bioreagent, >99.5%	1.85E-04
MoO ₄ Na ₂ (2H ₂ O)	241.95	Sigma-Aldrich, >99.5%	4.93E-06
FeCl ₃ (6H ₂ O)	270.3	Sigma-Aldrich, >99%	1.79E-05
EDTA	372.24	Sigma-Aldrich, ACS, 99-101%	1.71E-04

2.3.2. Isolation de *Coccomyxa peltigera* sur milieu sélectif solide

Un morceau de thalle de *Peltigera aphthosa* provenant du Nord-Québec a été lavé deux fois à l'eau dé-ionisée et broyé dans un mortier à l'aide d'un pilon avec 5 mL de milieu AA/8 (2.3.1.1, Tableau 6). 1 ml de suspension ainsi récupéré a été ensemencé sur un milieu solide BBM (2.3.1.2, Tableau 7) (2% agar) en triplicata, et laissé en incubation à température ambiante sous illumination pendant 1 à 2 mois. Les colonies vertes qui se sont développées sur le milieu ont été vérifiées sous microscope et ensemencées dans un milieu BBM liquide (Figure 14).

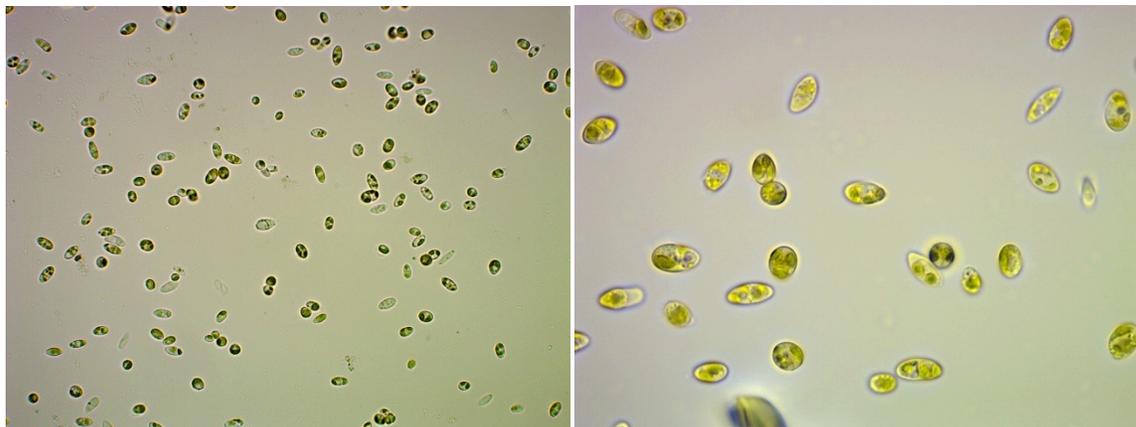


Figure 14 : Identification et vérification de la pureté de la culture de *Coccomyxa* isolé du thalle de *P.aphthosa*.

Photographie au microscope optique, gauche : X400, droite : X1000 (immersion).

2.3.3. Isolation de *Nostoc* sp. en milieu liquide à partir des cephalodia

Les cephalodia excisés (voir 2.2.2) ont été disposés dans des tubes à centrifugation de 2 mL, lavés 3 fois à l'eau MQ stérilisée, et ensuite immergés dans un milieu AA/8. Les cephalodia ont ensuite été brisés à l'aide d'un cône à pipeter, et laissés à incuber à température ambiante sous illumination 12h/12h pendant 2 à 3 mois. Les colonies de cyanobactéries qui se sont développées ont été vérifiées sous microscope et ensemencées dans un milieu AA/8 liquide avec ajout ou non de Mo ou de V ($[Métal] = 10^{-7} M$). Le processus a été répété plusieurs fois afin de purifier la souche (Figure 15).

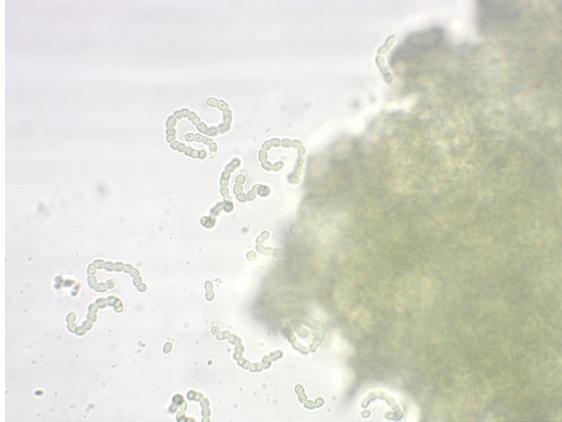


Figure 15 : Photographie au microscope optique de colonies de *Nostoc* isolées des cephalodia de *Peltigera aphthosa* (grossissement X400)

2.3.4. Caractérisation des souches isolées

Les souches d'algues et de cyanobactéries isolées ont été envoyées au laboratoire du Professeur Lutzoni (Duke University, NC, USA) pour identification par séquences spécifiques (ITS pour l'algue, et RbcLx pour *Nostoc*) par le Dr Miadlikowska Jolanta. L'algue a été identifiée comme *Coccomyxa aphthosa*, symbionte algal du lichen *Peltigera aphthosa* s.l., et la cyanobactérie *Nostoc* sp. a été identifiée comme le symbionte du même lichen.

2.4. Méthode de culture des cyanobactéries et algues unicellulaires

2.4.1. Notes préliminaires

- La souche d'*Anabaena variabilis* (cyanobactérie) ATCC 29413 utilisée dans cette étude a été obtenue auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC).
- Les symbiontes du lichen *Peltigera aphthosa* s.l., *Nostoc* sp. et *Coccomyxa peltigerea* ont été obtenus par isolation et purification à partir d'échantillons naturels de lichen.

- Toute la verrerie et le matériel (erlenmeyer, bouteilles, barreaux magnétiques) utilisés pour contenir les organismes d'études ont été préalablement lavés un minimum de 24h dans du HCl 1M, puis rincés trois fois à l'eau Milli-Q ($S = 18.2 \text{ ohm.cm}^{-2}$).
- Les cultures de cyanobactéries ont été effectuées en erlenmeyer de 250 ml sur des multi-plaques agitatrices (IKA®, modèle RO15PS1), avec barreaux magnétiques recouverts de Teflon®) ou sur des agitateurs orbitaux (Multitron PRO, Infor HT) à températures ambiantes ou contrôlées (5-30°C), avec des cycles lumière/obscurité de 12h/12h.

2.4.2. Suivi de croissance et prélèvement des échantillons

2.4.2.1. Appareillages utilisés

2.4.2.1.1. Spectrophotomètre UV-visible

Un spectromètre UV-Visible (Genesys 20, ThermoScientific) a été utilisé pour le suivi de la croissance des micro-organismes. La croissance des cyanobactéries *Nostoc* et *Anabaena* a été suivie par mesure de la densité optique (DO, ou absorbance) à $\lambda_{\text{max}} = 720 \text{ nm}$. L'algue *Coccomyxa* a été suivie à $\lambda_{\text{max}} = 560 \text{ nm}$. Dans les deux cas, les longueurs d'ondes sélectionnées ne sont pas impactées par la présence des pigments photosynthétiques.

2.4.2.1.2. Lecteur optique de microplaque 96-puits

Un lecteur de microplaque 96-puits (SpectraMax 250, Molecular device, SoftMax Pro v3.1.2) pouvant réaliser la lecture de six longueurs d'ondes simultanées a été utilisé pour la quantification des pigments photosynthétiques. Le chemin optique de la microplaque pour un volume de 200 μl a été déterminé expérimentalement à 0.50 cm ($\text{IC}_{95\%} = 0.023 \text{ cm}$, $n = 45$) par lecture de mêmes solutions au spectrophotomètre et au lecteur de microplaque.

2.4.2.2. Protocole de quantification des pigments photosynthétiques

2.4.2.2.1. Extraction des pigments

2.4.2.2.1.1. Microméthode

0.5 ml à 1 ml de culture ont été prélevés dans un tube de centrifugation de 2 ml, et ont été centrifugés à 10,000 rpm (Sorvall LEGEND MICRO 21, Thermo scientific, rotor 75003424) pendant 2 x 10 minutes et le surnageant a ensuite été éliminé. Le culot cellulaire a été mis à extraire dans 1 ml de méthanol, agité au vortex (15 secondes) et mis au bain à ultrason pendant 2 x 10 minutes, avec agitation au vortex entre les deux périodes. Les cellules ont été centrifugées une seconde fois à 10,000 rpm pendant 2 x 10 minutes pour sédimenter les amas cellulaires. Le surnageant a ensuite été prélevé pour la détermination des pigments photosynthétiques par spectrophotométrie UV-visible tel que détaillé dans le paragraphe 2.4.2.2.2.

2.4.2.2.1.2. Macrométhode

1 ml à 2 ml de culture ont été prélevés dans un tube de centrifugation de 15 ml, et ont été centrifugés (Sorvall ST4OR, Thermo scientific, rotor 75003607) à 3500 rpm pendant 2 x 10 minutes et le surnageant a ensuite été éliminé. Le culot a ensuite été traité comme décrit en 1.3.4.2.1.1

2.4.2.2.2. Détermination des concentrations en chlorophylles au lecteur optique de microplaque 96-puits

200 µl d'extrait ont été prélevés et introduits dans une microplaque 96 puits non stérile, préalablement lue au lecteur optique de microplaque 96-puits pour retirer la participation de l'hétérogénéité du plastique à la lecture. 200 µl de méthanol ont été utilisés comme blanc. La microplaque a ensuite été lue à 4 longueurs d'onde ($\lambda_1 = 750$, $\lambda_2 = 665$, $\lambda_3 = 653$, $\lambda_4 = 470$) afin de déterminer la concentration en chlorophylle-a pour les cyanobactéries ainsi que la concentration en chlorophylle-a, en chlorophylle-b et la concentration totale en caroténoïde pour les algues, selon les formules empiriques trouvées dans les équations [2.1] à [2.4] suivantes.¹⁵⁶⁻¹⁵⁸

Pour les cyanobactéries :

$$Chl_a (\mu g. ml^{-1}) = 13.42 \times (A_{665} - A_{750}) \quad [2.1]$$

Pour les algues unicellulaires :

$$Chl_a(\mu g. ml^{-1}) = 15.65 \times (A_{665} - A_{750}) - 7.340 \times (A_{653} - A_{750}) \quad [2.2]$$

$$Chl_b(\mu g. ml^{-1}) = 27.05 \times (A_{653} - A_{750}) - 11.21 \times (A_{665} - A_{750}) \quad [2.3]$$

$$Car_{tot}(\mu g. ml^{-1}) = \frac{(1000 \times (A_{470} - A_{750}) - 2.860 Chl_a - 129.2 Chl_b)}{245} \quad [2.4]$$

Avec :

Chl_a : Concentration massique en Chlorophylle a

Chl_b : Concentration massique en Chlorophylle b

Car_{tot} : Concentration massique totale en carotenoïde

A_λ : Absorbance à la longueur d'onde λ

2.4.2.2.3. Validation du stockage des cellules à -80°C avant extraction de la chlorophylle-a chez *Anabaena variabilis*

Les culots cellulaires en attente de détermination de leur concentration en pigment photosynthétique ont été conservés à -80°C. Un même lot de culots provenant du même échantillon a été soumis en triplicatas à la procédure d'extraction après différents temps de stockage (1 mois et 1 an) afin de vérifier la stabilité au cours du temps. Les résultats (Tableau 8) montrent que les culots cellulaires peuvent être stockés pendant 1 an sans modification significative du contenu en chlorophylle-a de l'échantillon.

Tableau 8 : Suivi de la concentration en chlorophylle-a pour un même échantillonnage de *Anabaena variabilis* en fonction du temps de conservation à -80°C avant l'extraction.

Temps de stockage (jour)	[Chl _a] ($\mu g Chl_a. ml^{-1}$)	Écart-type	n
0	6,4	0,5	9
30	6,5	0,2	6
406	6,3	0,6	6

2.4.2.3. Équivalence masse / densité optique / chlorophylle-a.

Enfin d'assurer la qualité des mesures de croissance d'un microorganisme, il est essentiel de (i) vérifier que les paramètres utilisés sont bien directement reliés à l'accroissement de biomasse de la culture et (ii) valider les limites de linéarité pour les techniques utilisées. Dans cette étude nous avons utilisé la densité optique (DO, autre dénomination pour l'absorbance) et la concentration en chlorophylle-a (Chl_a) comme proxy de la croissance. Nous ferons l'hypothèse que la DO, étant proportionnelle à la turbidité du milieu, sera indicative de la biomasse totale, alors que la chlorophylle-a sera proportionnelle aux cellules entières, car la chlorophylle se dégrade rapidement hors de la cellule.

2.4.2.3.1. Linéarité de la lecture de DO₇₂₀ au spectrophotomètre.

Tableau 9 : Pourcentage d'écart entre la valeur de DO₇₂₀ (sans unité) avant et après une dilution par 2.

DO _{non dilué}	% Écart (DO _{non dilué} -DO _{dilué})/DO _{dilué}	Écart-type	n
0.40	0	1	7
0.50	-3	2	16
0.55	-4	2	22
0.60	-4	3	14
0.70	-5	3	18
0.80	-8	4	14
0.90	-8	6	8

Les fortes variations obtenues pour des DO₇₂₀ > 0.6 (Tableau 9) peuvent être expliquées par la présence d'amas de filaments de cellule. De façon à garder les erreurs inférieures à 5%, toutes les valeurs supérieures à DO = 0.50 seront systématiquement diluées.

2.4.2.3.2. Détermination du ratio masse / Densité Optique

Pour chaque microorganisme, deux cultures (réplicat 1 et 2) ont été effectuées dans des erlenmeyers de 2 L remplis de 1.7 L de milieu de culture. Les prélèvements de volume se font tel

que $\text{Vol} \times \text{DO} = \text{Constante}$, afin d'obtenir une masse aux alentours de 15 mg, suivant une estimation préliminaire. Les volumes de culture prélevés sont centrifugés dans des tubes de 50 mL, regroupés ensemble dans un seul tube de 2 ml et mis à sécher. A chaque prélèvement, 3 lectures indépendantes de la densité optique et de la chlorophylle-a ont été effectués selon les méthodes décrites précédemment. Les résultats pour *Anabaena variabilis* sont présentés en Figure 16 et dans les Tableau 10 à Tableau 12.

Les résultats pour *Anabaena variabilis* montrent que la DO et la concentration en chlorophylle-a sont proportionnelles jusqu'à près de $\text{DO} = 1$ (Figure 16A). Également, aux faibles DO ($\text{DO}_{720} < 0.150$), la densité cellulaire dérive sensiblement de la moyenne (Figure 16B). La chlorophylle-a elle est relativement stable jusqu'à une $\text{DO} < 1$, puis diminue fortement pour les $\text{DO} > 1$ (Figure 16C), certainement dû à une diminution de l'activité photosynthétique en fin de croissance ou dû à une accumulation de corps cellulaire mort. De façon générale, la DO_{720} et la Chl_a donne des résultats très similaires entre $\text{DO}_{720} = 0.15$ et 0.1 (Figure 16D). Ces résultats semblent confirmer nos hypothèses, car la chlorophylle-a est un meilleur estimateur de la biomasse à faible DO ($\text{DO} < 0.15$), mais décroît rapidement en fin de croissance, alors que la DO, reste proportionnelle à la biomasse, même à forte OD.

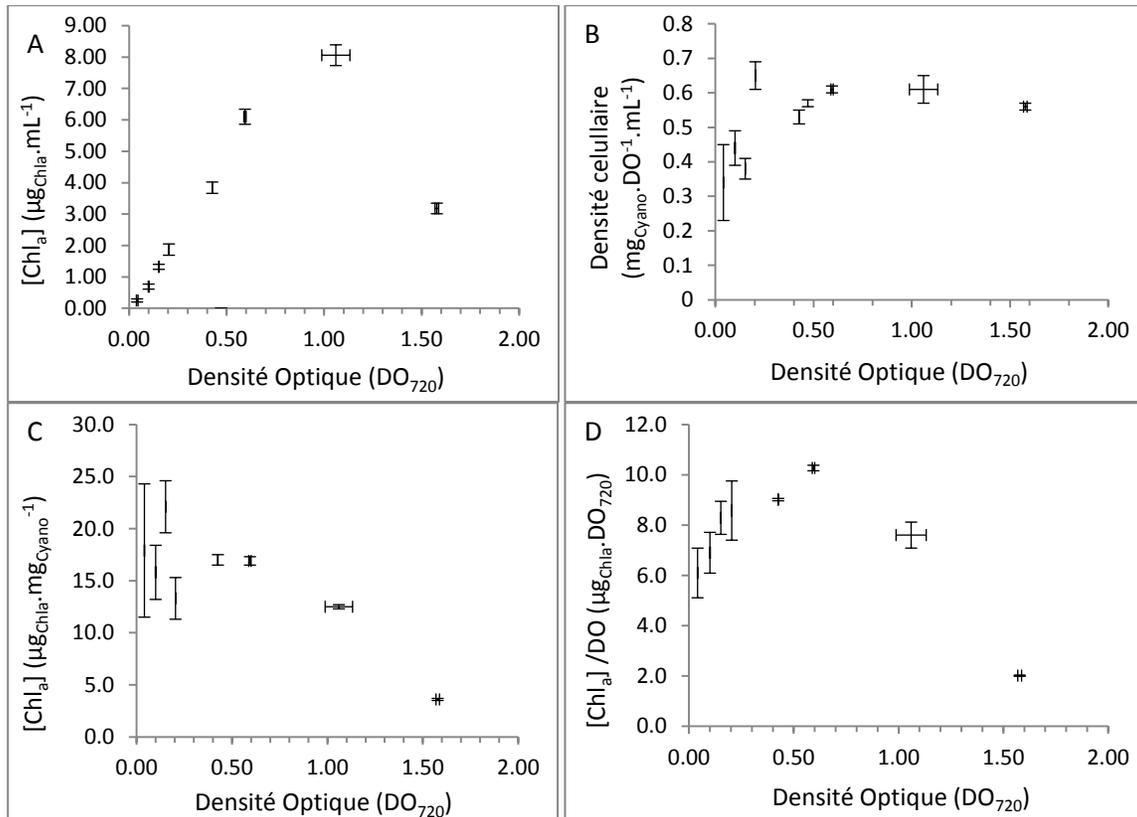


Figure 16 : Évolution de la densité cellulaire, du contenu en chlorophylle-a et du ratio chlorophylle-a sur OD₇₂₀ en fonction de la croissance.

Les barres d'erreurs représentent les écart-types pour la DO et la [Chl_a] exprimée en µg_{chla}.mL⁻¹, et des incertitudes propagées pour toutes les autres valeurs.

Il faut également noter que les caractéristiques des filaments (nombre de cellules, fréquence des hétérocystes) peuvent participer à complexifier le système. Néanmoins, la DO et la Chl_a sont efficaces pour suivre la croissance d'*Anabaena variabilis*. Particulièrement, dans la région DO₇₂₀ 0.2 – 1, correspondant à la phase de croissance linéaire, et où nous effectuerons nos prélèvements.

2.4.2.3.3. Évolution des paramètres physiologiques au long de la croissance.

Le Tableau 10 regroupe les paramètres physiologiques qui vont nous intéresser particulièrement pendant cette étude ; le contenu cellulaire en phosphore (P), en Mo, en magnésium (Mg),

l'activité enzymatique des nitrogénases (ARA, voir 2.7.1), ainsi que certains ratio d'importance (C :N :P, et Mo :P).

Tableau 10 : Contenu cellulaire d'*Anabaena variabilis* ATCC 29413 en fonction de la croissance.

DO ₇₂₀	Écart-type (n=3)	Contenu en Mg (mg _{Mg} ·g _{Cyano} ⁻¹)	Écart-type	Contenu en P (mg _P ·g _{Cyano} ⁻¹)	Écart-type	Contenu en Mo (µg _{Mo} ·g _{Cyano} ⁻¹)	Écart-type	# Réplicat
0.041	0.004	2.6	0.1	12.3	0.4	17.1	0.5	1
0.100	0.002	2.7	0.1	10.9	0.3	20.1	0.6	2
0.152	0.000	3.0	0.1	12.5	0.4	19.0	0.6	2
0.204	0.000	1.9	0.1	8.0	0.2	9.2	0.3	1
0.426	0.000	2.6	0.1	9.2	0.3	15.5	0.5	2
0.471	0.001	2.8	0.1	10.6	0.3	12.7	0.4	1
0.594	0.006	2.3	0.1	8.2	0.2	11.6	0.4	2
1.06	0.07	1.8	0.1	6.6	0.2	38.1	1.2	2
1.578	0.009	1.6	0.1	6.3	0.2	22.0	0.7	1

Les écart-types pour les contenus en éléments ont été déterminés par propagation des incertitudes sur les mesures (une seule mesure par ligne). Pour chaque DO, trois échantillons ont été prélevés pour la détermination de la DO, et un échantillon a été prélevé pour la mesure de masse et le contenu en élément chimique. A chaque DO, un des deux réplicats biologiques (# Réplicat) seulement a été utilisé.

Le contenu en métaux au long de la croissance diminue légèrement. Particulièrement P passe de 8.2 mg_P·g_{Cyano}⁻¹ à DO₇₂₀= 0.05 à 4.2 mg_P·g_{Cyano}⁻¹ à DO₇₂₀ = 1.5. Le Mg est relativement stable jusqu'à DO₇₂₀ = 0.6, puis diminue. Cela est cohérent avec le comportement de la chlorophylle-a, qui est composé à 3% m/m de Mg. Le Mo quant à lui après une faible diminution ré-augmente pour des DO₇₂₀ > 1.

Néanmoins, le ratio Mo : P (mol.mol⁻¹) est stable tout au long de la croissance (Tableau 11) jusqu'à OD₇₂₀ > 1, où le Mo commence possiblement à être stocké dans la cellule (voir 1.5.2.5). De même, l'activité de la Nase diminue légèrement au long de la croissance. Cela est consistant avec une activité métabolique moins forte en fin de croissance. Le ratio N :P est relativement

semblable en début de croissance et en fin de croissance. Par contre, le ratio C:N et C:P est plus grand en fin de croissance (une seule détermination effectuée pour chaque DO).

Tableau 11 : Paramètres cellulaires et activité d'*Anabaena variabilis* ATCC 29413 en fonction de la croissance.

DO ₇₂₀	Écart-type (n=3)	Mo : P (10 ⁻⁴ .mol _{Mo} .mol _P ⁻¹)	Écart-type	Activité Nase (nmol _{éthylène} .min ⁻¹ .g ⁻¹)	Écart-type	%N	%C	C:N:P	# Réplicat
0.041	0.004	4.5	0.2	-	-	-	-	-	1
0.100	0.002	5.9	0.3	5.0	0.3	-	-	-	2
0.152	0.000	4.9	0.2	-	-	-	-	-	2
0.204	0.000	3.7	0.2	3.2	0.3	10.23	44.26	96:19:1	1
0.426	0.000	5.4	0.2	-	-	-	-	-	2
0.471	0.001	3.9	0.2	4.3	0.4	-	-	-	1
0.594	0.006	4.6	0.2	2.9	0.3	-	-	-	2
1.060	0.07	18.7	0.8	-	-	7.55	48.79	140:19:1	2
1.578	0.009	11.3	0.5	-	-	-	-	-	1

L'écart-type pour Mo :P et pour l'activité de la Nase a été déterminé par propagation des incertitudes (une seule mesure par ligne pour Mo :P). À chaque DO, trois échantillons ont été prélevés pour la détermination de la DO, et un échantillon a été prélevé pour la mesure de masse et le ratio Mo :P. L'activité de la Nase a été établie avec 3 réplicats techniques. À chaque DO, un des deux réplicats biologiques (# Réplicat) seulement a été utilisé. Les valeurs de %N, %C et C :N :P sont indicatives car elles ne relèvent que d'un seul échantillon.

2.4.2.3.4. Synthèse

L'activité métabolique d'*Anabaena variabilis* est plus importante en début de croissance, puis diminue ensuite. Les indicateurs de l'activité photosynthétique (Mg, chlorophylle-a) montrent que celle-ci est assez constante jusqu'à une OD environ de 1, puis décline. L'activité de fixation de N, ainsi que la quantité de P totale diminuent sensiblement tout au long de la croissance. Malgré tout, le ratio N :P :Mo est constant jusqu'à OD₇₂₀ = 1, alors que le ratio C :N et C :P augmente en fin de croissance, possiblement dû à une accumulation de corps cellulaires vides enrichis en C (ratio Chla/DO diminue), ou par une diminution des besoins en N (chlorophylle a).

Le comportement de *Anabaena variabilis* peut différer entre la phase de croissance exponentielle ($DO_{720} < 0.2$) et la phase linéaire ($0.2 < DO_{720} < 1$). Les valeurs caractéristiques qui diffèrent entre les deux phases seront conservées telle quelle, et les autres valeurs seront moyennées (Tableau 12).

Tableau 12 : Résumé des caractéristiques d'*Anabaena variabilis* ATCC 29413 lors des différentes phases de croissance.

Caractéristiques	Phase exponentielle	Écart-type (n=3)	Phase linéaire	Écart-type (n=4)	Total	Écart type (n=7)
Contenu en Mg ($mg_{Mg} \cdot g_{Cyano}^{-1}$)	2.8	0.2	2.4	0.4	2.6	0.4
Contenu en P ($mg_P \cdot g_{Cyano}^{-1}$)	11.9	0.6	9.0	0.8	10	2
Contenu en Mo ($\mu g_{Mo} \cdot g_{Cyano}^{-1}$)	19	1	12	3	15	4
Mo : P ($10^{-4} \cdot mol_{Mo} \cdot mol_P^{-1}$)	5.1	0.7	4.4	0.8	4.7	0.8
Densité cellulaire ($mg_{Cyano} \cdot DO_{720}^{-1} \cdot mL^{-1}$)	0.38	0.08	0.59	0.03	0.52	0.07
Contenu en Chlorophylle-a ($mg_{Chla} \cdot g_{Cyano}^{-1}$)	17	4	15	1	17	3
Chla. DO_{720}^{-1}	7.1	0.9	8.9	0.7	8.1	0.8

En gras les valeurs retenues pour notre étude.

2.4.2.4. Prélèvement des échantillons à fin d'analyse élémentaire

Lorsque la culture atteint une DO d'environ 0.6, 10 ml de culture ont été prélevés dans un tube à centrifugation de 15 ml, centrifugés à 2500 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant est ensuite éliminé et les culots conservés à 4°C.

2.5. Méthodes de lavage des métaux extracellulaires

Dans le cadre de notre étude, il est essentiel de pouvoir différencier les métaux adsorbés sur la partie extracellulaire du plasmalemme des différents organismes, des métaux effectivement contenus à l'intérieur du cytoplasme ou associés aux protéines de la membrane cellulaire. Afin d'éliminer les métaux présents à la surface de la membrane, une procédure de lavage employant un mélange d'oxalate de sodium (0.1M) et d'acide éthylène diamine tetraacétique (EDTA) disodique (0.05M) a été utilisé. Ce réactif a été utilisé précédemment pour éliminer les métaux associés aux oxy-hydroxydes de fer à la surface d'algue unicellulaire ¹⁵⁹. La littérature sur les lichens ne faisant pas état de ce traitement, les différents lavages utilisés pour les lichens dans la littérature ont été comparés entre eux pour vérifier l'efficacité de la méthode.

2.5.1. Description de la procédure de lavage

2.5.1.1. Procédure pour le lavage de cellule (cyanobactérie, algue, eubactérie)

Généralement 10 ml de suspension de cellule (ajustable suivant les paramètres de l'expérience de 5 ml à 50 ml) ont été centrifugés. Le culot de cellule récupéré après centrifugation est ensuite re-suspendu dans 5 ml de solution de lavage Oxalate/EDTA (0.1M/0.05M) à l'aide d'un vortex ou par secousses répétées et laisser à agiter pendant 30 minutes à 130-150 rpm. L'échantillon est ensuite centrifugé à 2500 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant est éliminé. L'opération est répétée 3 fois. Le culot final est transféré dans un tube à digestion Digitube® (SCP Science) et mis à sécher au four (Model 6, Precision scientifique, THELCO) à 70°C avant d'être analysé.

2.5.1.2. Procédure pour le lavage des thalles de lichen

Les thalles de lichen sont préalablement choisis et pesés, avant d'être insérés dans un tube à centrifugation de 50 mL (Fisherbrand, Canada). 20 mL de solution de lavage Oxalate/EDTA (0,1M/0,05M) est ajouté au tube, et les tubes sont laissés à agiter 130-150 rpm pendant 40

minutes. Le liquide de lavage est ensuite éliminé, et l'opération est répétée une seconde fois avec 20 mL de solution de lavage pendant 30 minutes sous agitation. Le thalle de lichen est ensuite lavé rapidement à l'eau MQ afin de retirer les excès de solution de lavage. Les échantillons sont ensuite disposés dans une coupelle de pesée recouverte d'une autre coupelle de pesée préalablement percée pour permettre l'évaporation de l'eau. Enfin, les échantillons sont mis à sécher dans un four à 70°C jusqu'à ce que le poids du thalle soit devenu stable.

2.5.2. Comparaison de différentes méthodes de lavage du thalle de lichen

Afin de vérifier l'efficacité de la méthode de lavage Oxalate/EDTA, différentes méthodes de lavage sélectionnées dans la littérature sur les lichens ont été testées sur 5 répliques de lichens. 5 conditions ont été établies i) Sans traitements, (témoin négatif) ii) eau Milli-Q (blanc de méthode) ^{160,161}, iii) NiCl₂ 0,2M (agent déplaçant) ¹⁶²⁻¹⁶⁶ iv) EDTA 0,02M (agent chélatant) ^{162,167-169} et v) Oxalate EDTA ¹⁵⁹. Les lichens ont été soumis à trois traitements de lavage avec 20 mL de solution de lavage pendant 40, 30 et 30 minutes, similairement à la littérature ^{163,168}. Les thalles de lichens ont ensuite été analysés selon le protocole déterminé en partie 2.6. Les contenus en Mg⁺⁺ et en K⁺ sont des marqueurs de potentiels dégâts au niveau des membranes des lichens, pouvant indiquer une perte de contenu intracellulaire.¹⁶⁴

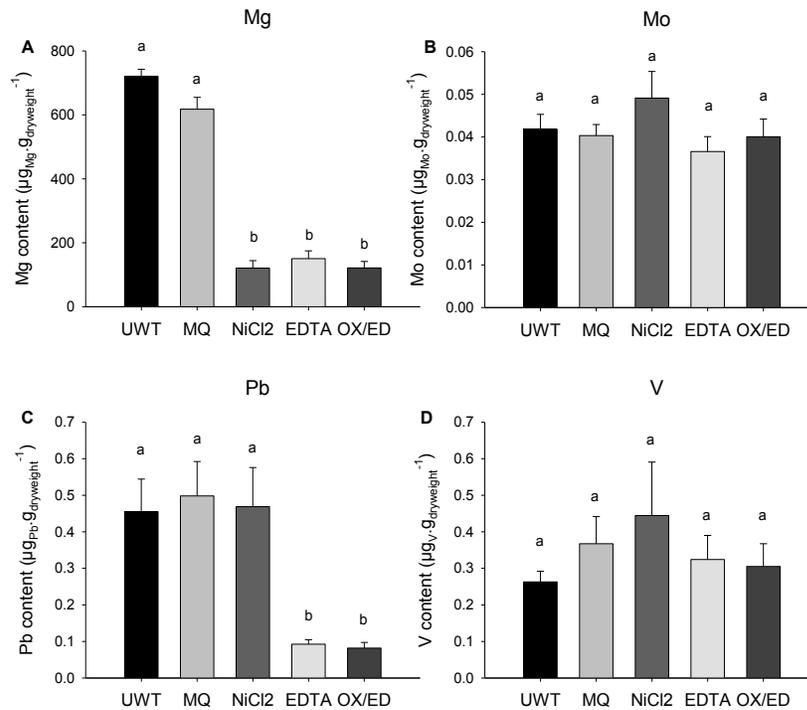


Figure 17 : Contenu en métaux des thalles de lichen en fonction du lavage subit.

Les lettres représentent le résultat d'une Anova ($p < 0.05$)

UWT : Thalle non lavé, MQ : Thalle lavé à l'eau MQ, NiCl₂ : Thalle lavé avec du Chlorure de Nickel (II) (0,2M), EDTA : Thalle lavé avec de l'EDTA (0,2M) et OX/ED : Thalle lavé avec une solution d'Oxalate / EDTA (0.1M/0.05M).

Également, les solutions de lavage ont été récupérées et analysées par spectrométrie de masse à torche plasma (ICPMS) (gamme d'étalonnage effectuée dans la solution de lavage initiale) afin de vérifier que le nombre de lavage était suffisant à retirer la majeure partie des éléments présents extracellulairement.

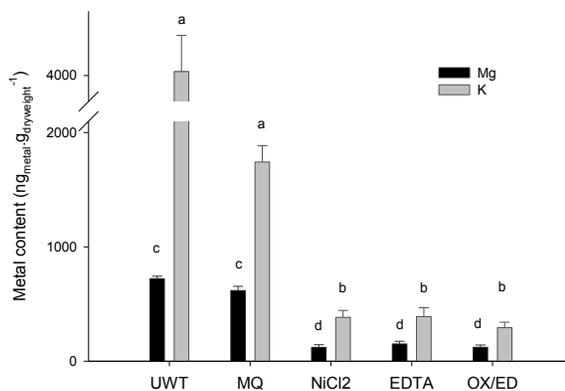


Figure 18 : Suivi des métaux indicateurs de dommages cellulaires en fonction des lavages effectués.

UWT : Thalle non lavé, MQ : Thalle lavé à l'eau MQ, NiCl₂ : Thalle lavé avec du Chlorure de Nickel (II) (0,2M), EDTA : Thalle lavé avec de l'EDTA (0,2M) et OX/ED : Thalle lavé avec une solution d'Oxalate / EDTA (0.1M/0.05M).

Les résultats de l'expérience sont disponibles pour les métaux d'intérêt dans notre étude en Figure 17 et Figure 18 . Le lavage Oxalate/EDTA donne des résultats similaires au lavage EDTA en termes d'efficacité et des résultats similaires à l'EDTA et à NiCl₂ en termes de dégât cellulaire sur les thalles de lichens. Cette méthode étant utilisée principalement pour les micro-organismes ¹⁵⁹, nous conserverons le lavage Oxalate/EDTA pour le reste de l'étude dans un souci de comparabilité.

2.6. Analyses élémentaires dans les matrices biologiques

La caractérisation des contenus en métaux des différents organismes biologiques présents dans cette étude a été réalisée en deux étapes ; premièrement, le matériel organique est minéralisé par un processus de digestion oxydative avant d'être analysé par spectrométrie de masse à torche plasma (ICPMS).

2.6.1. Note préliminaire

- L'eau utilisée dans la totalité de ces procédures est une eau obtenue par triple traitement de l'eau du robinet de la ville de Sherbrooke. Un premier traitement est effectué par l'université par osmose inverse. Ensuite, l'eau est passée à travers un système Thermofisher Barnstead E-pure (module ORGANICfree D5023 ; cartouche D0836-MACROpure, D0803-High Capacity, D5027-ULTRApure DI SG, D5021-ORGANICfree, FisherScientific, Canada). Enfin, l'eau ainsi obtenue (résistivité 18.2 M Ω .cm) est stockée dans une cuve de 50 litres en Nalgene® préalablement nettoyée à HNO₃ 20%. Avant son utilisation finale, l'eau est passée à travers un système de purification Milli-Q® Advantage A10(Millipore) avec lampe UV pour l'élimination des résidus organiques et filtre 0.2 μ m en sortie. Cette eau triplement traitée sera dénommée eau MQ le long de ce manuscrit.
- Toutes les manipulations de lavage de matériel et de digestion des échantillons ont été effectuées sous des hottes aspirantes chimiques dédiées à cet usage.
- Toutes les manipulations de séchage de matériel et de préparation des échantillons pour l'analyse élémentaire ont été effectuées sous une hotte biologique de niveau II (Thermofisher 1300 Series Classe II, Type A2) équipée d'un filtre à particule HEPA.
- Tout le matériel plastique utilisé pour les analyses élémentaires (tubes pour les courbes d'étalonnage, embout de pipette, tube en Teflon® de 55 mL, à l'exception des tubes DigiPrep® 15 ml et 50 ml fournis avec certificat d'analyse) est préalablement traité à l'HNO₃ 20% dans un bac en plastique pendant 24 heures. Le matériel est ensuite rincé 3 fois à l'eau MQ et mis à sécher sur des supports à tubes préalablement lavés sous hotte.

2.6.2. Minéralisation des matrices organiques

Les différents matériaux biologiques ont été solubilisés à l'aide d'acide nitrique (HNO₃), additionnés ou non de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Deux procédures de digestion ont été employées suivant la quantité et la qualité des matériaux à digérer ; une procédure de digestion assistée par microonde pour les quantités supérieures ou égales à 100 mg, et une procédure par

plaque chauffante (DigiPrep Mini, SCP Science) pour les quantités inférieures à 100 mg et les matrices contenant des composés carbonés non récalcitrants (bactérie, algue).

2.6.2.1. Préparation des échantillons avant digestion

2.6.2.1.1. Lavage et séchage au four

Les échantillons à digérer sont, au besoin, préalablement lavés suivant la méthode décrite dans la section 2.5.1. Les échantillons sont ensuite mis à sécher au four à 70°C pendant 3 jours ou jusqu'à obtention d'une masse constante.

2.6.2.1.2. Pesée et préparations

Les échantillons séchés sortis du four ont été pesés après 10 minutes de refroidissement à la température de la pièce. Les pesées ont été effectuées sur une balance Mettler Toledo XS64. Le Tableau 13 regroupe par matériaux biologiques la gamme de masses utilisées, la méthode de digestion employée ainsi que la quantité d'acide utilisée.

Tableau 13 : Détails des procédures de minéralisation des échantillons.

Matériel biologique	Masse digérée (±0.0002mg)	Digestion	volume HNO ₃ (mL)
Cyanobactérie pure	~ 2-4	DigiPrep	1 - 2
Algue extraite	~ 1-2	DigiPrep	1 - 2
Cephalodia	1 - 10	DigiPrep	1 - 2
Lichen lavé	100-200	Micro-onde	10
Lichen non lavé	100-200	Micro-onde	10

2.6.2.2. Méthode de digestion assistée par micro-ondes

La méthode de digestion assistée par microonde a été principalement utilisée pour la minéralisation des thalles de lichen lavés et non lavés.

2.6.2.2.1. Procédure de digestion

100 à 500 mg d'échantillons de thalles de lichen préalablement séchés et pesés ont été disposés dans des tubes en Téflon® de 55 ml sous une hotte aspirante dédiée à cet usage. 10 à 12 ml d'HNO₃ grade métaux traces (TraceMetal™ Grade, Fisher scientific) additionnés ou non de 1 mL d'H₂O₂ (Grade Métaux Trace, VWR) ont été ajoutés aux tubes. Les échantillons sont laissés à réagir dans les tubes à température ambiante pendant 30 minutes avant d'être disposés dans un micro-onde MARS avec des bombes à digestion Mars Xpress™ (CEM corporation) dans un carrousel 40 places (minimum 8 places utilisées à chaque digestion). Les échantillons sont ensuite soumis à une rampe de température de 15 minutes jusqu'à 170°C, puis maintenus à cette température pendant 55 minutes (paramètres de puissance : 80%, 1600W). Des blancs de méthode ont été systématiquement utilisés lors de chaque set de digestion afin de s'assurer de la propreté des tubes.

2.6.2.2.2. Récupération des digestats

Une fois la digestion terminée, les tubes sont laissés à refroidir pendant 1 à 6 heures, puis ouverts sous hottes avec précaution pour évacuer les gaz de digestion irritants (NO). Le digestat est ensuite versé dans un tube à volume certifié DigiTUBE 50 ml (50 ± 0.25ml, SCP Science) préalablement lavé 3 fois à l'eau MQ et rempli à 15-20 mL d'eau MQ. Les tubes de digestion sont lavés 2 à 3 fois avec 5 à 10 ml d'eau MQ afin de récupérer la totalité du digestat. Une fois les tubes DigiTUBE équilibrés en densité (eau/HNO₃) et en température, le volume de solution dans le tube est ajusté à environ 49 ml (%v/v HNO₃ environ 20%). L'ajustement à 50 ml du tube se fait juste avant son utilisation pour analyse, afin de s'assurer de l'exactitude du volume final.

2.6.2.3. Méthode de digestion sur plaque chauffante DigiPREP

Les faibles quantités d'échantillon, typiquement les cellules de cyanobactérie, d'algue et les extraits de lichen (algues extraites, cephalodia, champignons), ont été minéralisés dans des tubes en polypropylène vierges certifiés en volume DigiTUBE (15 mL ± 0.1 ml, SCP Science) et en

contenu en métaux à l'aide d'un dispositif DigiPREP Jr (40 positions, 15mL, SCP Science, Montréal) et d'un module de contrôle tactile (DigiPREP touch Screen, SCP Science).

2.6.2.3.1. Procédure de digestion

20 à 100 mg d'échantillon préalablement séchés et si besoin pesés ont été disposés dans des tubes DigiTUBE de 15 ml sous une hotte aspirante dédiée à cet usage. 1 à 3 ml d'HNO₃ GMT ont été ajoutés aux tubes. Les échantillons sont laissés à réagir dans les tubes à température ambiante pendant 30 minutes avant d'être disposés dans le système DigiPREP Jr. Les échantillons sont ensuite soumis à une rampe de température de 15 minutes jusqu'à 65°C, puis maintenus à température pendant 1 à 3 heures ou jusqu'à obtenir une solution translucide. Pour les échantillons contenant beaucoup de matériels organiques labiles, un palier de 30 minutes supplémentaires à 45°C a pu être mis en place. Des blancs de méthode ont été systématiquement utilisés lors de chaque set de digestion afin de s'assurer de la propreté des tubes.

2.6.2.3.2. Récupération des digestats

Une fois la digestion terminée, les tubes sont laissés à refroidir pendant 1 à 4 heures, puis le volume du digestat est ajusté jusqu'à obtenir une solution de concentration volumique d'environ 20% en HNO₃ (de 5 à 15 ml). L'ajustement au volume du tube au volume exact se fait juste avant son utilisation pour analyse, afin de s'assurer de l'exactitude du volume final.

2.6.2.4. Comparaison méthode microonde et méthode en plaque

Afin de vérifier la validité de la comparaison des résultats obtenus pour des échantillons digérés par micro-onde et par plaque chauffante, des tests ont été effectués sur le Matériel de Références Certifiés (MRC, Standart Reference Material®) NIST 1575a « Trace Elements in Pine Needles». Ce matériel a été sélectionné pour sa similarité avec la plupart des matrices organiques utilisées dans notre laboratoire. Les résultats obtenus montrent des résultats assez similaires entre les deux méthodes et proches des valeurs certifiées (Tableau 14). Seuls quelques éléments (DigiPREP® : Cr, Cu, As, micro-onde : Cr, As) ont des valeurs qui diffèrent fortement de celles reportées par le

Tableau 14 : Comparaison des méthodes de minéralisation par micro-onde et par DigiPREP à l'aide du Matériel de Référence Certifié NIST 1575a (« Trace Elements in Pine Needles »).

Isotope	Unité	DigiPrep® (n=15)		Digestion assisté par Micro-onde (n=9)		Certificat		% Écart Méthode	Récupération DigiPrep® (%)	Récupération Micro-onde (%)
		Moyenne	Écart-type	Moyenne	Écart-type	Moyenne	Incertitude élargie			
²³ Na	mg.kg ⁻¹	90	30	53	3	63	1	62	37	-15
²⁴ Mg	%	0.098	0.014	0.09	0.006	0.106	0.017	8	-8	-15
²⁷ Al	mg.kg ⁻¹	540	80	510	30	580	30	5	-7	-11
³¹ P	%	0.12	0.02	0.109	0.006	0.107	0.008	10	12	1
³⁹ K	%	0.43	0.07	0.39	0.02	0.417	0.007	10	3	-7
⁴⁴ Ca	%	0.18	0.02	0.220	0.06	0.25	0.01	-19	-29	-12
⁴⁷ Ti	mg.kg ⁻¹	0	1	0	1	-	-	-23	-	-
⁵¹ V	mg.kg ⁻¹	0.057	0.002	0.06	0.04	-	-	-6	-	-
⁵² Cr	mg.kg ⁻¹	0.12	0.04	0.22	0.06	0.3-0.5	-	-47	-70	-44
⁵⁵ Mn	mg.kg ⁻¹	470	70	440	30	488	12	7	-4	-11
⁵⁶ Fe	mg.kg ⁻¹	37	6	39	3	46	2	-6	-20	-15
⁵⁷ Fe	mg.kg ⁻¹	40	7	40	3	46	2	-1	-14	-13
⁵⁹ Co	mg.kg ⁻¹	0.052	0.005	0.060	0.003	0.061	0.002	-13	-14	-1
⁶⁰ Ni	mg.kg ⁻¹	1.2	0.6	1.18	0.10	1.47	0.10	3	-17	-20
⁶⁵ Cu	mg.kg ⁻¹	4.9	1.5	2.7	0.2	2.8	0.2	80	75	-3
⁶⁶ Zn	mg.kg ⁻¹	44	12	31	4	38	2	41	15	-18
⁷⁵ As	mg.kg ⁻¹	0.010	0.008	0.07	0.02	0.039	0.002	-85	-74	69
⁹⁵ Mo	mg.kg ⁻¹	0.03	0.01	0.03	0.01	-	-	25	-	-
⁹⁸ Mo	mg.kg ⁻¹	0.03	0.01	0.02	0.01	-	-	33	-	-
¹⁰⁷ Ag	mg.kg ⁻¹	0.00	0.02	0.01	0.00	-	-	-64	-	-
¹¹¹ Cd	mg.kg ⁻¹	0.22	0.03	0.20	0.01	0.233	0.004	7	-7	-13
¹²¹ Sb	mg.kg ⁻¹	0.00	0.00	0.00	0.00	-	-	-4	-	-
¹³⁷ Ba	mg.kg ⁻¹	5.2	0.6	4.9	0.3	6.0	0.2	6	-14	-19
¹⁸² W	mg.kg ⁻¹	27	26	30	25	-	-	-9	-	-
²⁰⁵ Tl	mg.kg ⁻¹	0.01	0.01	0.02	0.00	-	-	-13	-	-
²⁰⁸ Pb	mg.kg ⁻¹	0.11	0.02	0.12	0.02	0.167	0.015	-9	-32	-25

Dans les valeurs du certificat, les éléments en gras sont des valeurs certifiées, les autres étant des valeurs de référence. La valeur pour le Cr est une valeur indicative (inhomogénéité dans le matériel de référence).

certificat d'analyse. Parmi ces éléments, seul le Cu est un élément certifié (en gras dans le tableau).

La forte valeur de Cu est uniquement obtenue pour la digestion DigiPrep®, et pourrait être causée par une contamination dans les tubes. On peut noter également que la plupart des pourcentages d'erreur sont négatifs, c'est-à-dire que notre méthode nous donne des résultats inférieurs à ceux du certificat d'analyse. Ce phénomène pourrait être expliqué par le fait que les masses d'échantillons utilisées dans nos méthodes ($m=0.01 - 0.1\text{g}$) sont inférieures à la masse nécessaire pour garantir les valeurs certifiées ($m = 0.250\text{g}$). Les valeurs absolues des pourcentages d'erreur pour la comparaison des deux méthodes sont inférieures à 30%, et l'exactitude est inférieure à 20% en ce qui concerne les éléments principalement étudiés dans ce projet (P, Fe, V, Mg et Mo).

2.6.2.5. Conservation des échantillons

Les échantillons dilués (20% v/v HNO₃) sont conservés pour une période n'excédant pas un mois avant la première analyse. Les échantillons sont ensuite éliminés par le service de gestion des matières dangereuses et résiduelles selon une procédure établie avec eux.

2.6.3. Analyse élémentaire par spectrométrie de masse à torche plasma (ICPMS)

La spectrométrie de masse à torche plasma (ICP MS) a été utilisée lors de cette étude afin de pouvoir obtenir simultanément les concentrations massiques d'éléments traces (Mo, V, de l'ordre de la dizaine de ng.L^{-1}) et d'éléments présents en plus grande concentration (P, Mg, de l'ordre du mg.L^{-1}). L'ICP MS offre ici une solution analytique intéressante pour obtenir les résultats recherchés, grâce à des limites de détection faible, une bonne linéarité sur plusieurs échelles logarithmiques de concentration et un temps d'analyse de l'ordre de trois minutes par échantillon.

2.6.3.1. Théorie de la spectrométrie de masse à torche plasma

2.6.3.1.1. Principe général

L'échantillon est introduit dans une chambre de nébulisation par le biais d'un nébuliseur, formant ainsi un nuage de gouttelettes pouvant être introduit dans le plasma. L'étape de ionisation assistée par torche plasma, consiste en un transfert d'énergie entre un gaz sous forme de plasma (ici l'argon (Ar)) et les éléments à analyser afin de leur apporter l'énergie nécessaire à leur première ionisation. Les éléments ainsi ionisés sont ensuite dirigés par des lentilles électromagnétiques vers un séparateur de masse, pour pouvoir être analysés et quantifiés par amplification du signal masse/charge (m/z) obtenu dans le détecteur.

2.6.3.1.2. Présentation de l'appareillage

L'ICP-MS qui a été utilisée tout au long de cette étude est un Thermofisher Xserie II, équipé d'un auto-échantillonneur CETAC ASX-520. La chambre de nébulisation est équipée d'un refroidisseur à effet Peltier maintenant la température à 5°C, améliorant la stabilité du signal et diminuant la formation d'interférents (i.e. oxydes) pouvant altérer les performances d'analyse. Deux cônes servent d'interface entre le plasma et la partie analyseur de masse ; un cône d'échantillonnage et un cône d'écrêtage, qui permettent de sélectionner une fraction représentative de l'échantillon.

L'analyseur de masse est un filtre quadripolaire, permettant l'analyse séquentielle des éléments une seule m/z à la fois. Les paramètres du quadripôle ont été ajustés suivant la sensibilité et la concentration analytique en chaque élément afin d'améliorer les performances du spectromètre (Tableau 15). Le détecteur est une dynode électro-amplificateur qui permet l'amplification du signal obtenu par contact des éléments ionisés sur une surface électro-sensible, avec une linéarité sur 9 ordres de grandeur (ng.L^{-1} (ppt) à mg.L^{-1} (ppm)).

Un hexapôle supplémentaire, appelé cellule de collision, est localisé entre les cônes et l'analyseur de masse.

Tableau 15 : Caractéristique de la méthode d'analyse élémentaire utilisée dans cette étude.

Isotope	$M_{\text{Élément}}$ ($g_{\text{Élément}} \cdot mol^{-1}$)	$E_{i, \text{Élément}}$ (eV)	Temps de balayage (ms)	Résolution	Solution d'étalonnage	Limite de Détection instrumental ($\mu g \cdot L^{-1}$)	Limite de quantification instrumentale ($\mu g \cdot L^{-1}$)
²³ Na		5.1390	10	Standard	MM	1.5	3
²⁴ Mg		7.6460	10	Standard	MM	1.5	1.5
²⁷ Al		5.9860	10	Standard	MM	0.5	1.5
³¹ P		10.4860	10	Standard	P	3	10
³⁹ K		4.3410	10	Standard	MM	2.5	15
⁴⁴ Ca		6.1130	10	Standard	MM	3	10
⁴⁷ Ti		6.8200	10	Standard	MM	0.05	0.2
⁵¹ V		6.7400	50	Standard	MM	0.001	0.007
⁵² Cr		6.7660	10	Standard	MM	0.01	0.01
⁵⁵ Mn		7.4350	5	Haute	MM	0.01	0.05
⁵⁶ Fe		7.8700	5	Haute	MM+P	0.2	0.5
⁵⁷ Fe		7.8700	10	Standard	MM+P	0.2	0.5
⁵⁹ Co		7.8600	30	Standard	MM	0.005	0.01
⁶⁰ Ni		7.6350	10	Standard	MM	0.01	0.05
⁶⁵ Cu		7.7260	10	Standard	MM	0.05	0.01
⁶⁶ Zn		9.3940	10	Standard	MM	0.2	0.5
⁷⁵ As		9.8100	10	Standard	MM	0.05	0.2
⁹⁵ Mo		7.0990	30	Standard	MM	0.001	0.003
⁹⁸ Mo		7.0990	30	Standard	MM	0.001	0.003
¹⁰³ Rh		7.4600	10	Standard	MM	-	-
¹⁰⁷ Ag		7.5760	10	Haute	MM	0.005	0.01
¹¹¹ Cd		8.9930	10	Standard	MM	0.002	0.005
¹²¹ Sb		7.8500	10	Standard	MM	0.001	0.004
¹³⁷ Ba		5.2120	10	Standard	MM	0.002	0.01
¹⁸² W		7.9800	10	Haute	P	0.001	0.01
²⁰⁵ Tl		6.1080	10	Haute	MM	0.001	0.005
²⁰⁸ Pb		6.1080	10	Haute	MM	0.001	0.005

2.6.3.1.3. Difficulté analytique

Il existe différentes problématiques analytiques à l'utilisation d'une ICPMS. Bien que ces difficultés puissent paraître triviales à tout analyste confirmé, il n'en demeure pas moins nécessaire de les rappeler, ainsi que de détailler les moyens mis en œuvre pour limiter leurs effets.

2.6.3.1.3.1. Effet de matrice

Une première difficulté présente dans tous les systèmes analytiques repose sur une différence de réponse des éléments lors de l'étalonnage par rapport à leurs réponses dans la matrice de l'échantillon. Par exemple, les atomes très présents et/ou énergivores, c'est-à-dire nécessitant une forte énergie pour leurs ionisations vont diminuer l'énergie du plasma disponible pour l'ionisation des autres éléments. Cet effet est particulièrement marqué pour HNO_3 . N et O sont des éléments très énergivores (énergie de première ionisation de N et de O $E_{i,N} = 14.5341$ eV, $E_{i,O} = 13.6181$ eV) présents en grande quantité (2% v/v). La présence de HNO_3 peut potentiellement diminuer le pourcentage d'ionisation de nombreux éléments à haute énergie d'ionisation, comme le Zn ($E_{i,Zn} = 9.3940$ eV), et ainsi diminuer leurs signaux. Cet « effet de matrice » peut être mitigé en établissant la courbe d'étalonnage dans une solution similaire à la composition de l'échantillon.

Il est également possible d'avoir des effets d'augmentation de l'ionisation lorsque par exemple la concentration en HNO_3 dans l'échantillon est inférieure à celle dans la courbe d'étalonnage. En effet, lors de la digestion, une quantité d' HNO_3 réagit avec la matière organique et est dégradée. Il en résulte une diminution de la concentration en HNO_3 dans les échantillons par rapport à l'étalonnage, et donc une augmentation de l'ionisation, entraînant une surévaluation de la concentration de l'élément.

Le choix d'un standard interne se comportant de façon analogue à l'analyte vis-à-vis des matrices permettra de mitiger les effets de la matrice dus à des variations en HNO_3 , à de fortes teneurs en sels, ou à la présence de composés carbonés dissous.

2.6.3.1.3.2. Interférences polyatomiques

Certains atomes peuvent se combiner dans le plasma et se retrouver sous une forme polyatomique, pouvant posséder la même m/z qu'un élément à analyser, faussant ainsi le résultat analytique. Nous pouvons citer l'exemple des oxydes, comme $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$ qui va donner un signal à m/z de 56, similaire à celle du ^{56}Fe . Il existe plusieurs possibilités pour contrecarrer cet effet.

La procédure de contrôle journalier de l'état de la machine prend en compte la présence d'oxyde et demande un ratio éléments sur oxyde pour le couple $^{140}\text{Ce} : ^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}$ inférieur à 2%.

Le choix de l'isotope à analyser, avec un compromis entre sensibilité et interférence permet d'optimiser l'analyse. Par exemple, le ^{57}Fe , moins abondant, a été préféré au ^{56}Fe qui subit l'interférence $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$.

Le signal de l'interférence étant proportionnel à celui de l'ion responsable, la détermination d'une équation reliant les deux permet de corriger le signal en fonction de la présence de l'analyte causant l'interférence. Ainsi, dans cette étude, le phosphore entraîne la formation d'un ion polyatomique à la masse 47 ($^{31}\text{P}^{16}\text{O}$) qui agit sur le signal du ^{47}Ti . Une courbe d'étalonnage de l'interférence peut être obtenue, et une équation de correction a été utilisée pour corriger le signal du ^{47}Ti .

Ces interférences peuvent également être mitigées par la technologie « Collision Cell Technology ® », pour laquelle deux modes de fonctionnement existent ; un mode à discrimination en énergie cinétique, et un mode dit réactionnel. Le mode à discrimination en énergie cinétique repose sur la différence de taille entre l'analyte et l'interférence polyatomique à éliminer. Ainsi, en passant dans la cellule de collision, l'interférant va subir un plus grand nombre de collision que l'analyte, et perdre ainsi plus d'énergie cinétique. Un filtre d'énergie permet ensuite d'éliminer la plus grande partie de l'interférence tandis que seule une faible fraction de l'analyte est éliminée, augmentant considérablement le signal de l'analyte par rapport à l'interférant. Le mode réactionnel utilise des gaz réactifs pour éliminer chimiquement les interférents polyatomiques.

2.6.3.1.3.3. Espèce doublement chargée

Lors de l'ionisation de certains éléments, il est possible d'obtenir un ion doublement chargé si l'énergie de deuxième ionisation est suffisamment faible, diminuant ainsi le signal de l'analyte, et donnant lieu à un signal supplémentaire à $m/2z$. Comme pour la présence d'oxyde, la procédure de vérification de l'état de la machine avant le lancement d'une acquisition contrôle la présence de l'ion Ba^{++} avec un ratio Ba^{++}/Ba^+ devant être inférieur à 3%.

2.6.3.2. Courbe d'étalonnage

Afin de palier au problème de diminution de la quantité d'énergie dans le plasma, les courbes d'étalonnage ont été effectuées dans la même concentration d'acide nitrique que les échantillons, c'est à dire 2%v/v. Le standard interne utilisé est le Rhodium (Rh). L'Indium (In) et le scandium (Sc) ont également été utilisés lors du développement de la méthode, avec des résultats comparable à Rh. Néanmoins, In et Sc n'ont pas été retenus dans cette méthode car : i) le Sc est abondant dans la croûte terrestre, et il est devenu un analyte d'intérêts pour suivre les éléments terrigènes, ii) l'In a été retrouvé en grande quantité dans des sédiments de lac Québécois, et l'origine a été attribuée à l'activité minière.¹⁷⁰

2.6.3.2.1. Description

Étant données les concentrations des éléments à analyser dans nos échantillons (principalement Mo, V, Fe et P), la courbe d'étalonnage a été séparée en deux séries. Une première solution contenant un mélange de 28 éléments (ESI Elemental Scientific), nommé mélange métaux (MM) dans cette étude. La plupart de ces éléments sont à analyser généralement au niveau de trace ($< 0.1 \mu\text{g}_{\text{Élément}}\cdot\text{L}^{-1}$), avec une gamme d'étalonnage allant de $0.001 \mu\text{g}_{\text{Élément}}\cdot\text{L}^{-1}$ (MM1) à $10 \mu\text{g}_{\text{Élément}}\cdot\text{L}^{-1}$ (MM10) (Tableau 16). Une deuxième solution contenant le phosphore (P) ainsi que le Fe (10 fois moins concentré que le P) avec une gamme d'étalonnage allant de $5 \mu\text{g}_P\cdot\text{L}^{-1}$ (P1, $0.5 \mu\text{g}_{Fe}\cdot\text{L}^{-1}$) à $2000 \mu\text{g}_P\cdot\text{L}^{-1}$ (P6, $200 \mu\text{g}_{Fe}\cdot\text{L}^{-1}$) (Tableau 16). La présence de Fe dans les deux gammes permet une vérification de la qualité des droites d'étalonnage par comparaison des paramètres des droites (pente, ordonnée à l'origine).

Tableau 16 : Description des gammes d'étalonnage.

Gamme d'étalonnage	[Élément] ($\mu\text{g}_{\text{élément}}\cdot\text{L}^{-1}$)	[K] ($\mu\text{g}_K\cdot\text{L}^{-1}$)
MM1	0.001	0.01
MM2	0.002	0.02
MM3	0.005	0.05
MM4	0.01	0.1
MM5	0.05	0.2
MM6	0.2	2
MM7	0.5	5
MM8	1.5	15
MM9	3	30
MM10	10	100
	[P] ($\mu\text{g}_P\cdot\text{L}^{-1}$)	[Fe] ($\mu\text{g}_{\text{Fe}}\cdot\text{L}^{-1}$)
P1	5	0.5
P2	20	2
P3	50	5
P4	200	20
P5	500	50
P6	2000	200

2.6.3.2.2. Contrôle de l'étalonnage à l'aide de matériel de référence certifié

La validité de l'étalonnage a été vérifiée à l'aide du MRC SLRS-5 (Conseil national de recherches du Canada). Le SLRS-5 est une eau de rivière prélevée en profondeur, et dont la concentration en 16 des éléments utilisés dans cette étude, dont le Mo, le V et le Fe, est certifiée. Pour chaque étalonnage, au moins un échantillon de SLRS5 a été passé pour vérifier l'exactitude de l'étalonnage.

2.6.4. Caractéristiques de la méthode et contrôle qualité

2.6.4.1. Définition des termes

Les définitions des termes utilisés ici est celle du document « Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie » du Centre d'expertise en analyse environnemental du Québec.¹⁷¹

2.6.4.2. Procédure de détermination des caractéristiques de la méthode

Le L1CH3N est un matériel de référence non certifié établi lors de cette étude afin de vérifier la comparabilité des résultats au cours du temps, spécifiquement pour les lichens. Il s'agit d'un mélange homogène de 100 digestats de lichen (20%v/v HNO₃) maintenu à 4°C dans une bouteille en polypropylène Nalgène® préalablement lavée. Ce matériel a été utilisé pour établir les paramètres de la méthode telle que la réplicabilité et le pourcentage de récupération pour le thalle de lichen non lavé.

La réplicabilité a été déterminée en préparant au moins 3 échantillons à partir du même digestat et en les analysant le même jour, à la suite.

Similairement, pour les autres matrices (algue, cephalodia, thalle lavé), plusieurs échantillons ont été regroupés et mélangés après avoir été analysés pour estimer certains paramètres de la méthode.

2.6.4.3. Synthèse des caractéristiques

Le Tableau 17 regroupe les caractéristiques de la méthode pour les différentes matrices utilisées.

2.6.4.4. Suivi de la méthode au cours du temps

La Figure 19 montre le suivi de la concentration en P, V, Mo et Fe pour le standard interne L1CH3N depuis son instauration.

Tableau 17 : Pourcentage de récupération et répliquabilité pour les matrices utilisées.

Isotope	Thalle de lichen		Cephalodia		Algue		Thalle de lichen (EDTA)
	Récupération (%)	Répliquabilité (%)	Récupération (%)	Répliquabilité (%)	Récupération (%)	Répliquabilité (%)	Récupération (%)
²³ Na	100	2	-	5	-	5	-
²⁴ Mg	105	2	108	5	116	4	-
²⁷ Al	105	2	108	5	107	4	-
³¹ P	124	1	122	3	116	2	119
³⁹ K	147	3	109	4	109	3	95
⁴⁴ Ca	70	2	109	5	113	18	-
⁴⁷ Ti	105	3	113	14	108	123	-
⁵¹ V	104	2	112	7	108	69	109
⁵² Cr	101	2	112	16	107	13	107
⁵⁵ Mn	113	1	115	5	110	3	109
⁵⁶ Fe	100	7	118	4	114	5	122
⁵⁷ Fe	101	6	116	3	112	2	111
⁵⁹ Co	102	2	113	16	107	3	108
⁶⁰ Ni	103	3	113	7	108	11	107
⁶⁵ Cu	103	1	114	6	108	4	107
⁶⁶ Zn	110	1	110	8	109	10	104
⁷⁵ As	-	-	111	38	107	219	109
⁹⁵ Mo	97	5	113	4	107	21	108
⁹⁸ Mo	96	3	111	3	106	22	107
¹⁰³ Rh	-	-	-	-	-	-	-
¹⁰⁷ Ag	103	7	105	26	101	-155	101
¹¹¹ Cd	98	5	104	17	102	115	102
¹²¹ Sb	97	52	102	58	100	67	101
¹³⁷ Ba	95	1	102	5	98	23	101
¹⁸² W	91	65	102	12	94	75	100
²⁰⁵ Tl	85	6	97	0	89		97
²⁰⁸ Pb	82	2	101	15	93	0	100

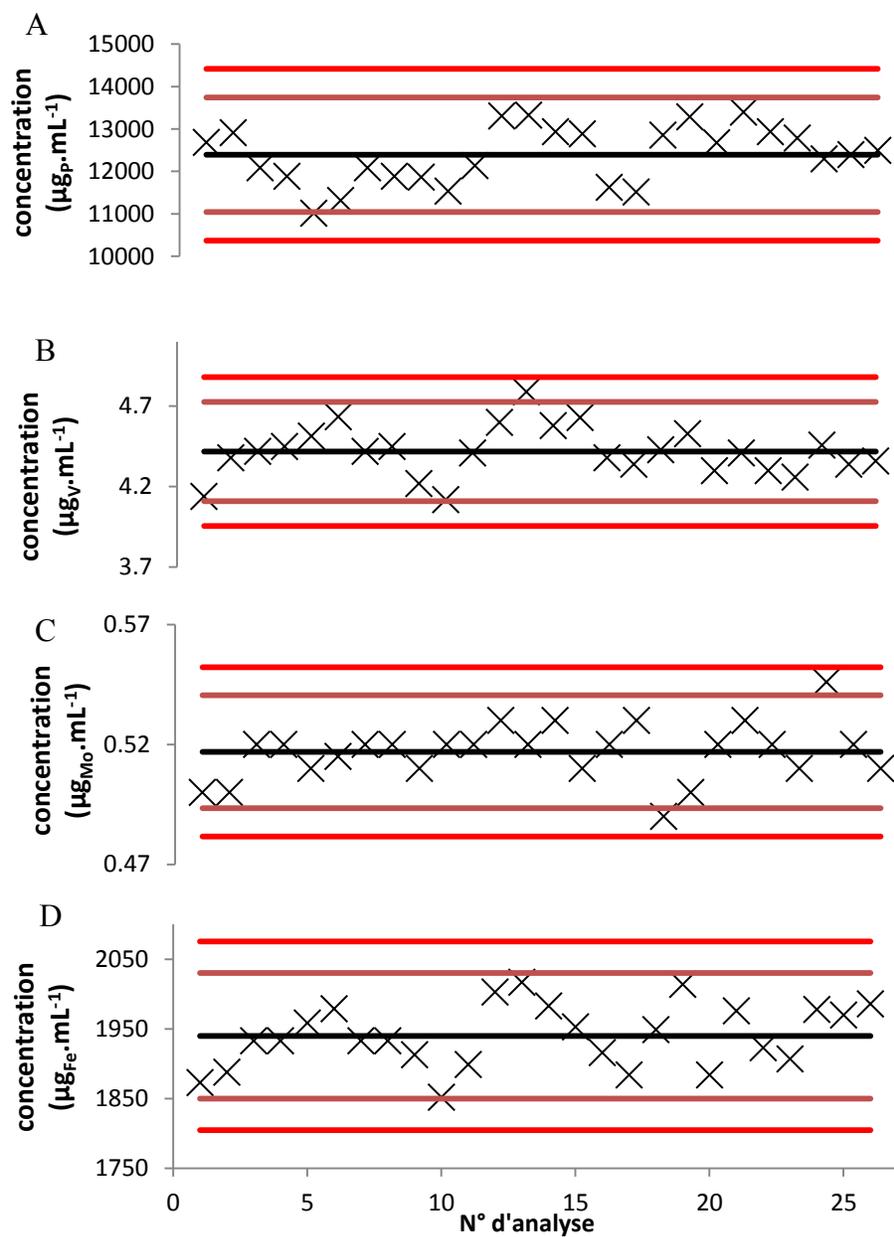


Figure 19 : Suivi du standard L1CH3N pour A) P, B) V, C) Mo, D) Fe.

Les lignes rouges (extérieures) représentent 3σ , les lignes roses (intérieures) 2σ , et la ligne noire centrale la moyenne.

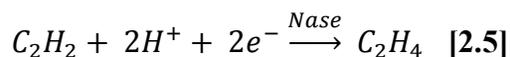
2.7. Méthodes utilisées pour l'évaluation de l'activité de fixation biologique de l'azote

2.7.1. Test de réduction de l'acétylène

L'évaluation de l'activité de fixation d'azote chez les lichens et chez les cyanobactéries a été effectuée en se basant sur le test de réduction de l'acétylène (ARA, pour Acetylene Reduction Assay) développé par Hardy en 1968.⁷⁶

2.7.1.1. Théorie du test

Le test ARA utilise la propriété des nitrogénases, enzyme responsable de la réduction du N₂ en ammonium, à également réduire l'acétylène en éthylène selon l'équation [2.5], pour évaluer l'activité de l'enzyme.

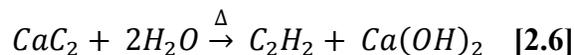


L'activité enzymatique est estimée en suivant la production d'éthylène au cours du temps par chromatographie en phase gaz (CPG). Un facteur de correction entre l'activité de réduction de l'acétylène vis-à-vis de la réduction du N₂ peut être déterminé expérimentalement grâce à des expériences comparatives à l'azote marqué.

2.7.1.2. Protocole expérimental

2.7.1.2.1. Préparation de C₂H₂ à partir du carbure de calcium (CaC₂).

Environ 5 g de carbure de calcium (Acros organic, NJ) est concassé et introduit dans un sac pour prélèvement de gaz en Tedlar® de 9" × 9" (VWR). Le sac est fermé et vidé de son air et 25 ml d'eau osmosée sont introduits dans le coin opposé au CaC₂, puis mélangés ensemble sous une hotte aspirante. La réaction a lieu selon l'équation [2.6] :



Le sac contenant l'acétylène est utilisé après 20 minutes de refroidissement, et est conservé pendant un maximum 4 jours après la préparation.

2.7.1.2.2. Évaluation de l'activité de fixation d'azote dans les thalles de lichen

0.1 g à 3 g de lichen sec sont réhydratés à l'eau osmosée pendant un minimum de 12 heures préalablement au test, dans des coupelles de pesée en plastique à l'abri de contamination éventuelle. Les thalles de lichen sont ensuite introduits dans des pots Masson de 250 ml, arrosés d'eau osmosée et les pots sont fermés. Un système de septum permet l'introduction d'une aiguille pour le retrait de 10%v/v d'air (25 ml) et l'introduction de 25 ml de C₂H₂. L'injection de l'acétylène correspond au temps 0 de l'expérience. À différents intervalles de temps, des aliquots de 10 mL de gaz sont prélevés et injectés dans des contenants en verre de 10 ml préalablement fermés par un septum, sertis d'une capsule en aluminium et vidés de leur air (vide relatif < 0.1Bar).

2.7.1.2.3. Évaluation de l'activité de fixation d'azote chez les cyanobactéries

10 ml de culture dont la DO a été préalablement mesurée sont introduits dans des pots Masson de 250 ml. Le reste de l'expérience a été effectué de la même façon que précédemment

2.7.1.2.4. Analyse de l'éthylène par Chromatographie en Phase Gazeuse

3 mL des échantillons de gaz prélevés sont introduits dans un chromatographe en phase gazeuse (Shimadzu 8A) équipé d'une colonne sur mesure (Supelco, 01282011) à l'aide d'une boucle d'introduction de 25 µl. La méthode de 3 minutes permet la séparation de l'éthylène, de l'éthane et de l'acétylène. La concentration en éthylène est déterminée à l'aide d'une courbe (1, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 500, 1000ppm) effectuée avec un standard éthylène (99.5%, Scott Speciality Gases).

2.7.1.3. Traitement des données

La quantité d'éthylène est exprimée en $\text{nmol}_{\text{éthylène}} \cdot \text{min}^{-1}$ à l'aide de la formule suivante (équation [2.7]) dérivée de la loi des Gaz Parfaits :

$$n_{\text{éthylène}} \cdot \text{temps}^{-1} = \frac{\text{ppmv}_{\text{éthylène}} \cdot \text{temps}^{-1} \times V_{\text{pot masson}} \times P_{\text{atm}} \times 100}{T_{\text{amb}} \times R} \quad [2.7]$$

Avec :

$n_{\text{éthylène}} \cdot \text{temps}^{-1}$: vitesse de production d'éthylène ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1}$)

$\text{ppmv}_{\text{éthylène}} \cdot \text{temps}^{-1}$: vitesse de production d'éthylène (partie par million volume. min^{-1})

$V_{\text{pot masson}}$: Volume du réacteur utilisé (mL)

P_{atm} : Pression atmosphérique (Bar)

T_{amb} : Température au prélèvement de l'échantillon pour analyse (K)

R : Constante des gaz parfait ($8,314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)

La vitesse de production de l'éthylène est ensuite exprimée en $\text{nmol}_{\text{éthylène}} \cdot \text{temps}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{échantillon}}^{-1}$ ou $\text{nmol}_{\text{éthylène}} \cdot \text{temps}^{-1} \cdot \text{DO}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$.

2.7.2. Test de réduction de l'acétylène par spectroscopie d'absorption laser dans un résonateur optique en anneau (ARACAS)

2.7.2.1. Appareillage

L'appareillage utilisé a été extensivement décrit dans Cassar *et al.*¹⁷² Brièvement, la méthode ARACAS repose sur le même principe que l'ARA, cependant la détection de la production de C_2H_4 se fait par absorption laser dans un résonateur optique en anneau (CRDS, Cavity Ring-Down absorption Spectroscopy) et non par CPG. Cette méthode permet des mesures très précises (2 et 0.2 ppbv pour 5 et 300 seconde)¹⁷² avec une bonne sensibilité et de façon non destructive. Le suivi de l'activité peut donc se faire en continu.

2.7.2.2. Protocole expérimental

Les expériences de température ont été menées à l'aide d'un bain de température (modèle 1160A, VWR Scientific). La température a été descendue régulièrement de 2 ou 3°C, avec 40 à 120 minutes d'attente entre chaque changement de température pour assurer une activité constante. Chaque réplica a été effectué à des températures différentes. Les valeurs obtenues ensuite pour chaque réplica ont été normalisées à l'activité enregistrée à 22.5°C. Des détails supplémentaires sur la détermination des paliers et sur les étalonnages de température sont disponibles en Annexe 4- 4.1 –Figure S1 et S2.

2.7.2.3. Correction appliquées

Plusieurs phénomènes ont été corrigés lors des expériences avec ARACAS. Une diminution du signal, causée par une augmentation de la pression en fonction du temps, a été évaluée et corrigée tel que décrit dans Cassar *et al.*¹⁷² ($k_{\text{fuite}} = (7 \pm 0.2) \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$, Figure 20). Une interférence entre le signal de l'éthylène et celui du CO₂ a également été évaluée et corrigée ($k_{\text{correction}} = (8 \pm 2) \times 10^{-3} \text{ ppbv éthylène / ppbv CO}_2$, Figure 21).

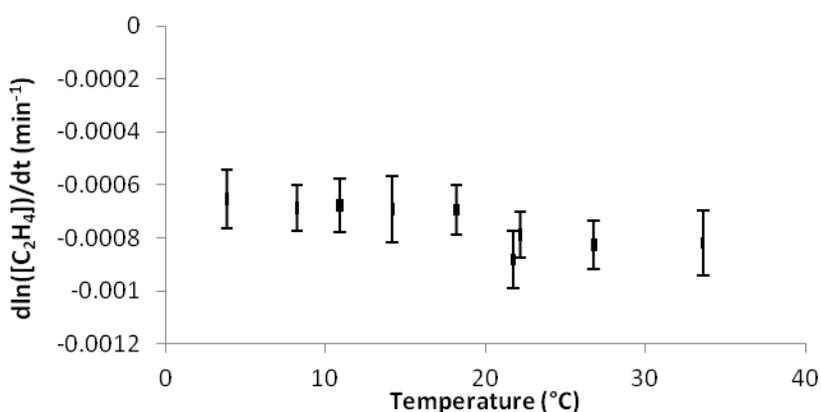


Figure 20 : Évolution de la constante de fuite de C₂H₄ de l'ARACAS en fonction de la température

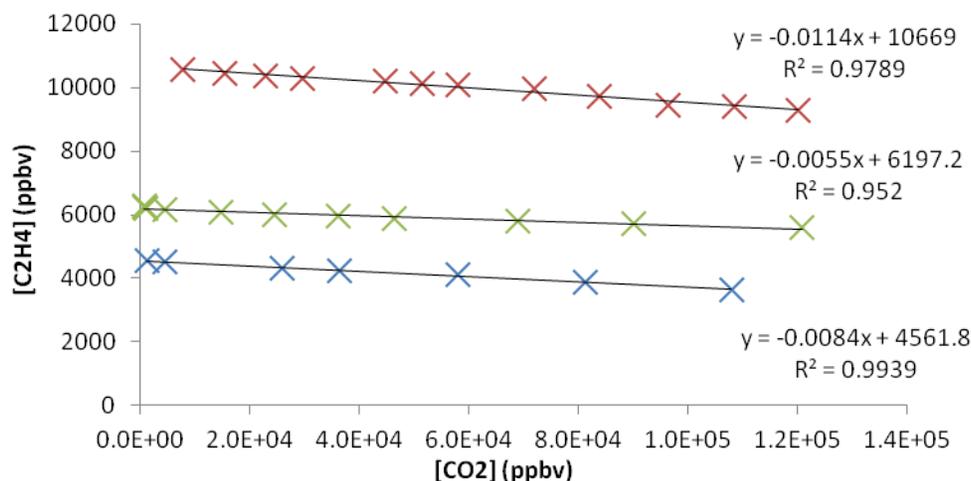


Figure 21 : Évaluation de l'interférence entre le signal de l'éthylène (ppbv C₂H₄) et le CO₂ par d'ajouts successifs de CO₂.

Expérience répétée avec trois concentrations d'éthylène initiales différentes, symbolisées par des couleurs différentes.

2.7.3. Préparation des échantillons de lichen pour l'analyse du $\delta^{15}\text{N}$.

Les échantillons de lichens ont été lavés à l'eau MQ pour retirer les composés azotés solubles éventuellement présents à la surface du thalle, puis séchés à 70°C jusqu'à poids stable. Puis ils ont été broyés dans un tube de 2mL à l'aide d'un poinçon en Inox®. Les cephalodia excisés (voir 2.2.2) ont été lavés à l'eau MQ et séchés à 70°C pendant 3 jours. Les analyses sont ensuite menées par un laboratoire externe (Laboratoire de géochimie des isotopes stables légers, GEOTOP, UQAM, Montréal)

2.8. Méthodes statistiques

2.8.1. Méthodes de statistiques multivariées utilisées

Afin d'analyser les résultats des analyses multi-élémentaires comprenant généralement plusieurs métaux, l'utilisation de traitements statistiques multivariées descriptives (analyse en composante

principale) et prédictives (analyse discriminante) a été employée pour permettre une vision plus aisée et complète des jeux de données.

2.8.1.1. Analyse en Composantes Principales (ACP)

L'analyse en composante principale est une analyse descriptive exploratoire qui repose sur la projection des données contenues dans le plan multivarié des variables de départ vers un ensemble réduit de vecteur construit selon les propriétés suivantes ; i) la première composante principale est construite selon une combinaison linéaire des variables de départ de façon à contenir le maximum de la variance totale de l'échantillonnage, ii) les composantes principales suivantes sont construites de la même façon en maximisant la variance résiduelle.^{173,174} Cette méthode est très efficace pour visualiser la totalité des points d'une série de données multivariées dans un plan conservant le maximum de variance de l'échantillonnage, permettant ainsi de trouver plus aisément les sources de différences entre les individus.

2.8.1.2. Analyse Canonique Discriminante (ACD)

L'Analyse Canonique Discriminante est une technique descriptive qui repose, comme pour l'ACP, sur une projection des données multivariées vers un espace réduit de composante canonique, mais avec une hypothèse *a priori*.¹⁷⁴ Dans cette analyse, on indique l'appartenance d'un individu à un groupe, et on cherche à maximiser la variance intergroupe et à minimiser la variance intragroupe. De cette façon, on cherche à connaître quelle combinaison linéaire des variables de départ expliquent au mieux la séparation des différents groupes. Cette analyse a été utilisée dans le cadre de cette étude pour déterminer quels éléments chimiques séparaient les différents constituants de la symbiose lichénique.

2.8.1.3. Analyse Discriminante Linéaire (ADL)

L'analyse discriminante linéaire est très proche de l'ACD, dans le sens où elle cherche à expliquer au mieux l'appartenance à un groupe. Toutefois, contrairement à l'ACD, l'ADL est une analyse prédictive qui cherche à assigner à un groupe n'importe quel individu en fonction

des variables de départ.¹⁷⁵ Elle permet ainsi, en appliquant la règle d'assignation aux individus de notre jeu de données, de quantifier la réussite de l'assignation, et donc d'évaluer le modèle linéaire permettant la séparation dans les différents groupes. La méthode d'évaluation utilisée dans cette étude est celle du « in and out », c'est à dire que l'assignation de chaque individu se fait à l'aide d'un modèle linéaire ne tenant pas compte de l'individu, permettant une meilleure objectivité dans l'évaluation du modèle. Les analyses ADL dans cette étude ont été réalisées à l'aide du logiciel Tanagra v1.4.¹⁷⁶

2.8.2. Procédure pour les données manquantes et inférieures à la limite de détection de la méthode (LDM).

Cette partie expose la stratégie qui a été utilisée pour les données manquantes ou inférieures à la LDM. Dans tout les cas de figures, les analyses et inférences faites avec ces modifications ont été vérifiées en reproduisant l'analyse sans les individus ou variables induisant ces problèmes, afin de s'affranchir de tous biais dans les conclusions.

2.8.2.1. Données inférieures à la limite de détection de la méthode

Les données inférieures à la limite de détection n'ont pas été remplacées pour la détermination des moyennes et des variances; en effet, selon la définition de la LDM, il est impossible de déterminer avec confiance si la valeur correspond au bruit de fond de l'appareil ou à l'élément. Remplacer systématiquement une valeur par 0 pourrait biaiser vers le bas et remplacer par la LDM pourrait biaiser vers le haut. Si la moyenne ou la médiane obtenue est inférieure à la LDM, la valeur est remplacée par « <LDM » dans la présentation des résultats.^{177,178}

Pour les analyses multivariées nécessitant des transformations logarithmiques, les valeurs détectées nulles ont été remplacées par la valeur de la LDM pour l'élément considéré. Ce cas de figure n'a pas été relevée plus d'une fois par analyses, rendant le biais dans l'analyse minime.

2.8.2.2. Données manquantes

La présence de données manquantes dans certains jeux d'échantillons rend difficiles les analyses multivariées comme l'ACP ;¹⁷⁸ en effet, le meilleur choix est de supprimer les individus présentant des données manquantes, mais cela entraîne une diminution du nombre d'individus et une perte significative d'informations. Dans le cas où les données manquantes ont représenté plus du tiers des individus, la variable n'a pas été considérée dans l'analyse. Dans le cas où les données manquantes ont représenté moins du tiers des individus, les données manquantes ont été remplacées par la médiane pour la variable considérée, meilleure estimation de la tendance centrale pour nos données.

2.8.2.3. Données aberrantes

Certaines données se retrouvent très éloignées de la moyenne des échantillons. Ces données aberrantes ont été écartées des analyses suivant les résultats de test de rejet adaptés au jeu de données. Le test Q de Dixon a été utilisé sur les petits jeux de données ($n < 30$). Les jeux de données > 30 et validées comme normales ont été évalués à l'aide du test de Grubbs. Également, les graphiques en boîte à moustaches ont été utilisés pour détecter les données aberrantes.

2.8.3. Cas particulier des données compositionnelles

2.8.3.1. Théorie des données compositionnelles

La plupart des résultats obtenus au cours de cette étude possèdent une structure particulière et constituent des données dites compositionnelles. En effet, les données exprimées en pourcentage ou en partie par million, comme les contenus en métaux d'un échantillon biologique de lichen ou de bactérie, font partie d'une classe de données appelées données fermées, i.e. la somme de la totalité des parties d'un échantillon est égal à une valeur constante. Cette propriété a pour impact que ces données ne sont utilisables que si elles sont traitées en prenant en compte l'aspect relatif.¹⁷⁹ Il s'agit de données qui ne contiennent pas d'information de façon absolue, mais qui contiennent chacune une partie de l'information sur la composition. Ce problème reste vrai même si la totalité de la composition n'a pas été déterminée comme cela est souvent le cas et que

la somme des variables réellement mesurée pour chaque échantillon n'est pas constante ; en effet il est très rare d'avoir accès à la totalité de l'analyse élémentaire comprenant le carbone, l'azote, ainsi que les métaux traces. Malgré cela, les données représentent un pourcentage massique et ne suivent pas une géométrie Euclidienne dans \mathbb{R} . Elle doivent donc être considérées en tant que telles.¹⁸⁰ Très peu d'études ont appliqué les analyses multivariées compositionnelles,¹⁸¹⁻¹⁸⁴ et aucune n'a encore été conduite sur des lichens.

Une structure de travail ainsi que des transformations ont été développées depuis les années 1980¹⁷⁹ afin de prendre en compte la structure fermée de ces données. Dans le cadre de notre étude, la transformation du ratio logarithmique centré (clr, pour centered log-ratio) a été utilisée avant les analyses en composantes principales afin de pouvoir prendre en compte la structure particulière des données compositionnelles.

2.8.3.1.1. Transformation par log-ratio centré (clr)

La transformation par ratio logarithmique centré consiste à prendre le logarithme du ratio de chaque variable x_i sur la moyenne géométrique de l'ensemble des variables (formule [2.8]).¹⁷⁹

$$clr(x)_i = \ln x_i - \frac{1}{D} \sum_{j=1}^D \ln x_j \quad [2.8]$$

Avec x = une composition contenant D variables

x_i = la $i^{\text{ème}}$ variable de la composition x

$clr(x)_i$ = transformation clr de la $i^{\text{ème}}$ variable de la composition x

Cette transformation a l'avantage de conserver une signification de la variable clr proche de celle de la variable de départ. Par contre, l'un des désavantages de cette méthode, est que l'une des données devient obsolète, car il ne reste que n-1 degrés de liberté dans le système. Ainsi, les matrices de variance-covariance seront singulières, et une variable devra être sacrifiée dans certaines analyses nécessitant des matrices de plein rang. Néanmoins, cette transformation est la

plus propice pour l'analyse en composante principale, puisque les variables restent facilement identifiables.

2.8.3.2. Analyse des graphiques d'ACP avec données transformées clr

L'analyse graphique des ACP est différente dans le cadre de données transformées.^{179,185,186} En effet, les deux graphiques habituels de l'ACP, le graphique des variables et le graphique des individus doivent être obligatoirement analysés ensemble. Également, on ne doit plus considérer la corrélation entre les variables de départ et les composantes principales, mais plutôt chaque clr-variable comme le ratio de cette variable sur la moyenne géométrique. Ainsi, i) la distance entre la pointe d'une flèche et le centre du graphique indique la stabilité du ratio, assimilable à la variance du ratio, ii) la distance entre les pointes de deux variables clr renseigne sur la stabilité du ratio entre les deux variables de départ (plus les pointes sont proches, plus la variance du ratio est faible, et plus les variables sont corrélées) et iii) la projection orthogonal des individus sur la droite reliant deux variables clr renseigne sur l'enrichissement relatif de cet individu vis-à-vis des deux variables. En suivant ces trois règles simples, l'analyse des graphiques permet de déterminer des groupes de variables fortement corrélés influençant la composition, et de former des groupes d'individus par rapport à leur proximité dans le graphique, et donc d'inférer sur les sources d'inhomogénéités d'un échantillonnage en superposant d'autres informations qualitatives tout en détectant les individus présentant des anomalies de compositions.

2.8.4. Logiciels statistiques utilisés

2.8.4.1. R

Le logiciel libre R (R-project CRAN¹⁸⁷) a été utilisé pour le traitement statistique des données au long de cette étude.

Les représentations graphiques d'analyses multivariées et de certaines régressions linéaires ont été effectuées à l'aide de la fonction `plot()` (package `graphics` v3.1.2).

Les modèles de régression linéaire ont été déterminées et évaluées à l'aide de la fonction `lm()` et `glm()` du package `stats` v3.1.2.

Les analyses ACP dans cette étude ont été réalisées à l'aide du package FactomineR v1.28. Les analyses ACD dans cette étude ont été réalisées à l'aide du logiciel R et du package candisc v06-5.

Les transformations des données compositionnelles ont été effectuées avec la fonction *clr()* du package compositions v1.40-1.¹⁸⁸

Les analyses de variance ont été effectuées à l'aide de la fonction *Anova()* du package car v2.0-22 et de la fonction *oav()* du package stats v3.1.2.

Les tests de normalité ont été effectués à l'aide du package nortest v1.0-2 ainsi que de la fonction *shapiro.test()* du package stats v3.1.2

2.8.4.2. *Sigmaplot*

Les figures en histogrammes ou en nuages de points ont été effectuées avec le logiciel sous license Sigmaplot (Systat Software) v11.0. Les régressions linéaires univariées obtenues sur R ont été vérifiées avec la fonction régression linéaire de Sigmaplot.

2.8.4.3. *Tanagra*

Les analyses linéaires discriminantes ont été effectuées à l'aide du logiciel libre Tanagra v1.4 et de la fonction LDA.¹⁷⁶ La fonction Canonical Discriminant Analysis a également été utilisée pour confirmer les résultats de l'ACD obtenus dans R.

2.8.4.4. *CoDaPack*

Le logiciel libre CoDaPack v2.01.15,¹⁸⁹ a été utilisé afin de confirmer les données des analyses compositionnelles obtenues sur R.

CHAPITRE 3. CARACTÉRISATION DES CONTENUS EN MÉTAUX DES CYANOLICHENS BORÉAUX PRÉLEVÉS DANS LE NORD-QUÉBEC.

3.1. Notes préliminaires

L'article présenté dans ce chapitre a été accepté pour publication : Darnajoux et *al.* (2015), *Science of the Total Environment* 533, pp1-7.

Les modifications effectuées dans ce chapitre par rapport à la version publiée sont de natures typographiques. Seule la responsabilité de l'étudiant est engagée dans les modifications effectuées.

3.1.1. Auteurs et affiliations

Romain Darnajoux¹, François Lutzoni², Jolanta Miadlikowska², Jean-Philippe Bellenger^{1*}

¹Centre Sève, Département de chimie, Université de Sherbrooke, 2500 Boul. de l'Université, Sherbrooke, Québec J1K 2R1, Canada

²Department of Biology, Duke University, 125 Science Drive, Durham, North Carolina, 27708, USA

3.1.2. Introduction de l'article

L'étude de l'homéostasie métallique nécessite l'utilisation de spécimens peu contaminés. Une surexposition en dépôt métallique d'origine anthropique peut en effet masquer la gestion naturelle au sein des organismes. Le but de ce premier travail est donc d'évaluer l'exposition en

métaux chez quatre cyanolichens ubiquitaires du climat boréal afin de trouver des zones d'échantillonnage peu polluées propices aux études homéostatiques des métaux.

Les lichens sélectionnés se développent sur les tapis de mousses, qui sont des acteurs majeurs de la FBN en milieux boréaux. Cette étude va ainsi également pouvoir nous renseigner sur les apports en métaux au niveau des couverts de mousses dans le nord-Québec.

Enfin, les lichens étant communément utilisés comme biomoniteurs de la déposition atmosphérique, cette étude a également permis de mettre en place une base de données sur les contenus en métaux. Cela permettra un suivi de la qualité environnementale du grand nord québécois dans le futur, notamment pendant les modifications majeures qu'il va subir avec les changements globaux et avec le développement des activités humaines dans le cadre du plan Nord.

3.1.3. Participation de chaque auteur

JPB et FL ont conçu cette étude. FL et JM ont collecté les lichens, FL et JM ont identifié les lichens, RD a effectué les expériences et les analyses élémentaires. RD a rédigé la première version de l'article. JPB, RD, FL et JM ont tous commenté et modifié les versions suivantes.

3.2. Determination of elemental baseline using peltigeralean lichens from Northeastern Canada (Québec): Initial data collection for long term monitoring of the impact of global climate change on boreal and subarctic areas in Canada.

3.2.1. Abstract:

Northeastern Canada is mostly free of anthropogenic activities. The extent to which this territory has been impacted by anthropogenic atmospheric depositions remains to be studied. The main goal of our study was to establish background levels for metals in boreal muscicolous/terricolous macrolichens over non-urbanized areas of northeastern Canada (Québec). Concentrations of 18 elements (Na, Mg, Al, P, K, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Cd, and Pb) were determined for three species of the genus *Peltigera* (*P. aphthosa* (L.) Willd. s.l., *P. neopolydactyla* (Gyeln.) Gyeln. s.l., *P. scabrosa* Th. Fr. s.l.), and *Nephroma arcticum* (L.) Torss., along a 1080 km south-north transect and along a of 730 km west-east transect. We report that elemental contents in the sampled lichen thalli are very low and similar to background levels found in other studies performed in pristine places (high elevation or remote ecosystems) throughout the world.

Overall, our results demonstrate that most of the boreal and subarctic zone of Québec (northeastern Canada) is still pristine. The elemental baseline established in these lichen populations will contribute to monitor metal pollution in boreal and sub-polar ecosystems due to global climate change and future industrial expansion.

3.2.2. Introduction

Climates of the northern hemisphere will undergo significant changes in the next decades. By the end of this century, according to the 2013 International Panel for Climate Change (IPCC) report, the average temperature in boreal and sub-polar regions is expected to rise from 3 to 11°C, the snow and ice cover of the northern hemisphere will be reduced by up to 50 %, and the annual precipitation in high latitudes will increase from 10 to 40% compared to 2005.⁵⁶ (scenarios RCP 2.6 and RCP 8.5 in IPCC fifth assessment report).⁵⁵ In addition to these environmental concerns, global warming offers new economic opportunities that will likely further impact these natural boreal and arctic habitats. In the next 20 years, the Government of Québec plans to expand economic activities northward as part of the Canadian strategy to increase the exploitation of natural resources in its northern regions.¹⁹⁰ That development would inevitably impact boreal and subarctic ecosystems.

Lichens have been used as biomonitors in countless studies;^{25,128–131,191–194} lichens are ubiquitous, slow growing and long living symbioses, able to tolerate high levels of metal contaminants.^{25,195} They are particularly abundant in boreal and arctic regions where they can be the dominant photoautotrophs.¹²⁸ While some studies have reported the elemental content of lichens from northwestern Canada,^{130,196–198} Ontario¹⁹⁸, southern Québec^{199,200} and Greenland,²⁰¹ data from northeastern Canada are limited to specific metals of health concern in the reindeer food industry, generally Pb, Cd and Hg.²⁰²

In the context of a global warming mediated economic development in northern regions, defining background levels for metal contaminants in lichen species from northeastern Canada (Québec) is urgently needed. Our study provides a baseline dataset for future biomonitoring surveys designed to evaluate the impact of human activities in northern Québec and contributes to the overall understanding of biogeochemistry in boreal regions.

In this study, we measured the elemental composition of four species: *Peltigera aphthosa* (L.) Willd. s.l., *P. neopolydactyla* (Gyeln.) Gyeln. s.l., *P. scabrosa* Th. Fr. s.l., and *Nephroma arcticum* (L.) Torss, collected along two transects (1080 km south-north and 730 km east-west)

covering a large fraction of northeastern Canada. These lichen-forming fungi from the families Peltigeraceae and Nephromataceae (Peltigerales; Lecanoromycetes; Ascomycota) are associated with cyanobacteria (*Nostoc* spp.) or a combination of *Nostoc* and a unicellular green alga (*Coccomyxa* sp.) and are ubiquitous in boreal and subarctic regions.^{45,143,152,203,204}

3.2.3. Materials and methods

3.2.3.1. Lichen Sampling

The sampling for this study is derived from a sampling designed specifically for a project focusing on fungal endophytes of the boreal biome (endobiodiversity.org). Additional specimens were collected for a revisionary taxonomic study of the genus *Peltigera* (www.peltigera.lutzonilab.net) and for this study. All lichens were collected in August 2011 in the Province of Québec, along a 1080 km south-north (SN) transect (from SN2, 48°37'58"N 73°2'20"W to SN9, 57°49'36"N 73°11'45"W) and a 730 km east-west (EW) transect (from W50, 50°54'11"N 69°33'56"W to E400, 51°37'5"N 59°9'1"W) (Figure 22A-B). Because of their abundance and broad distribution in boreal forests, four species were collected along both transects: *Peltigera aphthosa* s.l., *P. neopolydactyla* s.l., *P. scabrosa* s.l., and *Nephroma arcticum*. An ongoing molecular systematic revision of the genus *Peltigera* by Miadlikowska et al.¹⁴² strongly suggest that the focal species contain multiple taxonomic entities, which are likely to be recognized at the species level. Therefore, the current broad species concept (s.l.) is used throughout the text.

We selected our biological material based on their biogeochemical relevance and availability in nature. The peltigeralean lichens selected for this study are living on mosses, which are of particular importance to nitrogen inputs in boreal forest,³⁰ and are known to fix nitrogen. Therefore, they will provide a better evaluation of the potential impact of atmospheric depositions on the boreal forest biogeochemistry.

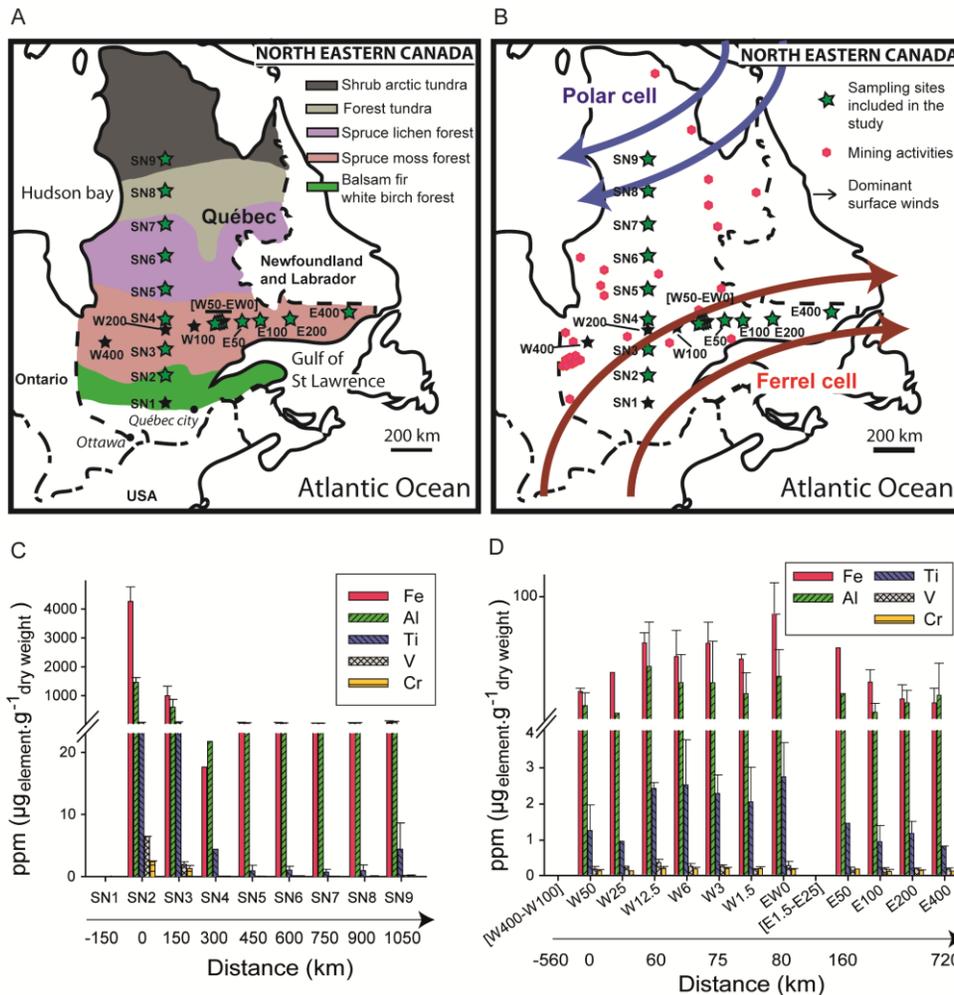


Figure 22. Sampling sites in Québec and comparisons of Fe, Al, Ti, V, and Cr contents along transects.

(A) Geographic localization of sampling sites with main vegetation zones ²⁰⁵. (B) Geographic localization of the main mining activities in Québec²⁰⁶ and directions of dominant winds. For both panels, stars represent sites sampled as part of a separate study (endobiodiversity.org). Green stars represent sites from which *Peltigera* and *Nephroma* specimens were used for this study. (C) Comparison of some metals along a south-north (SN) oriented transect and (D) along an east-west (EW) oriented transect.

Moreover, *Peltigera* species were found throughout the boreal belt as part of a study on endophytic and endolichenic fungi of the boreal biome (see endobiodiversity.org) and are present

in the arctic, i.e., beyond the tree line. The latter point is important because the choice of this genus and *Nephroma arcticum* enables a sampling for atmospheric deposition beyond what is possible with arboreal lichens.

Nine sampling sites (SN1 – SN9) were equally distributed along the SN transect, approximately one at each 150 km segments (Figure 22A-B). At each sampling site along the SN transect, individual thalli were collected at three sub-sites, one central sub-site and two sub-sites about 2 km away (in opposite directions) from the central sub-site, for a maximal distance of 4 km from the two most distant sub-sites. Within each sub-site, lichens were collected at three microsites, where two of the three microsites were 30 meter away from the central microsite for a total distance of approximately 60 meters from one terminal microsite to the other. For this study we used lichen thalli collected at sites SN2 to SN9, as no lichen thalli were found at SN1 (black spruce dominated forests of La Mauricie National Park). On the EW transect (Figure 22A-B), the sites were distributed from a central point (EW0) at a doubling distance toward the west up to about 650 km (400 miles) west of that central point (W1.5, W3, W6, W12.5, W25, W50, W100, W200, W400). For this study we used lichens collected at sites up to W50, inclusively, as not enough lichen thalli were found at W100 and no peltigeralean lichens were found at W200 and W400. No sub-sites were established along the EW transect, however three microsites were sampled as for the SN transect. For the east arm of this transect, only sites E50, E100, E200 and E400 were sampled (Figure 22A-B). A summary of the lichens sampled for this study can be found in Annexe 1 – 1.4 - Table S1. Lichens were air dried, cleaned from soil, plant and other organic debris, and then stored in paper bags at room temperature in the dark before further processing.

3.2.3.2. Mineralization and analysis of samples

Elemental analyses were performed on individual thalli. Healthy looking parts of lichen thalli were oven dried (70°C, 24h), weighted (0.50 ± 0.02 g) and inserted in 55 mL Teflon® vessels with 10 mL of concentrated nitric acid (HNO₃, trace metal grade, Fisherbrand). Digestions were performed with a MARS Xpress Microwave assisted digestion system at 170°C for 1 hour.

Digested samples were recovered in 15 mL conical centrifuge tubes and stored at 4°C prior to analysis. Procedural blanks were done for every set of digestions. All elemental quantifications of Na, Mg, Al, P, K, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Cd and Pb were done on a Thermofisher XSeries II Inductively-Coupled Plasma Mass Spectrometer (ICP-MS) and PlamaLab software v2.6.1.335. Rhodium was used as an internal standard and the accuracy of measurements was tested using CRM SLRS5 (NRCC). Replicability was below 5% for all elements (except for Ti 12% and Fe 6%) and repeatability was below 10% for all elements, except for Mg (19%), Ti (27%) and Fe (17%). Element recovery was assessed by spiking a dummy lichen sample (constituted of a mix of 100 digested lichens) with a multi-element standard solution (See Annexe 1 - 1.3 -Table S2). Full duplicates (selection, digestion, measurement and data processing) were performed to control the validity of the method. Results were reported in μg of element per g of oven dry weight lichen ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of dry weight).

3.2.3.3. *Statistics*

Due to the closed structure of the metal content, our data set was transformed using centered log-ratio (clr).^{179,186,207} Then, a principal component analysis (PCA) of compositional data was performed in order to reduce the size of the data set by highlighting factors that explain variation in the composition of the thalli. While many studies^{197,208} have used classical PCA, this is the first time compositional PCA is being used on data from lichen. The compositional biplot must be analysed in term of ratio of element; the center of the plot represent the average composition, and links between arrows represent the ratio between elements. Due to the large number of variables, results from the PCA were separated into two different types of graphs (see Annexe 1 - 1.1. Supplementary methods for details on compositional biplot interpretation and description). All statistics were performed using R software v2.15.2 with RStudio, Composition, FactomineR, Stats and Nortest pack (R development core team; <http://www.cran.r-project.org>). Medians and median absolute deviations were used as estimators of central tendency and dispersion to conveniently show non-transformed data.

3.2.4. Results and discussion

3.2.4.1. Principal component analysis

3.2.4.1.1. Major southern anomaly

A first PCA analysis performed on all data (Annexe 1 - 1.3 - Fig. S1) highlighted a major anomaly associated with the southernmost sampling sites (i.e., SN2 and SN3). PC1 clearly separates SN2 and SN3, which show a higher ratio of terrigenous insoluble elements such as Fe, Al, Ti, V to soluble elements such as P, Mg, K and Mn, from all other sites (Annexe 1 – 1.4. - Table S3 and Annexe 1 - 1.3 - Fig. S1B). This difference among sampling sites is likely due to their southern geographic location and proximity to pollution rather than their bioclimatic domain (Figure 22A-B). SN3 is located in the spruce moss domain, which is the same bioclimatic domain as for SN4 and yet, thalli sampled at SN3 show high metal contents, compared to SN4 (Figure 22A, Figure 22C). It is also worth noting that while we sampled different bioclimatic domains, samples were collected where black spruce was the dominant tree (as much as possible).

The relative abundance of cyanolichens further supports the hypothesis of an anthropogenic origin of the southern anomaly. Some lichens are known to be susceptible to anthropogenic nitrogen deposition, nitrogenic acid rain and other city-derived sources.^{209,210} No *Peltigera* and *Nephroma* species were found at SN1, W400 and W100 and were nearly absent from SN2, SN3, SN4 and W200 (Annexe 1 - 1.4 - Table S1). These southern and western most sites are located in the proximity of active mining areas (Figure 22B) and near urbanized and industrialized areas (along the Saint Lawrence River). The location of these sampling sites relative to the mining sites and cities is also consistent with dominant winds in the region (Figure 22B). Thus, the lack of lichens in the southern most portions of these transects could be due to metal pollution and/or to enhanced nitrogen pollution from urbanized areas. This could also explain the overall distribution of some of these lichen species (e.g., *Nephroma arcticum*) in Québec.(see Brodo et al., 2001⁴⁵) Further dedicated research, including a more intensive survey, is required to clearly establish the role of human activities on the abundance of cyanolichens in the region.

Because our main objective was to determine baseline metal contamination levels, samples collected at SN2 and SN3 (Annexe 1 - 1.4 - Tables S1 and S3) were excluded from further analyses. A new PCA was performed without samples from SN2 and SN3 (Figure 23). Results highlight that samples from SN4 to SN9 and W50 to E400 can hardly be differentiated based on their geographical location (Figure 22, Figure 23B). This is unexpected considering the large territory and bioclimatic range covered by the sampling, especially along the SN transect. This finding suggests that elemental deposition in most of northern Québec is homogeneous. Only few and small geographic anomalies could be revealed and likely reflects local conditions (natural and anthropogenic, See Annexe 1 - 1.2. Supplementary discussion 1.2.1 for details).

3.2.4.1.2. Elemental composition of thalli.

The variable biplot (Figure 23) shows comparable repartition of elements between the two first PCs when compared to the one obtained with the first analysis (compare Figure 23A and Annexe 1 - 1.3 - Fig. S1A). Those two first PC explain > 40% of the total variance of the dataset. PC1 opposes Ti and other terrigenous elements such as Fe, Al and V to more soluble elements such as Zn, P, and K. We can distinguish several clusters of correlated variables. On the left quadrants, a first group contains mostly insoluble terrigenous elements such as Fe, Al, Ti, V and Cr. The high ratio stability between those five elements strongly suggests that they are deposited all together. This first group certainly reflects the deposition of element as particles from pedogenic (orogenic) or anthropogenic origins (mining activities). A similar pattern with high correlation of terrigenous materials was reported for the first component of PCA from most studies on elemental deposition conducted in pristine areas.^{197,208}

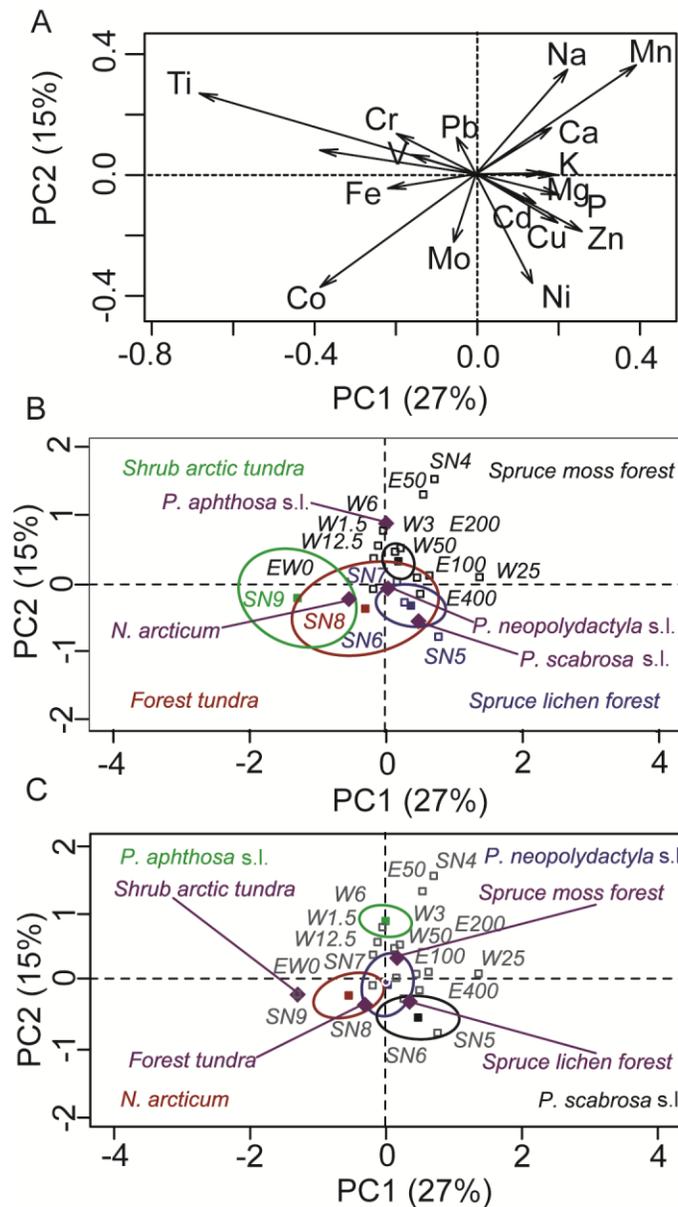


Figure 23. Correlations among elements and the effect of bioclimatic zones and species on data structure.

(A) Correlation among elements projected on the first two principal components. Variable plots highlighting bioclimatic domains (B) and lichen-forming species (C). In (B) centroids of geographical sampling points are highlighted with the color of their bioclimatic domains location. For clarity purpose, individuals are not shown.

A second group, in the lower-right quadrant, composed of numerous elements (K, Mg, P, Zn, Cu, Cd and Ni), may point at depositions from anthropogenic origin such as mining industries (i.e. Ni, Cu) and agricultural activities (P and K). However, the low levels of Ni, Cu and Zn (Annexe 1 - 1.4 - Table S3-S7) suggest that anthropogenic sources, if any, must be scarce. A third group of elements (Na, Ca and Mn) is found in the upper-right quadrant (Figure 23B) and might reflect leaching of easily soluble nutrients from the surrounding vegetation.^{167,211,212} However, source apportionment of elements that play a role in lichen physiology (Mn, Ca, Na, P, K) should be performed with care. Soil analysis at sampling sites is needed to determine more accurately the origin of trace metals.

Overall, the biplots (Figure 23) suggest that metal content of lichens from large parts of the boreal zone of Québec mostly reflect atmospheric deposition of particles from pedogenic sources and transfer of soluble elements from surroundings (i.e., vegetation leaching). The contribution of anthropogenic sources, if any, is likely low.

3.2.4.1.3. Lichen species

When considering the different lichen-forming species with regard to the first two components (Figure 23C), all species have narrow confidence ellipses ($p = 0.95$), reflecting intraspecies homogeneity. Regarding PC1, none of the species could be well separated from each other. Moreover, all centroids are close to the center of the plot (i.e. the average composition). This result demonstrates that the accumulation of metals originating from the deposition of particles is quite similar regardless of the four species we examined.

When comparing metal content for each species separately (Figure 24, Annexe 1 - 1.3 - Fig. S2, Annexe 1 - 1.4 - Tables S4-S7), there is no clear difference in the metal content of the thalli. Only few elements seem to differ in abundance in some species (e.g. Ni). However, these differences could reflect more their geographic distribution than a difference in species behavior with regard to these metals (See Annexe 1 - 1.2. Supplementary discussion 1.2.2 for details).

Nonetheless, our results show that all species have comparable overall elemental composition throughout most of our sites; from W50 to E400 and SN4 to SN9 (Figure 23C, Figure 24, Annexe 1 - 1.4 - Table S8), suggesting that these four peltigeralean species do not significantly affect the quality of metal monitoring, at least for the level of contamination recorded here. The pertinence of the selected species for future biomonitoring surveys will strongly depend on their ability to accumulate elements and survive under high element exposures. Samples collected close to anthropogenic activities (SN2 and SN3, in this study; Alaska and Siberia, data not shown), suggest that the selected species (*P. aphthosa* s.l., *P. neopolydactyla* s.l. and *P. scabrosa* s.l.) can efficiently monitor anthropogenic perturbations (i.e., metal deposition), while *N. arcticum* seems to be more sensitive to anthropogenic perturbations and could potentially be of use as a bioindicator. Further dedicated studies are required to fully establish the potential of these species as biomonitors or bioindicators.

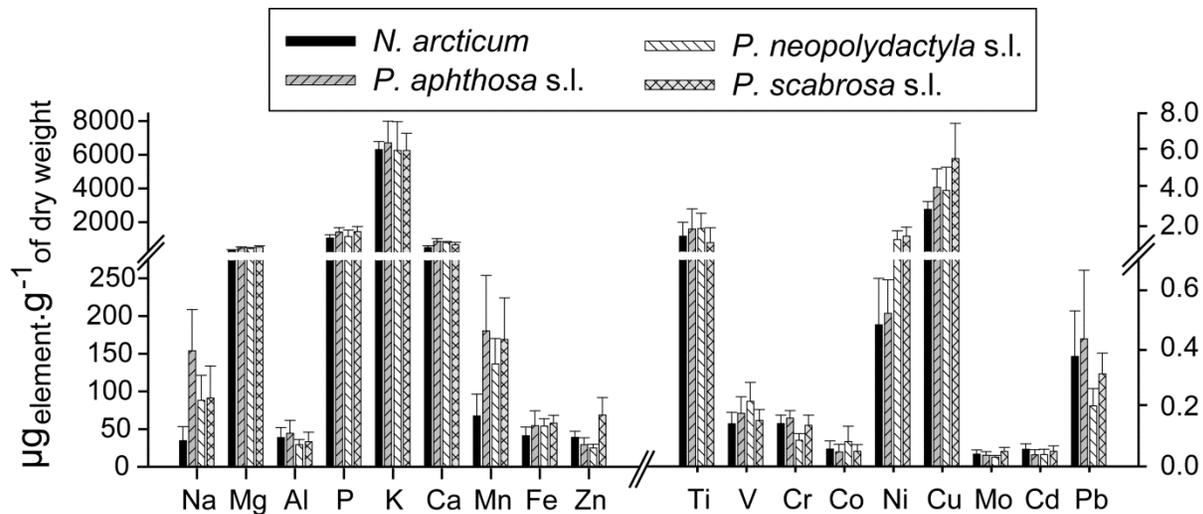


Figure 24. Element contents for four lichen-forming species.

Data from all sites were combined for each species as median and median absolute deviation.. *Nephroma arcticum* (n = 31), *Peltigera aphthosa* s.l. (n = 30), *P. neopolydactyla* s.l. (n = 16) and *P.scabrosa* s.l. (n = 33). Samples from SN2 and SN3 were excluded.

3.2.4.2. Determination of baseline element composition

Because our selected set of data is homogenous in term of composition with respect to species and geography, our baseline estimation was derived using the median and median absolute deviation on the all set (data for species are available in Annexe 1 - 1.4 - Table S8). When comparing our results with previously published values from remote areas, including mountainous regions, most elements are in the lowest portion of the range (Tableau 18). Our results are also very similar to values reported from surrounding boreal and arctic regions, such as in the Northwest Territories,^{130,197} and Greenland,²⁰¹ as well as from Antarctic regions.²¹³ Most elements reported from our study are at the lowest concentration ever reported so far. However it should be stated that comparison between different species are always difficult. The lower elemental content observed in our samples compared to other pristine locations from high elevation such as the Alps, Himalaya or Mount Kenya²¹⁴ could reflect differences in erosion dynamics. The Canadian Shield is the result of an early orogenic episode, mountains have a low elevation (culminating at 1700 m in the Province of Québec), and were less likely subject to erosion in the past hundreds of years than the Alps, the Himalaya or Mount Kenya, which originated from more recent orogeneses. Thus, the Canadian Shield likely generated less terrigenous particles. Some recent studies highlighted the pertinence to use thalli margins in order to better evaluate recent pollution sources. For lichen thalli collected in this study, whole thalli and margins provided similar conclusions (see Annexe 1 - 1.4 - Tables S9 and S10 and Annexe 1 - 1.2 - Supplementary discussion 1.2.3 for details).

Tableau 18. Baseline concentrations of elements detected from this study compared to previous studies in pristine areas of the world.

Element	Lichen content ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, dry weight)											
	This work					Literature						
	Whole lichen (n=103)				margin (n=20)	Himalaya ²¹⁴	Kenya ²¹⁴	Italy ²¹⁴	Greenland ²⁰¹	Canadian Arctic ^{130,196,197}	Chile ²⁰⁸	Antarctic ²¹³
	Min-Max	AM \pm SD	MED \pm MAD	GM	GM	AM \pm SD	AM \pm SD	AM \pm SD	GM	AM	AM	AM \pm SD
Na	<13-483	126 \pm 109	92 \pm 61	85	-	-	-	-	-	86-2756	101	222 \pm 101
Mg	133-1597	488 \pm 195	457 \pm 104	457	596	2577 \pm 1497	1653 \pm 895	1008 \pm 249	-	350.8-916.5	-	436 \pm 179
Al	15-515	53 \pm 69	36 \pm 12	40	14	-	-	-	70.1-518	369-940	1289-1691	428 \pm 191
P	543-4995	1445 \pm 665	1338 \pm 354	1337	1980	-	-	-	-	-	1267-1623	963 \pm 517
K	3748-10898	6549 \pm 1423	6518 \pm 966	6395	9568	4229 \pm 1113	4348 \pm 1844	4703 \pm 608	-	1030-7920	2916	2007 \pm 483
Ca	255-2009	778 \pm 314	738 \pm 158	722	666	-	-	-	-	1100-8200	4300-4946	640 \pm 707
Ti	<1-80	3 \pm 8	2 \pm 1	2	1	-	-	-	-	7-850	-	-
V	0.07-2.20	0.21 \pm 0.21	0.16 \pm 0.05	0.18	0.11	2.4 \pm 1.2	1.8 \pm 0.5	0.6 \pm 0.1	0.21-0.64	0.17-9.7	2.09	-
Cr	<0.07-1.43	0.19 \pm 0.21	0.15 \pm 0.04	0.15	0.18	2.5 \pm 1.4	2.5 \pm 2.0	1.7 \pm 1.3	0.17-0.7	0.5-2	2.17	1.3 \pm 0.6
Mn	19-1206	169 \pm 158	129 \pm 64	126	99	55 \pm 26	169 \pm 138	108 \pm 75	-	30.2-84.5	109	11.8 \pm 3.9
Fe	18-880	71 \pm 88	54 \pm 13	57	27	1512 \pm 756	1615 \pm 792	220 \pm 105	90.2-225	50-900	1410	802 \pm 402
Co	<0.03-0.79	0.11 \pm 0.14	0.06 \pm 0.03	0.07	0.02	0.82 \pm 0.53	0.39 \pm 0.24	0.27 \pm 0.12	-	0.08-2.84	-	-
Ni	0.2-4.7	1.0 \pm 0.8	0.8 \pm 0.3	0.8	0.5	-	-	-	<1-1.1	1.7-5.5	2.63	-
Cu	1.8-23.8	4.9 \pm 3.8	3.7 \pm 1.1	4.1	5.4	5.9 \pm 3.7	5.3 \pm 2.0	4.1 \pm 3.1	0.594-0.979	0.7-5	4.39-4.49	5.3 \pm 5.1
Zn	12-166	51 \pm 33	40 \pm 15	43	43	34 \pm 13	67 \pm 32	35 \pm 16	10.6-25.1	7-55	44.2-51.0	18.6 \pm 4.1
Mo	<0.03-0.33	0.06 \pm 0.05	0.05 \pm 0.01	0.05	0.03	-	-	-	-	0.07-0.32	-	-
Cd	<0.03-1.00	0.08 \pm 0.10	0.06 \pm 0.02	0.06	0.14	0.04 \pm 0.03	0.14 \pm 0.13	0.21 \pm 0.10	0.066-0.119	0.03-0.24	0.13-0.28	0.21 \pm 0.11
Pb	0.05-3.02	0.43 \pm 0.37	0.32 \pm 0.12	0.35	0.22	14.0 \pm 3.9	3.6 \pm 1.9	4.8 \pm 1.3	0.77-2.3	0.4-9.2	0.25-1.51	0.54 0.34

3.2.5. Conclusions

Overall, our results show that a large portion of the boreal biome of Québec (Northeastern Canada) remains pristine. The elemental composition of selected muscicolous/terricolous macrolichens, independent of the species considered here, mostly reflects deposition of particles from pedogenic origin. All lichens are surprisingly homogeneous with regards to their geographic origin. This likely reflects the relative homogeneity in the geological formation of northeastern Canada; mostly the Canadian Shield. Baseline element compositions of studied lichens are very comparable to lichens from the most pristine places in the world (i.e., Greenland, Himalaya, Antarctica and various polar regions). Finally, we showed that in the southern part of the SN transect, the sampled specimens of *Peltigera* spp. were able to monitor anthropogenic perturbations; the intense mining activity in this region was easily recorded in all samples. Also, the use of multivariate analysis in this study underlined small anomalies for specific metals with regard to geography and species, even at low concentration levels. Biomonitoring surveys including several species offer a variety of advantages; (i) it will facilitate sampling (species have different abundances and distributions along both transects) and (ii) it will significantly reduce the odds of losing the reference material over time. Some species are more sensitive than other to perturbation such as nitrogen deposition and acid rain. With future economic developments of boreal regions associated with global climate change, some species could disappear from some regions as a result of anthropogenic activity. The absence or very low abundance of *Peltigera* and *Nephroma* close to intense mining and urbanized areas in the mossouthern and western part of our transects (SN1 to SN3, W100 to W400) supports this prediction. This study provides a valuable set of data to monitor the impact of global climate change, future urbanization, and mining development in northeastern Canadian ecosystems.

3.2.6. Acknowledgements

We want to thank the Air Saguenay pilot, Jacques Bérubé, and the team at Lac Margane for the sampling in Québec, Canada; members of the Lutzoni lab: Bernie Ball, Emilie Lefèvre; and the Arnold lab (University of Arizona): A. Elizabeth Arnold and Kayla Arendt for the field

assistance in Québec. The sampling of the lichen specimens for this project was done with the financial support of the National Science foundation through a Dimensions of Biodiversity award DEB-1046065 to FL and a REVSYS award on the genus *Peltigera* DEB-1025930 to JM and FL. This work was supported by the Canadian Research Chair in terrestrial biogeochemistry and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada through a Discovery grant. We want to thank also Prof. Bernard Colin from the Department of Mathematics, Université de Sherbrooke, for his advice and comments regarding multivariate statistics.

3.3. Synthèse de l'article

Les lichens collectés le long des deux transects dans le nord-Québec sont caractérisés par des contenus en métaux parmi les plus faibles enregistrés dans la littérature, avec des niveaux pour la plupart des éléments comparables à ceux d'endroits reculés comme la Patagonie ou l'Antarctique, ou à des sites de hautes élévations comme les Alpes ou l'Himalaya. Le nord-Québec est donc encore peu affecté par les activités humaines. La diminution brusque le long de l'axe sud-nord est aussi cohérente avec les diminutions des dépôts d'azote dans cette région. Ainsi, on peut faire l'hypothèse que les lichens, qui reposent en grande partie sur la déposition atmosphérique pour leurs apports en éléments chimiques, vont être potentiellement limités en N dû aux apports faibles dans cette région. De plus, les faibles niveaux en métaux enregistrés ne devraient pas noyer le signal métabolique des constituants de la symbiose lichénique. Ainsi, les lichens du nord-Québec sont de parfaits candidats pour notre étude de l'homéostasie des micronutriments au sein de la symbiose. Cette étude est détaillée dans le chapitre suivant.

CHAPITRE 4. HOMÉOSTASIE DU VANADIUM AU SEIN DU LICHEN *PELTIGERA APHTHOSA* (L.) WILLD.

4.1. Notes préliminaires

L'article présenté dans ce chapitre a été publié en 2014 : Darnajoux et *al.*, *New phytologist* (2014), 202 (3), pp765-771.

Les modifications effectuées dans ce chapitre par rapport à la version publiée sont de natures typographiques. Seule la responsabilité de l'étudiant est engagée dans les modifications effectuées.

4.1.1. Auteurs et affiliations

Romain Darnajoux¹, Jérôme Constantin¹, Jolanta Miadlikowska², François Lutzoni², Jean-Philippe Bellenger^{1*}

¹Centre Sève, Département de chimie, Université de Sherbrooke, J1K 2R1, Qc, Canada

²Department of Biology, Duke University, Box 90338, Durham, NC 27708-0338, USA

4.1.2. Introduction de l'article

Cette étude a été initiée dans le but de caractériser la répartition de certains métaux, particulièrement du vanadium, au sein de la symbiose lichénique. Les spécimens du cyanolichen boréal *Peltigera apthosa* utilisés proviennent de zones faiblement contaminées par les dépôts atmosphériques d'origine anthropique du nord-Québec (voir chapitre 3). Cet échantillonnage a été complété avec des spécimens provenant d'autres sites, caractérisés par des expositions en métaux modérées à élevées, afin d'étudier les effets de gradient naturel

d'exposition sur les contenus en métaux. Les contenus en métaux du thalle, avec et sans lavage des éléments extracellulaires (voir 2.5), de l'algue ainsi que des cephalodia, structures abritant les cyanobactéries siège de la fixation d'azote, ont été déterminés. Quatre métaux ont été particulièrement étudiés; le magnésium (Mg), impliqué dans les molécules de chlorophylles essentielles à la photosynthèse, le molybdène (Mo) impliqué dans la fixation biologique de l'azote, le plomb (Pb), métal généralement toxique à faible concentration et sans aucun rôle biologique, ainsi que le vanadium (V), au cœur de notre étude, qui est un métal potentiellement toxique et dont le seul rôle connu en écosystème terrestre est dans la fixation d'azote. Est-ce que les distributions des métaux entre les symbiontes reflètent leur fonction au sein de la symbiose ? Le V est-il géré comme un élément toxique ou bien comme un micronutriment essentiel à la FBN ?

4.1.3. Participation de chaque auteur

JPB et FL ont conçu cette étude. FL et JM ont collecté les lichens, JM a identifié les lichens, RD a effectué les expériences et les analyses élémentaires. JC a participé à la dissection des cephalodia. JPB a rédigé la première version de l'article. JPB, RD, FL et JM ont tous commenté et modifié les versions suivantes.

4.2. Is vanadium a biometal for boreal cyanolichens?

4.2.1. Abstract

- Molybdenum (Mo) nitrogenase has long been considered the predominant isoenzyme responsible for dinitrogen fixation worldwide. Recent findings have challenged the paradigm of Mo hegemony, and highlighted the role of alternatives nitrogenases such as the vanadium-nitrogenase.
- Here, we first characterised homeostasis of vanadium along with other metals *in-situ* in the dinitrogen fixing cyanolichen *Peltigera aphthosa*. These lichens were sampled in natural sites exposed to various levels of atmospheric metal deposition. These results were compared to laboratory experiments where *Anabaena variabilis*, which is also hosting the V-nitrogenase, and a relatively close relative of the lichen symbiont *Nostoc*, was subjected to various levels of V.
- We report here that V is preferentially allocated to cephalodia, which are specialised structures hosting the cyanobacterium *Nostoc*, and where dinitrogen fixation occurs in tri-membered lichens. This specific allocation is biologically controlled and tightly regulated. Vanadium homeostasis in lichen cephalodia exposed to various V concentrations is comparable to the one observed in *Anabaena variabilis* and other dinitrogen fixing organisms using V-nitrogenase.
- Overall, our findings support current hypotheses that V could be a more important factor in mediating N input in high latitude ecosystems than previously recognized. They invite the reassessment of current theoretical models linking metal dynamics and N₂ fixation in boreal and subarctic ecosystems.

4.2.2. Introduction

Biological nitrogen fixation (BNF) is the main source of new nitrogen (N) for the biosphere, accounting for up to 97% of N input in unmanaged terrestrial ecosystems.^{2,5,6,65} This reaction is

catalysed by the enzyme nitrogenase (Nase) in few prokaryotes. Three nitrogenases have been identified so far.¹² In N₂ fixers associated with higher plants, only the molybdenum (Mo) dependent nitrogenase (Mo-Nase) has been identified. However, in many other N₂ fixers two additional isoenzymes have been reported;^{12,215,216} the vanadium (V) dependent (V-Nase) and iron-only dependent nitrogenase (Fe-Nase). The role of these alternative nitrogenases (V-Nase and Fe-Nase) in natural habitats has been mostly overlooked, because they are found in communities that were not considered major contributors to N inputs. In recent years, N₂ fixation associated with mosses and lichens has captured the interest of the scientific community for its importance toward global N input in high latitude ecosystems.^{12,24,30,48} Within this context, it is imperative to characterise the role of alternative nitrogenases in these biomes. Various observations suggest that alternative nitrogenases could play an important role in N₂ fixation in these cold environments. Molybdenum limitation on free-living and symbiotic N₂ fixers is now well documented,¹⁴⁻¹⁶ and the genes coding for the alternative nitrogenases have been found in most ecosystems.⁹ More recently, V-Nase has been found in cyanolichens.¹⁰ These findings challenge the traditional view of Mo hegemony on N input and justify a re-evaluation of the importance of alternative nitrogenases in natural habitats.¹² If alternative means of N₂ fixation are more common and active than recognized so far, it would deeply affect our conceptual models relating to N₂ fixation and trace metal dynamics in the environment.¹² Not only would this affect our fundamental understanding of N₂ fixation and N cycling, it would also impact our ability to predict ecosystems response to global climate change.

Approaches to assess the importance of V for N₂ fixation in natural habitats, include monitoring V-Nase activity *in situ* by gas chromatography⁸⁷ or quantifying the expression of genes coding for the V-Nase. None of these approaches are trivial. For instance, the low N₂ fixation activity by most N₂ fixers jeopardizes the detection of V-Nase activity through the monitoring of ethylene and ethane production during acetylene reduction assays.⁸⁷ But more importantly, both approaches might be compromised by the versatility in the use of the nitrogenases; many biotic and abiotic parameters influence the expression, efficiency and use of the various nitrogenases. Thus, the odds of detecting V-Nase activity in field samples are spatiotemporally dependent.

This might explain why attempts to provide direct evidences for V-mediated N₂ fixation in natural habitats have failed so far.

Here we opted for an alternative approach relying on the principles of metal homeostasis in order to overcome these challenges. The purpose of homeostasis is to maintain internal conditions independently of variations of the external environment. Internal concentrations of essential biometals are often tightly regulated, and maintained close to metabolic optima. Unlike gene expression or metalloenzyme activity, which can be influenced by quickly changing external parameters (i.e., temperature), homeostasis of many biometals is fairly stable. Thus, for alternative nitrogenases, assessing the biological importance of a metal by characterizing its homeostasis is justifiable compared to detecting the activity of the enzymes directly.

We studied V homeostasis in the tri-membered lichen *Peltigera aphthosa*, a ubiquitous cyanolichen in boreal regions. Our choice was motivated by the following reasons. First, the homeostasis-based approach is particularly relevant for V. Other than its role in N₂ fixation, V has no significant biological purposes in terrestrial organisms and can easily become toxic.²¹⁷ Expectations about V homeostasis are thus very different depending on whether or not V is used for N₂ fixation. For instance, homeostasis of V has been shown to be more tightly controlled than Mo in the free-living N₂ fixer *Azotobacter vinelandii*²⁶ owning the three Nases. Secondly, *P. aphthosa* offers a particularly suitable model for the study of metal homeostasis. This lichen is formed by the symbiotic association of: a fungus (*P. aphthosa*, mycobiont); a carbon (C) fixing unicellular green alga (*Coccomyxa* sp., phycobiont) located in an algal layer; and a N₂ fixing cyanobacterium (*Nostoc* sp., cyanobiont) restricted to small specialised structures called cephalodia (Annexe 2 - Fig. S1). While this question has been poorly addressed so far for lichens,¹³⁷ the allocation and concentration of metals within the lichen thallus are likely to be tightly regulated, reflecting the specific metal requirements of the green alga and cyanobacterium located in specific compartments. Finally, from a theoretical perspective, the alternative V-Nase presents several advantages over the Mo-Nase for lichens in boreal and subarctic areas. At low temperatures (< 15°C), the repression of alternative Nase genes by Mo stops¹⁹ and the activity of

V-Nase is higher than Mo-Nase.²¹ It is also worth reminding that Mo is the least abundant biometal in the earth's crust¹³ and that Mo has been reported to be limiting N₂ fixation by free living N₂ fixers and lichens.¹⁴⁻¹⁷ Vanadium is 50 to 200 times more abundant in the earth's crust than Mo.¹³ Thus, the V-Nase could be particularly relevant for species that live in high latitude ecosystems and rely on atmospheric depositions for their mineral nutrition such as *P. aphthosa* and other cyanolichens. The study of V homeostasis in thalli of the tri-membered cyanolichen *P. aphthosa* collected in high latitude habitats enhances our ability to unveil the biological importance of V in N₂ fixation.

4.2.3. Materials and Methods

4.2.3.1. Samples collection.

Specimens of *Peltigera aphthosa* were collected in northern Québec, Canada (August 2011, $n = 29$), in southern Quebec, Canada (Fjord du Saguenay, June 2013, $n = 9$), in Alaska, USA (Fairbanks, August 2011, $n = 6$, N64°50.37 W147°43.23) and Krasnoyarsk territory, Russia (Stolby Reserve, June 2012, $n = 5$, N55°53.15 E92°46.22) (Annexe 2 - Fig. S1). All thalli were manually cleaned for foreign materials (bryophytes and leaves) with forceps and then kept dry in opaque paper bags at room temperature until further analysis.

4.2.3.2. Thallus washing procedure.

Lichens were washed to remove metals present at the surface of the thallus (non-specific absorption sites and particles). Then 0.1 – 0.2 g of each sample of lichen were washed twice for 30 minutes with 20 ml of an oxalate/EDTA (0.1M/0.05 M) solution¹⁵⁹ and then once with 5 mL of Milli-Q[®] (MQ) water. Samples were allowed to dry in an oven at 70°C before weighting. The use of nickel chloride (NiCl₂) wash (a very common washing technique) was avoided to prevent metal contamination of the sample. High concentration of nickel (Ni) and chlorine (Cl) is particularly problematic for inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) analysis as it can interfere with the quantification of trace metals such as Mo and V. Oxalate/EDTA solutions are commonly used in our laboratory to wash various biological materials prior to

elemental analysis. It has proven efficiency on bacteria, algae, and plants. EDTA wash are also commonly used with lichens.¹⁶⁴ Thus, oxalate/EDTA wash was also selected for consistency purposes.

4.2.3.3. *Separation of the symbionts.*

Cephalodia were manually dissected under a binocular microscope using razor blade and forceps. All cephalodia were freed of algal layer and fungal hypha debris after excision. Each sample was washed twice with an oxalate/EDTA¹⁵⁹ solution (0.1/0.05M), then once with Milli-Q[®] (grade I) water. Clean cephalodia were allowed to dry at 70°C in an oven before weighting. Algae from Québec and Alaska were separated using a density separation on Percoll[®] gradient method modified from Gasulla et al., (2010);¹⁵³ no Tween 20[®] was used to prevent metal contaminations and 3 additional washes (Oxalate/EDTA (0.1M/0.05M)) were performed at the end of the procedure. Isolated algae were dried and kept at -80°C until further manipulations.

4.2.3.4. *Elemental analysis.*

Unwashed and washed thalli were digested using a microwaved assisted procedure. Briefly, 200 to 500 mg of each sample was transferred into a Teflon tube to which 10 to 12 ml of nitric acid (70%, trace metal grade, Fisher scientific) were added. The samples were then digested at 170°C for 50 minutes on a MarsXpress microwave digester (CEM, Buckingham, UK). Cephalodia and algae were digested in 1.5 to 2 mL of concentrate nitric acid (70%, trace metal grade, Fisher scientific) at 60°C for 48h. Samples were diluted with Milli-Q[®] water, spiked with internal standards (40 ppb Rh, 2 ppb In) and analyzed for their concentrations of Al, P, Mo, V, Mg and Pb by inductively coupled plasma-mass spectrometer (ICP-MS, XSeries[®] II, Thermofisher). Metal contents are reported in $\text{mol}_{\text{metal}} \cdot \text{mol}_{\text{P}}^{-1}$ (Figure 25 - Figure 26) and in $\mu\text{g}_{\text{metal}} \cdot \text{g}_{\text{dryweight}}^{-1}$ (Annexe 2 - Fig. S2). Both ratios provide similar conclusions. Metal contents in the alga are reported only in $\text{mol}_{\text{metal}} \cdot \text{mol}_{\text{P}}^{-1}$, because the low amount of extracted algae did not allow accurate measurement of the dry mass.

4.2.3.5. Vanadium addition experiments.

Four lichen thalli from the same site in northern Quebec (0.1 g) were incubated each in 20 ml of a different solution of NaVO_4 / Na_2MoO_4 with concentration of V ranging from 10^{-7} to 10^{-4} M. Incubation lasted 20 min with agitation and light, then thalli were rinsed with MQ water before being left to dry. The addition was repeated twice within two weeks and in duplicate with lichens from two different sites (SN7 and SN9; Annexe 2 - Fig.S1). Lichens were kept dry in the dark for 6 months, then cephalodia were excised and thalli and cephalodia were washed with oxalate/EDTA before elemental analysis (see earlier). A second experiment was conducted to refine data in the range of 10^{-8} to 10^{-6} M V exposure using thalli (triplicate from one site) from a location exposed to higher metal deposition (southern Québec, FdS; Annexe 2 - Fig. S1). Controls are corresponding values from the same sampling site without any addition.

4.2.3.6. Vanadium homeostasis of *Anabaena variabilis*.

Anabaena variabilis (strain ATCC 29413) was cultured at different concentration of V (10^{-8} – 10^{-4} M) at 15°C and 20°C in an eight-fold dilution of Allen and Arnon medium¹⁵⁵ under a 12-12 h night/day cycle in Infors HT Multitron shaker. Then, 10ml of culture ($\text{OD}_{730} \sim 0.6$) were centrifuged and washed three times with oxalate/EDTA (0.1 M/0.05 M) before digestion (see earlier). Results from different temperatures were combined together.

4.2.4. Results and discussions

4.2.4.1. Vanadium distribution within the lichen thallus

In order to determine whether or not V homeostasis is characteristic of a biometal essential for N_2 fixation in *P. aphthosa*, we first examined the distribution of metals within the lichen thallus. Our hypothesis was that the repartition of elements within the different compartments of the thallus (i.e., cephalodia containing *Nostoc* versus the remaining part of the thallus containing the algal layer) will be characteristic of their metabolic function. We measured metal contents in the whole thallus and in each symbiont (green alga and cyanobacterium) separately. We selected sites in north-eastern Canada (Annexe 2 – Fig. S1) that were as far as possible from active

mining sites to avoid metal contaminations that can interfere with homeostasis of trace metals. In these localities, metal concentrations in lichens are among the lowest reported on earth.

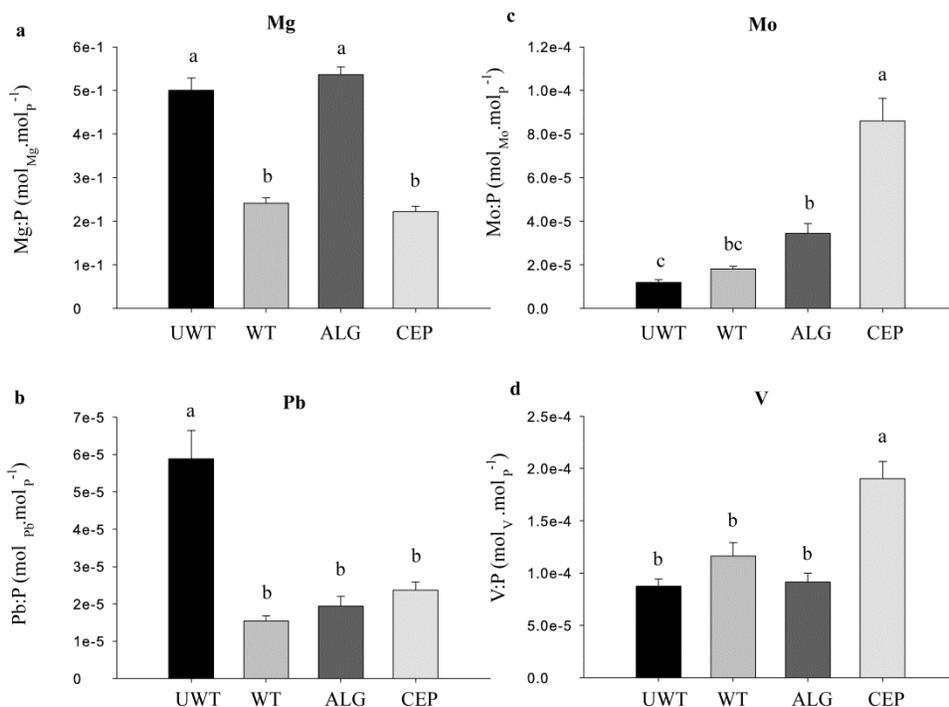


Figure 25. Distribution of metals within *P. aphthosa* thalli from Québec, Canada.

Metal contents (a, Magnesium (Mg). b, Lead (Pb). c, Molybdenum (Mo). and d, Vanadium (V)) are reported in metal to phosphorus molar ratios ($\text{mol}_{\text{metal}}\cdot\text{mol}_{\text{P}}^{-1}$). UWT: unwashed thallus (i.e., exposition), WT: Ox/EDTA-washed thallus, ALG: alga, and CEP: cephalodia. Error bars represent standard errors ($n = 28, 29, 26$ and 27 for UWT, WT, ALG and CEP, respectively). Identical letters above bars indicate no significant difference according to a one-way analysis of variance (ANOVA), Holm-Sidak (Annexe 2 - Table S1). Data in $\text{g}_{\text{metal}}\cdot\text{g}_{\text{dryweight}}^{-1}$ are available in supplementary information (Annexe 2 - Fig. S2).

Magnesium, which is associated with ATP in all living cells, is consistent with the distribution of an essential biometal; it is present in washed thalli, alga and cephalodia. The higher Mg content in the alga, compared to cephalodia and washed thalli, could be related to the role of Mg in carbon fixation (the core metal in chlorophyll) (Figure 25a). Looking at Pb, a metal with no

biological purpose and potentially toxic, we observed that it is mostly present at the surface of the thallus (easily washed, Figure 25b). Within the thallus, Pb is equally distributed among partners; no specific translocation of the metal occurs. This likely reflects protective mechanism that prevents this non-essential and toxic metal to enter the thallus. On the contrary, we observed that Mo is highly concentrated in cephalodia, and to a lesser extent in the alga (Figure 25c). This distribution of Mo likely reflects the importance of Mo for N₂ fixation by the cyanobacterium *Nostoc* and nitrate reduction by the alga *Coccomyxa*.²¹⁸ As for Mo, we found that cephalodia are preferentially enriched in V, where it is 2-3 times more concentrated than in the alga and the whole thallus (Figure 25d). Vanadium is highly toxic when not required to sustain N₂ fixation. In such situation, it is fair to assume that the distribution of V should be similar to the one of Pb. The preferential allocation of V to the cephalodia, comparable to Mo, suggests its biological importance for N₂ fixation in *P. aphthosa*.

4.2.4.2. Vanadium to Titanium ratios

We then evaluated whether or not this preferential allocation of V to cephalodia is a biologically driven process. A simple way to address this question is to measure the relative abundance of titanium (Ti) and V in the different compartments of the lichen thallus. The main source of V for *Peltigera aphthosa* is through atmospheric deposition of particles. These deposits have characteristic V : Ti ratios, which are often used to characterise their origin in biomonitoring studies.²¹⁹ High correlation between terrigenous metals, such as Ti and V, also indicates the particulate origin of the metals. Here we compared the correlation between V and Ti abundances in the unwashed thallus (representative of metal exposure), in the washed thallus (mostly representative of the fungus which represent > 90% of the biomass), in the algae and in cephalodia (Tableau 19). We observed that Ti and V are correlated in the unwashed thallus, washed thallus and alga ($r^2 \sim 0.48, 0.92$ and 0.64 , respectively). This suggests that the concentration of Ti and V in washed thallus and alga is still representative of particle deposition (unwashed thallus). However, the lower V : Ti ratio in the alga and washed thalli compared to unwashed thalli shows that V is less accumulated than Ti in these compartments (Tableau 19).

This result is consistent with the high toxicity of V and the necessity to limit its accumulation in living cells.

Tableau 19 : Content and ratio of vanadium (V) and titanium (Ti) for different compartments of *P. aphthosa*

		Cephalodia		Alga		Washed thalli		Unwashed thalli	
		Ti	V	Ti	V	Ti	V	Ti	V
Metal content	Content	2.57 ^a	0.41 ^A	-	-	3.31 ^a	0.15 ^B	2.65 ^a	0.21 ^B
($\mu\text{g}_{\text{metal}} \cdot \text{g}_{\text{ODW}}^{-1}$)	<i>SE</i>	0.46	0.04	-	-	0.40	0.01	0.54	0.02
Paired-ratio	Ratio V / Ti	2.74E-01 ^a		4.36E-02 ^b		5.51E-02 ^b		1.26E-01 ^c	
($\text{mol}_V \cdot \text{mol}_{\text{Ti}}^{-1}$)	<i>SE</i>	4.42E-02		5.27E-03		4.80E-03		2.13E-02	
	n=23								
Linear regression	R ²	<0.001		0.64		0.92		0.48	
	n	27		26		29		28	

V and Ti contents are expressed in $\mu\text{g}_{\text{element}} \cdot \text{g}_{\text{ODWlichen}}^{-1}$ (letters represent results of analysis of variance (ANOVA) Holm-Sidak $p=0.05$), V:Ti (mol:mol) ratios from paired samples (only thalli with all compartments represented were kept, letters represent results of paired t-test between compartment, $n=23$) and correlation factor (r^2) from linear regression of Ti:phosphorus (P) (mol:mol) ratio and V: P (mol:mol) ratio.

Contrary to the alga, washed and unwashed thalli, no correlation was detected between Ti and V in the cephalodia (Tableau 19). Therefore, the relative content of V and Ti is not representative of particle deposition in the cephalodia, but rather reflects the preferential allocation of V compared to Ti in this compartment (Tableau 19). While the concentrations of Ti in the washed and unwashed thalli are similar to the concentration in the cephalodia, the concentration of V is significantly higher in the cephalodia (> 2 folds). Similar conclusions can be made if considering another terrigenous element as reference, such as aluminum (Annexe 2 - Table S2). The mechanisms involved in the redistribution of V and its selective recruitment by cephalodia remains unclear, however this phenomenon is clearly biologically driven. Recently, lichen

substances have been shown to be involved in the homeostasis of several metals in *Hypogymnia physodes*.¹³⁵ Analogous to vanadophores and molybdophores, that is, low molecular weight ligands specialized in the recruitment and homeostasis of Mo and V, found in N₂ fixing bacteria,²²⁰ some lichen substances could be involved in the homeostasis of Mo and V.

4.2.4.3. Natural and artificial vanadium exposures

We further examined V homeostasis by characterizing the effect of increasing V exposure on intracellular V concentrations in pure culture of *Anabaena variabilis*, a cyanobacterium closely related to *Nostoc*. *Anabaena variabilis* was grown under diazotrophic conditions in presence of V and in absence of Mo (Figure 26a). Intracellular V concentrations are maintained in a narrow range ($2\text{-}5 \times 10^{-4} \text{ mol}_V \cdot \text{molP}^{-1}$) over a large array of external V concentrations (from 5×10^{-8} to 10^{-5} M V). These results are comparable to those reported in other N₂ fixing organisms, such as *Azotobacter vinelandii* in which V is limiting at $[\text{V}]_{\text{medium}} < 10^{-7} \text{ M}$, is toxic at $[\text{V}]_{\text{medium}} > 10^{-5} \text{ M}$, and is optimal for N₂ fixation at $c. 5 \times 10^{-4} \text{ mol}_V \cdot \text{molP}^{-1}$.²⁶

Then, we measured the effect of V exposure on V concentration in cephalodia of *Peltigera aphthosa* in a laboratory setting. Our goal was to determine whether or not V homeostasis in *P. aphthosa* is similar to *A. variabilis*. Below 10^{-6} M V , V concentrations in cephalodia are maintained in a narrow range ($1\text{-}3 \times 10^{-4} \text{ mol}_V \cdot \text{molP}^{-1}$), close to the V optimum²⁶ (Figure 26b), independently of the external conditions (V concentration). Above 10^{-5} M V , V concentrations in cephalodia significantly increase with increasing V exposure. Finally, we compared specimens from our pristine locations in Québec with specimens collected in areas affected by human activity (southern Québec, Alaska and Siberia), that is, with significantly higher total metal concentrations (unwashed thalli). This set of samples represents a field gradient in metal exposure. While metal exposure cannot be tightly controlled as in the laboratory experiment, this set of samples is more representative of the response of *P. aphthosa* to long term metal exposure in natural habitats. Both Mo and V increase with total exposure in the field (Figure 26c).

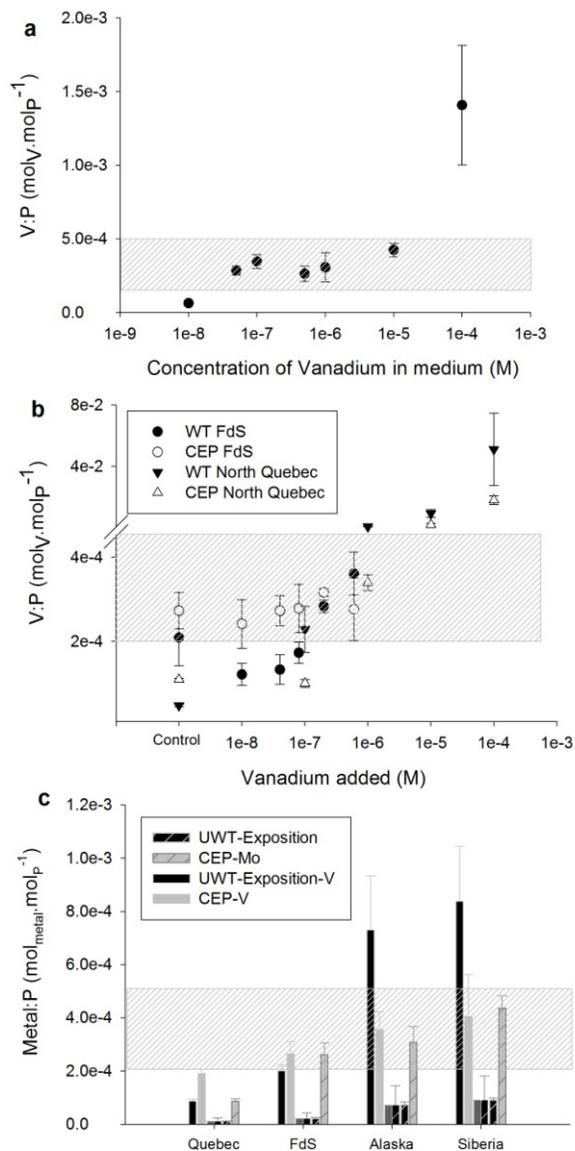


Figure 26. Cellular response of *Anabaena variabilis* to increasing extracellular vanadium concentration.

a, effects of increasing vanadium concentration on V cellular concentrations in *Anabaena variabilis* growing diazotrophically (in absence of Mo). Error bars are standard errors n = 2. b, effects of artificial vanadium exposures on *Peltigera aphthosa* from pristine location (northern Québec, triangles) and Fjord of Saguenay (FdS, circles). Vanadium contents are reported in metal to phosphorus molar ratios (mol_{metal}.mol_P⁻¹). Washed thalli (close symbols) and cephalodia (open symbols). Error bars are standard errors (n = 2 for northern Québec, n = 3 for FdS). c, comparison of V and Mo contents in specimens of *P. aphthosa* from pristine (northern Québec) and metal exposed locations (Fairbanks, Alaska, US; FdS, Québec, Canada; and Stolby Reserve, Siberia, Russia). Unwashed thallus (black bars) and cephalodia (grey bars). V solid bars and Mo striped bars. Error bars are standard errors; n = 28, and 27 for UWT and CEP in Québec, n = 6 for Alaska, n = 9 for FdS and n = 5 for Russia). Gray shady box in each graph represent range of intracellular V : P ratio (mol_V.mol_P⁻¹) for optimal N fixation in *Anabaena variabilis* and literature.

While total Mo and V increase by a factor of eight to ten, Mo content in cephalodia increases by a factor of five but V only by a factor of c. two. It is worth noting that V concentrations in cephalodia are higher than V exposures (unwashed thallus) in our pristine specimens.

Whereas, in samples collected in innated areas (especially Alaska and Siberia), V concentrations in cephalodia are lower than V exposures. This rules-out the passive allocation of V to cephalodia in response to V exposure. More interestingly, both Mo and V reach comparable

concentrations in the cephalodium ($\sim 4 \times 10^{-4}$ mol.molP⁻¹) under high metal exposure conditions (Figure 26). This concentration is similar to the optimum V (and Mo) concentration required for the diazotrophic growth of *A. variabilis* (Figure 26a) and other cyanobacteria¹⁵⁸ and soil N₂ fixers.²⁶ Overall, the results from Figure 26 show that V homeostasis in cephalodia of *P. aphthosa* is characteristic of an essential biometal for N₂ fixation, that is, V concentrations are maintained close to the biological optimum for N₂ fixation under a wide array of external conditions. As a final note we want to highlight that in samples collected in pristine locations (northern Québec), Mo concentrations in cephalodia are below the optimum Mo requirement to sustain N₂ fixation.²⁶ Whereas, V concentrations are close to the optimal concentrations observed in this study (Figure 26a,b) and Bellenger *et al.* (2011).²⁶ This illustrates that V could be an important nutrient for N₂-fixing cyanobacteria and cyanolichens in northern regions.

4.2.5. Conclusions

To the best of our knowledge, this is the first attempt to characterise metal homeostasis in lichen thalli containing a cyanobacterium, collected in their natural habitats. We show here for the first time that V homeostasis in cyanolichens present the characteristic of an essential biometal for N₂ fixation. More specifically, our results demonstrates that: V is preferentially allocated to cephalodia, the structure specialised in hosting *Nostoc*, and where N₂ fixation takes place; this allocation is biologically driven; and V content achieved under various metal exposures (replete conditions) are comparable to the V optimum observed in pure culture of cyanobacteria and in other N₂ fixers using V-Nase. Our results highlight the biological importance of V in cyanolichens. They strongly suggest that not only *Peltigera* and other cyanolichens own the V-Nase,¹⁰ but that V very likely plays an active role in N₂ fixation in boreal ecosystems. The exact conditions at which V comes at play and the relative contribution of the V-Nase, compared to Mo-Nase, remains to be elucidated. Further research is required to determine the importance of V in other cyanolichen species and other climatic regions. Overall, our results incite a reconsideration of the role V plays in N₂ fixation by cyanolichens in warm, and cold, ecosystems, and encourage a reassessment of current theoretical models linking metal dynamics and N₂ fixation.

4.2.6. Acknowledgment

We want to thank Mikhail Zhurbenko (Senior Researcher, Komarov Botanical Institute Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia), as well as Anastasya Knorre (Director for Science) and Altyna Dutbaeva (Botanist) both at “Stolby” National Wildlife Nature Reserve (Krasnoyarsk, Siberia, Russia) for the field assistance in Russia; Air Saguenay pilot Jacques Bérubé and the team at Lac Margane for the sampling in northern Québec, Canada, as well as the Société des établissements de plein air du Québec (SEPAQ) Fjord du Saguenay, especially Yana Desautels and Nathaël Bergeron and the team at Baie Sainte Marguerite for the sampling in southern Québec, Canada; members of the Lutzoni lab: Bernie Ball, Emilie Lefèvre, and the Arnold lab (University of Arizona): A. Elizabeth Arnold and Kayla Arendt for the field assistance in Québec. The sampling of the lichen specimens for this project was done with the financial support of the National Science foundation through a Dimensions of Biodiversity award DEB-1046065 to FL and a REVSYS award on the genus *Peltigera* DEB-1025930 to JM and FL. This work was supported by the Canadian Research Chair in terrestrial biogeochemistry and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada through a Discovery grant.

4.3. Synthèse de l'article

Les résultats de cet article montrent que les nutriments sont finement régulés au sein de la symbiose lichénique. Ainsi, le Mg se retrouve en plus grande concentration à la surface du thalle et dans l'algue, en cohérence avec son rôle dans la photosynthèse. Le Mo se retrouve lui enrichi dans les cephalodia, siège de la fixation d'azote. Le Pb est retrouvé uniquement à la surface du thalle, et pénètre très peu à l'intérieur des organismes, ce qui est cohérent pour un métal sans rôle biologique et potentiellement toxique. Plus intéressant, le V se retrouve plus concentré dans les cephalodia, similairement au molybdène. De plus, nos données montrent que cet enrichissement est le fait d'un processus biologique actif. L'homéostasie du V caractérisée chez des spécimens collectés le long d'un gradient naturel d'exposition est comparable à celle d'*Anabaena variabilis*, cyanobactérie proche du cyanobionte de *Peltigera aphthosa* et qui possède la V nitrogénase.

En conclusion, cette étude nous a permis de valider notre méthode de caractérisation, ainsi que notre hypothèse sur la gestion des micronutriments au sein de la symbiose lichénique en relation avec les besoins métaboliques de chaque symbionte. Plus important, nous avons démontré que la localisation et la gestion du V au sein du lichen *P. aphthosa* est caractéristique de celle d'un micronutriment essentiel à la fixation d'azote. Ce résultat montre que le lichen possède les ressources en micronutriments nécessaires pour soutenir une fixation biologique de l'azote supporté par le V. Néanmoins, aucune preuve directe de la fixation d'azote alternative n'a été encore apportée. Nous allons approfondir cette caractérisation dans le chapitre suivant.

CHAPITRE 5. MISE EN ÉVIDENCE D'UNE ACTIVITÉ DE LA NITROGÉNASE AU VANADIUM DANS LES ÉCOSYSTÈMES NATURELS.

5.1. Notes préliminaires

L'article présenté dans ce chapitre n'a pas encore été soumis pour des raisons de stratégie de publication. Il sera soumis au journal *New Phytologist* courant 2015.

Des modifications ont été apportées à cette partie sur recommandation des membres du jury avant le dépôt final. Seule la responsabilité de l'étudiant est engagée dans les modifications effectuées.

5.1.1. Auteur et affiliations

Romain Darnajoux¹, Xinning Zhang², Darcy L. McRose², Jolanta Miadlikowska³, François Lutzoni³, Anne M. L. Kraepiel², Jean-Philippe Bellenger^{1*}

¹Centre Sève, Département de chimie, Université de Sherbrooke, J1K 2R1, Qc, Canada

² Department of Geosciences, Princeton University, Princeton, NJ, USA

³Department of Biology, Duke University, Box 90338, Durham, NC 27708-0338, USA

5.1.2. Introduction de l'article

Nous venons préalablement de démontrer dans les deux précédents chapitres que le lichen *Peltigera aphthosa* s.l. était un très bon modèle pour tenter de mettre en évidence la présence

d'une activité des Nases alternatives dans les écosystèmes terrestres. Après avoir caractérisé la présence d'une homéostasie du V au sein du cyanolichen tripartite *P. aphthosa*, nous allons, dans le prochain article, chercher à étendre les résultats obtenus à l'ensemble du biome boréal. Nous chercherons ainsi à vérifier si le vanadium est toujours enrichi dans le cephalodia de *P. aphthosa*, mais également, grâce à un plus grand nombre d'échantillons provenant de sites géographiques variés et où la déposition atmosphérique en métaux est plus contrastée, nous allons chercher à mettre en évidence les facteurs qui influencent l'homéostasie du V au sein de la symbiose tripartite.

5.1.3. Participation de chaque auteur

JPB et RD ont conçu l'étude sur l'homéostasie des lichens, et AMK a conçu l'étude sur ISARA. FL, JM, JPB et RD ont collecté les lichens, FL et JM ont identifié les lichens, RD a effectué toutes les expériences et toutes les analyses en dehors des analyses ISARA, réalisées par XZ, et des analyses génétiques, réalisées par DM. RD a rédigé la première version de l'article. Tous les auteurs ont commenté et modifié les versions successives.

5.2. Alternative nitrogenases contribute to biological nitrogen fixation in boreal cyanolichens

5.2.1. Abstract

In recent years, cryptogamic species have attracted the attention of biogeochemists, essentially due to their roles in the nitrogen cycle through symbiotic and asymbiotic biological fixation of Nitrogen (BNF). Mo, an essential biometal for BNF, is often reported as limiting BNF, and therefore primary production in various ecosystems from tropical to temperate forests. Meanwhile, alternative nitrogenases, relying on more abundant crustal elements such as V or Fe¹³, have been the subject of an increasing number of studies, suggesting they might play a more predominant role in natural ecosystems than previously perceived. Here we studied the metal homeostasis of a nitrogen-fixing boreal cyanolichen, *Peltigera aphthosa* (L.) Willt. s.l., collected from multiple sites of the circumboreal belt. We found that not only the genes for alternative V-based nitrogenase are present among these lichens, but that this nitrogenase is used, and may account for a substantial participation in the total fixation of N by this cyanolichen. We also decipher the regulation of V inside the nitrogen fixing part of the thallus, as being driven by the abundance of Mo. This finding raises questions about the relevance of the Mo-only based models to predict N budgets in various ecosystems, and associated methodologies currently used.

5.2.2. Introduction:

The boreal biome covers 17% of land on the planet and stores more carbon than tropical and temperate forests combined.²⁷ Nitrogen (N) is the most frequently reported limiting nutrient for primary production in boreal forests.² Over the course of the next century, boreal forests will undergo changes at an unprecedented rate due to global climate change.⁵⁵ The availability of N to plants is expected to play a critical role in the response of boreal forests to global climate change.^{68,221,222} Despite its prime importance to boreal ecosystem functions, our understanding of the biogeochemical cycling of N remains incomplete, and closing the N budget remains

challenging. Biological nitrogen fixation (BNF) by cyanobacteria associated with bryophytes and other cryptogamic species is a critical source of new N to unmanaged boreal ecosystems.³⁰ Biological nitrogen fixation is catalyzed by the enzyme nitrogenase (Nase). Three iso-enzymes of the Nase have been identified so far;¹² the canonical molybdenum (Mo)-Nase and two Mo independent isozymes, i.e. the vanadium (V) dependant Nase (V-Nase) and the iron (Fe)-only Nase (Fe-Nase). The contribution of alternative Nases to N input in natural habitats is currently unknown. However, recent findings suggest that alternative N₂ fixation might make a larger contribution to BNF than previously reported. Several studies covering a wide range of ecosystems, from tropical to cold temperate, have reported limitation of BNF by Mo.^{14,15,17} V is roughly 50-200 times more abundant than Mo in the earth crust¹³ and might thus represent a suitable alternative to sustain BNF in Mo limited environments. This is consistent with several studies reporting the presence of the genes coding for alternative Nases in a wide range of biomes⁹ and cyanobacteria, including *Nostoc* spp. of cyanolichens.¹⁰ Another report, based on an exhaustive analysis of published acetylene reduction to ¹⁵N incorporation conversion ratio concluded that both Mo-Nase and alternative Nases (V- and Fe-Nase) likely contribute to BNF in soils.⁸⁵ Finally, a recent study on metal homeostasis in the ubiquitous trimembered cyanolichen *Peltigera aphthosa* (L.) Willd. *sensu lato* (s.l.). also suggested that V very likely plays a significant role in BNF by boreal cyanolichens.²²³

While evidence suggests that alternative Nases are widespread and active in a wide range of ecosystems, the definitive demonstration of the importance of alternative Nase remains to be done. This goal is now within reach because new methods allow the assessment of the activity of alternative Nases in environmental samples. In 2014, Zhang et al.⁸⁸ demonstrated that alternative nitrogen fixation produces organic matter with lower $\delta^{15}\text{N}$ (¹⁵N isotopic fractionation for Mo-Nase is $\sim -2\%$, than for alternative Nases ~ -6 to -7%). More recently another isotope fractionation-based technique (ISARA) has been developed to efficiently and reliably assess alternative Nase activity in environmental samples.²²⁴

In this study, we used these new tools, together with more conventional approaches, in order to provide a complete set of evidence on the contribution of alternative Nases to BNF in boreal ecosystems using cyanolichens (*P. aphthosa* s.l.). We also discuss the significance of these findings on the reliability of current BNF estimates reported in the literature. We conclude that alternative Nases may be important contributors to N inputs in boreal ecosystems, which invites a reevaluation of current BNF estimates.

5.2.3. Materials and Methods

5.2.3.1. Samples collection.

Specimens of *Peltigera aphthosa* s.l. were collected from a 365 year old chronosequence in Sweden (September 2013, August 2014, n=20, (details of the chronosequence can be found in Zackrisson *et al.*⁵¹ and in Alberta (Wood Buffalo National Park, August 2013, n=6). Data from samples in Northern Québec, Alaska (Fairbanks), Russia (Stolby Reserve, Krasnoyarsk) and Fjord du Saguenay (n=27, 5, 6 and 9 respectively)²²³ were also used in statistical analyses. All thalli were manually cleaned for foreign materials (bryophytes and leaves) with forceps and then kept dry in opaque paper bags at room temperature until further processing.

5.2.3.2. Thallus washing procedure.

Lichens were washed to remove metals present at the surface of the thallus (non-specific absorption sites and particles), following the methodology described in Darnajoux *et al.*, 2014.²²³

5.2.3.3. Separation of the symbionts.

Algae and cephalodia were separated from the thallus of *P. aphthosa* s.l. according to Darnajoux *et al.*, 2014.²²³

5.2.3.4. Elemental analysis.

Elemental determination for unwashed thallus, washed thallus, algae and cephalodia were performed as in Darnajoux et al, 2014.²²³ Metal contents are reported either in $\text{mol}_{\text{metal}} \cdot \text{mol}_{\text{P}}^{-1}$ or in $\mu\text{g}_{\text{metal}} \cdot \text{g}_{\text{thallus}}^{-1}$.

5.2.3.5. $\delta^{15}\text{N}$ experiments.

Whole dissected cephalodia and Milli-Q-washed grounded lichen thalli were analysed for their $\delta^{15}\text{N}$ at the “Laboratoire d’analyses des isotopes stables et légers du GEOTOP-UQAM”. Data are expressed as ‰ vs AIR ($\pm 0.2\text{‰}$ for 1σ).

5.2.3.6. ISARA.

Samples from Sweden, collected two months prior to the analysis were sprayed with deionised water, then left to acclimate at 10°C in a orbital shaker (Infors HT multitron pro), with 12/12 light/dark hours for at least 5 days, with regular spraying (every 2 days) to maintain optimal humidity of the sample. Samples were then incubated in 250 mL Mason jars, with 10% headspace removed and replace by acetylene produced from the reaction of CaCl_2 (Acros Organic, New Jersey, USA) and water. Blanks of acetylene were sampled for each batch of acetylene. Lichens were left for one to six days under 12/12 light/dark hours at 10°C , with regular sampling of the headspace. Ethylene production was measured as in Jean *et al*, 2013¹⁷ All gas samples were then sent for ISotopic Acetylene Reduction Assay (ISARA) analyses at Princeton University (for detail on the method, see Zhang et al.²²⁴under review).

Results are presented as ^{13}C fractionation of acetylene reduction to ethylene ($^{13}\epsilon_{\text{AR}}$ (‰) = $\delta^{13}\text{C}_{\text{acetylene}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{ethylene}}$, at low ethylene yield) and as percentage of alternative BNF, calculated as fraction of alternative fixation in ARA corrected with $\text{C}_2\text{H}_4:\text{N}_2$ R values ($R_{\text{M}_0}=3$, $R_{\text{V}}=1$). Calculation details can be found in Annexe 3 - 3.1. Supplementary methods and in Zhang et al. under review.²²⁴

5.2.3.7. *Statistical analysis.*

Data for regression and multivariate discriminate analysis were log transformed in order to avoid spurious correlation or to achieve normality. Canonical Discriminant Analysis (CDA) was performed using R software version 3.1.2 (Rstudio 0.98.501, package FactoMineR 1.24, Candisc 0.6-5, and Nortest 1.0-2)¹⁸⁷ and Linear Discriminant Analysis (LDA) using TANAGRA software (version 1.4.48)¹⁷⁶. All regressions were performed with R using a linear model (lm, Stat 3.1.2), with selection of variables based first on the significance of regression ANOVA (function Anova, Car 2.0-22) then on the minimization of the Akaike Information Criterion (AIC). All residues were tested for normality. Figures were drawn either using R or Sigmaplot 11.2.0.5 (Systat Software).

5.2.4. Results and discussion

5.2.4.1. *Contribution of V-Nase to BNF in boreal ecosystems*

Recently, a study on metal homeostasis in cyanolichens collected in pristine areas in northern Québec (Canada)²²⁵ showed that V presents all the characteristic of a metal of biological importance for BNF.²²³ In order to evaluate the importance of V for BNF across diverse boreal ecosystems, we analyzed the metal contents of 63 specimens of *P. aphthosa* s.l. collected in boreal forests in pristine areas (Alberta and Québec), low contamination area (Sweden) and higher contamination areas (Alaska and Russia) (Annexe 3 - 3.1 - Fig. S1 A). As expected, discriminant analysis identified Mo and Fe as discriminators for the cephalodia, the biological structure enclosing the N₂-fixing cyanobacteria in the cyanolichen, (Figure 27A-B). This is concordant with Nase being an important Fe and Mo reservoir in N₂ fixers. More interestingly, discriminant analysis identified also V as a discriminator for the cephalodia.

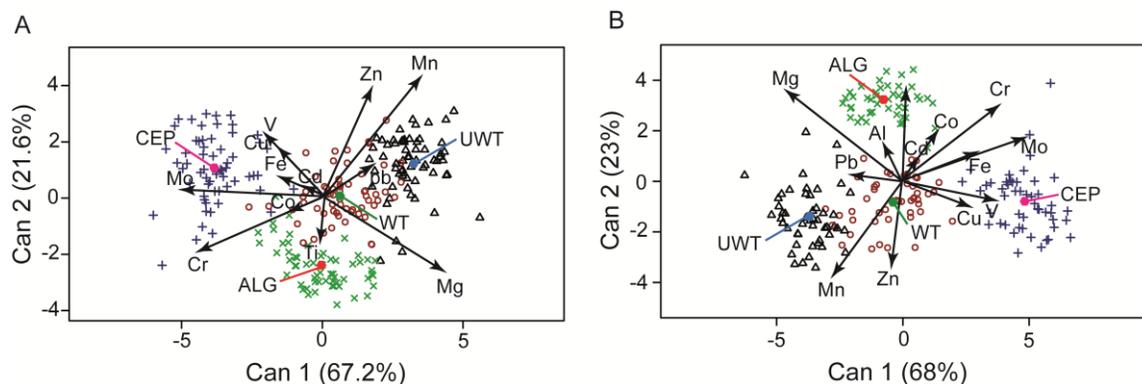


Figure 27. Metals in cyanolichens.

(A) Canonical Discriminant Analysis of all thallus of *P.aphthosa* with regard to compartment in all samples, (B) low metal exposure area only (see Sup. Info Fig. S1A) UWT: Unwashed Thallus, WT: Oxalate-EDTA Washed Thallus, ALG: Algae, CEP: Cephalodia. All data in $\text{mol}_{\text{metal}} \cdot \text{mol}_{\text{P}}^{-1}$ were log-transform prior to the analysis.

It is worth noting that analyses lead to similar conclusions whether highly contaminated sites are included or not (compared Figure 27A and Figure 27B).

Unfortunately, a similar approach cannot be used to address the potential role of the Fe-only nitrogenase in cyanolichens. Contrary to V, Fe is required in large amount for many enzymatic processes including the Nase. All nitrogenases contain a minimum of 26 Fe atoms.^{109,226} The Fe-only nitrogenase only requires 2 additional atoms per Nase protein. Thus, the effect of Fe-Nase on cellular Fe homeostasis is too small to be efficiently monitored. Nonetheless, these metal homeostasis data strongly suggest that V is accumulated in the cephalodia possibly for use in the alternative V-Nase.²²³

In order to confirm these observations we took advantage of the new method ISARA²²⁴ to determine whether or not alternative Nases are actually active in cyanolichen samples. We use six freshly collected *P. aphthosa* s.l. samples from northern Sweden characterized by low to moderate metal and N depositions⁶ (Annexe 3 - 3.1 - Fig. S1 A). Results show that $^{13}\epsilon_{\text{AR}}$ of most cyanolichens tested are lower than what can be expected for Mo-only Nase activity.

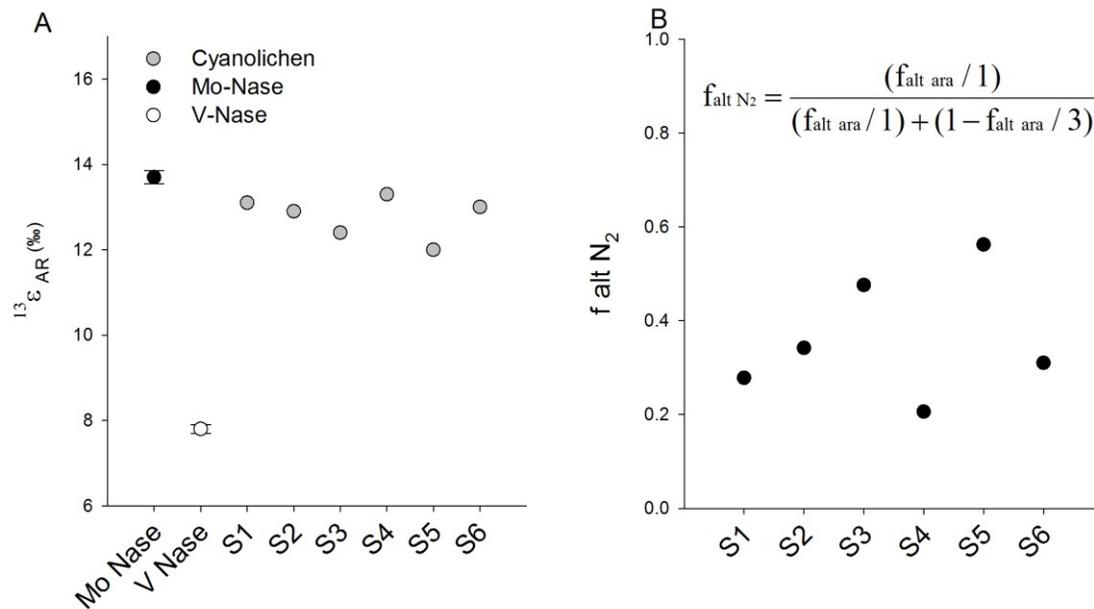


Figure 28. Nase utilization in cyanolichens collected along a 365 year old chronosequence based on ISARA analysis.

(A) $^{13}\epsilon_{AR}$ data for Mo-Nase only (black), V-Nase only (white) from pure culture, and cyanolichen (grey dot, samples (S) 1-6). B) Estimated percentage of alternative BNF for cyanolichens (more details on calculation can be found here²²⁴ and in Annexe 3 - Sup. Methods). The presence of *vnfD* genes was confirmed in samples from sites 3 and 4. BLASTN searches to GenBank (April 2015) showed highest identity to sequences from lichens deposited by Hodkinson *et al.*, 2014¹⁰ (Accessions: KF662359, KF662360, KF662361, KF662362).

Estimated percentage of alternative BNF,²²⁴ Annexe 3 - 3.1. Supplementary methods) show that alternative Nases contribute to BNF in most samples from the Swedish chronosequence, which is consistent with V accumulation in the cephalodia (~ 20-60 %, Figure 28 and Zhang *et al.* under review²²⁴).

5.2.4.2. Conditions under which V Nase are used

While genomic,¹⁰ V homeostasis²²³ (see also this work) and ISARA data²²⁴ (see also Figure 28) clearly established that alternative Nases, at least the V-Nase, are present and active in boreal cyanolichens, the conditions under which V-Nase might be used in natural habitats remains to be fully characterized.

5.2.4.2.1. The role of Mo availability:

Metal availability, especially Mo, is likely to be an important factor affecting Nase activity and thus V accumulation in boreal N₂-fixers. In order to address this question, we focused on *P. aphthosa* s.l. samples collected along a fire chronosequence in Sweden. Lichens samples collected along this ~ 400 years chronosequence are exposed to contrasting levels of metal deposition (with Mo and V covarying) as illustrated by the data collected for unwashed thalli (Figure 29A). Mo and V contents in the washed thallus and the algal layer follow similar trends as unwashed thalli (Compare Figure 29A with Figure 29B and Figure 29C), suggesting that Mo and V abundances in washed thallus and alga primarily reflect metal depositions. Mo content in the cephalodia also followed the same trend as metal deposition. However, V concentrations in cephalodia follow an opposite trend as Mo and is low when V deposition is high (Figure 29D). This clearly suggests that V accumulation in the cephalodia is directly related to Mo abundance in cephalodia (Figure 29E) rather than V deposition; V seems to be accumulated in the cephalodia when Mo availability is low. Interestingly, V is always present in cephalodia even when Mo is high (minimum 30% of Mo).

These observations made on samples from the Swedish chronosequence can be generalized to the whole boreal area by further analyzing Mo and V contents in unwashed thallus (in $\mu\text{g}_{\text{metal}} \cdot \text{g}_{\text{thallus}}^{-1}$) and cephalodia (in $\text{mol}_{\text{metal}} \cdot \text{mol}_{\text{P}}^{-1}$) in all samples collected in pristine and low metal contamination sites (n = 58). Samples from Alaska and Russia were not considered since they are characterized by higher metal deposition that can interfere with natural metal management (homeostasis) (Annexe 3 - 3.1 - Fig 1). As shown in Figure 30A, Mo cellular quotas, expressed as Mo:P ratio,²⁶ in cephalodia are positively correlated to Mo exposures (Mo

content in unwashed thallus). This strongly suggests that Mo deposition mostly controls Mo concentrations in cephalodia, leading to Mo availability limiting BNF in low Mo deposition sites, which is consistent with several studies.^{14,15,17}

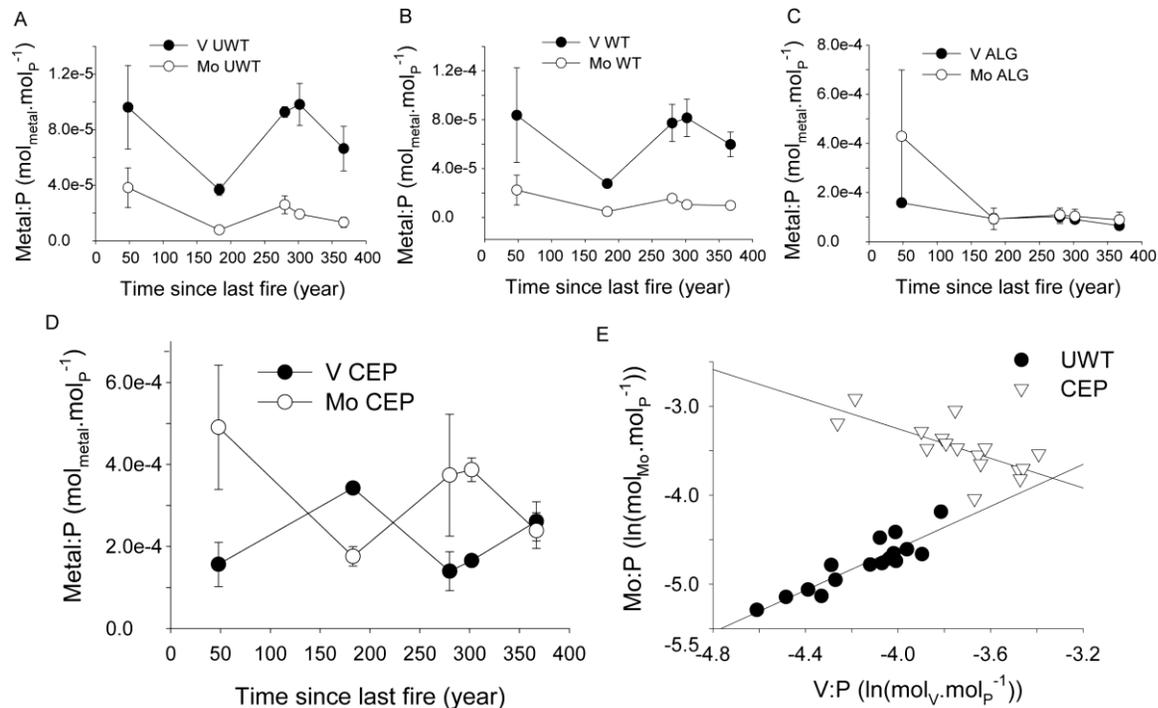


Figure 29. Nase metal cofactors in cyanolichens collected along a 365-year chronosequence.

Mo and V content averaged per sites in (A) unwashed thallus (UWT), (B) washed thallus (WT), (C) Algae (ALG), (D) Cephalodia (CEP). (E) Linear regression of Mo:P ratio versus V:P ratio in cephalodia (open symbol) and unwashed thallus (closed symbol) for individual cephalodium. Data were log transform to avoid spurious correlation. Error bars are standard error.

Interestingly, V:P ratios in the cephalodia are not correlated to V exposures (Figure 30B). In accordance with the Swedish samples showing a negative correlation between Mo and V in the cephalodia (Figure 29E), we postulated that the V:P ratio in the cephalodia could be primarily controlled by the Mo content in cephalodia (Mo:P). As shown in Figure 30C, Mo:P and V:P ratio are correlated in cephalodia (quadratic correlation). For Mo:P ratios lower than $1-2 \times 10^{-4}$

$\text{mol}_{\text{Mo}}.\text{mol}_{\text{P}}^{-1}$, Mo and V are positively correlated, reflecting correlation in metal exposure for both metals (UWT, Annexe 3 - 3.1 - Fig. S1B). We hypothesize that metal deposition in these sites is so scarce that cyanolichens use any available metal (Mo or V) to sustain BNF. For Mo concentrations in the cephalodia higher than $1-2 \times 10^{-4} \text{ mol}_{\text{Mo}}.\text{mol}_{\text{P}}^{-1}$, V:P ratios start to be negatively correlated to Mo:P ratios, indicating that Mo availability regulates, or at least impacts, V accumulation in cephalodia. Interestingly, the sum of Mo:P and V:P after this threshold is equal to $6 \pm 2 \times 10^{-4} \text{ mol}_{\text{Mo+V}}.\text{mol}_{\text{P}}^{-1}$, which is close to the optimum Mo and V requirements to sustain N_2 fixation in various N_2 fixers, including cyanobacteria.^{26,223} This further suggests that this co-regulated Mo and V homeostasis is directly related to N_2 fixation. Thus, our data strongly suggest that Mo availability is an important factor controlling the contribution of V to BNF in boreal cyanolichens. Further laboratory and field experiments and measurements are required to fully characterize the role of Mo availability on V acquisition and use in cyanolichens.

While Mo availability significantly impact V acquisition, we evaluated whether or not these variations in Mo:V abundance in the cephalodia has an impact on the contribution of alternative Nase to BNF. As reported by Zhang *et al.*, 2014⁸⁸ N fractionation can be used to evaluate the contribution of alternative Nase ($\delta^{15}\text{N} \sim -6-8\%$) versus Mo Nase ($\delta^{15}\text{N} \sim -2\%$). Variations in $\delta^{15}\text{N}$ in cyanolichens from the Sweden chronosequence are consistent with metal content measured in the cephalodia (compare Figure 31A and B). $\delta^{15}\text{N}$ significantly decreases when V concentration in the cephalodia increases which is consistent with a higher contribution of alternative Nase. Thus, while ISARA data clearly established that alternative Nase are active in samples from the chronosequence, $\delta^{15}\text{N}$ data suggest that alternative Nases might contribute to a greater extent to BNF in Mo limited sites, although N deposition could also contribute to variations in the $\delta^{15}\text{N}$ data.

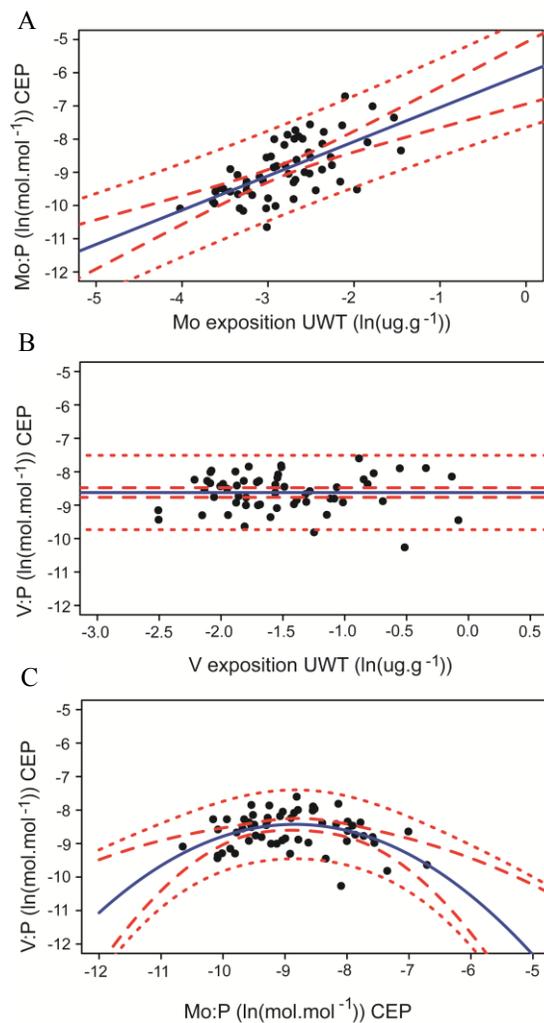


Figure 30. Linear regression of Mo and V in nitrogen fixing part, i.e., cephalodia (CEP) of lichen thallus in non-heavily contaminated sites of the boreal biome.

All data were log-transformed to achieve normality of residues and to avoid spurious correlation. (A) Mo:P ($\text{mol}_{\text{Mo}}.\text{mol}_{\text{P}}^{-1}$) in cephalodia as a function of Mo exposure ($\mu\text{g}_{\text{Mo}}.\text{g}_{\text{thallus}}^{-1}$) (B) V:P ($\text{mol}_{\text{V}}.\text{mol}_{\text{P}}^{-1}$) in cephalodia as a function of V exposure ($\mu\text{g}_{\text{V}}.\text{g}_{\text{thallus}}^{-1}$) (C) V:P ($\text{mol}_{\text{V}}.\text{mol}_{\text{P}}^{-1}$) in cephalodia as a function of Mo:P in cephalodia ($\text{mol}_{\text{Mo}}.\text{mol}_{\text{P}}^{-1}$). Blue lines represent model values, em dash represent 95% confidence area, and en dash represent 95% prediction area for the regression. A and B show linear regression model. C shows quadratic regression model. Detail on regression can be found in Sup. Info Fig

Nonetheless our data show that Mo availability is a primary factor influencing V concentration in the cephalodia in these cyanolichens. ISARA results and $\delta^{15}\text{N}$ data are also consistent and suggest that alternative Nases are not only active in short-term lab experiments (ISARA data) but are also likely to contribute to BNF by these cyanolichens during their entire lifetime ($\delta^{15}\text{N}$ data).

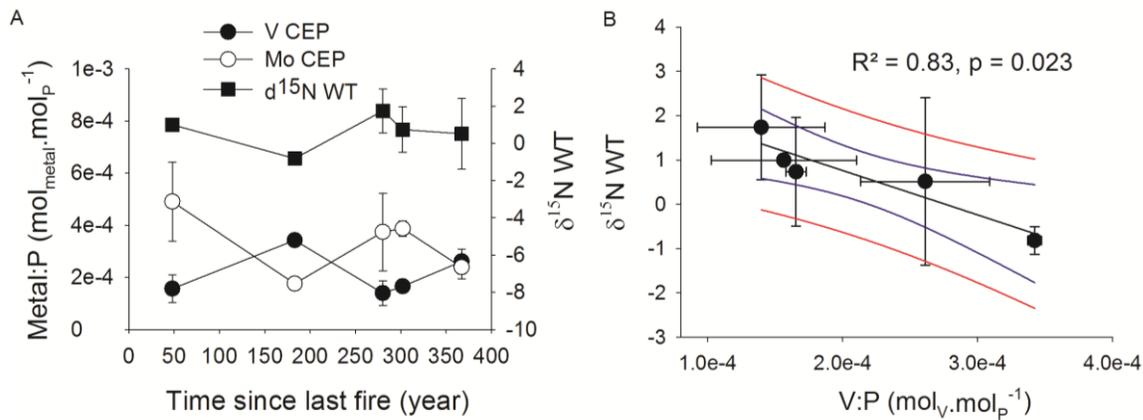


Figure 31. Nase metal cofactors in cyanolichens collected along a 365 years chronosequence.

(A) $\delta^{15}\text{N}$ of washed thallus (WT); (B) Regression of $\delta^{15}\text{N}$ in washed thallus versus V content in cephalodia (CEP, mol_{metal}.mol_P⁻¹). Data are average for chronosequence sites. Error bars are standart error. In B, black line represents model values, blue lines represent 95% confidence intervals and red lines represent 95% prediction interavals.

5.2.4.2.2. Omnipresence of V in cephalodia:

While Mo is found at contrasting level in the cephalodia, V is always found at around the same values, even when Mo is highly present. Mo is known to repress the genes of V-Nase, so it is surprising to find V and Mo together in cyanobacteria. However, at low temperature (<14°C) the repression of V-Nase genes by Mo disappears.¹⁹ Moreover, experiments on purified enzymes have demonstrated that the activity of the V-Nase is less affected by low temperature than the Mo-Nase.²¹ Thus, temperature is clearly a factor that can favor alternative Nases in boreal ecosystems This factor contributes to explain the occurrence of V inside cephalodia, even at high

Mo cellular content. The ISARA data (Figure 28) were performed under low temperature (10°C) to avoid possible repression of V-Nase genes by Mo. The significant contribution of alternative Nases to BNF by *P. aphthosa* s.l. in our analysis is coherent with this assumption.

5.2.4.3. *Reevaluation of BNF estimates*

Our results, along with others,²²⁴ show that alternative Nases contribute to BNF in a wide range of ecosystems, which could significantly improve our understanding of BNF in natural habitats. These findings also raise questions regarding the reliability of current BNF estimates. The canonical method used to assess BNF in field samples, i.e. Acetylene Reduction Assay (ARA),⁷⁶ requires the use of a conversion ratio (ARA/N₂) in order to convert ARA data into BNF (N inputs). This ratio can be affected by many factors, such as growth conditions, but primarily by the type of Nase in use; ARA/N₂ = 3:1, 1-2:1 and <1:1 for the Mo-, V- and Fe-only Nases respectively⁸⁵. However, because the calibration of ARA data by ¹⁵N incorporation experiments is problematic for most environmental samples the theoretical Mo-Nase conversion ratio of ARA/N₂ = 3, is often assumed. A survey of more than 40 reports on BNF by cryptogamic covers⁴⁸ highlights that ARA/¹⁵N conversion ratios were effectively measured in less than half of the studies (Tableau 20, Annexe 3 - 3.1 - Table S1). Another potential bias comes from the experimental determination of ARA/N₂ ratios. Due to low BNF activity, ¹⁵N incorporation data are often acquired under laboratory conditions that are poorly representative of the field (i.e., increased temperature, CO₂ and humidity, Annexe 3 - 3.1 - Table S1). Recent reports on the presence of easily absorbed forms of ¹⁵N in commercial ¹⁵N₂ gas stocks,⁷⁹ further emphasize the importance to interpret past reports on BNF with great cautions. Interestingly, studies that performed both ARA and ¹⁵N incubations in the field on the same samples reveal that soil samples, lichens and mosses are often characterized by heterogeneous ratios characteristic of both the Mo-Nase and alternative Nases.^{85,227,228}

Thus, current BNF estimates include large errors, and the magnitude of these errors remains to be fully determined. However, the assumption of the predominance of Mo-Nase, without the proper validations, could result in a significant underestimation of N inputs (Tableau 21). It is

urgent to deploy more rigorous protocols allowing scientists to convert field measurements of Nase activity into N input estimates. One crucial step is to consider Nase heterogeneity in a more systematic manner by implementing, for instance, new methods and tools allowing better evaluations of the contribution of alternative Nases to BNF (such as ISARA, $\delta^{15}\text{N}$).

Tableau 20. Summary of literature review (Annexe 3 - 3.1 - Table S1) for BNF in cryptogamic cover (soil, moss, lichens, epiphytes).

	Nb of studies	ARA based studies	^{15}N calibration made	% of ^{15}N calibration
Arctic	2	1	0	0
Boreal	9	9	5	56
Continental	6	5	1	17
Temperate	12	12	6	50
Tropical	7	6	3	43
Dry	7	7	1	14
Total	43	40	16	37

5.2.5. Conclusion

Overall our data demonstrate that alternative Nases are not only present in boreal cyanolichens but they are also active and contribute to BNF. It is urgent to better characterize the enzymatic heterogeneity of BNF in various compartments of the boreal forest and other ecosystems in order to re-evaluate BNF estimates.

Tableau 21. Estimation of N fixation ($\mu\text{gN}\cdot\text{glichen}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) when considering Mo-only contribution ($\text{C}_2\text{H}_4\text{:}^{15}\text{N Mo}= 3:1$) or estimation of alternative Nase activity with ISARA ($\text{C}_2\text{H}_4\text{:}^{15}\text{N alt}= 1:1$).

Sample #	C ₂ H ₄ reduction ($\mu\text{molC}_2\text{H}_4\cdot\text{glichen}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)	N fixation		% Error / ISARA estimation
		Mo-only ($\mu\text{gN}\cdot\text{glichen}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)	ISARA ($\mu\text{gN}\cdot\text{glichen}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)	
1	3.5	32	40	23
2	3.4	31	41	30
3	1.6	15	22	46
4	1.7	16	18	16
5	2.2	21	26	26
6	2.1	20	27	34

% Error represents the difference between estimates based on $\text{C}_2\text{H}_4\text{:}^{15}\text{N}_{\text{Mo}}= 3:1$ and $\text{C}_2\text{H}_4\text{:}^{15}\text{N}_{\text{alt}}= 1:1$.

While temperature and Mo availability seem to be important factors controlling Nase heterogeneity, significant work remains to be done to fully understand the conditions under which alternative Nases come into play. It is also critical to re-evaluate the methods by which we assess BNF in the field. Even if well calibrated with ^{15}N incorporation experiments, the Acetylene Reduction Assay is still affected by severe biases that significantly impede the quality and reliability of BNF estimates. It is crucial to develop and implement more reliable approaches to measure BNF in field samples, such as a combination of ARA, ISARA, and $\delta^{15}\text{N}$ that could provide a better view of Nase heterogeneity and thus lead to better BNF estimates. A better characterization of Nase heterogeneity in boreal ecosystems (and others) will significantly improve our understanding of the role of micronutrients on ecosystem function and may also help fill current gaps in N budgets.

5.2.6. Acknowledgments

We want to thank Mikhail Zhurbenko as well as Anastasya Knorre and Altyna Dutbaeva both at “Stolby” National Wildlife Nature Reserve (Krasnoyarsk, Siberia, Russia) for the field assistance in Russia; Air Saguenay pilot Jacques Bérubé and the team at Lac Margane for the sampling in northern Québec, Canada, as well as the Société des établissements de plein air du Québec (SEPAQ) Fjord du Saguenay, ; members of the Lutzoni lab: Bernie Ball, Emilie Lefèvre, and the Arnold lab (University of Arizona): A. Elizabeth Arnold and Kayla Arendt for the field assistance in Québec. We also thank Marie-Charlotte Nilsson-Hegethorn and members of her research team for their support in sample collection in Sweden. The sampling of the lichen specimens for this project was, in part, done with the financial support of the National Science foundation through a Dimensions of Biodiversity award DEB-1046065 to FL and a REVSYS award on the genus *Peltigera* DEB-1025930 to JM and FL. This work was supported by the Canadian Research Chair in terrestrial biogeochemistry and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada through a Discovery grant.

5.3. Synthèse de l'article

Les deux précédents articles nous ont permis de déterminer que la nitrogénase au vanadium est présente et fonctionnelle dans les milieux boréaux. Nous avons également mis en évidence un processus de régulation du vanadium au sein de la symbiose tripartite *Peltigera aphthosa* s.l.; le vanadium est toujours présent au sein des cephalodia à des concentrations similaires à l'optimum biologique et ce, indépendamment de l'exposition que subit le lichen. Dans les milieux où l'exposition en métaux est proche des conditions optimum, comme au sein de la chronoséquence de Suède, le contenu cellulaire en vanadium dans les structures fixatrices d'azote est inversement corrélé à la disponibilité du molybdène pour le lichen. Ce résultat est cohérent avec la notion d'économie biologique; en effet, la gestion d'un métal au sein d'un organisme est très coûteuse en termes d'énergie cellulaire. Ainsi, le lichen va se concentrer sur une seule ressource lui

permettant de remplir la fonction d'acquisition de l'azote. Après avoir établi le rôle de la disponibilité en molybdène sur l'homéostasie du vanadium chez *Peltigera aphthosa*, nous allons dans l'article suivant nous pencher sur le rôle d'un second facteur pouvant favoriser la fixation alternative de l'azote, la température.

CHAPITRE 6. EFFET DE LA TEMPÉRATURE SUR L'ACTIVITÉ DES NITROGÉNASES *IN VIVO*.

6.1. Notes préliminaires

L'article présenté dans ce chapitre a été soumis au journal *Environmental Science and Technology* en 2015.

Des modifications ont été apportées à cette partie sur recommandation des membres du jury avant le dépôt finale. Seule la responsabilité de l'étudiant est engagée dans les modifications effectuées.

6.1.1. Auteurs et affiliations

Romain Darnajoux¹, Jean-Philippe Bellenger^{1*}

¹Centre Sève, Département de chimie, Université de Sherbrooke, J1K 2R1, Qc, Canada

6.1.2. Introduction de l'article

Après avoir déterminé le rôle de la disponibilité en Mo sur la dynamique du V chez les cyanolichens, nous nous sommes concentrés sur un paramètre abiotique potentiellement crucial pour comprendre la régulation des différentes Nases, la température. Cet article est une prolongation des résultats obtenus *in vitro* par Miller et Eady²¹ sur des nitrogénases purifiées. Dans cette étude de 1988, il a été démontré que la V-Nase devenait plus efficace que la Mo-Nase à basse température. Or, ces résultats importants pour la compréhension de la régulation des nitrogénases en milieu naturel n'ont jamais été étendus à des organismes vivants. Est-ce que les conditions réelles d'activité d'une cellule vivante pourraient mener aux mêmes conclusions ?

Afin de répondre à cette question, nous avons profité d'une nouvelle méthode de caractérisation de l'activité des Nases, ARACAS (voir 2.7.2), qui permet un suivi en temps réel de la production d'éthylène lors du test de réduction de l'acétylène, avec une sensibilité 1000 fois plus grande que la méthode conventionnelle d'analyse par CPG. Nous avons ainsi pu étudier comment des changements de température rapides influençaient la fixation d'azote chez *Anabaena varibilis*, une cyanobactérie phylogénétiquement proche du symbionte de *Peltigera aphthosa*, et qui possède la Mo-Nase et la V-Nase. Cette méthode permet de suivre sur un même échantillon au cours du temps l'évolution de l'activité de la nitrogénase, en s'affranchissant ainsi d'une partie de la variabilité biologique intraspécifique.

6.1.3. Participation de chaque auteur

JPB a conçu cette étude. RD a effectué les expériences et le traitement de données. RD a rédigé la première version de l'article. JPB et RD ont commenté et modifié les versions successives.

6.2. Temperature dependency of molybdenum and vanadium nitrogenases activity in *Anabaena variabilis*

6.2.1. Abstract

Biological nitrogen fixation plays an important role in the terrestrial nitrogen cycle and ecosystem function. This reaction is catalyzed by the enzyme nitrogenase for which three isoforms have been described; the canonical molybdenum (Mo)-nitrogenase and two alternative nitrogenases (the vanadium- (V) and iron-nitrogenase). Recent findings have highlighted that the contribution of alternative nitrogenases to N inputs might be more important than previously reported. The conditions under which alternative nitrogenases come into play remains elusive. A study on purified enzymes has demonstrated that the V-nitrogenase is more efficient at low temperature than the canonical Mo-nitrogenase. However those results have never been confirmed *in vivo*. This reflects the limitations of conventional methods to measure nitrogenase activity. Using the new method ARACAS (Acetylene Reduction Assay by Cavity ring-down Absorption Spectroscopy), we investigated the response of the Mo- and V-nitrogenase to temperature in the heterocystous cyanobacteria *Anabaena variabilis* ATCC 29413. Our results confirmed *in vivo* that the V-nitrogenase is more efficient than the Mo-nitrogenase at temperatures lower than $\sim 12^{\circ}\text{C}$. We also report that below 15°C Mo- and V-nitrogenase are characterized by different activation energies. Finally, we discuss the relevance of these findings for the nitrogen cycle in terrestrial ecosystems, especially cold environments.

6.2.2. Introduction:

Nitrogen (N) is an essential element in living organisms. Biological nitrogen fixation (BNF) is the main source of new N into unmanaged ecosystems.² This reaction is catalyzed by a few prokaryotes, such as cyanobacteria. Cyanobacteria are an essential part of the N global cycle. In terrestrial ecosystems, they are found in free-living state, in cyanobacterial mats and crust, as well as in different degree of associations, from the cyanobacterial-bryophyte associations to fully symbiotic associations with fungi and/or algae in lichens.⁴⁵ Together, those cryptogamic covers are thought to account for up to 46% of BNF inputs in terrestrial ecosystems⁴⁸ and play a particularly important role in boreal forest biomes.^{30,48}

BNF is supported by the enzyme nitrogenase (Nase), which catalyzes the reduction of atmospheric N_2 to bioavailable ammonia (NH_3). Three isoforms of the Nase have been characterized so far;¹² the canonical molybdenum dependent Nase (Mo-Nase) and two Mo independent isozymes, i.e. the vanadium (V) dependent Nase (V-Nase) and the iron (Fe) only Nase (Fe-Nase). The Mo-Nase has the highest specific activity of all Nases at room temperature and the activation of the genes coding for the Mo independent Nases is controlled by Mo availability.¹⁸ While the Mo-Nase is found in all N_2 fixers, Mo independent Nases have been reported only in few of them and are absent in N_2 fixers forming symbioses with higher plants. Thus the Mo-Nase has often been considered the only relevant Nase in natural ecosystems. Recent studies have challenged this traditional view; Mo limitation of BNF is now well documented worldwide¹⁴⁻¹⁷ and the presence of the genes coding for the Mo independent Nases have been found in many environmental samples from tropical to boreal ecosystems.^{9,10} In natural ecosystems, where Mo is a very scarce resource, Mo independent Nases likely play an important role that has been mostly overlooked so far. Indeed, the importance and activity of Mo independent Nases in terrestrial ecosystems has been highlighted in several recent reports.^{85,223} While the importance of considering Mo independent Nases is gaining increasing interest within the scientific community, the conditions under which Mo independent Nases come at play in natural ecosystems remain elusive.

One peculiar characteristic of the V-Nase, described on purified enzymes from *Azotobacter chroococcum* in 1988,²¹ is that the efficiency of the V-Nase is less diminished by low temperature than the one of Mo-Nase. This *in vitro* study even showed that below 7°C the V-Nase becomes more efficient than the Mo-Nase to reduce N₂. Another study by Walmsley and Kennedy¹⁹ also showed that under low temperature (< 14 °C) the activation of Mo independent Nases is no longer controlled by Mo availability. This is particularly interesting considering that the average annual temperature on earth is around 14°C. Thus, Mo independent Nases could play an important role on BNF worldwide but particularly in low temperature ecosystems (i.e. boreal and arctic).

However, these findings on the effect of temperature on the relative efficiency of the Nases, made on purified enzymes, have never been extended to living organisms. This likely reflects the difficulty to study the effect of temperature on Nase activity using traditional N fixation measurement methods. Here, we used the high resolution and real-time capabilities of the newly developed method ARACAS^{122,172} to study the *in vivo* effect of temperature (from 3°C to 40°C) on the activity of the Mo-Nase and V-Nase in the cyanobacteria *Anabaena variabilis* ATCC 29413. Our results confirm the findings made by Miller and Eady on purified enzymes. The V-Nase is significantly less affected by low temperatures than the Mo-Nase. At temperature lower than ~12°C the V-Nase may achieve similar and even higher activity than the Mo-Nase. Not only these results extend previous observations made on purified enzymes to living cells, it also strongly questions the traditional view that the Mo-Nase is more efficient than Mo independent Nases. These findings invite to reconsider the importance of Mo independent Nases in natural habitats especially in high latitude ecosystems.

6.2.3. Materials and Methods

6.2.3.1. Culture conditions.

Specimens of *Anabaena variabilis* ATCC 29413 were grown in 8th fold dilution of Allen and Arnon media containing 10⁻⁷ M of either Mo or V (supplied as Na₂MoO₄ and NaVO₃). Mo and V

concentrations in the media were analyzed by ICP-MS to insure that media are truly Mo-only and V-only ($[Mo] < 4.10^{-10} M$, $[V] < 1.10^{-10} M$). Cells were grown for several generations (~15) in a Mo or V free medium in order to deplete possible intracellular stocks of Mo and V. Growth was followed by measuring optical density (OD) at $\lambda = 720$ nm. For the experiments, cultures were sampled in linear phase at $OD_{720} = 0.5-0.8$. Mo and V cellular contents were measured by ICP-MS as described in Darnajoux *et al.* 2014,²²³ after the experiment in order to verify that no Mo was present in cell under V-only conditions ($Mo:P < 1.5.10^{-5} mol_{Mo}.mol_P^{-1}$ and $V:P = 2.4.10^{-4} mol_V.mol_P^{-1}$).

6.2.3.2. ARACAS settings.

The ARACAS equipment was set according to Jean *et al.* 2013.¹²² 5 to 10 ml of culture was transferred in a 550 ml glass vessel disposed inside a temperature regulated water bath, with magnetic stirring and under constant illumination. Temperature was monitored with a HOBO TidBit v2 (UTBI-001) data logger. Cross calibration of vessel (inside) and water bath temperature show less than 1°C deviation in temperature value and less than 15 minutes of lag time (Sup. Info. Figure S1 and S2). The vessel was closed with vacuum grease, and 55 ml of air was replaced by 100% acetylene produced from the reaction of calcium carbide (Acros Organic, New Jersey, USA) and water. During experiments, temperature was changed every 50 minutes, or when ethylene production was stable enough to derive reduction rates (see Figure 1). Experiments were carried out for 10 to 15h. Figure 2 represents three independent experiments with different temperature point for each metal. Rates were smoothed using 200 points moving average of the derivative of ethylene with time. Our determination represented the average of the values during plateau, i.e. at steady state, and error bars represents standart deviation. Data for each sample were normalized on the activity of the same sample at 22.5°C.

6.2.4. Results and discussions

6.2.4.1. Fast response of Nase activity to temperature variations:

Results show that temperature is a major factor influencing nitrogenase activity. This is in accordance with several reports on purified enzymes and environmental samples.^{21,122} As shown in Figure 32 and previously described by Jean et al,¹²² the response of Nase activity (acetylene reduction) to decreasing temperature is very rapid. After stabilization of the temperature, Nase activity reached a new equilibrium within less than 20 minutes. This significantly simplifies the characterization of Nase dependency to temperature.

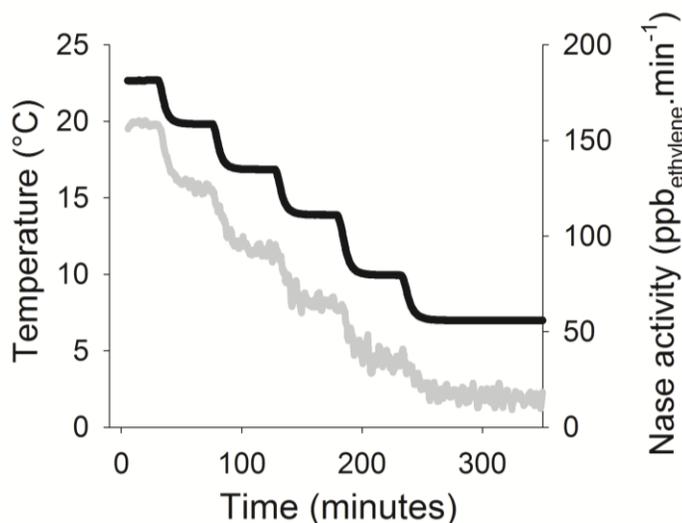


Figure 32. Ethylene production rates by *Anabaena variabilis* as a function of temperature measured by ARACAS.

Time response for ethylene production rate (grey line) with respect to temperature (black line).

Traditional methods for N fixation assessment, such as ARA coupled to GC-FID,⁷⁶ achieve poor time resolution as several hours of incubation are often required to measure acetylene reduction rates. Under such conditions one has to perform multiple experiments at different temperatures to characterise the *in vivo* dependency of Nase to temperature. This generally requires the use of

multiple separate cultures, and large amount of replicates are required at each temperature tested in order to overcome biological variability.

With ARACAS, Nase activity can be recorded at many temperatures in a short amount of time using the same culture, meaning the same pool of intracellular Nase. This significantly reduces the amount of replicates required.

6.2.4.2. Impact of temperature on Mo-Nase and V-Nase activity:

The effect of temperature on Nase activity is similar for both Mo-Nase and V-Nase for temperatures ranging from around 15°C to 40°C (Figure 33). Relative activity is increased by ~5 folds between 15 and 40°C for both Mo-Nase and V-Nase. The high acetylene reduction rates measured at high temperature (> 35°C) are in accordance with the known tolerance of *Anabaena variabilis* ATCC 29713 to high temperatures.¹¹³

However, at temperature lower than 15°C, Mo- and V- based Nases showed contrasting responses to decreasing temperature. The relative activity of the V-Nase is less affected by decreasing temperature than the one of the Mo-Nase (see insert Figure 33). At 7°C, the Mo-Nase activity is only 4% of the activity measured at 22.5°C, while it is 10% for the V-Nase. These results are concordant with results obtained on purified Mo and V Nases from *Azotobacter chroococcum* by Miller and Eady²¹ where V-Nase was shown to be more efficient at reducing N₂ at low temperature than the Mo-Nase (Annexe 4 - 4.1 - Figure S3A).

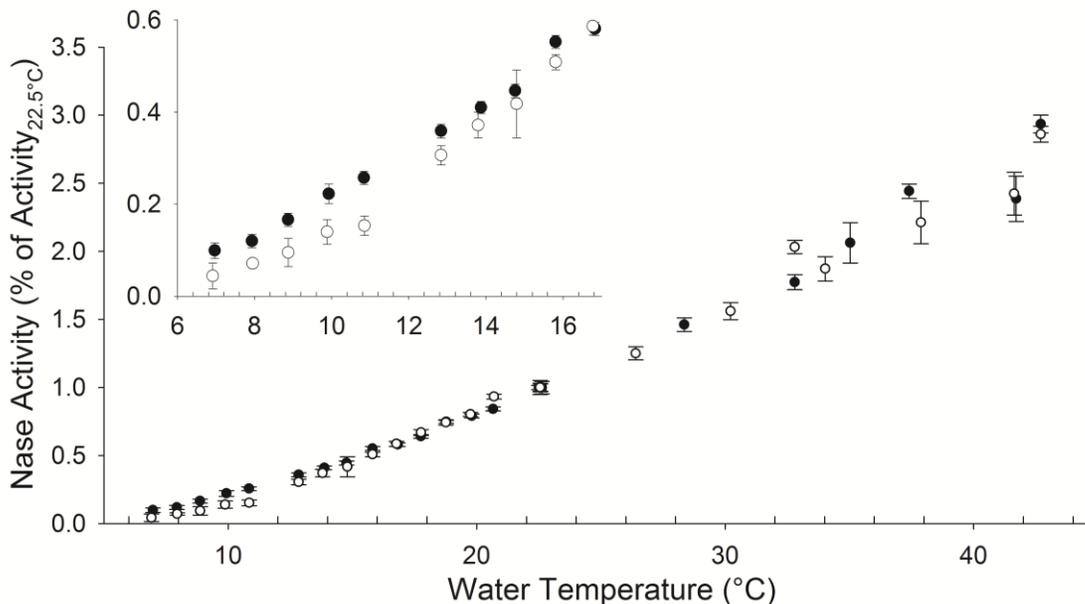


Figure 33. Temperature dependency of acetylene reduction for Mo-grown (white circle) and V-grown cultures (black circle).

Each curve combines data from four independent cultures of *Anabaena variabilis*.
 Insert: Close up for low temperatures 6-17°C. Error bars represents the standard deviation of the value for each temperature at steady state.

6.2.4.3. Activation energy of Mo and V Nitrogenases

Figure 34 presents the Arrhenius plot for both Nases, derived from the values of Nase activity expressed as percentage of activity normalized to 22.5°C. The Arrhenius plots present a break at around 15°C for both Nases. Above 15°C, both Nases show comparable slopes corresponding to an activation energy of 47 kJ.mol⁻¹ (Tableau 22).

Below 15°C, V-Nase and Mo-Nase are characterized by clearly distinct slopes corresponding to activation energies of 144 kJ.mol⁻¹ and 189 kJ.mol⁻¹ for V-Nase and Mo-Nase respectively. These values are in accordance with activation energy derived from the study of Miller and Eady²¹ on purified enzymes (see Tableau 22, Annexe 4 - 4.1 - Figure S3B). Other values of activation

energy for Nase in the literature range from 52 kJ.mol⁻¹ for heterocystous cyanobacteria⁹⁵ (no break in the Arrhenius plot reported) to 63 kJ.mol⁻¹ for *Azotobacter* sp. above the break in the Arrhenius plot and 160 to 210 kJ.mol⁻¹ below the break.^{93,94} These values are similar to the values obtain in this study for Mo-Nase.

Tableau 22. Nitrogenase activation energy for Mo-grown and V-grown cultures of *Anabaena variabilis*.

Reference		V-Nase	Mo-Nase
		Ea (kJ.mol ⁻¹) ± SD	Ea (kJ.mol ⁻¹) ± SD
This study	>15°C	46.8 ± 1.4	46.5 ± 1.9
	<15°C	144 ± 10	189 ± 10
Miller and	>15°C	62.7	53.2
Eady 1988	<15°C	157 ± 12	204 ± 19

Values represent the linear regression of the Arrhenius plot below and above 15°C for data in this study and for data from Miller and Eady 1988²¹ (see Sup. Info. Figure S3).

The occurrence of a break in the Arrhenius plot for Nase was first reported by Burns in 1969 in *Azotobacter vinelandii*.⁹⁴ The most often reported temperature for the break is around 21°C which is slightly higher than the one reported here, ~15°C. In a study on *Azotobacter* sp, the break has been associated to a phase transition in cellular lipids.⁹³ The difference in the temperature at which the break is observed could have reflected differences in the composition of the cellular lipids between *Azotobacter* and *Anabaena*. However when the Arrhenius plot is drawn using data published for purified enzyme²¹ (Annexe 4 - 4.1 - Figure S3B), a similar break appears at around the same temperature than in our study (15°C). While the presence of cellular lipids in the protein extract impacting the break cannot be ruled out, the break likely reflects intrinsic properties of the Nase.

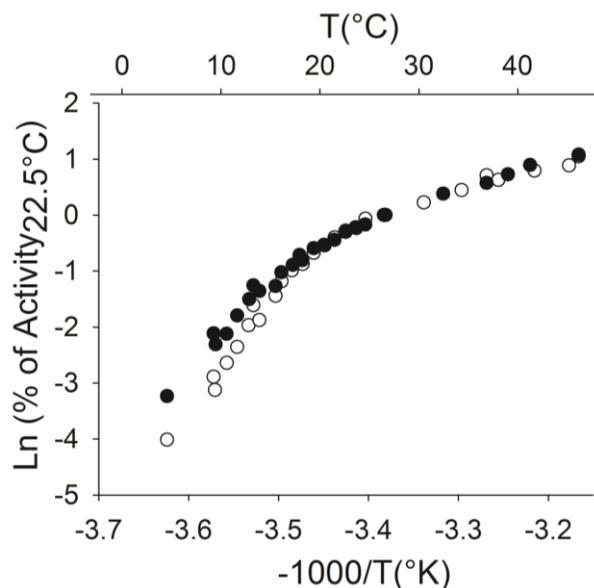


Figure 34. Arrhenius plot of Nase activity for Mo-grown (white circles) and V-grown (black circles) cultures of *Anabaena variabilis*.

Values of regression can be found in Tableau 22.

The effect of temperature on the Mo-Nase activity has been hypothesized to result from a change in the conformation of one of the sub-unit of the Nase.²²⁹ Thorneley²³⁰ showed in *Klebsiella pneumoniae* that the limiting step in the Mo-Nase activity at 23°C is the dissociation of the Fe-Protein/FeMo-Protein complex, and Miller and Eady²¹ attributed the higher performance of the V-Nase at low temperature to the Fe-protein. Thus the difference between Mo and V Nase activity at low temperature could come from a conformational change in the Fe-protein, or another rate-limiting step involving the Fe-protein. Further research is required to elucidate the origin of the break in the Arrhenius plot for Nases activity at low temperature *in vivo*.

Nonetheless, our results show that the V-Nase is less affected by low temperatures than the Mo-Nase in *Anabaena variabilis*. To the best of our knowledge, this is the first demonstration of this phenomenon *in vivo* since its characterization on purified enzymes by Miller et al.²¹ This study also illustrates the unmatched capabilities of the recently developed method ARACAS for the

characterization of the dependency of Nase activity to environmental parameters, such as temperature.

6.2.4.4. Nitrogen fixation activity

In order to better evaluate the temperature dependency on actual N₂ fixation, we converted relative acetylene reduction rates into N₂ fixation rates assuming that the V-Nase is ~20% less efficient at reducing N₂ than the Mo-Nase at room temperature.²⁶ The difference in growth rates of *A. variabilis* in Mo-only or V-only media between 20 and 25°C supports this assumption (Annexe 4 - 4.1 - Table S1). As shown in Figure 35, we estimate that under temperature lower than roughly 12°C the V-Nase becomes more efficient than the Mo-Nase at reducing N₂. For illustration, average temperature during growing season in boreal forest near Thomson (Manitoba, 55.9°N, 98.5°W) was estimated at 11.2±0.9°C.²²

6.2.4.5. Implication for BNF

While more research on the effect of temperature on the activity of the Nases *in vivo* in various environmental samples from different habitats is required to confirm observations made here and decipher the origin of the break in the Arrhenius plot, our results support current views that Mo independent Nases could be more important to global BNF than previously reported, especially in high latitude ecosystems.

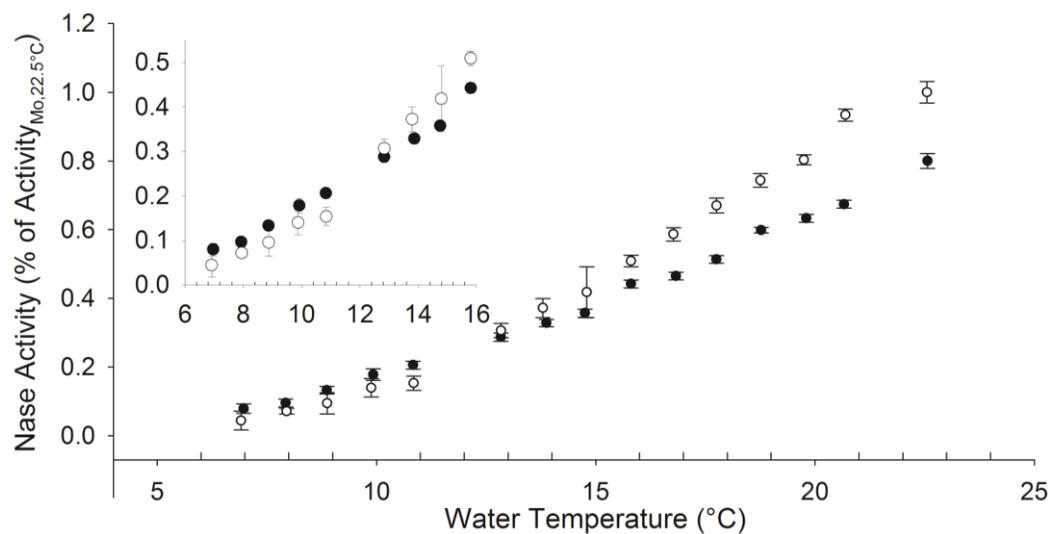


Figure 35. Estimation of N₂ fixation as a function of temperature (white circles) and V-grown (black circles) cultures of *Anabaena variabilis*.

N₂ fixation rates are calculated assuming that the V-Nase is ~20% less efficient at reducing N₂ than the Mo-Nase at room temperature (22.5°C).²⁶ Error bars represent the propagated standard deviation of the value for each temperature at steady state.

Recent studies have reported that (i) Mo is limiting BNF in cold temperate and boreal forest,¹⁷ (ii) the gene coding for V-Nase are present in the cyanolichen genera *Peltigera*,¹⁰ containing heterocystous cyanobacteria and (iii) V homeostasis in the ubiquitous cyanolichens *Peltigera aphthosa* (L.) Willt. s.l. present all the characteristic of a metal of importance for BNF.²²³ Considering that V is 50 to 200 times more abundant than Mo in terrestrial ecosystems,¹³ V-based BNF could provide an efficient way to cope with Mo limitation while supporting sufficient BNF at a similar or even better energetic yield than Mo-based BNF under low temperature. The question of the role of the V-Nase is especially acute in high latitude ecosystems characterized by low temperature and heavily dependent on cyanobacterial BNF for N inputs (cyanolichens and moss associated cyanobacteria). It is also critical to characterize the dependency of the Fe-only Nase to temperature both *in vitro* and *in vivo*.

6.2.5. Acknowledgment

This work was supported by the Canadian Research Chair in terrestrial biogeochemistry and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada through a Discovery grant.

6.3. Synthèse de l'article:

Les résultats de cette étude montrent que l'activité de la V-Nase est moins impactée à faible température que celle de la Mo-Nase chez *Anabaena variabilis*, et cela en raison d'une différence d'énergies d'activation entre les deux isozymes en dessous de $\sim 15^{\circ}\text{C}$. Au dessus de 15°C , les deux Nases possèdent la même dépendance à la température (i.e., la même énergie d'activation). Ces résultats sont cohérents avec la littérature sur *Azotobacter vinelandii* et *Nostoc commune* et avec les connaissances sur la biochimie de la nitrogénase. Par ailleurs, ces résultats mettent en évidence une différence de propriétés fondamentale entre le Mo et le V au sein de la nitrogénase, avec des implications sur la biochimie des nitrogénases. L'extrapolation de la différence d'activité de l'enzyme pour l'actélyne ramenée à la fixation d'azote montre que la V-Nase deviendra plus efficace que la Mo-Nase en dessous d'environ 12°C . Une estimation plus conservatrice de l'écart entre la fixation d'azote avec le V et avec le Mo mènerait à des résultats similaires d'activité pour les deux Nases en dessous de 10°C . Or, la température moyenne de la saison de croissance en forêt boréale est comprise entre 7 et 14°C . Ainsi, la V-Nase n'est pas seulement aussi compétitive que la Mo-Nase en termes d'énergie par moles d'azote fixé, mais elle pourrait également être plus efficace dans les écosystèmes froids.

CONCLUSION GÉNÉRALE

La caractérisation de l'homéostasie du vanadium et du molybdène chez le cyanolichen *Peltigera aphthosa* s.l. a permis de mettre en évidence plusieurs mécanismes biogéochimiques d'importance. Premièrement, tous les résultats obtenus à l'aide de méthodes de caractérisation chimiques et biologiques indépendantes démontrent que la nitrogénase au vanadium n'est pas seulement présente dans l'environnement, mais qu'elle est également active. Ainsi, le vanadium joue un rôle important dans la fixation biologique de l'azote dans les écosystèmes boréaux. Ce résultat remet en question le paradigme selon lequel le molybdène serait le seul acteur de la fixation biologique d'azote dans les écosystèmes naturels.

Cette étude éclaire également d'un jour nouveau la régulation des micronutriments au sein de la symbiose lichénique. En effet, les micronutriments essentiels sont distribués au sein de la symbiose en fonction de l'activité métabolique des différents symbiotes. L'exemple de la cogestion du vanadium et du molybdène au sein des cyanobactéries symbiotiques suppose une régulation très fine et une attribution spécifique des métaux aux cellules. Or, les cellules de symbiotes sont entourées de cellules de champignon. Ainsi, la symbiose, ou plus particulièrement le champignon, joue très certainement un rôle dans l'allocation des micronutriments aux différents symbiotes. Également de nombreux métaux sont retrouvés immobilisés à la surface du thalle sans pénétrer dans les symbiotes. Cela laisserait penser à un rôle important des substances lichéniques dans la protection contre les éléments toxiques, et peut être également dans la régulation des micronutriments essentiels.

Deuxièmement, nos résultats démontrent également que la régulation du vanadium est indépendante de son abondance, et qu'elle semble dépendre de la disponibilité du molybdène pour les fixateurs d'azote. Ainsi, le vanadium aurait un rôle de support lorsque le molybdène ne serait pas suffisamment présent pour soutenir une activité de fixation d'azote optimum. Considérant que le molybdène est peu présent dans la croûte terrestre et qu'il est souvent reporté comme l'élément limitant la fixation d'azote dans les milieux naturels, le rôle du vanadium dans

la FBN pourrait être largement répandu. Ceci suggère que le V jouerait un rôle important dans le cycle de l'azote dans les écosystèmes, plus particulièrement dans les écosystèmes limités en azote.

Troisièmement, nos résultats montrent que la température est un facteur important pouvant favoriser la V Nase. En effet, la nitrogénase au vanadium pourrait devenir aussi efficace, voir plus efficace que la nitrogénase au molybdène pour des températures inférieures à 12°C chez les cyanobactéries. Hors, la température moyenne mondiale est d'environ 14°C, et la température moyenne lors de la saison de croissance dans les écosystèmes boréaux est aux alentours de 10°C. De plus, en dessous de 18°C, la nitrogénase au vanadium n'est plus inhibée par la présence de molybdène. Ainsi, la nitrogénase au vanadium pourrait non seulement être active lorsque le molybdène est limitant, mais elle pourrait également jouer un rôle continu dans les écosystèmes boréaux, et cela avec une efficacité similaire à celle de la nitrogénase au molybdène.

Enfin, l'évaluation de la fixation biologique d'azote ainsi que les bilans d'azote dans les écosystèmes reposent à majorité sur la méthode de la réduction de l'acétylène. Or, cette évaluation est très dépendante du type d'enzyme active. En effet le ratio acétylène : azote utilisé pour convertir l'activité de réduction de l'acétylène en réduction du diazote est de 3 pour la nitrogénase au molybdène alors qu'il n'est que d'environ 1 pour la nitrogénase au vanadium. Ainsi, les bilans actuels basés sur la fixation d'azote pourraient être sous évalués jusqu'à un facteur 3 suivant l'hétérogénéité de la FBN. L'azote étant un élément limitant la production primaire dans de nombreux écosystèmes, ces résultats pourraient également influencer notre compréhension du couplage carbone-azote, notamment dans un contexte de changements climatiques.

Dans de futures recherches, il serait important de mieux comprendre le rôle des substances lichéniques dans la gestion des micronutriments au sein de la symbiose lichénique. Il est également important d'étendre les résultats sur l'utilisation de la nitrogénase au vanadium à d'autres organismes d'importance comme les bryophytes, qui jouent un rôle prépondérant dans

le cycle de l'azote en forêt boréale. Également, il est urgent de développer et de systématiser l'utilisation de méthodes d'évaluation de la fixation biologique de l'azote prenant en compte l'hétérogénéité des nitrogénases pour l'établissement des bilans d'azotes. Il serait finalement intéressant d'un point de vue évolutif de caractériser l'étendue et la répartition géographique de la fixation d'azote alternative. Est-elle ubiquitaire ou bien localisée ? Quels facteurs permettraient d'expliquer sa localisation ?

RÉFÉRENCES

- (1) Basho, M. *Haiku*.
- (2) Wang, Y. P.; Law, R. M.; Pak, B. A global model of carbon, nitrogen and phosphorus cycles for the terrestrial biosphere. *Biogeosciences* **2010**, *7*, 2261–2282.
- (3) Wieder, W. R.; Cleveland, C. C.; Smith, W. K.; Todd-Brown, K. Future productivity and carbon storage limited by terrestrial nutrient availability. *Nat. Geosci.* **2015**, No. April, 1–5.
- (4) Vitousek, P. M.; Howarth, R. W. Nitrogen limitation on land and in the sea : How can it occur ? *Biogeochemistry* **1991**, *13* (2), 87–115.
- (5) Vitousek, P. M.; Cassman, K. E. N.; Cleveland, C.; Crews, T. I. M.; Field, C. B.; Grimm, N. B.; Howarth, R. W.; Marino, R.; Martinelli, L.; Rastetter, E. B.; et al. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry* **2002**, *57/58*, 1–45.
- (6) Galloway, J. N.; Dentener, F. J.; Capone, D. G.; Boyer, E. W.; Howarth, R. W.; Seitzinger, S. P.; Asner, G. P.; Cleveland, C. C.; Green, P. A.; Holland, E. A.; et al. Nitrogen cycles : past , present , and future. *Biogeochemistry* **2004**, *70*, 153–226.
- (7) Kumar, S.; Rao, B.; Kumar, S. R. S.; Rao, K. V. B. Biological Nitrogen Fixation : A Review. *Int. J. Adv. Life Sci. (IJALS)* **2012**, *1*, 1–9.
- (8) Eady, R. R. Structure–Function Relationships of Alternative Nitrogenases. *Chem. Rev.* **1996**, *96* (7), 3013–3030.
- (9) Betancourt, D. A.; Loveless, T. M.; Brown, J. W.; Bishop, P. E. Characterization of diazotrophs containing Mo-independent nitrogenases, isolated from diverse natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74* (11), 3471–3480.
- (10) Hodkinson, B. P.; Allen, J. L.; Forrest, L. L.; Goffinet, B.; Sérusiaux, E.; Andrésón, Ó. S.; Miao, V.; Bellenger, J.-P.; Lutzoni, F. Lichen-symbiotic cyanobacteria associated with *Peltigera* have an alternative vanadium-dependent nitrogen fixation system. *Eur. J. Phycol.* **2014**, *49* (1), 11–19.
- (11) Loveless, T. M.; Saah, J. R.; Bishop, P. E. Isolation of nitrogen-fixing bacteria containing molybdenum-independent nitrogenases from natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65* (9), 4223–4226.

- (12) Reed, S. C.; Cleveland, C. C.; Townsend, A. R. Functional ecology of free-living nitrogen fixation: a contemporary perspective. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **2011**, *42*, 489–512.
- (13) Wedepohl, H. K. The composition of the continental crust. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1995**, *59* (7), 1217–1232.
- (14) Barron, A. R.; Wurzburger, N.; Bellenger, J.-P.; Wright, S. J.; Kraepiel, A. M. L.; Hedin, L. O. Molybdenum limitation of asymbiotic nitrogen fixation in tropical forest soils. *Nat. Geosci.* **2008**, *2* (1), 42–45.
- (15) Silvester, W. Molybdenum limitation of asymbiotic nitrogen fixation in forests of Pacific Northwest America. *Soil Biol. Biochem.* **1989**, *21* (2), 283–289.
- (16) Horstmann, J. L.; Denison, W. C.; Silvester, W. B. ¹⁵N Fixation and molybdenum enhancement of acetylene reduction by *Lobaria* spp. *New Phytol.* **1982**, *92* (2), 235–241.
- (17) Jean, M. E.; Phalyvong, K.; Forest-Drolet, J.; Bellenger, J.-P. Molybdenum and phosphorus limitation of asymbiotic nitrogen fixation in forests of Eastern Canada: Influence of vegetative cover and seasonal variability. *Soil Biol. Biochem.* **2013**, *67*, 140–146.
- (18) Jacobson, M. R.; Premakumar, R.; Bishop, P. E. Transcriptional regulation of nitrogen-fixation by molybdenum in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **1986**, *167* (2), 480–486.
- (19) Walmsley, J.; Kennedy, C. Temperature-dependent regulation by molybdenum and vanadium of expression of the structural genes encoding three nitrogenases in *Azotobacter vinelandii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *57* (2), 622–624.
- (20) Working Group I. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. *Clim. Chang. 2001 Sci. Basis* **2001**, 881.
- (21) Miller, R. W.; Eady, R. R. Molybdenum and vanadium nitrogenases of *Azotobacter chroococcum*. Low temperature favors N₂ reduction by vanadium nitrogenase. *Biochem. J.* **1988**, *256*, 429–432.
- (22) Brooks, J. R.; Flanagan, L. B.; Ehleringer, J. R. Responses of boreal conifers to climate fluctuations: indications from tree-ring widths and carbon isotope analyses. *Can. J. For. Res.* **1998**, *28* (4), 524–533.
- (23) Nash, T. *Lichen Biology*; Nash, T., Ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2008.

- (24) Crittenden, P. D.; Kershaw, K. A. Discovering the role of lichens in the nitrogen cycle in boreal-arctic ecosystems. *Bryologist* **1978**, *81* (2), 258–267.
- (25) Nash, T. Nutrients, elemental accumulation, mineral cycling. In *Lichen Biology*; Nash, T., Ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2008; pp 236–254.
- (26) Bellenger, J.-P.; Wichard, T.; Xu, Y.; Kraepiel, A. M. L. Essential metals for nitrogen fixation in a free-living N₂-fixing bacterium: chelation, homeostasis and high use efficiency. *Environ. Microbiol.* **2011**, *13* (6), 1395–1411.
- (27) DeLuca, T. H.; Boisvenue, C. Boreal forest soil carbon: Distribution, function and modelling. *Forestry* **2012**, *85* (2), 161–184.
- (28) Brandt, J. P.; Flannigan, M.; Maynard, D. G.; Thompson, I. An introduction to Canada's boreal zone: Ecosystem processes, health, sustainability, and environmental issues. *Environ. Rev.* **2013**, *21* (4), 207–226.
- (29) Working group II. *Climate change impacts on forests*; 1995.
- (30) DeLuca, T. H.; Zackrisson, O.; Nilsson, M.-C.; Sellstedt, A. Quantifying nitrogen-fixation in feather moss carpets of boreal forests. *Nature* **2002**, *419* (6910), 917–920.
- (31) Bond-Lamberty, B.; Peckham, S. D.; Ahl, D. E.; Gower, S. T. Fire as the dominant driver of central Canadian boreal forest carbon balance. *Nature* **2007**, *450* (7166), 89–92.
- (32) Kurz, W. A.; Shaw, C. H.; Boisvenue, C.; Stinson, G.; Metsaranta, J.; Leckie, D.; Dyk, A.; Smyth, C.; Neilson, E. T. Carbon in Canada's boreal forest — A synthesis. *Environ. Rev.* **2014**, *292* (January), 260–292.
- (33) Gouvernement du Québec. Critères et INDicateur d'aménagement durable des forêts <https://www.mffp.gouv.qc.ca/publications/enligne/forets/criteres-indicateurs/5/511/511.asp> (accessed May 10, 2015).
- (34) Singh, T.; Powell, J. M. Climatic variation and trends in the Boreal forest regions of western Canada. *Clim. Change* **1986**, *8*, 267–278.
- (35) Cleveland, C. C.; Townsend, A. R.; Schimel, D. S.; Fisher, H.; Hedin, L. O.; Perakis, S.; Latty, E. F.; Fischer, C. Von; Elseroad, A.; Wasson, M. F. Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N₂) fixation in natural ecosystems. *Glob. Biochem. Cycles* **1999**, *13* (2), 623–645.
- (36) Dixon, R. K.; Solomon, A. M.; Brown, S.; Houghton, R. A.; Trexler, M. C.; Wisniewski, J. Carbon Pools and Flux of Global Forest Ecosystems. *Science*, 1994, *263*, 185–190.

- (37) Tamocai, C.; Canadell, J. G.; Schuur, E. A. G.; Kuhry, P.; Mazhitova, G.; Zimov, S. Soil organic carbon pools in the northern circumpolar permafrost region. *Global Biogeochem. Cycles* **2009**, *23* (2), 1–11.
- (38) Hugelius, G.; Kuhry, P.; Tarnocai, C.; Virtanen, T. Soil organic carbon pools in a periglacial landscape: A case study from the central Canadian Arctic. *Permafr. Periglac. Process.* **2010**, *21* (1), 16–29.
- (39) Hobbie, S. E.; Nadelhoffer, K. J.; Högberg, P. A synthesis: The role of nutrients as constraints on carbon balances in boreal and arctic regions. *Plant Soil* **2002**, *242* (1), 163–170.
- (40) Davidson, E. A.; Janssens, I. A. Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change. *Nature* **2006**, *440* (7081), 165–173.
- (41) DeLuca, T. H.; Nilsson, M.-C.; Zackrisson, O. Nitrogen mineralization and phenol accumulation along a fire chronosequence in northern Sweden. *Oecologia* **2002**, *133*, 206–214.
- (42) Rousk, K.; Jones, D. L.; Deluca, T. H. Moss-cyanobacteria associations as biogenic sources of nitrogen in boreal forest ecosystems. *Front. Microbiol.* **2013**, *4* (June), 150.
- (43) DeLuca, T. H.; Zackrisson, O.; Gentili, F.; Sellstedt, A.; Nilsson, M. C. Ecosystem controls on nitrogen fixation in boreal feather moss communities. *Oecologia* **2007**, *152* (1), 121–130.
- (44) Galloway, J. N.; Cowling, E. B. Reactive nitrogen and the world: 200 years of change. *Ambio* **2002**, *31* (2), 64–71.
- (45) Brodo, I. M.; Sharnoff, S. D.; Sharnoff, S. *Lichens of North America*; Yale University Press: New Haven, 2001.
- (46) Wardle, D. A. The Influence of Island Area on Ecosystem Properties. *Science* (80-.). **1997**, *277* (5330), 1296–1299.
- (47) Lupi, C.; Morin, H.; Deslauriers, A.; Rossi, S.; Houle, D. Role of soil nitrogen for the conifers of the boreal forest : A critical review. *Int. J. plant soil Sci.* **2013**, *2* (2), 155–189.
- (48) Elbert, W.; Weber, B.; Burrows, S.; Steinkamp, J.; Büdel, B.; Andreae, M. O.; Pöschl, U. Contribution of cryptogamic covers to the global cycles of carbon and nitrogen. *Nat. Geosci.* **2012**, *5* (7), 459–462.

- (49) Gundale, M. J.; Deluca, T. H.; Nordin, A. Bryophytes attenuate anthropogenic nitrogen inputs in boreal forests. *Glob. Chang. Biol.* **2011**, *17* (8), 2743–2753.
- (50) Turetsky, M. R.; Bond-Lamberty, B.; Euskirchen, E.; Talbot, J.; Frohling, S.; McGuire, A. D.; Tuittila, E. S. The resilience and functional role of moss in boreal and arctic ecosystems. *New Phytol.* **2012**, *196* (1), 49–67.
- (51) Zackrisson, O.; DeLuca, T. H.; Nilsson, M.-C.; Sellstedt, A.; Berglund, L. M. Nitrogen Fixation Increases with Successional Age in Boreal Forests. *Ecology* **2004**, *85* (12), 3327–3334.
- (52) Lagerström, A.; Nilsson, M. C.; Zackrisson, O.; Wardle, D. A. Ecosystem input of nitrogen through biological fixation in feather mosses during ecosystem retrogression. *Funct. Ecol.* **2007**, *21* (6), 1027–1033.
- (53) Smith, S. E.; Read, D. J. Introduction. In *Mycorrhizal Symbiosis*; 2008; pp 1–9.
- (54) Näsholm, T.; Högberg, P.; Franklin, O.; Metcalfe, D.; Keel, S. G.; Campbell, C.; Hurry, V.; Linder, S.; Högberg, M. N. Are ectomycorrhizal fungi alleviating or aggravating nitrogen limitation of tree growth in boreal forests? *New Phytol.* **2013**, *198* (1), 214–221.
- (55) Working Group I Contribution to the IPCC Fifth Assessment Report. *Climate Change 2013: The Physical Science Basis*; 2013.
- (56) Logan, T.; Charron, I.; Chaumont, D.; Houle, D. *Atlas de scénarios climatiques pour la forêt québécoise*; Ouranos et MRNF, 2011.
- (57) Wieder, W. R.; Cleveland, C. C.; Lawrence, D. M.; Bonan, G. B. Effects of model structural uncertainty on carbon cycle projections: biological nitrogen fixation as a case study. *Environ. Res. Lett.* **2015**, *10* (4), 044016.
- (58) Thornley, J.; Cannell, M. Soil carbon storage response to temperature: an hypothesis. *Ann. Bot.* **2001**, *87* (5), 591–598.
- (59) Lenton, T. M. Land and ocean carbon cycle feedback effects on global warming in a simple Earth system model. *Tellus B* **2000**, 1159–1188.
- (60) Schuur, E. A. G.; McGuire, A. D.; Schädel, C.; Grosse, G.; Harden, J. W.; Hayes, D. J.; Hugelius, G.; Koven, C. D.; Kuhry, P.; Lawrence, D. M.; et al. Climate change and the permafrost carbon feedback. *Nature* **2015**, *520* (7546), 171–179.
- (61) Schuur, E. A. G.; Abbott, B. W.; Bowden, W. B.; Brovkin, V.; Camill, P.; Canadell, J. G.; Chanton, J. P.; Chapin, F. S.; Christensen, T. R.; Ciais, P.; et al. Expert assessment of

- vulnerability of permafrost carbon to climate change. *Clim. Change* **2013**, *119* (2), 359–374.
- (62) Goulden, M. L. Sensitivity of boreal forest carbon balance to soil thaw. *Science* (80-.). **1998**, *279* (5348), 214–217.
- (63) Norby, R. J.; Warren, J. M.; Iversen, C. M.; Medlyn, B. E.; McMurtrie, R. E. CO₂ enhancement of forest productivity constrained by limited nitrogen availability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107* (45), 19368–19373.
- (64) Zhang, Q.; Wang, Y. P.; Mearns, R. J.; Pitman, A. J.; Dai, Y. J. Nitrogen and phosphorus limitations significantly reduce future allowable CO₂ emissions. *Geophys. Res. Lett.* **2014**, *41*, 632–637.
- (65) Houlton, B. Z.; Wang, Y.-P.; Vitousek, P. M.; Field, C. B. A unifying framework for dinitrogen fixation in the terrestrial biosphere. *Nature* **2008**, *454* (7202), 327–330.
- (66) D'Orangeville, L.; Houle, D.; Côté, B.; Duchesne, L. Soil response to a 3-year increase in temperature and nitrogen deposition measured in a mature boreal forest using ion-exchange membranes. *Environ. Monit. Assess.* **2014**, *186* (12), 8191–8202.
- (67) Gundale, M. J.; Nilsson, M.; Bansal, S.; Jäderlund, A. The interactive effects of temperature and light on biological nitrogen fixation in boreal forests. *New Phytol.* **2012**, *194* (2), 453–463.
- (68) Sigurdsson, B. D.; Medhurst, J. L.; Wallin, G.; Eggertsson, O.; Linder, S. Growth of mature boreal Norway spruce was not affected by elevated [CO₂] and/or air temperature unless nutrient availability was improved. *Tree Physiol.* **2013**, *33* (11), 1192–1205.
- (69) Hungate, B. A.; Stiling, P. D.; Dijkstra, P.; Johnson, D. W.; Ketterer, M. E.; Hymus, G. J.; Hinkle, C. R.; Drake, B. G. CO₂ Elicits Long-Term Decline in Nitrogen Fixation. *Science* (80-.). **2004**, *304* (May), 1291.
- (70) Howard, J. B.; Rees, D. C. Structural basis of biological nitrogen fixation. *Chem. Rev.* **1996**, *96* (7), 2965–2982.
- (71) Yates, M.; Planqué, K. Nitrogenase from *Azotobacter chroococcum*. *Eur. J. Biochem.* **1975**, *476* (1975), 467–476.
- (72) Dixon, R.; Kahn, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2* (8), 621–631.

- (73) Hoffman, B. M.; Lukoyanov, D.; Yang, Z. Y.; Dean, D. R.; Seefeldt, L. C. Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: The next stage. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (8), 4041–4062.
- (74) Gerlach, D. L.; Lehnert, N. Fischer-tropsch chemistry at room temperature? *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, *50* (35), 7984–7986.
- (75) Hu, Y.; Lee, C. C.; Ribbe, M. W. Extending the carbon chain: hydrocarbon formation catalyzed by vanadium/molybdenum nitrogenases. *Science (80-.)*. **2011**, *333* (6043), 753–755.
- (76) Hardy, R. W. F.; Holsten, R. D.; Jackson, E. K.; Burns, R. C. The acetylene - ethylene assay for N₂ fixation : laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* **1968**, *43*, 1185–1207.
- (77) Montoya, J. P.; Voss, M.; Kahler, P.; Capone, D. G. A simple , high-precision , high-sensitivity tracer assay for N₂ fixation. *Appl. Environ. Microbiol. Microbiol.* **1996**, *62* (3), 986–993.
- (78) Mohr, W.; Großkopf, T.; Wallace, D. W. R.; LaRoche, J. Methodological underestimation of oceanic nitrogen fixation rates. *PLoS One* **2010**, *5* (9), 1–7.
- (79) Dabundo, R.; Lehmann, M. F.; Treibergs, L.; Tobias, C. R.; Altabet, M. A.; Moisaner, P. H.; Granger, J. The contamination of commercial ¹⁵N₂ gas stocks with ¹⁵N-labeled nitrate and ammonium and consequences for nitrogen fixation measurements. *PLoS One* **2014**, *9* (10), e110335.
- (80) Seefeldt, L. C.; Hoffman, B. M.; Dean, D. R. Mechanism of Mo-dependant nitrogenase. *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78* (1), 701–722.
- (81) Robson, R.; Eady, R.; Richardson, T. The alternative nitrogenase of *Azotobacter chroococcum* is a vanadium enzyme. *Nature* **1986**, *322*, 388–390.
- (82) Schneider, K.; Müller, A.; Schramm, U.; Klipp, W. Demonstration of a molybdenum- and vanadium-independent nitrogenase in a nifHDK-deletion mutant of *Rhodobacter capsulatus*. *Eur. J. Biochem.* **1991**, *195* (3), 653–661.
- (83) Thiel, T.; Pratte, B. S. Alternative nitrogenases in *Anabaena variabilis*: the role of molybdate and vanadate in nitrogenase gene expression and activity. *Adv. Microbiol.* **2013**, *3* (October), 87–95.
- (84) Krahn, E.; Schneider, K.; Müller, A. Comparative characterization of H₂ production by the conventional Mo nitrogenase and the alternative “iron-only” nitrogenase of

- Rhodobacter capsulatus hup- mutants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1996**, *46* (3), 285–290.
- (85) Bellenger, J.-P.; Xu, Y.; Zhang, X.; Morel, F. M. M.; Kraepiel, A. M. L. Possible contribution of alternative nitrogenases to nitrogen fixation by asymbiotic N₂-fixing bacteria in soils. *Soil Biol. Biochem.* **2014**, *69*, 413–420.
- (86) Dilworth, M. J.; Eady, R. R.; Eldridge, M. E. The vanadium nitrogenase of *Azotobacter chroococcum*. Reduction of acetylene and ethylene to ethane. *Biochem. J.* **1988**, *249* (3), 745–751.
- (87) Dilworth, M. J.; Eady, R. R.; Robson, R. L.; Miller, R. W. Ethane formation from acetylene as a potential test for vanadium nitrogenase in vivo. *Nature* **1987**, *327* (6118), 167–168.
- (88) Zhang, X.; Sigman, D. M.; Morel, F. M. M.; Kraepiel, A. M. L. Nitrogen isotope fractionation by alternative nitrogenases and past ocean anoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111* (13), 4782–4787.
- (89) Rubio, L. M.; Ludden, P. W. Maturation of nitrogenase: A biochemical puzzle. *J. Bacteriol.* **2005**, *187* (2), 405–414.
- (90) Schmitz, R. a; Klopprogge, K.; Grabbe, R. Regulation of nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae* and *Azotobacter vinelandii*: NifL, transducing two environmental signals to the nif transcriptional activator NifA. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *4* (3), 235–242.
- (91) Eady, R. R.; Issack, R.; Kennedy, C.; Postgate, J. R.; Ratcliffe, H. D. Nitrogenase synthesis in *Klebsiella pneumoniae*: comparison of ammonium and oxygen regulation. *J. Gen. Microbiol.* **1978**, *104* (2), 277–285.
- (92) Kietzin, A.; Adams, M. W. W. Tungsten in biological systems. *FEMS Microbiol. Rev.* **1996**, *18* (1), 5–63.
- (93) Ceuterick, F.; Peeters, J.; Heremans, K.; De Smedt, H.; Olbrechts, H. Effect of high pressure, detergents and phospholipase on the break in the Arrhenius plot of *Azotobacter* nitrogenase. *Eur. J. Biochem.* **1978**, *87* (2), 401–407.
- (94) Burns, R. C. The nitrogenase system from *azotobacter* activation energy and divalent cation requirement. *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, *171* (2), 253–259.
- (95) Shukla, S. P.; Pandey, K. D.; Kashyap, a. K. Nitrogen fixation, ammonium transport and glutamine synthetase activity in an antarctic cyanobacterium *Anabaena* sp.: Influence of temperature. *J. Plant Physiol.* **1997**, *150* (3), 351–354.

- (96) Welter, J. R.; Benstead, J. P.; Cross, W. F.; Hood, J. M.; Huryn, A. D.; Johnson, P. W.; J, W. T. Does N₂ fixation amplify the temperature dependence of ecosystem metabolism? *Ecology* **2015**, *96* (3), 603–610.
- (97) Wichard, T.; Mishra, B.; Myneni, S. C. B.; Bellenger, J.-P.; Kraepiel, A. M. L. Storage and bioavailability of molybdenum in soils increased by organic matter complexation. *Nat. Geosci.* **2009**, *2* (9), 625–629.
- (98) Degboe, J. Mo limitation of biological nitrogen fixation in moss associated cyanobacteria in boreal forest of South Québec, 2015.
- (99) Desai, M. S.; Brune, A. Bacteroidales ectosymbionts of gut flagellates shape the nitrogen-fixing community in dry-wood termites. *ISME J.* **2012**, *6* (7), 1302–1313.
- (100) Droop, M. Some thoughts on nutrient limitation in algae. *J. Phycol.* **1973**, *9* (3), 264–272.
- (101) Verdy, A.; Follows, M.; Flierl, G. Optimal phytoplankton cell size in an allometric model. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2009**, *379*, 1–12.
- (102) Poggiale, J.-C.; Baklouti, M.; Queguiner, B.; Kooijman, S. a L. M. How far details are important in ecosystem modelling: the case of multi-limiting nutrients in phytoplankton-zooplankton interactions. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **2010**, *365* (1557), 3495–3507.
- (103) Voos, K. A.; Malone, R. F.; Grenney, W. J. *Cell quota growth and uptake models applied to growth of Selenastrum capricornutum , printz in a non-steady state environment*; 1978.
- (104) Ahmed, E.; Holmström, S. J. M. Siderophores in environmental research: Roles and applications. *Microb. Biotechnol.* **2014**, *7* (3), 196–208.
- (105) Saha, R.; Saha, N.; Donofrio, R. S.; Bestervelt, L. L. Microbial siderophores: a mini review. *J. Basic Microbiol.* **2013**, *53* (4), 303–317.
- (106) Self, W. T.; Grunden, A. M.; Hasona, A.; Shanmugam, K. T. Molybdate transport. *Res. Microbiol.* **2001**, *152* (3-4), 311–321.
- (107) Thiel, T.; Pratte, B.; Zahalak, M. Transport of molybdate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *Arch. Microbiol.* **2002**, *179*, 50–56.
- (108) Pratte, B. S.; Thiel, T. High-affinity vanadate transport system in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *J. Bacteriol.* **2006**, *188* (2), 464–468.

- (109) Kustka, A.; Carpenter, E. J.; Capone, D. G.; Raven, J. A. A revised estimate of the iron use efficiency of nitrogen fixation, with special reference to the marine cyanobacterium *Trichodesmium* spp. (cyanophyta). *J. Phycol.* **2003**, *39* (1), 12–25.
- (110) Fenske, D.; Gnida, M.; Schneider, K.; Meyer-Klaucke, W.; Schemberg, J.; Henschel, V.; Meyer, A.-K.; Knöchel, A.; Müller, A. A new type of metalloprotein: The Mo storage protein from *azotobacter vinelandii* contains a polynuclear molybdenum-oxide cluster. *Chembiochem* **2005**, *6* (2), 405–413.
- (111) Glass, J. B.; Poret-Peterson, A. T.; Wolfe-Simon, F.; Anbar, A. D. Molybdenum limitation induces expression of the molybdate-binding protein MOP in a freshwater nitrogen-fixing cyanobacterium. *Adv. Microbiol.* **2013**, *03* (06), 9–15.
- (112) Thiel, T.; Lyons, E. M.; Erker, J. C. Characterization of genes for a second Mo-dependent nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J. Bacteriol.* **1997**, *179* (16), 5222–5225.
- (113) Thiel, T.; Pratte, B. S.; Zhong, J.; Goodwin, L.; Copeland, A.; Lucas, S.; Han, C.; Pitluck, S.; Land, M. L.; Kyrpides, N.; et al. complete genome sequence of *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *Stand. Genomic Sci.* **2014**, *9*, 562–573.
- (114) Pratte, B. S.; Eplin, K.; Thiel, T. Cross-functionality of nitrogenase components NifH1 and VnfH in *Anabaena variabilis*. *J. Bacteriol.* **2006**, *188* (16), 5806–5811.
- (115) Bothe, H.; Schmitz, O.; Yates, M. G.; Newton, W. E. Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in cyanobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, *74* (4), 529–551.
- (116) Wu, D.; Hugenholtz, P.; Mavromatis, K.; Pukall, R.; Dalin, E.; Ivanova, N. N.; Kunin, V.; Goodwin, L.; Wu, M.; Tindall, B. J.; et al. A phylogeny-driven genomic encyclopaedia of Bacteria and Archaea. *Nature* **2009**, *462* (7276), 1056–1060.
- (117) Stanier, R. Y.; Chen-Bazire, G. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **1977**, *31*, 225–274.
- (118) Bergman, B.; Gallon, J. R.; Rai, A. N.; Stal, L. J. N₂ fixation by non-heterocystous cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **1997**, *19*, 139–185.
- (119) Kumar, K.; Mella-Herrera, R. A.; Golden, J. W. Cyanobacterial heterocysts. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, *2* (4), a000315.
- (120) Golden, J. W.; Yoon, H. S. Heterocyst development in *Anabaena*. *Curr. Opin. Microbiol.* **2003**, *6* (6), 557–563.

- (121) Berman-Frank, I.; Lundgren, P.; Chen, Y. B.; Küpper, H.; Kolber, Z.; Bergman, B.; Falkowski, P. Segregation of nitrogen fixation and oxygenic photosynthesis in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. *Science* (80-.). **2001**, *294* (5546), 1534–1537.
- (122) Jean, M. E.; Cassar, N.; Setzer, C.; Bellenger, J.-P. Short-term N₂ fixation kinetics in a moss-associated cyanobacteria. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46* (16), 8667–8671.
- (123) Attridge, E.; Rowell, P. Growth, heterocyst differentiation and nitrogenase activity in the cyanobacteria *Anabaena variabilis* and *Anabaena cylindrica* in response to molybdenum and vanadium. *New Phytol.* **1997**, *135*, 517–526.
- (124) Berberoğlu, H.; Barra, N.; Pilon, L.; Jay, J. Growth, CO₂ consumption and H₂ production of *Anabaena variabilis* ATCC 29413-U under different irradiances and CO₂ concentrations. *J. Appl. Microbiol.* **2008**, *104* (1), 105–121.
- (125) Weyman, P. D.; Pratte, B.; Thiel, T. Hydrogen production in nitrogenase mutants in *Anabaena variabilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2010**, *304* (1), 55–61.
- (126) Thiel, T.; Lyons, E. M.; Erker, J. C.; Ernst, A. A second nitrogenase in vegetative cells of a heterocyst-forming cyanobacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92* (20), 9358–9362.
- (127) Zambare, V. P.; Christopher, L. P. Biopharmaceutical potential of lichens. *Pharm. Biol.* **2012**, *50* (6), 778–798.
- (128) Seaward, M. Environmental role of lichen. In *Lichen Biology*; Nash, T., Ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2008; pp 276–300.
- (129) Garty, J. Biomonitoring atmospheric heavy metals with lichens: theory and application. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* **2001**, *20* (4), 309–371.
- (130) Nash, T.; Gries, C. The use of lichens in atmospheric deposition studies with an emphasis on the Arctic. *Sci. Total Environ.* **1995**, *161*, 729–736.
- (131) Nimis, P. L.; Scheidegger, C.; Wolseley, P. A. Monitoring with lichens — Monitoring lichens. In *NATO Sciences Series Volume 7*; Nimis, P. L., Scheidegger, C., Wolseley, P. A., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2002.
- (132) Hauck, M.; Willenbruch, K. Lichen Substances Prevent Lichens from Nutrient Deficiency. *J. Chem. Ecol.* **2009**, 71–73.
- (133) Hauck, M.; Huneck, S. Lichen substances affect metal adsorption in *Hypogymnia physodes*. *J. Chem. Ecol.* **2007**, *33* (1), 219–223.

- (134) Hauck, M.; Huneck, S.; Elix, J. A.; Paul, A. Does secondary chemistry enable lichens to grow on iron-rich substrates? *Flora - Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* **2007**, *202* (6), 471–478.
- (135) Hauck, M. Metal homeostasis in Hypogymnia physodes is controlled by lichen substances. *Environ. Pollut.* **2008**, *153* (2), 304–308.
- (136) Hauck, M.; Böning, J.; Jacob, M.; Dittrich, S.; Feussner, I.; Leuschner, C. Lichen substance concentrations in the lichen Hypogymnia physodes are correlated with heavy metal concentrations in the substratum. *Environ. Exp. Bot.* **2013**, *85*, 58–63.
- (137) Goyal, R.; Seaward, M. Metal uptake in terricolous lichens I. Metal localization within the thallus.pdf. *New Phytol.* **1981**, *89*, 631–645.
- (138) Chen, J.; Blume, H.-P.; Beyer, L. Weathering of rocks induced by lichen colonization - a review. *Catena* **2000**, *39* (2), 121–146.
- (139) Seneviratne, G.; Indrasena, I. K. Nitrogen fixation in lichens is important for improved rock weathering. *J. Biosci.* **2006**, *31* (5), 639–643.
- (140) Goyal, R.; Seaward, M. Metal uptake in terricolous lichens. III. Translocation in the thallus of *Peltigera canina*. *New Phytol.* **1982**, 85–98.
- (141) Loppi, S.; Nelli, L.; Ancora, S.; Bargagli, R. Accumulation of trace elements in the peripheral and central parts of a foliose lichen thallus. *Bryologist* **1997**, *100* (2), 251–253.
- (142) Miadlikowska, J.; Richardson, D.; Magain, N.; Ball, B.; Anderson, F.; Cameron, R.; Lendemer, J.; Truong, C.; Lutzoni, F. Phylogenetic placement, species delimitation, and cyanobiont identity of endangered aquatic *Peltigera* species (lichen-forming Ascomycota, Lecanoromycetes). *Am. J. Bot.* **2014**, *101* (7), 1141–1156.
- (143) Martínez, I.; Burgaz, A. R.; Vitikainen, O.; Escudero, A. Distribution patterns in the genus *Peltigera* Willd. *Lichenol.* **2003**, *35* (4), 301–323.
- (144) Hitch, C. J. B.; Millbank, J. W. Nitrogen metabolism in lichens. VII. Nitrogenase activity and heterocyst frequency in lichens with blue-green phycobionts. *New Phytol.* **1975**, *75* (2), 239–244.
- (145) Millbank, J. W. Nitrogen Metabolism in Lichens. V. The Forms of Nitrogen Released by the Blue-Green Phycobiont in *Peltigera* Spp. *New Phytol.* **1974**, *73* (6), 1171–1181.
- (146) Millbank, J.; Kershaw, K. Nitrogen metabolism in lichens. I. Nitrogen fixation in the cephalodia of *Peltigera aphthosa*. *New Phytol.* **1969**, *68* (3), 721–729.

- (147) Rai, A. N.; Rowell, P.; Stewart, W. D. P. Mycobiont-cyanobiont interactions during dark nitrogen fixation by the lichen *Peltigera aphthosa*. *Physiol. Plant.* **1983**, *57* (2), 285–290.
- (148) Kershaw, K. A.; Millbank, J. W. Nitrogen metabolism in lichens II. The partition of cephalodial-fixed nitrogen between the mycobiont and the phycobionts of *Peltigera aphthosa*. *New Phytol.* **1970**, *69* (1), 75–79.
- (149) Kallio, S. On the effect of forest fertilizers on nitrogenase activity in two subarctic lichens. *Ecol. Bull.* **1978**, No. 26, 217–224.
- (150) Dahlman, L.; Persson, J.; Palmqvist, K.; Näsholm, T. Organic and inorganic nitrogen uptake in lichens. *Planta* **2004**, *219* (3), 459–467.
- (151) Sundberg, B.; Sundberg, B.; Näsholm, T.; Näsholm, T.; Palmqvist, K.; Palmqvist, K. The effect of nitrogen on growth and key thallus components in the two tripartite lichens, *Nephroma arcticum* and *Peltigera aphthosa*. *Plant. Cell Environ.* **2001**, *24* (5), 517–527.
- (152) Miadlikowska, J.; Lutzoni, F. Phylogenetic revision of the genus *Peltigera* (lichen-forming Ascomycota) based on morphological, chemical, and large subunit nuclear ribosomal DNA data. *Int. J. Plant Sci.* **2000**, *161* (6), 925–958.
- (153) Gasulla, F.; Guéra, A.; Barreno, E. A simple and rapid method for isolating lichen photobionts. *Symbiosis* **2010**, *51* (2), 175–179.
- (154) Yoshimura, I.; Yamamoto, Y.; Nakano, T.; Finnie, J. Isolation and Culture of lichen Photobionts and Mycobionts. *Protoc. Lichenol.* **2002**, 3–33.
- (155) Allen, M. B.; Arnon, D. I. Studies on Nitrogen-Fixing Blue-Green Algae. I. Growth and Nitrogen Fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm. *Plant Physiol.* **1955**, *30* (4), 366–372.
- (156) Lichtenthaler, H.; Wellburn, A. Determinations of total carotenoids and chlorophylls b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.* **1983**, *11* (1955), 591–592.
- (157) Dere, Ş.; Günes, T.; Sivaci, R. Spectrophotometric determination of chlorophyll - a , b and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. *Turk. J. Botany* **1998**, *22*, 13–17.
- (158) Glass, J. B.; Wolfe-Simon, F.; Elser, J. J.; Anbar, A. D. Molybdenum-nitrogen co-limitation in freshwater and coastal heterocystous cyanobacteria. *Limnol. Oceanogr.* **2010**, *55* (2), 667–676.
- (159) Tang, D.; Morel, F. M. M. Distinguishing between cellular and Fe-oxide-associated trace elements in phytoplankton. *Mar. Chem.* **2006**, *98*, 18–30.

- (160) Baptista, M. S.; Vasconcelos, M. T. S. D.; Cabral, J. P.; Freitas, M. C.; Pacheco, A. M. G. Copper, nickel and lead in lichen and tree bark transplants over different periods of time. *Environ. Pollut.* **2008**, *151* (2), 408–413.
- (161) Garty, J.; Galun, M. Localization of heavy metals and other elements accumulated in the lichen thallus. *New Phytol.* **1979**, *82*, 159–168.
- (162) Vazquez, M. D.; Lopez, J.; Carballeira, A. Modification of the sequential elution technique for the extraction of heavy metals from bryophytes. *Sci. Total Environ.* **1999**, *241*, 53–62.
- (163) Spagnuolo, V.; Zampella, M.; Giordano, S.; Adamo, P. Cytological stress and element uptake in moss and lichen exposed in bags in urban area. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2011**, *74* (5), 1434–1443.
- (164) Branquinho, C. A method for studying the cellular location of lead in lichens. *Lichenol.* **1994**, *26* (1), 83–90.
- (165) Branquinho, C.; Brown, D. H.; Catarino, F. The cellular location of Cu in lichens and its effects on membrane integrity and chlorophyll fluorescence. *Environ. Exp. Bot.* **1997**, *38*, 165–179.
- (166) Branquinho, C.; Brown, D. H.; Maguas, C.; Catarino, F. Lead (Pb) uptake and its effects on membrane integrity and chlorophyll fluorescence in different lichen species. *Environ. Exp. Bot.* **1997**, *37*, 95–105.
- (167) Schmall, M.; Hauck, M. Extraction methods for assessing the availability of cations for epiphytic lichens from bark. *Environ. Exp. Bot.* **2003**, *49* (3), 273–283.
- (168) Branquinho, C.; Catarino, F.; Hunter Brown, D.; Joao Pereira, M.; Soares, A. Improving the use of lichens as biomonitors of atmospheric metal pollution. *Sci. Total Environ.* **1999**, *232*, 67–77.
- (169) Brown, D. H.; Beckett, R. P. Uptake and Effect of Cations on Lichen Metabolism. *Lichenol.* **1984**, *16* (02), 173–188.
- (170) Laforte Lucie. Thallium et indium dans les sédiment de deux lacs du bouclier canadien : sources, géochimie et potentiel comme traceurs, Université du Québec, INRS-ETE, 2005.
- (171) Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. *Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie*; Québec, 2015.

- (172) Cassar, N.; Bellenger, J.-P.; Jackson, R. B.; Karr, J.; Barnett, B. A. N₂ fixation estimates in real-time by cavity ring-down laser absorption spectroscopy. *Oecologia* **2012**, *168* (2), 335–342.
- (173) Smith, L. I. A tutorial on Principal Components Analysis Introduction. *Statistics (Ber)*. **2002**, *51*, 52.
- (174) Abdi, H. *Multivariate Analysis*; 2003.
- (175) Balakrishnama, S.; Ganapathiraju, a. Linear Discriminant Analysis - a Brief Tutorial. *Compute* **1998**, *11*, 1–9.
- (176) Rakotomalala, R. TANAGRA : un logiciel gratuit pour l'enseignement et la recherche. *Actes EGC* **2005**, *2* (3), 697–702.
- (177) Boogaart, K. G. Van Den; Bren, M. Concepts for handling of zeros and missing values in compositional data. In *International Association for Mathematical Geology XIth International Congress*; Liège, 2006; pp 1–4.
- (178) Wohlrab, L.; Fürnkranz, J. *A Comparison of Strategies for Handling Missing Values in Rule Learning*; 2009.
- (179) Aitchison, J. A concise guide to compositional data analysis. In *2nd CDA Workshop*; Girona, Spain, 2003.
- (180) Astier, A.; Pitiot, F. Kaamelot, Livre I, Tel un chevalier.
- (181) Campbell, G. P.; Curran, J. M.; Miskelly, G. M.; Coulson, S.; Yaxley, G. M.; Grunsky, E. C.; Cox, S. C. Compositional data analysis for elemental data in forensic science. *Forensic Sci. Int.* **2009**, *188* (1-3), 81–90.
- (182) Parent, S.-É.; Parent, L. E.; Egozcue, J. J.; Rozane, D.-E.; Hernandez, A.; Lapointe, L.; Hébert-Gentile, V.; Naess, K.; Marchand, S.; Lafond, J.; et al. The Plant Ionome Revisited by the Nutrient Balance Concept. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4* (March), 39.
- (183) Korhoňová, M.; Hron, K.; Klimčíková, D.; Müller, L.; Bednář, P.; Barták, P. Coffee aroma-Statistical analysis of compositional data. *Talanta* **2009**, *80* (2), 710–715.
- (184) Ziembik, Z.; Dołhańczuk-Śródka, A.; Majcherczyk, T.; Waclawek, M. Illustration of constrained composition statistical methods in the interpretation of radionuclide concentrations in the moss *Pleurozium schreberi*. *J. Environ. Radioact.* **2013**, *117*, 13–18.

- (185) Reimann, C.; Filzmoser, P.; Fabian, K.; Hron, K.; Birke, M.; Demetriades, A.; Dinelli, E.; Ladenberger, A.; Albanese, S.; Andersson, M.; et al. The concept of compositional data analysis in practice - Total major element concentrations in agricultural and grazing land soils of Europe. *Sci. Total Environ.* **2012**, *426*, 196–210.
- (186) Filzmoser, P.; Hron, K.; Reimann, C. Principal component analysis for compositional data with outliers. *Environmetrics* **2009**, *20* (6), 621–632.
- (187) R Development Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*.; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria., 2009.
- (188) Van den Boogaart, K. G.; Tolosana-Delgado, R. “compositions”: A unified R package to analyze compositional data. *Comput. Geosci.* **2008**, *34* (4), 320–338.
- (189) Comas-Cufí, M.; Thió-Henestrosa, S. CoDaPack 2.0: a stand-alone, multi-platform compositional software. In *4th International Workshop on Compositional Data Analysis*.; Egozcue, J., Tolosana-Delgado, R., Ortego, M., Eds.; Sant Feliu de Guíxols, 2011.
- (190) Gouvernement du Québec. Le potentiel économique
<http://www.nord.gouv.qc.ca/potentiel/index.asp>.
- (191) Sloof, J. Lichens as quantitative biomonitors for atmospheric trace-element deposition, using transplants. *Atmos. Environ.* **1995**, *29* (1), 11–20.
- (192) Conti, M.; Cecchetti, G. Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment--a review. *Environ. Pollut.* **2001**, *114* (3), 471–492.
- (193) Wolterbeek, B. Biomonitoring of trace element air pollution: principles, possibilities and perspectives. *Environ. Pollut.* **2002**, *120* (1), 11–21.
- (194) Jeran, Z.; Jaćimović, R.; Batic, F.; Mavsar, R. Lichens as integrating air pollution monitors. *Environ. Pollut.* **2002**, *120* (1), 107–113.
- (195) Seaward, M. R. D. Lichen Ecology of the Scunthorpe Heathlands I. Mineral Accumulation. *Lichenol.* **1973**, *5*, 423–433.
- (196) Chiarenzelli, J.; Aspler, L.; Dunn, C.; Cousens, B.; Ozarko, D.; Powis, K. Multi-element and rare earth element composition of lichens, mosses, and vascular plants from the Central Barrenlands, Nunavut, Canada. *Appl. Geochemistry* **2001**, *16* (2), 245–270.
- (197) Puckett, K. J.; Finegan, E. J. An analysis of the element content of lichens from the Northwest Territories, Canada. *Can. J. Bot.* **1980**, *58* (19), 2073–2089.

- (198) Tomassini, F.; Puckett, K. Determination of copper, iron, nickel, and sulphur by X-ray fluorescence in lichens from the Mackenzie Valley, Northwest Territories, and the Sudbury District, Ontario. *J. Bot.* **1976**, *54*, 1591–1603.
- (199) Aznar, J.-C.; Richer-Lafleche, M.; Cluis, D. Metal contamination in the lichen *Alectoria sarmentosa* near the copper smelter of Murdochville, Québec. *Environ. Pollut.* **2008**, *156* (1), 76–81.
- (200) Evans, C. A.; Hutchinson, T. C. Mercury accumulation in transplanted moss and lichens at high elevation sites in Quebec. *Water. Air. Soil Pollut.* **1996**, *90* (3-4), 475–488.
- (201) Riget, F.; Asmund, G.; Aastrup, P. The use of lichen (*Cetraria nivalis*) and moss (*Rhacomitrium lanuginosum*) as monitors for atmospheric deposition in Greenland. *Sci. Total Environ.* **2000**, *245*, 137–148.
- (202) Crête, M.; Lefebvre, M.; Zikovsky, L.; Walsh, P. Cadmium, lead, mercury and 137 cesium in fruticose lichens of northern Québec. *Sci. Total Environ.* **1992**, *121*, 217–230.
- (203) Vitikainen, O. Taxonomic revision of Peltigera (lichenized Ascomycota) in Europe. *Acta Bot. Fenn.* **1994**, *152*, 1–96.
- (204) Miadlikowska, J.; Lutzoni, F. Phylogenetic classification of peltigeralean fungi (Peltigerales, Ascomycota) based on ribosomal RNA small and large subunits. *Am. J. Bot.* **2004**, *91* (3), 449–464.
- (205) Gouvernement du Québec. Zones de végétation et domaines bioclimatiques du Québec <https://www.mrn.gouv.qc.ca/forets/inventaire/inventaire-zones-carte.jsp>.
- (206) Gouvernement du Québec. Cartes Minières <http://www.mrn.gouv.qc.ca/mines/publications/publications-cartes.jsp>.
- (207) Filzmoser, P.; Hron, K.; Reimann, C. Univariate statistical analysis of environmental (compositional) data: problems and possibilities. *Sci. Total Environ.* **2009**, *407* (23), 6100–6108.
- (208) Monaci, F.; Fantozzi, F.; Figueroa, R.; Parra, O.; Bargagli, R. Baseline element composition of foliose and fruticose lichens along the steep climatic gradient of SW Patagonia (Aisén Region, Chile). *J. Environ. Monit.* **2012**, *14* (9), 2309–2316.
- (209) Nash, T. Nitrogen, its metabolism and potential contribution to ecosystems. In *Lichen Biology*; Nash, T., Ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2008; pp 218–235.

- (210) Nash, T. Lichen sensitivity to air pollution. In *Lichen Biology*; Nash, T., Ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2008; pp 301–316.
- (211) Chou, C.; Chen, A. Leaching metabolites in vegetation of northern taiwan. 1. Release of cations in some vegetation of northern Taiwan. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **1976**, *17*, 25–36.
- (212) Carlisle, A.; Brown, A.; White, E. The organic matter and nutrient elements in the precipitation beneath a sessile oak (*Quercus petraea*) canopy. *J. Ecol.* **1966**, *54* (1), 87–98.
- (213) Bargagli, R.; Sanchez-Hernandez, J.; Monaci, F. Baseline concentrations of elements in the antarctic macrolichen *Umbilicaria decussata*. *Chemosphere* **1999**, *38* (3), 475–487.
- (214) Bergamaschi, L.; Rizzio, E.; Giaveri, G.; Profumo, A.; Loppi, S.; Gallorini, M. Determination of baseline element composition of lichens using samples from high elevations. *Chemosphere* **2004**, *55* (7), 933–939.
- (215) Rehder, D. Vanadium nitrogenase. *J. Inorg. Biochem.* **2000**, *80* (1-2), 133–136.
- (216) Boyd, E. S.; Hamilton, T. L.; Peters, J. W. An alternative path for the evolution of biological nitrogen fixation. *Front. Microbiol.* **2011**, *2*, 1–11.
- (217) Crans, D. C.; Smee, J. J.; Gaidamauskas, E.; Yang, L. The Chemistry and Biochemistry of Vanadium and the Biological Activities Exerted by Vanadium Compounds. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (2), 849–902.
- (218) Williams, R. J. P.; Fraústo da Silva, J. J. R. The involvement of molybdenum in life. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *292* (2), 293–299.
- (219) Addison, P. A.; Puckett, K. J. Deposition of atmospheric pollutants as measured by lichen element content in the Athabasca oil sands area. *Can. J. Bot.* **1980**, *58* (22), 2323–2334.
- (220) Bellenger, J. P.; Wichard, T.; Kustka, A. B.; Kraepiel, A. M. L. Uptake of molybdenum and vanadium by a nitrogen-fixing soil bacterium using siderophores. *Nat. Geosci.* **2008**, *1* (4), 243–246.
- (221) Yuan, Z. Y.; Chen, H. Y. H. Decoupling of nitrogen and phosphorus in terrestrial plants associated with global changes. *Nat. Clim. Chang.* **2015**, No. March, 1–5.
- (222) Heimann, M.; Reichstein, M. Terrestrial ecosystem carbon dynamics and climate feedbacks. *Nature* **2008**, *451* (7176), 289–292.
- (223) Darnajoux, R.; Constantin, J.; Miadlikowska, J.; Lutzoni, F.; Bellenger, J.-P. Is vanadium a biometal for boreal cyanolichens? *New Phytol.* **2014**, *202* (3), 765–771.

- (224) Zhang, X.; McRose, D. L.; Darnajoux, R.; Bellenger, J.-P.; Morel, F. M. M.; Kraepiel, A. M. L. Alternative nitrogenase activity in the environment and nitrogen cycle implications.
- (225) Darnajoux, R.; Lutzoni, F.; Miadlikowska, J.; Bellenger, J.-P. Determination of baseline metal contamination using peltigeralean lichens in Northeastern Canada. *Sci. Total Environ.*
- (226) Dean, D. R.; Bolin, J. T.; Zheng, L. Nitrogenase metalloclusters: Structures, organization, and synthesis. *J. Bacteriol.* **1993**, *175* (21), 6737–6744.
- (227) Vile, M. A.; Kelman Wieder, R.; Živković, T.; Scott, K. D.; Vitt, D. H.; Hartsock, J. A.; Iosue, C. L.; Quinn, J. C.; Petix, M.; Fillingim, H. M.; et al. N₂-fixation by methanotrophs sustains carbon and nitrogen accumulation in pristine peatlands. *Biogeochemistry* **2014**, *121*, 317–328.
- (228) Menge, D. N. L.; Hedin, L. O. Nitrogen fixation in different biogeochemical niches along a 120 000-year chronosequence in New Zealand. *Ecology* **2009**, *90* (8), 2190–2201.
- (229) Thorneley, R. N. F.; Eady, R. R.; Yates, M. G. Nitrogenases of *Klebsiella pneumoniae* and *Azotobacter chroococcum*. *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, *403* (2), 269–284.
- (230) Thorneley, R. N.; Lowe, D. J. Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*. Kinetics of the dissociation of oxidized iron protein from molybdenum-iron protein: identification of the rate-limiting step for substrate reduction. *Biochem. J.* **1983**, *215* (2), 393–403.

ANNEXES

TABLE DES ANNEXES

ANNEXE 1. INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES DU CHAPITRE 3	169
1.1. Supplementary methods	169
1.1.1. Principal Component Analysis	169
1.1.2. Compositional biplot.....	170
1.2. Supplementary discussion	170
1.2.1. Species variability.....	170
1.2.2. Small anomalies.....	171
1.2.3. Thallus part composition.	171
1.3. Supplementary figures.....	173
1.4. Supplementary tables.....	176
ANNEXE 2. INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES DU CHAPITRE 4	187
ANNEXE 3. INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES DU CHAPITRE 5	191
3.1. Supplementary methods	191
ANNEXE 4. INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES DU CHAPITRE 6	197
4.1. Supplementary figures and tables.....	197
ANNEXE 5. SUPPLEMENTARY BIBLIOGRAPHY	201

ANNEXE 1. INFORMATIONS

SUPPLÉMENTAIRES DU CHAPITRE 3

Determination of baseline metal contamination using peltigeralean lichens in northeastern Canada

1.1. Supplementary methods

1.1.1. Principal Component Analysis

Principal component analyses (PCA) used in this study are different from the classical PCA found in most literature on lichen metal content. The mass ratio data (ppm) are not independent one to the other, due to the unity sum of the mass ratio, and belong to the closed data category. With these data, Euclidian geometry is no longer valid, and classical statistics relying on Euclidian distance, such as analysis of variance and factor analysis are no longer valid. This issue has been addressed in numerous publications in the last years (Ranganathan and Borges 2011; Tolosana-Delgado 2012; Buccianti 2013), and we decided to process our data accordingly using a centered-log ratio transformation (Aitchison 2003). In multivariate analysis of compositional data, it is important to state that the analysis of scatter plot is somehow different from classical PCA (Aitchison 2003; Filzmoser et al. 2009). In the space formed by the two axes, the closer the individuals are, the more similar their composition, (i.e. relative content) with regard to each variables. In those plots, a line between two elements represents the ratio of these two elements. The orthogonal projection of a point on these lines informs us on the enrichment of one element with respect to the other (the closer apart from the projection of the center of the plot, the further from the 1:1 ratio). The center of the plot represents the average composition of the lichen thalli, and its projection on these lines represents the 1:1 ratio.

1.1.2. Compositional biplot

Compositional biplot should be analyzed with variables and individual at the same time. In this paper, for convenience we separate in two type of graph; the first type displays clr correlation of the variable in the PC1 and PC2 axes (Fig. 2B and Sup. Info Fig. S1B) and the second type represent the projection of qualitative data (Fig. 2C and Sup. Info Fig. S1C). Closed squares represent centroids of categorical variables highlighted on the graphs. Open squares represent centroids of geographical sampling points. Individuals are hidden to facilitate the interpretation. Ellipses circumscribe the 95% confidence area around centroids. More information on the use of multivariate analysis for compositional data can be found in Aitchison 2003; Ranganathan and Borges 2011; Buccianti 2013; Ziembik et al. 2013

1.2. Supplementary discussion

1.2.1. Species variability

Differences in element contents among species can be due to factors other than species differences. Most specimens of *N. arcticum* were sampled in the northern and far eastern part of the transects (Table S1). While this is consistent with the geographic distribution of this species reported by Brodo et al. 2001, and suggests that *N. arcticum* could be more susceptible to the proximity of anthropogenic activities than the other species, species and geographical differences are partially confounded. Moreover, more than half of *P. neopolydactyla* s.l. specimens were collected in the EW0-W25, SN2 and SN3 areas, i.e., closer to urbanized area, while only two specimens were collected in the more pristine sampling sites (SN4-SN9, Table S1). Thus species variability in our sampling reflects more their geographic distribution than a difference in species behavior with regard to metal.

1.2.2. Small anomalies

Correlations between the groups defined in the main manuscript 3.1.3 (Fig. 2B) revealed small anomalies highlighted in Fig. 1C-D. One anomaly is associated with SN9, located at the northern tree limit and showing higher level of terrigenous than soluble elements (Fig. 1C, 2B and Table S3). Shrub arctic tundra (SN9), and to a lesser extent, the forest tundra domain (SN8), which are less populated with trees, may allow more dry and wet depositions due to a lack of tree canopy. Few excavation sites located in the far north of Québec may also contribute to this slight increase in metal contents detected in lichens at these sites. Finally, transportation of residues from Russia and Western Europe through the polar vortex cannot be ruled out (Fig. 1A-B, Simonetti et al., 2000; Bindler and Renberg, 2001). Samples from EW0 to W12.5 also show a slight enrichment of terrigenous elements (Fig. 1D, Fig. 2B, Table S3). Sampling sites SN5 and SN6 were also anomalous (lower right quadrant), correlating with *P. scabrosa* centroid, and showing higher anthropogenic elements (i.e., Zn, Cu and Ni) to pedogenetic elements ratios than other thalli (Fig. 2, Sup. Info. Table S3). The presence of two active Zn smelters in this area (Gouvernement du Québec, 2013a) may explain these results. Analogous to SN2 and SN3 (see main manuscript 3.1.2), anomalies detected in EW0-EW12.5 might be related to higher anthropogenic activities (Figs. 1). Nonetheless, levels of contamination in those areas remain low with regard to available values in the literature for the Canadian arctic (Nash, 1995).

Overall, the PCAs suggest that the source of metals deposited on lichens is homogeneous in most parts of the boreal portion of Québec. This likely reflects the fact that all sampling sites are located on the Canadian Shield, which is mostly geologically uniform. This homogeneity in the elemental composition of lichens also suggests that particles are most likely of pedogenic origin and that particles from anthropogenic origins are limited, with the exception of the southernmost portion of the SN transect (SN1-SN3) representing about one quarter of the full length of this transect.

1.2.3. Thallus part composition.

We compared the elemental contents of the outer margin (3 to 5 mm wide) with the elemental contents of the whole thallus. This approach was used in many studies to

establish a proper baseline (e.g., Bergamaschi et al., 2004; Monaci et al., 2012); as the margin of the thallus represents the most recent years of growth, while the whole thallus represents elemental accumulation (deposition and other sources) over the entire lifetime of the thallus. In our study, the margin was defined as the outer layer showing a clearer (lighter) color (as seen from the upper surface of the thallus) compared to the rest of the thallus. Thalli margins were manually dissected and samples digested as described above. For this procedure, we selected lichen thalli that have low Fe, Al and V contents (within the first tertile for each element). Two-way MANOVA was performed to compare cellular metal content at the margin of lichen thalli with cellular metal content of whole thalli.

Our results show that most studied elements are equally concentrated at the margin of the thallus (≤ 5 mm) as throughout the entire thallus (Tables S9 and S10). Results of a two-way multivariate ANOVA with species as second factor shows that only four elements were significantly different: Al, Fe, Ni and Zn ($p < 0.05$, Sup. Info. Table S10B). Al and Fe are more concentrated in the entire thallus than at the margin. Ni and Zn concentrations are only significantly higher at the margin, compare to the entire thallus for *P. scabrosa* s.l. (Sup. Info. Table S10B; interaction p-value < 0.05). These results show that Ni and Zn contaminations are likely recent and most certainly localized, however the number of replicate for *P. scabrosa* s.l. is too low to be conclusive ($n = 4$ for margin and $n = 3$ for the entire thallus). The concentration of essential nutrients P, K and Mg was expected to be higher at the margin of thalli, where thallus growth is more active (Loppi et al., 1997). While not statistically significant, our data seem to support this assumption, since P, K and Mg are slightly more concentrated at the thalli margins when compared to whole thalli. Overall, these results show that, for our dataset, there is no significant difference between using whole thalli vs thalli margins for the determination of a baseline for elemental deposition in northeastern Canada, except for Al, Fe, Ni and Zn.

1.3. Supplementary figures

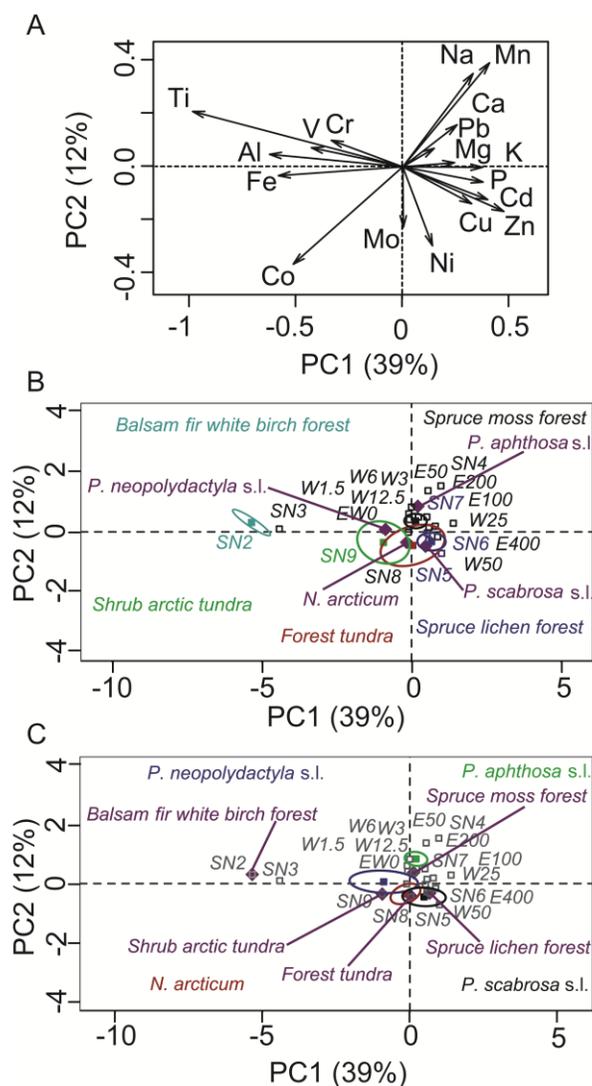


Figure S1. Correlations among elements and the effect of bioclimatic zones and species on data structure including all samples.

(A) Correlation among elements projected on the first two principal components. Variable plots highlighting bioclimatic domains (B) and lichen-forming species (C).

Comments on Fig. S1:

About 50% of the variance can be explained with the two first PCs. The first component (PC1), which explains 39% of the total variance, opposes elements such as Al, Fe, Ti, V and Cr to more soluble elements such as P, Mg, Mn, K and Cd (Fig. S2A). The second

component (PC2), which explains 12% of the variance, opposes Co and Ni, and to a lesser extent Mo, Zn and Cu to elements such as Mn, Na, Ca and Pb. Balsam fir white birch forest centroid (Fig. S2B) as well as SN2 and SN3 (Fig. S2C) are clearly separate from the other vegetation domains and sampling points. Those samples are characterized by higher terrigenous elements (Ti, Al, Fe, V, Cr, Co) to soluble elements (Mn, Ca, Zn, Na) ratio.

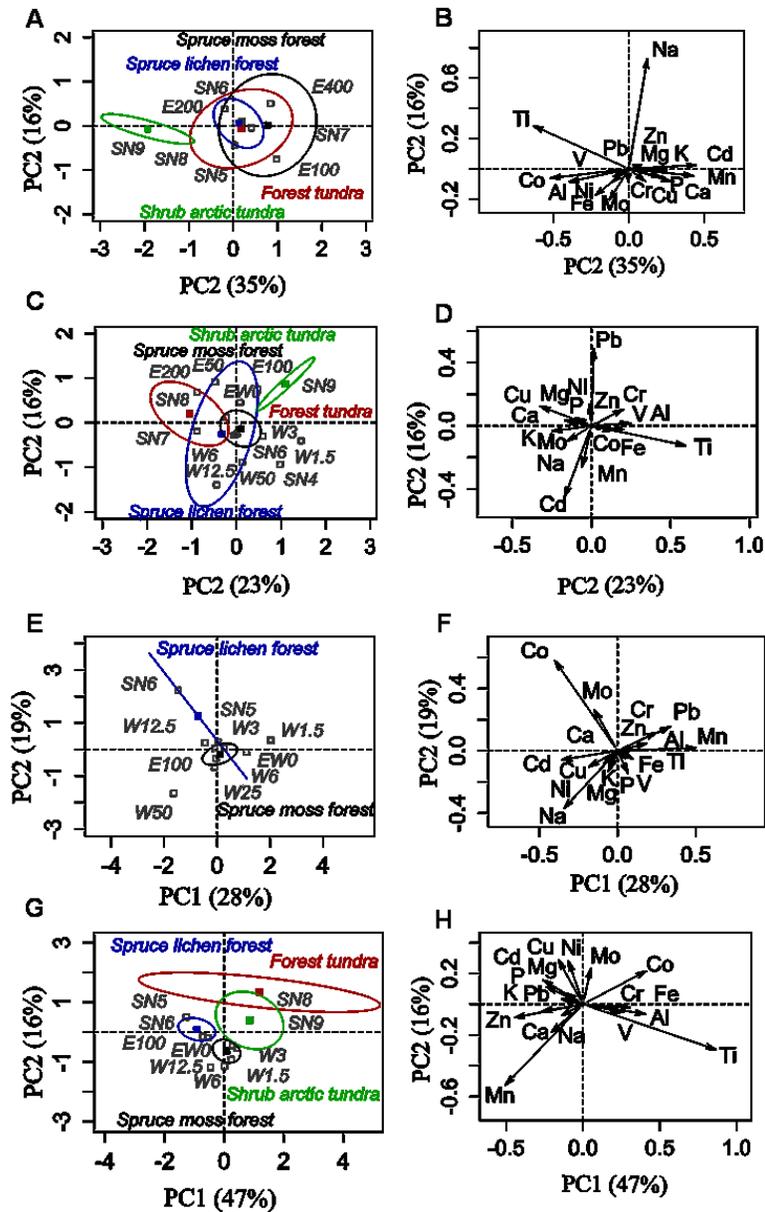


Figure S2. Geographical localities and vegetation types associated with metal deposition levels for each lichen-forming species.

PCA results are shown for (A, E) *Nephroma arcticum* (n=31), (B, F) *Peltigera aphthosa* s.l. (n=30), (C, G) *P. neopolydactyla* s.l. (n=16) and (D, H) *P. scabrosa* s.l. (n=33). Anomalies (SN2 and SN3) were not considered. Ellipse: $p = 0.95$. The lengths of arrows are generally short, i.e., closer to the center of the plot, compare to when all species are combined. This is highlighting the intraspecific homogeneity of the elemental composition.

1.4. Supplementary tables

Table S1. Number of specimens per species per site, with geographic coordinates for each sampling site used in this study.

See Fig. 1A for the location of all sites relative to dominant vegetation types.

Sampling site	N coordinate	W coordinate	<i>N. arcticum</i>	<i>P. aphthosa</i> s.l.	<i>P. neopolydactyla</i> s.l.	<i>P. scabrosa</i> s.l.	Total
W400	50.317	77.519	0	0	0	0	0
W200	50.640	72.970	0	0	0	0	0
W100	50.823	70.730	0	0	0	0	0
W50	50.904	69.565	0	1	1	0	2
W25	50.945	69.016	0	0	1	0	1
W12,5	50.955	68.719	0	2	2	1	5
W6	50.966	68.587	0	3	2	1	6
W3	50.970	68.511	0	3	1	1	5
W1,5	50.976	68.435	0	2	1	3	6
EW0	50.979	68.354	0	1	3	5	9
E50	51.069	67.171	0	1	0	0	1
E100	51.152	66.028	2	3	3	2	10
E200	51.303	63.765	1	3	0	0	4
E400	51.618	59.150	3	0	0	0	3
SN1	46.777	72.976	0	0	0	0	0
SN2	48.162	73.010	0	0	2	1	3
SN3	49.557	73.037	0	0	2	0	2
SN4	50.964	73.065	0	1	0	0	1
SN5	52.362	73.092	2	0	1	4	7
SN6	53.755	73.120	5	2	1	7	15
SN7	55.138	73.147	6	1	0	0	7
SN8	56.535	73.180	8	4	0	4	16
SN9	57.833	73.205	4	3	0	5	12
Total			31	30	20	34	115

Table S2. Characteristics of the analytical methods.

Method detection limits are the instrument detection limits corrected for dilution and weighing. Instrument detection limits represent three times a blank standard deviation. Replicability and repeatability are standard error of the same sample repeated intra-day and inter-day. Apparent recovery was obtained with addition of standard at a concentration between 50% and 150% of the sample concentration, except for Ca, K (10%) and Mg (25%).

	n	Na	Mg	Al	P	K	Ca	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Mo	Cd	Pb
Method Detection Limits (ppm)	-	12.5	12.5	5	50	12.5	25	1.25	0.025	0.075	0.5	0.5	0.025	0.125	0.125	1.25	0.025	0.025	0.025
Replicability (%)	5	-	2.1	0.7	2.2	-	-	11.8	1.9	1.1	0.6	6.2	3.3	1.6	1.4	3.6	2.9	2.8	0.9
Repeatability (%)	3	-	18.6	1.8	4.1	-	-	26.5	4.5	4.4	6.1	17.6	12.2	4.6	6.5	1.5	0.8	2.6	1.4
Apparent recovery (%)	-	0.99	1.01	1.03	1.26	-	1.00	0.98	1.04	1.09	1.12	0.97	1.07	1.06	1.06	1.10	1.03	1.01	0.80
SLRS 5																			
Certified value	-	5380	2540	49.5	-	839	10500	-	0.315	0.208	4.33	91.2	0.05	0.476	17.4	0.845	0.5	0.006	0.081
Tolerance		0.4	160	5	-	36	400	-	0.033	0.023	0.18	5.8	-	0.064	1.3	0.095	-	0.001	0.006
Average		5316	2612	47.39	-	833.2	10546	-	0.341	0.208	3.954	97.94	0.053	0.525	16.76	0.967	0.426	0.008	0.073
Repeatability (%)	11	20.0		6.2	-	14.8	22.8	-	11.5	13.7	4.0	5.9	4.6	5.2	3.6	35.2	43.8	6.6	5.3
Accuracy (%)	-	0.99	0.97	0.96	-	0.99	1.00	-	0.92	1.00	0.91	0.93	0.95	0.90	0.96	0.86	0.85	0.59	0.90

Table S3. Elemental concentration at each site (see Fig. 1).

Data from all lichen-forming species were pooled for each site. Data are reported in μg of element per g of oven dry weight lichen ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, dry weight) as median \pm median absolute deviation for each site.

Sites	n	Na	Mg	Al	P	K	Ca	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Mo	Cd	Pb
W400- W100	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W50	2	163 \pm 120	457 \pm 29	28 \pm 6	818 \pm 59	6008 \pm 781	910 \pm 44	1 \pm 0	0.16 \pm 0.05	0.11 \pm 0.02	62 \pm 12	38 \pm 1	0.03 \pm 0.01	1.4 \pm 0.8	3.6 \pm 1.0	17 \pm 3	0.03 \pm 0.00	0.12 \pm 0.08	0.12 \pm 0.05
W25	1	198	570	24	2615	9586	919	1	0.24	0.11	345	50	0.09	1.4	5.5	37	0.04	0.08	0.21
W12.5	5	316 \pm 70	522 \pm 68	54 \pm 19	1773 \pm 313	8297 \pm 762	1203 \pm 234	2 \pm 0	0.34 \pm 0.06	0.18 \pm 0.03	218 \pm 56	69 \pm 4	0.19 \pm 0.11	1.0 \pm 0.5	4.9 \pm 1.4	40 \pm 8	0.04 \pm 0.01	0.09 \pm 0.03	0.26 \pm 0.01
W6	6	123 \pm 67	456 \pm 74	43 \pm 12	1731 \pm 488	6146 \pm 1081	757 \pm 40	2 \pm 1	0.24 \pm 0.05	0.16 \pm 0.03	320 \pm 57	60 \pm 12	0.08 \pm 0.03	0.7 \pm 0.2	4.4 \pm 1.2	39 \pm 7	0.03 \pm 0.01	0.04 \pm 0.00	0.28 \pm 0.05
W3	5	135 \pm 77	482 \pm 39	43 \pm 18	1417 \pm 305	8088 \pm 374	818 \pm 90	2 \pm 0	0.24 \pm 0.02	0.17 \pm 0.02	224 \pm 52	69 \pm 9	0.07 \pm 0.01	0.8 \pm 0.4	4.5 \pm 0.3	32 \pm 12	0.05 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.21 \pm 0.06
W1.5	6	61 \pm 8	473 \pm 62	36 \pm 9	1587 \pm 330	7677 \pm 279	717 \pm 73	2 \pm 1	0.15 \pm 0.01	0.18 \pm 0.03	210 \pm 50	59 \pm 2	0.04 \pm 0.01	0.7 \pm 0.2	2.4 \pm 0.3	34 \pm 12	0.04 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.25 \pm 0.05
EW0	9	176 \pm 85	521 \pm 94	48 \pm 12	1386 \pm 178	7055 \pm 685	825 \pm 76	3 \pm 1	0.26 \pm 0.08	0.15 \pm 0.02	183 \pm 31	88 \pm 14	0.09 \pm 0.04	1.5 \pm 0.3	4.3 \pm 0.7	75 \pm 43	0.04 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	0.24 \pm 0.05
E50	1	188	518	36	824	7263	818	1	0.21	0.16	294	66	0.03	0.6	4.6	31	0.03	0.04	0.48
E100	10	75 \pm 35	413 \pm 54	24 \pm 4	1151 \pm 185	5574 \pm 1106	662 \pm 155	1 \pm 0	0.16 \pm 0.02	0.09 \pm 0.04	152 \pm 39	44 \pm 5	0.06 \pm 0.03	0.5 \pm 0.2	2.5 \pm 0.5	36 \pm 12	0.05 \pm 0.01	0.03 \pm 0.00	0.32 \pm 0.09
E200	4	91 \pm 37	480 \pm 34	30 \pm 5	1590 \pm 210	8044 \pm 364	1045 \pm 124	1 \pm 0	0.17 \pm 0.01	0.12 \pm 0.01	93 \pm 17	33 \pm 6	0.06 \pm 0.01	0.5 \pm 0.1	3.2 \pm 0.2	27 \pm 7	0.03 \pm 0.00	0.03 \pm 0.01	0.64 \pm 0.08
E400	3	131 \pm 28	458 \pm 136	35 \pm 14	1713 \pm 62	6586 \pm 633	623 \pm 37	1 \pm 0	0.16 \pm 0.02	0.10 \pm 0.00	86 \pm 2	30 \pm 6	0.10 \pm 0.07	0.3 \pm 0.1	3.2 \pm 1.2	42 \pm 1	0.04 \pm 0.02	0.08 \pm 0.02	0.29 \pm 0.07
SN1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SN2	3	190 \pm 8	1283 \pm 75	1448 \pm 107	1983 \pm 43	8496 \pm 1349	2121 \pm 13	64 \pm 1	6.48 \pm 0.03	2.46 \pm 0.08	184 \pm 15	4224 \pm 338	1.25 \pm 0.25	2.4 \pm 0.3	6.7 \pm 0.4	32 \pm 5	0.18 \pm 0.02	0.05 \pm 0.00	0.83 \pm 0.05
SN3	2	90	687 \pm 164	586 \pm 182	1462 \pm 213	7708	1551	63 \pm 12	2.02 \pm 0.29	1.35 \pm 0.32	301 \pm 126	978 \pm 222	0.61 \pm 0.11	2.5 \pm 0.0	6.9 \pm 0.0	51 \pm 19	0.15 \pm 0.06	0.12 \pm 0.10	0.40 \pm 0.13
SN4	1	-	533	22	1472	-	-	4	0.14	0.17	504	18	0.03	0.3	4.8	39	0.04	0.12	0.20
SN5	7	40 \pm 19	482 \pm 106	33 \pm 13	1328 \pm 425	6365 \pm 857	689 \pm 165	1 \pm 1	0.13 \pm 0.03	0.12 \pm 0.04	178 \pm 55	53 \pm 7	0.07 \pm 0.04	1.6 \pm 0.5	6.3 \pm 3.2	48 \pm 22	0.05 \pm 0.01	0.07 \pm 0.02	0.36 \pm 0.11
SN6	15	90 \pm 36	356 \pm 66	35 \pm 8	1060 \pm 399	6563 \pm 891	658 \pm 120	1 \pm 0	0.15 \pm 0.02	0.16 \pm 0.02	131 \pm 65	50 \pm 18	0.04 \pm 0.01	0.8 \pm 0.2	4.7 \pm 1.7	56 \pm 16	0.06 \pm 0.01	0.06 \pm 0.02	0.46 \pm 0.13
SN7	7	23 \pm 9	347 \pm 34	26 \pm 8	1135 \pm 44	6752 \pm 586	632 \pm 99	1 \pm 0	0.10 \pm 0.02	0.13 \pm 0.01	84 \pm 32	36 \pm 6	0.03 \pm 0.02	0.4 \pm 0.1	3.5 \pm 0.9	35 \pm 6	0.04 \pm 0.02	0.07 \pm 0.01	0.29 \pm 0.15
SN8	16	42 \pm 25	395 \pm 103	40 \pm 12	1266 \pm 326	5892 \pm 305	699 \pm 231	1 \pm 1	0.12 \pm 0.02	0.15 \pm 0.03	68 \pm 32	44 \pm 9	0.04 \pm 0.02	0.5 \pm 0.2	3.3 \pm 1.2	45 \pm 13	0.05 \pm 0.02	0.07 \pm 0.02	0.33 \pm 0.11
SN9	12	69 \pm 35	593 \pm 154	65 \pm 23	2382 \pm 317	5910 \pm 608	557 \pm 138	4 \pm 3	0.19 \pm 0.05	0.22 \pm 0.08	68 \pm 31	75 \pm 28	0.13 \pm 0.06	0.8 \pm 0.3	4.3 \pm 1.0	43 \pm 14	0.09 \pm 0.03	0.05 \pm 0.02	0.56 \pm 0.31

Table S4. Elemental concentration at each site for *Nephroma arcticum*.

Data are reported in µg of element per g of oven dry weight lichen (µg.g⁻¹, dry weight) as median ± median absolute deviation for each site.

Sites	n	Na	Mg	Al	P	K	Ca	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Mo	Cd	Pb
W400 - W100	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W50	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W25	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W12.5	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W6	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W3	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W1.5	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EW0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E50	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E100	2	<13	359±5	33±8	1235±127	7541	449	3±2	0.22±0.05	0.21±0.01	389±220	47±5	0.08±0.02	0.5±0.2	3.3±0.9	93±47	0.05±0.01	0.51±0.49	0.57±0.20
E200	1	-	451	33	2028	-	-	2	0.18	0.12	77	39	0.06	0.6	3.0	40	0.03	0.04	0.60
E400	3	131±28	458±136	35±14	1713±62	6586±633	623±37	1±0	0.16±0.02	0.10±0.00	89±2	30±6	0.09±0.07	0.3±0.1	3.2±1.2	42±1	0.04±0.02	0.08±0.02	0.29±0.07
SN1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SN2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SN3	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SN4	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SN5	2	36±24	248±31	55±18	814±89	6085±279	471±216	1±0	0.19±0.06	0.18±0.02	113±65	71±18	0.06±0.02	0.4±0.1	2.8±0.6	36±10	0.06±0.02	0.09±0.03	0.54±0.20
SN6	5	54±21	250±52	43±11	767±36	6541±649	540±30	2±0	0.15±0.02	0.18±0.03	46±7	42±13	0.05±0.01	0.6±0.1	2.6±0.3	41±9	0.04±0.01	0.05±0.01	0.41±0.13
SN7	6	21±4	342±22	31±10	1131±30	6764±304	623±59	1±1	0.10±0.03	0.13±0.02	76±20	38±5	0.05±0.02	0.4±0.2	3.1±0.5	36±6	0.04±0.01	0.07±0.02	0.24±0.08
SN8	8	30±13	348±26	36±6	996±116	5884±66	599±181	1±0	0.11±0.01	0.13±0.01	47±23	42±4	0.04±0.01	0.4±0.1	2.9±0.3	35±13	0.04±0.01	0.06±0.02	0.33±0.11
SN9	4	39±5	439±30	134±72	1130±118	6298±304	477±55	6±3	0.25±0.09	0.23±0.08	37±3	114±58	0.29±0.10	0.5±0.1	2.9±0.3	37±4	0.09±0.01	0.06±0.01	0.47±0.14

Table S5. Elemental concentration at each site for *Peltigera aphthosa* s.l..

Data are reported in µg of element per g of oven dry weight lichen (µg.g-1, dry weight) as median ± median absolute deviation for each site.

Sites	n	Na	Mg	Al	P	K	Ca	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Mo	Cd	Pb
W400- W100	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W50	1	42	428	34	759	5227	867	1	0.11	0.13	74	36	<0.03	0.6	2.6	14	0.03	0.04	0.17
W25	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W12.5	2	386±37	521±76	90±36	1617±156	8163±1406	1497±511	4±2	0.38±0.05	0.22±0.04	277±59	110±45	0.16±0.11	0.6±0.1	3.5±1.3	33±3	0.04±0.00	0.12±0.01	0.46±0.20
W6	3	191±3	405±27	60±16	1508±154	6146±154	717±34	3±1	0.25±0.03	0.18±0.03	293±18	76±22	0.10±0.01	0.6±0.0	5.5±2.3	38±4	0.05±0.01	0.04±0.01	0.34±0.09
W3	3	135±39	469±26	62±6	842±138	6755±1662	912±163	3±0	0.21±0.06	0.18±0.03	224±52	78±5	0.04±0.00	0.6±0.2	2.6±0.5	20±3	0.05±0.01	0.04±0.01	0.27±0.05
W1.5	2	79±27	519±53	41±5	1702±4	7705±267	717±21	2±1	0.14±0.00	0.18±0.03	206±8	60±3	0.05±0.00	0.4±0.0	2.4±0.2	22±1	0.06±0.03	0.20±0.16	0.20±0.00
EW0	1	483	477	94	1386	6935	905	6	0.39	0.19	183	109	0.09	0.4	4.3	30	0.06	0.10	0.32
E50	1	188	518	36	824	7263	818	1	0.21	0.16	294	66	0.03	0.6	4.6	31	0.03	0.04	0.48
E100	3	109±26	449±121	22±6	1309±116	7189±1405	806±191	1±0	0.13±0.01	0.12±0.01	194±82	35±10	0.06±0.01	0.4±0.1	3.4±0.6	27±5	0.03±0.00	0.03±0.00	0.39±0.17
E200	3	91±37	508±68	28±5	1438±116	8044±364	1045±124	1±0	0.16±0.02	0.12±0.01	110±34	27±1	0.06±0.02	0.4±0.0	3.4±0.3	22±3	0.04±0.00	0.03±0.00	0.68±0.15
E400	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SN1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SN2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SN3	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SN4	1	-	533	22	1472	-	-	4	0.14	0.17	504	18	0.03	0.3	4.8	39	0.04	0.12	0.20
SN5	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SN6	2	288	390±67	49±18	1334±165	6585	871	2±0	0.23±0.04	0.17±0.00	103±37	54±12	0.31±0.28	0.8±0.1	14.3±9.6	40±1	0.06±0.01	0.18±0.14	0.85±0.07
SN7	1	341	428	23	1362	5039	773	1	0.08	0.14	164	27	<0.03	0.4	23.7	29	0.03	0.05	0.57
SN8	4	155±17	585±102	44±6	1254±332	5385±697	1244±425	1±1	0.13±0.03	0.15±0.01	111±8	48±5	0.03±0.01	0.5±0.1	4.8±0.3	32±14	0.06±0.02	0.07±0.03	0.55±0.24
SN9	3	210	1107±397	107±49	2193±714	4432	1532	9±3	0.32±0.17	1.13±0.14	179±107	81±17	0.13±0.00	0.9±0.2	5.1±1.2	53±16	0.05±0.03	0.07±0.05	1.50±0.80

Table S6. Elemental concentration at each site for *Peltigera neopolydactyla* s.l..

Data are reported in µg of element per g of oven dry weight lichen (µg.g-1, dry weight) as median±median absolute deviation for each site.

Sites	n	Na	Mg	Al	P	K	Ca	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Mo	Cd	Pb
W400- W100	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W50	1	283	486	23	877	6790	954	2	0.21	0.08	50	39	0.04	2.2	4.7	21	0.03	0.20	0.08
W25	1	198	570	24	2615	9586	9190	1	0.24	0.11	345	50	0.09	1.4	5.5	37	0.04	0.08	0.21
W12.5	2	180	513±9	52±21	3021±361	5065	771	2±0	0.32±0.04	0.14±0.06	139±28	78±13	0.28±0.09	2.3±0.2	6.6±0.3	44±4	0.04±0.01	0.07±0.02	0.23±0.01
W6	2	88	439±87	32±10	1667±692	8349	818	5±3	0.23±0.07	0.14±0.05	515±184	48±5	0.13±0.10	1.2±0.4	3.3±0.9	31±10	<0.03	0.04±0.00	0.21±0.10
W3	1	27	482	25	1417	8349	818	2	0.25	0.07	238	64	0.09	1.4	4.5	32	0.04	0.04	0.05
W1.5	1	68	320	36	749	4067	743	2	0.16	0.21	366	57	0.04	0.6	1.8	21	0.06	0.03	0.68
EW0	3	91±1	521±27	37±2	1282±56	7175±931	807±63	3±1	0.33±0.03	0.15±0.02	136±3	76±12	0.20±0.07	1.5±0.2	3.7±0.3	24±1	0.03±0.00	0.06±0.02	0.20±0.02
E50	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E100	3	67±2	436±21	27±2	853±175	5365±678	751±41	1±0	0.16±0.01	0.07±0.00	121±5	45±0	0.08±0.04	1.0±0.2	2.0±0.2	27±4	0.03±0.00	0.03±0.00	0.15±0.05
E200	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E400	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SN1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SN2	2	170±20	1198±161	1162±393	1718±265	8425±1420	1794±340	72±8	4.57±1.94	1.88±0.66	288±119	3069±1155	1.17±0.33	2.5±0.4	7.6±0.9	30±2	0.21±0.03	0.06±0.00	0.68±0.20
SN3	2	90	687±164	586±182	1462±213	586	1462	63±12	2.02±0.29	1.35±0.32	301±126	978±222	0.61±0.11	2.5±0.0	6.9±0.0	51±19	0.15±0.06	0.12±0.10	0.40±0.13
SN4	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SN5	1	58	360	33	743	3942	1097	1	0.11	0.07	122	46	0.08	1.1	3.1	21	0.04	0.05	0.25
SN6	1	54	356	19	648	4466	718	1	0.08	0.10	91	30	0.55	0.8	2.4	22	0.16	0.10	0.15
SN7	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SN8	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SN9	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table S7. Elemental concentration at each site for *Peltigera scabrosa* s.l.

Data are reported in µg of element per g of oven dry weight lichen (µg.g-1, dry weight) as median ± median absolute deviation for each site.

Sites	n	Na	Mg	Al	P	K	Ca	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Mo	Cd	Pb
W400- W100	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W50	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W25	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W12.5	1	284	591	48	1763	8046	950	2	0.28	0.15	274	69	0.07	1.0	3.5	91	0.05	0.08	0.26
W6	1	50	507	36	1954	8828	757	2	0.19	0.13	530	67	0.07	1.1	4.7	90	0.03	0.07	0.26
W3	1	213	528	43	1624	8088	728	2	0.24	0.17	157	69	0.07	1.2	4.5	70	0.07	0.05	0.21
W1.5	3	54	479±32	28±7	1474±531	7916±23	597±307	2±2	0.15±0.03	0.17±0.02	206±84	60±4	0.04±0.01	0.9±0.0	2.8±0.7	64±19	0.03±0.00	0.04±0.01	0.29±0.01
EW0	5	-	540±113	48±10	1564±395	6717±685	815±55	2±0	0.23±0.05	0.14±0.01	195±16	88±10	0.08±0.03	1.6±0.3	5.1±0.8	106±14	0.04±0.00	0.05±0.00	0.24±0.03
E50	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E100	2	-	381±111	19±4	1054±37	4517±379	431±87	<1	0.16±0.03	0.06±0.01	100±35	38±5	0.03±0.00	0.6±0.1	2.4±0.1	50±9	0.05±0.00	<0.03	0.32±0.00
E200	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E400	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SN1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SN2	1	198	1283	1448	2026	8496	2121	63	6.48	2.46	184	4562	1.25	2.4	6.3	61	0.16	0.05	0.83
SN3	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SN4	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SN5	4	23	569±12	20±1	1510±177	7397±440	771±84	<1	0.12±0.01	0.10±0.02	224±53	50±7	0.08±0.05	1.9±0.2	8.4±1.9	96±40	0.08±0.04	0.08±0.01	0.37±0.09
SN6	7	92±5	422±70	28±6	1459±186	6669±958	758±159	1±0	0.14±0.02	0.14±0.03	187±35	57±3	0.04±0.01	1.5±0.5	5.9±0.4	104±27	0.06±0.01	0.07±0.01	0.46±0.08
SN7	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SN8	4	-	742±86	48±28	2185±837	6064±294	521±117	2±1	0.21±0.10	0.19±0.05	42±6	96±47	0.14±0.08	3.2±0.9	8.6±2.1	56±5	0.08±0.02	0.07±0.01	0.31±0.04
SN9	5	221	600±39	47±15	1685±392	5260±631	626±81	2±1	0.15±0.05	0.14±0.06	66±11	69±34	0.10±0.03	1.2±0.5	4.9±1.3	46±19	0.05±0.02	0.04±0.01	0.36±0.14

Table S8. Baseline concentration of elements for *Nephroma arcticum*, *Peltigera aphthosa* s.l., *P. neopolydactyla* s.l. and *P. scabrosa* s.l. in Québec.

SN2 and SN3 were excluded from the dataset. Min: lowest value of the dataset, Max: highest value of the dataset, MED: median, MAD: median absolute deviation, GM: Geometric mean.

Element	Lichen content ($\mu\text{g.gODWLichen-1}$)															
	<i>N. arcticum</i> (n=31)				<i>P. aphthosa</i> s.l. (n=30)				<i>P. neopolydactyla</i> s.l. (n=16)				<i>P. scabrosa</i> s.l. (n=33)			
	Min	Max	MED \pm MAD	GM	Min	Max	MED \pm MAD	GM	Min	Max	MED \pm MAD	GM	Min	Max	MED \pm MAD	GM
Na	<13	213	36 \pm 19	40	42	483	155 \pm 55	156	27	395	89 \pm 33	105	23	284	92 \pm 42	98
Mg	133	593	347 \pm 55	331	323	1597	493 \pm 83	533	320	570	469 \pm 67	439	271	1031	561 \pm 79	547
Al	10	213	40 \pm 13	40	17	176	46 \pm 17	47	19	73	30 \pm 7	31	15	515	34 \pm 13	35
P	543	2028	1091 \pm 195	1093	704	3435	1449 \pm 265	1410	648	3382	1182 \pm 383	1258	653	4995	1474 \pm 305	1548
K	3748	9041	6365 \pm 473	6297	4432	10898	6757 \pm 1286	6665	3942	9586	6304 \pm 1709	6101	4138	8828	6306 \pm 1028	6414
Ca	255	1243	540 \pm 108	550	615	2009	905 \pm 166	963	710	1419	812 \pm 81	872	290	1411	695 \pm 148	666
Ti	<1	21	2 \pm 1	2	<1	12	2 \pm 1	2	1	8	2 \pm 1	2	<1	80	1 \pm 1	1
V	0.07	0.58	0.15 \pm 0.04	0.15	0.08	0.6	0.18 \pm 0.06	0.19	0.08	0.36	0.22 \pm 0.06	0.21	0.10	2.2	0.16 \pm 0.04	0.18
Cr	0.10	0.68	0.15 \pm 0.03	0.16	0.10	1.27	0.17 \pm 0.03	0.20	<0,08	0.21	0.09 \pm 0.02	0.10	<0,08	1.43	0.14 \pm 0.03	0.14
Mn	19	610	69 \pm 29	71	58	1206	181 \pm 74	174	50	699	137 \pm 34	168	34	530	170 \pm 55	140
Fe	24	311	42 \pm 12	50	18	190	56 \pm 20	55	30	102	55 \pm 10	56	33	880	59 \pm 10	67
Co	<0.03	0.65	0.06 \pm 0.03	0.07	<0.03	0.59	0.05 \pm 0.03	0.06	0.03	0.55	0.09 \pm 0.05	0.11	0.03	0.79	0.05 \pm 0.02	0.07
Ni	0.2	2.0	0.5 \pm 0.2	0.5	0.2	1.1	0.5 \pm 0.1	0.5	0.5	2.5	1.3 \pm 0.5	1.2	0.5	4.7	1.5 \pm 0.5	1.5
Cu	1.9	8.8	2.9 \pm 0.4	3.0	2.1	23.8	4.1 \pm 1.0	4.4	1.8	6.8	3.9 \pm 1.2	3.6	2.1	16.7	5.6 \pm 1.9	5.6
Zn	17	140	40 \pm 8	41	12	68	30 \pm 9	29	20	83	26 \pm 5	30	27	166	70 \pm 23	75
Mo	<0.03	0.20	0.04 \pm 0.01	0.05	<0.03	0.16	0.04 \pm 0.01	0.05	<0.03	0.16	0.03 \pm 0.01	0.04	0.03	0.33	0.05 \pm 0.01	0.06
Cd	<0.03	1.00	0.06 \pm 0.02	0.07	<0.03	0.35	0.04 \pm 0.02	0.06	<0.03	0.20	0.04 \pm 0.02	0.05	<0.03	0.17	0.05 \pm 0.02	0.06
Pb	0.14	1.10	0.37 \pm 0.15	0.39	0.17	3.02	0.43 \pm 0.23	0.46	0.05	0.68	0.21 \pm 0.06	0.18	0.09	1.47	0.32 \pm 0.07	0.33

Table S9. Comparison of metal content from the entire thallus versus the margin of the thallus for *Nephroma arcticum*, *Peltigera aphthosa* s.l., and *P. scabrosa* s.l. (see method section for details).

Results are expressed as median ± median absolute deviation. Element contents are reported in µg of element per g of oven dry weight lichen (µg.g⁻¹, dry weight). Percentages are expressed with regard to the value from the entire lichen thallus. An asterisk indicates when data for one element was missing (K and Ca in entire thallus).

Element	<i>N. arcticum</i> n=6 (*n=5)			<i>P. aphthosa</i> n=4 (*n=3)			<i>P. scabrosa</i> n=4 (*n=3)		
	margin	entire	%	margin	entire	%	margin	entire	%
Mg	540±105	362±27	49	694±201	468±134	48	596±54	526±58	13
Al	14±8	24±3	-42	16±6	22±1	-27	14±3	16±2	-13
P	1896±911	1018±145	86	2027±718	1400±181	45	1896±403	1512±495	25
K	10294±1228	6775±1297*	52	8702±1596	7680±1356*	13	9589±2465	7222±521*	33
Ca	566±129	632±196*	-10	930±433	921±112*	1	676±53	685±250*	-1
Ti	1±0	1±0	0	1±0	1±0	0	<1±0	<1±0	-
V	0.07±0.03	0.08±0.01	-13	0.17±0.11	0.12±0.01	42	0.17±0.04	0.12±0.02	42
Cr	0.20±0.05	0.13±0.01	54	0.17±0.05	0.12±0.01	42	0.15±0.06	0.08±0.03	88
Mn	75±43	72±47	4	159±118	137±79	16	135±62	169±119	-20
Fe	26±11	28±4	-7	24±9	26±1	-8	34±2	40±5	-15
Co	0.01±0.01	0.03±0.01	-67	<0.03±0.01	0.03±0.00	-	0.05±0.06	0.06±0.04	-17
Ni	0.2±0.0	0.3±0.08	-33	0.6±0.3	0.4±0.1	50	3.0 ±0.3	1.6±0.8	88
Cu	4.5±1.3	2.5±0.4	80	5.1±2.4	3.8±1.3	34	9.3±2.2	6.9±5.9	35
Zn	36±13	28±8	29	29±15	24±6	21	93±24	98±64	-5
Mo	0.03±0.01	0.04±0.01	-25	0.03±0.01	0.03±0.00	0	0.04±0.02	0.05±0.02	-20
Cd	0.26±0.15	0.06±0.01	333	0.07±0.04	0.03±0.01	133	0.12±0.07	0.07±0.04	71
Pb	0.11±0.03	0.19±0.04	-42	0.22±0.03	0.48±0.26	-54	0.36±0.05	0.37±0.04	-3

Table S10. Comparison of element concentrations for the whole thallus versus the \leq 5 mm wide margin of the thallus.

(A) Data are averaged for all species (*Nephroma arcticum* n = 6 [*n = 5], *Peltigera aphthosa* s.l. n = 4 [*n = 3], *Peltigera scabrosa* s.l. n = 4 *n = 3]). * indicates that K and Ca were not analyzed in one sample (whole thallus). MED = Median. MAD = Median absolute deviation. Elements are sorted by increasing atomic weights. Element contents are expressed in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, dry weight. Percentages are expressed with respect to the entire lichen values. (B) P-values of a two-way ANOVA with interaction on clr transformed data with thallus part as first factor and species as the second factor. Only significant results for thallus part are shown.

A

	Margin of thalli		Whole thalli ^s		Difference
	MED \pm MAD ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		MED \pm MAD ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		%
Mg	599	\pm 140	424	\pm 107	41
Al	14	\pm 7	22	\pm 5	-36
P	1896	\pm 552	1266	\pm 416	50
K	9646	\pm 2300	7612	\pm 1083*	24
Ca	666	\pm 215	684	\pm 168*	-3
Ti	1	\pm 1	1	\pm 0	0
V	0.12	\pm 0.08	0.10	\pm 0.04	20
Cr	0.19	\pm 0.07	0.12	\pm 0.03	58
Mn	102	\pm 60	102	\pm 79	0
Fe	33	\pm 6	28	\pm 5	-18
Co	0.02	\pm 0.01	0.03	\pm 0.01	-30
Ni	0.4	\pm 0.4	0.4	\pm 0.2	0
Cu	5.0	\pm 2.7	3.2	\pm 1.1	56
Zn	42	\pm 27	29	\pm 11	45
Mo	0.03	\pm 0.01	0.03	\pm 0.01	0
Cd	0.16	\pm 0.13	0.06	\pm 0.04	167
Pb	0.22	\pm 0.17	0.30	\pm 0.15	-27

B

Element	P value		
	Species	Thallus part	Interaction
Mg	0.18	0.024	0.43
Al	<0.001	<0.001	0.064
P	0.174	0.004	0.245
K	0.002	0.019	0.849
Cr	<0.001	0.002	0.819
Fe	0.022	<0.001	0.813
Co	0.326	0.005	0.776
Cd	<0.001	<0.001	0.060
Pb	<0.001	<0.001	0.198

ANNEXE 2. INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES DU CHAPITRE 4

Is vanadium a biometal for boreal cyanolichens?

Tableau 23. *P*-values of one-way analysis of variance (ANOVA) Holm-Sidak from Fig 1. a, Magnesium (Mg). b, Molybdenum (Mo). c, Lead (Pb). d, Vanadium (V).

a		b	
Mg	P-value	Mo	P-value
UWT/WT	<0.001	UWT/WT	0.433
UWT/ALG	0.328	UWT/ALG	0.018
UWT/CEP	<0.001	UWT/CEP	<0.001
WT/ALG	<0.001	WT/ALG	0.083
WT/CEP	0.466	WT/CEP	<0.001
ALG/CEP	<0.001	ALG/CEP	<0.001

c		d	
Pb	P-value	V	P-value
UWT/WT	<0.001	UWT/WT	0.218
UWT/ALG	<0.001	UWT/ALG	0.799
UWT/CEP	<0.001	UWT/CEP	<0.001
WT/ALG	0.51	WT/ALG	0.262
WT/CEP	0.432	WT/CEP	<0.001
ALG/CEP	0.742	ALG/CEP	<0.001

Tableau 24. Content and ratio of Vanadium (V) and Aluminium (Al) for different compartments of *P. aphthosa*.

V content and Al content are expressed in $\mu\text{g}_{\text{element}} \cdot \text{g}_{\text{ODWlichen}}^{-1}$, V:Al (mol:mol) molar ratios from paired samples with paired t-test (only thalli with all compartments represented were kept, n=23,) and correlation factor (r^2) from linear regression of Al : Phosphore (P) (mol:mol) ratio and V: P (mol:mol) ratio.

		Cephalodia		Algae		Washed thalli		Exposition	
		Al	V	Al	V	Al	V	Al	V
Metal content (ppm)	Content	37.86 ^a	0.41 ^A	-	-	47.31 ^a	0.15 ^B	53.92 ^a	0.21 ^B
	<i>SE</i>	5.15	0.04	-	-	5.26	0.01	7.11	0.02
Paired-ratio (mol:mol) n=23	Ratio V / Al	8.14E-03 ^a		2.15E-03 ^{bc}		2.01E-03 ^c		2.33E-03 ^b	
	<i>SE</i>	1.08E-03		2.47E-04		1.27E-04		1.54E-04	
Linear regression	R^2	0.23		0.29		0.95		0.69	
	n	27		26		29		28	

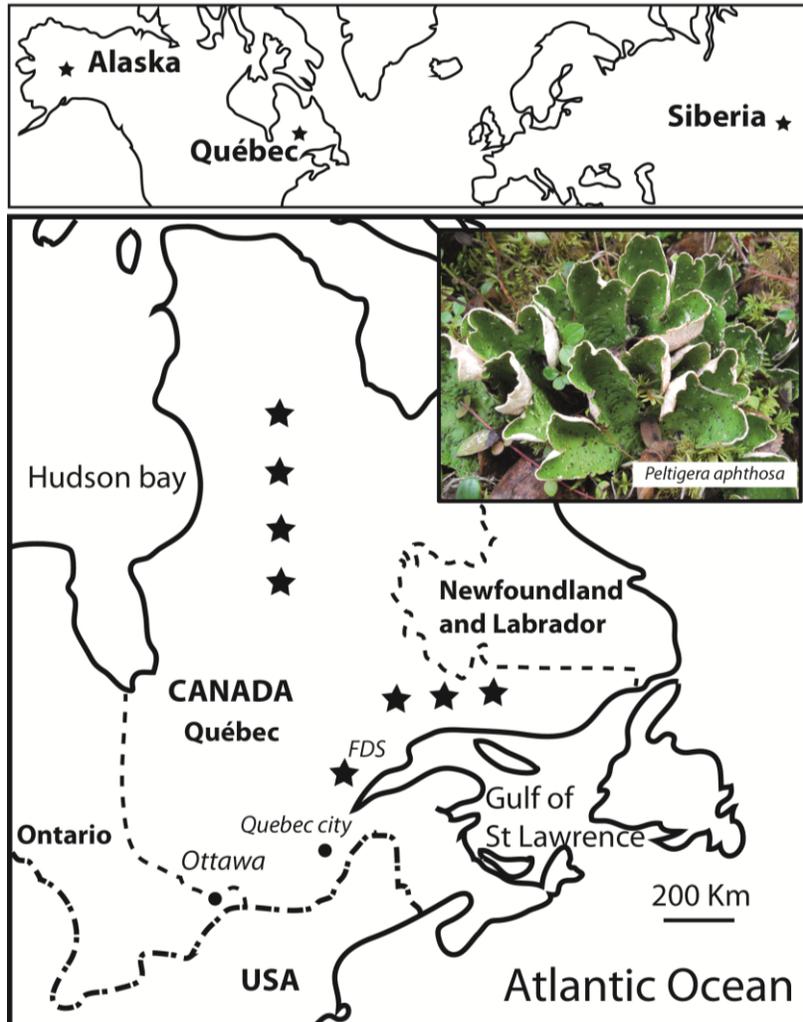


Figure 36. Localisation (stars) of the sampling sites in Québec, Canada, Alaska, USA, and Siberia, Russia; as well as a picture of the tri-membered lichen *Peltigera aphthosa* taken in the field.

Seven sites were sampled in Québec compare to one site in Alaska and Siberia, respectively. Most of the thallus is formed by the mycobiont. The green color comes from the green alga *Coccomyxa*, and the small black dots on the surface of the thallus are cephalodia containing the N₂ fixing cyanobacterium *Nostoc*.

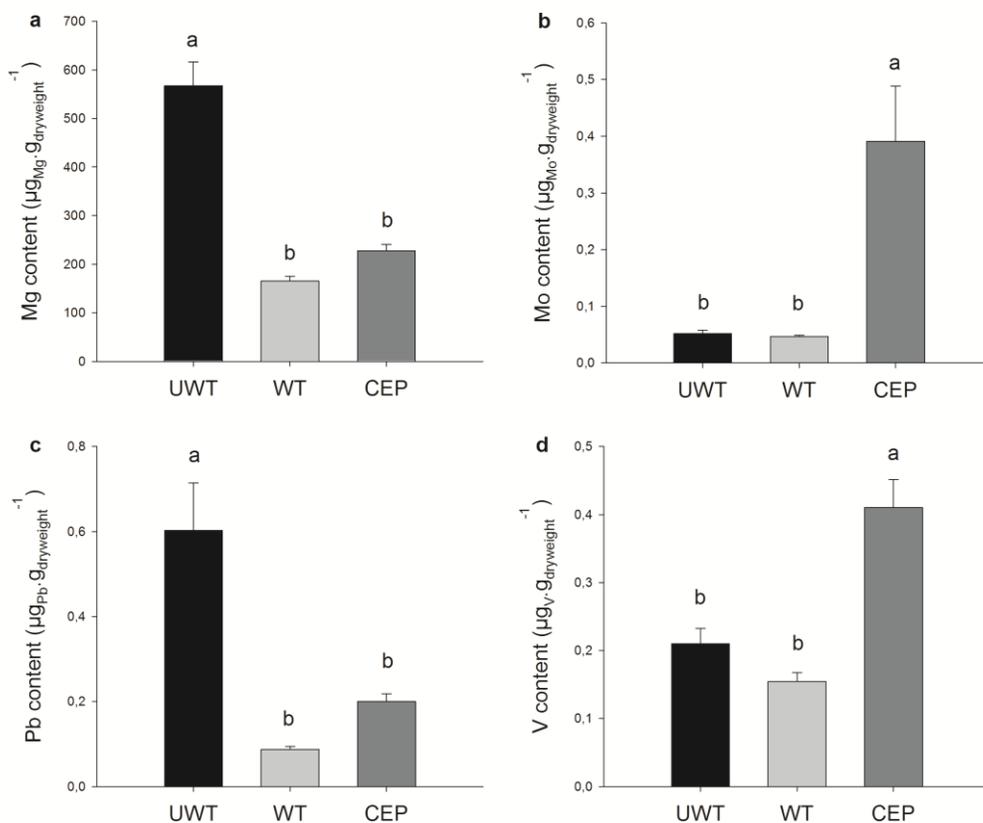


Figure 37. Comparison of metals content in ppm ($\mu\text{g}_{\text{metal}} \cdot \text{g}_{\text{dryweight}}^{-1}$) between unwashed lichens, (i.e., exposition) (UWT), Ox/EDTA-washed lichen thalli (WT) and cephalodia (CEP).

Metal are a, Magnesium (Mg). b, Molybdenum (Mo). c, Lead (Pb) and d, Vanadium (V). Error bars are standard error, $n = 28, 29$ and 27 for UWT, WT and CEP, respectively. Identical letters indicate no significant difference according to a one-way analysis of variance (ANOVA), Holm-Sidak, $P < 0.001$.

ANNEXE 3. INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES DU CHAPITRE 5

Alternative nitrogenases contribute to biological nitrogen fixation in boreal cyanolichens.

3.1. Supplementary methods

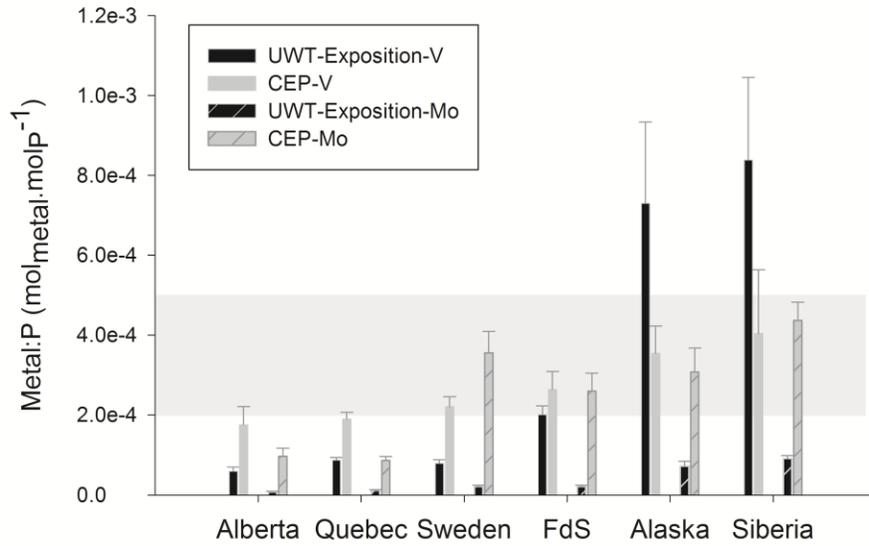
Contribution of alternative nitrogenase to acetylene reduction ($f_{\text{alt ara}}$) and to N_2 fixation ($f_{\text{alt N}_2}$) are calculated according to Zhang et al under review:(Zhang et al.)

$$f_{\text{alt ara}} = \frac{({}^{13}\epsilon_{\text{Mo}} - {}^{13}\epsilon_{\text{AR,sample}})}{({}^{13}\epsilon_{\text{Mo}} - {}^{13}\epsilon_{\text{alt}})}$$

$$f_{\text{alt N}_2} = \frac{(f_{\text{alt ara}}/1)}{\left(\frac{f_{\text{alt ara}}}{1}\right) + \left(\frac{1 - f_{\text{alt ara}}}{3}\right)}$$

Isozyme specific ${}^{13}\epsilon$ (see main text) for Mo and V were determined in deletion mutants CA 1.70 (Mo-Nase only) and CA11.70 (V-Nase only) of *Azotobacter vinelandii*, in *Rhodospseudomonas palustris* wild type (CGA009) and deletion mutant CGA753 (Mo-Nase only) and CGA766 (V-Nase only) and in wild type strain of *Anabaena variabilis* (ATCC 29413) as ${}^{13}\epsilon_{\text{Mo}} = 13.77 \pm 0.14\text{‰}$ and ${}^{13}\epsilon_{\text{V}} = 7.87 \pm 0.09\text{‰}$. Value of ${}^{13}\epsilon_{\text{alt}}$ for V was used for all calculation of in this manuscript.

A



B

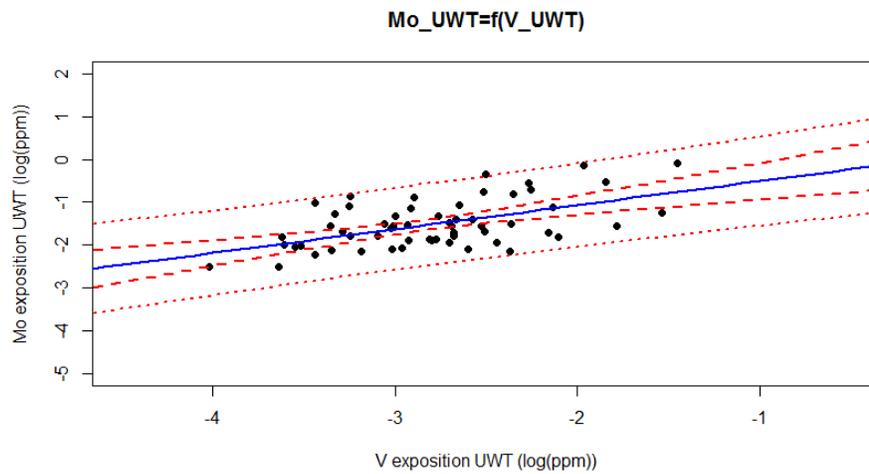


Figure S1. Unwashed thallus (UWT, i.e., metal exposure) and cephalodia (CEP) content for V and Mo.

(A) Metal content of UWT and CEP on sampling sites express in $\text{mol}_V \cdot \text{mol}_P^{-1}$ (modification of Darnajoux et al. 2014) pale background represents optimal V and Mo cellular quota required to sustain diazotrophic growth (Darnajoux et al. 2014) (B) Linear regression of Mo exposition ($\mu\text{g}_{\text{Mo}} \cdot \text{g}_{\text{thallus}}^{-1}$) and V exposition ($\mu\text{g}_{\text{Mo}} \cdot \text{g}_{\text{thallus}}^{-1}$) in lichen thallus in non-heavily contaminated sites over boreal biome. (All data were log-transform achieve normality of residues and to avoided spurious correlation).

Table S1. Literature review of BNF estimation and measurement conditions for cryptogamic species in various biomes around the world.

Geography	Details	Species	BNF estimation (kgN.ha ⁻¹ .yr ⁻¹)	ARA	ARA condition	¹⁵ N calibration	¹⁵ N condition	C ₂ H ₂ : N ₂ (mol.mol ⁻¹)	References
New Mexico	Alpine climat, Douglas fir, spruce fir	<i>Peltigera</i> spp.	0.04-3.3	No	-	No	-	Forman 1975 estimations	(Forman and Dowden 1977)
West North Carolina		<i>Lobaria pulmonaria</i> , <i>Lobaria quercizans</i>	0.8	Yes	Field (1h)	No	-	N.C.	(Becker 1980)
New Zealand	Urewera National Park,	<i>Sticta</i> , <i>Pseudocyphellaria</i>	1 - 10	Yes	26°C, 1h30 - 3h	Yes	26°C, 1h30 - 3h	C ₂ H ₂ =5.6*N ₂ -6.3	(Green et al. 1980)
Scotland and South Wales		<i>Peltigera membranacea</i> , <i>P. polydactyla</i> , <i>Lobaria pulmonaria</i>	2.4-5.8	Yes	Climatic chamber 2.5°C-18°C	Yes	Climatic chamber 2.5°C-18°C	7.8-12.2	(Millbank 1981)
Nebraska	Prairies	Cyanolichens, heterotrophs	3.5	Yes	18°C-22°C	No	-	3	(Kapustka and DuBois 1987)
Northwest Pacific	Canopy	<i>Lobaria oregana</i>	1.5-16.5	Yes	Field/Labo (0°C-20°C)	No	-	4	(Antoine 2004)
Puerto Rico	Tropical forest	Soil, phyllophyte, moss, lichens	8.4-12.3	Yes	Field	No	-	3	(Cusack et al. 2009)
South-central Chile	Rain forest chronosequence	Soil, cyanolichens, moss	0-6	Yes	Laboratory	No	-	3	(Pérez et al. 2014)
Sweden, Finland, Norway	Boreal forest	<i>Pleurozium schreberi</i>	1.5-2	Yes	Field	Yes	Lab	3	(DeLuca et al. 2002)
Northern Sweden	Boreal forest chronosequence	<i>Pleurozium schreberi</i> , <i>Hylocomnium splendens</i>	1.6	Yes		ND		3	(Zackrisson et al. 2009)
Northern Sweden	Boreal forest chronosequence	<i>Pleurozium schreberi</i>	0.2-7	Yes		No		3	(DeLuca et al. 2007)

Northern Sweden	Boreal forest chronosequence	<i>Pleurozium schreberi</i>	0.5-2	Yes		Yes	Lab	3	(Zackrisson et al. 2004)
Northern Sweden	Boreal forest	<i>Pleurozium schreberi</i> , <i>Hylocomnium splendens</i>	0.52-2	Yes		Yes (<i>H.splendens</i>)	Lab	3	(Lagerström et al. 2007)
Northern Sweden	Sub arctic	<i>Sphagnum</i> , <i>Drepanocladus</i>	94	Yes		No		3	(Granhall and Selander 1973)
Northern Sweden	Sub arctic	<i>Sphagnum</i>	32	Yes		No		3	(Basilier and Granhall 1978)
British Columbia	Rain forest	Moss	0.26-0.76	Yes	16°C	No		3	(Lindo and Whiteley 2011)
Arctic	High Arctic	Soil and cyanobacterial mat	0.6-1	Yes	Field	No	-	3	(Henry and Svoboda 1986)
Ohio	Prairies	<i>Nostoc</i> sp.	4.6+3.19	Yes	Field (9°C-30°C)	No		3	(Dubois and Kapustka 1983)
Inner Mongolia	Stepp	<i>Nostoc</i> sp., lichens	0.033-0.087	Yes	25°C	Yes	5°C and 25°C	0.31	(Holst et al. 2009)
Southern Utah		Biocrust	0.02-3.63	Yes	21°C-22.5°C	No		3	(Jeffries et al. 1992)
Indiana, South Lake Michigan	Sand dune soil	Soilcrust	0.2-8	No		No	Mass bilan		(Thiet et al. 2005)
China, Loess plateau	Soil, grazzland	Biocrust	4-13	Yes	growth chambers (5°C to 45°C)	No		3	(Zhao et al. 2010)
Southern Utah		Biocrust	1.4-13	Yes	26°C	No		0.062	(Belnap 2002)
Southern Alberta		<i>Nostoc</i> sp.	0.1-0.773 (31days)	Yes	Field with water bath	No		3	(Coxson and Kershaw 1983)
Niger		Biocrust	3.5	Yes	30°C	No		NC	(Malam Issa et al. 2001)

Northwest China	Desert	Biological soil crust	C2H2 data only	Yes	26°C (24h)	No		3	(Wu et al. 2009)
Zambia, Botswana		Soil crust	0.008-0.044	Yes	Field (48h)	No		3	(Aranibar et al. 2003)
Costa Rica	Rain forest	<i>Scytonema</i> sp.	2-5	Yes	Field	No		4	(Freiberg 1998)
French Guiana	Tropical forest	Cyanobacteria biofilm	134-233	No		No	Value from Freiberg 1998		(Dojani et al. 2007)
North western Ohio		Biocrust	1.3	Yes	26°C (4h)	No		3.2	(Veluci et al. 2006)
Western North Carolina		Woody litter, soil, phyllosphere, leaf litter	12.04	Yes	18°C (16-24h)	No		NC	(Todd et al. 1978)
Papua New Guinea, Australia		Phyllosphere	0.5	Yes	Field	No		3	(Goosem and Lamb 1986)
California		Soil	2.1-4.8	Yes	Lab (26°C, 1h)	Yes	Lab (26°C, 1h)	3.1-8.4	(Steyn and Delwiche 1970)
Central Sweden	Boreal forest	Soil	0.4-1.4	Yes	Lab (20°C)	Yes	Lab (20°C)	1.6-5.6	(Nohrstedt 1985)
Ontario	Boreal transition zone	Soil	0.02-0.26	Yes	30°C	No		3	(Hendrickson 1990)
Hawai		Soil	0.06-1.29	Yes	Lab	Yes		3.9	(Vitousek and Hobbie 2000)
Oregon		Wood log	1.4	Yes	Lab 22°C	Yes	Lab 22°C	3.5	(Silvester et al. 1982)
Oregon		Wood roots	6.3	Yes	Lab 22°C	Yes	Lab 22°C	3.5	(Chen and Hicks 2003)
Hawaii		Leaf litter, roots, soil	0.1-4.9	Yes	Lab (12 to 28°C)	Yes	Lab, 25°C	1.07-12.1	(Ley and D'Antonio 1998)

Germany (bavaria)		soil	0.2	Yes	Lab (20°C)	Yes	Lab	6-8	(Limmer and Drake 1996)
Oregon	Andrew experimental forest	<i>Lobaria oregana</i>	3.5	Yes	Field (1h)	No		3	(Denison 1979)
Hawai	Kilauea volcano	<i>Stereocaulon volceni</i> , leaf litter, liverworts	0.3-2.8	Yes	Field (24h)	Yes	Lab?	3.1/ 3.8 / 5.4	(Vitousek 1994)
New zealand	60000 yrs chronosequence	<i>Coriaria</i> / lichens/moss/ litter	11/0.02-2/0.7-9.6/1.1-1.9	Yes	Field	Yes	Field	1.33/1.58/0.25	(Menge and Hedin 2009)

ANNEXE 4. INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES DU CHAPITRE 6

Temperature dependency of molybdenum and vanadium nitrogenases activity.

4.1. Supplementary figures and tables

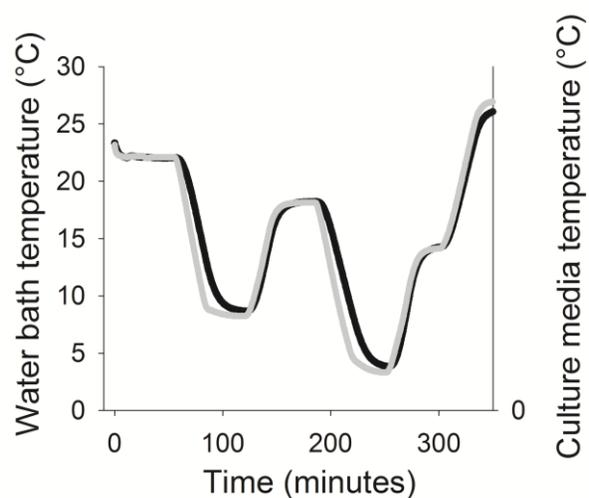


Figure S1. Response to temperature variation.

Water bath temperature (grey curve) and culture media temperature (black curve).

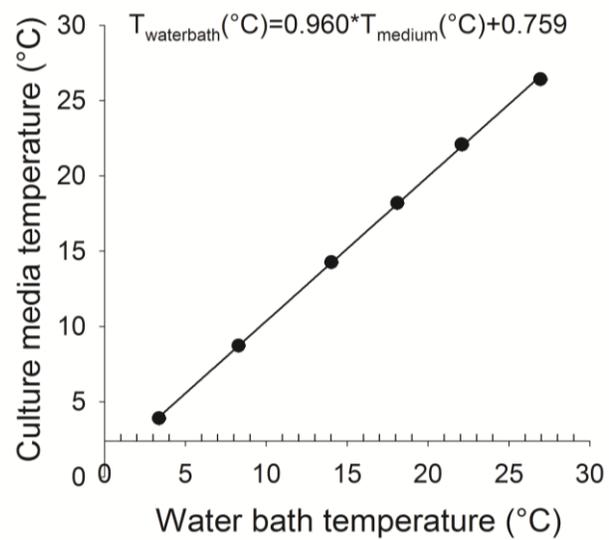


Figure S2 Evolution of temperature of the culture medium and of the water bath

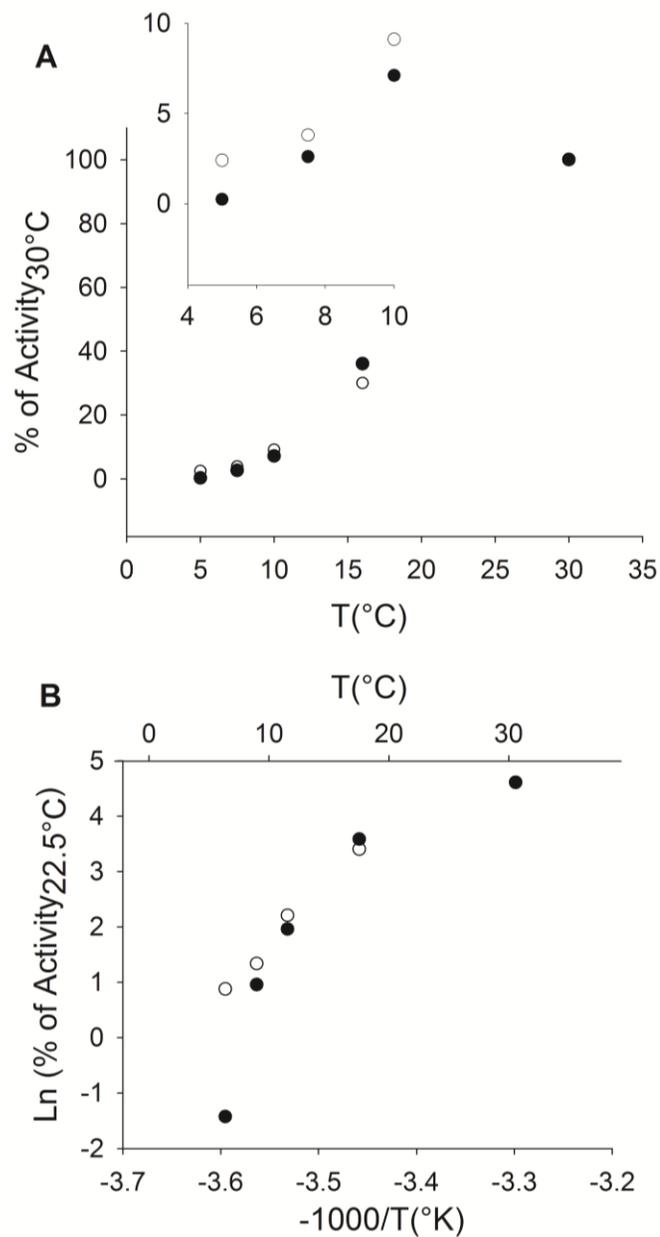


Figure S3. Representation of the result obtain by Miller and Eady 1988 (Miller and Eady 1988) for comparison purpose

A) NH₃ production at different temperatures for purified Mo-Nase and V-Nase, B)Arrhenius plots derived from the activity.

Table S1 Growth rate of *Anabaena variabilis* in function of temperature and growth phase.

Temperature (°C)	Exponential growth phase (n=3)					Linear growth phase (n=3)				
	Mo (d ⁻¹)	SD	V (d ⁻¹)	SD	% V / Mo	Mo (OD.ml ⁻¹ .d ⁻¹)	SD	V (OD.ml ⁻¹ .d ⁻¹)	SD	% V / Mo
20	0.56	0.05	0.57	0.04	102	0.07	0.01	0.059	0.002	84
25	1.27	0.06	1.07	0.09	84	0.08	0.02	0.08	0.03	100

ANNEXE 5. SUPPLEMENTARY BIBLIOGRAPHY

- Aitchison J. A concise guide to compositional data analysis. 2nd CDA Work. Girona, Spain; 2003.
- Antoine ME. An ecophysiological approach to quantifying nitrogen fixation by *Lobaria oregana*. *Bryologist*. 2004;107(1):82–7.
- Aranibar J., Anderson I., Ringrose S, Macko S. Importance of nitrogen fixation in soil crusts of southern African arid ecosystems: acetylene reduction and stable isotope studies. *J Arid Environ*. 2003;54(2):345–58.
- Basilier K, Granhall U. Nitrogen Fixation in Wet Minerotrophic Moss Communities of a Subarctic Mire. *Oikos*. 1978;31(1978):236–46.
- Becker VE. Nitrogen Fixing Lichens in Forests of the Southern Appalachian Mountains of North Carolina. *Bryologist*. 1980;83(1):29–39.
- Belnap J. Nitrogen fixation in biological soil crusts from southeast Utah, USA. *Biol Fertil Soils*. 2002;35(2):128–35.
- Bergamaschi L, Rizzio E, Giaveri G, Profumo A, Loppi S, Gallorini M. Determination of baseline element composition of lichens using samples from high elevations. *Chemosphere*. 2004;55(7):933–9.
- Bindler R, Renberg I. Pb isotope ratios of lake sediments in West Greenland: inferences on pollution sources. *Atmos Environ*. 2001;35:4675–85.
- Buccianti A. Is compositional data analysis a way to see beyond the illusion? *Comput Geosci*. Elsevier; 2013;50:165–73.
- Chen H, Hicks W. High asymbiotic N₂ fixation rates in woody roots after six years of decomposition: controls and implications. *Basic Appl Ecol*. 2003;4(5):479–86.
- Coxson DS, Kershaw K a. The pattern of in situ summer nitrogenase activity in terrestrial *Nostoc commune* from *Stipa* and *Bouteloua* grassland, southern Alberta. *Can J Bot*. 1983;61:2686–93.
- Cusack DF, Silver W, McDowell WH. Biological nitrogen fixation in two tropical forests: Ecosystem-level patterns and effects of nitrogen fertilization. *Ecosystems*. 2009;12(8):1299–315.
- Darnajoux R, Constantin J, Miadlikowska J, Lutzoni F, Bellenger J-P. Is vanadium a biometal for boreal cyanolichens? *New Phytol*. 2014;202(3):765–71.
- DeLuca TH, Zackrisson O, Gentili F, Sellstedt A, Nilsson MC. Ecosystem controls on nitrogen fixation in boreal feather moss communities. *Oecologia*. 2007;152(1):121–30.
- DeLuca TH, Zackrisson O, Nilsson M-C, Sellstedt A. Quantifying nitrogen-fixation in feather moss carpets of boreal forests. *Nature*. 2002;419(6910):917–20.

- Denison WC. *Lobaria oregana*, a nitrogen-fixing lichen in old-growth Douglas fir forests. In: Gordon JC, Wheeler CT, Perry DA, editors. *Symbiotic nitrogen Fixat Manag Temp For*. Corvallis: Oregon State University; 1979. p. 266–75.
- Dojani S, Lakatos M, Rascher U, Wanek W, Lüttge U, Büdel B. Nitrogen input by cyanobacterial biofilms of an inselberg into a tropical rainforest in French Guiana. *Flora*. 2007;202(7):521–9.
- Dubois J, Kapustka L a. Biological nitrogen influx in an Ohio relict prairie. *Am J Bot*. 1983;70(1):8–16.
- Filzmoser P, Hron K, Reimann C. Principal component analysis for compositional data with outliers. *Environmetrics*. 2009;20(6):621–32.
- Forman RTT, Dowden DL. Nitrogen fixing lichen roles from desert to alpine in the Sangre de Cristo mountains, New Mexico. *Bryologist*. 1977;80(4):561–70.
- Freiberg E. Microclimatic parameters influencing nitrogen fixation in the phyllosphere in a Costa Rican premontane rain forest. *Oecologia*. 1998;117(1):9–18.
- Goosem S, Lamb D. Measurements of phyllosphere nitrogen fixation in a tropical and two sub-tropical rain forests. *J Trop Ecol*. 1986;2(04):373.
- Gouvernement du Québec. Cartes Minières [Internet]. 2013. Available from: <http://www.mrn.gouv.qc.ca/mines/publications/publications-cartes.jsp>
- Granhall U, Selander H. Nitrogen fixation in a subarctic mire. *Oikos*. 1973;24(1):8–15.
- Green TG a., Horstmann J, Bonnett H, Wilkins A, Silvester WB. Nitrogen fixation by members of the Stictaceae (Lichenes) of New Zealand. *New Phytol*. 1980;84(2):339–48.
- Hendrickson OQ. Asymbiotic nitrogen fixation and soil metabolism in three Ontario forests. *Soil Biol Biochem*. 1990;22(7):967–71.
- Henry GHR, Svoboda J. Dinitrogen fixation (acetylene reduction) in high Arctic sedge meadow communities. *Arct Alp Res*. 1986;18(2):181–7.
- Holst J, Butterbach-Bahl K, Liu C, Zheng X, Kaiser AJ, Schnitzler JP, et al. Dinitrogen fixation by biological soil crusts in an Inner Mongolian steppe. *Biol Fertil Soils*. 2009;45(7):679–90.
- Jeffries DL, Klopatek JM, Link SO, Bolton H. Acetylene reduction by cryptogamic crusts from a blackbrush community as related to resaturation and dehydration. *Soil Biol Biochem*. 1992;24(11):1101–5.
- Kapustka L a., DuBois JD. Dinitrogen Fixation by Cyanobacteria and Associative Rhizosphere Bacteria in the Arapaho Prairie in the Sand Hills of Nebraska. *Am J Bot*. 1987;74(1):107.
- Lagerström A, Nilsson MC, Zackrisson O, Wardle DA. Ecosystem input of nitrogen through biological fixation in feather mosses during ecosystem retrogression. *Funct Ecol*. 2007;21(6):1027–33.
- Ley RE, D'Antonio CM. Exotic grass invasion alters potential rates of N fixation in Hawaiian woodlands. *Oecologia*. 1998;113(2):179–87.

- Limmer C, Drake HL. Non-symbiotic N₂-fixation in acidic and pH-neutral forest soils: Aerobic and anaerobic differentials. *Soil Biol Biochem.* 1996;28(2):177–83.
- Lindo Z, Whiteley J a. Old trees contribute bio-available nitrogen through canopy bryophytes. *Plant Soil.* 2011;342(1-2):141–8.
- Loppi S, Nelli L, Ancora S, Bargagli R. Accumulation of trace elements in the peripheral and central parts of a foliose lichen thallus. *Bryologist.* 1997;100(2):251–3.
- Malam Issa O, Stal LJ, Défarge C, Couté a., Trichet J. Nitrogen fixation by microbial crusts from desiccated Sahelian soils (Niger). *Soil Biol Biochem.* 2001;33(10):1425–8.
- Menge DNL, Hedin LO. Nitrogen fixation in different biogeochemical niches along a 120 000-year chronosequence in New Zealand. *Ecology.* 2009;90(8):2190–201.
- Millbank JW. The assessment of nitrogen fixation and throughput by lichens. I The use of a controlled environment chamber to relate acetylene reduction estimates to nitrogen fixation. *New Phytol.* 1981;89(4):647–55.
- Miller RW, Eady RR. Molybdenum and vanadium nitrogenases of *Azotobacter chroococcum*. Low temperature favors N₂ reduction by vanadium nitrogenase. *Biochem J.* 1988;256:429–32.
- Monaci F, Fantozzi F, Figueroa R, Parra O, Bargagli R. Baseline element composition of foliose and fruticose lichens along the steep climatic gradient of SW Patagonia (Aisén Region, Chile). *J Environ Monit.* 2012;14(9):2309–16.
- Nohrstedt H-Ö. Nonsymbiotic nitrogen fixation in the topsoil of some forest stands in central Sweden. *Can J For Res.* 1985;15(4):715–22.
- Pérez C a., Thomas FM, Silva W a., Segura B, Gallardo B, Armesto JJ. Patterns of biological nitrogen fixation during 60 000 years of forest development on volcanic soils from south-central Chile. *N Z J Ecol.* 2014;38(2):189–200.
- Ranganathan Y, Borges RM. To transform or not to transform: That is the dilemma in the statistical analysis of plant volatiles. *Plant Signal Behav.* 2011;6(1):113–6.
- Silvester WB, Sollins P, Verhoeven T, Cline SP. Nitrogen fixation and acetylene reduction in decaying conifer boles: effects of incubation time, aeration, and moisture content. *Can J For Res.* 1982;12(3):646–52.
- Simonetti A, Gariépy C, Carignan J. Pb and Sr isotopic compositions of snowpack from Quebec, Canada: inferences on the sources and deposition budgets of atmospheric heavy metals. *Geochim Cosmochim Acta.* 2000;64(1):5–20.
- Steyn PL, Delwiche CC. Nitrogen fixation by nonsymbiotic microorganisms in some California soils. *Environ Sci Technol.* 1970;4(12):1122–8.
- Thiet RK, Boerner REJ, Nagy M, Jardine R. The effect of biological soil crusts on throughput of rainwater and N into Lake Michigan sand dune soils. *Plant Soil.* 2005;278(1-2):235–51.

- Todd RL, Meyer RD, Waide JB. Nitrogen fixation in a deciduous forest in the southeastern United States. *Ecol Bull.* 1978. p. 172–7.
- Tolosana-Delgado R. Uses and misuses of compositional data in sedimentology. *Sediment Geol.* Elsevier B.V.; 2012;280:60–79.
- Veluci RM, Neher D a., Weicht TR. Nitrogen fixation and leaching of biological soil crust communities in mesic temperate soils. *Microb Ecol.* 2006;51(2):189–96.
- Vitousek PM. Potential nitrogen fixation during primary succession in Hawai`i volcanoes national park. *Biotropica.* 1994;26(3):234–40.
- Vitousek PM, Hobbie S. Heterotrophic Nitrogen fixation in decomposing litter: Patters and Regulation. *Ecology.* 2000;81(9):2366–76.
- Wu N, Zhang YM, Downing a. Comparative study of nitrogenase activity in different types of biological soil crusts in the Gurbantungut Desert, Northwestern China. *J Arid Environ.* Elsevier Ltd; 2009;73(9):828–33.
- Zackrisson O, DeLuca TH, Gentili F, Sellstedt A, Jäderlund A. Nitrogen fixation in mixed *Hylocomnium splendens* moss communities. *Oecologia.* 2009;161(1):15–24.
- Zackrisson O, DeLuca TH, Nilsson M-C, Sellstedt A, Berglund LM. Nitrogen Fixation Increases with Successional Age in Boreal Forests. *Ecology.* 2004;85(12):3327–34.
- Zhang X, McRose DL, Darnajoux R, Bellenger J-P, Morel FMM, Kraepiel AML. Alternative nitrogenase activity in the environment and nitrogen cycle implications.
- Zhao Y, Xu M, Belnap J. Potential nitrogen fixation activity of different aged biological soil crusts from rehabilitated grasslands of the hilly Loess Plateau, China. *J Arid Environ.* 2010;74(10):1186–91.
- Ziembik Z, Dolhańczuk-Śródka A, Majcherczyk T, Waclawek M. Illustration of constrained composition statistical methods in the interpretation of radionuclide concentrations in the moss *Pleurozium schreberi*. *J Environ Radioact.* 2013;117:13–8.