

PRINCIPAUX CRITÈRES ACTUELS POUR L'IDENTIFICATION DES LICHENS

Jean-Pierre Gavériaux
14, résidence les Hirsons - 62800 LIEVIN
jean-pierre.gaveriaux@wanadoo.fr

Pour la détermination des espèces, une petite loupe (x10) et quelques réactifs chimiques suffisent, pour identifier les principaux lichens corticoles foliacés ou fruticuleux présents sur les arbres de nos villes ; par contre, si vous désirez faire un inventaire précis des espèces présentes sur un site, il vous faudra obligatoirement prélever des fragments de thalle, au couteau (opinel avec virole de sécurité recommandé) pour les terricoles et les corticoles, au burin pour les saxicoles, sans oublier de noter sur le terrain toutes les indications utiles [date de la récolte, lieu (données GPS vivement souhaitées), altitude, nature et orientation du substrat, etc.] ; chez vous il faudra ensuite faire une étude à l'aide d'un matériel optique souvent onéreux, utiliser des réactifs, des colorants, et même pour certaines espèces, réaliser des chromatographies (CCM).

I. Le matériel indispensable au laboratoire

1) Petit matériel

Pincettes fines normales, pincettes à pointes très fines, type Dumont de précision pour travail sous la binoculaire, aiguilles montées, lames de rasoir, lames et lamelles, etc.

2) Matériel optique

- Petite loupe de poche (à un grossissement x10 ou à trois grossissements x3, x6 et x9).
- Loupe binoculaire (grossissement x20 minimum, x60 souhaitable), indispensable pour les crustacés, les détails des foliacés et des fruticuleux, très utile pour la réalisation des coupes microscopiques ; c'est très certainement l'instrument le plus important pour l'observation de fins détails (soralies, isidies, pseudocyphelles, etc.) et la détermination des espèces.
- Microscope optique avec objectifs x10, x40 et x100 à immersion, et oculaire (x10) micrométrique pour faire les mesures ; un jeu de polaroïds est nécessaire pour l'observation en lumière polarisée afin de préciser la localisation de certains cristaux (ex. chez les *Lecanora*).

3) Produits chimiques

► Les 5 réactifs pour les tests colorés :

- **C** : l'eau de javel ou hypochlorite de sodium
- **K** : la potasse ou hydroxyde de potassium en solution aqueuse (10 à 35 %)
- **P** : la paraphénylènediamine (para 1-4 phénylènediamine), en solution stabilisée qui se conserve une année ou solution alcoolique préparée extemporanément.
- **N** : l'acide nitrique (noté N) : solution aqueuse à 50 %
- **I** : le réactif iodé (lugol)

► Les produits de base pour la microscopie :

- L'eau normale ou additionnée de SDS (sodium dodécyl sulfate = agent mouillant).
- **KOH** à 3% et 10% pour dissociation des structures compactes des coupes.
- **Lugol** (solution d'iode dans l'iodure de potassium), mise en évidence de l'amyloïdie, la dextrinoïdie, le tholus, etc.
- **Bleu coton lactique** aqueux ou lactophénol pour les préparations semi-définitives.
- Le **Rouge Congo** SDS (coloration de matériel fongique frais) et ammoniacal (pour la coloration de matériel fongique sec (issu d'herbier)).
- **Lactophénol au chloral**, milieu de montage ayant un indice de réfraction proche de celui du verre, permettant d'obtenir des images plus nettes en photomicrographie.

- **Phloxine B**, excellent colorant cytoplasmique (cellules mortes uniquement).
- **Bleu de crésyl**, indispensable pour l'étude des conidies, des champignons lichénicoles...

II. Informations apportées par le thalle et les organes non sporogènes qu'il porte

La couleur du thalle doit toujours être notée mais elle ne représente pas le critère essentiel pour la détermination ; il faut regarder le type de thalle, parfois sa structure, rechercher les organes non sporogènes qu'il porte, préciser dans certains cas la nature du photosymbiote, mais surtout, réaliser des tests colorés pour pouvoir progresser dans les clés de détermination.

1. Le type de thalle et sa structure

Selon leur morphologie, les thalles lichéniques sont classés en 7 types fondamentaux. Leur structure s'observe simplement sur une coupe microscopique faite à main levée (coupe mince indispensable) observée dans l'eau au petit grossissement du microscope.

Thalles lépreux : association $\pm$ cohérente de granules (0,1-0,2 mm) constitués chacun d'un peloton d'hyphes associées à quelques cellules algales. Les thalles lépreux, considérés comme primitifs, parviennent à constituer de grandes surfaces farineuses, surtout sur des substrats protégés des eaux de ruissellement et ombragés. Ex : les thalles des *Lepraria* (Planche 1 - photo 1).

Thalles crustacés : ils forment une croûte fortement adhérente au substrat dans lequel pénètrent les hyphes de la médulle (pas de cortex inférieur). Plus de 4/5 des lichens ont des thalles crustacés. Parfois, sous la médulle, un hypothalle parfois visible à la périphérie du thalle où il peut former des zones concentriques $\pm$ colorées (Planche 1 - photo 2)..



1. phorophyte ; 2. lichen corticole épiphléode ; 3. cellules du liège ; 4. cortex supérieur ; 5. couche algale ; 6. médulle ; 7. hypothalle ; 8. cellules du liège désorganisées (d'après des Abbayes - Traité de Lichénologie 1951)

Ex : les *Lecanora Ochrolechia*, *Pertusaria*... plus de 4/5 des lichens ont des thalles crustacés, la plupart d'entre eux sont souvent appelés les microlichens.

En fonction de sa position vis-à-vis du substrat, le thalle crustacé peut être endosubstratique ou épisubstratique (épi- ou endolithique dans le cas d'une roche, épi- ou endophléode dans le cas d'un lichen corticole, épi-ou endogé pour un lichen terricole).

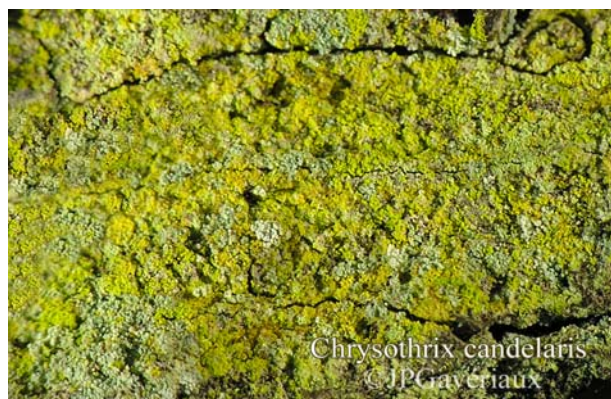
Il est important d'observer la périphérie, lobée (thalle placoïde) ou non lobée ; délimitée ou non ; l'aspect de la surface (thalle continu, fendillé, aréolé, verruqueux, glébuleux, granuleux).

Thalles squamuleux : formés de petites écailles qui se chevauchent partiellement. La partie de l'écaille décollée du substrat commence à différencier un cortex inférieur. Ces thalles sont intermédiaires entre les thalles crustacés et les thalles foliacés. Ex : *Normandina pulchella* (Planche 1 - photo 3).

Thalles foliacés : formé de lames ayant $\pm$ l'apparence de feuilles constituées de lobes diversement orientés ; ces thalles sont facilement détachables du substrat auquel ils sont fixés par des rhizines, rarement présentes sur toute la face inférieure et même parfois absentes.

Planche 1 : principaux types de thalles

Photos J.P. Gavériaux (sauf Photo 8)



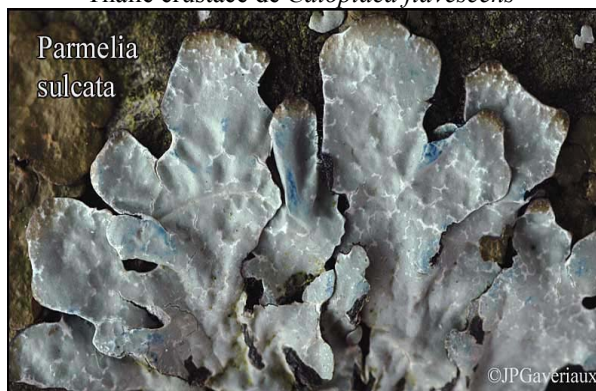
Thalle lépreux de *Chrysothrix candelaris*



Thalle crustacé de *Caloplaca flavescens*



Thalle squamuleux de *Normandina pulchella*



Thalle foliacé de *Parmelia sulcata*



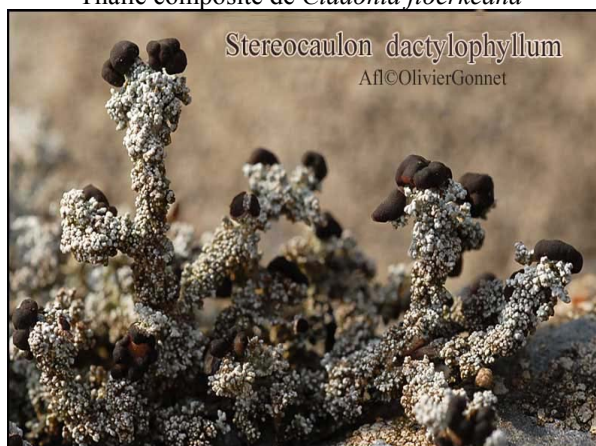
Thalle fruticuleux de *Ramalina farinacea*



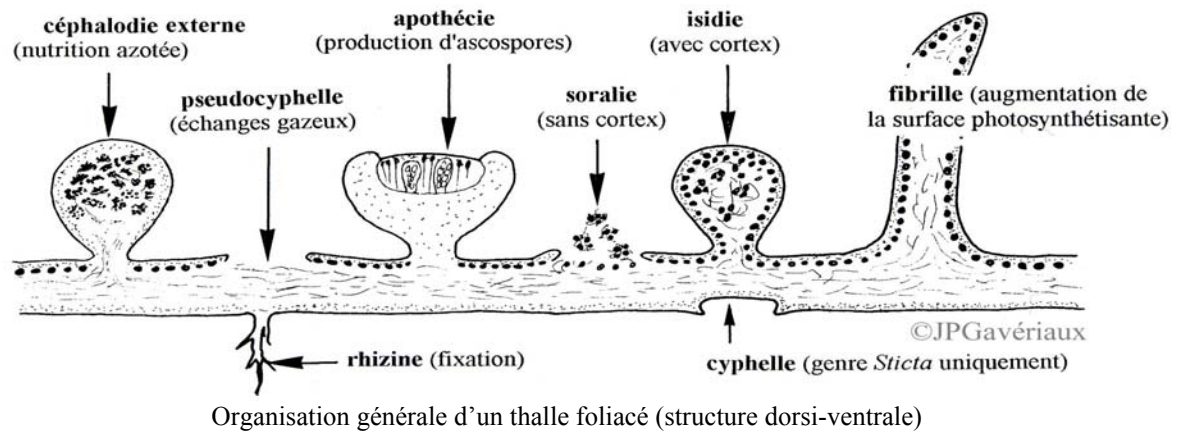
Thalle composite de *Cladonia floerkeana*



Thalle gélatineux (sec) de *Collema flaccidum*



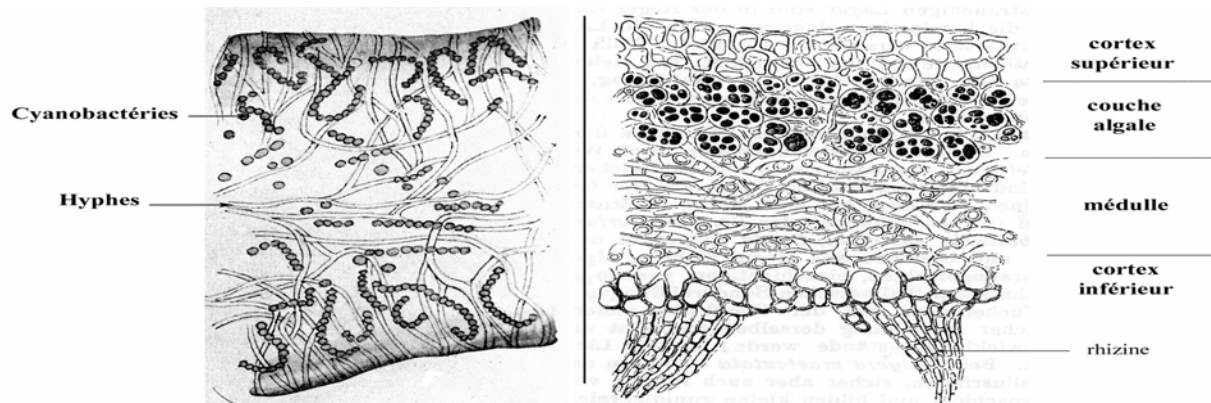
Thalle secondaire de *Stereocaulon* (Ph. O. Gonnet)



La plupart des thalles foliacés présentent une structure hétéromère avec une disposition dors-ventrale où l'on peut distinguer :

- un cortex supérieur : hyphes serrées souvent structurées ;
- une couche algale : les photobiontes (algues vertes ou cyanobactéries)
- une médulle : hyphes lâches ;
- un cortex inférieur : hyphes serrées donnant naissance à des rhizines* jouant un rôle dans la fixation du thalle.

Ex : les *Parmelia* (Planche 1 - photo 4), *Physcia*, *Xanthoria*...



Structure homéomère d'un cyanolichen (<i>Collema</i>) (d'après l'abbé Harmand – Lichens de France – 1905)	Structure hétéromère d'un lichen foliacé (<i>Sticta</i>) (d'après Zahlbruckner et Sachs - Flechten - 1926)
--	---

Certains thalles foliacés n'adhèrent au substrat que par une petite zone (crampon) souvent située au centre de la face inférieure, et la face supérieure présente une légère dépression (ombilic) ; ce sont les thalles foliacés ombiliqués. Ex : les *Umbilicaria*.

Thalles fruticuleux : non appliqués sur le substrat auquel ils n'adhèrent que par une surface très réduite, ils sont ± buissonnants, dressés, pendants ou prostrés, ± ramifiés (parfois non ramifiés comme chez les *Thamnolia*). On peut souvent discerner un tronc principal et des rameaux (primaires et secondaires) ainsi qu'une structure hétéromère à symétrie ± radiale avec un cortex périphérique, une couche algale autour de la médulle centrale.

Chez certains lichens fruticuleux (*Evernia*, *Ramalina* par exemple) les ramifications sont ± aplaties, parfois cannelées ou canaliculées, chez les usnées, la partie centrale de la médulle est occupée par un cordon axial, certaines espèces (*Pseudevernia furfuracea* par ex.) présentent une organisation dors-ventrale comme chez les lichens foliacés (Planche 1 - photo 5).

Thalles composites : comportant plusieurs composantes distinctes :

- au niveau du substrat un thalle ± foliacé-squamuleux (thalle primaire)
- et un thalle dressé, ± ramifié (thalle secondaire), qui se développe secondairement à partir du thalle primaire ; le thalle secondaire produisant les structures sporogènes. Ex. : le thalle composite des *Cladonia*, des *Stereocaulon* (Planche 1 - photos 6 et 8).

Thalles gélatineux : ayant la consistance et l'apparence de la gélatine, ce qui est le cas, à l'état humide, des thalles homéomères à cyanobactéries, uniformément réparties dans toute l'épaisseur du thalle (pas de stratification dorsi-ventrale). À l'état sec, ces thalles sont noirâtres, rigides, cassants et friables. Ex. : les thalles d'*Ephebe*, *Collema*, *Leptogium*, *Lichina*... Pour les enlever sans dommage de leur substrat, il est nécessaire de les réhydrater. Cette consistance gélatineuse est due à l'existence d'une gaine mucilagineuse (Planche 1 - photo 7).

2. Modalités d'agencement des hyphes dans les plectenchymes

Chez les champignons les assemblages d'hyphes font penser aux tissus trouvés chez les végétaux ; toutefois, dans les tissus des végétaux, la croissance est due au fonctionnement d'une assise génératrice, ce qui n'est pas le cas chez les champignons où toutes les hyphes ont une croissance apicale. Les assemblages d'hyphes sont des "faux tissus" appelés plectenchymes.

En fonction des modalités d'agencement des hyphes on distingue 2 grands types de plectenchyme.

- Le **prosoplectenchyme** dans lequel les cellules sont $\pm$ allongées, avec une orientation décelable, les hyphes étant $\pm$ parallèles entre elles. Les cellules $\pm$ parallèles peuvent être serrées (dans un cortex) ou lâches (dans une médulle).

Les hyphes du prosoplectenchyme sont dites anticlinales lorsqu'elles sont disposées $\pm$ perpendiculairement par rapport à la surface ; périclinales lorsqu'elles sont $\pm$ parallèles à la surface.

- Le **paraplectenchyme** dans lequel les cellules sont $\pm$ isodiamétriques, sans orientation particulière (le paraplectenchyme est parfois appelé pseudoparenchyme étant donné sa similitude d'aspect avec un parenchyme végétal).

Le paraplectenchyme peut présenter plusieurs textures différentes parmi lesquelles on peut citer :

- **textura prismatica** : les hyphes à orientation anticlinale (perpendiculaires à la surface), sont assez serrées les unes contre les autres (espaces intercellulaires très réduits), $\pm$ légèrement entremêlées et à structure leptodermateuse (parois minces et lumen important).

- **textura porrecta** : les hyphes à orientation anticlinale, sont $\pm$ légèrement entremêlées, peu serrées les unes contre les autres (espaces intercellulaires importants).

- **textura oblita** : les hyphes à orientation anticlinale sont assez serrées les unes contre les autres (espaces intercellulaires très réduits), $\pm$ légèrement entremêlées et à structure mésodermateuse (parois épaisses et lumen important).

- **textura intricata** : les hyphes allongées n'ont pas d'orientation préférentielle, les hyphes sont $\pm$ sinueuses et entremêlées en tous sens.

3. Organes non sporogènes portés par le thalle

a) au niveau de la face supérieure

Poil : visible à la loupe, il correspond au prolongement libre d'une hyphe du cortex. Parfois nombreux et serrés, les poils constituent un tomentum.

Cil (Planche 2 – Photo 1) : formation filiforme, de teinte habituellement sombre, visible à l'œil nu, constituée par les prolongements de plusieurs hyphes accolées ; se trouve généralement sur les bords du thalle ; lorsque les cils sont bien visibles à l'œil nu, épais et rigides on les nomme **spinules** (ex. chez *Cetraria islandica*).

Poils, **tomentum** et cils sont de nature fongique, ils protègent contre les radiations, limitent l'évapotranspiration, retiennent l'eau, la rosée, l'humidité ; dépourvus de photosymbiote, ils n'ont aucune fonction assimilatrice.

Fibrille : courte ramification filamenteuse, concolore au thalle, contenant des hyphes et des algues et augmentant de façon significative la surface photosynthétisante (Planche 2 – Photo 3).

Planche 2 : quelques observations thallines

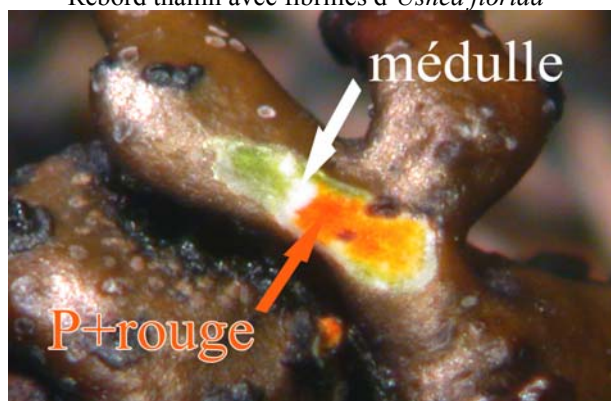
Photos J.P. Gavériaux



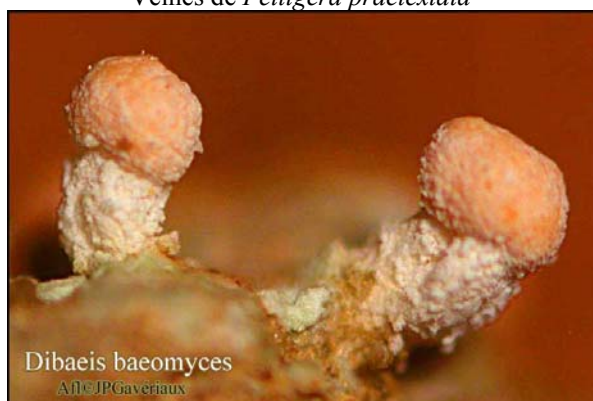
Lobes cucullés et cils de *Physcia adscendens*



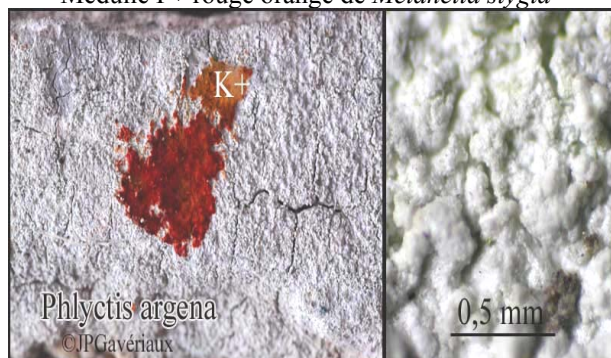
Lobes couverts de pruine de *Physconia distorta*



Médulle P+ rouge orangé de *Melanelia stygia*



Apothécies pédicellées de *Dibaeis baeomyces*



Thalle. K+ rouge de *Phlyctis argena*



Apothécies cryptolécánorines de *Diploschistes*

Papille : petite protubérance, uniquement constituée de cortex, visible à la loupe, plus haute que large, située entre les fibrilles sur le thalle des Usnées.

Chez les usnées, on peut observer des **nodules**, petites saillies situées sur le thalle entre les fibrilles, visibles à l'œil nu, $\pm$ tronconiques (leur hauteur est plus petite que le $\varnothing$ de la base), constituées d'hyphes médullaires et souvent génératrices de soralies ; elles ne doivent pas être confondues avec les papilles uniquement visibles à la loupe, dont la hauteur est plus grande que le $\varnothing$ de la base, et présentant une structure corticale ; ni avec les **tubercules** dont l'épaisseur dépasse le millimètre.

Pores respiratoires : petites verrues munies d'un pore sommital permettant le passage des divers gaz.

Pseudocyphelles : ouvertures des cortex supérieur et inférieur laissant apparaître la médulle. Rôle important dans les échanges gazeux avec l'atmosphère (les **cyphelles** sont des dépressions, à contour arrondi, du cortex inférieur, rencontrées uniquement dans le genre *Sticta*).

b) au niveau de la face inférieure

Rhizines : organes de fixation des thalles foliacés, simples ou ramifiées, groupées ou dispersées, parfois colorées, formées d'un faisceau d'hyphes $\pm$ soudées et recouvertes d'une gaine gélatineuse facilitant l'adhésion au substrat. Certaines rhizines, en particulier les rhizines périphériques, ne jouent aucun rôle dans la fixation des thalles, elles sont dans ce cas souvent appelées **rhizomorphes**.

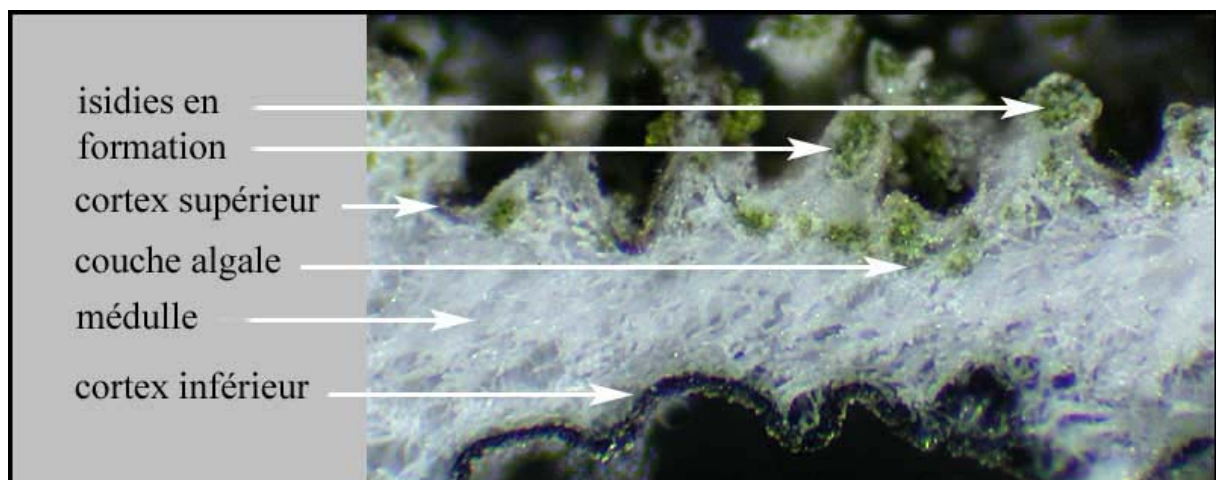
Veines : réseau plus ou moins saillant, situé à la face inférieure du thalle des *Peltigera* et *Solorina* ; leur répartition, couleur, forme, les rhizines ou tomentum qu'elles portent interviennent souvent pour différencier les espèces (Planche 2 – Photo 4).

c) Les céphalodies

Certains lichens à algues vertes (*Lobaria*, *Nephroma*, *Peltigera*, *Solorina*, *Stereocaulon*, etc.) contiennent également des cyanobactéries. Celles-ci, réunies par des hyphes, donnent des petites formations bien délimitées, en forme de galles à l'intérieur du thalle, d'excroissances ou de verrues à sa surface. Les céphalodies internes ne sont décelables qu'au microscope mais les céphalodies externes sont visibles à l'œil nu ; leur couleur est différente de celle du thalle.

d) les isidies et les soralies (voir les photos de la planche 3)

Les isidies



Les isidies sont des petites excroissances cortiquées, de quelques dixièmes de millimètre, élaborées par le thalle lichénique. Elles contiennent des cellules du photosymbiote principal, des cellules du mycosymbiote et sont entourées d'une couche serrée d'hyphes, prolongement du cortex supérieur, ce qui explique qu'elles sont généralement concolores au thalle. Elles jouent 2 rôles essentiels :

1. permettre la reproduction végétative du thalle, l'isidie contenant les 2 partenaires de la symbiose lichénique et ayant tendance à se détacher à l'état sec ;
2. augmenter de façon significative la surface photosynthétisante du thalle en développant les échanges gazeux et aqueux.

► Leur forme (sphériques, cylindriques, clavées, coralloïdes, ramifiées...), leur localisation (faciales, marginales...) et leur modalité de groupement sont des caractères souvent pris en compte pour la détermination des espèces.

Les **soralies** sont des groupements de sorédies (granulations non cortiquées, de très petite taille, formés d'un enchevêtrement d'algues et d'hyphes) engendrées au niveau d'ouvertures du thalle. Ces sorédies permettent une dispersion aisée du complexe lichénique, assurant ainsi une multiplication végétative efficace de l'espèce en disséminant simultanément les deux partenaires de la symbiose.

► L'étude des soralies (nécessitant parfois le plus fort grossissement de la bino) est souvent très importante pour la détermination des espèces. Il faut noter leur couleur et étudier :

- leur localisation, faciales (ou superficielles) quand elles sont à la face supérieure du thalle, terminales ou marginales en fonction de leur position à l'extrémité ou sur les bords des lobes des lichens foliacés ;

- leur forme, maculiformes, globuleuses, hémisphériques, plates, capitiformes, rimiformes (en forme de fente), labriformes, linguiformes, forniciformes (cachées dans l'extrémité du lobe qui se recourbe comme c'est le cas chez *Physcia adscendens*), etc.

- Lorsqu'un thalle présente des soralies (ensemble de sorédies) il est qualifié de **sorédié**.



Situées sur les bords des lanières et pratiquement invisibles à l'œil nu (photo 1 à gauche), leur observation nécessite l'utilisation d'une petite loupe x10 (photo du centre) ou d'une loupe binoculaire x40 (photo 3).

Les Soralies isidifères sont des soralies sur lesquelles prennent naissance des isidies ; ces isidies, d'origine soréales, se forment par coalescence de sorédies, autour desquelles se développe un cortex*. Les soralies isidifères se rencontrent dans le genre *Usnea* (bino x60).

Les Isidies soralifères sont des isidies à l'extrémité desquelles prennent naissance de petites soralies ; ces soralies d'origine isidiale se rencontrent chez certains *Pertusaria* (bino x60).

4. La nature du photosymbiote

La détermination précise du photosymbiote n'est jamais indispensable, mais il est parfois utile de savoir s'il s'agit d'une **algue verte**, *Trebouxiophyceae* (le genre *Trebouxia* incapable de vivre librement étant le plus commun parmi les *Lecanorales*) ou *Chlorophyceae* (avec le genre *Trentepohlia* à cellules riches en carotènes) ou d'une **cyanobactérie** (le genre *Nostoc* étant le plus commun). Un

Planche 3 : soralies et isidies

Photos J.P. Gavériaux (sauf Ph. 2 – O. Gonnet)



Soralies plates de *Pertusaria albescens*



Soralies globuleuses de *Pertusaria amara*



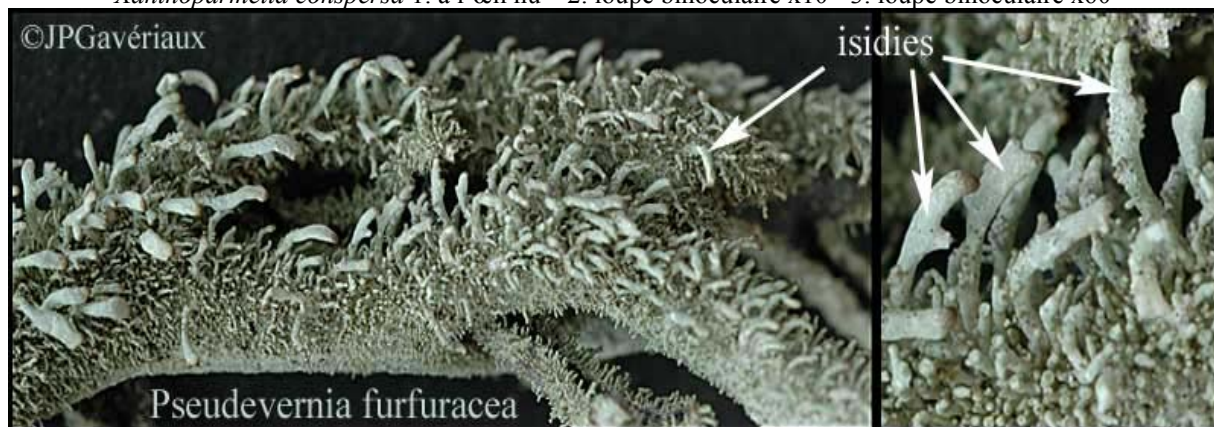
Soralies faciales de *Punctelia subrudecta*



Soralies marginales de *Pseudocyphellaria aurata*



Xanthoparmelia conspersa 1. à l'œil nu – 2. loupe binoculaire x10 – 3. loupe binoculaire x60



Face supérieure isidiée de *Pseudevernia furfuracea* – 1. loupe x10 – 2. loupe x 60

simple examen microscopique suffit et sur le terrain la trace rouge laissée par l'ongle qui frotte un thalle crustacé fait déjà penser à une algue du genre *Trentepohlia*.

5. Les réactions colorées [K, C, KC, P, N, I] (planche 2 - photos 5 et 7)

- L'association algue-champignon permet la synthèse de métabolites secondaires (acides lichéniques et pigments) qui donnent souvent des réactions colorées en présence de certains réactifs macrochimiques spécifiques. Ces réactions, connues depuis les travaux du finlandais Nylander (1822-1899) apportent des informations très utiles pour la détermination.

- Ces produits (voir la liste à la première page de cet article) sont dans de petits flacons munis d'une fine languette facilitant leur application sur la partie du thalle à tester ; si cette partie change de couleur, la réaction est positive ; par exemple la médulle devient rouge en présence de potasse, elle est dite K+ rouge, bleu en présence d'iode elle est I+ bleue... ; dans le cas inverse, réaction négative, elle est dite K- ou I-... Ces réactions colorées sont utiles aussi bien en laboratoire que sur le terrain.

- Les tests sont souvent réalisés sur le cortex, la médulle (qu'il faut mettre à nu en faisant une petite section oblique dans le thalle), parfois sur les soralies ou le rebord de l'apothécie, l'utilisation de la loupe binoculaire facilite beaucoup l'observation de la réaction colorée ; certaines colorations ne se développent qu'au bout de quelques dizaines de secondes, d'autres sont très fugaces et la coloration disparaît en moins d'une seconde.

- Lorsque le thalle est de couleur sombre, on ne voit pas toujours très bien la réaction colorée, il est conseillé dans ce cas, poser le fragment de thalle sur un petit morceau de papier-filtre blanc préalablement imprégné de réactif.

III. L'étude des ascomes [apothécies et périthèces]

L'étude des apothécies et des périthèces est rarement nécessaire pour la détermination des lichens foliacés et fruticuleux différenciables par les caractères morphologiques de leur thalle ; elle est par contre indispensable pour l'étude des crustacés.

1. L'apothécie (photos 6 et 8 planche 2 et photos 1 et 2 planche 4)

C'est la structure de reproduction sexuée élaborée par le mycosymbiote des discolichens, en forme de coupe, de couleur variable, de quelques dixièmes de millimètres à quelques centimètres de Ø, sessile à stipitée, parfois enfoncées dans le thalle et constituée par :

- L'**hyménium** formé par l'ensemble des asques (ou **thécium**) accompagnés de filaments stériles, les paraphyses.

- L'**épithécium** correspondant aux parties supérieures renflées des paraphyses dépassant le sommet des asques ; il est généralement coloré, les pigments étant localisés au sommet des paraphyses.

- L'**hypothécium** correspond à la couche d'hyphes située sous l'hyménium, il donne parfois naissance à un stipe qui porte l'apothécie au-dessus de la surface du thalle.

Remarque : La couche d'hyphes située juste sous l'hyménium et donnant naissance aux asques (hyphes ascogènes) est parfois appelée soughyménium.

- Le **rebord** (ou **excipulum**) entourant latéralement les 3 structures précédentes et qui peut contenir des cellules du photosymbiote.

- 1^{er} cas il ne contient pas d'algues (ni de cyanobactéries), il a alors la même couleur que le disque de l'apothécie ; il prend le nom de parathécium (autour du thécium) ou **rebord propre**.

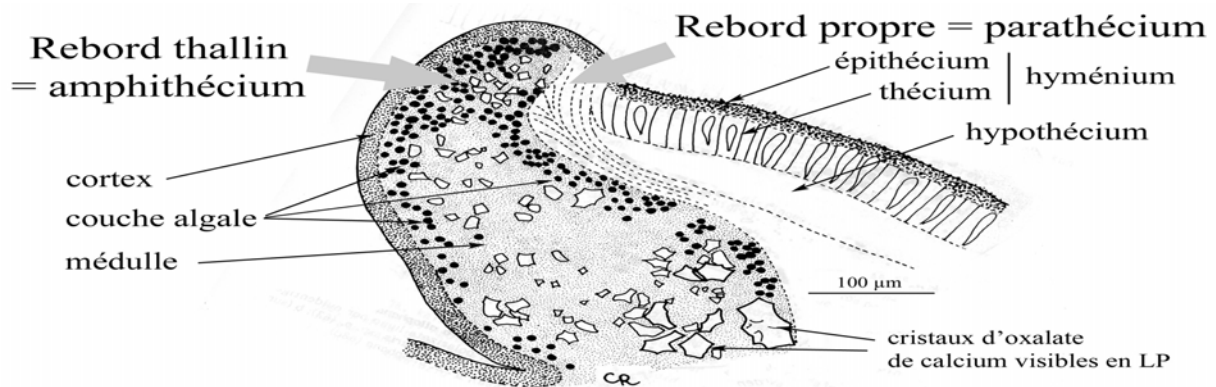
- 2^e cas il contient des algues (ou des cyanobactéries), il a la même couleur que le thalle ; il prend le nom de **rebord thallin** ou amphithécium ou excipulum externe.

La particularité anatomique du rebord permet de distinguer plusieurs types d'apothécies :

- Apothécies **lécidéines** ayant un seul rebord, le rebord propre (= parathécium = excipulum interne) concolore au disque.

- Apothécies **lécanorines** munies d'un rebord thallin (= amphithécium = excipulum externe) concolore au thalle (à l'intérieur duquel on peut parfois ± nettement distinguer un rebord propre).

- Apothécies **zéorines** à double rebord, rebord propre doublé vers l'extérieur d'un rebord thallin,
- Apothécies **pseudolécánorines** ayant un aspect lécidéen mais dont le rebord contient quelques cellules algales.



Bord de l'apothécie lécanorine de *Lecanora chlarotera* (d'après Claude Roux - Likenoj - figure 276b p. 413)

Remarques : certaines apothécies qualifiées de **cryptolécánorines** (ex. chez les *Aspicilia*, certains *Diploschistes* – voir photo 8 planche 2) sont ± enfoncées dans une verrue ou une aréole du thalle ; leur rebord thallin est peu ou pas visible. Chez les Graphidales et les Opégraphales, les disques apothéciaux sont longuement étirés, ils ressemblent à des petites fentes ± sinueuses simulant une "écriture chinoise" ou un hiéroglyphique ; ces apothécies dont l'excipulum est souvent carbonacé sont appelées **lirelles**.

Plusieurs caractéristiques apothéciales doivent être observées.

La taille des apothécies, leur répartition, la présence d'un pied (apothécie stipitée comme chez les Caliciales), la couleur du disque, l'aspect de sa surface, sa forme générale (plat, convexe, concave, umboné...), la présence de pruine, de plis enroulés d'une façon ± compliquée (chez certaines espèces du genre *Umbilicaria*), le type d'apothécie (lécanorine, lécidéine, zéorine...) avec toujours de nombreux cas particuliers, intermédiaires entre les types présentés, et il n'est pas toujours facile de trancher [d'où l'intérêt de travailler en groupes].

Le microscope est souvent utile pour rechercher la hauteur de l'épithécium, de l'hyménium, parfois de l'hypothécium, ; la présence d'inclusions lipidiques, de cristaux (en lumière polarisée) ; dans quelques cas les réactions colorées avec K, C, N, I et P sont demandées.

La confection des coupe minces se fait à la main, avec une lame de rasoir, sous la loupe binoculaire. Actuellement, l'éclairage par LED permet de travailler confortablement sans risque de se brûler.

2. Le périthèce (non traité le jour de l'exposé et donné ici pour présenter les principaux termes techniques)

C'est la structure de reproduction sexuée élaborée par le mycosymbiote des pyrénolichens, en forme de poire ± enfoncée dans le thalle, la partie renflée contenant l'hyménium, la partie supérieure présentant un orifice, l'ostiole, visible à la loupe (x10), qui s'ouvre à maturité pour libérer les spores.

Le périthèce comprend :

- Une enveloppe externe dure, protectrice, le **pyrénium** ou excipulum, en général de couleur sombre (sauf à la base où il est parfois incolore).
- À la partie supérieure du pyrénium on trouve dans certains cas, une sorte de couvercle, plus dur et plus sombre, l'**involutcrellum**.
- À l'intérieur du pyrénium, la cavité est tapissée par l'**hyménium** qui contient les **asques** et les **paraphyses** ; les pseudoparaphyses et paraphysoides ne se rencontrent que chez quelques espèces (contrairement aux pyrénomycètes non lichénisés) mais il est fréquent de trouver des **périphyses** au niveau du canal ostiolaire.
- L'hypothécium (**subhyménium**) qui contient les hyphes ascogènes, est parfois décelable entre l'hyménium et le pyrénium.

Il est plus difficile de faire des coupes de périthèces que des coupes d'apothécies, surtout chez les saxicoles ; la lame de rasoir ne pourra pas servir plusieurs fois et il est recommandé de couper la lame

neuve en plusieurs morceaux (les lames se coupent facilement avec de gros ciseaux). Il faudra principalement noter les caractéristiques du pyrénium et distinguer 4 cas principaux :

- pyrénium entier lorsqu'il est entièrement noir ou de couleur sombre ;
- pyrénium dimidié lorsqu'il est coloré au sommet et présente une partie basale incolore ;
- pyrénium entièrement ou presque entièrement incolore (cas chez les *Dermatocarpon*) ;
- pyrénium surmonté d'un involucrellum.

Pour les lichens endolithiques calcicoles, il est conseillé de détruire le calcaire avec de l'acide chlorhydrique dilué (ou du vinaigre).

Remarque : bien que n'étant pas un organe constitutif du thalle, un critère de détermination doit être ajouté, il s'agit de la **pruine** (à ne pas confondre avec le tomentum). Elle forme une fine pellicule, ayant un aspect poudré, constituée de minuscules cristaux blanchâtres d'oxalate ; cette pruine disparaît au moindre frottement. On la rencontre sur certains thalles (ex. les lobes des *Physconia* (photo 2 planche 2), certaines apothécies (photo 1 planche 4).

IV. Asques, tholus, spores et conidies (Planche 4 - photos 3 à 11)

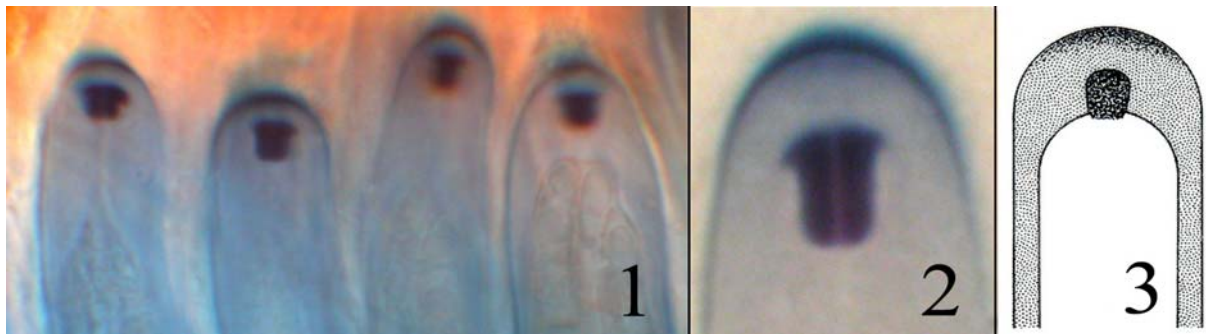
1. Les asques

Ce sont les cellules hyméniales dans lesquelles se forment les spores permettant la reproduction sexuée du champignon. Leur étude n'est pas toujours indispensable pour la détermination des espèces, mais dans certains cas il faut noter :

- Leur forme, généralement en massue, plus rarement cylindrique (ex. chez les *Caliciales*), piriforme (ex. chez les *Arthonia*) ou lagéniforme (ex. chez les *Theleocarpaceae*).
- Leur taille, le plus souvent entre 40 et 100 µm mais pouvant dépasser 300 µm chez les *Pertusariales*.
- Leur enveloppe, qui peut présenter sous le microscope optique une (asque unituniqué) ou deux parois (asque bituniqué).

2. Le tholus

Chez les fissituniqués et semi-fissituniqués, autrefois regroupés sous le terme de bituniqués, le sommet de l'asque présente un ensemble de structures qui accompagneront ultérieurement l'expulsion des spores. Certaines parties de ces structures, en particulier la partie fortement épaissie de l'endoascus (paroi interne de l'asque) prennent une coloration bleu-nuit en présence d'iode (parfois rouge en présence de rouge Congo) ; cette partie épaissie, appelée tholus, montre très souvent une structure spécifique qui permet, surtout aux débutants, de distinguer des genres macroscopiquement très proches (ex. les *Porpidia* et les *Lecidea*).



1. Tholus de *Peltigera rufescens* dans le lugol (K/I) ; 2. après dilution à l'eau pour deviner le canal axial ;
3. ex. de schéma de tholus (Galloway - une centaine de tholus sont représentés dans *New Zealand Lichens*).

La structure du tholus n'est visible qu'au microscope après traitement par K/I. Il faut laisser séjourner la coupe très fine d'apothécies dans KOH à 3 % pendant quelques dizaines de secondes (ou plus si la dissociation n'est pas suffisante, plusieurs essais sont parfois nécessaires) ; rincer la coupe à l'eau ; faire le montage dans du lugol (que l'on doit parfois diluer à l'eau si la coloration est trop intense).

Planche 4 : apothécies et observations microscopiques

Photos J.P. Gavériaux



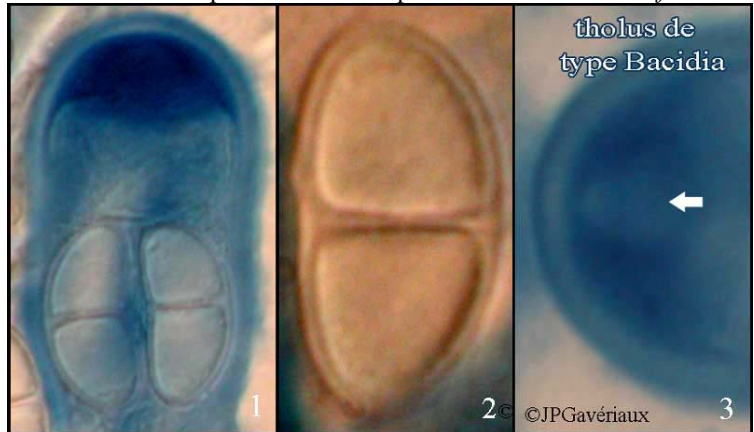
Coupe d'apothécie lécanorine de *Physconia distorta*



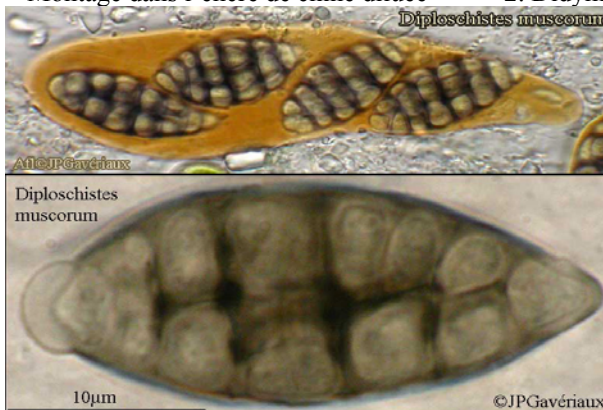
Apothécies en bouquets de *Cladonia bellidiflora*



Gaine mucilagineuse (halo) d'ascospore
Montage dans l'encre de chine diluée



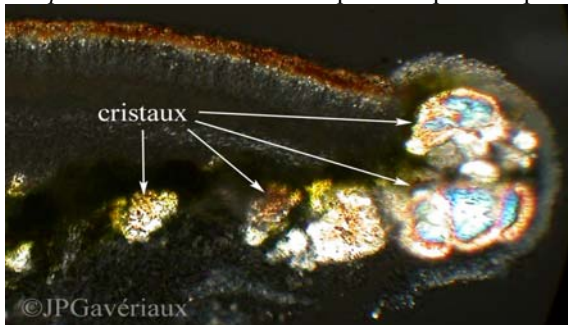
Ramalina fastigiata : 1. Sommet de l'asque à maturité (K/I)
2. Didymospore (spore bicellulaire) 3. Tholus de type *Bacidia*



Diploschistes muscorum : asque tétrasporé et spores



Apothécies gyreuses d'*Umbilicaria hyperborea*



Cristaux d'un rebord thallin de *Lecanora chlorotera*
Montage H₂O - Lumière polarisée/analyséex 10



Spores submurales de *Rhizocarpon* - montage dans le
Lactophénol - Obs. en pseudonormarski

3. Les paraphyses

Cellules stériles situées entre les asques, elles sont toujours pluriseptées et nécessitent souvent une coloration, le bleu coton lactophénolé convient parfaitement, pour révéler leurs cloisons, leurs ramifications et leurs anastomoses.

D'après Claude Roux, on distingue plusieurs type de paraphyses :

- sans ramifications, sans anastomoses (*Lecanora*, *Lecidella*...).
- avec peu de ramifications (quelques-unes vers le sommet) et peu d'anastomoses (*Caloplaca*).
- avec peu de ramifications et de nombreuses anastomoses (*Farnoldia*).
- avec de nombreuses ramifications et peu d'anastomoses (*Trapelia*).
- avec de nombreuses ramifications et nombreuses anastomoses (*Opegrapha*, *Rhizocarpon*).

Lorsque l'on écrase la coupe dans l'eau, deux cas se présentent :

- les paraphyses sont cohérentes, elles adhèrent les unes aux autres par leurs anastomoses ou par une substance $\pm$ gluante (*Tephromela*) ;
- les paraphyses ne sont pas cohérentes, elles se séparent facilement.

Dans quelques cas la forme des cellules peut intervenir, la dernière cellule peut être renflée (paraphyse capitée) ou toutes les cellules renflées dans leur milieu sont séparées par des étranglements, elles ressemblent à un chapelet (paraphyses moniliformes de *Caloplaca lactea*).

4. Les spores

L'observation des ascospores est très certainement l'aspect le plus important de l'étude microscopique. Le montage dans l'eau permet d'apprécier la couleur, de faire les mesures, mais le plus souvent pour voir le détail des structures, il faut faire un montage dans KOH à 3-5 % ou utiliser des colorants.

- La **couleur** : à maturité les spores peuvent être hyalines (= incolores), jaunâtres, verdâtres, rougeâtres, $\pm$ brunâtres et même noirâtres. Toutefois les pigments ne sont formés que pendant la phase de maturation et il faut bien prendre la précaution d'observer des spores mûres, si possible sorties des asques.

- Le **nombre par asque** : est en principe de 8 mais il peut être plus petit (1 à 4) ou être de plusieurs centaines (ex. chez les *Acarospora*).

- La **taille** : la longueur est souvent comprise entre 8 et 15 μm , mais certaines spores peuvent atteindre des tailles impressionnantes, ex. les spores de *Pertusaria* qui atteignent facilement 200 ou 300 μm (les asques dans ce cas ne possèdent qu'une ou deux spores) ; chez certaines espèces à asque contenant un très grand nombre de spores, celles-ci ne dépassent pas 3-4 μm de longueur.

- La **forme** : est très variable, souvent elliptique, subglobuleuse, cylindrique, fusiforme, réniforme... Les spores bacilliformes peuvent être droites, arquées, sinueuses...

- La **septation** : toutes les spores ne sont pas simples (= unicellulaires = non cloisonnées = améropores), dans de nombreux genres elles sont cloisonnées et on peut distinguer :

► Les spores **unicloisonnées** (= didymospores = spores bicellulaires) présentent dans la majorité des genres une cloison mince ; il y a toutefois 2 genres qui font exception.

➡ Chez les *Caloplaca*, pendant la sporogénèse, un épaississement se forme à l'équateur de la cellule, puis un petit canal se creuse au centre de cet épaississement, finalement une cloison (très fine, qui est longtemps passée inaperçue) se forme au centre du canal ; on a donc une spore bicellulaire, mais les 2 cellules apicales ne sont pas séparées par l'épaississement mais par la cloison du canal.

➡ Chez les *Physcia*, *Physconia*, *Rinodina* la cloison est épaisse et certains *Rinodina* on a en plus un tore (anneau noir $\pm$ développé entourant l'équateur de la spore).

► Les spores **pluricloisonnées** (= phragmospores) présentent des cloisons transversales, et dans certains cas, en supplément, des cloisons longitudinales (spores dites murales ou submurales lorsqu'il n'y a qu'une ou deux cloisons longitudinales).

- La **guttulation**, étude de la taille et de la répartition des gouttelettes d'huile (réserve lipidique) trouvées dans le cytoplasme de spores vivantes (également dans celui des paraphyses, algues...) peut

être étudiée sur des spores mûres à l'aide d'un colorant vital comme le bleu de crésyl brillant* (BCB) en solution aqueuse à très faible concentration, entre 0,1 à 1 %.

Lorsqu'il y a 2 grosses guttules, on peut penser à une cloison équatoriale; le montage dans KOH (5-10%) élimine les gouttelettes d'huile et permet de lever le doute.

Selon H.O. Baral (Vital taxonomy - 2001) ce caractère guttulation pourrait apporter de nombreuses informations et être utilisé comme critère de détermination en lichénologie mais les observations sur matériel vivant sont très difficiles à réaliser et nécessitent l'emploi de matériel optique de très grande qualité.

- L'**ornementation**, produite généralement par l'exospore, est souvent très importante chez champignons non lichénisés, elle est par contre très peu utilisée pour les spores du mycosymbiote qui, dans la plupart des cas, présente des spores lisses, pratiquement jamais verruqueuses ou ornementées [sauf exception, ex. la spore de *Pertusaria heterochroa* ornée d'un réseau de veines saillantes].

- Le **halo** : certaines spores sont expulsées de l'asque, accompagnées d'un peu de cytoplasme, qui forme autour de la spore une enveloppe $\pm$ gélatineuses, la périspore ; cette gangue muqueuse (ou halo) peut être mise en évidence avec de l'encre de chine. Les fines particules noires ne pénètrent pas dans la gaine mucilagineuse mais permettent de rendre visible son contour en microscope optique, cette zone périphérique paraissant translucide sur un fond beaucoup plus sombre (Planche 4 – photo 3).

5. Les conidies et la gelée conidiale

Chez de nombreux lichens existent de très petites cavités, les conidiomes (ou pycnides), $\pm$ enfoncés dans le thalle, colorés ou non, munis d'un orifice (l'ostiole) décelable le plus souvent à la loupe binoculaire sur thalle préalablement humidifié. À l'intérieur on trouve une gelée contenant de minuscules cellules, les conidies (ou pycnidiospores), produites au niveau de conidiophores qui tapissent l'intérieur du conidiome.

Ces conidies permettent la multiplication végétative du mycosymbiote et dans quelques cas jouent le rôle de spermatie (permettant la dicaryotisation après rencontre avec un trichogyne).

La forme des conidies, leur mode de formation et la structure des conidiomes* sont souvent utilisés pour caractériser les genres et les espèces lichéniques.

Dans certains cas, pour la détermination des espèces, il est important de noter :

- La couleur de la gelée conidiale (ex. rosée à rougeâtre chez *Cladonia stygia*, incolore chez *Cladonia rangiferina*).

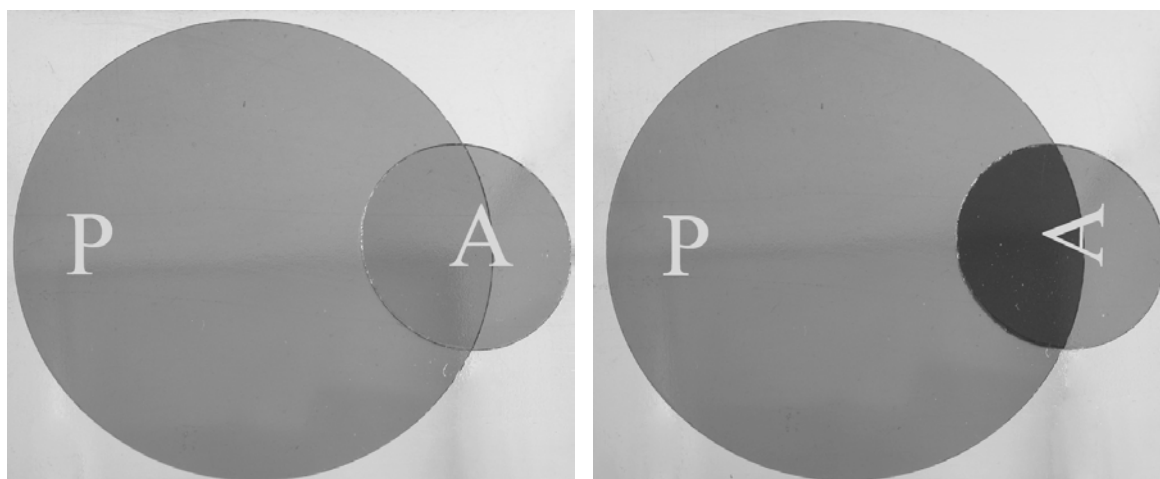
- La taille des conidies ; ex. chez les *Aspicilia* du groupe *cinerea/epiglypta/intermutans* c'est cette taille qui permet la distinction des 3 espèces.

Espèce	Spores	Pycnidiospores
<i>Aspicilia cinerea</i>	11-22 μm	11-16 x 1 μm
<i>Aspicilia epiglypta</i>	20-30 μm	15-28 x 1 μm
<i>Aspicilia intermutans</i>	20-30 μm	07-12 x 1 μm

V. L'examen en lumière polarisée

Quelques espèces lichéniques (exemple : certains *Lecanora*) possèdent des cristaux dans la marge de l'apothécie, le sous-hyménium et parfois aussi au niveau de l'épihyménium entre les extrémités des paraphyses. Difficile à distinguer en lumière normale, ils deviennent facilement visibles en lumière polarisée, ce qui permet l'identification de l'espèce (Planche 4 - photo 10).

Plusieurs possibilités sont offertes pour la réalisation technique, mais le dispositif le plus simple et suffisant pour une observation de contrôle en lichénologie, consiste à placer un premier morceau de polaroïd sous la lame ou dans le porte-filtre du condenseur, et le deuxième est tenu à la main à la sortie de l'oculaire. Le jeu de 2 plaques de polaroïd est disponible auprès de l'AFL. Il suffit de tourner l'un des deux filtres pour obtenir l'extinction de la lumière (lorsque polariseur et analyseur sont croisés à 90°) et voir apparaître les cristaux, brillant sur un fond noir.



À gauche : P = le polariseur, est le morceau de polaroïd que l'on place sous la lame ;
 A = l'analyseur est un morceau de polaroïd plus petit que l'on place sur l'oculaire ;
 P et A sont orientés dans le même sens, la lumière polarisée par le 1^{er} filtre traverse le second.
 A droite : P et A sont croisés, le 2^{ème} filtre arrête la lumière, il y a extinction.

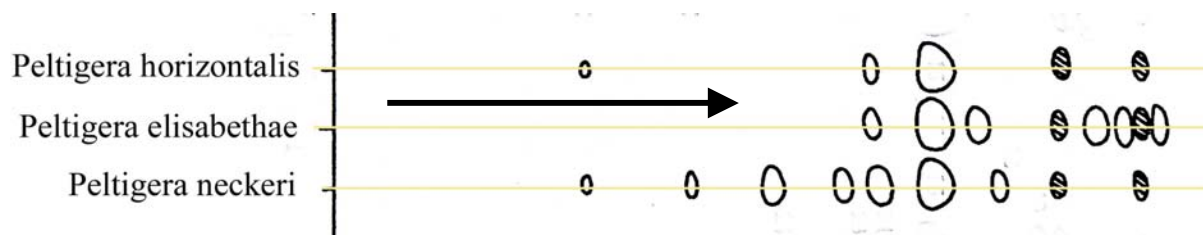
VI. La chromatographie couche mince (CCM) en phase vapeur

La chromatographie est une technique qui permet de mettre en évidence certains métabolites secondaires contenus dans les lichens en faisant passer un solvant par ascension. Plus les pigments et acides lichéniques sont solubles dans la phase mobile, plus ils sont déplacés. Cette technique permet après observation aux UV ou révélation chimique de mettre en évidence un certain nombre de constituants caractéristiques de certaines espèces qu'il est alors possible d'identifier avec précision.

Dans certains groupes, ex. certains groupes de *Cladonia*, *Peltigera*, *Lepraria*... l'identification des espèces est impossible sans cette technique de chromatographie couche mince (CCM) en phase vapeur.

L'extraction des substances lichéniques se fait à l'acétone ; les microgouttes d'acétone contenant les substances lichéniques sont déposées sur des plaques au gel de silice sur support en aluminium rigide. De chaque côté de la plaque, deux témoins sont déposés, l'acide norstictique (Rf 4) et l'atanorine (Rf 7), obtenus à partir d'un mélange de 2 lichens : *Parmelia acetabulum* et *Physcia tenella* dont les Rf sont connus pour les éluants utilisés.

Ces éluants contiennent des produits toxiques que l'on doit manipuler sous une hotte, filtrée et reliée à l'extérieur (**toluène, dioxane, acide acétique, Hexane, éther éthylique, acide formique**).



Le nombre et la position des taches dans le chromatogramme permettent d'identifier l'espèce lorsque l'étude des caractères macroscopiques et microscopiques ne suffit pas ; le flèche schématise le sens de migration de l'éluant (d'après A. Orange - Microchemical methods for the identification of lichens)

Au terme de l'ascension, la plaque est retirée de la cuve à chromatographie, séchée sous la hotte pour éliminer les solvants précédents, plongée pendant 2 secondes dans une solution d'acide sulfurique à 10 % puis placée dans une étuve à 100-110°C. Au bout de dix à quinze minutes, les taches apparaissent. Leur identification se fait à l'aide la brochure de Orange, James et White, 2001, 101 p. éditée par la BLS « Microchemical methods for the identification of lichens » et le livre de Purvis & al. *The lichen flora of Great Britain and Ireland*.

VII. Quelques livres actuellement disponibles pour la détermination des lichens

Seul le livre d'E. Sérussiaux, P. Diederich et J. Lambinon est en langue française (limité aux macrolichens). Les flores de Clauzade et Roux sont en esperanto (la langue universelle), les livres de Dobson et Purvis en anglais, ceux de Wirth en allemand.

Clauzade G. et Roux C., 1985 - Likenoj de Okcidenta Europo : Ilustrita determinlibro, Soc. Bot. du Centre-Ouest, Royan, (892 p. et 3 suppléments)

Clauzade G. & C. Roux, 1986 - Likenoj de okcidenta Eùropo. Supplément 2a, Soc. Bot. du Centre-Ouest, 18:177-214.

Clauzade G. & C. Roux, 1989 - Likenoj de okcidenta Eùropo. Supplément 3a, Soc. Linn. Provence, 40:73-110.

▷▷▷Traduction - *Cette flore en espéranto comprend les clés de détermination de tous les genres présents en Europe ; de nombreux schémas macro- et microscopiques en font un ouvrage de référence pour la détermination précise des espèces (2300 taxons). La traduction de l'ensemble des textes, réalisée par Madame Paulette Ravel, la flore et les 3 suppléments est disponible auprès de l'AFL (un peu plus de 1100 pages au format A4).*

Dobson F. S., 2005 - Lichens - an illustrated guide to the british and irish species, 5ème édition revue et corrigée ; éditée par Richmond Publishing Co. Ltd, Slough, England. 480 p. [*Description de plus de 850 espèces avec photographies en couleur, schémas et cartes de répartition. Présence au début de l'ouvrage d'une clé des genres et pour chaque genre d'une clé des principales espèces (les caractéristiques du tholus et de la spore sont données pour chaque genre). Ce livre peut également être emporté sur le terrain*].

Purvis O.W., Coppins B.J., Hawksworth D.L., James P.W., Moore D.M., 1992 - The lichen flora of Great Britain and Ireland. Natural History Museum, British Lichen Society, London, 710p [*Clés de détermination dichotomiques de espèces de GB et d'Irlande mais reste valable pour une grande partie de la France. nouvelle édition à paraître en 2009*].

Sérussiaux Emmanuël, Diederich Paul et Lambinon Jacques, 2004 - Les macrolichens de Belgique, du Luxembourg et du nord de la France - Clés de détermination, le Muséum national d'histoire naturelle de Luxembourg (Ferrantia 40), 188 pages.

Wirth V., 1995 - Die Flechten Baden-Württembergs, Ulmer GmbH & Co., Stuttgart, t. 1 : 527 p., tome 2 : 480 pages [*Clés de détermination, plus de 550 photos en couleur, 1000 cartes de répartition et les clés permettent la détermination de plus de 1500 espèces de lichens*].

Bibliographie (limitée aux livres utilisés pour écrire ou illustrer cet article)

Abbeyes H. des, 1951 - Traité de Lichénologie, Lechevalier, 217 p.

Galun M. Ph. D., 1988 - Handbook of lichenology, en 3 volumes, vol. 1 - 297 p. ; vol. 2 - 181 p. ; vol. 3 - 147 p.

Gavériaux J.-P., 2003 - Principaux produits chimiques utilisés en lichénologie, bull. AFL 2003-1, vol. 28, 16 p.

Gavériaux J.-P., 2003 / 2004 / 2005 - Le microscope et son utilisation en lichénologie, 1^e partie, bull. AFL 2003-2, vol. 28, 20 p. / 2^e partie 2004-1, vol. 29, 10 p. / 3^e partie, 2005-1, vol. 30, 10 p.

Gavériaux J.-P., 2008 - Lexique des principaux termes de lichénologie, Lettres A,B,C, bull. AFL 33-1, 28 p. / lettres D,E, bull. AFL 33-2, 20 p.

Malcolm W.M. & Galloway D.J., 1997 - New Zealand Lichens, checklist, key and glossary, museum of New Zealand, 192 p.

Nash III T. H., 2008 - Lichen Biology, second edition, Cambridge University Press, 486 p.

Orange A., James P.W. & White F.J., 2001 - Microchemical methods for the identification of lichens, British Lichen Society, 101 p.

Ozenda P., 1963 - Handbuch der Pflanzenanatomie, Lichens, traité d'anatomie végétale, 199 p., Gebrüder Borntraeger, Berlin.

Roux C. et Clauzade G., 1985 - Likenoj de Okcidenta Europo : Ilustrita determinlibro, p. 9-58 : ĝeneralaĵoj pri la likenoj ; p. 59-69 : determino de la likenoj (*généralités sur les lichens et détermination des lichens*).