

Etude des niveaux de contamination en HAP et des différentes variables biologiques dans les grains de pollen de pin (Pinus nigra) et de frêne (Fraximus excelsior) du sillon Mosellan

Anna Macaluso-Galletta

▶ **To cite this version:**

Anna Macaluso-Galletta. Etude des niveaux de contamination en HAP et des différentes variables biologiques dans les grains de pollen de pin (Pinus nigra) et de frêne (Fraximus excelsior) du sillon Mosellan. Toxicologie. Université Paul Verlaine - Metz, 2004. Français. NNT : 2004METZ023S . tel-01750185

HAL Id: tel-01750185
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750185

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE DE METZ

UNIVERSITE DE METZ – UFR Sci F.A.

Laboratoire « Ecotoxicité, Santé Environnementale »

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE METZ
N° inv 2004 068 S
Cote S/M3 04/23
Loc

THESE

Présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur ès Sciences
mention "Toxicologie de l'Environnement"

le 1er Octobre 2004

par

Anna MACALUSO-GALLETTA

Etude des niveaux de contamination en HAP et des différentes variables biologiques dans les grains de pollen de pin (*Pinus nigra*) et de frêne (*Fraxinus excelsior*) du sillon mosellan

Membres du jury

Chantal VAN HALLUWYN, Professeur, Université de Lille, Rapporteur
Pierre Marie BADOT, Professeur, Université de Franche-Comté, Rapporteur
Jean-Pierre GARREC, Professeur, INRA Nancy, Examinateur
Jean-François MASFARAUD, Docteur, Université de Metz, Examinateur
Sylvie COTELLE, Docteur, Université de Metz, co-encadrant de Thèse
Jean-François FERARD, Professeur, Université de Metz, Directeur de Thèse

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ
031 536045 1

PPN 085630888

Tantae molis erat Romanam condere gentem

(Tant il était difficile de fonder l'empire romain, VIRGILE, Énéide, liv. I, v. 33).

Ce vers résume toutes les difficultés auxquelles les fondateurs de Rome ont du faire face lors de la construction de la ville, ainsi que dans l'union du peuple qui devait dicter les lois au monde.
Quand je suis arrivée en France, sans aucune connaissance de la langue française, j'étais, moi aussi dans le même cas : pour moi ce fût un défit difficile. Heureusement, j'ai rencontré sur mon chemin de nombreuses personnes qui ont su m'aider et je tiens à les en remercier.

Je tiens à remercier tout d'abord Monsieur le Professeur Jean François Férard de m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche et pour son soutien et sa confiance durant le déroulement de ce travail. Grâce à lui mon arrivée en France a été facilitée.

Je suis également reconnaissante à Sylvie Cotelle, Maître de conférences et co-responsable de ma thèse, pour l'intérêt qu'elle a toujours porté à mon travail. Sa disponibilité et ses conseils m'ont été d'une aide précieuse.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Jean François Masfaraud, Maître de conférences au laboratoire d'Ecotoxicologie (ESE), toujours prêt à m'aider durant ces trois années. Grâce à vos conseils et votre bonne humeur, je n'ai jamais baissé les bras face aux difficultés rencontrées dans ce travail de recherche. Votre bienveillance à mon égard restera pour toujours graver dans ma mémoire. A vos côtés, j'ai beaucoup appris et je vous remercie particulièrement pour votre aide dans l'interprétation statistique des données. Veuillez trouver ici l'expression de mon admiration et de mon respect.

Je remercie également le Professeur Paule Vasseur, Directeur du laboratoire d'Ecotoxicologie (ESE), de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de l'Université de Metz.

Je tiens à remercier sincèrement Mme Chantal VAN HALLUWYN, Professeur à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lille et Mr Pierre-Marie BADOT, Professeur à l'INRA de Franche-Comté, d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.
Mes remerciements s'adressent aussi à Mr Jean-Pierre GARREC, Professeur à l' INRA de Champenoux qui a bien voulu accepter de faire partie de ce jury.

Ma gratitude va également à Mme Maria Rita Melati et Santino Orecchio, Professeurs à l'Université de Palerme (Italie), votre amitié et votre disponibilité m'ont été d'une aide précieuse. Veuillez accepter ma reconnaissance et ma profonde sympathie.

Je tiens à remercier Anna Firetto, Docteur de l'Université de Palerme, combien de fois je t'ai appelé au secours car je n'arrivais pas à reproduire les même conditions que celles du laboratoire de Palerme (France Telecom te remercie également).

Mes remerciements s'adressent aussi à Jonathan Signoret, Docteur à l'Université de Metz pour m'avoir aidé dans les choix des sites.

Grâce à Claudine, Anne-Marie et Chantal, j'ai pu acquérir de bonnes connaissances techniques en laboratoire du point de vu des manipulations et de la « SECURITE », je vous remercie de votre disponibilité et de votre écoute.

Merci à toi Rosy pour la sympathie et la gentillesse, que tu as toujours montré à mon égard.

Je tiens sincèrement à exprimer ma gratitude à Maryline pour sa sympathie et son aide aux moments les plus variés.

J'en profite également pour remercier l'ensemble des actuels thésards et anciens thésards (Marie-Aline, Périne, Sébastien, Sophie, Stéphanie C., et Stéphanie P.) de leur soutien et de leur bonne humeur, tout au long de ma thèse. En particulier grâce à Eric, Loïc, Marc et Renaud pour la disponibilité et l'aide qu'ils m'ont offert pendant ces trois années surtout quand je paniquais face à la grammaire française ou à l'informatique. Merci de tout mon cœur pour les agréables moments passés ensemble.

Je tiens enfin à remercier mes parents et ma famille pour leur soutien et leur réconfort : c'est grâce à vos efforts si j'ai réussi. Merci à toi, Calogero, pour m'avoir permis de réaliser mon rêve et pour toute la compréhension dont tu as fait preuve pendant les moments difficiles.

Merci à vous tous pour l'effort qui vous avez fait pour comprendre mon français sans jamais vous moquer de moi.

SOMMAIRE

I INTRODUCTION p.1

II SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE p.3

II.1 LES HAP : ORIGINES ET PRINCIPALES CARACTERISTIQUES p.3

II.1.1 Source des HAP p.3

II.1.2 Propriété physico-chimiques et toxicologiques p.4

II.2 COMPORTEMENT DANS L'ENVIRONNEMENT ATMOSPHERIQUE p.8

II.3 PHYTODISPONIBILITE DES HAP p.11

II.3.1 Concentration des HAP dans les sols p.11

II.3.2 Les voies d'absorption et d'adsorption p.12

II.3.2.1 La voie d'absorption racinaire p.12

II.3.2.2 La voie foliaire p.13

II.3.3 La biosurveillance végétale p.16

II.4 LE POLLEN p.21

II.4.1 Structure p.21

II.4.2 Composition p.25

II.4.3 Pouvoir allergène p.26

II.4.4 Influence des polluants p.27

II.4.5 Variables biochimiques p.31

II.4.5.1 L'estérase p.31

II.4.5.2 La phosphatase acide p.32

III MATERIEL ET METHODES p.34

III.1 CHOIX DES PLANTES p.34

III.1.1 *Fraxinus excelsior* p.35

III.1.2 *Pinus nigra* p.37

III.2 CHOIX DES SITES D'ECHANTILLONNAGES p.39

III.3 PRELEVEMENT ET CONSERVATION DES GRAINS DE POLLEN p.41

III.4 ANALYSE MORPHOLOGIQUE p.41

III.5 TEST DE GERMINATION p.41

III.6 ANALYSE CHIMIQUE p.44

III.7 ANALYSE ENZYMATIQUE p.47

III.7.1 Estérase p.47

III.7.2 Phosphatase acide p.50

III.8 STATISTIQUE p.52

IV RESULTATS p.53
IV.1 ANALYSE MORPHOLOGIQUE p.53
IV.2 TEST DE GERMINATION p.58
IV.3 ANALYSE CHIMIQUE p.62
IV.4 ACTIVITES ENZYMATIQUES p.67
IV.4.1 Estérase p.67
IV.4.2 Phosphatase acide p.69
V DISCUSSION ET CONCLUSION p.72
VI PERSPECTIVES p.78
VII REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES p.79
ANNEXES (1 à 6)

Liste des figures

Figure 1 : Localisation de la région baie (bay region) et de la région fjord (fjord region) dans le dibenzo(a,l)pyrène.

Figure 2 : Répartition des HAP entre la phase gazeuse et particulaire selon la tension de vapeur.

Figure 3 : Flux de HAP pour le Nord-Est des Etats-Unis.

Figure 4 : Corrélation entre les HAP classifiés cancérogènes dans les feuilles de *Laurus nobilis* et dans l'air en Toscane, Italie.

Figure 5 : Corrélation entre les HAP et le Pb dans les feuilles de *Laurus nobilis*.

Figure 6 : Pollen de Myosotis.

Figure 7 : Pollen de *Melothria pendula* ayant 200 µm de diamètre.

Figure 8 : Structure du pollen.

Figure 9 : Structure de la paroi du pollen.

Figure 10 : Structure de la surface du pollen d'*Arabidopsis*.

Figure 11 : Mécanismes de la libération des allergènes par interaction pollen-polluant.

Figure 12 : Images par microscopie électronique à balayage d'un grain de pollen prélevé dans un site rural et un site urbain.

Figure 13 : Exemple de grains de pollen de *Pinus nigra* modifiés en comparaison avec un grain standard.

Figure 14 : Carte des sites d'échantillonnages.

Figure 15 : Courbe d'étalonnage pour le fluorène.

Figure 16 : Schéma de la réaction catalysée par l'estérase.

Figure 17 : Gamme étalon de la fluorescéine.

Figure 18 : Cinétique de la réaction enzymatique.

Figure 19 : Schéma de la réaction catalysée par la phosphatase acide.

Figure 20 : Gamme étalon du *p*-nitrophenolate.

Figure 21 : Pollen *Fraxinus excelsior* prélevé à la station témoin Amanvillers.

Figure 22 : Pollen *Pinus nigra* prélevé à la station témoin Lessy.

Figure 23 : Pollen *Fraxinus excelsior* prélevé à la station Joffre.

Figure 24 : Pollen *Fraxinus excelsior* prélevé à la station Leclerc.

Figure 25 : Pollen *Pinus nigra* prélevé à la station Remy.

Figure 26 : Pollen *Pinus nigra* prélevé à la station Remy.

Figure 27 : Pollen *Pinus nigra* prélevé à la station Remy.

Figure 28 : Pollen *Pinus nigra* prélevé à la station Hayange.

Figure 29 : Germination du pollen de *Fraxinus excelsior* prélevé à la station témoin Amanvillers.

Figure 30 : Germination du pollen de *Fraxinus excelsior* prélevé à la station Leclerc et à la station Gare.

Figure 31 : Germination du pollen de *Pinus nigra* prélevé à la station témoin Lessy.

Figure 32 : Germination du pollen de *Pinus nigra* prélevé à la station Mozart.

Figure 33 : Pourcentage de germination pour le pollen de *Fraxinus excelsior*.

Figure 34 : Pourcentage de germination pour le pollen de *Pinus nigra*.

Figure 35 : Concentration totale des HAP dans les grains de pollen de *Fraxinus excelsior*.

Figure 36 : Concentration totale des HAP dans les grains de pollen de *Pinus nigra*.

Figure 37 : Activité esterasique du pollen de *Fraxinus excelsior*.

Figure 38 : Activité esterasique du pollen de *Pinus nigra*.

Figure 39 : Phosphatase acide de *Fraxinus excelsior*.

Figure 40 : Phosphatase acide de *Pinus nigra*.

Figure 41 : Cercle de corrélation de données centrées réduites incluant les mesures des activités enzymatiques, le taux en HAP, le pourcentage de germination et la distribution des stations pour le pollen de *Pinus nigra*.

Figure 42 : Cercle de corrélation de données centrées réduites incluant les mesures des activités enzymatiques, le taux en HAP, le pourcentage de germination et la distribution des stations pour le pollen de *Fraxinus excelsior*.

Liste des tableaux

Tableau I : Les sources de la pollution atmosphérique par les HAP.

Tableau II : Sources des émissions et répartition des HAP dans la ville de Chicago.

Tableau III : Quelques HAP : structure et propriétés physico-chimiques.

Tableau IV : Classification de la cancérogénicité de 16 HAP.

Tableau V : Temps de demi-vie de certains HAP sous différentes conditions.

Tableau VI : Durée de vie de divers HAP et Nitro-HAP en présence de $OH^{\bullet}$, $NO_3^{\bullet}$, O_3 et hν.

Tableau VII : Concentrations des HAP dans l'air de différents sites.

Tableau VIII : Concentration des HAP dans les sols.

Tableau IX : log K_{ow}, log K_{oa} et log K_p pour certains HAP.

Tableau X : Concentration des HAP dans des échantillons de feuilles et air prélevé pendant les saisons estive et hivernale.

Tableau XI : Concentrations des HAP observées chez les plantes.

Tableau XII : Sites d'échantillonnage pour le frêne et le pin.

Tableau XIII : Composition de la solution mère.

Tableau XIV : Composition de la solution mère.

Tableau XV : Paramètres instrumentaux pour la détermination des HAP par CPG.

Tableau XVI : Teneur des différents HAP dans le pollen de *Fraxinus excelsior* prélevé dans les 9 stations en µg/g de p.s.

Tableau XVII : Teneur des différents HAP dans le pollen de *Pinus nigra* prélevé dans les 9 stations en µg/g de p.s.

Tableau XVIII : Rapport des concentrations des HAP.

Tableau XIX : Matrice de corrélation pour le pollen de *Fraxinus excelsior*.

Tableau XX : Matrice de corrélation pour le pollen de *Pinus nigra*.

Tableau XXI : Synthèse des résultats.

Liste des abréviations

2,4 D	2,4-acide dichlorophenoxy acétique
ACP	analyse en composantes principales
BPDE	bp-7,8-diol-9,10-epoxide
C_a	concentrations (g/m^3) d'un composé dans la phase gazeuse
$Ca(NO_3)_2 ,4H_2O$	nitrate de calcium
C_o	concentrations (g/m^3) d'un composé dans l'octanol
CPG	chromatographie en phase gazeuse
C_w	concentrations d'un composé dans l'eau
DCM	dichlorométane
FDA	fluorescéine diacétate
FID	détecteur à ionisation de flamme gazeuse
H_3BO_3	acide borique
HAP	hydrocarbures aromatiques polycycliques
K_{aw}	coefficient de partition entre l'air et l'eau
KH_2PO_4	phosphate de potassium
KNO_3	nitrate de potassium
K_{oa}	coefficient de répartition octanol – air
K_{ow}	coefficient de partition entre l'octanol et l'eau
K_p	coefficient de partition ($m^3 \cdot \mu g^{-1}$) entre la phase particulaire et la phase
L.Q.	limite de quantification
LUGOL	solution aqueuse iodo-iodurée
$MgSO_4 ,7H_2O$	sulfate de magnésium
NaOH	hydroxyde de sodium
$NO_3^{\bullet}$	radical nitrate
O_3	ozone
$OH^{\bullet}$	radical hydroxyle
p.s.	poids sec
PAH	polycyclic aromatic hydrocarbons
PER	perylène
Phosph. A.	phosphatase acide
p-NPP	*p*-nitrophenyl phosphate
q.s.p.	quantité suffisant pour
RNSA	Réseau National de Surveillance Aérobiologique
TMID	tetramethyl thiuram disulfide

Liste des annexes

Annexe 1 : Liste des espèces citées dans le texte

Annexe 2 : *Fraxinus excelsior* : fleur

Annexe 3 : *Pinus nigra* : fleur

Annexe 4 : *Fraxinus excelsior* : site d'échantillonnage George

Annexe 5 : *Pinus nigra* : sites d'échantillonnage Mozart et A31

Annexe 6 : Chromatogramme de 16 HAP

INTRODUCTION

I INTRODUCTION

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont très répandus dans l'environnement. Ils ont été détectés dans l'eau potable, les eaux superficielles, l'air, les sols, les aliments et les plantes. Ils constituent une famille de composés organiques, plus ou moins complexes, dont certains sont cancérigènes chez l'animal et pourraient l'être pour l'homme. Ils sont synthétisés lors de la formation des combustibles fossiles (pétrole et charbon) ou bien lors de combustions incomplètes de matières organiques. Même si les sources naturelles d'émissions de HAP (incendies de forêts ou éruptions volcaniques) peuvent contribuer à leur accumulation dans l'environnement, les sources de pollution par les HAP sont essentiellement anthropiques (transport routier, effluents industriels, extraction et transport du pétrole, chauffage, ...).

La distribution des HAP dans l'atmosphère dépend de leurs caractéristiques physico-chimiques. Ils peuvent être présents sous forme gazeuse ou associés aux particules atmosphériques selon leur tension de vapeur et la température ambiante. En raison de leur faible solubilité dans l'eau, les HAP présents dans l'environnement ont tendance à s'associer aux fines particules en suspension (Onuska *et al.*, 1989). En général l'exposition n'est pas limitée à un seul composé mais plutôt à un mélange.

La concentration des HAP dans l'atmosphère n'est pas encore une mesure de routine faite par les stations de mesure. Les plantes peuvent être utilisées comme bio-indicateurs qualitatifs et quantitatifs de la concentration des HAP dans l'environnement. Elles sont capables d'accumuler les HAP présents dans l'atmosphère (Simonich et Hites, 1994a). Les plantes utilisées pour la biosurveillance des HAP dans l'air ont des caractéristiques qui en favorisent l'accumulation (haute teneur en lipides, grande surface pour les feuilles,....). Mais très peu de travaux ont porté jusqu'à présent sur l'accumulation et l'action des HAP sur les grains de pollen. L'intérêt d'étudier le pollen est justifié par le fait que le pollen est responsable de la transmission du patrimoine génétique de l'espèce et que toute modification peut perturber la distribution et la survie de l'espèce dans son environnement. De plus le pollen est impliqué dans les phénomènes d'allergie qui depuis ces 20 dernières années sont en constante augmentation.

Les grains de pollen adsorbent les polluants de l'atmosphère, ce qui conduit à l'altération de la surface des grains de pollen, à la libération d'allergènes et à leur agglomération.

L'objectif de ce travail est de vérifier l'existence ou non de relations de cause à effet entre exposition de grains de pollen et i) modifications de la morphologie, de la structure et/ou

ii) fonctions des grains de pollen. Il s'agit aussi de mieux connaître le rôle de certaines enzymes telles que phosphatase acide et estérase.

Ce travail a été réalisé sous le double responsabilité du Professeur J.F. Férard et du Dr S. Cotelle au laboratoire Ecotoxicologie et Santé Environnementale (équipe CNRS FRE 2635).

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

II SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1 LES HAP : ORIGINES ET PRINCIPALES CARACTERISTIQUES

II.1.1 Sources des HAP

Les sources naturelles de HAP dans l'atmosphère sont les incendies de forêts, les activités volcaniques et la décomposition de matériaux organiques (Berko, 1999). Les rejets de HAP d'origine anthropique sont dus en général aux combustions incomplètes de matières organiques et en particulier de matériaux fossiles. En France, les activités d'origine anthropique responsables de la production de HAP sont présentées dans le tableau I. Les émissions proviennent principalement de 3 secteurs qui sont par ordre d'importance :

- l'usage de combustibles notamment pour le chauffage domestique et industriel au fuel, au charbon ou au bois (92,9 tonnes en 2002).
- les transports routiers : les moteurs (notamment les moteurs diesels) rejettent des HAP (80,3 tonnes en 2002)
- les procédés industriels tels que la métallurgie des métaux ferreux, le craquage catalytique du pétrole ou la production de coke (55,2 tonnes en 2002).

Combustibles (chauffage)	37 %
Transports routiers	32 %
Procédés industriels	22 %
Divers	9 %

Tableau I : Les sources de la pollution atmosphérique par les HAP en France (CITEPA, 2004).

Plusieurs données confirment que les sources les plus importantes de HAP dans les villes sont les transports routiers et le chauffage domestique (Aceves et Grimald,1993 ; Nielsen, 1996 ; Anh *et al.*, 1999 ; Cincinelli *et al.*, 2003). Khalili *et al.*(1995) ont déterminé la composition chimique des HAP dans la ville de Chicago (USA) de 1990 à 1991 (tab. II). Ils ont trouvé que les HAP à deux et trois cycles représentaient la majorité des HAP totaux mesurés à l'émission ou à l'immission.

Par ailleurs, les HAP avec six cycles comme l'indéno(1,2,3-cd)pyrène et le benzo(ghi)pérylène ont été trouvés principalement au niveau des tunnels autoroutiers et des moteurs diesel et à fuel.

Lieux de prélèvement	**% HAP 2 et 3 cycles**
Fours des cokeries	98 %
Tunnels autoroutiers	92 %
Combustion de bois	80 %
Moteurs diesel	76 %
Moteurs à fuel	73 %

Tableau II : Sources des émissions et répartition des HAP dans la ville de Chicago (d'après Khalili *et al.*, 1995).

Comme de nombreux polluants, les HAP se retrouvent également dans les compartiments terrestres (Wild et Jones, 1995) et aquatiques (Menzie *et al.*, 1992 ; Akpan *et al.*,1994). Dans ces derniers, les principales sources de HAP sont les produits traités à la créosote, les activités pétrolières et les rejets industriels (Baird, 1999).

II.1.2 Propriétés physico-chimiques et toxicologiques

Les HAP constituent un groupe de composés organiques issus de la fusion de cycles benzéniques. Il est courant de considérer la somme des 16 HAP (tab.III) ayant entre 2 (par exemple le naphtalène) et 6 cycles (par exemple le benzo(ghi)périlène). A température et pression ordinaires, les HAP sont solides, blancs ou légèrement jaunes. Ce sont des composés qui dans l'environnement se retrouvent sous forme non-substituée ou substituée et dans ce cas, les produits sont évidemment très nombreux. Comme le montre le tableau III, les caractéristiques physico–chimiques des HAP varient avec leur masse moléculaire. De façon générale, les HAP ont un point de fusion supérieur à 80°C et un point d'ébullition élevé (supérieur à 217°C). Vu leur faible tension de vapeur (de 10^{-2} à 10^{-11} kPa à 25°C) et leur faible solubilité dans l'eau (inférieure à 31,7 mg/l), les HAP sont généralement adsorbés aux matières particulaires en suspension que ce soit dans l'air ou dans l'eau (Onuska *et al.*, 1989 ; Eisler, 2000). Lorsque leur masse moléculaire augmente, leur solubilité dans l'eau diminue. A l'inverse, leur solubilité augmente dans les tissus riches en lipides avec leur masse moléculaire (Agence de l'eau Seine – Normandie, 1997), comme l'illustre l'augmentation du log K_{ow}.

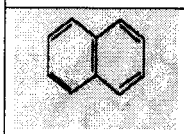
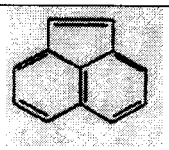
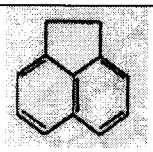
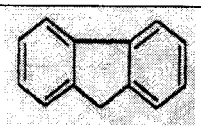
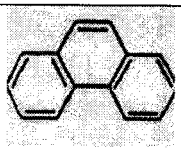
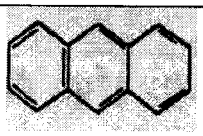
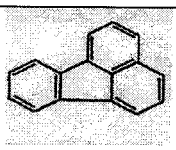
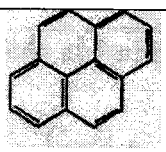
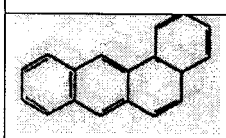
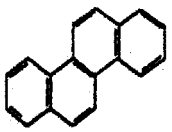
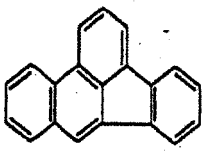
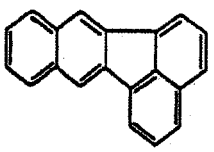
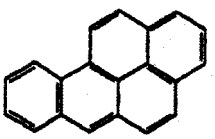
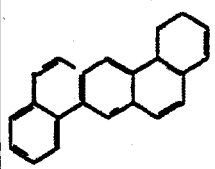
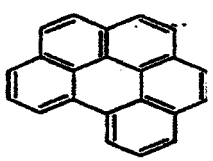
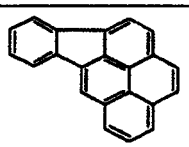
Structure	Nom Usuel selon la Nomenclature IUPAC et Abréviation usuelle	• log K_{ow} •Formule chimique •Masse moléculaire g/mol	T_f * (°C)	T_e * (°C)	Solubilité (µg/l à 25°C)	P_v* Pa à 25°C)
	Naphtalène nap	• 3,4 • $C_{10}H_8$ • 276,34	81	217	31700	10,4
	Acénaphtylène acy	• 4,07 • $C_{12}H_{12}$ • 152.22	92-93	265-275	----------	$8,9 \bullet 10^{-1}$
	Acénaphtène ace	• 3,92 • $C_{12}H_{10}$ • 154,21	95	279	3930	$2,9 \bullet 10^{-1}$
	Fluorène fl	• 4,18 • $C_{13}H_{10}$ • 166,21	115-116	295	1980	$9,0 \bullet 10^{-2}$
	Phénanthrène phe	• 4,57 • $C_{14}H_{10}$ • 178,22	100,5	340	1290	$1,6 \bullet 10^{-2}$
	Anthracène ant	• 4,54 • $C_{14}H_{10}$ • 178.22	216,4	342	73	$8,0 \bullet 10^{-4}$
	Fluoranthène flu	• 5,22 • $C_{16}H_{10}$ • 202,25	108,8	375	260	$1,2 \bullet 10^{-3}$
	Pyrène pyr	• 5,18 • $C_{16}H_{10}$ • 202,25	150,4	393	135	$6,0 \bullet 10^{-4}$
	Benzo(a)anthracène baa	• 5,81 • $C_{18}H_{12}$ • 228,28	160,7	400	14	$2,8 \bullet 10^{-5}$

Tableau III : Quelques HAP : structure et propriétés physico-chimiques (d'après Environmental Health Criteria 202,1998 ; Agence de l'eau Seine – Normandie, 1997 ; Finizio et al. 1997).

Structure	Nom usuel selon la nomenclature IUPAC - Abréviation usuelle	• log K_{ow} •Formule chimique •Masse moléculaire g/mol	T_f * (°C)	T_e * (°C)	Solubilité (µg/l à 25°C)	P_v* (Pa à 25°C)
	Chrysène chr	• 5,86 • $C_{18}H_{12}$ • 228,28	253,8	448	2,0	$8,4 \bullet 10^{-5}$
	Benzo(b)fluoranthène bbf	• 6,12 • $C_{20}H_{12}$ • 252,32	168,3	481	1,2	$6,7 \bullet 10^{-5}$
	Benzo(k)fluoranthène bkf	• 6,00 • $C_{20}H_{12}$ • 252,32	215,7	480	0,76	$1,3 \bullet 10^{-8}$
	Benzo(a)pyrène bap	• 6,04 • $C_{20}H_{12}$ • 252,32	178,1	496	3,8	$7,3 \bullet 10^{-7}$
	Dibenzo(a,h)anthracène dba	• 6,50 • $C_{22}H_{14}$ • 278,33	266,6	524	0,5	$1,3 \bullet 10^{-8}$
	Benzo(ghi)périlène Bgp	• 7,10 • $C_{22}H_{12}$ • 276,34	278,3	545	0,26	$1,4 \bullet 10^{-8}$
	Indeno(1,2,3-cd)pyrène ind	• 6,58 • $C_{22}H_{12}$ • 276,34	163,6	536	62	$1,3 \bullet 10^{-8}$

T_f = Température de fusion T_e = Température d'ébullition P_v = Pression de vapeur

Les HAP constituent une classe de polluants dangereux, bien qu'ils ne possèdent pas une forte toxicité aiguë, car beaucoup d'entre eux sont de puissants cancérogènes (tab.IV).

	IARC[a]	US-EPA[b]
Naphtalène	-	-
Acénaphthylène	-	D
Acénaphtène	-	-
Fluorène	3	D
Phénanthrène	3	D
Antracène	3	D
Fluoranthène	3	D
Pyrène	3	D
Benzo(a)anthracène	2A	B2
Chrysène	3	B2
Benzo(b)fluoranthène	2B	B2
Benzo(k)fluoranthène	2B	B2
Benzo(a)pyrène	2A	B2
Dibenzo(a,h)anthracène	2B	B2
Benzo(ghi)pérylène	3	D
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	2B	B2

Tableau IV : Classification de la cancérogénicité de 16 HAP.

[a] 2A probablement cancérigène pour l'homme, 2B possiblement cancérigène pour l'homme, 3 non classifiable

[b] B2 probablement cancérigène pour l'homme, D non classifiable (selon IRIS, 1999).

Déjà au 18ème siècle, la proportion importante de cancers du scrotum chez les ramoneurs, a été attribuée à la suie (riche en HAP). La cancérogénicité se manifeste pour les HAP constitués d'au moins quatre cycles. La position des cycles détermine leur niveau de cancérogénicité. Les HAP les plus cancérigènes possèdent une région baie et/ou une région fjord et sont dissymétriques (fig.1). Absorbés, ils vont subir une oxydation enzymatique par les cytochromes P-450, et plus particulièrement par le cytochrome P4501A ou 1B (Burchiel et Luster, 2001).

Dans le cas du benzo(a)pyrène, fréquemment utilisé comme substance de référence, les cytochromes P-450 participent à des réactions d'époxidation qui aboutissent à la formation d'un cancérogène ultime le BPDE (BP-7,8-diol-9;10-epoxide) mutagène et cancérogène (Baird, 1999 ; Eisler, 2000).

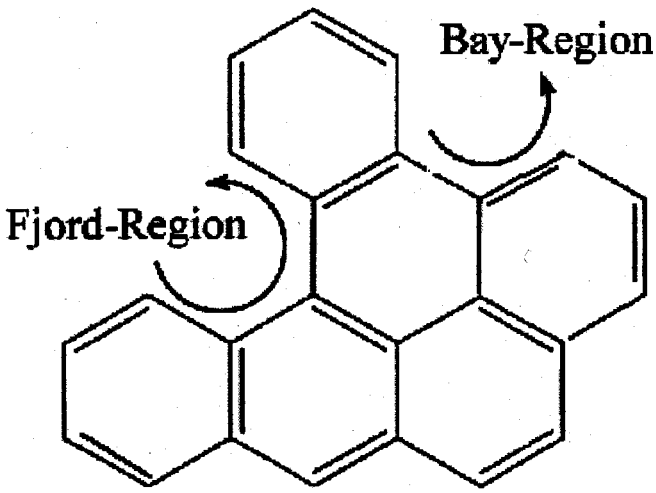


Figure1 : Localisation de la région baie (bay region) et de la region fjord (fjord région) dans le dibenzo(a,l)pyrène (non présenté dans la liste des 16 HAP du tableau III) (d'après Katz *et al.*, 1998).

En écotoxicologie plusieurs auteurs ont mis en évidence les modifications biochimiques après exposition aux HAP de différentes espèces de vers de terre (*Eisenia fetida, Enchytraeus crypticus, Lumbricus rubellus*). Saint-Denis *et al.* (1999); Brown *et al.* (2004) et Achazi *et al.* (1998) ont pu constater une modulation de certaines enzymes de détoxication (catalase, enzyme de peroxydation lipidique) en fonction de la durée d'exposition et de la concentration des HAP. De plus, Brown *et al.* (2004) ont montré une diminution de la survie et de la production de cocon pour les vers de terre exposés à une concentration croissante de pyrène dans les sols. L'effet génotoxique des HAP sur le ver de terre *Eisenia fetida* a été illustré par Walsh *et al.* (1997) qui ont constaté une augmentation des adduits à l'ADN après une et deux semaines d'exposition au sol contaminé par les HAP (notamment par du benzo(a)pyrène).

II.2 COMPORTEMENT DANS L'ENVIRONNEMENT ATMOSPHERIQUE

Dans l'environnement, les concentrations et la distribution des HAP varient fortement à la fois dans le temps et dans l'espace en relation avec leurs propriétés physico-chimiques et la température ambiante. En raison de leur faible solubilité dans l'eau, les HAP présents dans l'environnement ont tendance à s'associer aux fines particules en suspension, aussi bien dans l'eau que dans l'air. Dans l'atmosphère, comme l'illustre la figure 2, les HAP se répartissent entre la phase gazeuse et la phase particulaire en fonction de leur pression de vapeur. C'est pour cette raison que le naphtalène se retrouve dans la phase vapeur alors que le benzo(ghi)perylène se retrouve dans la phase particulaire.

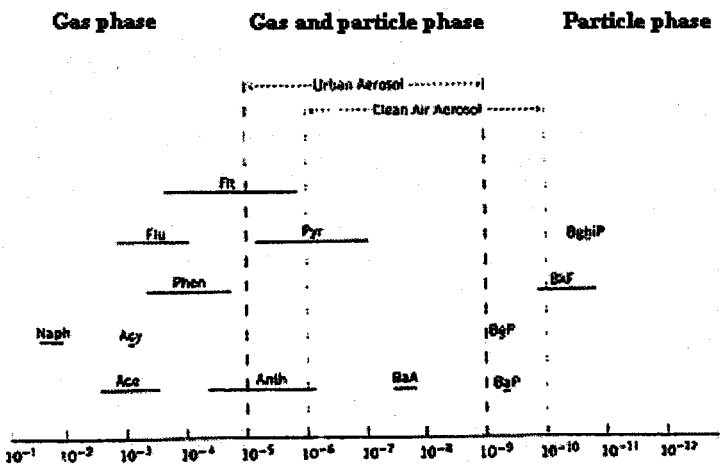


Figure 2 : Répartition des HAP entre la phase gazeuse et particulaire selon la tension de vapeur (d'après Lane, 1989).

La tension de vapeur croît avec l'augmentation de la température : pendant les jours les plus chauds de l'année avec une température proche de 40°C même une partie du benzo(a)pyrène se trouve en phase vapeur. A l'inverse, une diminution de la température provoque une chute de la tension de vapeur telle que même les plus petits HAP ne restent que partiellement dans la phase vapeur et s'associent rapidement aux matières particulaires en suspension (Baird, 1999).

La plupart des HAP ont des temps de demi-vie sous lumière artificielle inférieurs à 14 heures (tableau V). Ceux-ci diminuent en présence de 0,2 ppm d'ozone. Il faut signaler que les effets de la lumière et de l'ozone ne sont pas cumulables comme le montre le tableau V

(Lane,1989). Les HAP présents dans l'atmosphère en phase vapeur réagissent avec la lumière (photolyse), avec le radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$), le radical nitrate ($NO_3^{\bullet}$), et l'ozone (Arey *et al.*, 1995) comme l'illustre le tableau VI. Divers auteurs, dont Bolzacchini *et al.*(1998), estiment que les produits de réaction sont bien plus toxiques que les produits initiaux : par exemple le naphtalène ne présente pas de toxicité, contrairement à son nitroderivé, le 2- nitronaphtalène, qui est cancérigène chez l'animal.

HAP	Temps de demi-vie (en heures) sous lumière artificielle	Temps de demi-vie (en heures) sous lumière artificielle et 0,2 ppm d'ozone	Temps de demi-vie (en heures) à l'obscurité et 0,2 ppm d'ozone
Anthracène	0,20	0,15	1,23
Benzo(a)anthracène	4,20	1,35	2,88
Dibenzo(a,h) anthracène	9,60	4,80	2,71
Dibenzo(a,c) anthracène	9,20	4,60	3,82
Pyrène	4,20	2,75	15,72
Benzo(a)pyrène	5,30	0,58	0,62
Benzo(e)pyrène	21,10	5,38	7,60
Benzo(b)fluoranthène	8,70	4,20	52,70
Benzo(k)fluoranthène	14,10	3,90	34,90

Tableau V : Temps de demi-vie de certains HAP sous différentes conditions (d'après Lane, 1989).

	$OH^{\bullet}$	$NO_3^{\bullet}$	O_3	hν
Naphthalène	8 h*	1,5 a*	> 80 j	
Biphenyl	2,0 j*	>105 a	> 80 j	
1-Methylnaphthalène	3,3 h	250 j	> 125 j	
2-Methylnaphthalène	3,3 h	180 j	> 40 j	
Acénaphtène	1,7 h	h	> 30 j	
Acénaphtylène	1,6 h	6 min	~ 43 min	
Phénanthrène	j	4,6 h	40 j	
1-Nitronaphthalène	2,7 j	18 a	> 28 j	1,7 h
2-Nitronaphthalène	2,6 j	20 a	> 28 j	2,2 h

* j = jour, h=heure, a=année min=minute

Tableau VI : Durée de vie de divers HAP et Nitro-HAP en présence de $OH^{\bullet}$, $NO_3^{\bullet}$, O_3 et hν (d'après Arey *et al.*, 1995).

La détermination des HAP dans l'atmosphère est effectuée grâce à de filtres en fibres de verre où l'on fait passer l'air en grande quantité (Nielsen, 1996 ; Odabasi *et al.*,1999 ; Venkataraman *et al.*, 1999; Monarca *et al.*, 2001 ; Cincinelli *et al.*, 2003).
Plusieurs auteurs ont analysé les concentrations des HAP dans différents sites (tab.VII).

Ville	Total HAP	Références
Prato (Italie)	0,8 – 24,2 ng/m^3	Cincinelli *et al.* (2003)
Naples (Italie)	2 – 130 ng/m^3	Caricchia *et al.* (1999)
Thessalonique (Grèce)	15 – 4974 ng/m^3	Kipopoulou *et al.* (1999)
Parc National du Mississippi (U.S.A.)	2,6 – 3,0 ng/m^3	White et Hardy (1994)
Flandres (Belgique)	43,1 –268,7 ng/m^3	Du Four *et al.* (2004)
France (site à proximité d'un incinérateur)	4,3 – 77,6 ng/m^3	Besombes *et al.* (2001)

Tableau VII : Concentrations des HAP dans l'air de différents sites.

II.3 PHYTODISPONIBILITE DES HAP

II.3.1 Concentration des HAP dans les sols.

Simonich et Hites (1994a) estiment que 44±18% des HAP présents dans l'atmosphère du Nord-Est des Etats-Unis sont récupérés par la végétation, ce qui représentait en 1983 pas moins de 1700 tonnes/an (fig.3). Au total, ces auteurs estiment que plus de 53 % des HAP présents dans l'atmosphère se retrouvent finalement dans les sols.

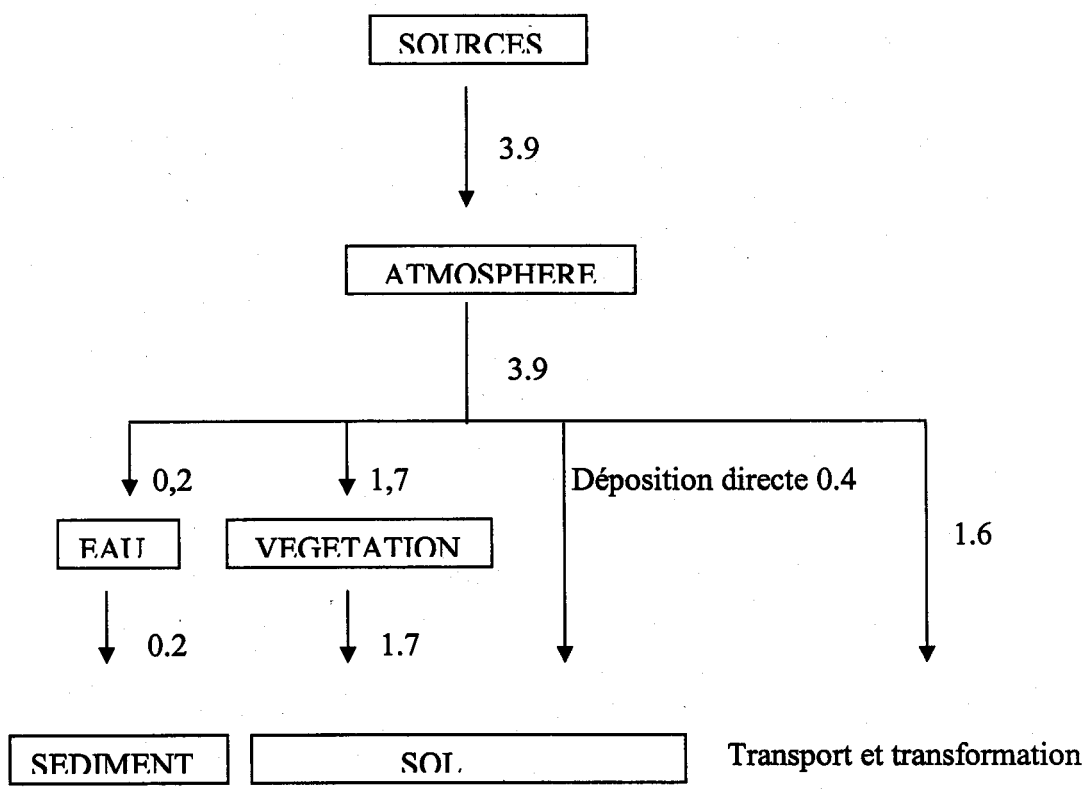


Figure 3 : Flux de HAP (en unité de 10^6 kg/an) pour le Nord-Est des Etats-Unis (d'après Simonich et Hites, 1994a).

Le tableau VIII présente quelques données relatives à la détermination des HAP totaux dans les sols. Il en ressort que les concentrations retrouvées dans les sols des zones industrielles et urbaines sont plus fortes que celles retrouvées dans les zones semi-rurales. Dans ces dernières, un' étude de Jones *et al.* (1989a) montre une augmentation de la concentration des HAP totaux à partir de 1914.

	Total HAP µg/kg	Référence
Sol semi-rural	150-1770	Jones *et al.* (1989a)
Gradient sol rural-urbain	100-55000	Jones *et al.* (1989b)
Sol industriel	151-93785	Wilcke *et al.* (1996)
Sol près d'une autoroute	106-3095	Tuhackova *et al.*(2001)
Sol près d'une usine à gaz	$7337 \cdot 10^3$	Bewley *et al.* (1989)
Sol près d'une usine pour la production de créosote	$5863 \cdot 10^3$	Ellis *et al.* (1991)

Tableau VIII : Concentration des HAP dans les sols.

II.3.2. Les voies d'absorption et d'adsorption

Puisque les HAP sont présents dans l'air et dans le sol, il y a deux voies d'absorption et d'adsorption possibles soit par le système racinaire, soit par le système foliaire.

II.3.2.1 La voie d'absorption racinaire

Même si un peu plus de 50 % des HAP de l'atmosphère sont déposés sur le sol par déposition directe (fig.3), de nombreux auteurs affirment que l'absorption racinaire est faible (Thomas *et al.*,1984 ; Nakajima *et al.*,1995 ; Simonich et Hites, 1995 ; Tremolada *et al.*, 1996 ; Slaski *et al.* 2000 ; Gao et Zhu, 2004). En effet, après déposition sur le sol, les HAP légers (2-3 cycles) sont dégradés alors que les HAP lourds (>4 cycles) sont adsorbés aux matières organiques (Slaski *et al.*, 2000). De plus, les même auteurs stipulent que les HAP, au vu de leurs propriétés lipophiles, sont immobilisés par les lipides des racines. En outre, Binet *et al.* (2000) ont montré qu'ils sont aussi retenus et dégradés par la rhizosphère.

II.3.2.2 La voie foliaire

L'accumulation des HAP dans les feuilles est liée à plusieurs facteurs : le statut des HAP dans l'atmosphère, la superficie foliaire, la teneur en lipides, le coefficient de répartition octanol-air et la température ambiante.

a) *Le statut des HAP dans l'atmosphère*

L'accumulation des HAP dans les feuilles dépend de la distribution des HAP dans l'atmosphère entre la phase vapeur et la phase particulaire. Par conséquent, le mécanisme de transfert dans ou sur les feuilles peut se faire par voie gazeuse ou par déposition de particules (Tremolada *et al.*,1996). Nakajima *et al.* (1995) ont mesuré la concentration en HAP chez *Rhododendron oomurasaki* (azalée) et dans l'atmosphère. La concentration de HAP avec cinq cycles, comme le benzo(a)pyrène et le pérylène, dans et sur les feuilles était proportionnelle à celle trouvée dans la phase particulaire atmosphérique, alors que la concentration de pyrène était liée à celle de la phase vapeur.

b) *La surface foliaire*

En général, les feuilles ayant une grande surface ont un pouvoir d'absorption plus important que les feuilles qui ont une surface moindre pour un même taux d'exposition (Thomas *et al.*,1984,1985 ; Simonich et Hites, 1995). La morphologie de la feuille intervient dans la capacité d'adsorption des HAP, la présence des poils sur la surface est aussi un facteur qui augmente la rétention des HAP (Free-Smith *et al.*, 1997 ; Howsam *et al.*, 2000).

c) *La teneur lipidique*

La teneur en lipides dans les feuilles joue un rôle important dans l'accumulation des HAP (Simonich et Hites 1994a, 1994b, 1995). Les tissus qui ont davantage de lipides sont capables d'accumuler plus de HAP quand ils sont exposés à une même concentration atmosphérique (Simonich et Hites, 1994b). Les différences de concentrations en HAP observées entre les tissus d'une même plante peuvent ainsi être expliquées par la différence des teneurs en lipides. Le fait que les feuilles aient une cuticule favorise l'accumulation des HAP. En effet elle est constituée de polymères lipidiques insolubles (Garrec *et al.*, 1995 ; Kerstiens, 2001).

Lodovici *et al.* (1998) ont montré que les HAP sont bien liés à la portion lipophile de la feuille. Ils ont mis en évidence sur des feuilles de *Laurus nobilis* (laurier) rincées avec de l'eau que la teneur en HAP n'était pas modifiée.

d) *Le coefficient octanol-air*

Le coefficient de répartition octanol – air (K_{oa}) est le rapport entre la concentration des HAP dans l'octanol et la concentration des HAP dans l'air. Il est reconnu comme un excellent descripteur du partage entre le phase gazeuse et la phase particulaire (Finizio *et al.*, 1997) et, à ce titre, comme un important paramètre pour la compréhension de la pénétration des polluants à travers la surface foliaire (Simonich et Hites, 1995 ; Kipopoulou *et al.*, 1999).
Il peut être estimé par le rapport K_{ow}/K_{aw} où K_{ow} est le coefficient de partition entre l'octanol et l'eau et K_{aw} est le coefficient de partition entre l'air et l'eau (Finizio *et al.*, 1997), selon l'expression suivante :

$$K_{oa} = K_{ow}/K_{aw} = (C_o/C_w)/(C_a/C_w) = C_o/C_a \quad (1)$$

Ce rapport est également équivalent au rapport C_o/C_a comme le montre l'équation (1) où C_o est C_a sont respectivement les concentrations (g/m^3) d'un composé dans l'octanol et dans la phase gazeuse (Harner et Mackay, 1995).
Comme le montre le tableau IX, il existe une corrélation entre le log K_{ow} et le log K_{oa} (calculé) ainsi que entre le log K_p et le log K_{oa} illustrée par l'équation suivante (Finizio *et al.*, 1997) :

$$\log K_p = 0{,}79 \log K_{oa} - 10{,}01 \quad (n = 10) \quad r^2 = 0{,}97$$

où le log K_p est le coefficient de partition ($m^3 \cdot \mu g^{-1}$) entre la phase particulaire et la phase gazeuse.

HAP	log K_{ow}	log K_{oa} (calculé)	log K_p
Fluorène	4,18	6,68	- 4,02 à - 5,08
Phenanthrène	4,57	7,45	- 3,56 à - 4,75
Anthracène	4,54	7,34	- 3,79 à - 4,72
Fluranthène	5,22	8,60	- 2,94 à - 3,70
Pyrène	5,18	8,61	- 2,94 à - 3,51
Chrysène	5,86	10,44	
Benzo(a)anthracène	5,91	9,54	
Benzo(a)pyrène	6,04	10,77	
Benzo(k)fluoranthène	6,00	11,19	

Tableau IX : log K_{ow}, log K_{oa} et log K_p pour certains HAP (d'après Finizio *et al.*, 1997)

Ceci est confirmé par les travaux de McLachlan (1999) et Kaupp et McLachlan (1999) pour lesquelles les HAP avec log Koa > 11, donc à haut poids moléculaire, sont présents en majorité dans la phase particulaire.

e) *La température ambiante*

La répartition des HAP entre l'atmosphère et les plantes dépend aussi de la température ambiante. Pour une température ambiante basse en automne et hiver, la plupart des HAP sont récupérés par les plantes. Au contraire, en été, les HAP peuvent se volatiliser dans l'atmosphère. Les changements de la répartition des HAP liés à la saison ont été observés par plusieurs auteurs (tableau X).

Il faut enfin préciser que l'adsorption par les plantes des HAP à haut poids moléculaire qui sont préférentiellement liés aux particules est peu dépendante de la température (Simonich et Hites, 1994b, Howsam *et al.*, 2001).

ECHANTILLON	ETE	AUTOMNE/HIVER	REFERENCE
Feuilles (laurier) *Laurus nobilis*	Σ HAP 102,4 µg/kg	Σ HAP 352,5 µg/kg	Lodovici *et al.* (1994)
Feuilles (laurier) *Laurus nobilis*	Σ HAP 432,8 µg/kg	Σ HAP 812,9 µg/kg	Lodovici *et al.*(1994)
Feuilles (laurier) *Laurus nobilis*	Σ HAP 211,0 µg/kg	Σ HAP 855,2 µg/kg	Lodovici *et al.* (1994)
Feuilles (érable) *Acer saccarum*	Σ HAP 500 µg/kg	Σ HAP 1100 µg/kg	Simonich et Hites (1994b)
Feuilles (azalée) *Rhododendron oomurasaki*	Pyrène 31 µg/kg Benzo(a)pyrène 3,19 µg/kg	Pyrène 495 µg/kg Benzo(a)Pyrène 39,9 µg/kg	Nakajima *et al.* (1995)
Air	Σ HAP 43 ng/m^3	Σ HAP 8 ng/m^3	Smith *et al.*(2001)
Air	Pyrène 24 ng/ m^3	Pyrène 3,5 ng/m^3	Nakajima *et al.* (1995)

Tableau X : Concentration des HAP dans des échantillons de feuilles et air prélevé pendant les saisons estive et hivernale.

II.3.3 La biosurveillance végétale

Il existe deux formes de biosurveillance (biomonitoring) : active et passive. On parle de surveillance active quand les plantes ont poussé dans un milieu artificiel, sans aucun ou un minimum de contact avec le polluant que l'on veut étudier, puis transférées, pendant une durée variable mais connue, sur le site à étudier. La surveillance passive permet d'analyser le polluant dans ou sur la plante (ou une partie de celle-ci) qui se trouve dans son propre milieu et où la durée d'exposition est une donnée plus difficile à obtenir.

L'utilisation des plantes permet aussi de contrôler les variations de concentration à différentes distances par rapport à la source de pollution. Une analyse de l'effet « distance » sur l'accumulation de HAP dans les plantes a été faite par Meharg *et al.* (1998). L'accumulation des 16 HAP (cf. tab.III) a été analysée dans les pousses d'herbe prélevées à différentes distances (2,5 à 4 km) du site où pendant neuf heures il y avait eu un incendie de 10000 tonnes de polypropylène. Les concentrations des HAP retrouvées dans les pousses d'herbe étaient 70 fois supérieures à celles de zones témoins non impactées. De plus, les HAP les plus légers étaient dispersés sur une plus large distance que les HAP les plus lourds.

Une très grande variété d'espèces végétales a été utilisée pour évaluer la concentration des HAP dans l'environnement. L'avantage, en utilisant les plantes, est dû au fait que la végétation joue le rôle d'échantillonneur avec accumulation des HAP en continu. En général, les plantes utilisées pour la détermination des HAP dans l'air ont des caractéristiques qui en favorisent l'accumulation : haute teneur en lipides, grande surface pour les feuilles, caractéristiques morphologiques particulières comme la présence de poils et d'une cuticule.

Le fait que les plantes peuvent être considérées comme de bons échantillonneurs a été démontré par plusieurs travaux où l'on trouve une excellente corrélation entre les HAP présents dans l'air et ceux déterminés dans les plantes. Néanmoins, par rapport aux prélèvements effectués sur des supports non biologiques, les HAP adsorbés sur filtre peuvent être davantage oxydés par des oxydants présents dans la matrice gazeuse étudiée, ce qui peut sous-estimer la concentration réelle dans l'air (Lodovici *et al.*, 1994). Ces même auteurs ajoutent qu'il faut faire plusieurs échantillonnages sur plusieurs jours et pendant les différentes saisons de l'année avant d'obtenir des résultats significatifs et que cela nécessite un personnel spécialisé et des appareils coûteux.

Lodovici *et al.* (1998) ont utilisé des feuilles de *Laurus nobilis* (laurier), un arbre sempervirent[1], pour déterminer le taux des HAP présents dans l'air. Les feuilles ont été prélevées pendant l'été et l'hiver à partir de 13 sites urbains en Toscane (Italie). En même

[1] Végétaux qui conservent leurs feuilles toute l'année.

temps, des échantillons d'air ont été prélevés sur les même sites. Les auteurs ont trouvé une bonne corrélation (r=0.824) entre le taux des HAP cancérogènes trouvés dans l'air et celui dans les feuilles (fig.4). D'autres études confirment la similitude de composition en HAP dans l'air et dans les végétaux (Nakajima *et al.*, 1995 ; Kipopoulou *et al.*, 1999).

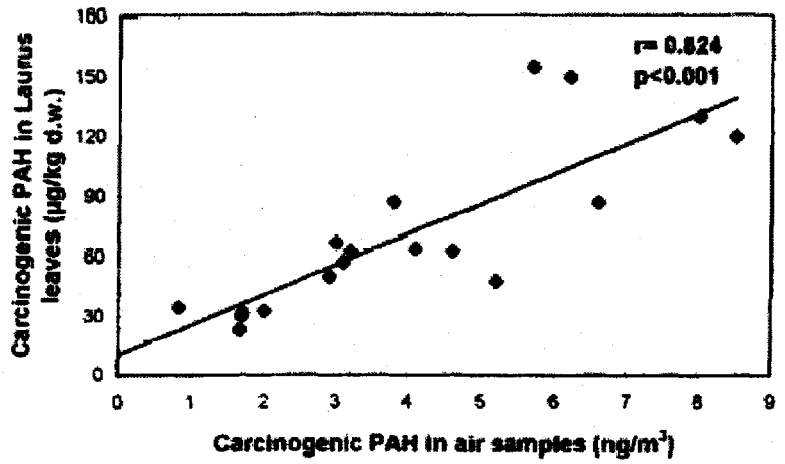


Figure 4 : Corrélation entre les HAP classifiés cancérogènes dans les feuilles de *Laurus nobilis* (laurier) et dans l'air en Toscane, Italie (d'après Lodovici *et al.*, 1998).

Par ailleurs, Lodovici *et al.* (1994) ont étudié l'accumulation du plomb dans les feuilles de *Laurus nobilis* (laurier) prélevées à partir de 13 sites urbains et non urbains à proximité de Florence, Italie. Ils ont établi que les concentrations du plomb étaient bien corrélées (r=0.829) avec les concentrations des HAP déterminées dans les feuilles (fig.5). La même corrélation, a été faite par Macaluso *et al.*(2000) sur les feuilles de *Olea europaea* (olivier).

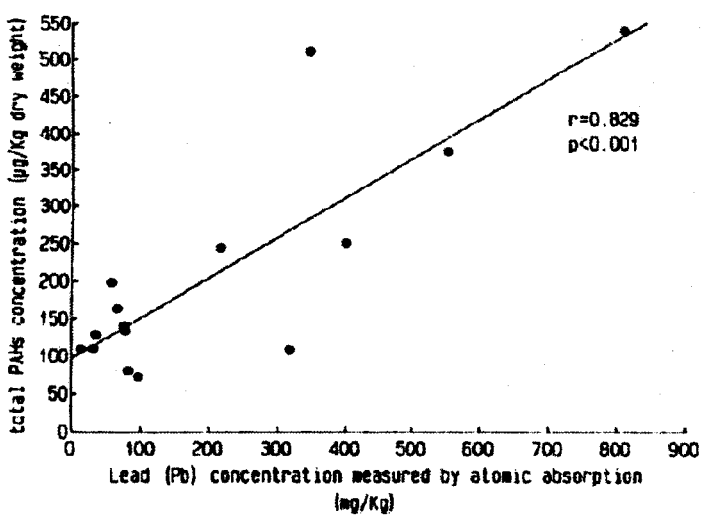


Figure 5 : Corrélation entre les HAP et le Pb dans les feuilles de *Laurus nobilis* (laurier) (d'après Lodovici *et al.*, 1994).

Le tableau XI présente diverses applications de l'utilisation de plantes comme bio-indicateurs pour la détermination de HAP issus de différentes sources. Les conifères ont été très utilisés pour la bioindication soit parce qu'ils sont sempervirents soit pour leurs caractéristiques : cuticule, contenu en lipides (Thomas *et al.*, 1984 ; Tremolada *et al.*, 1996 ; Wagrowski et Hites, 1997 ; Wenzel *et al.*, 1997 ; Holoubek *et al.*, 2000 ; Migaszewski *et al.*, 2002). Le chêne (Alfani *et al.*, 2001), le plantain (Bakker *et al.*, 2000), l'olivier (Macaluso *et al.*, 2000), l'azalée (Nakajima *et al.*, 1995), le laurier (Lodovici *et al.*, 1994,1998), les légumes (Kipopoulou *et al.*, 1999) sont également étudiés. Le chou est couramment utilisé comme détecteur de la présence de certains COV (Composés Organiques Volatils) dans l'air. En effet, les feuilles de cette plante ont la particularité de sécréter une cire cuticulaire qui est un excellent capteur de pollution et pour cette raison plusieurs auteurs ont utilisé le chou pour la détermination de HAP issus de différentes sources (Gao & Zhu, 2004 ; Zhu & Gao, 2004). Rojo-Camargo & Toledo (2003) ont notamment trouvé du fluoranthène et du benzo(e)pyrène dans des choux prélevés sur deux sites : un site proche d'une voie à trafic intense et un site rural (respectivement 5,53 et 2,10 µg/kg pour le première site et 1,75 et 0,85 µg/kg pour le deuxième site. D'autres travaux font mention de l'utilisation de mousses et de lichens pour la bio-surveillance (Holoubek *et al.*, 2000 ; Gerdol *et al.*, 2002 ; Migaszewski *et al.*, 2002 ; Guidotti *et al.*, 2003). En particulier, Otvos *et al.* (2004) ont utilisé la mousse *Hypnum cupressiforme* comme bioindicateur pour déterminer le taux des HAP présents dans l'air en Hongrie. Ils ont trouvé une concentration élevée des HAP à 3 cycles et une bonne corrélation entre la teneur en HAP et l'intensité du trafic des différents sites urbains ($r^2 = 0,83$).

Seuls, 2 travaux ont porté jusqu'à présent sur l'interaction entre HAP et les grains de pollen. Tomianova *et al.* (1998)[2] utilisent les aiguilles et le pollen du pin pour comparer deux techniques d'extraction des HAP accumulés dans les végétaux. Quant à Stransky *et al.* (2001), en analysant les extraits du pollen du sureau (*Sambucus nigra*), ils ont trouvé une fraction contenant les HAP.

Nous pouvons constater que dans toutes les études présentées dans le tableau XI, seule la teneur en HAP dans les différents tissus des plantes sélectionnées a été mesurée. Les effets biologiques liés à la présence des HAP n'ont fait l'objet d'aucune publication.

[2] Cette référence ne figure pas dans le tableau XI car les unités ne sont pas précisées dans cette publication.

ESPECE	SITE	TAILLE ECHANTILLON	RESULTATS	REFERENCE
Laurus nobilis (laurier)	15 sites près de Florence - Italie	30 g de feuilles	Σ HAP jusqu'à 477 µg/kg	Lodovici *et al.* (1994)
Laurus nobilis (laurier)	13 villes en Italie	10 g de feuilles	Σ HAP jusqu'à 880 µg/kg	Lodovici *et al.* (1998)
Olea europaea (Olive)	34 sites dans un rayon de 15 km de Florence - Italie	100 g d'olives	Σ HAP jusqu'à 15 µg/kg	Ignesti *et al.* (1992)
Populus (peuplier)	Autoroute (60000 véhicules par jour) à Francfort - Allemagne	100 g de feuilles	Σ HAP jusqu'à 4,2 µg/m^2	Khun *et al.* (1998)
Rhododendron oomurasaki (azalée)	2 sites à Tokyo – Japon	8 g de feuilles	B(a)P jusqu'à 40 µg/kg PER jusqu'à 11 µg/kg PYR jusqu'à 495 µg/kg	Nakajima *et al.* (1995)
Pousses d'herbe	1-4.5 km d'une usine de polypropylène en Royaume-Unis	20 g de feuilles	Σ HAP jusqu'à 2365 µg/kg	Meharg *et al.* (1998)
Pinus sylvestris (pin sylvestre)	Plusieurs sites en Argentine et Allemagne	10 g aiguilles	Σ HAP 146 – 240,9 µg/kg respectivement	Wenzel *et al.* (1997)
Pinus sylvestris (pin sylvestre)	Site industriel en République Tchèque	non précisé	Σ HAP jusqu'à 19251 µg/kg	Holoubek *et al.*(2000)
Pinus sylvestris (pin sylvestre)	28 sites en au Royaume-Unis	10 g d'aiguilles	Σ HAP jusqu'à 3090 µg/kg	Tremolada *et al.* (1996)
Pinus sylvestris (pin sylvestre)	3 sites en Pologne	50 g aiguilles	Σ HAP jusqu'à 118 µg/kg	Migaszewski *et al.* (2002)
Végétaux divers	Site industriel en Grèce	5-10 g	Σ HAP 25-294 µg/kg	Kipopoulou *et al.* (1999)

Tableau XI : Concentrations des HAP observées chez les plantes.

ESPECE	SITE	TAILLE ECHANTILLON	RESULTATS	REFERENCE
Picea abies (epicéa) *Fagus sylvatica* (hêtre) *Quercus robur* (chêne)	2 km près la ville de Bayreuth	Echantillonnage de la masse déposée	Σ HAP vitesse de déposition : 0,05-0,73 cm/s	Horstmann et McLachlan, (1998)
Sambucus nigra (sureau)	500 m en proximité d'une rue avec intense trafic automobile à Prague	50 g pollen	Σ HAP + squalene = 300 µg/g extrait pollinique	Stransky *et al.* (2001)
Zea maïs (maïs), *Acer saccarum* (erable) *Pinus strobus* (pin blanc)	13 sites au Nord-Est des USA	2-5 g de feuilles	Σ HAP jusqu'à 1600 µg/kg	Wagrowski et Hites, (1997)
Plantago major (plantain majeur)	Raffinerie de pétrole en Belgique	10 g feuilles	Σ HAP jusqu'à 8000 µg/kg	Bakker *et al.* (2000)
Quercus ilex (chêne)	Site urbain – Naples	10 g feuilles	Σ HAP jusqu'à 4607.5 µg/kg	Alfani *et al.* (2001)

Tableau XI (suite)

II.4 LE POLLEN

II.4.1 Structure

Le mot « pollen » dérive du grec « palé » qui désigne à la fois la farine et la poussière pollinique. Le pollen représente une multitude de corpuscules microscopiques contenus dans les sacs polliniques de l'anthère de la fleur et constitue les éléments fécondants mâles de celle-ci. Il existe des milliers de variétés de pollen : il est spécifique à chaque espèce de plante, c'est une véritable « empreinte digitale » de la plante concernée, dont les caractéristiques permettent l'identification précise au microscope.

De forme sphérique ou ovoïde plus ou moins déformée, un grain de pollen a une taille qui varie entre 5 µm pour le myosotis (fig.6) et 200 µm pour les Cucurbitacées (fig.7).

Les grains de pollen sont les structures reproductrices des plantes. Ils sont dispersés principalement par l'air, l'eau ou les animaux. Les plantes avec des fleurs colorées sont habituellement pollinisées par les insectes (entomophiles) et peuvent devenir aéroportées. D'autre part les plantes, telles que les arbres, les arbustes et les mauvaises herbes qui dépendent du vent pour la pollinisation, sont appelées anémophiles.

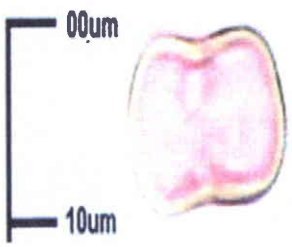


Figure 6 : Pollen de Myosotis[a].

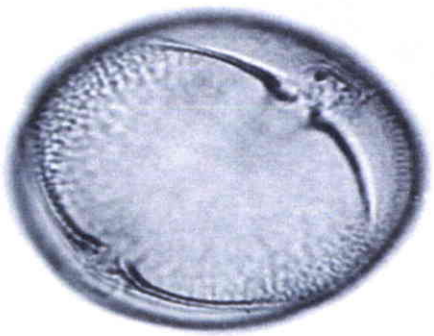


Figure 7 : Pollen de *Melothria pendula*[b] (Cucurbitacée) ayant 200 µm de diamètre selon Twell (2001).

[a] photo on line, adresse URL: http://perso.club-internet.fr/cetam/cetamframe.html
[b] photo on line, adresse URL:
http://pollen.usda.gov/Light_Micrographs/Cucurbitaceae/Melothria%20pendula.html

Le pollen peut se présenter sous forme bi-cellulaire ou tri-cellulaire :

- les grains bicellulaires (ou binucléés) sont constitués d'une cellule végétative et de la cellule spermatogène à partir de laquelle se formeront, dans le tube pollinique, les deux gamètes mâles, lors de la germination du grain

- les grains tricellulaires (ou trinucléés), dont la cellule spermatogène s'est divisée avant la déhiscence des anthères. Ces grains comprennent un noyau végétatif et deux gamètes mâles.

Dans les 2 cas, la cellule végétative est responsable du développement du tube pollinique (fig.8).

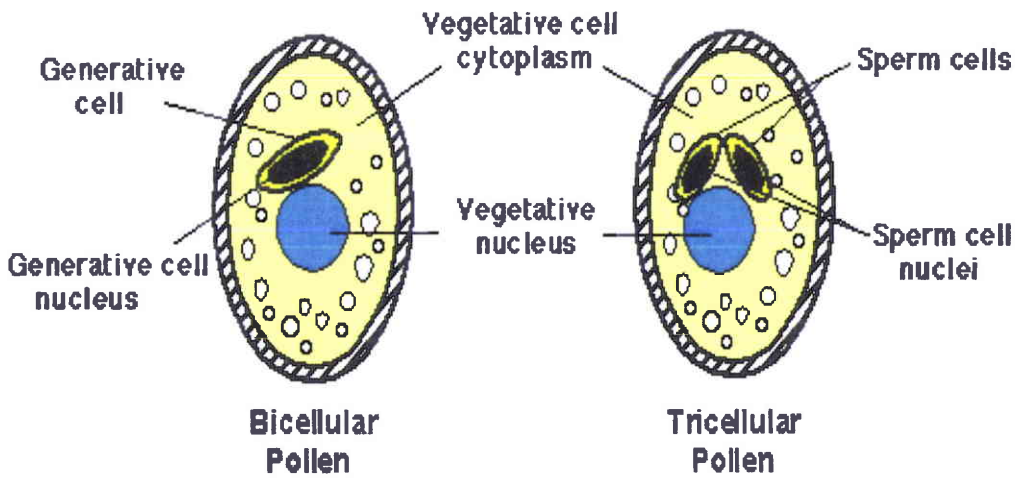


Figure 8 : Structure du pollen (d'après Twell, 2001).

Pour ce qui concerne la paroi elle peut être considérée comme un mur double face. La couche externe, l'exine, dont la morphologie est spécifique de l'espèce de plante considérée, est formée de sporopollenine, substance très résistante aux influences exogènes : c'est pourquoi le pollen peut survivre durant des siècles. L'exine est formée de deux couches : la nexine est une couche interne non sculptée alors que la sexine est une couche externe sculptée. Les éléments structuraux de la sexine sont appelés tectum ou pilum en raison de leur conformation.

La couche interne, l'intine (cellulose+composés pectiques), délimite le cytoplasme qui contient les organites subcellulaires, incluant les noyaux (fig.9).

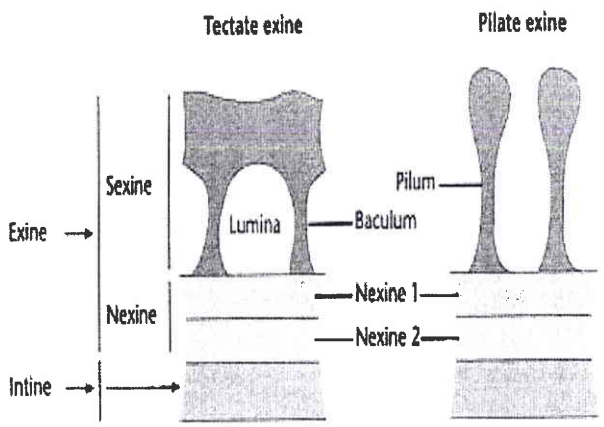


Figure 9 : Structure de la paroi du pollen (d'après Twell, 2001).

L'exine est très souvent sculptée et présente des interruptions à des endroits bien établis qui représentent les points d'ouverture lors de germination (Furness et Rudall, 2004). Ces ouvertures peuvent être variées : pores circulaires, sillon allongé. Les nombres d'ouvertures, leurs positions et les sculptures de l'exine sont des caractères taxonomiques (fig.10).

L'exine a un rôle de protection pour les noyaux reproductifs, mais elle favorise aussi, grâce à ses ornements, l'adhésion du pollen aux insectes pollinisateurs.

Rodriguez-Garcia *et al.* (2003) ont trouvé dans les grains de pollens de *Olea europaea* (olivier) de nombreuses inclusions lipidiques lors de la formation du tube pollinique. Ceci peut être expliqué par la nécessité d'un apport d'énergie pour la formation du tube pollinique pendant la germination.

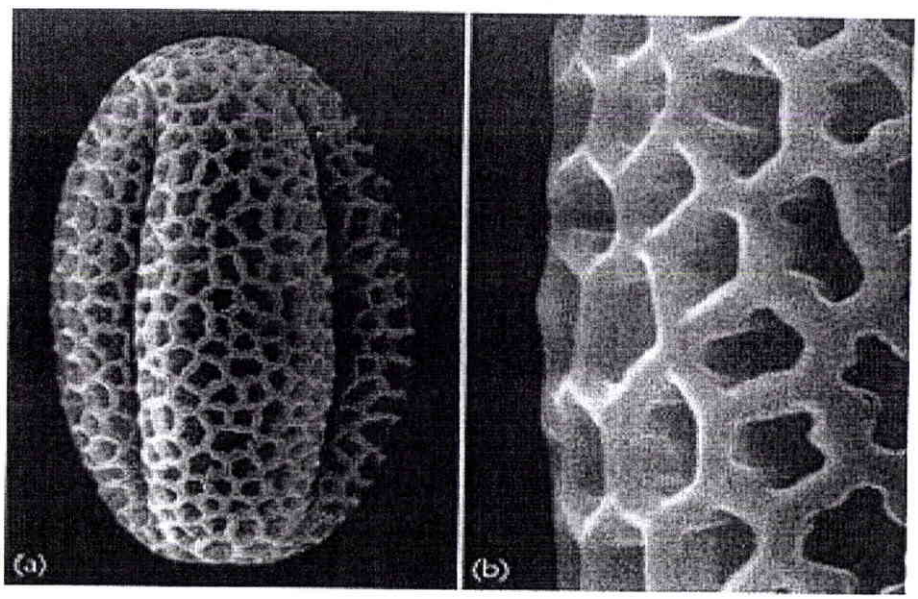


Figure 10 : Structure de la surface du pollen d'*Arabidopsis* visualisée par microscope électronique à balayage. a) vue générale b) agrandissement (d'après Twell, 2001)

II.4.2 Composition

Le pollen contient (d'après Donadieu, 1987) :

- un certain pourcentage d'eau, en moyenne 10 à 12% pour le pollen frais et 4% pour le pollen asséché.
- des glucides avec un pourcentage moyen de 35%.
- des lipides pour environ 5%.
- des protides avec un pourcentage moyen de 20%, dont une grande partie sous forme d'acides aminés à l'état libre ou à l'état combiné. Ces acides aminés sont les suivantes : acide aspartique, acide glutamique, alanine, arginine, cystine, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, proline, sérine, thréonine, tryptophane, tyrosine, valine.
- des vitamines dont une particulière abondance en vitamines du groupe B : vitamine B1 ou thiamine, vitamine B2 ou riboflavine, vitamine B3 (vitamine PP) ou nicotinamide, vitamine B5 ou acide pantothénique, vitamine B6 ou pyridoxine, vitamine B7 ou méso-inositol, vitamine B8 (vitamine H) ou biotine, vitamine B9 ou acide folique et vitamine B12 ou cyanocobolamine. On trouve également la présence, mais en petites quantités, de la provitamine A ou carotène, de la vitamine C ou acide ascorbique, de la vitamine D et de la vitamine E ou tocophérol.
- un certain nombre d'enzymes : amylase, invertase, certaines phosphatases et estérases.
- des substances antibiotiques.
- de nombreux pigments qui donnent la couleur d'un pollen déterminé.

Un vaste échantillonnage de substances minérales (dont de nombreuses sous forme d'oligo-éléments) parmi lesquelles on peut citer : le calcium, le chlore, le cuivre, le fer, le magnésium, le manganèse, le phosphore, le potassium, le silicium et le soufre.

Oleksyn *et al.*, (1999) ont analysé la variation en concentration de substances minérales dans le pollen de *Pinus sylvestris* (pin sylvestre) prélevé en sites pollués et non pollués. Ils ont pu constater que le pollen, provenant de sites pollués, avait des concentrations plus élevées de cuivre, manganèse, aluminium, sodium, cuivre, nickel et cadmium.

II.4.3 Pouvoir allergène

L'incidence des maladies allergiques ne cesse de croître. Depuis 20 ans, il y a une augmentation constante de la fréquence des cas d'asthme et de rhinites allergiques qui constituent un problème de santé publique de plus en plus important (Beasley, 1998). Sont concernés essentiellement les sujets jeunes, de l'enfance jusqu'à 20-30 ans (Duchateau, 1998) et les habitants des grandes villes des pays développés (Kogevinas *et al.*, 1999 ; Weiland *et al.*, 1999). Ces maladies atopiques sont déclenchées par divers aéroallergènes, dont les pollens représentent la majeure partie (Suphioglu *et al.*, 1998 ; Bousquet *et al.*, 1999). L'hypersensibilité correspond à une réponse immunitaire exagérée. Les réactions d'hypersensibilité peuvent être produites par de nombreux antigènes appelés « allergènes » (Roitt *et al.*, 1997).

Les principaux allergènes sont subdivisés en 5 classes majeures (d'après Johansson *et al.*, 2004 et Pichler, 2004) :

- les pneumallergènes animaux constitués par les acariens ou la blatte germanique
- les pneumallergènes végétaux comprenant le pollen des arbres et des herbacées
- les allergènes alimentaires
- les insectes piqueurs
- les allergènes chimiques

Les réponses aux allergies n'apparaissent pas lors de la première exposition d'un sujet à l'allergène ; la réponse adaptative initiale prend du temps pour s'installer et ne provoque habituellement aucun symptôme. Cependant, une fois qu'ont été produits des anticorps, toute exposition ultérieure déclenchera les symptômes (Knox et Suphioglu, 1996).

La plupart des allergènes sont des molécules protéiques relativement petites et très solubles, qui sont inhalées sous forme de particules desséchées, tels que des grains de pollen ou des excréments d'animaux microscopiques (Janeway *et al.*,1997). Parmi les allergènes majeurs, le pollen est en seconde place après les acariens. Tous les pollens ne sont pas allergisants. En principe, ceux qui occasionnent des symptômes respiratoires sont plutôt anémophiles, c'est-à-dire transportés par le vent. Les pollens des plantes entomophiles, transportés par des insectes, sont, en revanche, peu allergisants (site RNSA). Les arbres sont des sources très importantes d'allergènes polliniques. On distingue classiquement les angiospermes où les graines sont enfermées dans un fruit (par exemple bouleau, châtaignier), et les gymnospermes où les graines nues sont portées par des écailles ouvertes (par exemple cyprès, ifs).

II.4.4 Influence des polluants

Dans l'air ambiant, les grains de pollen, adsorbent des polluants de l'atmosphère, ce qui conduit à l'altération de la surface des grains de pollen, à la libération des allergènes (Behrendt *et al.* 2001) et à leur agglomération (Melati, 1996 ; Crescimanno *et al.*, 1999 ; Macaluso, 1998 ; Alaimo *et al.*, 2000b ; Chehregani *et al.*, 2004).

Macaluso (1998) a observé, par microscopie optique, que les grains de pollen de *Olea europaea* (olivier) issus des zones fortement polluées étaient agglomérés et que leurs morphologies étaient très irrégulières. De plus Alaimo *et al.* (1998 a,b) et Lombardo *et al.* (2001) ont trouvé, pour les grains de pollen de *Pinus pinea* (pin parasol) dans les zones polluées, des extrusions de protoplaste coagulé. Au contraire, les grains de pollen provenant de zones de référence étaient de forme régulière et apparaissaient de façon isolée, sans formation d'agglomérats. Ceci a également été mis en évidence sur le pollen de *Cupressus sempervirens* (cyprès) par Melati et Alaimo, (2001).

Si divers travaux ont montré un impact des polluants particulaires et gazeux sur la structure du grain de pollen, l'étude des conséquences de ces modifications sur le développement de la réponse allergique n'a été que peu abordée, notamment concernant les HAP. Or, il est maintenant bien établi qu'il n'existe pas de relation simple et directe entre le déclenchement des maladies atopiques et la saison de pollinisation et que de nombreux facteurs doivent être pris en compte (Davies *et al.*, 1998). Parmi ceux-ci, les polluants atmosphériques semblent jouer un rôle important dans l'incidence des allergies et la sensibilisation des populations (Glikson *et al.*, 1995 ; Cerceau-Larrival *et al.*, 1996 ; Beggs, 1998 ; Monn & Koren, 1999 ; D'Amato, 2000 ; Ring *et al.*, 2001 ; Laaidi *et al.*, 2002).

Des études épidémiologiques réalisées au Japon, ont montré que, pour une quantité similaire de pollen dans l'air, des riverains de voies à grande circulation bordées de cèdres développaient plus de rhino-conjonctivites que des personnes vivant près de forêts de cèdres où le trafic est moins intense (13.2 % contre 5.1 %) (Ishizaki *et al.*, 1987). Ces études suggèrent que la différence de prévalence des rhino-conjonctivites résulte de la pollution automobile, qui est le facteur prédominant dans les zones de forte incidence en atopie respiratoire.

Il est aussi vrai que beaucoup de plantes d'ornement dans les villes sont responsables, soit seules, soit en association avec d'autres plantes, des phénomènes d'allergies. (Lorenzoni – Chiesura *et al.*, 2000). Parmi ces plantes, les auteurs citent les Oleaceae (dont fait partie le frêne commun, *Fraxinus excelsior*) et les Pinaceae (dont fait partie le pin noir, *Pinus nigra*).

De plus, Pauli *et al.* (2003) montrent que 4,4 % d'enfants strasbourgeois âgé de 9 à 10 ans sont sensibilisés à l'allergie du frêne.

Quelques auteurs ont aussi observé des activités enzymatiques plus élevées pour l'estérase et la phosphatase acide dans les grains de pollen exposés à des atmosphères urbaines (Melati, 1996 ; Alaimo *et al.*, 1997). Ces enzymes sont suspectées de jouer un rôle dans les mécanismes allergènes (Alaimo *et al.* 1997). Le fait qu'il y ait une interaction entre le pollen et les polluants dus aux émissions du trafic, est prouvée par les études de Franchi et Franchi (1983) qui montrent l'accumulation du plomb dans les grains de pollens de plusieurs plantes.

Le pollen non seulement adsorbe les polluants mais aussi interagit avec eux (fig.11 et 12) ce qui a pour effet la libération des allergènes contenus dans les granules cytoplasmiques (Behrendt et Becker, 2001; Behrendt *et al.*, 2001 ; Chehregani *et al.*, 2004). Il existe 3 inducteurs principaux de la libération des allergènes : une humidité ambiante assez élevée, les orages et les grosses pluies, les polluants atmosphériques. La libération des allergènes est aussi dépendante du pH et de la température (Behrendt et Becker, 2001).

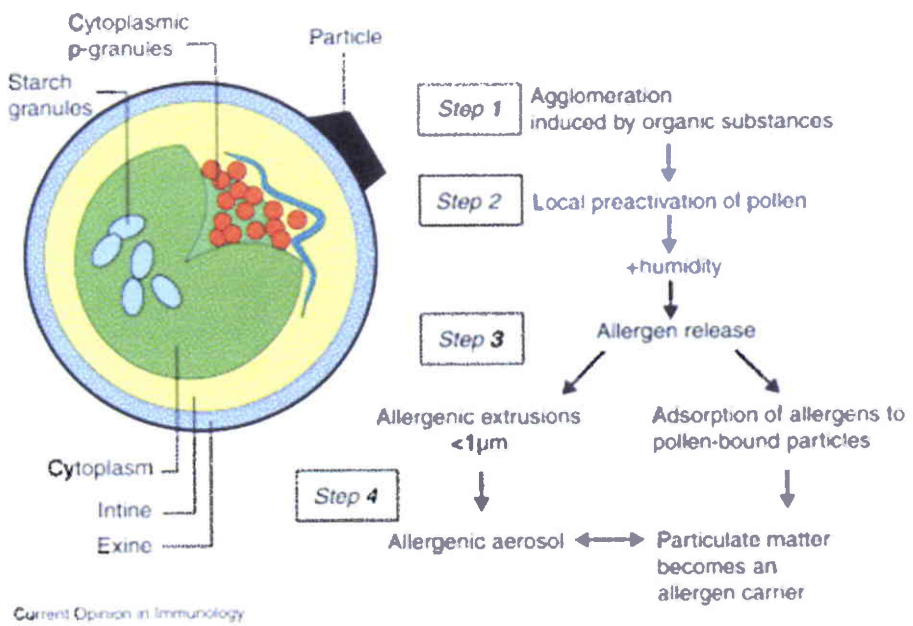


Figure 11 : Mécanismes de libération des allergènes par interaction pollen-polluant. Sur la gauche un grain de pollen avec une particule adsorbée (d'après Behrendt et Becker, 2001).

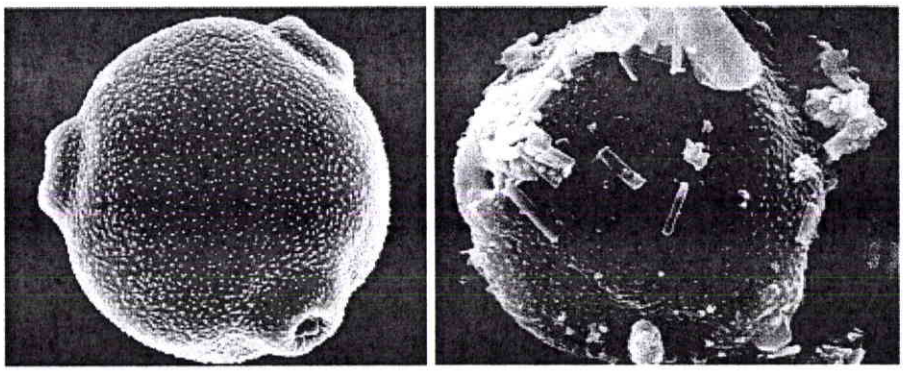


Figure 12 : Images par microscopie électronique à balayage d'un grain de pollen prélevé dans un site rural (gauche) et un site urbain (droite) (d'après Behrendt et Becker, 2001).

La culture de grains de pollen *in vitro*, est une bonne méthode pour la détermination d'un danger environnemental car la germination et l'élongation du tube pollinique sont inhibés en présence d'un produit toxique (Kristen, 1997). L'inhibition de la croissance du tube pollinique est déterminée après avoir mesuré la longueur de plusieurs tubes par microscopie optique. Cette méthode a été utilisée pour tester les effets toxiques des pesticides sur le pollen du maïs et du concombre (Gentile *et al.*, 1973,1978).

Ma et Khan (1976) ont utilisé le pollen de *Tradescantia paludosa* (misère) pour vérifier la relation dose-effet du SO_2 sur l'élongation du tube pollinique. Ils ont pu prouver que l'effet inhibiteur du SO_2 était directement proportionnel à la concentration de ce gaz.

L'effet de plusieurs fongicides sur la germination des grains de pollen de *Brassica campestris* (navette) a été testé par Pavlic et Jandurova (2000). Ils ont confirmé une augmentation de la germination avec la diminution des fongicides.

Les grains de pollen ont été utilisés pour tester les effets de métaux lourds sur la viabilité du pollen. Handique et Baruah (1995) ont pu constater une diminution significative de la viabilité des grains de pollen de *Lycopersicum esculentum* (tomate), *Pisum sativum* (pois) et *Cajanas cajan* (Pois d'Angole) exposés à des solutions de chlorure mercurique et d'acétate de plomb.

Crescimanno *et al.* (1999) ont travaillé sur les grains de pollen de *Citrus paradisi* (pamplemousse). Ils ont testé en particulier l'effet d'un fongicide (TMID) et d'un herbicide (2,4-D) sur la germination du pollen. Les résultats ont montré que non seulement les deux produits ont induit une diminution du pourcentage de germination par rapport au témoin, mais ils ont pu noter aussi une déformation du tube pollinique dans les grains qui avaient germé.

La présence d'ozone (Schoene *et al.*, 2004), de formaldéhyde (Schirazi et Moir, 1998), de radiation UV-B (Feng *et al.*, 2000) provoque aussi la réduction du pouvoir de germination du

pollen. La présence des HAP dans les sols provoque une diminution de la germination des graines (Maila et Cloete, 2002 ; Kummerova et Kmentova, 2004). Henner *et al.* (1999) ont pu constater que la germination des grains de plusieurs plantes était inhibée par la présence de HAP à bas poids moléculaire (< 3 cycles) et au contraire les HAP à haut poids moléculaire n'avaient aucun effet toxique.

L'étude de la morphologie du pollen a été utilisée comme indicateur de pollution. Micieta et Murin (1997,1998) ont choisi d'étudier les grains de pollen de différentes espèces de *Pinus* en les considérant bioindicateurs de la pollution atmosphérique.
Les critères d'analyse étaient les suivants :
- dimension : augmentation significative du diamètre.
- morphologie : augmentation du nombre de sacs aériens.
- coloration insuffisante : les grains endommagés ne sont pas colorés (fig.13).

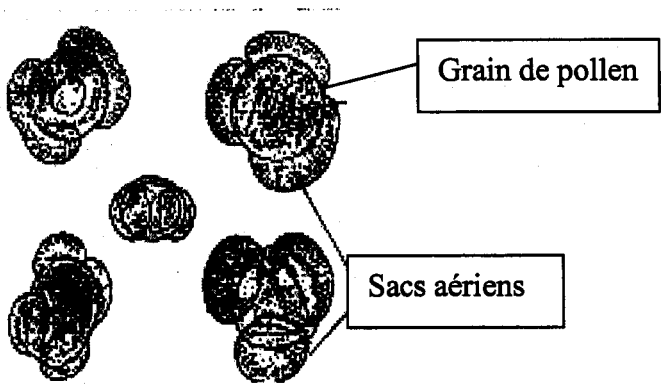


Figure 13 : Exemple de grains de pollen de *Pinus nigra* modifiés en comparaison avec un grain standard (au milieu) (d'après Micieta et Murin, 1997).

II.4.5 Variables biochimiques

II.4.5.1 L'estérase

Les estérases forment une famille d'enzyme qui sont réparties dans les tissus des plantes et peuvent hydrolyser les esters carboxyliques des alcools, phénols et naphtols (Gahan, 1984) :

$$\mathbf{R\text{-}COOR' + H2O \Leftrightarrow R\text{-}COOH + R'OH}$$

Les estérases sont impliquées dans le métabolisme des acides gras et des lipides. L'activité et la localisation des estérases ont été utilisées comme marqueurs de la différentiation cellulaire de *Populus euramericana* (peuplier euraméricain) (Guglielmino *et al.*, 1997) mais aussi comme réponse à une interaction plante-pathogène étant donné qu'elles sont liées à l'état physique et métabolique de la cellule (Cachot *et al.*, 1994). Elles sont présentes dans les tissus où il y a une intense activité métabolique (Pretova *et al.*, 2001) et sont impliquées dans la formation et réorganisation de la paroi cellulaire (Bordenave *et al.*, 1995 ; Moore *et al.*, 1996). Plusieurs variables peuvent influencer l'activité des estérases notamment la température ambiante et le stress hydrique. Les estérases sont aussi de bons indicateurs des effets toxiques des métaux lourds (Maier, 1978). Soukupova *et al.* (2002) ont observé une augmentation du taux des estérases dans les aiguilles de *Picea abies* L. Karst (Epicéa commun) qui ont été exposées à une pluie acide simulée. Selon De Carvalho *et al.* (2003), les estérases dans les plantes peuvent être utilisées comme bioindicateur pour déterminer la toxicité des insecticides. Vithange et Knox (1976) ont localisé les estérases dans la paroi la plus externe du pollen : l'exine. Enfin, l'activité estérasique dans les parois des grains du pollen de Pinaceae peut être reliée à la manifestation de la réaction allergique (Alaimo *et al.*,1997).

II.4.5.2 La phosphatase acide

La phosphatase acide est une enzyme qui hydrolyse une grande variété d'esters de phosphates. Pretova *et al.* (2001) ont localisé la phosphatase acide dans les tissus où règne une intense activité métabolique. Même si le rôle exact de cette enzyme dans les plantes n'a pas vraiment été expliqué, il est possible qu'elle soit responsable de la régulation du phosphore dans les plantes. A ce sujet, l'étude de Zhang et McManus (2000) a permis de localiser l'activité de la phosphatase acide, dans la paroi des cellules de racines de *Trifolium repens* (trèfle blanc), induite par la privation de phosphate dans le milieu de culture.

Panara *et al.* (1990) ont étudié la phosphatase acide dans la paroi des racines de *Hordeum vulgare* (orge). La phosphatase acide a également été isolée dans les coléoptiles de l'orge (Pasqualini *et al.*, 1992a,1997). Quant à Pasqualini *et al.* (1992b), ils ont vérifié le rôle de *Tuber albidum* un champignon associé à des racines de *Pinus pinea* (pin parasol) : l'activité de la phosphatase acide dans les racines colonisées était 36 % plus élevée que dans les racines témoins. La présence de phosphatase acide dans les graines a été prouvée par plusieurs travaux (Panara *et al.*, 1990 ; Pasqualini *et al.*, 1996,1997 ; Olczak *et al.*, 1997). C'est le cas pour *Phaseolus vulgaris* (haricot) où une augmentation de l'activité enzymatique a été observée pendant la germination de graines (Cashikar *et al.*,1997)

Une étude très spécifique a été faite par Pasqualini *et al.* (1996). Ces auteurs ont examiné l'activité de la phosphatase acide des fractions solubles, membranaires et pariétales dans les graines sèches de *Hordeum vulgare* (orge) ainsi qu'imbibées et germées. Ils ont trouvé une augmentation du taux de phosphatase acide dans la fraction pariétale après 24 h d'imbibition.

La détermination de la phosphatase acide dans les grains de pollen a fait l'objet de peu d'études. Dans les grains de pollen de *Lilium longiflorum* (lys de Pâques) la phosphatase acide a été trouvée en association avec la paroi, mais aussi libérée pendant la germination à l'intérieur de vésicules dans le tube pollinique (Ibrahim *et al.*, 2002). Enfin la phosphatase acide a été localisée dans un endroit précis de la paroi du pollen : l'intine (Vithanage et Knox, 1976 ; Cirkovic *et al.*, 2002).

Mais c'est l'équipe de Melati (Université de Palerme, Italie) qui a observé que l'activité de la phosphatase acide était liée à la pollution atmosphérique et à de possibles effets allergiques du pollen : une augmentation de l'activité enzymatique a été observée dans le pollen de *Cupressus sempervirens* (cyprès) prélevé sur des sites pollués (Melati, 1996 ; Melati et Alaimo, 2001) et dans les feuilles de *Olea europaea* (Macaluso,1998). Enfin, une relation entre le stress des plantes et l'accumulation de phosphatase a aussi été montrée sur les aiguilles de *Pinus pinea* (pin parasol) (Alaimo *et al.*, 2000a).

Différentes espèces de plantes sont capables d'accumuler les HAP présents dans l'atmosphère et cette accumulation peut être liée à la nature de la source d'émission (urbaine ou industrielle). De plus, les concentrations des HAP dans l'atmosphère sont bien corrélées à celles trouvées dans les tissus végétaux. Peu de travaux, jusqu'à présent, ont considéré les grains de pollen comme bioindicateurs de la pollution atmosphérique. Le pollen issu des zones polluées montre une morphologie irrégulière, est plus visqueux, présente une extrusion de protoplaste et des activités enzymatiques plus élevées. En ce qui concerne les enzymes, la présence de la phosphatase acide et de l'estérase a été considérée comme paramètres du stress de la plante en réponse à la pollution atmosphérique mais leurs dosages ont été effectués qualitativement par coloration histochimique.

Dans cette étude, nous voulons vérifier s'il y a une relation entre la présence des HAP dans les grains de pollen issus de différents sites (urbains et industriels) et les modifications morphologiques et enzymatiques telles que la phosphatase acide et l'estérase déterminées quantitativement.

MATERIEL ET METHODES

III MATERIEL ET METHODES

III.1 CHOIX DES PLANTES

Pour cette étude nous avons étudié la réponse à la pollution atmosphérique d'une partie spécifique de la plante : le pollen. Pour que le pollen d'une plante soit un « bon » indicateur, Micieta et Murin (1998) ont défini quelques critères parmi lesquels :

- les espèces choisies doivent être diploïdes avec production stable de pollen haploïde.
- les espèces choisies doivent posséder des grains de pollen bien développés et viables (dans des conditions climatiques normales).

De plus, nous avons ajouté deux autres critères :

- les espèces choisies doivent être anémophiles : les plantes qui ont une pollinisation par le vent produisent plus de pollen et surtout l'échantillonnage est simplifié
- les espèces choisies doivent être des plantes d'alignement courantes dans les villes.

L'évaluation des différents paramètres biologiques, chimiques et morphologiques, a été réalisée sur les grains de pollen des plantes suivantes qui ont été choisies parce qu'elles correspondent à tous les critères précédents :

- *Fraxinus excelsior* (Frêne commun)
- *Pinus nigra* (Pin noir)

III.1.1 *Fraxinus excelsior*

La systématique du frêne commun est la suivante :

EMBRANCHEMENT : Spermaphytes
CLASSE : Angiospermes – Dicotylédones
ORDRE : Gentianales
FAMILLE : Oléacées
GENRE : Fraxinus
ESPECE : excelsior L.

Les angiospermes constituent la majeure partie des plantes, soit environ 250000 espèces répandues sur toute la Terre. Elles sont peu abondantes en milieu aquatique. Elles constituent, avec les gymnospermes, l'ensemble des spermaphytes (plantes à graines) appelées traditionnellement phanérogames (plantes à fleurs).
Les angiospermes sont divisées en monocotylédones, qui comprennent les céréales, les plantes bulbeuses, les palmiers, les orchidées, et les dicotylédones, les plus nombreuses, avec les arbres feuillus et la plupart des plantes d'intérêt agronomique.
La fleur typique, le plus souvent bisexuée porte des feuilles vertes (les sépales), des feuilles colorées (les pétales), des feuilles porteuses de spores mâles (les étamines) et enfin des feuilles porteuses d'ovules (les carpelles). Chez les angiospermes, ces feuilles peuvent se replier sur elles-même et se souder pour donner l'ovaire. Mais comme les ovules, alors enfermés, doivent être fécondés, les angiospermes ont dû développer un nouvel organe permettant le contact avec les spores mâles : ce rôle est dévolu au style et aux stigmates. Le grain de pollen ne peut atteindre l'élément femelle que par le jeu de forces physiques (le vent, l'eau courante) ou d'un vecteur auxiliaire. Dans le cas le plus élémentaire, c'est le vent qui véhicule le pollen (pollinisation anémophile), ce qui implique la production d'un grand nombre de grains. La présence du style et du stigmate favorise la réception du pollen disséminé par le vent. C'est pourtant dans le domaine de la transmission par les insectes que ces appendices se sont révélés les plus fructueux. La présence de nectar, produit par les glandes voisines, et d'une corolle colorée qui leur indique la présence de ce nectar, incitera les insectes à la visite des fleurs.
La fécondation est unique dans l'ensemble des êtres vivants, car elle est double. Lors de la fécondation, chaque ovule reçoit d'un grain de pollen deux gamètes mâles par l'intermédiaire du tube pollinique. L'un de ces gamètes féconde l'oosphère, gamète femelle de l'ovule, et il en résulte l'œuf qui forme l'embryon à l'origine de la future plantule. L'autre gamète mâle va

s'unir avec deux noyaux pour donner une cellule triploïde ; celle-ci sera la source de l'albumen, tissu nourricier de l'embryon. Cette double fécondation est caractéristique des angiospermes, végétaux les plus évolués (Deysson, 1979 ; Rayval-Roques, 1994 ; Chase, 2001).

Le frêne, arbre forestier d'Europe, appartient à la famille des Oléacées (angiosperme). Les deux espèces principales rencontrées en France sont *Fraxinus excelsior* et *Fraxinus ornus*. Les différentes espèces de frêne se rencontrent essentiellement dans les régions tempérées ou subtropicales de l'hémisphère Nord.

Le frêne commun est un arbre à feuilles caduques d'une hauteur maximale d'environ 40 m : c'est l'un des plus grands feuillus européens. Il est très facile à identifier par son très gros bourgeon terminal, noir, et de forme pyramidale. Les feuilles opposées sont pennées et sont composées de sept à quinze folioles ovales, dentées et glabres. Les fruits qui restent sur l'arbre tout l'hiver, sont des samares contenant habituellement une seule graine (Rameau *et al.*,1989).

Les fleurs apparaissent avant la foliation. Les étamines sont de couleur pourpre foncée. Il existe plusieurs types d'inflorescence et elles sont situées vers l'extrémité des rameaux où elles forment des panicules axillaires. Les arbres exclusivement mâles sont plus fréquents, que les arbres exclusivement femelles. Il est également possible de rencontrer des fleurs hermaphrodites ou encore mâles et femelles sur le même arbre. La pollinisation est anémophile (Collin et Badot, 1997).

Les grains de pollens de frêne ont un diamètre voisin de 25 µm et un poids moyen de 13 ng, tri ou tétracolpés. Des quantités importantes de pollens de frêne sont mises en évidence en France dans le Nord-Est. La durée de dissémination des pollens s'étale de 5 à 6 semaines, à partir de la 1re quinzaine du mois de mars (Pauli *et al.* 2003).

III.1.2 *Pinus nigra*

La systématique du pin noir est la suivante :

EMBRANCHEMENT : Spermaphytes
CLASSE : Gymnospermes
ORDRE : Coniférales
FAMILLE : Pinacées
GENRE : Pinus
ESPECE : Nigra (Arnold)

La présence d'un ovaire distingue les angiospermes des gymnospermes dont les graines sont nues et ne sont pas entourées d'un fruit. Les gymnospermes ont beaucoup régressé avec l'expansion des angiospermes. Elles ne sont représentées que par environ 700 espèces, dont beaucoup sont des arbres. Le plus souvent les feuilles sont persistantes. Les fleurs sont, en général, unisexuées. Les fleurs mâles mais aussi les fleurs femelles, sont groupées et insérées en spirale le long d'un axe. Les fleurs mâles sont placées à l'extrémité d'un rameau ou insérées à l'aisselle des feuilles et sont formées d'un ensemble de petites écailles insérées sur l'axe précité, écailles qui portent les sacs polliniques contenant les grains de pollen.
Les fleurs femelles, qui sont également réunies en cônes, sont formées d'une ou de deux écailles portant à l'aisselle l'ovule qui, une fois fécondé, produira la graine. Celle-ci, du fait de la position de l'ovule, qui est uniquement appuyé sur les écailles et non pas enfermé dans la cavité de l'ovaire, est nue. Cependant l'évolution du tissu de protection de l'ovule fournit à la graine une enveloppe protectrice : celle-ci peut être dure et ligneuse, comme dans le cône des pins ou munie d'une aile pour la dissémination comme chez le sapin.
Les conifères sont les représentants des gymnospermes. Ce sont toujours des arbres ou des arbustes également connus sous le nom de résineux et s'opposant aux autres arbres, ou feuillus, par leurs feuilles aciculaires (aiguilles) ou étroites. On les qualifie aussi de toujours verts, par opposition aux feuillus, dits caducifoliés, mais on ne peut généraliser cette notion. En effet, parmi les conifères, certains, dont le mélèze, perdent leurs feuilles en hiver, alors que certains feuillus gardent en tout temps leur frondaison. Les conifères qui, parmi les arbres, supportent le mieux les climats sévères, se rencontrent essentiellement dans les régions froides et tempérées, où ils forment les limites forestières.
Les conifères sont regroupés en un seul ordre, celui des coniférales, dont les pinacées sont la famille qui réunit certains des arbres les plus caractéristiques de l'hémisphère Nord. La famille des pinacées comprend 10 genres d'arbres dont les fleurs sont toujours unisexuées et

regroupées en cône. Les fleurs mâles ont à leur base quelques folioles en écailles et, au-dessus de ces dernières, des étamines en forme de petites écailles disposées en spirale qui portent, à leur surface inférieure, deux sacs polliniques. Lorsqu'elles apparaissent, les fleurs femelles ont un aspect semblable à celui des mâles, mais ensuite elles se développent et présentent, insérées en spirale sur l'axe, des bractées stériles et des écailles fertiles, à la base desquelles sont présents deux ovules.
Les grains de pollen des pinacées, plantes typiquement anémophiles, possèdent des chambres aérifères : lorsque le soleil brille, les gaz contenus dans ces sacs aérifères se réchauffent et se dilatent, de sorte que le grain peut naviguer dans l'air pour aller féconder un ovule (Deysson, 1979 ; Rayval-Roques, 1994).

Le *Pinus nigra* (pin) appartient à la famille de pinacées. L'aire naturelle de ce pin se trouve en Autriche et dans les Balkans. Il est fréquemment planté dans la moitié est de la France. C'est une espèce introduite en France au XIXe pour reboiser les endroits secs, caillouteux ou calcaires. C'est un arbre à silhouette massive, d'une hauteur de 25 à 35m, à écorce noirâtre et à rameaux densément et longuement feuillés. Les aiguilles, groupées par deux, sont rigides, piquantes, droites ou légèrement courbes, vert foncé, persistants 4 à 5 ans. Les cônes sont ovoïdes, de taille moyenne, à écussons pyramidaux (Rameau *et al.*, 1989).

III.2 CHOIX DES SITES D'ECHANTILLONNAGES

Les analyses biologiques, chimiques et morphologiques ont été réalisées sur les grains de pollen prélevés sur différents sites dans le sillon mosellan. Chaque site a été choisi en fonction de la nature des émissions (automobile ou industrielle) et de la présence de plantes (tab.XII et fig.14). Les sites George, A31 et Mozart sont visualisés en Annexe 4 et 5.

SITES *Fraxinus excelsior*	**SITES** *Pinus nigra*	
Metz – Avenue Joffre		Intense trafic automobile (tous types), 17500 véhicules par jour - entrée autoroute A31
Metz – Avenue Leclerc de Hauteclocque	**Metz** – Avenue Mozart - Leclerc de Hauteclocque	Intense trafic automobile (tous types), de nombreux feux de signalisation
Metz – Place du Roi George		Intense trafic automobile (véhicules légers) et bus
Metz – Gare Avenue de l'Amphithéâtre		Intense trafic automobile (tous types) à proximité de la voie ferrée
La Maxe - Rue du Trou au Serpent	**La Maxe** - Rue du Trou au Serpent	Loin du trafic, mais juste à côté de la centrale électrique alimentée au charbon
Autoroute A 31 - Aire de St. Remy	**Autoroute A 31** Aire de St. Remy	Intense trafic automobile (tous types)
Hayange – Lotissement du Brühl – D 57	**Hayange** – Lotissement du Brühl – D 57	Région industrielle sidérurgique et à côté d'une rue avec un faible trafic
	Longeville les Metz – Rue du G.al de Gaulle	Intense trafic automobile (véhicules légers) et arrêt de bus
	Ban Saint Martin – Rue de la Côte	Trafic automobile (tous types)
	Autoroute A 31	Intense trafic automobile (tous types)
	Lessy - Bois	Site témoin
	Longeville les Metz – Jardin botanique.	A l'intérieur du jardin botanique à 150 m d'une rue principale mais protégé par des bâtiments
Amanvillers – Bois		Site témoin
Metz – Université Campus Bridoux		A l'intérieur du campus universitaire à 50 m d'une rue principale mais protégé par des bâtiments

Tableau XII : Sites d'échantillonnage pour le frêne et le pin.

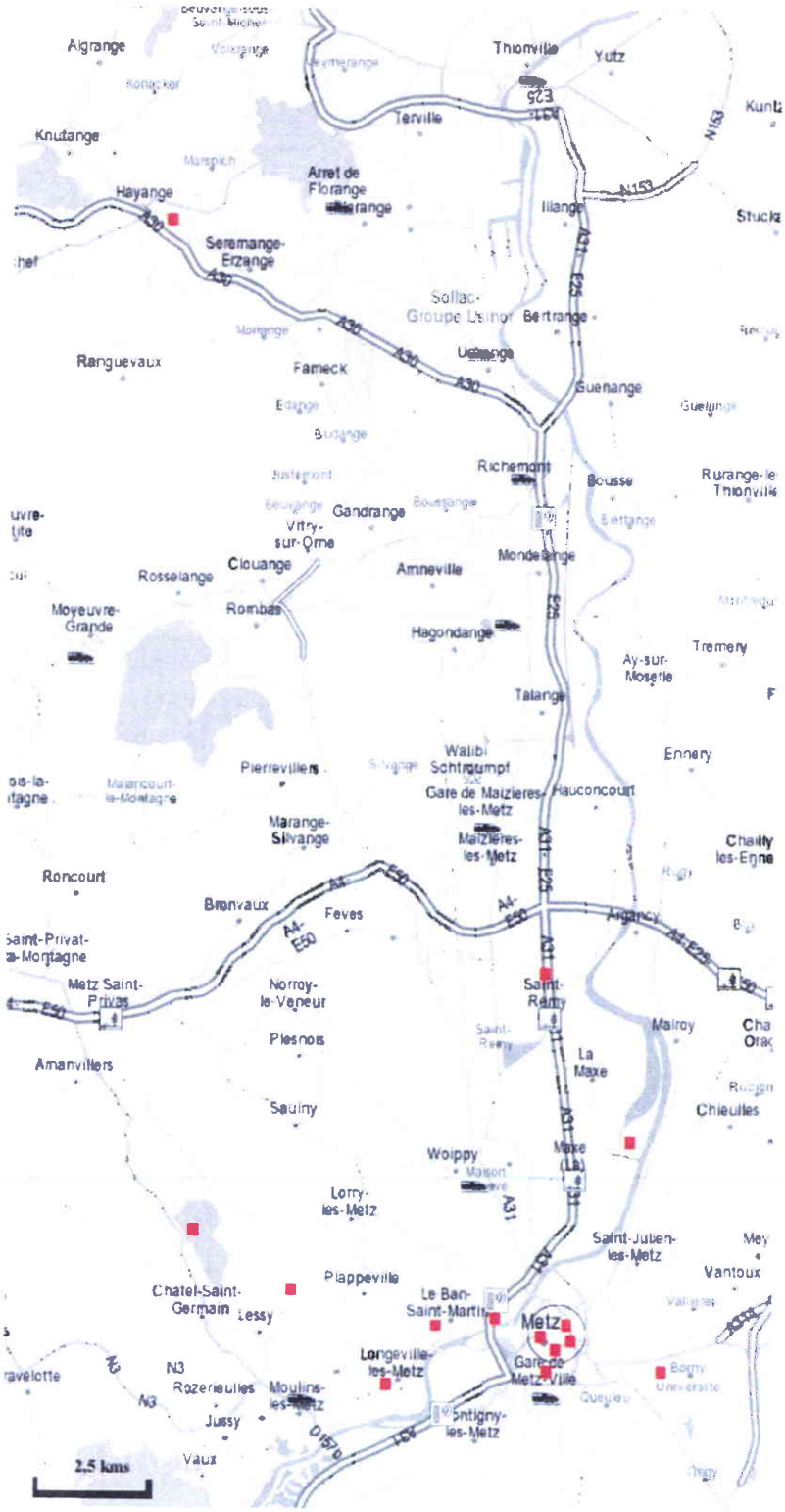


Figure 14 : Carte des sites d'échantillonnage

En définitive, 5 grands types de sites peuvent être *a priori* différenciés :

- les sites, Joffre, Mozart, Leclerc, Amphithéâtre, De Gaulle, Côte, Roi George sont des sites urbains localisés à Metz centre ville et dans le banlieue, avec différents niveaux de circulation automobile.
- les sites La Maxe et Hayange se trouvent loin du trafic mais dans des zones industrielles.
- les sites Remy et A31 représentent les sites les plus liés au trafic automobile, étant donné qu'ils se trouvent à coté de l'autoroute A31 qui est un axe régional principal.
- Jardin et Bridoux se trouvent à l'intérieur d'espaces verts, protégés par des bâtiments, mais néanmoins en zone urbaine.
- Lessy, Amanvillers, sont des sites témoins situés à l'intérieur des bois.

Autant que faire se peut, nous avons essayé de récolter sur un même site des grains de pollen des 2 types d'arbres sélectionnés. Nous avons aussi essayé de sélectionner les arbres qui, à l'aide d'une analyse externe et superficielle, ne présentaient pas de perturbations liées à un mauvais état de santé comme la défoliation, le jaunissement, etc. Cependant, leur état physiologique peut présenter des différences influencées par de nombreux facteurs comme l'âge, l'éclairement, les conditions édaphiques et la variabilité intraspéciphique.

Les difficultés d'utilisation des grains de pollen pour la biosurveillance, résident i) dans la production annuelle de pollen et ii) ce sur une courte période, environ 4 semaines, ce qui réduit les possibilités de prélèvement. De plus, les espèces que nous avons choisies, sont des arbres de très grande taille et pour certaines sites, il a été très difficile d'effectuer le prélèvement. En outre, l'espèce *Fraxinus*, en tant que dioïque, porte des fleurs mâles et des fleurs femelles sur des arbres différents et sur certains sites les arbres mâles se sont avérés très peu nombreux (contrairement à ce qu'on l'observe dans la nature).

Une seule campagne (2003) de prélèvement a fait l'objet de résultats présentés dans cette étude car le pollen prélevé en 2002 a permis de mettre au point et d'optimiser les méthodes.

III.3 PRELEVEMENT ET CONSERVATION DES GRAINS DE POLLEN

Le prélèvement a été fait pendant la troisième semaine de dissémination des pollens, quand les fleurs étaient bien ouvertes, ce qui coïncide avec la fin du mois de mars pour le frêne et la mi-avril pour le pin. A partir de branches, les rameaux avec les fleurs ont été prélevés au hasard et sur plusieurs arbres. Puis les branches ont été placées entre deux feuilles de papier aluminium pour le transport au laboratoire.

Au laboratoire, les fleurs ont été séparées des branches et placées entre deux feuilles de papier Joseph pour le séchage. Après séchage (deux jours à 25°C) les fleurs sont isolées et placées sur une série de tamis (1mm, 90 µm et 63 µm) pour être « frottées » manuellement. Le tamisage est nécessaire afin d'isoler le pollen du reste de la fleur. Seule la fraction tamisée à 63 µm est conservée entre 2 feuilles de papier Joseph et en boîte de Pétri, à l'obscurité et à 4°C.

III.4 ANALYSE MORPHOLOGIQUE

Les grains de pollen ont été observés par microscopie optique pour étudier leur forme et leur taille. Cette analyse a été faite avant tamisage. Nous avons examiné le pollen entre lame et lamelle en présence de gouttes d'eau, sous un grossissement de x100, x 400 et x1000.

III.5 TEST DE GERMINATION

Il s'agit de calculer le pourcentage du pollen germé après incubation à 25°C dans un milieu nutritif spécifique à chaque espèce et dont la composition de la solution mère est fournie par les tableaux XIII et XIV.

a) Réalisation du milieu *Fraxinus*

Composées	Quantité pour 100 ml H_2O ultra - pure
ACIDE BORIQUE (H_3BO_3)	100 mg
NITRATE DE CALCIUM $Ca(NO_3)_2, 4H_2O$	300 mg
SULFATE DE MAGNESIUM ($MgSO_4, 7H_2O$)	200 mg
NITRATE DE POTASSIUM (KNO_3)	100 mg
PHOSPHATE DE POTASSIUM (KH_2PO_4)	100 mg

Tableau XIII : Composition de la solution mère (d'après Feng *et al.*, 2000).

10 ml de la solution mère et 10 g de saccharose sont dissous, q.s.p., dans100 ml d'eau milliQ.

b) Réalisation du milieu *Pinus*

Composées	Quantité pour 100 ml H_2O ultra - pure
ACIDE BORIQUE (H_3BO_3)	100 mg
NITRATE DE CALCIUM $Ca(NO_3)_2, 4H_2O$	300 mg
SULFATE DE MAGNESIUM ($MgSO_4, 7H_2O$)	200 mg
NITRATE DE POTASSIUM (KNO_3)	100 mg

Tableau XIV : Composition de la solution mère (d'après Webber, 1991).

10 ml de la solution mère et 10g de saccharose sont dissous, q.s.p., dans100 ml d'eau milliQ.

c) Méthodologie

Le test est effectué tout de suite après séchage du pollen, mais avant tamisage. Les grains de pollen sont placés sur des lames avec quelques gouttes de la solution de germination. Les lames sont recouvertes par des lamelles et placées dans une atmosphère saturée en humidité pendant 48 heures, à 25 °C, pour le pollen de pin et 6 heures pour le pollen de frêne. La chambre humide est constituée d'une boite de pétri dont le fond et les côtés sont revêtus de papier bien humidifié. Une fois la lame placée, la boite est fermée et mise en incubation dans une chambre à 25°C.

Après incubation, les lames sont retirées de la chambre humide et on y ajoute entre lame et lamelle quelques gouttes de solution LUGOL pour stopper la germination.

La lecture se fait sous un grossissement de x100 ou x400 sur une série de dix champs optiques. Seuls les grains de pollen ayant un tube pollinique d'une longueur supérieure au double du diamètre sont considérés comme germés.

III.6 ANALYSE CHIMIQUE

L'extraction des HAP a été réalisée suivant la méthode décrite par Macaluso *et al.* (2000) modifié par Orecchio au laboratoire de Chimie Inorganique de l'Université de Palerme (Italie).

a) *Protocole*

- 50 mg de pollen ont été mis en contact avec 8 ml de dichlorométhane (DCM) sous ultra-sons (Bioblock Scientific) pendant 40 min (2 x 20 min) dans une enceinte réfrigérée par des glaçons, ensuite la solution est maintenue à l'obscurité et à 18°C pendant une nuit (il est nécessaire de protéger la solution de la lumière et de la chaleur excessive afin d'éviter la décomposition des HAP).
- Après extraction la solution est filtrée sur sulfate de sodium anhydre.
- L'extrait est concentré à 2 ml avec un évaporateur rotatif (Büchi rotavapor R-114) à 35°C.
- La solution restante est séchée sous un léger courant d'azote.
- Le résidu sec est dissous dans 200 µl de cyclohexane plus 50 µl de solution d'hexadecane 1/1000 dans le DCM comme standard interne.

L'analyse qualitative et quantitative est faite par chromatographie en phase gazeuse (CPG) à l'aide d'un appareil Shimadzu (GC-17A ver.3) avec un détecteur à ionisation de flamme (FID) et une colonne capillaire QUADREAX, remplie avec 5% de phényle méthyle silicone, de 25m de longueur et 0.25mm de diamètre. L'appareil est équipé avec un injecteur split/splitless et un flux total de 20,6 ml/min en splitless est appliqué. La température de l'injecteur est maintenue à 305°C et celle du détecteur à 325°C. Le programme de température de la colonne capillaire va de 80°C (3 min) à 295 °C (13 min) à raison de 5°C/min. Le gaz transporteur est l'azote (débit 1.6 ml/min). La quantité de solution injectée est de 1 µl avec une seringue Hamilton. Toutes ces conditions sont résumées dans le tableau XV.

PARAMETRES	VALEURS
Longueur colonne	25 m
Diamètre interne colonne	0,25 mm
Pression colonne	108 kPa
Flux colonne	1,6 ml/min
Flux totaux	21 ml/min
Température injecteur	305 °C
Température détecteur	325 °C
Temps d'équilibre	3 min
Température initiale colonne	80 °C
Gradient temperature colonne	5 °C/min
Température finale colonne	295 °C
Volume injecté	1 µl
Gaz transporteur	azote

Tableau XV Paramètres instrumentaux pour la détermination des HAP par CPG.

b) *Identification*

Pour l'analyse qualitative, un mélange de 16 HAP (EPA 690 Supelco) a été injecté. L'identification de chaque composant du mélange a été effectuée par comparaison du temps de rétention de chaque composant du mélange avec celui du HAP injecté isolement et analysé dans les mêmes conditions expérimentales. Les paramètres choisis pour l'analyse ont permis une séparation satisfaisante pour tous les composants. L'identification des HAP dans les solutions d'extraction du pollen a été obtenue en calculant le rapport entre le temps de rétention de chaque composant du mélange des 16 HAP, et le temps de rétention du standard interne (hexadecane) qui avait été ajouté au mélange. Le chromatogramme de 16 HAP est visualisé en Annexe 6.

c) *Expression des résultats*

La détermination quantitative a été obtenue en utilisant un standard interne et des courbes d'étalonnage spécifiques pour chaque HAP. A partir de la solution standard commerciale (EPA 690 Supelco) comportant un mélange d'HAP, nous avons préparé une gamme de dilution avec du DCM. A chaque dilution a été ajouté le standard interne. Après analyse des dilutions, des courbes d'étalonnages, spécifiques pour chaque composé, ont pu être établies, en portant en abscisses les concentrations théoriques du composé et en ordonnée la valeur du rapport d'aire $A_{composé}/A_{standard\ interne}$ (fig.15).

La quantification des HAP dans les échantillons (avec standard interne) est basée sur le calcul des rapports d'aire $A_{composé}/A_{standard\ interne}$ et l'utilisation des courbes d'étalonnages préalablement établies. La concentration ainsi trouvée a été rapportée à la quantité de pollen utilisée pour l'extraction.

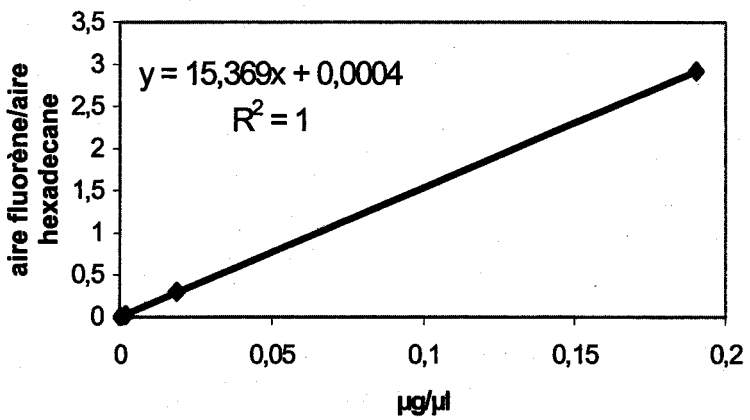


Figure 15 : Courbe d'étalonnage pour le Fluorène (n = 4).

Le calcul de la limite de quantification (L.Q.) a été fait en analysant le chromatogramme de plusieurs solutions de standard interne à la même concentration. Pour chacun des temps de rétention correspondant aux différents HAP, une intégration a été faite en considérant les pics apparaissant dans la ligne de base et les limites d'intégration utilisées pour les HAP. Cette aire a été rapportée à celle issue de l'intégration du pic correspondant au standard interne (rapport aire pic / aire standard interne). Ce rapport aire du pic / aire standard interne a alors permis de déterminer la concentration de chaque composé, en utilisant leurs courbes de d'étalonnage spécifiques.

Enfin, nous avons appliqué la formule suivante pour le calcul de la limite de quantification (LQ)(C.E.A.E.Q., 2002)

$LQ = x + 10\sigma$

où x est la moyenne et σ est l'écart type de 5 solutions ne contenant que le standard interne.

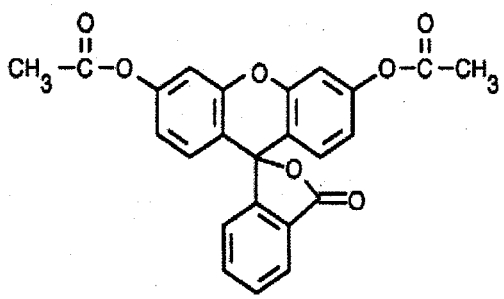
III.7 ANALYSES ENZYMATIQUES

III.7.1 ESTERASE

a) *Principe*

Il s'agit de doser l'activité estérasique avec la fluorescéine diacétate (FDA) qui est transformée en fluorescéine par les estérases du pollen (fig.16). La quantité de fluorescéine formée est directement proportionnelle à l'activité estérasique (Morris, 1980 modifié par Cotelle & Ferard, 1996).

Fluorescéine diacétate (FDA)



↓ Estérases

Fluorescéine

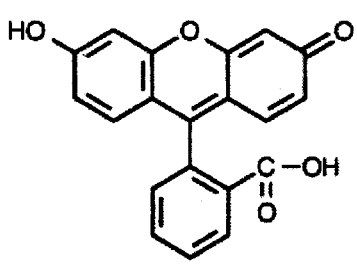


Figure 16 : Schéma de la réaction catalysée par l'estérase.

b) *Solution mère de FDA*

La solution de FDA 1mM est préparée dans l'acétone et conservée à –20°C pendant une période maximale de 20 jours dans des récipients en verre et à l'obscurité à cause de sa photosensibilité.

c) *Solution mère de fluorescéine*

La solution de fluorescéine 2µM est préparée dans l'eau milliQ, puis des dilutions successives sont réalisées pour établir la gamme d'étalonnage (fig.17).

d) *Dosage fluorimétrique*

Le dosage de la fluorescéine est réalisé à l'aide du fluorimètre XENIUS 5123 dans des cuves en quartz, en prenant garde à ce que les échantillons restent à l'obscurité. La longueur d'onde d'excitation utilisée est 370 nm et la longueur d'onde d'émission est fixée à 518 nm.

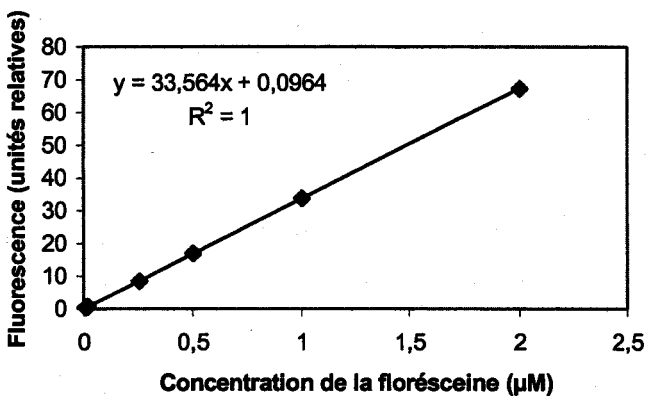


Figure 17 : Gamme étalon de la fluorescéine.

Pour déterminer le meilleur temps d'incubation nous avons vérifié la cinétique de la réaction à partir de la première minute (fig.18). Etant donné que la réaction est linéaire, nous avons choisi un temps d'incubation de 20 min.

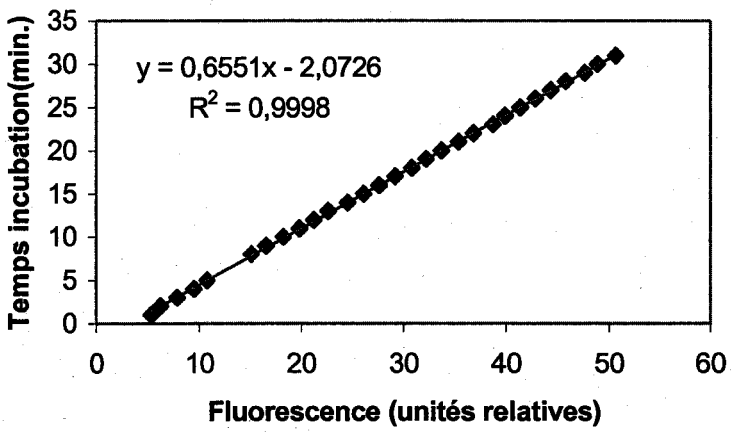


Figure 18 : Cinétique de la réaction enzymatique

e) *Protocole*

20 mg de pollen sont placés avec 5 ml d'eau distillée puis 50.2 µl de FDA (1mM) sont ajoutés. Après un temps d'incubation de 20 min à l'obscurité et à 22°C, on dose la fluorescéine contre un blanc constitué par le même volume d'eau et de FDA mais sans pollen.

f) *Expression des résultats*

Les unités relatives de fluorescence sont transformées en concentration de fluorescéine d'après l'équation de la droite d'étalonnage.

III.7.2 PHOSPHATASE ACIDE

a) *Principe*

La phosphatase acide hydrolyse le *p*-nitrophenyl phosphate (*p*NPP) en *p*-nitrophenol incolore qui avec l'ajout de NaOH forme un produit coloré qui absorbe à 405 nm (fig.19). La quantité de *p*-nitrophenol formée est directement proportionnelle à l'activité de l'enzyme.

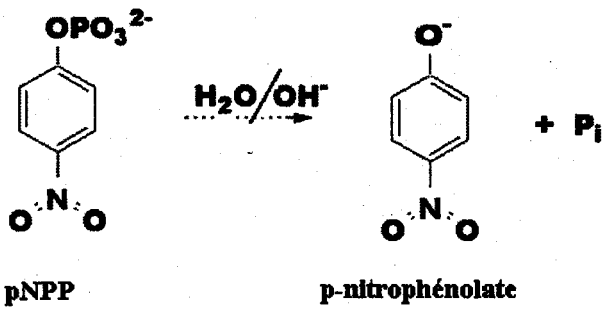


Figure 19 : Schéma de la réaction catalysée par la phosphatase acide.

b) *Solution mère de p-NPP*

La solution de *p*-NPP 6 mM est préparée dans un tampon acétate 0,1M. Nous avons vérifié que le pH était compris entre 5,2 et 5,4 qui correspond au pH optimal pour l'enzyme (Circovic *et al.*, 2002).

c) *Solution mère de p-nitrophénolate*

La solution de *p*-nitrophenol 0.2 mM est préparée dans une solution de NaOH 3M, puis des dilutions successives sont réalisées pour établir la gamme d'étalonnage.

d) *Tampon acétate à base de solutions 0.1M d'acide acétique et acétate de sodium*

11 ml de solution d'acide acétique sont mélangés avec 89 ml de solution d'acétate de sodium.

e) *Solution de NaOH 3M*

12 g de NaOH sont dissous dans 100 ml d'eau milliQ.

f) *Dosage spectrophotométrique*

Le dosage du p-nitrophénol est réalisé avec le spectrophotomètre UVICON 930 à une longueur d'onde de 405 nm.

g) *Gamme étalon du p-nitrophenolate*

Des dilutions en cascade à partir de la solution mère de 0.2 mM et le blanc a été réalisé avec la solution de NaOH 3M (fig.20).

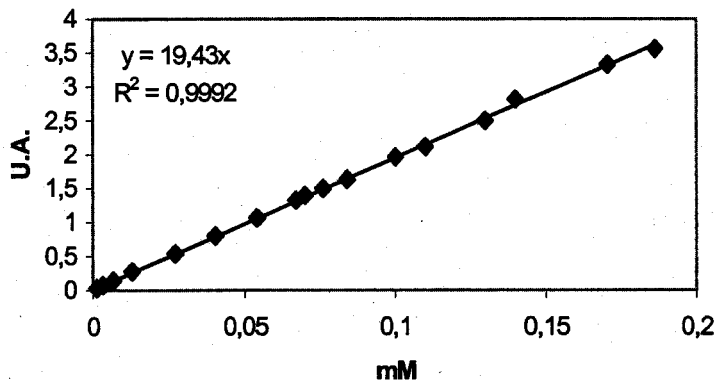


Figure 20 : Gamme étalon du *p*-nitrophenolate

h) *Protocole* (d'après Cirkovic *et al.*, 2002)

20 mg de pollen ont été mis en suspension dans 200 µl d'eau distillée à l'intérieur de tubes qui ensuite ont été placés dans un agitateur circulaire (Test-Tube Rotator, Snijder) pendant une nuit à 4°C pour agiter doucement la solution. La solution est ensuite centrifugée pendant 3 min à 1000 g. 20 µl de surnageant ont été mélangés à 200 µl de solution p-NPP. Après 5 min d'incubation à 30°C la réaction est arrêtée par l'ajout de 100 µl de solution de NaOH 3M et on dose l'activité enzymatique à 405 nm contre un blanc constitué par le même volume de p-NPP et NaOH, mais sans pollen.

III.8 STATISTIQUES

Pour chaque échantillon de pollen (*Fraxinus* et *Pinus*), 3 réplicats ont été obtenus pour chaque variable étudiée (concentrations des HAP, activité phosphatasique et esterasique, pourcentage de germination). La différence significative entre les échantillons issus de différents sites a été évaluée par le test Kruskal-Wallis. Si une différence significative était trouvée ($p < 5\%$), les analyses supplémentaires étaient effectuées avec le test Mann-Whitney.

Le calcul de significativité des coefficients de corrélation entre 2 variables a été réalisé selon le test *t* de Student (Schwartz, 1969) selon la formule suivante :

$$t = \frac{r}{\sqrt{1-r^2}}\sqrt{n-2}$$

Et en comparant la valeur de t calculé avec la valeur de t lue dans la table de t.

L'analyse des résultats par ACP (analyse en composantes principales) a été réalisée avec les variables transformées (valeurs centrées réduites) et les stations.

RESULTATS

IV RESULTATS

La présente étude s'inscrit dans le cadre de la validation de l'emploi du pollen pour la biosurveillance environnementale passive de plantes exposées à différents types d'émissions (automobile et industrielle). L'objectif consiste à étudier la contamination des grains de pollen par les HAP ainsi que les relations éventuelles entre la présence de HAP et divers effets physiologiques.

IV.1 ANALYSE MORPHOLOGIQUE

Les grains de pollen prélevés dans les stations témoins sont caractérisés par une forme régulière, et par l'absence d'agrégats (fig.21 pour le frêne ; fig.22 pour le pin).
Les grains de pollen prélevés dans les stations caractérisées par une forte circulation automobile se sont révélés plus visqueux, de forme irrégulière et très souvent cassés avec expulsion du matériel cytoplasmique. En particulièrement, le pollen de frêne s'est avéré former souvent des agrégats à cause de sa viscosité (fig.23 et 24). En ce qui concerne le pollen de pin, il était plus grand que celui prélevé sur le site témoin, il ne contenait parfois pas les deux sacs aériens mais seulement un, ou encore plusieurs (cas du pollen prélevé dans les stations Remy et Hayange) (fig.25,26,27,28). Ces résultats s'accordent bien avec ceux qui ont été montrés par Micieta et Murin (1997,1998).

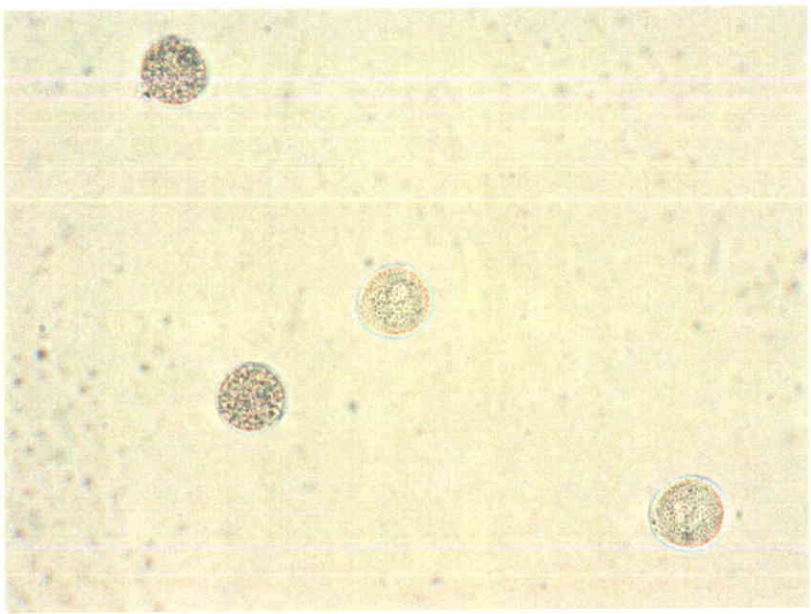


Figure 21 : Pollen *Fraxinus excelsior* prélevé à la station témoin Amanvillers (M.O. x400).



Figure 22 : Pollen *Pinus nigra* prélevé à la station témoin Lessy (M.O. x400).

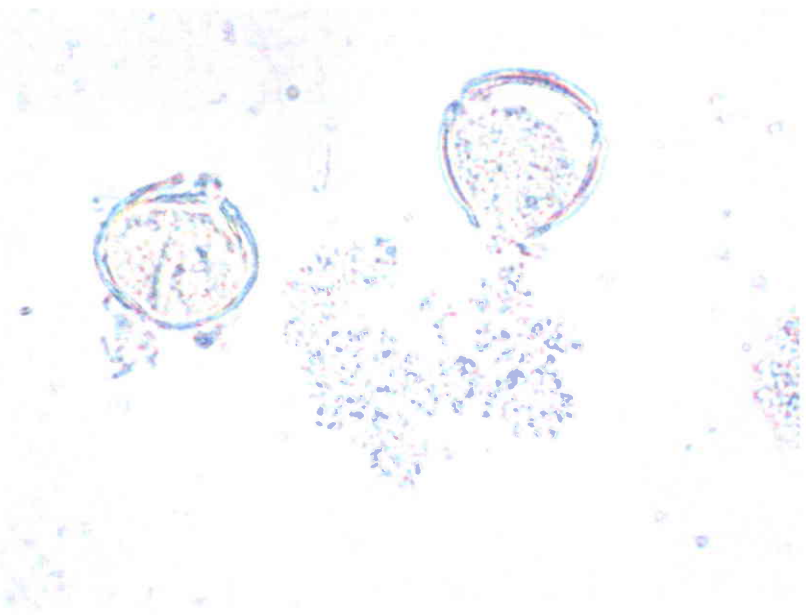


Figure 23 : Pollen *Fraxinus excelsior* prélevé à la station Joffre (M.O. x400). Nous pouvons observer la paroi cassée et l'extrusion du matériel cytoplasmique.



Figure 24 : Pollen *Fraxinus excelsior* prélevé à la station Leclerc (M.O. x400). Nous pouvons observer que les grains forment des aggregats.

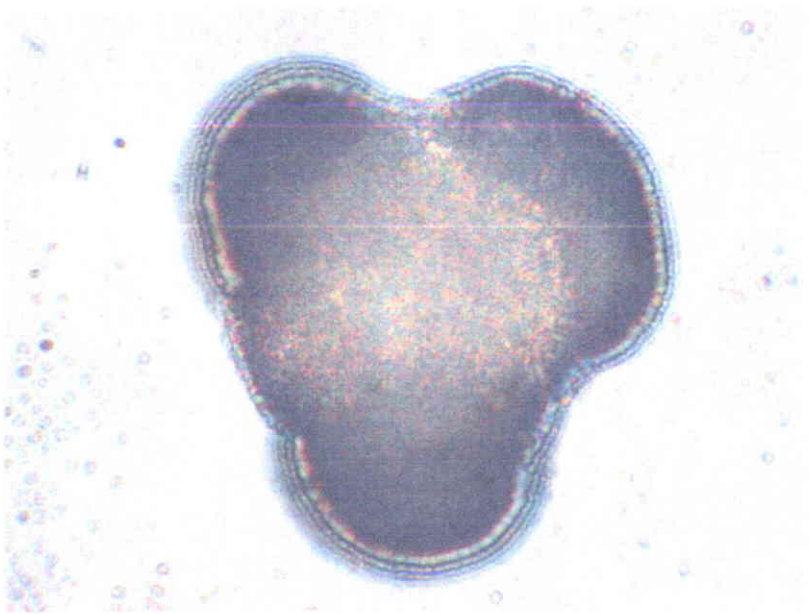


Figure 25 : Pollen *Pinus nigra* prélevé dans la station Remy (M.O. x1000). On observe la présence de 3 sacs aériens.

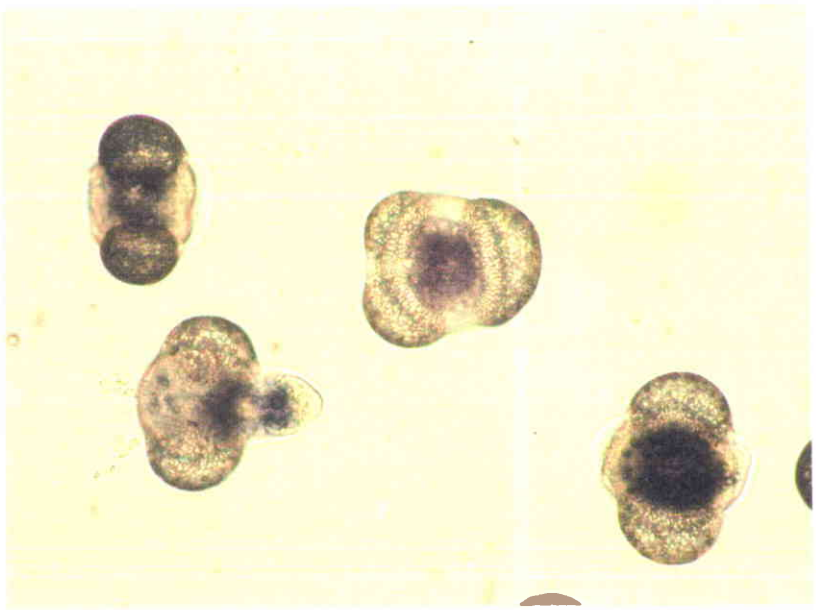


Figure 26 : Pollen *Pinus nigra* prélevé à la station Remy (M.O. x400). Au milieu de la figure, se trouve un grain de pollen avec 3 sacs aériens.

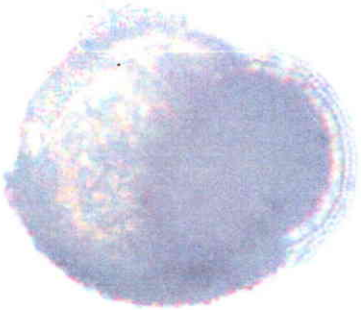


Figure 27 : Pollen *Pinus nigra* prélevé à la station Remy (M.O. x1000). Nous pouvons observer qu'il manque un sac aérien.

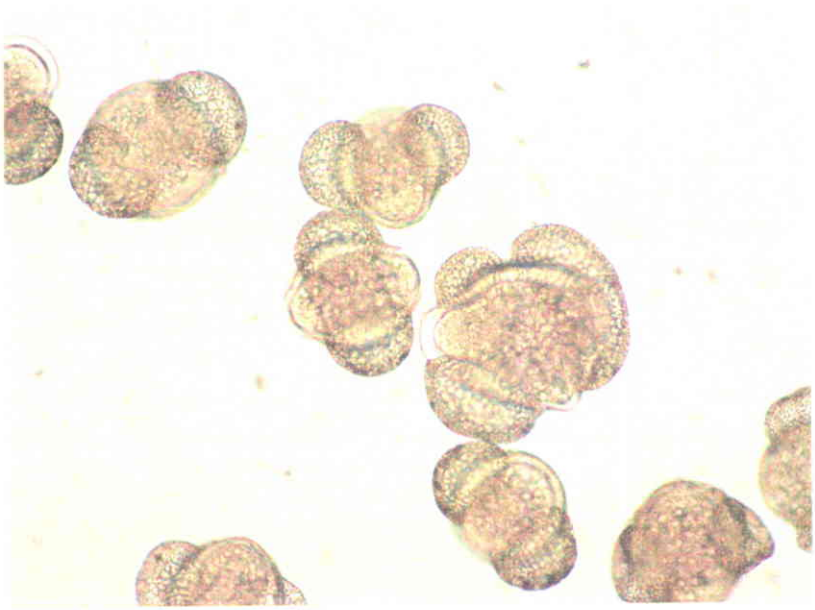


Figure 28 : Pollen *Pinus nigra* prélevé à la station Hayange (M.O. x400). Au milieu de la figure, se trouve un grain de pollen avec 3 sacs aériens.

IV.2 TEST DE GERMINATION

La figure 29 montre la germination du pollen de frêne de la station témoin où les tubes polliniques sont bien développés, au contraire de la station Gare (fig.30) où les grains n'ont pas germé et qui présentent aussi des modifications au niveau du cytoplasme. Les grains de pollen de pin de la station témoin (fig.31) présentent un tube pollinique satisfaisant par rapport à ceux de la station Mozart (fig.32) qui n'ont pas germé (il faut rappeler qu'un grain germé doit avoir une longueur du tube au moins égale au double du diamètre du pollen).

Les résultats complets du test de germination sont montrés en figures 33 et 34.

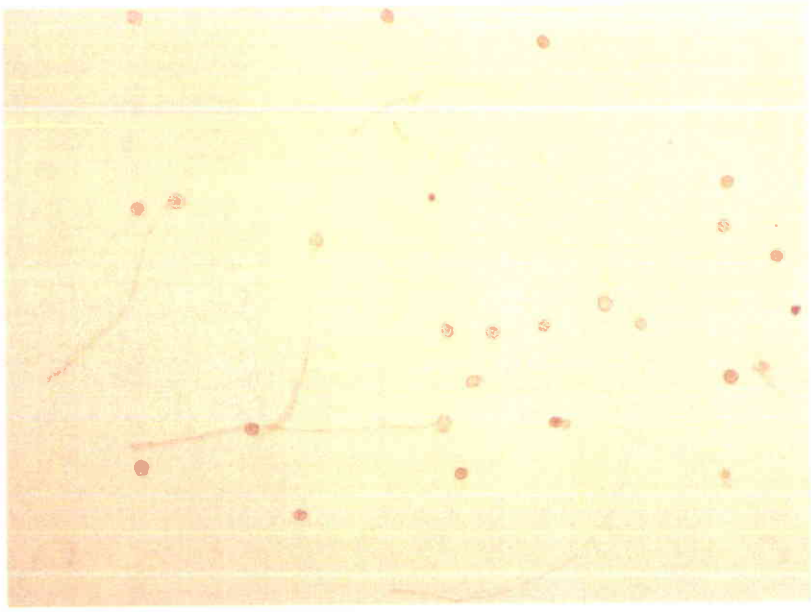
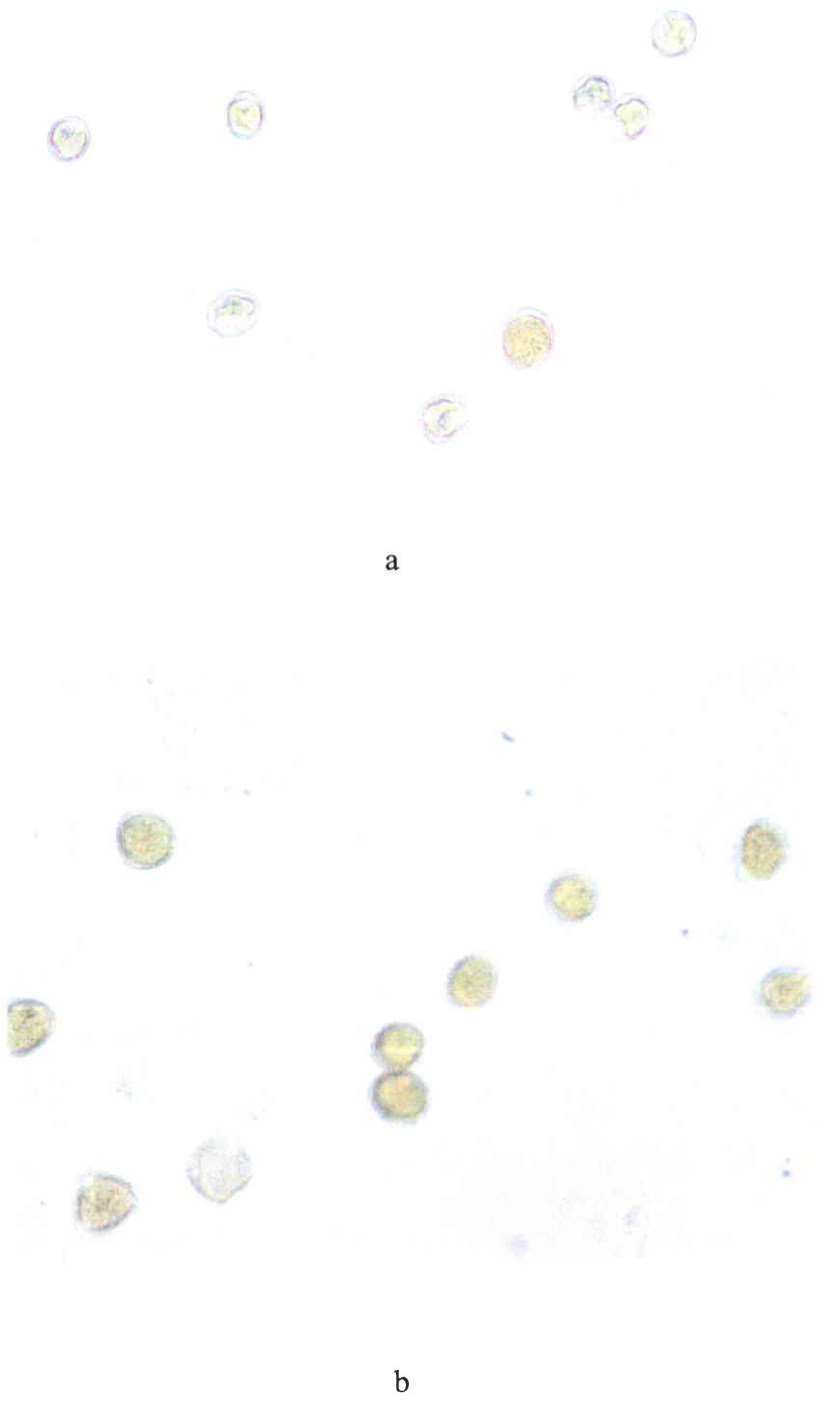


Figure 29 : Germination du pollen de *Fraxinus excelsior* prélevé à la station témoin Amanvillers (M.O. x100).



a

b

Figure 30 : Germination du pollen de *Fraxinus excelsior* prélevé à la station Gare (a) et à la station Leclerc (b) (M.O. x400).



Figure 31 : Germination du pollen de *Pinus nigra* de prélevé à la station témoin Lessy (M.O. x400).

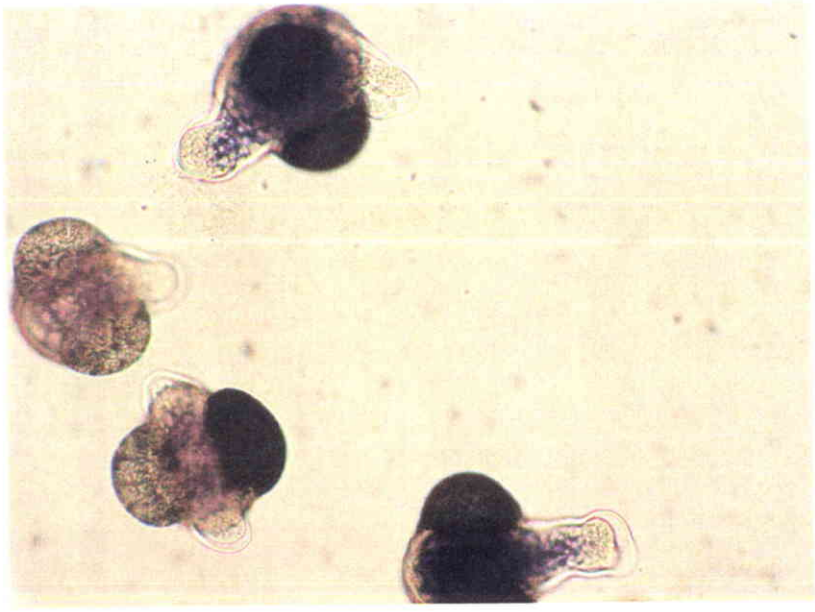
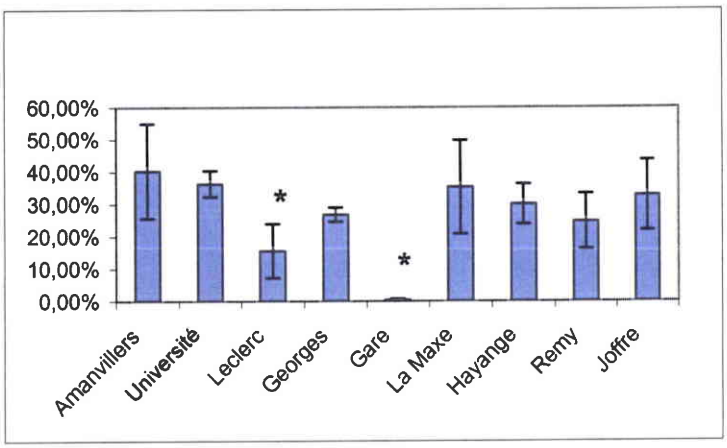


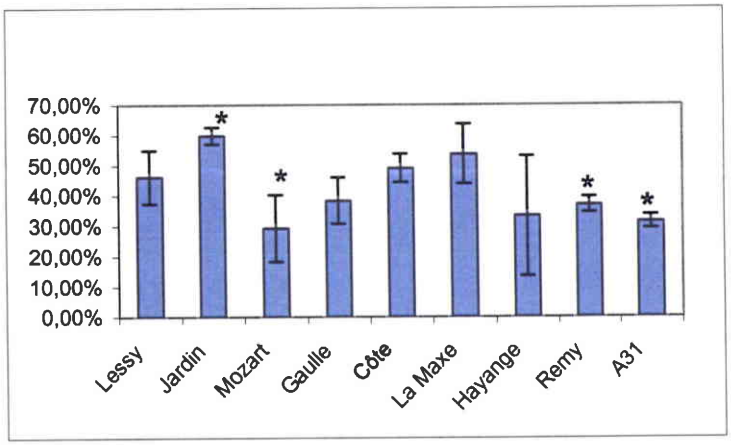
Figure 32 : Germination du pollen de *Pinus nigra* prélevé à la station Mozart (M.O. x400).



* Résultat statistiquement significatif par rapport au témoin représenté par le site Amanvillers ($p < 0,05$)

Figure 33 : Pourcentage de germination pour le pollen de *Fraxinus excelsior* (n=3).

Pour le frêne, à l'exception des stations Leclerc et Gare (stations urbaines) il n'apparaît pas sur la figure 33 de différence significative du pourcentage de germination entre les différentes stations. En ce qui concerne le pollen de frêne de la station Gare, un seul réplicat parmi les trois a germé. Il est possible que d'autres variables spécifiques (état physiologique de l'arbre, maladies apportées par un virus ou un champignon) aient influencé ce résultat.



* Résultat statistiquement significatif par rapport au témoin représenté par le site Lessy ($p < 0,05$)

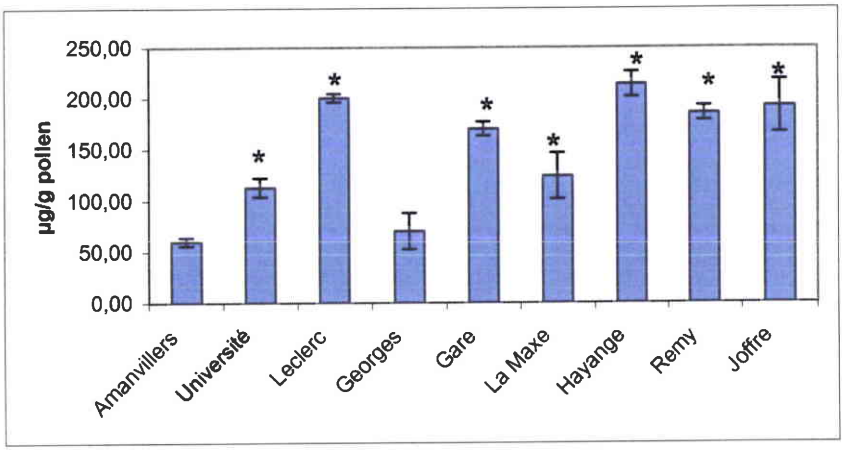
Figure 34 : Pourcentage de germination pour le pollen de *Pinus nigra* (n=3).

De même que précédemment, le pollen de pin (fig.34) aux stations à trafic automobile élevé (Mozart, Remy et A31) montre une diminution significative du taux de germination. Au contraire, le pollen du site Jardin est caractérisé par un plus fort pourcentage de germination que le site de Lessy choisi comme témoin a priori.

Plusieurs auteurs ont montré que les polluants pouvaient induire une réduction de la germination du pollen (Feng *et al.*, 2000 ; Pavlic et Jandurova, 2000).

IV.3 ANALYSE CHIMIQUE

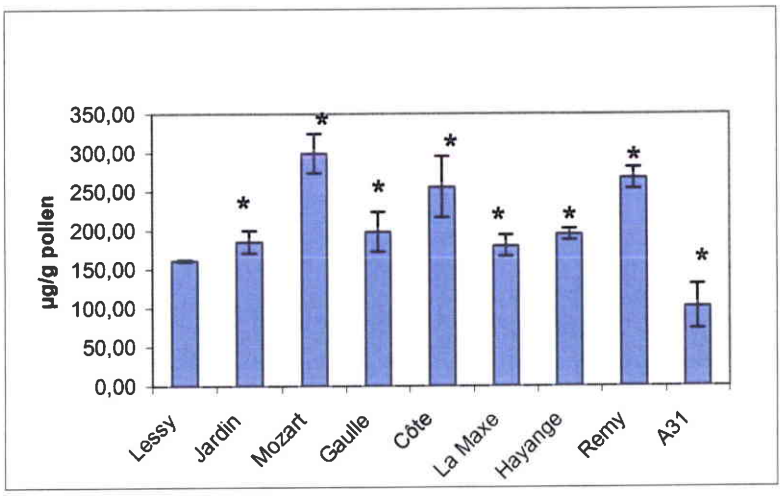
Les figures 35 et 36 montrent la distribution de la concentration totale de HAP pour le pollen de *Fraxinus* (fig.35) et pour le pollen de *Pinus* (fig.36).



* Résultat statistiquement significatif par rapport au témoin Amanvillers ($p < 0,05$)

Figure 35 : Concentration totale des HAP (µg/g p.s.) pour le pollen de *Fraxinus excelsior* (n=3).

D'un point de vue général, nous observons sur la figure 35 que, mise à part la station George pour *Fraxinus* la concentration de HAP pour toutes les stations est significativement différente de la station témoin (Amanvillers). La station George représente un cas particulier car même si elle est située au centre ville, les arbres sur lesquels a été prélevé le pollen n'étaient pas situés dans la rue principale mais sur un parking situé à environ 20 m de la voie de circulation. Le pollen de *Fraxinus excelsior* montre un taux élevé de HAP pour les stations à intense trafic automobile, notamment Leclerc, Gare, Remy et Joffre, et pour la station industrielle Hayange qui est soumise à un faible trafic mais qui se trouve dans une zone sidérurgique.



*Résultat statistiquement significatif par rapport au témoin Lessy ($p < 0,05$)

Figure 36 : Concentration totale des HAP (µg/g p.s.) pour le pollen de *Pinus nigra* (n=3).

La figure 36 permet d'observer que les concentrations de HAP pour toutes les stations sont significativement différentes de celle de la station témoin (Lessy). Le pollen de *Pinus nigra* prélevé dans les stations urbaines, Mozart, Côte et Remy, présente des taux élevés en HAP, mais les deux stations industrielles (La Maxe et Hayange) ne montrent pas de différence significative entre elles (non représenté sur la figure). Par ailleurs, la concentration en HAP du site A31 est significativement plus faible que le témoin, ce qui est étonnant compte-tenu que les arbres sont positionnés à coté de l'autoroute.

Pour mieux comprendre la distribution des HAP les tableaux XVI et XVII montrent la répartition de chaque HAP entre les stations.

HAP	STATIONS *Fraxinus excelsior*								
	Amanvillers	Université	Leclerc	George	Gare	La Maxe	Hayange	Remy	Joffre
Fl	0.8	0,7	3,3	1,3	1,3	1,8	3,3	2	1,7
Flu	1,6	1,4	2,7	0,8	2	1,5	2,5	1,8	1,9
Pyr	< L.Q.[a]	7,7	10,5	< L.Q.[a]	18,8	27,0	14,8	26,5	35,3
Baa	6	8,5	18,0	5,4	11,1	8,1	10,1	8	10,4
Chr	3,1	2,2	< L.Q.[b]	2,3	3,3	8,5	4	5,8	4,6
Bbf	22	24,9	44,1	22,5	27,7	9,5	27,7	29,7	26,7
Bkf	3,6	< L.Q.[c]	< L.Q.[c]	< L.Q.[c]	7,5	6,7	13	9,3	9,1
Bap	7,3	17,2	35,7	4,3	7,4	5,9	10,2	9,3	8,2
Ind	15,7	21,2	36,1	18,2	28,5	26,6	65,9	37,3	32,6
Dba	< L.Q.[d]	29,3	< L.Q.[d]	< L.Q.[d]	28,6	28,8	32,9	29,9	30,7
Bgp	< L.Q.[e]	< L.Q.[e]	50,2	15,8	34,5	< L.Q.[e]	29,6	26	31,2
Σ µg/g	60	113	201	71	171	124	214	186	192

Fl-Fluorène; **Flu**-Fluoranthène ; **Pyr**-Pyrène ; **Baa**-Benzo(a)anthracène ; **Chr**-Chrysène ; **Bbf**-Benzo(b)fluoranthène ; **Bkf**-Benzo(k)fluoranthène; **Bap**-B(a)pyrène; **Ind**-Indeno(1,2,3-cd)pyrène; **Dba**-Dibenzo(a,h)anthracène ; **Bgp**- Benzo(ghi)pérylène; **L.Q.** – Limite de quantification **a** = 6,3 10^{-6} µg/µl; **b** = 9,5 10^{-6} µg/µl; **c** = 13 10^{-6} µg/µl; **d** = 7,5 10^{-6} µg/µl; **e** = 8,2 10^{-6} µg/µl.

En gras italique les HAP à 3/4 cycles, en gras normal les HAP à 5/6 cycles.

Tableau XVI : Teneur des différents HAP dans le pollen de *Fraxinus excelsior* prélevé dans les 9 stations en µg/g de p.s.

Pour le frêne, seul 11 des 16 HAP ont pu être quantifiés sur au moins 6 stations. Les 5 autres (naphtalène, acénaphtylène, acénaphtène, phénanthrène et anthracène) n'ont pas été détectés. En général, les HAP légers sont peu présents contrairement aux HAP plus lourds, avec 5/6 cycles, (benzo(b)fluoranthène ; indéno(1,2,3-cd)pyrène ; dibenzo(a,h)anthracène ; benzo(ghi)pérylène). Le pyrène montre un taux élevé dans les stations industrielles (La Maxe et Hayange) et urbaines avec un intense trafic automobile (Gare, Remy et Joffre).

HAP	STATION *Pinus nigra*								
	Lessy	Jardin	Mozart	Gaulle	Côte	La Maxe	Hayange	Remy	A31
Fl	2,8	1,1	3,6	1,0	1,0	0,8	0,7	1,8	1,4
Flu	1,4	< L,Q,[a]	1,6	1,5	1,9	2,1	1,0	1,6	1,0
Pyr	4,8	5,3	36	2,1	3,7	2,1	4,5	34,0	0,9
Baa	7,8	6,4	29,7	21,4	8,2	7,1	7,0	17,4	5,7
Chr	< L,Q,[b]	< L,Q,[b]	< L,Q,[b]	< L,Q,[b]	< L,Q,[b]	< L,Q,[b]	< L,Q,[b]	< L,Q,[b]	< L,Q,[b]
Bbf	21,5	28,5	39,7	45,7	51,2	40,2	40,1	50,3	27,9
Bkf	< L,Q,[c]	< L,Q,[c]	< L,Q,[c]	< L,Q,[c]	< L,Q,[c]	< L,Q,[c]	< L,Q,[c]	< L,Q,[c]	< L,Q,[c]
Bap	99,1	91,7	129,3	102,7	137,5	73,0	88,7	104,5	48,2
Ind	< L,Q,[d]	< L,Q,[d]	< L,Q,[d]	< L,Q,[d]	< L,Q,[d]	< L,Q,[d]	< L,Q,[d]	< L,Q,[d]	< L,Q,[d]
Dba	< L,Q,[e]	28,0	34,8	< L,Q,[e]	28,8	29,8	27,4	33,7	8,7
Bgp	23,8	24,7	24,5	24,1	23,7	25,7	26,3	24,2	8,0
Σµg/g	161	186	299	198	256	181	196	268	101

Fl-Fluorène; **Flu**-Fluoranthène ; **Pyr**-Pyrène ; **Baa**-Benzo(a)anthracène ; **Chr**-Chrysène ; **Bbf**-Benzo(b)fluoranthène ;. **Bkf**-Benzo(k)fluoranthène; **Bap**-B(a)pyrène; **Ind**-Indeno(1,2,3-cd)pyrène; **Dba**-Dibenzo(a,h)anthracène ; **Bgp**- Benzo(ghi)pérylène; **L,Q,** – Limite de quantification **a** = 9,4 10^{-6} µg/µl; **b** = 9,5 10^{-6} µg/µl; **c** = 13 10^{-6} µg/µl; **d** = 7,8 10^{-6} µg/µl; **e** = 7,5 10^{-6} µg/µl.
En gras italique les HAP à 3/4 cycles, en gras normal les HAP à 5/6 cycles.

Tableau XVII : Teneur des différents HAP dans le pollen de *Pinus nigra* prélevé dans les 9 stations en µg/g de p.s.

Pour le pin, seul 8 des 16 HAP ont été quantifiés. Le chrysène, le benzo(k)fluoranthène et l'indéno(1,2,3-cd)pyrène sont présents en quantité inférieure à leur LQ. Les 5 autres (naphtalène, acénaphtylène, acénaphtène, phénanthrène et anthracène) n'ont pas (comme précédemment) été détectés.

Là également, les HAP les plus lourds sont les plus présents. Parmi les HAP, il est intéressant de remarquer que le benzo(a)pyrène, classé 2A c'est à dire probablement cancérigène pour

l'homme (IARC, 1987), est présent à forte concentration dans toutes les stations même pour la station témoin. Il représente entre 43% et 61% de la quantité totale des HAP mesurés.

Le pollen de l'espèce *Pinus nigra* se caractérise par une concentration totale de HAP plus élevée que l'espèce *Fraxinus excelsior*, même si certains HAP (chrysène, benzo(k)fluoranthène et indeno(1,2,3-cd)pyrène) ne sont pas présents en concentration quantifiable. La concentration totale en HAP varie de 161 µg/g à 299 µg/g et de 60 à 214 µg/g pour le pin et le frêne respectivement. Il est intéressant de noter que le profil des HAP est différent entre les deux espèces pour les stations communes (tableaux XVI et XVII), ce qui peut être dû à un léger décalage dans le temps de l'échantillonnage (fin mars pour le frêne et mi-avril pour le pin).

En effet, le rapport des concentrations des HAP retrouvés dans le pollen de frêne et de pin pour les même sites (Mozart – Leclerc[3], La Maxe, Hayange et Remy) montre des valeurs quasi constantes pour 3 sites sur 4 (Mozart-Leclerc, La Maxe et Remy) (tab.XVIII). Ce rapport de 0,68 ± 0,01 semblent caractériser des stations urbaines ou semi-urbaines plus ou moins proches de voies de circulation. Par contre, la station de Hayange proche d'un émetteur industriel se caractérise par un rapport plus élevé (1.09).

SITES	Σ HAP *Fraxinus* (µg/g p.s.)	Σ HAP *Pinus* (µg/g p.s.)	RAPPORT
Mozart – Leclerc	201	299	0.67
La Maxe	124	181	0.68
Hayange	214	196	1.09
Remy	186	268	0.69

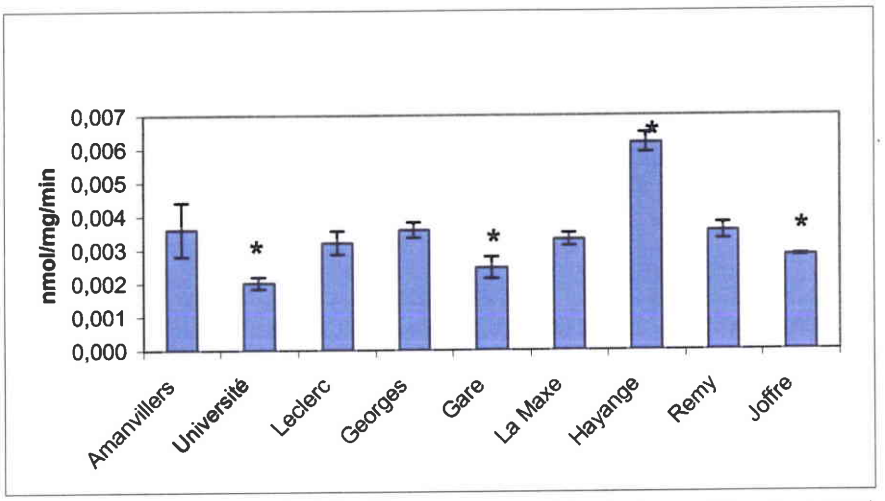
Tableau XVIII : Rapport des concentrations des HAP.

[3] Nous avons pu comparer les stations Mozart pour le pin et Leclerc pour le frêne étant donne qu'elles sont proches (10 m).

IV.4 ACTIVITES ENZYMATIQUES

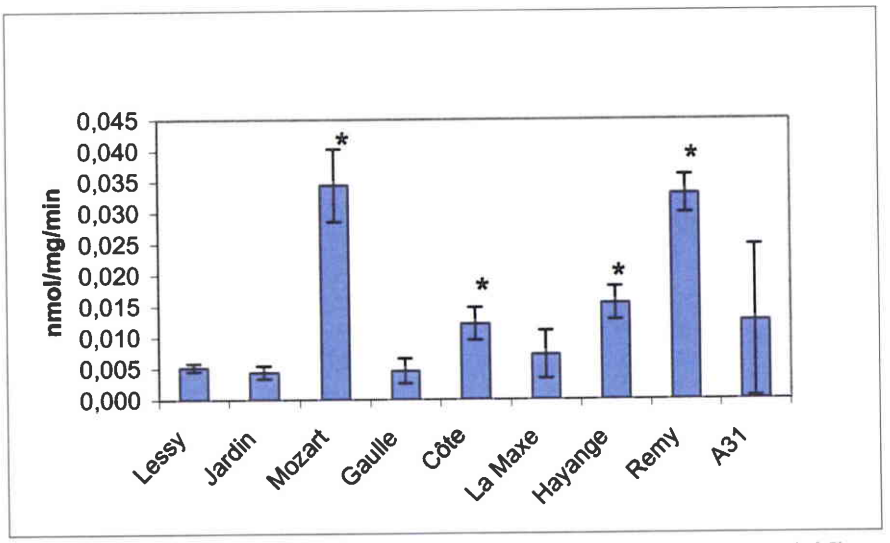
IV.4.1 ESTERASE

Les résultats obtenus pour l'activité esterasique sont montrés en figures 37 et 38.



* Résultat statistiquement significatif par rapport au témoin Amanvillers ($p < 0,05$)

Figure 37 : Activité esterasique du pollen de *Fraxinus excelsior* (n=3).



* Résultat statistiquement significatif par rapport au témoin Lessy ($p < 0,05$)

Figure 38 : Activité esterasique du pollen de *Pinus nigra*(n=3).

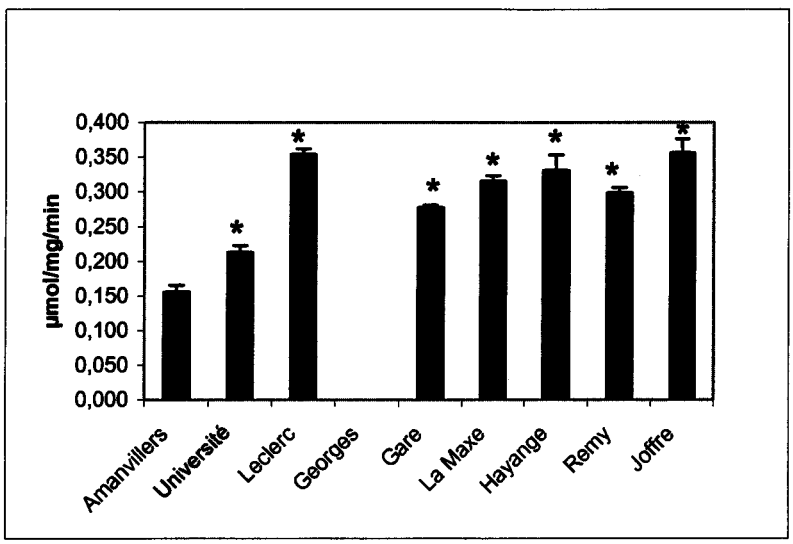
La distribution de l'activité estérasique parmi les stations de prélèvement du pollen de *Fraxinus* (figure 37) est plutôt singulière. En effet, la seule station qui montre une augmentation significative par rapport au témoin de l'activité enzymatique est la station industrielle Hayange qui d'ailleurs présentait un taux en HAP élevé (214 µg/g). Pour toutes les autres stations, soit il n'y a pas de différence avec le témoin, soit on remarque une diminution significative. Il est possible que le statut morphologique du pollen, les parois cassées, l'extrusion de matériel cytoplasmique, aient affecté ici l'analyse.

Pour le pollen de *Pinus* (figure 38) la distribution de l'activité estérasique est plus régulière. Il existe une augmentation significative pour les mêmes stations Mozart, Côte et Remy et, comme pour le pollen de *Fraxinus*, une activité plus élevée pour la station industrielle Hayange. La station A31 montre un grand écart type parce que, parmi les réplicats, le troisième a montré une activité beaucoup plus élevée par rapport aux deux autres. Une explication possible est que parmi les trois replicats, l'un soit resté beaucoup plus en incubation et ait donné une valeur plus élevée que les autres[4].

[4] 0.006, 0.005 et 0.03 nmol/mg/min

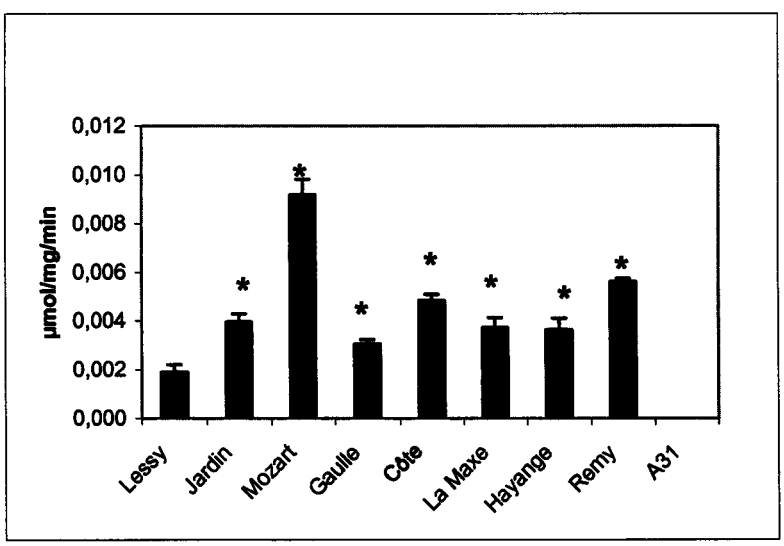
IV.4.2 PHOSPHATASE ACIDE

Les résultats obtenus pour la phosphatase acide sont montrés en figures 39 et 40.



* Résultat statistiquement significatif par rapport au témoin Amanvillers ($p < 0,05$)

Figure 39 : Phosphatase Acide de *Fraxinus excelsior*(n=3).



* Résultat statistiquement significatif par rapport au témoin Lessy ($p < 0,05$)

Figure 40 : Phosphatase Acide de *Pinus nigra*(n=3).

En premier lieu, il faut noter que pour la détermination de l'activité phosphatase acide nous avons effectué l'analyse sur 8 stations et non pas 9. En effet, la quantité de pollen prélevé pour les stations George et A31 a été trop faible étant donné que la méthode d'analyse a été optimisée sur ce même pollen, il restait donc une quantité insuffisante pour le dosage.
Les résultats montrent bien une augmentation significative par rapport au témoin pour l'activité phosphatase acide parmi toutes les stations et pour les deux espèces. En particulier le pollen de *Fraxinus* présente un taux élevé pour les stations urbaines et industrielles (fig.39). Quant au pollen de *Pinus* (fig.40), son activité phosphatase acide est augmentée significativement dans les stations à intense trafic automobile (Mozart, Côte et Remy).

Les matrices de corrélation établies entre toutes les variables sont décrites dans les tableaux XIX et XX.

	HAP	Phosphatase Acide	Estérase	% Germination
HAP	1,000	**0.878**	0,356	***-0,509***
Phosphatase Acide		1,000	0,246	-0,334
Estérase			1,000	0,181
% Germination				1,000

Tableau XIX : Matrice de corrélation pour le pollen de *Fraxinus excelsior*. En gras normal coefficient significatif au seuil de 5%, en gras italique coefficient significatif entre 5 et 10% (table de *t*).

	HAP	Phosphatase Acide	Esterase	% Germination
HAP	1,000	**0,909**	**0,870**	***-0,546***
Phosphatase Acide		1,000	**0,844**	-0.487
Esterase			1,000	**-0,692**
% Germination				1,000

Tableau XX : Matrice de corrélation pour le pollen de *Pinus nigra*. En gras normal coefficient significatif au seuil de 5%, en gras italique coefficient significatif entre 5 et 10% (table de *t*).

Si nous considérons uniquement les coefficients de corrélation significatifs au seuil de 5 (ou 10 %), nous pouvons remarquer que pour le pin, il y a une bonne corrélation entre la concentration en HAP et les activités enzymatiques mais que la première est inversement proportionnelle au pourcentage de germination. Ce dernier est également inversement proportionnel à l'activité estérasique (tab.XX).

Pour le pollen de frêne, la présence de HAP agit sur l'activité de la phosphatase acide mais pas sur celle de l'estérase. De même que précédemment le pourcentage de germination est inversement proportionnelle aux concentrations des HAP (tab.XIX).

Une synthèse des résultats obtenus sur les différents paramètres étudiés est présentée dans le tableau XXI.

RESULTATS	***Fraxinus excelsior***	***Pinus nigra***
Morphologiques	Grains plus endommagés	Grains avec paroi intacte
Physiologiques	Pourcentage de germination plus faible 0 – 40 %	Pourcentage de germination plus fort 30 – 60 %
Chimiques	Concentration en HAP plus faible 60 – 214 µg/g	Concentration en HAP plus élevée 161 – 299 µg/g
Enzymatiques Estérase	Activité esterasique plus faible 0,002 – 0,006 nmol/mg/min	Activité esterasique plus élevée 0,005 – 0,034 nmol/mg/min
Enzymatiques Phosphatase acide	Activité Phosphatase Acide plus élevée 0,150 – 0,354 µmol/mg/min	Activité Phosphatase Acide plus faible 0,002 – 0,009µmol/mg/min

Tableau XXI : Synthèse des résultats.

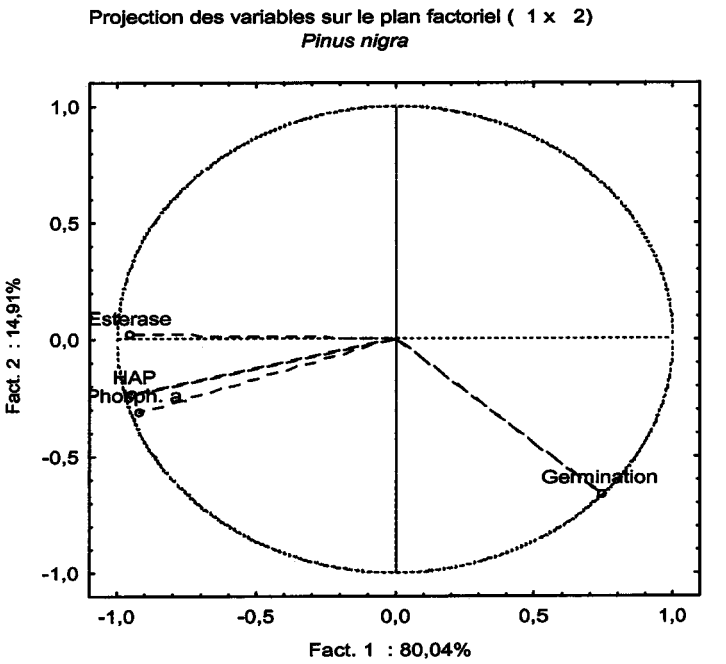
DISCUSSION ET CONCLUSION

V DISCUSSION ET CONCLUSION

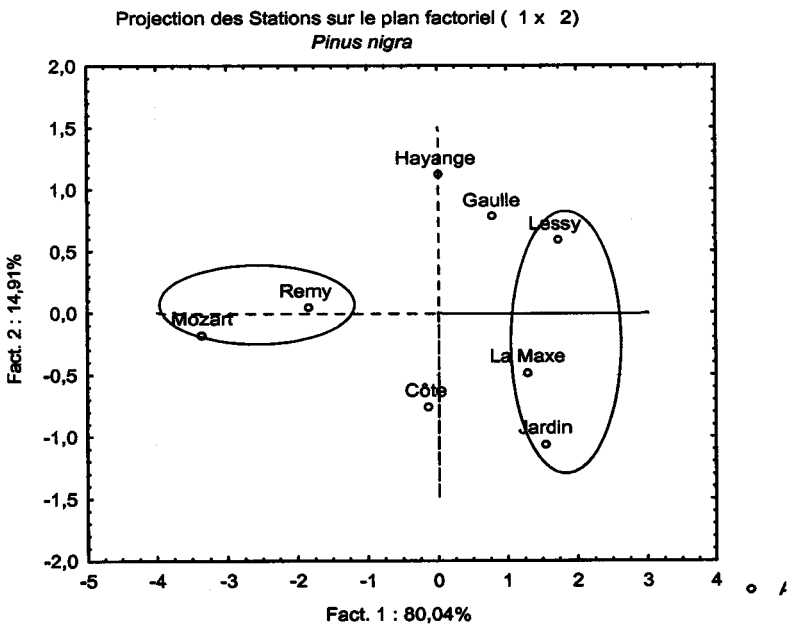
Nos résultats ont montré que les grains de pollen issus de différents sites étaient contaminés par des HAP. Les résultats que nous avons obtenus peuvent être comparés avec « quelques » résultats de la littérature. Le seul travail où nous avons trouvé des concentrations de HAP dans les grains de pollen est celui de Stransky *et al.* (2001) qui d'ailleurs n'utilisent pas le pollen pour une biosurveillance mais pour valider des techniques d'extraction. Les auteurs ont analysé un extrait de pollen de sureau (*Sambucus nigra*) et ils ont trouvé une fraction contenant à la fois les HAP et du squalène à une concentration de 300 µg/g (poids sec), donc comparable à nos résultats (bien que la concentration de squalène ne soit pas connue).

L'interaction entre les HAP et le pollen provoque des modifications au niveau enzymatique (estérase et phosphatase acide) et dans une moindre mesure au niveau physiologique (pourcentage de germination). L'analyse des résultats par ACP (analyse en composantes principales) a été réalisée avec les 4 variables transformées (valeurs centrées réduites) et les 8 stations. Les stations sont au nombre de 8 et non de 9 car il manque la station A31 (pour le pollen de pin) et la station George (pour le pollen de frêne) où les données concernant la variable activité phosphatase acide est absente (quantité de pollen insuffisante). La variabilité des données, présentées en figures 41 et 42, peut être expliquée à hauteur de 95% pour *Pinus* (fig.41a) et de 86% pour *Fraxinus* (fig.42a) par les axes 1 et 2. L'axe 1 (80% et 56% d'explication respectivement pour *Pinus* et *Fraxinus*) semble être représentatif des concentrations en HAP. L'ACP montre que la présence de HAP est bien corrélée à la phosphatase acide et à l'estérase pour le *Pinus* et seulement à la phosphatase acide pour *Fraxinus*, ce qui confirme donc les résultats de la matrice de corrélation (tab.XIX et XX).

La projection des stations de prélèvements de pin sur le plan factoriel (fig.41b) permet d'observer que la station Lessy a été bien choisie au départ mais que les stations Jardin et La Maxe se caractérisent par des grains de pollen peu contaminés. La station Jardin est localisée à l'intérieur d'un jardin botanique et la station La Maxe, même si elle est située à côté d'un centre de production thermique d'électricité, est relativement éloignée des sources urbaines de production de HAP. A l'inverse, les stations Remy et surtout Mozart, avec un intense trafic automobile sont caractérisées par des activités enzymatiques et des concentrations en HAP plus élevées.



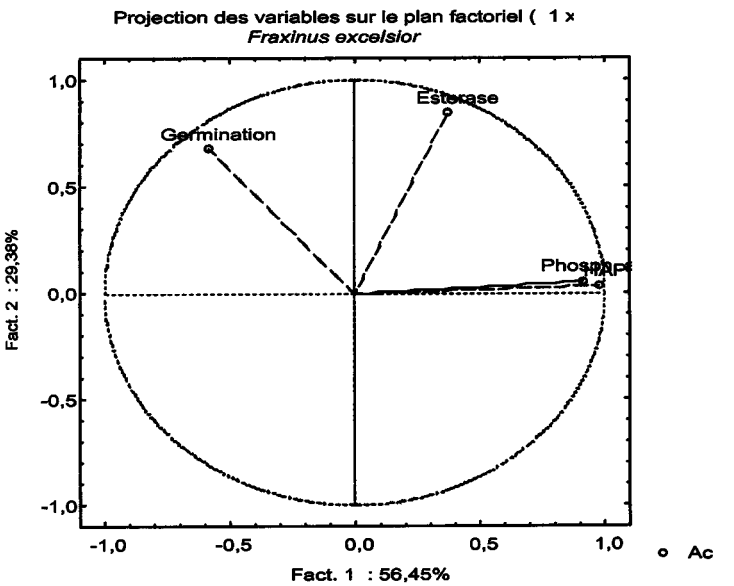
a



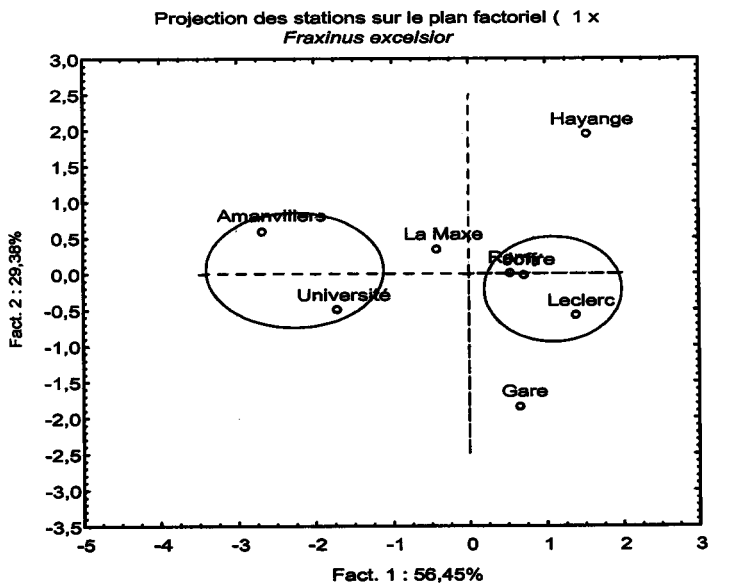
b

Figure 41 : Cercle de corrélations de données centrées réduites incluant les mesures des activités enzymatiques, le taux en HAP, le pourcentage de germination (a) et la distribution des stations (b) pour le pollen de *Pinus nigra*.

En ce qui concerne l'ACP réalisée sur le pollen de frêne (fig.42a), il y a une excellente corrélation des HAP avec la phosphatase acide mais pas avec l'estérase. En effet, les stations à intense trafic automobile, Remy, Joffre et Leclerc, non seulement montrent sur la figure 42b un taux élevé en HAP et phosphatase acide dans le pollen mais elles sont complètement opposées à la station témoin Amanvillers ou encore à celles qui n'ont pas un intense trafic automobile comme Université et La Maxe. Par contre, ces trois dernières stations montrent un pourcentage de germination très élevé.



a



b

Figure 42 : Cercle de corrélations de données centrées réduites incluant les mesures des activités enzymatiques, le taux en HAP, le pourcentage germination (a) et la distribution des stations (b) pour le pollen de *Fraxinus excelsior*.

Pour les deux espèces, *Pinus* et *Fraxinus*, les stations urbaines sont proches l'une de l'autre (fig. 41b et 42b), le taux de HAP y est bien corrélé avec l'activité phosphatase acide et enfin le trafic automobile y est plus élevé que dans les stations industrielles. Ces trois éléments permettent de faire l'hypothèse que la cause de l'augmentation de la concentration de HAP et de l'activité phosphatase acide dans les grains de pollen est due au trafic automobile. Il est regrettable de ne pas avoir les données ponctuelles du niveau de circulation pour tous les sites. Les recherches que nous avons menées, auprès des organismes publiques, n'ont été fructueuses que pour une station.

Comme l'ont signalé Lodovici *et al.* (1998) avec la détermination des HAP dans les feuilles de laurier, les grandes villes montrent un taux en HAP plus élevé que les petites villes (469,6 µg/kg et 17,7 µg/kg respectivement, soit un rapport de 26). Alfani *et al.* (2001) ont aussi montré sur des feuilles de chêne que la concentration de HAP détectée dans les feuilles prélevées dans les stations urbaines était plus élevée que dans les stations témoins (4607,5 ng/g et 106,6 ng/g soit un rapport de 43).

En ce qui concerne le dosage de la phosphatase acide, nos résultats sont en accord avec le travail présenté par Melati et Alaimo (2001) qui montrent la présence de sites d'activité dans la paroi des grains de pollen de *Citrus* (pamplemousse) et de *Cupressus* (cyprès) issus des zones très polluées de la ville de Palerme (Italie). L'activité phosphatase acide a été également corrélée à la pollution atmosphérique par Lombardo *et al.* (2001), qui constatent une augmentation, dans les aiguilles de plusieurs espèces de *Pinus*, de l'activité enzymatique dans les stations polluées par rapport à la station témoin. La phosphatase acide est donc un excellent biomarqueur de la contamination atmosphèrique.

Quant à l'activité estérasique qui est seulement corrélée au taux de HAP dans le pin, il faut noter que nos résultats sont cohérents avec le travail présenté par Alaimo *et al.* (1997), qui montrent la présence de sites d'activité estérasique dans la paroi des grains de pollen prélevés dans les stations à intense trafic automobile. La même observation a été faite pour le pollen de *Citrus* (pamplemousse) et *Cupressus* (cyprès) issu de zones très polluées de la ville de Palerme (Italie) (Melati et Alaimo, 2001) ou bien pour les bourgeons de *Picea abies* (épicéa commun) soumis à des traitements de pluie acide (Soukupova *et al.*, 2002).

Il faut noter que les activités enzymatiques phosphatase acide et estérase peuvent être modulées par d' autres facteurs comme la température et le stress hydrique.

En ce qui concerne la corrélation entre pollution et germination, Schoene *et al.* (2004) ont constaté que la présence d'ozone causait des modifications dans l'organisation du pollen de *Lolium perenne* (ray-grass) alors que Schirazi et Muir (1998) ont mis en évidence une

réduction de la germination du pollen de *Pseudotsuga menziesii* (sapin de Douglas), exposé à différentes concentrations de formaldéhyde (très abondant en zone polluée).

Par contre, nos résultats ont montré une corrélation faiblement significative (<10 %) entre la présence de HAP et la diminution du pouvoir de germination du pollen.

Les HAP peuvent agir sur les activités enzymatiques en favorisant l'accessibilité à la phosphatase acide située dans l'intine et à l'estérase (dans le cas du seul pollen de pin) située dans l'exine. Cette accessibilité attestée par l'augmentation des activités enzymatiques pourrait être liée à une action chimique des HAP ou d'autres polluants non étudiés dans ce travail.

A partir des données de la littérature, nous savons que ces enzymes sont présentes dans les tissus végétaux caractérisés par une intense activité métabolique (Pretova *et al.*, 2001) et sont impliquées en réponse à différents stress d'origine biotique (Pasquilini *et al.*,1992b) ou abiotique (Melati, 1996). Il est donc possible de faire l'hypothèse que les HAP (avec d'autres polluants) rendent ces enzymes plus accessibles à leurs substrats aussi bien dans le milieu destiné aux dosages enzymatiques que dans le milieu destiné à évaluer le pourcentage de germination et de ce fait ne sont plus disponibles pour la formation du tube pollinique. En effet pour les grains de pollen de pin nous avons pu constater que là où les concentrations des HAP étaient élevées (notamment Mozart et Remy), les activités enzymatiques étaient elles même élevées et qu'au contraire le pourcentage de germination y était plus faible.

Une autre explication possible est que les HAP sont adsorbés au pollen et que leur action reste seulement externe ou intramembranaire. Dans ce cas, la présence des HAP influence les facteurs enzymatiques impliqués dans la germination notamment ceux qui sont les plus accessibles à savoir les enzymes de la paroi. Pour confirmer cette hypothèse, il faut remarquer que la distribution air-végétation et la présence des HAP en phase gazeuse ou en phase particulaire dépend de la température ambiante et de leurs caractéristiques physico-chimiques. Parmi ces derniers le coefficient de répartition octanol-air (K_{OA}) permet d'expliquer cette répartition (Finizio *et al.*, 1997 ; Barber *et al.*, 2004). Les HAP avec log $K_{OA} > 11$, c'est à dire ceux à haut poids moléculaire, sont présents en majorité dans la phase particulaire (McLachlan, 1999 ; Kaupp et McLachlan, 1999). Cette théorie peut aussi expliquer le fait que nous n'ayons pas trouvé les HAP, dans les grains de pollen, avec un nombre de cycles < 4 (mis à part le cas du fluorène). Ces HAP de part leurs caractéristiques (log K_{OA}, tension de vapeur) se trouvent en effet en priorité dans la phase vapeur et donc n'ont pas été extraits comme les autres HAP qui étaient adsorbés aux matières particulaires en suspension.

La présence de structures propres à la végétation augmente la capacité de retenir les particules en suspension : poils foliaires, cuticule riche en cires, surface foliaire (Freer-Smith *et al.*, 1997). C'est pour cette raison qu'on peut remarquer une différence dans la capacité à capturer les polluants en phase particulaire. Beckett *et al.* (2000), ont montré que, parmi plusieurs végétaux, les aiguilles de *Pinus nigra* étaient plus efficaces à capturer les particules.

Or les valeurs présentées pour les HAP dans ce travail sont plus élevées que celles trouvées dans la littérature sur différentes parties de plantes (tab.XI). La structure et la composition de la paroi du pollen sont complexes et il semble donc que l'exine agisse comme une éponge avec de nombreux sites capables d'accumuler les particules.

PERSPECTIVES

VI PERSPECTIVES

Ce travail nous a permis de mieux comprendre la relation entre le pollen et les polluants et le rôle de certaines enzymes. Par contre, plusieurs aspects peuvent être améliorés :

1. l'optimisation de la méthode d'extraction, notamment une purification de l'extrait serait nécessaire car il est toujours possible qu'un composant masque la présence des HAP. Il faudrait également réaliser des essais avec d'autres solvants d'extraction (isooctane, N,N-Diméthylformalmide) et vérifier les pics obtenus par spectrométrie de masse.
2. le couplage du dosage des HAP dans le pollen, dans les feuilles et dans l'air pour mettre en évidence une éventuelle corrélation.
3. l'évaluation des effets génotoxiques des HAP dans les grains de pollen dans le cas où ils seraient absorbés. Nous pouvons proposer l'évaluation de ces effets par le test des comètes par exemple. Après des expériences préliminaires n'ayant pas abouti à des résultats satisfaisants, nous pensons néanmoins qu'il serait intéressant de poursuivre ces travaux en mettant au point une technique pour casser la paroi des grains de pollen et ainsi isoler les noyaux.
4. vérifier si les HAP sont les seuls responsables des perturbations enzymatiques et physiologiques (germination) des grains de pollen ou si d'autres polluants peuvent induire ces mêmes effets.
5. au niveaux de la santé humaine, il serait intéressant d'approfondir la compréhension du rôle des enzymes phosphatase acide et estérase dans le phénomène d'allergie ou d'autres protéines allergisantes du pollen et le conséquences de la présence du Benzo(a)pyrène retrouvé parfois en forte concentration au niveau du pollen.
6. une autre campagne aurait été nécessaire pour confirmer les résultats, mais faute de temps celle-ci n'a pu avoir lieu.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

VII REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aceves M. & Grimald J.O., 1993, Seasonally dependent size distributions of aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in urban aerosol from densely populated areas, *Environmental Sciences and Technology*., **27** (13), 2896-2908.

Achazi R.K., Flenner C., Livingstone D.R., Peters L.D., Schaub K. & Scheiwe E.,1998, Cytochrome P450 and dependent activities in unexposed and PAH – exposed terrestrial annelids, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **Part C-121**, 339-350.

Agence de l'eau Seine – Normandie, 1997, Les hydrocarbures aromatiques polycycliques, Agence de l'eau Seine – Normandie, Direction de la Recherche et des Etudes sur l'Agriculture et les Milieux Service Environnement, Nanterre, 1-63.

Akpan V., Lodovici M. & Dolara P., 1994, Polycyclic aromatic hydrocarbons in fresh and smoked fish samples from three nigerian cities, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **53,** 246-253.

Alaimo M.G., Li Vigni I. & Melati M.R., 1997, Presence of esterase in *Pinaceae* pollen, *Aerobiologia*, **13,** 117-120.

Alaimo M.G., Butera A., Melati M.R., Orecchio S. & Sciarrone S.G., 1998a, Soluzione contenente tensioattivi, *Ambiente, Risorse, Salute*, **60** (Marzo/aprile), 22-26.

Alaimo M.G., Palmeri E., Bruno A. & Melati M.R., 1998b, Proposal for the evaluation of stress caused by environmental pollution with plant markers, *6th International Congress on aerobiology*, Perugia.

Alaimo M.G., Li Pani B., Lombardo M.G., Orecchio S., Turano M. & Melati M.R., 2000a, Indice biologico di resistenza al carico di immissioni inquinanti, *Informatore Botanico Italiano*, **32,** 73-76.

Alaimo M.G., Lipani B., Lombardo M.G., Orecchio S., Turano M. & Melati M.R., 2000b, The mapping of stress in the predominant plants in the city of Palermo by lead dosage, *Aerobiologia*, **16**, 47-54.

Alfani A., Maisto G., Prati M.V.& Baldantoni D., 2001, Leaves of *Quercus ilex* L. as biomonitors of PAHs in the air of Naples (Italy), *Atmospheric Environment*, **35**, 3553-3559.

Anh M.T., Triet L.M., Sauvain J.-J. & Taradellas J., 1999, PAH contamination levels in air particles and sediments of Ho Chi Minh City, Vietnam, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **63**, 728-735.

Arey J., Atkinson R., Sasaki J., Gupta P., Eastmond D.A. & Grosovsky A.J., 1995, Atmospheric transformation reactions of 2-4 ring polycyclic aromatic hydrocarbons and the formation of mutagenic products, in *Ecotoxicology of air compartment*, proceeding of SEFA International Symposium in Rouen, 15-22.

Baird C., 1999, *Environmental Chemistry*, W.H. Freeman and Company, New York.

Bakker M.I., Casado B., Koerselman J.W., Tolls J. & Kollöffel C., 2000, Polycyclic aromatic hydrocarbons in soil and plant samples from the vicinity of an oil refinery, *The Science of the Total Environment*, **263**, 91-100.

Barber J.L., Thomas G.O., Kerstiens G. & Jones K.C., 2004, Current issues and uncertainties in I the measurement and modelling of air-vegetation exchange and within-plant processing of POPs, *Environmental Pollution*, **128**, 99-138.

Beasley R., 1998, Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC, *Lancet*, **351**, 1225-1232.

Beckett K.P., Freer-Smith P.H. & Taylor G., 2000, Particulate pollution capture by urban trees: effect of species and windspeed, *Global Change Biology*, **6**, 995-1003.

Beggs P.J., 1998, Pollen and pollen antigen as triggers of asthma – what to measure?, *Atmospheric Environment*, **32,** 1777-1783.

Behrendt H. & Becker W.M., 2001, Localization, release and bioavailability of pollen allergens: the influence of environmental factors, *Current Opinion in Immunology*, **13,** 709-715.

Behrendt H., Krämer U., Schäfer T., Kasche A., Eberlein-König B., Darsow U. & Ring J., 2001, Allergotoxicology – A research concept to study the role of environmental pollutants in allergy, *ACI International*, **13,** 122-128.

Berko H.N., 1999, State of knowledge report on PAHs in Australia, *Australian Government Department of the Environment and Heritage*, Perth, 1-54, on line, adresse URL:www.deh.gov.au/atmosphere/airtoxics/pubs/pahreport.pdf

Besombes J.L., Maître A., Patissier O., Marchand N., Chevron N., Stoklov M. & Masclet P., 2001, Particulate PAHs observed in the surrounding of a municipal incinerator, *Atmospheric Environment*, **35**,6093-6104.

Bewley R., Ellis B., Theile P., Viney I. & Rees J., 1989, cité par Juhasz A.L. & Naidu R., 2000.

Binet P., Portal J.M. & Leyval C., 2000, Dissipation of 3-6-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass, *Soil Biology & Biochemistry*, **32,** 2011-2017.

Bolzacchini E., Caserini S. & Maugeri M., 1998, Microinquinanti organici in atmosfera, in Il benzene e altri composti aromatici : monitoraggio e rischi per l'uomo, *Fondazione Lombardia per l'Ambiente*, Milano, 27-73.

Bordenave M., Goldberg R., Huet J.C. & Pernollet J.C., 1995, A novel protein from mung bean hypocotyls cell walls with acetyl esterase activity, *Phytochemistry*, **38**, 315-319.

Bousquet J., Demoly P., Vignola A.M., Godard P. & Michel F.B., 1999, Comprendre la maladie asthmatique, *Médecine/Sciences*, **15,** 823-832.

Brown P.J., Long S.M., Spurgeon D.J., Svendsen C. & Hankard P.K., 2004, Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Lumbricus rubellus* to pyrene, a non-carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon, *Chemosphere*, **57**, 1675-1681.

Burchiel S.W. & Luster M.I., 2001, Signaling by environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in human lymphocytes, *Clinical Immunology*, **98**, 2-10.

Cachot J., Romana L.A. & Galgani F., 1994, In vivo esterase activity in protoplasts as a bioassay of environmental quality, *Aquatic Botany*, **48**, 297-312.

Caricchia A.M., Chiavarini S. & Pezza M., 1999, Polycyclic aromatic hydrocarbons in the urban atmospheric particulate matter in the city of Naples (Italy), *Atmospheric Environment*, **33**, 3731-3738.

Cashikar A.G., Kumaresan R. & Rao N.M., 1997, Biochemical characterization and subcellular localization of the red kidney bean purple acid phosphatase, *Plant Physiology*, **114**, 907-915.

C.E.A.E.Q. Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec, 2002, Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie, on line, adresse URL: www.menv.gouv.qc.ca/ceaeq/accreditation/dr-12-vcm-2002.pdf.

Cerceau-Larrival M.Th., Bocquel C., Carbonnier-Jarreau M.C. & Verhille A.M., 1996, Pollen : bio-indicator of pollution, *Journal of Aerosol Science*, **27**, 227-228.

Chase M.W., 2001, Angiosperms, *Encyclopedia of Life Sciences*, Nature Publishing Group, on line, adresse URL: www.els.net.

Chehregani A., Majde A., Moin M., Gholami M., Shariatzadeh M.A. & Nassiri H., 2004, Increasing allergy potency of *Zinnia* pollen grains in polluted areas, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **58**, 267-272.

Cincinelli A., Mandorlo S., Dickhut R.M. & Lepri L., 2003, Particulate organic compounds in the atmosphere surrounding an industrialised area of Prato (Italy), *Atmospheric Environmental*, **37**, 3125-3133.

Cirkovic T.D., Gavrovic-Jankulovic M.DJ., Bukilica M.N., Mandic L., Petrovic S.Z. & Jankov R.M., 2002, Isolation and partial characterization of an acid phosphatase from *Artemisia vulgaris* pollen extract, *Journal of the Serbian Chemical Society*, **67,** 567-572.

CITEPA, 2004, on line, adresse URL: www.citepa.org/emissions/nationale/Pop/pop_hap.htm, contrôlé le 2/07/2004.

Collin P. & Badot P.M., 1997, Le point des connaissances relatives à la croissance et au développement du Frêne commun (*Fraxinus excelsior* L.), *Acta Botanica Gallica*, **144**, 253-267.

Cotelle S. & Ferard J.F., 1996, Effects of algae frozen at different temperatures on chronic assessment endpoints observed with *Daphnia magna*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **33**, 137-142.

Crescimanno F.G., Germanà M.A., Melati M.R. & Orecchio S., Diversità di risposta del polline di pompelmo agli eventi citotossici, 1999, *Notiziario Allergologico*, **18,** 38-43.

D'Amato G., 2000, Urban air pollution and plant-derived respiratory allergy, *Clinical and Experimental Allergy*, **30,** 628-636.

Davies R.J., Rusznak C. & Devalia J.L., 1998, Why is allergy increasing? – Environmental factors, *Clinical and Experimental Allergy*, **28,** 8-14.

De Carvalho V.M., Marquez R.M., Lapenta A.S. & Machado M.P.S., 2003, Functional classification of esterases from leaves of *Aspidosperma polyneuron* M. Arg. (Apocynaceae), *Genetics and Molecular Biology*, **26,** 195-198.

Deysson G., 1979, Organisation et classification des plantes vasculaires, 2ème partie Systématique, Société D'Edition D'Enseignement Supérieur (SEDES), Paris.

Donadieu Y., 1987, Le pollen, thérapeutique naturelle, Maloine S.A. editeur, Paris.

Duchateau J., 1998, Allergies et environnement, *Revue Médicale de Bruxelles*, **19**, A355-A357.

Du Four V.A., Van Larebeke N. & Janssen C.R., 2004, Genotoxic and mutagenic activity of environmental air sample in Flanders, Belgium, *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **558**, 155-167.

Eisler R., 2000, Polycyclic aromatic hydrocarbons, in *Handbook of Chemical Risk Assessment: Health Hazards to Humans, Plants, and Animals*, chapitre 25, **Vol. 2,** Lewis Publisher/CRC Press.

Ellis B., Harold P. & Kronberg H., 1991, cité par Juhasz A.L. & Naidu R., 2000.

Environmental Health Criteria 202, 1998, Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons, United Nations Environment Programme, on line, adresse URL : www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc202.htm

Feng H., An L., Tan L., Hou Z. & Wang X., 2000, Effect of enhanced ultraviolet-B radiation on pollen germination and tube growth of 19 taxa in vitro, *Environmental and Experimental Botany*, **43**, 45-53.

Finizio A., Mackay D., Bidleman T. & Harner T., 1997, Octanol-air partition coefficient as a predictor of partitioning of semi-volatile organic chemicals to aerosols, *Atmospheric Environment*, **31**, 2289-2296.

Franchi G.G., Franchi G. & Giorni G., 1983, Influenza sul polline dell'inquinamento atmosferico da piombo, *Bollettino Chimico Farmaceutico*, **122,** 589-597.

Freer-Smith P.H., Holloway S. & Goodman A., 1997, The uptake of particulates by an urban woodland: site description and particulate composition, *Environmental Pollution*, **95**, 27-35.

Furness C.A. & Rudall P.J., 2004, Pollen aperture evolution – a crucial factor for eudicot success?, *Trends in Plant Science*, **9**, 154-158.

Gahan P.B., 1984, Plant histochemistry and cytochemistry, an introduction, Academic Press, London.

Gao Y. & Zhu L., 2004, Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils, *Chemosphere*, **55**, 1169-1178.

Garrec J.P., Henry C. & Le Maout L., 1995, Cires epi-et intracuticulaires : étude de leur séparation, de leurs caractéristiques chimiques et de leurs rôles respectifs dans la perméabilité cuticulaire, *Environmental and Experimental Botany*, **35**, 399-409.

Gentile A.G., Vaughan A.W. & Pfeiffer D.G., 1973, cité par Kristen U., 1997.

Gentile A.G., Vaughan A.W. & Pfeiffer D.G., 1978, cité par Kristen U., 1997.

Gerdol R., Bragazza L., Marchesini R., Medici A., Pedrini P., Benedetti S., Bovolenta A. & Coppi S., 2002, Use of moss (*Tortula muralis* Hedw.) for monitoring organic and inorganic air pollution in urban and rural sites in Northern Italy, *Atmospheric Environment*, **36**, 4069-4075.

Glikson M., Rutherford S., Simpson R.W., Mitchell C.A. & Yago A., 1995, Microscopic and submicron components of atmospheric particulate matter during high asthma periods in Brisbane, Queensland, Australia, *Atmospheric Environment*, **29**, 549-562.

Guglielmino N., Liberman M., Catesson A.M., Mareck A., Prat R., Mutaftschiev S. & Goldberg R., 1997, Pectin methylesterases from poplar cambium and inner bark: localization, properties and seasonal changes, *Planta*, **202**, 70-75.

Guidotti M., Stella D., Owczarek M., De Marco A. & De Simone C., 2003, Lichens as polycyclic aromatic hydrocarbon bioaccumulators used in atmospheric pollution studies, *Journal of Chromatography A*, **985,** 185-190.

Handique A.K. & Baruah M., 1995, Histochemical estimation of pollen viability following exposure to heavy metals, *Journal of Environmental Biology*, **16,** 163-165.

Harner T. & Mackay D., 1995, Measurement of octanol-air partition coefficients for Chlorobenzenes, PCBs, and DDT, *Environmental Sciences and Technology*, **29**, 1599-1606.

Henner P., Schiavon M., Druelle V. & Lichtfouse E., 1999, Phytotoxicity of ancient gaswork soils. Effets of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on plant germination, *Organic Geohemistry*, **30**, 963-969.

Holoubek I., Korinek P., Seda Z., Schneiderova E., Holoubkova I., Pacl A., Triska J., Cudlin P. & Caslavsky J., 2000, The use of mosses and pine needles to detect persistent organic pollutants at local and regional scales, *Environmental pollution*, **109,** 283-292.

Horstmann M. & Mclachlan M.S., 1998, Atmospheric deposition of semivolatile organic compounds to two forest canopies, *Atmospheric Environment*, **32**, 1799-1809.

Howsam M., Jones K.C. & Ineson P., 2000, PAHs associated with the leaves of three deciduous tree species. I – Concentration and profiles, *Environmental Pollution*, **108,** 413-424.

Howsam M., Jones K.C. & Ineson P., 2001, PAHs associated with the leaves of three deciduous tree species. II: uptake during a growing season, *Chemosphere*, **44,** 155-164.

IARC, 1987, Overall evaluations of carcinogenicity : an updating of IARC monograph. In IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Vol. 1- 42, *International Agency for Research on Cancer*, Lyon, France.

Ibrahim H., Pertl H., Pittertschatscher K., Fadl-Allah E., El-Shahed A., Bentrup F.W. & Obermeyer G., 2002, Release of an acid phosphatase activity during lily pollen tube growth involves components of the secretory pathway, *Protoplasma*, **219,** 176-183.

Ignesti G., Lodovici M., Dolara P., Lucia P. & Grechi D., 1992, cité par Slaski *et al.*, 2000.

IRIS, 1999, Integrated Risk Information System, on line, adresse URL: http://cfpub.epa.gov/iris/compare.cfm

Ishizaki T., Koizumi K., Ikemori R. *et al.*, 1987, cité par Davies *et al.*, 1998.

Janeway C.A. & Travers P., 1997, Immunobiologie, 2ème édition, De Boeck & Larcier, Paris.

Johansson S.G.O., Hourihane J. O'B, Bousquet J., Bruijnzeel-Koomen C., Dreborg S., Haahtela T., Kowalski M.L., Mygind N., Ring J., van Cauwenberge P., van Hage-Hamsten M. & Wüthrich B., 2004, Révision de la nomenclature de l'allergie (version longue). Prise de position de l'EAACI par le groupe de l'EAACI chargé de la nomenclature. Revision of the nomenclature of allergy (complete version), *Revue Française d'Allergie et d'Immunologie Clinique*, **44**, 218-230.

Jones K.C., Stratford J.A., Waterhouse K.S., Furlong E.T., Glger W., Hites R.A., Schaffner C. & Johnston A.E., 1989a, Increases in the polynuclear aromatic hydrocarbon content of an agricultural soil over the last century, *Environmental Sciences and Technology,* **23**, 95-101.

Jones K.C., Stratford J.A., Waterhouse K.S. & Vogt N.B., 1989b, Organic contaminants in Welsh soils : polynuclear aromatic hydrocarbon, *Environmental Sciences and Technology,* **23**, 540-550.

Juhasz A.L. & Naidu R., 2000, Bioremedation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo(a)pyrene, *International Biodeterioration & Biodegradation*, **45,** 57-88.

Katz A.K., Carrell H.L.& Glusker J.P., 1998, Dibenzo(a,l)pyrène (dibenzo(def,p)chrysene): fjord-region distorsion, *Carcinogenesis*, **19**, 1641-1648.

Kaupp H. & McLachlan S., 1999, Gas/Particle partitioning of PCDD/Fs, PCBs, PCNs and PAHs, *Chemosphere*, **38**, 3411-3421.

Kerstiens G., 2001, Plant cuticle, *Encyclopedia of Life Sciences*, Nature Publishing Group, on line, adresse URL: www.els.net.

Khalili N.R., Scheff P.A. & Holsen T.M., 1995, PAH source fingerprints for coke ovens, diesel and gasoline engines, highway tunnels, and wood combustion emissions, *Atmospheric Environment*, **29**, 533-542.

Khun A., Ballach H.J.& Witting R., 1998, cité par par Slaski *et al.*, 2000.

Kipopoulou A.M., Manoli E. & Samara C., 1999, Bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables grown in an industrial area, *Environmental Pollution*, **106**, 369-380.

Knox B. & Suphioglu C., 1996, Environmental and molecular biology of pollen allergens, *Trends in Plant Science*, **1**, 156-164.

Kogevinas M., Anto J.M., Sunyer J., Tobias A., Kromhout H., Burney P., and the European Community Respiratory Health Survey Study Group, 1999, Occupational asthma in Europe and other industrialised areas: a population-based study, *Lancet*, **353**, 1750-1754.

Kristen U., 1997, Use of higher plants as screen for toxicity assessment, *Toxicology in Vitro*, **11**, 181-191.

Kummerova M. & Kmentova E., 2004, Photoinduced toxicity of fluoranthene on germination and early development of plant seedling, *Chemosphere*, **56**, 387-393.

Laaidi K., 2000, Synergie entre pollens et polluants chimiques de l'air : les risques croisés, *Environnement, Risques & Santé*, **1,** 42-49.

Lane D.A., 1989, The fate of polycyclic aromatic compounds in the atmosphere and during sampling, in *Chemical Analysis of Polycyclic Aromatic Compounds*, ed. Tuan Vo-Dinh.

Lodovici M., Dolara P., Taiti S., Del Carmine P., Bernardi L., Agati L. & Ciappellano S., 1994, Polynuclear aromatic hydrocarbons in the leaves of the evergreen tree *Laurus nobilis*, *The Science of the Total Environment*, **153,** 61-68.

Lodovici M., Akpan V., Casalini C., Zappa C. & Dolara P., 1998, Polycyclic aromatic hydrocarbons in *Laurus nobilis* leaves as a measure of air pollution in urban and rural sites of Tuscany, *Chemosphere*, **36,** 1703-1712.

Lombardo M., Melati R.M. & Orecchio S., 2001, Assessment of the quality of the air in the city of Palermo through chemical and cell analyses on *Pinus* needles, *Atmospheric Environment*, **35,** 6435-6445.

Lorenzoni-Chiesura F., Giorato M. & Marcer G., 2000, Allergy to pollen of urban cultivated plants, *Aerobiologia*, **16,** 313-316.

Ma T.H. & Khan H., 1976, Pollen mitosis and pollen tube growth inhibition by SO_2 in cultured pollen tubes of *Tradescantia*, *Environmental Research*, **12,** 144-149.

Macaluso A., 1998, Idrocarburi Polinucleari Aromatici nelle foglie di *Olea europaea* L. Dosaggi ed effetti citologici. Valutazione della qualità dell'aria nella zona di Palermo, mémoire de maîtrise en Sciences Biologique, Université de Palermo, 64 p.

Macaluso A., Melati M.R. & Orecchio S., 2000, The use of leaves of *Olea europaea* L. as passive samplers for polycyclic aromatic hydrocarbons. Assessment of the quality of the air in Palermo. *Annali Chimica*, **90,** 83-90.

Maila M.P.& Cloete T.E., 2002, Germination of *Lepidum sativum* as a method to evaluate polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHSs) removal from contaminated soil, *International Biodeterioration & Biodegradation*, **50**, 107-113.

Maier R., 1978, cité par Soukupova *et al.*, 2002.

McLachlan M.S., 1999, Framework for the interpretation of measurements of SOCs in plants, *Environmental Sciences and Technology*, **33**, 1799-1804.

Meharg A.A., Wright J., Dyke H. & Osborn D., 1998, Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dispersion and deposition to vegetation and soil following a large scale chemical fire, *Environmental Pollution*, **99**, 29-36.

Melati M.R., 1996, Iquinamento ambientale da piombo, *Notiziario Allergologico*, **15**, 111-114.

Melati M.R. & Alaimo M.G., 2001, Passive biomonitoring of atmospheric particulate by woody and herbaceous plant pollens, *European Journal of Histochemistry*, **45**, 61.

Menzie C.A., Potocki B.B. & Santodonato J.,1992, Exposure to carcinogenic PAHs in the environment, *Environmental Sciences and Technology*, **26**, 1278-1284.

Micieta K. & Murin G., 1997, The use of *Pinus sylvestris* L. and *Pinus nigra* Arnold as bioindicator species for environmental pollution, in *Cytogenetic studies of forest trees and shrub species*, Borzan & Schlarbaum, Croatian Forests, Inc., Zagreb, 253-263.

Micieta K. & Murin G., 1998, Three species of genus *Pinus* suitable as bioindicators of polluted environment, *Water, Air, and Soil Pollution*, **104**, 413-422.

Migaszewski Z.M., Galuszka A. & Paslawski P., 2002, Polynuclear aromatic hydrocarbons, phenols, and trace metals in selected soil profiles and plant bioindicators in the Holy Cross Mountains, South-Central Poland, *Environment International*, **28**, 303-313.

Monarca S., Ferretti D., Zanardini A., Moretti M., Villarini M., Spiegelhalder B., Zerbini I., Gelatti U. & Lebbolo E., 2001, Monitoring airborne genotoxicants in the rubber industry using genotoxicity tests and chemical analyses, *Mutation Research*, **490,** 159-169.

Monn C. & Koren H.S., 1999, Bioaerosols in ambient air particulates: a review and research needs, *Reviews on Environmental Health*, **14,** 79-89.

Moore J., Bamforkh C.W., Kroon P. A. & Bartolome B., 1996, cité par Soukupova *et al.*, 2002.

Nakajima D., Yoshida Y., Suzuki J. & Suzuki S., 1995, Seasonal changes in the concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Azalea* leaves and relationship to atmospheric concentration, *Chemosphere*, **30,** 409-418.

Nielsen T., 1996, Traffic contribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the center of a large city, *Atmospheric Environment*, **30,** 3481-3490.

Odabasi M., Vardar N., Sofuoglu A., Tasdemir Y. & Holsen T.M., 1999, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Chicago air, *The Science of the Total Environment*, **227,** 57-67.

Olczak M., Watorek W. & Morawiecka B., 1997, Purification and characterization of acid phosphatase from yellow lupin (*Lupinus luteus*) seeds, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1341,** 14-25.

Oleksyn J., Reich P.B., Karolewski P., Tjoelker M.G. & Chalupka W., 1999, Nutritional status of pollen and needles of diverse *Pinus sylvestris* populations grown at sites with contrasting pollution, *Water, Air, and Soil Pollution* **110,** 195-212.

Onuska F.I., 1989, Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples, in *Analysis of Trace Organics in the Aquatic Environment*, B.K. Afghan & A.S.Y. Chau, Boca Raton, Florida, 206-237.

Otvos E., Kozak I.O., Fekete J., Sharma V.K. & Tuba Z., 2004, Atmospheric deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mosses (*Hypnum cupressiforme*) in Hungary, *Sciences of the Total Environment*, **330**, 89-99.

Panara F., Pasquilini S. & Antonielli M., 1990, Multiple forms of barley root acid phosphatase: purification and some characteristics of the major cytoplasmic isoenzyme, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1037,** 73-80.

Pasquilini S., Panara F., Bracardi P. & Antonielli M., 1992a, High molecular weight acid phosphatase from barley coleoptiles, *Phytochemistry*, **31,** 3703-3706.

Pasquilini S., Panara F. & Antonielli M., 1992b, Acid phosphatase activity in *Pinus pinea – Tuber albidum* ectomycorrhizal association, *Canadian Journal of Botany*, **70,** 1377-1383.

Pasquilini S., Batini P., Ederli L., Panara F. & Antonielli M., 1996, Acid phosphatase isoforms in dry seeds and during seedling development in barley (*Hordeum vulgare*), *Canadian Journal of Botany*, **74,** 653-658.

Pasquilini S., Panara F., Ederli L., Batini P. & Antonielli M., 1997, Multiple acid phosphatase in barley coleoptiles. Isolation and partial characterization of the 63 kDa soluble enzyme form, *Plant Physiology and Biochemistry*, **35,** 95-101.

Pauli G., Papanikolaou I. & Niederberger V., 2003, Sensibilisation au frêne : allergènes spécifiques et/ou allergènes croissants ?, *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, **43,** 120-124.

Pavlic M. & Jandurova O.M., 2000, Fungicides cytotoxicity expressed in male gametophyte development in *Brassica campestris* after in vitro application of converted field doses, *Environmental and Experimental Botany*, **44,** 49-58.

Pichler C., 2004, Allergie aux acariens de la poussière de maison, Centre suisse pour l'allergie, la peau et l'asthme, Berne, on line, adresse URL : www.ahaswiss.ch/download/aha_hausstaubm_f_04.pdf

Pretova A., Obert B., Hajduch M. & Gregova E., 2001, Total protein and isozyme characterization in the flax zygotic embryo during development, *Sex Plant Reproduction*, **13,** 329-334.

Rameau J.C., Mansion D., Dumé G., Timbal J., Lecointe A., Dupont P. & Keller R., 1989, Flore forestière française, guide écologique illustré, 1 plaines et collines, Institut pour le développement forestier, Ministère de l'agricoulture et de la forêt : direction de l'espace rural et de la forêt, école nationale du génie rural des eaux et de forêts.

Raynal-Roques A., 1994, La botanique redécouverte, BELIN/ INRA éditions.

Ring J., Krämer U., Schäfer T. & Behrendt H., 2001, Why are allergies increasing?, *Current Opinion in Immunology*, **13,** 701-708.

RNSA, on line, adresse URL : www.rnsa.asso.fr

Rodriguez-Garcia M.I., M'rani-Alaoui M. & Fernandez M.C., 2003, Behavior of storace lipids during development and germination of olive (*Olea europaea* L.) pollen, *Protoplasma*, **221,** 237-244.

Roitt I., Brostoff J. & Male D., 1997, Immunologie, 4ème édition, De Boeck & Larcier, Paris.

Rojo – Camargo, M.C. & Toledo M.C.F., 2003, Polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian vegetables and fruits, *Food Control*, **14,** 49-53.

Sant-Denis M., Narbonne J.F., Arnaud C., Thybaud E. & Ribera D., 1999, Biochemical responses of the earthworm Eisena fetida andrei exposed to contaminated artificial soil: effects of benzo(a)pyrene, *Soil Biology and Biochemistry*, **31,** 1837-1846.

Schoene K., Franz J.-Th. & Masuch G., 2004, The effect of ozone on pollen development in *Lolium perenne* L., *Environmental Pollution,* **131,** 347-354.

Shirazi A.M. & Muir P.S., 1998, In vitro effect of formaldehyde on Douglas fir pollen, *Plant, Cell and Environment*, **21**, 341-346.

Schwartz D., 1969, Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologists, 3ème édition, Flammarion Médecine-Sciences, Paris.

Simonich S.L. & Hites R.A., 1994a, Importance of vegetation in removing polycyclic aromatic hydrocarbons from the atmosphere, *Nature*, **370,** 19-51.

Simonich S.L. & Hites R.A., 1994b, Vegetation-atmosphere partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Environonmental Sciences and Technology.*, **28,** 939-943.

Simonich S.L. & Hites R.A., 1995, Organic pollutant accumulation in vegetation, *Environonmental Sciences and Technology*, **29,** 2905-2914.

Slaski J.J. & Archambauld D.J., Li X., 2000, Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) accumulation in plants. The potential use of PAH accumulation as a marker of exposure to air emissions from oil and gas flares, *Air Research Users Group, Alberta Environment*, Edmonton, Alberta, 1-25, on line, adresse URL: www3.gov.ab.ca/env/protenf/publications/pahaccuinplantsaug00.pdf

Smith K.E.C. & Jones K.C., 2000, Particles and vegetation: implications for the transfer of particle-bound organic contaminants to vegetation, *The Science of the Total Environment*, **264,** 207-236.

Smith K.E.C., Thomas G.O. & Jones K.C., 2001, Seasonal and species differences in the air-pasture transfer of PAHs, *Environonmental Sciences and Technology*, **35,** 2156-2165.

Soukupova J., Albrechtova J., Svobodova H. & Opatrna J., 2002, Anatomical and histochemical changes of Norway spruce buds induced by simulated acid rain, *Biologia Plantarum*, **45,** 77-84.

Stransky K., Valterova I. & Fiedler P., 2001, Nonsaponifiable lipid components of pollen of elder (*Sambucus nigra* L.), *Journal of Chromatography A*, **936,** 173-181.

Suphioglu C., Blaher B., Rolland J.M., McCluskey J., Schäppi G., Kenrick J., Singh M.B. & Knox R.B., 1998, Molecular basis of IgE-recognition of Lol p 5, a major allergen of rye-grass pollen, *Molecular Immunology*, **35,** 293-305.

Thomas W., Rühling A. & Simon H., 1984, Accumulation of airborne pollutants (PAH, chlorinated hydrocarbons, heavy metals) in various plant species and humus, *Environmental Pollution (series A)*, **36,** 295-310.

Thomas W. & Simon H., 1985, Classification of plant species by their organic (PAH, PCB, BHC) and inorganic (heavy metals) trace pollutant concentration, *The Science of the Total Environment*, **46,** 83-94.

Tomaniova M., Hajslova J., Pavelka J. Jr., Kocourek V., Holadova K. & Klimova I., 1998, Microwave-assisted solvent extraction – a new method for isolation of polynuclear aromatic hydrocarbons from plants, *Journal of Chromatography A*, **827,** 21-29.

Tremolada P., Burnett V., Calamari D. & Jones K.C., 1996, Spatial distribution of PAHs in the U.K. atmosphere using pine needles, *Environonmental Sciences and Technology*, **30,** 3570-3577.

Tuhackova J., Cajthaml T., Novak K., Novotny C., Mertelik J. & Sasek V., 2001, Hydrocarbon deposition and soil microflora as affected by highway traffic, *Environmental pollution*, **113,** 255-262.

Twell D., 2001, Pollen: structure, development and function, *Encyclopedia of Life Sciences*, Nature Publishing Group, on line, adresse URL: www.els.net.

Venkataraman C., Thomas S. & Kulkarni P., 1999, Size distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons – gas/ particle partitioning to urban aerosols, *Journal of Aerosol Science*, **30,** 759-770.

Vithanage H.I.M.V. & Knox R.B., 1976, Pollen-wall proteins: quantitative cytochemistry of the origins of intine and exine enzymes in *Brassica oleracea*, *Journal of Cell Science*, **21,** 423-435.

Vo-Dinh T., 1989, Chemical analysis of polycyclic aromatic compounds, in *Chemical Analysis, a series of monographs on analytical chemistry and its applications*, John Wiley & Sons, U.S.A.

Wagrowski D.M. & Hites R.A., 1997, Polycyclic aromatic hydrocarbon accumulation in urban, suburban, and rural vegetation, *Environonmental Sciences and Technology*, **31,** 279-282.

Walsh P., El Adlouni C., Nadeau D., Fournier M., Coderre D. & Poirier G.G., 1997, DNA adduct in earthworms exposed to a contaminated soil, *Soil Biology and Biochemistry*, **29,** 721-724.

Webber J.E., 1991, Interior spruce pollen management manual, *Land Management Report*, British Columbia, Ministry of Forest, Victoria, **70,** 1-25

Weiland S.K., von Mutius E., Hirsch T., Duhme H., Fritzsch C., Werner B., Husing A., Stender M., Renz H., Leupold W. & Keil U., 1999, Prevalence of respiratory and atopic disorders among children in the East and West of Germany five years after unification, *European Respiratory Journal*, **14,** 862-870.

Wenzel K.D., Weibflog L., Paladini E., Gantuz M., Guerreiro P., Puliafito C. & Schüürmann G., 1997, Immission patterns of airbone pollutants in Argentina and Germany II. Biomonitoring of organochlorine compounds and polycyclic aromatics, *Chemosphere*, **34,** 2505-2518.

White D.H. & Hardy J.W., 1994, cité par Eisler R., 2000.

Wilcke W., Zech W. & Kobza J., 1996, PAH-pools in soils along a PAH-deposition gradient, *Environmental pollution*, **92,** 307-313.

Wild S.R. & Jones K.C., 1995, Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget, *Environmental pollution*, **88**, 91-108.

Zhang C. & McManus M.T., 2000, Identification and characterisation of two distinct acid phosphatases in cell walls of roots of white clover, *Plant Physiology and Biochemistry*, **38**, 259-270.

Zhu L. & Gao Y., 2004, Prediction of phenanthrene uptake by plants with a partition – limited model, *Environmental Pollution*, **131**, 505-508.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Listes des espèces citées dans le texte

Nom latin	Nom commun
Acer saccarum	Erable à sucre
Artemisia vulgaris	Armoise vulgaire
Brassica campestris	Navette
Cajanas cajan	Pois d'Angola
Citrus paradisi	Pamplemousse
Cupressus sempervirens	Cyprès
Fagus sylvatica	Hêtre
Fraxinus excelsior	Frêne commun
Hordeum vulgare	Orge
Laurus nobilis	Laurier
Lilium longiflorum	Lys de Pâques
Lolium perenne	Ray grass
Lycopericum esculentum	Tomate
Melothria pendula	Concombre de Guadeloupe
Olea europaea	Olivier d'Europe
Phaseolus vulgaris	Haricot
Picea abies	Epicéa commun
Pinus nigra	Pin noir
Pinus pinea	Pin parasol
Pinus sylvestris	Pin sylvestre
Pinus strobus	Pin blanc
Pisum sativum	Pois
Plantago major	Plantain majeur
Populus euramericana	Peuplier euraméricains
Pseudotsuga menziesii	Sapin de Douglas
Quercus robur	Chêne pédonculé
Quercus ilex	Chêne vert

Rhododendron oomurasaki	Azalée
Sambucus nigra	Sureau
Tradescantia	Misère
Trifolium repens	Trèfle blanc
Tuber albidum	Truffe
Zea maïs	Maïs

ANNEXE 2 : ***Fraxinus excelsior*** **: fleur**



A



B



C



D



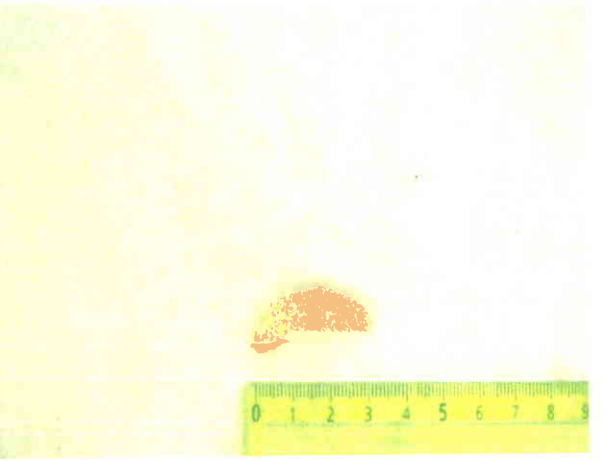
E

Inflorescences mâle (A) et femelle (B) de *Fraxinus excelsior*
étamines de couleur pourpre encore fermée (C,D) et libérant le pollen (E).

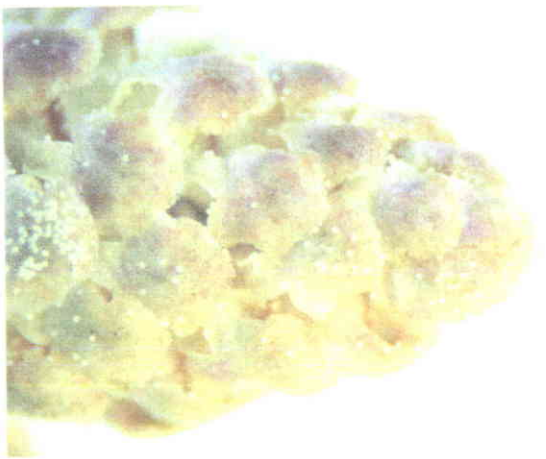
ANNEXE 3 : *Pinus nigra* : fleur



A



B



C



D

Inflorescence mâle (A) de *Pinus nigra* : les fleurs sont réunies en cônes (B) formés de petites écailles (C) contenant les grains de pollen.
D : coupe transversale d'un cône.

ANNEXE 4 : ***Fraxinus excelsior*** **: site d'échantillonnage George**





ANNEXE 5 : *Pinus nigra* : site d'échantillonnage A31





Pinus nigra : site d'échantillonnage Mozart





ANNEXE 6 : chromatogramme de 16 HAP

