Influence de la pollution atmosphérique sur les composés phénoliques du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) en région péri-marseillaise



ROBLES C., GREFF S., PASQUALINI V., GARZINO S.,
BOUSQUET-MELOU A., DUPOUYET S., BONIN G.

Janvier 2002

imep

UMR 6116

Région Provence-Alpes-Côte d'Azur

Influence de la pollution atmosphérique sur les composés phénoliques du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) en région péri-marseillaise

****

Travail commandé et financé par :
Conseil Régional PACA, ARPE, Hôtel de la région, 27, pl. Jules Guesdes, 13481 Marseille Cedex 20

à :
Université de Provence, Institut Méditerranéen d'Ecologie et de Paléoécologie UMR 6116, Laboratoire de Biosystématique et Ecologie Méditerranéenne, Case 421 bis, Av. Escadrille Normandie Niemen, 13397 Marseille, Cedex 20

****

Ce travail doit être cité sous la forme :

Robles C., Greff S., Pasqualini V., Garzino S., Bousquet-Mélou A., Dupouyet S., Bonin G., 2002. Influence de la pollution atmosphérique sur les composés phénoliques du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) en région péri-marseillaise. Contrat Conseil Régional PACA / LBEM, LBEM Edit., Marseille, Fr. : 35 p.

SOMMAIRE

1 INTRODUCTION 5

1.1 LA BIO-INDICATION : CONCEPTS ET MÉTHODES 5
1.2 POLLUTION ATMOSPHÉRIQUE 6
1.3 CADRE CONCEPTUEL DE L'ÉTUDE 7

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES 10

2.1 CARACTÉRISTIQUES DES STATIONS D'ÉTUDE ET PRÉLÈVEMENTS DES ÉCHANTILLONS 10
2.2 CONCENTRATIONS EN POLLUANTS ATMOSPHÉRIQUES 11
2.3 DOSAGE DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES TOTAUX 12
2.4 EXTRACTION ET DOSAGE DES FLAVONOIDES 13
2.4.1 EXTRACTION DES FLAVONOIDES 13
2.4.2 DOSAGE DES PROANTHOCYANIDINES TOTALES 13
2.4.3 DOSAGE DES FLAVONOLS TOTAUX 13
2.4.4 IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION DES FLAVONOLS INDIVIDUELS 14
2.5 TRAITEMENTS STATISTIQUES 14

3 RÉSULTATS 16

3.1 QUALITÉ DE L'AIR DES STATIONS D'ÉTUDE 16
3.2 LES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES TOTAUX 16
3.2.1 LES PHÉNOLS TOTAUX 17
3.2.2 LES PROANTHOCYANIDINES TOTALES 18
3.2.3 LES FLAVONOLS TOTAUX 19
3.2.4 ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES 21
3.3 LES FLAVONOLS 22
3.3.1 IDENTIFICATION 22
3.3.2 QUANTIFICATION 23

4 DISCUSSION ET CONCLUSION 26

4.1 IMPACT DE LA POLLUTION ATMOSPHÉRIQUE SUR LES PHÉNOLS TOTAUX, LES PROANTHOCYANIDINES ET LES FLAVONOLS TOTAUX 26
4.2 IMPACT DE LA POLLUTION ATMOSPHÉRIQUE SUR LES FLAVONOLS INDIVIDUELS 29
4.3 INDICATEURS BIOLOGIQUES 30

5 BIBLIOGRAPHIE 32

1 INTRODUCTION

1.1 La bio-indication : concepts et méthodes

La bio-indication est définie comme la **mise en évidence de l'impact des facteurs environnementaux sur des organismes animaux ou végétaux**. Elle permet d'appréhender l'action globale des polluants et de rendre compte des effets à long terme d'un degré de pollution peu élevé. En effet, la réponse des organismes reflète les effets complexes des substances nocives, non seulement en montrant les **effets synergiques** de ces substances mais également en intégrant le **facteur temps** (Rossbach *et al.*, 1999). A ce titre, elle constitue donc une investigation complémentaire aux analyses chimiques directes des polluants qui peuvent parfois poser des problèmes techniques importants et se révéler très onéreuses. Par ailleurs, le succès de la bio-indication s'explique également par le fait que le bio-indicateur appréhende l'exposition et les effets des polluants à la fois pour les organismes cibles (animaux et/ou végétaux) et pour l'homme (Burger & Gochfeld, 2001). Ils permettent donc d'évaluer **l'impact sur la santé humaine et sur les systèmes biologiques, *i.e.* les écosystèmes.**

C'est pourquoi, depuis les premières études sur la bio-indication réalisées dans les années 1960, son utilisation s'est considérablement développée et élargie (Conti & Cecchetti, 2001). La bio-indication est aujourd'hui utilisée pour des problèmes environnementaux touchant les trois compartiments de l'écosphère : eau, sol et atmosphère. Elle fait donc appel à des organismes très variés et propres au milieu considéré. En raison de leur mobilité, les animaux se prêtent moins à ce type d'étude. Parmi les plantes, les végétaux supérieurs (notamment conifères et plantes à fleur) ont l'avantage d'être de loin les plus répandus, de constituer l'essentiel en densité et en nombre d'espèces des écosystèmes terrestres. Par ailleurs, ils représentent le premier maillon de la chaîne alimentaire et participent très activement au fonctionnement des écosystèmes.

Les méthodes de diagnostic sont très diverses et peuvent se situer à des niveaux d'observation variables : prise en compte de l'absence ou de la présence d'espèces déterminées, de leur morphologie, de symptômes délétères externes, comme par exemple des nécroses ou des perturbations de la croissance et du développement (Impens & Delcarte, 1995) ou de modifications physiologiques internes (Rossbach *et al.*, 1999). Dans ce dernier cas, on prend en compte la mesure de certains composés chimiques contenus dans le végétal, révélateurs d'une situation particulière du milieu. Parmi les composés chimiques présents au niveau des plantes, les métabolites secondaires jouent un rôle crucial dans les relations entre la plante et son environnement (Beart *et al.*, 1985 ; Hagerman & Robbins, 1987 ; Haslam, 1989 ; Rhodes, 1994 ; Waterman & Mole, 1994 ; White, 1994 ; Macheix, 1996 ; Spaink, 1998). Ils sont déterminés au niveau qualitatif par le génome et sont donc très variables selon l'espèce

considérée, mais leur composition quantitative varie fortement en fonction des contraintes et des stress imposés par le milieu. A ce titre, ils constituent des bio-indicateurs intéressants pour l'évaluation de la qualité du milieu et l'impact des perturbations anthropiques.

1.2 Pollution atmosphérique

Les polluants émis par les activités humaines sont variables en nature mais aussi en proportions. On distingue les **polluants primaires** émis directement dans l'atmosphère et les **polluants secondaires** issus de l'évolution chimique des polluants primaires ; ils sont à l'origine de la pollution photochimique et des pluies acides.

Polluants primaires

Ce sont le dioxyde de soufre (SO_2), le dioxyde d'azote (NO_2) et les particules en suspension.

	Dioxyde de soufre	Dioxyde d'azote	Particules en suspension
Origine	Il provient de la combustion de combustibles fossiles contenant du soufre : fuels, charbon.	Il provient surtout des véhicules (environs 75%) et des installations de combustion (centrales énergétique,...).	Elles peuvent être d'origine naturelle (volcan) ou anthropique (combustion industrielle, ou de chauffage, incinération, véhicules).
Pollutions générées	En présence d'humidité, il forme de l'acide sulfurique qui contribue au phénomène des pluies acides et à la dégradation de la pierre et des matériaux de certaines constructions.	Il intervient dans le processus de formation d'ozone dans la basse atmosphère. Il contribue également au phénomène des pluies acides.	Les particules les plus fines peuvent transporter des composés toxiques dans les voies respiratoires inférieures. (sulfates, métaux lourds, hydrocarbures, ...).
Effets sur la santé	C'est un gaz irritant. Il peut déclencher des effets bronchospastiques chez l'asthmatique, augmenter les symptômes respiratoires aigus chez l'adulte (toux, gène respiratoire), altérer la fonction respiratoire chez l'enfant.	Il pénètre dans les plus fines ramifications des voies respiratoires. Il peut, dès 200 $\mu g/m^3$, entraîner une altération de la fonction respiratoire et une hyper-réactivité bronchique chez l'asthmatique et, chez les enfants, augmenter la sensibilité des bronches aux infections microbiennes.	Les plus fines particules, à des concentrations relativement basses, peuvent, surtout chez l'enfant, irriter les voies respiratoires ou altérer la fonction respiratoire. Certaines particules ont des propriétés mutagènes et cancérogènes.

Polluants secondaires

Ils sont issus de la réaction des polluants primaires dans l'atmosphère avec le rayonnement solaire qui donne l'ozone.

	Origine	Pollutions générées	Effets sur la santé
Ozone	Il résulte de la transformation photochimique de certains polluants dans l'atmosphère (dioxyde d'azote, monoxyde de carbone et COV) en présence de rayonnement ultra-violet solaire.	L'ozone est l'un des principaux polluants de la pollution dite « photo-oxydante », et contribue également indirectement aux pluies acides ainsi qu'à l'effet de serre.	C'est un gaz agressif qui pénètre facilement jusqu'aux voies respiratoires les plus fines. Il provoque, dès une exposition prolongée de 150 à 200 $\mu g/m^3$, de la toux et une altération pulmonaire, surtout chez les enfants et les asthmatiques. Les effets sont majorés par l'exercice physique et sont variables selon les individus.

L'accroissement de la population et l'intensification des activités humaines créent des sources de plus en plus importantes de pollutions. Compte tenu des graves effets de la pollution atmosphérique sur la santé humaine, il est nécessaire de mesurer et de contrôler les différents polluants libérés. De nombreux efforts ont été faits dans ce sens avec la création d'organismes ou d'associations surveillant la qualité de l'air que nous respirons.

1.3 Cadre conceptuel de l'étude

La bio-indication sur la qualité de l'air a fait l'objet de plusieurs études sur les végétaux. Nombre d'entre elles concernent les polluants solides *e.g.* métaux lourds, alcalins et alcalino-terreux, des matières en suspension dans l'air (Vasconcelos & Tavares, 1998; Rossbach *et al.*, 1999; Vassileva *et al.*, 2000; Rahman *et al.*, 2000). Pour les composés gazeux, les méthodologies les plus courantes reposent sur des expérimentations en conditions contrôlées où les polluants sont testés isolément (Peñuelas *et al.*, 1996 ; Rodrigues *et al.*, 1996). Les études réalisées en conditions naturelles restent peu nombreuses et ne concernent parfois que l'impact de l'ozone (Karlsson *et al.*, 1995; Oleksyn *et al.*, 1999; Chappelka *et al.*, 1999). Aucune d'elles n'a été réalisée en France.

C'est pourquoi nous avons, dans le cadre d'un contrat avec AIRFOBEP (association en charge de surveiller la qualité de l'air sur la partie Ouest des Bouches du Rhône), recherché un bio-indicateur fiable de la qualité de l'air (Pasqualini *et al.*, 2001). Le propos était de choisir un végétal largement répandu dans la région et pouvant être utilisé quelle que soit la période de

l'année. Le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) avait été retenu pour cette étude car il constitue l'une des essences majeures des régions méditerranéennes. En outre, il se rencontre aussi bien en milieu urbain qu'en milieu naturel, et présente des aiguilles en toute saison, contrairement aux arbres à feuilles caduques. Cet arbre a mobilisé l'attention des chercheurs depuis des décennies (Nahal, 1962 ; Serre-Bachet, 1973 ; Acherar, 1981 ; Abbas, 1983 ; Barbero *et al.*, 1987 ; Aillaud, 1990), mais sans aborder sa valeur indicatrice dans le suivi de la pollution de l'air.

Sur ce végétal, nous avons choisi de mesurer des modifications physiologiques pouvant traduire des degrés de pollution moindres que ceux engendrant l'apparition de ces symptômes externes. En particulier, les composés phénoliques, qui regroupent un vaste ensemble de substances possédant un ou plusieurs hydroxyles liés à au moins un cycle aromatique (Waterman & Mole, 1994), sont particulièrement intéressants en raison de leur rôle écologique majeur (Haslam, 1989 ; Rhodes, 1994 ; Cooper-Driver & Bhattacharya, 1998). Ils jouent aussi un rôle de protection de la plante contre les herbivores (Pisani & Distel, 1998) et sont impliqués notamment dans la réponse de la plante à des stress environnementaux, tels que le déficit en nutriments, la compétition intra et/ou interspécifiques et la pollution atmosphérique (Muzika, 1993 ; Peñuelas *et al.*, 1996). En effet, l'influence de l'action des polluants atmosphériques de type oxydatif (*e.g.* O_3, NO_2) entraîne des variations au niveau de la composition phénolique des plantes (Karolewski & Giertych, 1995). Toutefois, la plupart de ces observations ont été réalisées en milieu contrôlé et face à l'action d'un seul type de polluant (Peñuelas *et al.*, 1996).

Nous avons donc recherché si les teneurs en composés phénoliques (composés phénoliques totaux et phénols simples) pouvaient traduire les concentrations en polluants atmosphériques mesurées par AIRFOBEP, au niveau de différentes stations d'étude localisées autour de l'étang de Berre (Pasqualini *et al.*, 2001). Nos résultats ont démontré que **les teneurs en phénols totaux constituaient des bio-indicateurs fiables de la pollution atmosphérique**. En particulier, ils présentent des corrélations statistiquement significatives avec les concentrations en monoxyde d'azote et en dioxyde de soufre. Cependant, ces résultats ayant été obtenus à partir d'une seule série de prélèvements (juin 2000), **il convenait de les vérifier et de prendre en compte deux périodes de prélèvements**.

Par ailleurs, l'étude des concentrations en phénols simples a montré que plusieurs de ces composés présentaient des corrélations significatives avec l'ozone, le dioxyde de soufre, le dioxyde d'azote, le monoxyde d'azote et les autres oxydes d'azote (Pasqualini *et al.*, 2001) mais sans pour autant permettre de caractériser précisément le type de pollution. Il était donc nécessaire de **rechercher d'autres composés phénoliques plus spécifiques qui permettraient de traduire plus distinctement le type de pollution**. Parmi le vaste ensemble des composés phénoliques, les flavonoides sont des composés caractérisés au niveau structurel par deux cycles aromatiques hydroxylés reliés par un fragment à trois carbones

(Torssell, 1981). Ils peuvent constituer des bio-indicateurs intéressants puisque diverses études (Vogt *et al.*, 1991, Eckey-Kaltenbach *et al.*, 1993; Chaves *et al.*, 1993; Loponen *et al.*, 2001) ont montré leurs variations en fonction de divers stress (*e.g.* UV, ozone, herbivores, métaux lourds). Ces flavonoides regroupent diverses familles, parmi lesquelles on distingue les **flavonols** et les **proanthocyanidines** (Torssell, 1981).

Les objectifs de la présente étude visent donc à :

- affiner et valider les résultats obtenus précédemment en :
  - élargissant nos stations d'étude à la région marseillaise et péri-marseillaise
  - vérifiant les relations entre teneurs en phénols totaux et degré de pollution atmosphérique de ces sites d'études
- rechercher d'autres composés phénoliques plus sensibles et plus caractéristiques des divers types de pollution que les phénols simples. A ce titre, nous nous sommes intéressés aux concentrations totales en flavonols, aux concentrations individuelles de ces divers composés et aux concentrations totales en proanthocyanidines,
- réaliser des prélèvements à deux saisons différentes de l'année afin de comparer deux types de pollution différents : des fortes teneurs en polluants primaires (hiver) ou en polluant secondaire (été).

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 Caractéristiques des stations d'étude et prélèvements des échantillons

Six sites d'études ont été retenus pour cette expérimentation (Figure 1). Ils sont représentatifs de typologie environnementale différente : zones urbaines, zones industrielles et zones agricoles.

Trois de ces sites avaient déjà été retenus dans le cadre du travail précédent (Pasqualini *et al.*, 2001) et sont localisés dans la région de l'étang de Berre :

- à Sausset-les-Pins (zone urbaine),
- à Martigues (zone urbaine) et
- à St Rémy de Provence (zone péri-urbaine).

Ces stations sont communes aux sites de mesures d'AIRFOBEP.

Les trois autres sites sont situés :

- à l'Hôpital Ste Marguerite (dans l'agglomération marseillaise),
- aux alentours de Gardanne (zone forestière de Valabre) et
- à Cadarache (zone agricole).

Ils correspondent à des sites de mesures d'AIRMAREX.

Ces six stations ont fait l'objet d'une campagne d'échantillonnage, réalisée le **7 février 2001**. Afin d'éviter les variations dues à l'âge, les prélèvements ont été réalisés sur des individus d'environ 30 ans. L'âge de chaque individu a été préalablement déterminé sur des carottes à l'aide d'une tarière de Pressler. Pour chaque site, les aiguilles de première année sont prélevées sur six individus et à tous les niveaux de la canopée. Ces aiguilles de première année ont un peu plus de six mois.

Une deuxième campagne d'échantillonnage est réalisée le **13 juin 2001**, sur deux de ces sites d'étude à St Rémy de Provence et à Martigues, afin de connaître l'évolution des teneurs en phénols au niveau de ces mêmes aiguilles. Les prélèvements du mois de juin sont donc effectués sur des aiguilles de deuxième année. Ces aiguilles de deuxième année ont un peu plus d'un an.

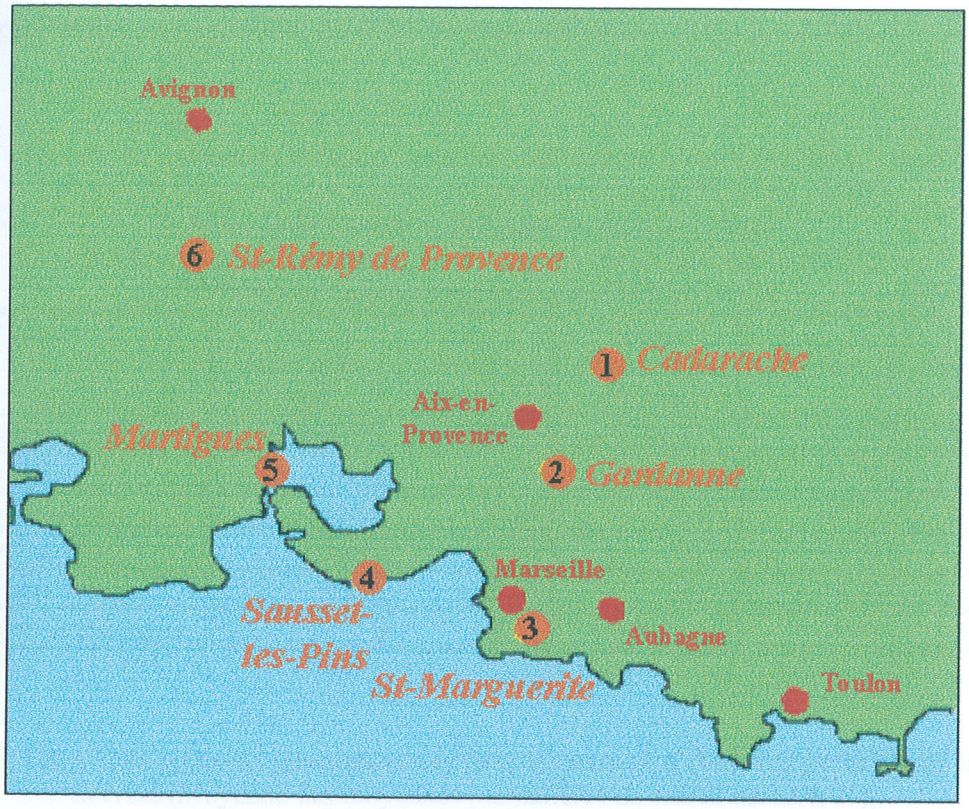


Figure 1 : Localisation des stations d'étude.

Les échantillons d'aiguilles sont transportés dans une glacière, afin d'éviter toute modification physiologique éventuelle. Ils sont ensuite séchés à l'étuve à 40°C pendant une semaine. Les aiguilles sont broyées et conservées à l'obscurité, à température ambiante.

2.2 Concentrations en polluants atmosphériques

Les mesures des polluants atmosphériques sont réalisées par AIRMAREX et AIRFOBEP : deux associations en charge d'évaluer la qualité de l'air respectivement dans les régions d'Aix-Marseille et de l'étang de Berre. Chaque polluant atmosphérique est mesuré tous les quarts d'heure. En fonction des activités anthropiques présentes dans le secteur étudié, cinq types de polluants ont été considérés dans le cadre de cette étude (Tableau I et Tableau II).

Les teneurs de chacun des polluants correspondent à la moyenne des teneurs quotidiennes entre le 16 décembre 2000 au 7 février 2001 (Tableau I) et entre le 1 mai 2001 et 13 juin 2001 (Tableau II). Dans certain site, l'absence de données a nécessité l'utilisation de données historiques (Tableau I et Tableau II). Pour le site de Cadarache, AIRMAREX n'a pu indiquer

qu'une valeur indicative pour le dioxyde de soufre. Pour le site de St Rémy de Provence, à l'exception de l'ozone qui est mesurée toute l'année, les valeurs concernant les autres polluants proviennent uniquement de prélèvements réalisés en période estivale.

Tableau I : Teneurs en polluants atmosphériques dans les stations d'étude (en $\mu g/m^3$) pour la période hivernale (Moyenne des moyennes journalières du 16/12/00 au 7/2/01);
* : Monoxyde d'azote et dioxyde d'azote non compris ;
** Moyenne des moyennes journalières du 16/12/1997 au 7/2/1997;
*** valeur moyenne indiquée par AIRMAREX

Stations	NO (Monoxyde d'azote)	NO_X (Oxydes d'azote) *	NO_2 (Dioxyde d'azote)	O_3 (Ozone)	SO_2 (Dioxyde de soufre)
N°1 : Cadarache	4,49**	13,82**	14,27**	37,90	2,30***
N°2 : Gardanne	3,11	13,55	15,70	31,70	14,53
N°3 : Ste Marguerite	13,09	30,96	27,153	40,24	6,85
N°4 : Sausset-les-Pins	2,14	11,70	13,78	43,59	18,70
N°5 : Martigues	5,81	23,05	26,92	42,76	7,38
N°6 : St. Rémy de Provence				39,54	

Tableau II : Teneurs en polluants atmosphériques dans les stations d'étude (en $\mu g/m^3$) pour la période estivale (Moyenne des moyennes journalières du 1/5/01 au 13/6/01);
* : Monoxyde d'azote et dioxyde d'azote non compris ;
** Moyenne des moyennes journalières du 20/6/00 au 17/7/00.

Stations	NO (Monoxyde d'azote)	NO_X (Oxydes d'azote) *	NO_2 (Dioxyde d'azote)	O_3 (Ozone)	SO_2 (Dioxyde de soufre)
N°5 : Martigues	1,58	8,81	10,12	81,93	5,37
N°6 : St. Rémy de Provence	4,36**	6,87**	4,53**	81,84	1,12**

2.3 Dosage des composés phénoliques totaux

La méthode d'extraction développée dans cette recherche est basée sur le travail de Peñuelas *et al.* (1996). Ainsi, 0,5 g de poids sec d'aiguilles par échantillon est extrait avec 20 ml d'une solution à 70% de méthanol aqueux (v/v) acidifiée par quelques gouttes d'HCl 1N. Le mélange est laissé à température ambiante pendant une heure et demi puis filtré. La quantification des phénols totaux s'effectue par réaction colorimétrique à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu. A chaque échantillon (0,5 ml d'extrait) sont ajoutés 8 ml d'eau déminéralisée, 0,5 ml de réactif et 1 ml de solution saturée de Na_2CO_3. Après une heure, la mesure de la réaction est réalisée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 720 nm. Les résultats quantitatifs sont exprimés par référence à une gamme étalon faite avec l'acide gallique.

2.4 Extraction et dosage des flavonoides

2.4.1 Extraction des flavonoides

La méthode d'extraction des flavonoides est inspirée des travaux de Kaundun (1995). Ainsi, 2 g de poids sec d'aiguilles sont mis en suspension dans 100 ml HCl 2N. La solution est portée à une température de 80°C, au bain-marie, sous reflux pendant 50 min avec insufflation d'air toutes les 10 min.

Après avoir laissée la solution refroidir pendant environ 30 min, elle est alors filtrée sur fritté de porosité N°3, à l'exception d'un volume de 2 ml prélevé pour le dosage des proanthocyanidines totales.

Les flavonols sont extraits de la solution filtrée et du lavage du filtre avec 2 x 60 ml puis 1 x 40 ml de diéthyl éther. Ces différentes fractions éthérées sont ensuite réunies puis évaporées.

Le résidu est repris dans 10 ml de méthanol puis conservé au congélateur à l'abri de la lumière avant analyses des flavonols individuels et totaux.

2.4.2 Dosage des proanthocyanidines totales

Ces molécules sont des composés de haut poids moléculaire constitués de la condensation de plusieurs monomères (anthocyanidines). Pour doser les proanthocyanidines, il est nécessaire de réaliser une dégradation acide qui conduit à la libération des différentes anthocyanidines, lesquelles sont quantifiables par spectrophotométrie (Kaundun, 1995).
Ainsi, le volume de 2 ml prélevé dans la solution initiale est ajusté à 5 ml avec HCl 2N. Les anthocyanidines totales sont dosées au spectrophotomètre d'absorption (Philips PU 8620) à une longueur d'onde de 530 nm. Les résultats sont indiqués en mesure de densité optique (DO).

2.4.3 Dosage des flavonols totaux

Un volume de 100 µl de la solution méthanolique est mis à réagir pendant 20 min dans 5 ml d'une solution méthanolique à 1% d'$AlCl_3$ (w/w). Les flavonols totaux sont dosés par spectrophotométrie d'absorption à une longueur d'onde de 435nm (mesure de la formation du complexe coloré intervenant en présence des ions Al^{3+}).

Les résultats quantitatifs sont exprimés par référence à une gamme étalon faite avec la quercétine.

2.4.4 Identification et quantification des flavonols individuels

La séparation et le dosage individuel des flavonols est effectué à partir de la solution méthanolique par Chromatographie Liquide Haute Performance (Hewlett Packard série 1050) équipé d'un détecteur à barrettes de diodes. La colonne utilisée est une colonne Nucléosil 100 C18 (4,6 x 250 mm) munie d'une pré-colonne de même phase stationnaire. La phase mobile est constituée d'un mélange ternaire de solvants : A : eau / acide acétique à 10% (v/v), B : méthanol, C : tétrahydrofurane. L'élution s'effectue à un débit de 1 ml/min selon le gradient suivant : de 63/10/17 (A/B/C) à 23/60/17 en 40 min. Les flavonols sont détectés à 370 nm. La boucle d'injection est de 10µl.
L'identification des composés est basée sur la comparaison de leur temps de rétention et de leur spectre UV (de 250 à 600 nm) avec ceux de standards commerciaux (Roth-Sochiel ®). L'étalonnage est externe.

2.5 Traitements statistiques

Les traitements statistiques ont été réalisés à l'aide des logiciels Statview® et Statitcf®. La limite de significativité des différents tests est de 5 %.

Pour comparer les concentrations en polluants atmosphériques entre les différents sites, une **Anova plan factoriel** a été réalisée à partir des moyennes journalières de chacun des polluants pour chacune des deux saisons (soit environ 40 mesures par site et par polluant). Pour le site de St Rémy de Provence, pour la période hivernale, seules ont été considérées les teneurs en ozone.

Afin de comparer les teneurs hivernales entre les différents sites d'étude, des tests non-paramétriques de **Kruskal-Wallis** ont été effectués sur les concentrations en composés phénoliques totaux, les teneurs totales en proanthocyanidines et en flavonols (soit six mesures par site pour chacun de ces paramètres chimiques).

Une **matrice de corrélation** a été réalisée à partir de l'ensemble des données sur les concentrations (par individu) en phénols totaux, proanthocyanidines totales et flavonols totaux et les concentrations de chacun des polluants dans les différents sites (St Rémy de Provence excepté) pour les prélèvements d'hiver, afin d'évaluer s'il existe des relations statistiques significatives entre ces groupes de données.

Pour les prélèvements d'hiver de l'ensemble des sites d'étude (à l'exception du site de St Rémy de Provence), une matrice de corrélation a également été réalisée à partir des concentrations par individu en flavonols individuels et les concentrations de chacun des polluants.

Deux **Analyses en Composantes Principales** (ACP) ont été ensuite effectuées. La première concerne les concentrations en phénols totaux, proanthocyanidines totales et flavonols totaux et les teneurs en polluants atmosphériques, à partir de la totalité des données des prélèvements d'hiver (St Rémy de Provence excepté), soit 30 points-individus (6 individus, 5 stations) et 8 variables. La seconde a été réalisée sur les flavonols individuels et les polluants atmosphériques pour la période hivernale, sur la totalité des données (à l'exception du site de St Rémy de Provence), soit 30 points-individus (6 individus, 5 stations) et 5 variables. A partir des coordonnées des points-individus dans les ACP, deux classifications ascendantes hiérarchiques du moment d'ordre 2 ont été réalisées, afin de permettre un regroupement statistique des individus.

3 RESULTATS

3.1 Qualité de l'air des stations d'étude

Pour la période hivernale, les six[1] stations d'étude présentent des teneurs globales en polluants atmosphériques statistiquement différentes (Anova plan factoriel, $p<0.05$).

- Sausset-les-Pins est caractérisé par des concentrations importantes en dioxyde de soufre et en ozone.
- Ste Marguerite et Martigues présentent des concentrations élevées en composées azotés, mais le premier de ces sites a des concentrations en NO et NO_x plus élevées que le second.
- Gardanne présente les plus faibles concentrations en ozone et des teneurs en SO_2 moyennes.
- Cadarache est caractérisée par des teneurs relativement faibles pour tous les polluants pris en compte dans cette étude.
- St Rémy de Provence présentent des concentrations en ozone moyenne.

Pendant la période estivale, les 2 sites d'étude présentent des concentrations moyennes en polluants statistiquement différentes (Anova plan factoriel, $p<0.05$), sauf pour l'ozone.

- St Rémy de Provence présente des plus fortes concentrations en NO.
- Martigues a des concentrations plus élevées en NO_2, NO_x et SO_2.

Les concentrations en ozone sont sensiblement identiques dans les deux sites.

La comparaison des concentrations entre les deux périodes étudiées, pour le site de Martigues, montre que seules les concentrations en ozone augmentent entre l'hiver et l'été. Les concentrations en SO_2, NO_x, NO et NO_2 sont plus faibles l'été que l'hiver.
La période hivernale est donc bien caractérisée par des pollutions liées aux polluants primaires alors que la période estivale est marquée par des pollutions relatives aux polluants secondaires.

3.2 Les composés phénoliques totaux

Les relations entre les composés phénoliques mesurés (phénols totaux, proanthocyanidines totales, flavonols totaux et flavonols individuels) et les teneurs en polluants atmosphériques

[1] St Rémy de Provence n'a pas été pris en compte dans ce traitement statistique car aucune donnée sur ce site en période hivernale n'était disponible, à l'exception des concentrations en ozone.

sont analysées pour la campagne d'échantillonnage d'hiver, car cette période de l'année n'a pas été étudiée dans le cadre du premier travail (Pasqualini *et al.*, 2001).

3.2.1 Les phénols totaux

En février, les teneurs en phénols totaux dans les aiguilles de l'année diffèrent significativement entre les divers sites d'étude (Kruskal-Wallis, $p<0,0001$; Figure 2). Cadarache présente les valeurs les plus élevées et St Rémy de Provence, les teneurs les plus basses. Les quatre autres sites se répartissent en deux groupes : Gardanne et Sausset-les-Pins présentent des concentrations élevées alors que Martigues et Ste Marguerite présentent des concentrations plus faibles.

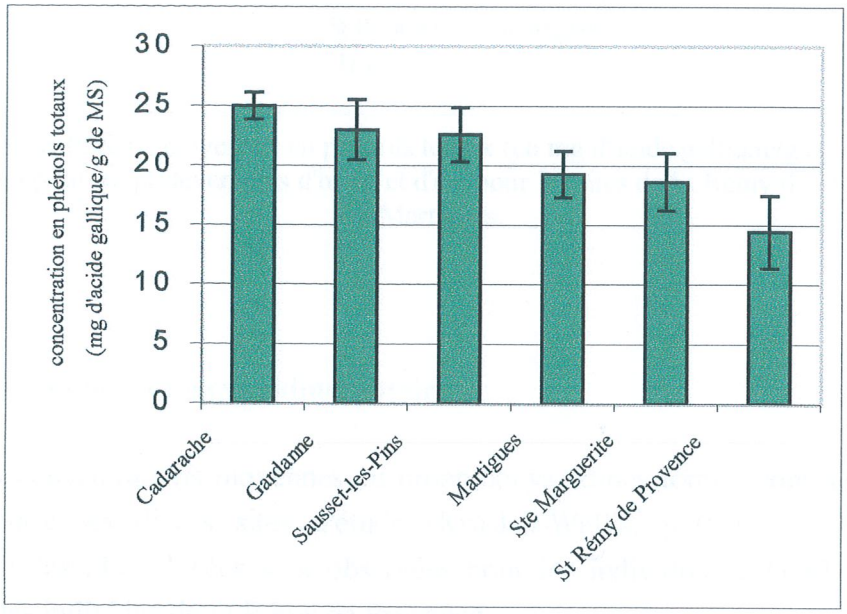


Figure 2 : Concentrations moyennes en composés phénoliques totaux dans les aiguilles de l'année du pin d'Alep (en mg d'acide gallique/g de matière sèche ± écart-type), pour les différentes stations d'étude, en février.

L'étude de la matrice de corrélation montre des relations significativement négatives entre les teneurs en phénols totaux et les concentrations en **monoxyde d'azote** ($r=-0,524$; $p<0,01$), en **dioxyde d'azote** ($r=-0,766$; $p<0,01$), en **NO_x** ($r=-0,682$; $p<0,01$) et en **ozone** ($r=-0,369$; $p<0,05$).

La Figure 3 représente les concentrations moyennes en composés phénoliques totaux en février et en juin à St Rémy de Provence et à Martigues. Ces concentrations sont toujours plus élevées en été qu'en hiver.

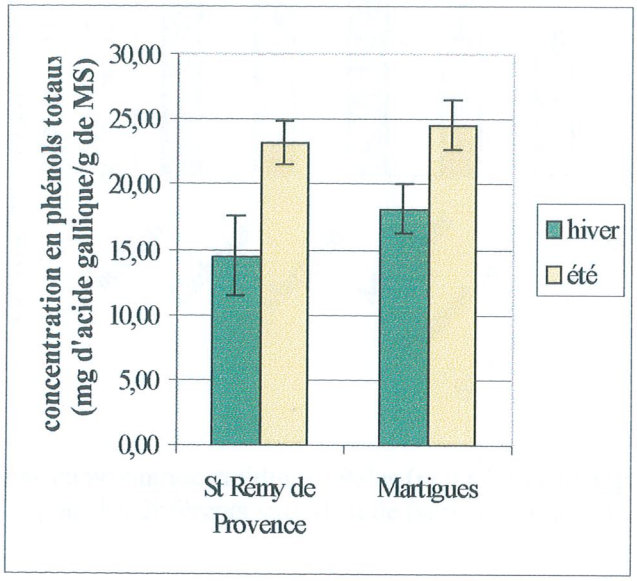


Figure 3: Concentrations moyennes en phénols totaux (en mg d'acide gallique/g de matière sèche ± écart-type) pour les prélèvements d'hiver et d'été pour les sites de St Rémy de Provence et de Martigues.

3.2.2 Les proanthocyanidines totales

En hiver, les concentrations moyennes en proanthocyanidines totales sont significativement différentes entre les divers sites d'étude (Kruskal-Wallis, $p=0,0005$; Figure 4). Les concentrations les plus élevées sont observées pour les individus de Gardanne et les plus basses, pour les individus de St Rémy de Provence.

La matrice de corrélation montre des relations significatives négatives entre ce paramètre et la concentration en **ozone** ($r=-0,625$; $p<0,01$) et en **dioxyde de soufre** ($r=-0,387$; $p<0,05$).

Durant l'été (Figure 5), les concentrations moyennes en proanthocyanidines sont de même ordre de grandeur que pendant l'hiver, pour le site de St Rémy de Provence. En revanche, pour Martigues, elles sont légèrement plus élevées en été qu'en hiver (Figure 5).

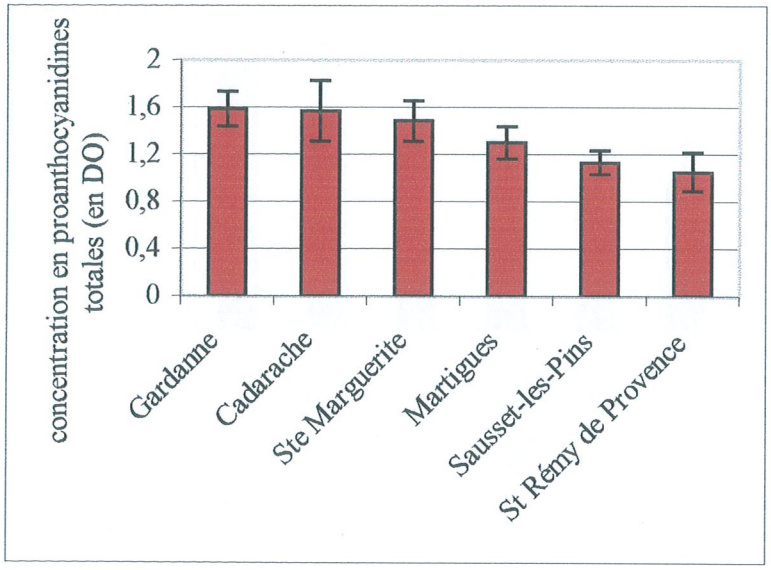


Figure 4 : Concentrations en proanthocyanidines totales (en DO ± écart-type) dans les aiguilles de *Pinus halepensis* pour les différents sites d'étude (série de prélèvements de février).

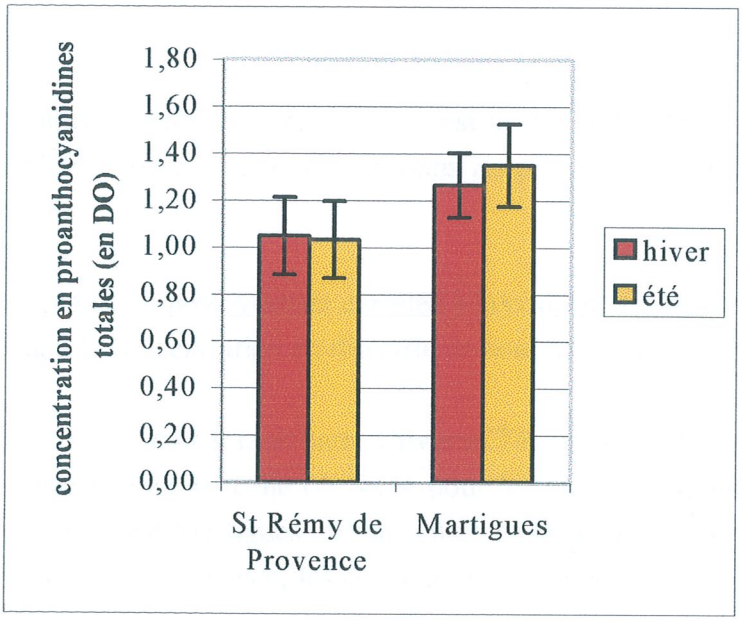


Figure 5 : Concentrations moyennes en proanthocyanidines totales (en DO ± écart-type) pour les prélèvements d'hiver et d'été de St Rémy de Provence et Martigues.

3.2.3 Les flavonols totaux

Les concentrations en flavonols totaux sont significativement différentes entre les stations d'étude, en hiver (Kruskal-Wallis, p=0,001 ; Figure 6).

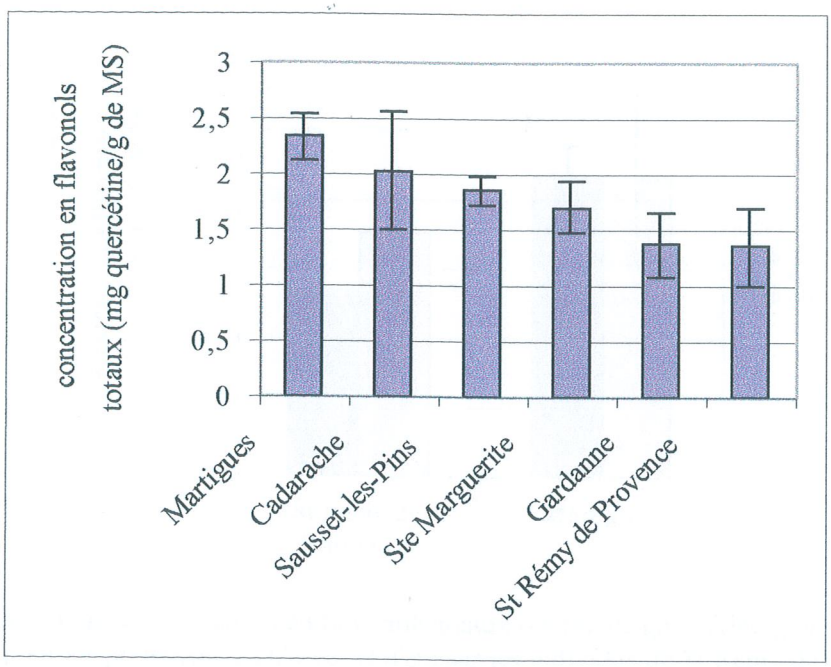


Figure 6 : Concentrations moyennes en flavonols totaux (en mg de Quercétine/g de matière sèche ± écart-type) dans les aiguilles de l'année pour la campagne de prélèvements de février pour les diverses stations d'étude.

Comme pour les deux autres paramètres précédents, c'est le site de St Rémy de Provence qui présente les valeurs les plus faibles. Les concentrations les plus élevées sont observées pour les individus de Martigues.

La teneur en flavonols totaux est positivement corrélée à la concentration en **ozone** ($r=0,519$; $p<0,01$) et négativement à la concentration en **dioxyde de soufre** ($r=-0,336$; $p<0,05$)

L'évolution des teneurs en flavonols totaux entre l'hiver et l'été pour St Rémy de Provence et Martigues suit la tendance inverse de celle observée pour les proanthocyanidines (Figure 7). En effet, pour ce paramètre, c'est Martigues qui présente des concentrations semblables entre l'hiver et l'été. Pour St Rémy de Provence, les concentrations en été sont supérieures à celles d'hiver.

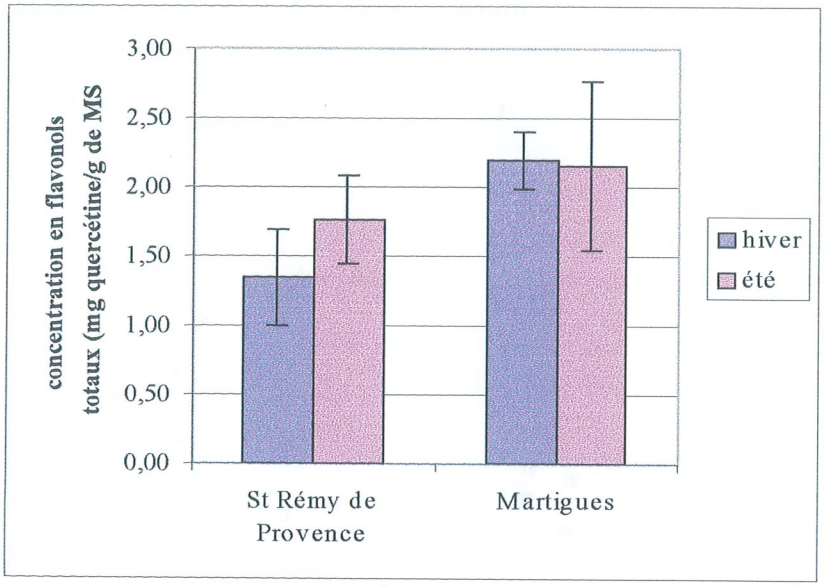


Figure 7 : Concentrations moyennes en flavonols totaux (en mg de quercétine/g de matière sèche ± écart-type) pour les prélèvements d'hiver et d'été sur les individus de St Rémy de Provence et de Martigues.

3.2.4 Analyse en Composantes Principales

La Figure 8 représente le plan 1-2 de l'Analyse en Composantes Principales. L'axe 1, représentant 46,5% de l'information, est caractérisé du côté positif par les concentrations en composés azotés (NO_x, NO_2 et NO par ordre décroissant d'importance) et du côté négatif par les concentrations en phénols totaux. L'axe 2, représentant 25,3 % de l'information, est caractérisé du côté positif par les concentrations en ozone, et du côté négatif, par celles en proanthocyanidines.

La distribution des points-individus dans le plan 1-2 montre une homogénéité entre les individus d'un même site d'étude. La classification ascendante hiérarchique permet de différencier statistiquement 2 grands groupes de sites qui se répartissent de part et d'autre de l'axe 2 :

- Le premier regroupe les individus des sites de **Sausset-les-Pins, Cadarache et Gardanne** qui se situent du côté négatif de l'axe 1. Ils sont caractérisés par des teneurs très élevées en phénols totaux. Ces sites présentent des teneurs assez faibles en polluants atmosphériques azotés. Ce groupe se subdivise secondairement en deux sous-groupes permettant de distinguer le site urbain (Sausset-les-Pins) des deux autres. Ces deux derniers ensembles se différencient selon l'axe 2. Le site de Sausset-les-Pins présente de fortes concentrations en ozone, il est donc situé du côté des valeurs positives élevées de cet axe, alors que les individus de Cadarache et de Gardanne, situés du côté négatif de cet axe, présentent des valeurs élevées en proanthocyanidines.

➢ Le second regroupe les individus des sites de Martigues et de Ste Marguerite. Ils sont situés du côté positif de l'axe 1. Ces sites présentent des teneurs très élevées en polluants atmosphériques azotés.

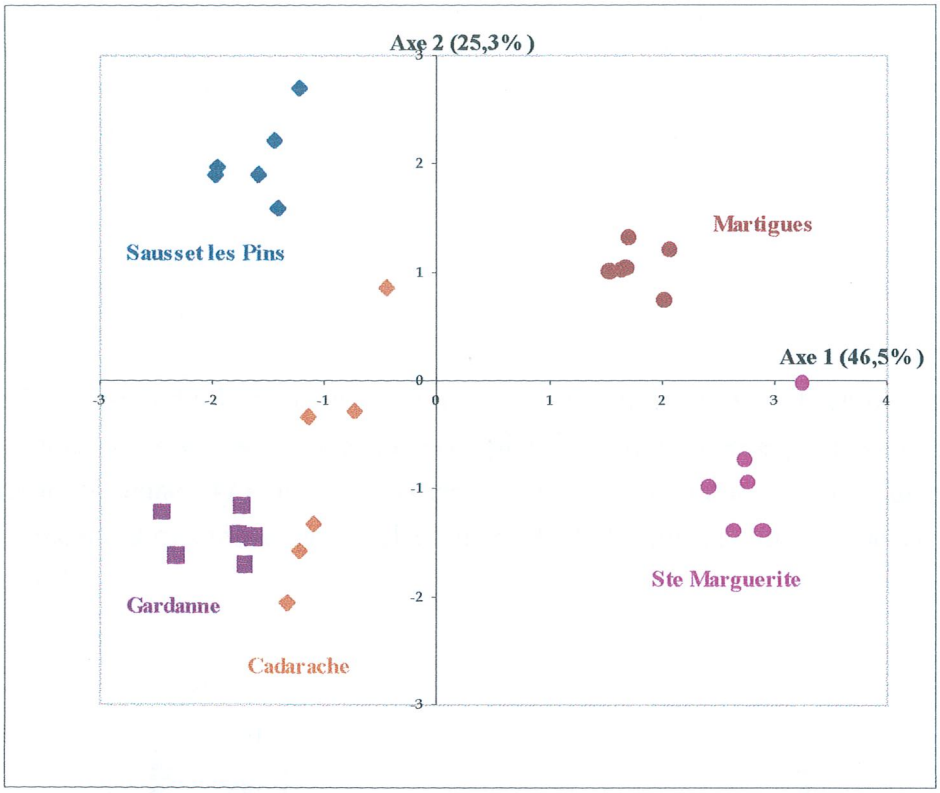


Figure 8 : Plan 1-2 de l'Analyse en Composantes Principales réalisée sur l'ensemble des phénols totaux, proanthocyanidines totales, flavonols totaux et des polluants atmosphériques (St Rémy de Provence excepté).

3.3 Les flavonols

3.3.1 Identification

Tous les flavonols dosés dans les aiguilles de *Pinus halepensis* ont été identifiés. Ces composés sont indiqués dans le Tableau III. Ils sont classés en fonction de leur ordre d'élution. Ces composés présentent tous deux noyaux aromatiques (A et B) et un hétérocycle à 3 atomes de carbone comportant un groupement hydroxyle sur le carbone 3. Ils diffèrent les uns des autres par le nombre de substitution (groupements méthoxyles ou hydroxyles) sur le cycle B.

Tableau III : Composition en flavonols pour l'ensemble des individus analysés.

	Temps de Rétention (min)
Myricétine	17,95
Larycitrine	22,80
Quercétine	26,47
Syringétine	31,00
Isorhamnétine	33,07
Kaempférol	36,35

3.3.2 Quantification

La Figure 9 correspond à la concentration moyenne des divers flavonols en période hivernale pour l'ensemble des stations d'étude. Le kaempférol est le composé présentant la plus forte concentration moyenne (475 µg/g de matière sèche ± 60,6). Pour les cinq autres composés dosés, les concentrations moyennes s'échelonnent de 238,7 µg/g de matière sèche à 50,5 µg/g de matière sèche.

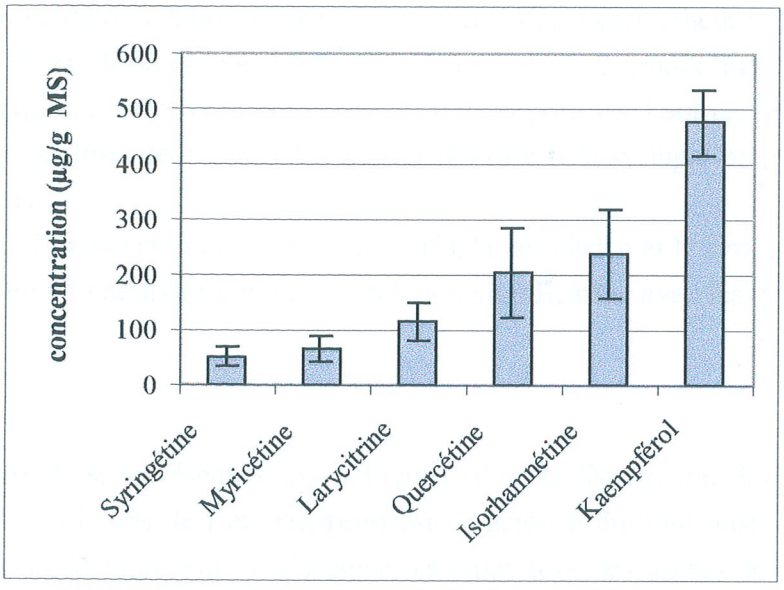


Figure 9 : Concentrations moyennes (en µg/g de matière sèche ± écart-type) en flavonols pour l'ensemble des sites d'étude lors des prélèvements de février.

Pour toutes les stations, les composés classés par ordre décroissant de concentration sont :

1. le kaempférol,
2. l'isorhamnétine,
3. la quercétine,

4. la larycitrine,
5. la myricétine et
6. la syringétine,

à l'exception de Cadarache pour lequel les concentrations en quercétine sont plus élevées que celles en isorhamnétine.

Les concentrations moyennes hivernales des flavonols pour chacun des sites d'étude sont présentées dans le Tableau IV.

Tableau IV : Concentrations moyennes (en µg/g de matière sèche ± écart-type) des flavonols pour les divers sites d'étude (prélèvements de février).

	Sausset-les-Pins	Ste Marguerite	St. Rémy de Provence	Cadarache	Gardanne	Martigues
Myricétine	73,2 ±13,5	62,6 ±17,0	34,1 ±20,4	92,5 ±25,0	40,8 ±26,6	82,3 ±23,4
Larycitrine	121,1 ±11,6	121,0 ±25,8	68,9 ±34,0	143,0 ±41,3	81,2 ±38,5	161,3 ±42,5
Quercétine	160,2 ±61,1	194,0 ±91,3	103,8 ±54,6	323,3 ±75,4	169,3 ±39,5	276,3 ±66,9
Syringétine	49,9 ±6,1	57,7 ±14,0	31,0 ±17,0	54,6 ±22,8	33,1 ±7,4	76,8 ±13,3
Isorhamnétine	194,4 ±68,9	234,4 ±63,7	125,3 ±51,0	321,0 ±88,8	212,8 ±63,1	344,0 ±88,8
Kaempférol	493,5 ±68,4	499,0 ±65,8	373,3 ±54,3	542,6 ±79,3	437,6 ±102,4	509,2 ±72,6

L'étude de la matrice de corrélation montre des relations significativement :

- négatives entre le **dioxyde de soufre** et chacun des flavonols individuels (pour la myricétine, la quercétine et l'isorhamnétine, $p<0,01$ et pour les 3 autres, $p<0,05$).
- positives entre le **dioxyde d'azote,** les **oxydes d'azote** et la syringétine ($p<0,01$ et $p<0,05$ respectivement),
- positives entre l'**ozone** et la myricétine ($p<0,05$), la larycitrine et la syringétine ($p<0,01$).

Seule les teneurs en NO ne montrent aucune relation significative avec les concentrations des divers flavonols.

Le plan 1-2 de l'ACP est représenté dans la Figure 10 et la distribution des points-individus sur ce plan. L'axe 1 (45,5% de l'information) est caractérisé du côté positif principalement par la syringétine et la larycitrine mais également par tous les autres flavonols. Du côté négatif, cet axe est marqué par les teneurs en dioxyde de soufre. L'axe 2 représente 24,1% de l'information. Il est caractérisé négativement par les concentrations en oxydes d'azote, en monoxyde d'azote et en dioxyde d'azote (par ordre décroissant d'importance).

La classification ascendante hiérarchique montre que les individus d'un même site d'étude sont rassemblés dans le même groupe sauf pour les sites de Cadarache et de Ste Marguerite. Ce traitement statistique permet de différencier deux grands ensembles qui se répartissent selon une diagonale du plan 1-2 de l'ACP.

- le premier rassemble tous les individus de Sausset-les-Pins, de Gardanne et deux individus de Cadarache. Cet ensemble est situé du côté négatif de l'axe 1. Ces individus présentent généralement des teneurs en flavonols individuels peu élevées et ces deux sites sont marqués par des concentrations importantes en dioxyde de soufre. Dans ce groupe, s'individualisent secondairement d'une part, les individus du site de Sausset-les-Pins et d'autre part, ceux de Gardanne et de Cadarache.
- le second regroupe les individus de Martigues, Ste Marguerite et les quatre autres de Cadarache. Ces individus présentent de fortes concentrations en flavonols individuels. Ce groupe se subdivise ensuite en deux avec, dans le premier sous-groupe, cinq individus de Ste Marguerite, et dans le second, ceux de Martigues, les quatre de Cadarache et le sixième individu de Ste Marguerite.

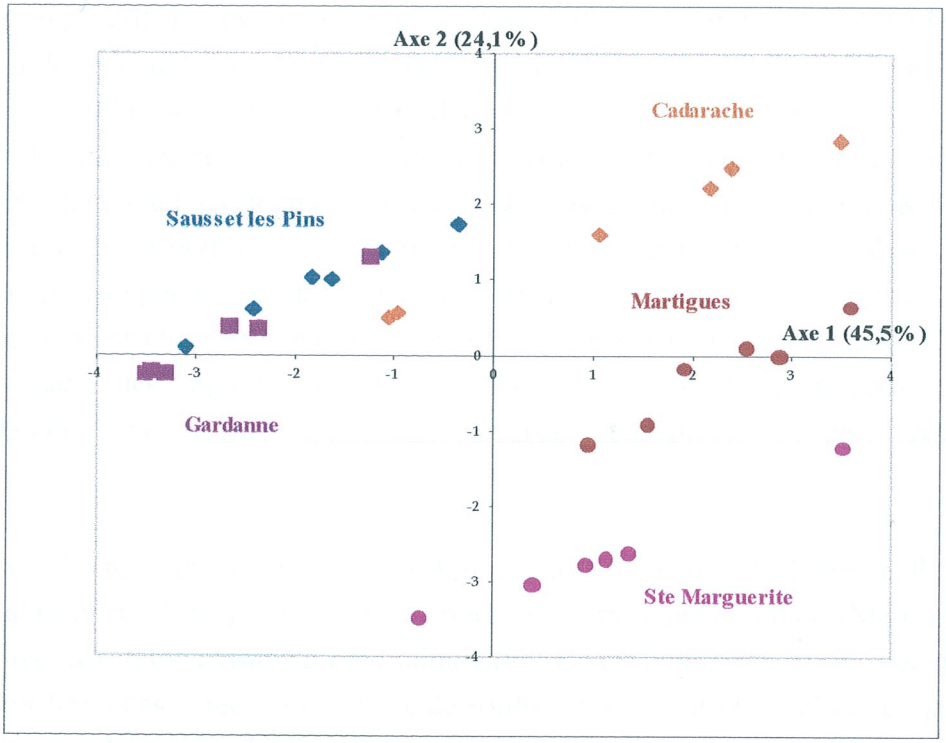


Figure 10 : Plan 1-2 de l'Analyse en Composantes Principales réalisée sur l'ensemble des flavonols individuels et des polluants atmosphériques pour les prélèvements de février (St Rémy de Provence excepté).

4 DISCUSSION ET CONCLUSION

4.1 Impact de la pollution atmosphérique sur les phénols totaux, les proanthocyanidines et les flavonols totaux

➢ Les quantités de **phénols totaux** dans les aiguilles de *Pinus halepensis,* en février 2001 et en juin 2001 (comprise entre 14 et 25 mg d'acide gallique /g de MS), sont de même ordre de grandeur que celles retrouvées chez d'autres espèces du même genre, également soumises à des pollutions atmosphériques, comme *Pinus nigra* Arn. (Giertych *et al.,* 1999), *Pinus sylvestris* L. (Karolewski, 1990) ou encore *Pinus eldarica* L. (Peñuelas *et al.,* 1996).

Les quantités en phénols totaux, mesurées chez *Pinus halepensis,* en février 2001 (de 14 à 25 mg d'acide gallique /g de MS), sont légèrement plus faibles que celles mesurées en juin 2001 (de 22 à 25 mg d'acide gallique /g de MS). Cette augmentation peut avoir plusieurs explications. Il a été montré, chez *Pinus nigra* et chez *Pinus sylvestris,* que les teneurs en composés phénoliques totaux augmentent avec l'âge des aiguilles (Karolewski & Giertych, 1995 ; Giertych *et al.,* 1999). Ce phénomène d'accumulation des composés phénoliques, qui représenterait une adaptation de défense contre les insectes phytophages, serait lié à une diminution des teneurs en azote et en eau des feuilles (Giertych *et al.,* 1999). La différence de quatre mois entre les aiguilles de février 2001 et celles de juin 2001 engendre vraisemblablement une augmentation des composés phénoliques totaux chez *Pinus halepensis.*

Si l'on compare les teneurs en composés phénoliques totaux de juin 2001 avec celles de juin 2000 (Pasqualini *et al.,* 2001), on remarque, pour les mêmes sites d'étude (Martigues et St Rémy de Provence), qu'il existe de plus faibles teneurs en juin 2001. Il se peut que cette diminution soit liée à des teneurs en dioxyde de soufre, légèrement plus faibles, en juin 2001. En effet, une corrélation significativement positive avait été mise en évidence entre les teneurs en phénols totaux et les teneurs en **dioxyde de soufre**, lors des précédents travaux (Pasqualini *et al.,* 2001). Des résultats similaires ont été obtenus, en milieu contrôlé, chez *Pinus sylvestris* par Karolewski (1990) et Giertych & Karolewski (1993) et même chez une espèce éloignée comme *Vicia faba* par Nandi *et al.* (1990). Toutefois, cette relation n'a pas été vérifiée dans le cadre de cette étude. De fortes teneurs en dioxyde de soufre induisent une augmentation des nécroses, ainsi que d'autres atteintes des fonctions vitales (Pierre & Queiroz, 1981 ; Nandi *et al.,* 1990). L'augmentation des phénols dans la plante, soumise à un stress atmosphérique, semble lié à une demande plus forte en énergie, qui induit une augmentation de la respiration (Rubin & Arcichowska, 1971 *in* Giertych *et al.,* 1999). L'action de l'acide sulfurique, en milieu contrôlé, sur *Pinus nigra* Arn. et sur *Pinus resinosa*

Ait. engendre aussi une augmentation des composés phénoliques (Zobel & Nighswander, 1991). Les mécanismes de défense semblent donc les mêmes qu'en présence de dioxyde de soufre.

Les teneurs en phénols totaux sont négativement corrélées, de manière significative, aux concentrations en polluants **azotés**, ce qui confirme les résultats obtenus précédemment (Pasqualini *et al.,* 2001). Cette corrélation négative entre les polluants azotés et les phénols totaux peut s'expliquer par l'action positive de ces polluants sur l'activité de la nitrate réductase (Krywult *et al.,* 1996). Cette dernière favorise l'assimilation de l'azote et plusieurs études ont démontré l'existence de corrélations négatives entre les concentrations en azote et en composés phénoliques des feuilles de diverses espèces (Giertych *et al.,* 1999).

Concernant l'impact de la pollution à l'**ozone** sur les composés phénoliques totaux, il a été mis en évidence une corrélation négative ($p<0,05$). Par contre, lors de la précédente étude (Pasqualini *et al.,* 2001), les résultats semblaient montrer une légère augmentation des composés phénoliques totaux en présence d'ozone. L'ensemble de ces travaux ne permet pas de révéler un impact marqué sur la concentration en phénols totaux. Très peu d'études bibliographiques ont été réalisées sur l'impact de l'ozone en milieu contrôlé (Howell, 1970 ; Louguet *et al.*, 1989 ; Kainulainen *et al.*, 1994). D'après les travaux de Howell (1970), il semble que les fortes teneurs en ozone influencent l'activité enzymatique intervenant dans le métabolisme des phénols. Toutefois, les travaux de Kainulainen *et al.* (1994) suggèrent qu'il n'y aurait aucune réponse des composés phénoliques totaux en présence de forte concentration en ozone. L'impact de l'ozone sur les phénols totaux révèle de nombreux résultats contradictoires et il est donc difficile de se prononcer. Par contre, il est clairement défini que chez *Pinus halepensis,* l'ozone induit une baisse de la teneur en chlorophylle et la présence de nombreuses nécroses, ainsi que des modifications sur le métabolisme du carbone (Anttonen *et al.,* 1995 ; Pelloux *et al.,* 2001).

Le comportement des phénols totaux en fonction du degré de pollution du site semble varier en fonction de l'espèce végétale étudiée. Ainsi, Peñuelas *et al.* (1996) montrent, pour *Pinus eldarica,* aussi une diminution des composés phénoliques totaux en présence de fortes concentrations en polluants atmosphériques, comme le dioxyde de carbone alors que Giertych *et al.* (1999) observent chez *Pinus nigra* des concentrations plus élevées en phénols totaux pour le site pollué que pour le site témoin. Pour *Betula pubescens,* la concentration en phénols totaux ne paraît pas liée au degré de pollution de site (Loponen *et al.,* 2001).

➢ Les quantités en **proanthocyanidines**, mesurées chez *Pinus halepensis,* en février 2001, sont de même ordre de grandeur que celles mesurées en juin 2001. Par contre, des différences sont observées entre les sites d'étude, que ce soit en saison hivernale ou en saison estivale. Ces variations peuvent avoir pour origine les concentrations en polluants atmosphériques entre les stations. Une relation significative négative entre les teneurs en proanthocyanidines

et la concentration en **ozone** a été mise en évidence. Les fortes teneurs en ozone inhiberaient la production de proanthocyanidines, comme cela pourrait être le cas à St Rémy de Provence, à Sausset-les-Pins et à Martigues. Ces résultats pourraient être mis en relation avec ceux de Vogt *et al.* (1991) et Chaves *et al.* (1993), qui ont montré que les flavonoides présentaient des variations en présence de fortes teneurs en UV.

Par ailleurs, la matrice de corrélation a montré une autre relation significative négative entre les teneurs en proanthocyanidines et la concentration en **dioxyde de soufre** ($p<0,05$), mais plus faible qu'avec l'ozone.

➢ Les quantités de **flavonols totaux** dans les aiguilles de *Pinus halepensis,* en février et juin 2001, sont de même ordre de grandeur que celles retrouvées dans la littérature (Kaundun *et al.,* 1998).

Contrairement aux proanthocyanidines, les concentrations les plus élevées en flavonols totaux sont observées pour les individus de Martigues ou encore Sausset-les-Pins. En effet, la teneur en flavonols totaux est positivement corrélée à la concentration en **ozone**. Ce comportement opposé de ces deux familles chimiques pourrait s'expliquer par leur concurrence dans les voies métaboliques de biosynthèse (Cooper-Driver & Bhattacharya, 1998). La mesure de ces deux paramètres apportent donc les mêmes renseignements, concernant la pollution par l'ozone.

Toutefois, comme pour les proanthocyanidines, la matrice de corrélation présente une relation significative négative entre les teneurs en flavonols totaux et la concentration en **dioxyde de soufre** ($p<0,05$), mais plus faible qu'avec l'ozone.

L'ensemble des investigations sur les phénols totaux, proanthocyanidines et flavonols totaux permettent d'affirmer que l'évolution des leurs concentrations dans les aiguilles de *Pinus halepensis* est à mettre en relation avec l'évolution des teneurs en polluants atmosphériques.

Même si les phénols totaux ne semblent pas être sensibles à une pollution par l'ozone, ils semblent être (i) influencés positivement par une pollution au dioxyde de soufre et (ii) influencés négativement par une pollution en oxydes d'azote, puisqu'ils présentent des corrélations négatives hautement significatives avec ce paramètre.

L'utilisation des proanthocyanidines et des flavonols totaux en tant que bio-indicateur de la pollution atmosphérique se révèle pertinente pour mettre en évidence la pollution à l'ozone, puisqu'ils présentent des corrélations hautement significatives avec ce paramètre, négatives pour les proanthocyanidines et positives pour les flavonols totaux.

Les proanthocyanidines et les flavonols totaux peuvent être influencés négativement par des fortes teneurs en dioxyde de soufre.

4.2 Impact de la pollution atmosphérique sur les flavonols individuels

Les six flavonols identifiés dans les aiguilles de *Pinus halepensis* ont déjà été mis en évidence dans cette même espèce par d'autres auteurs (Kaundun, 1995 ; Kaundun *et al.*, 1998), mais dans une perspective chimiotaxonomique. Il n'est pas possible de comparer les concentrations des composés car ces auteurs n'ont indiqué que leur pourcentage relatif. Ils remarquent que le kaempférol est le composé le plus abondant, ce qui est également le cas des populations prises en compte dans notre étude. Par contre, la quercétine et l'isorhamnétine sont respectivement les deuxième et troisième composés par ordre d'importance pour les populations qu'ils ont échantillonnés, alors que nous trouvons l'inverse.

Ces flavonols ne sont pas caractéristiques (au niveau qualitatif) de *Pinus halepensis* puisqu'ils sont présents chez d'autres espèces de *Pinus* comme *Pinus brutia*, *Pinus eldarica* (Kaundun, 1995).

Tous ces flavonols simples montrent des corrélations significatives avec un ou plusieurs polluants. Il ressort de l'analyse des résultats que la syringétine réagit à de nombreux polluants (SO_2, NO_2, NOx et O_3), mais de façon opposée pour certains d'entre eux. Elle ne peut donc pas être un bio-indicateur facilement interprétable. De même, la myricétine et la larycitrine réagissent positivement à la pollution en O_3 et négativement à la pollution en SO_2. En revanche, la quercétine et l'isorhamnétine permettent de caractériser, de manière hautement significative, la pollution en SO_2.

A partir de la fiabilité des coefficients de corrélation ($p<0,01$), ces travaux permettent de caractériser un type de polluants atmosphériques par les teneurs d'un ou plusieurs flavonols simples. Ainsi, il est possible de caractériser

- les fortes pollutions au dioxyde d'azote par de fortes teneurs en syringétine,

- les faibles pollutions au dioxyde de soufre par de faibles teneurs en quercétine, myricétine et l'isorhamnétine et

- les fortes pollutions à l'ozone par de fortes teneurs en syringétine et en larycitrine.

4.3 Indicateurs biologiques

Dans un souci de mettre en évidence les pollutions de fond, auxquelles les êtres vivants sont soumis régulièrement, il apparaît indispensable de pouvoir utiliser des bio-indicateurs pertinents pour évaluer la qualité de l'air à petite échelle.

Comme nous l'avons démontré précédemment, différents paramètres de *Pinus halepensis* peuvent être employés pour décrire la qualité de l'air : les phénols totaux, les proanthocyanidines, les flavonols totaux et les flavonols simples. L'ensemble de ces résultats sont synthétisés dans le Tableau V.

Tableau V : Composés phénoliques de *Pinus halepensis* utilisés comme bio-indicateur de la qualité de l'air

Composés phénoliques	Polluants	Influence
Phénols totaux		
	NO	-
	SO_2	+
Proanthocyanidines		
	O_3	-
	SO_2	-
Flavonols totaux		
	O_3	+
	SO_2	-
Flavonols simples		
Syringétine	**NO_2**	+
	O_3	+
Quercétine	**SO_2**	-
Isorhamnétine	**SO_2**	-
Myricétine	**SO_2**	-
Larycitrine	**O_3**	+

Bien que ces investigations sur les composés phénoliques représente un travail incontournable pour l'utilisation de bio-indicateurs de la qualité de l'air, elles ne constituent qu'une étape dans ce processus. Il apparaît désormais indispensable de suivre avec précision l'évolution du milieu, avec la mise en place d'un **réseau de surveillance**. L'objectif est de disposer, dans un avenir proche, de tout un ensemble de sites d'études, suivis régulièrement, à l'échelle d'un département ou d'une région. Ces informations devront être intégrées au sein d'une base de données géoréférencée, pour en faciliter l'interprétation et l'exploitation. Un effort particulier doit donc être entrepris pour développer un **Système d'Informations Géographiques**. Une telle quantité d'informations, appuyée par un système informatique adapté, assurant les fonctions de saisies, de stockage, de manipulation, de remise à jour des données, constituera un **outil d'aide à la décision**.