



THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR

DE L'UNIVERSITE DE LILLE

École Doctorale : Sciences de la Matière, du Rayonnement

Et de l'Environnement

Discipline : Optique, Lasers, Physico-chimie, Atmosphère

Vers une meilleure connaissance de l'exposition aux grains de pollens allergisants et de leur altération par la pollution de l'air

Présentée par

Mona HAMZÉ

Le 29 Avril 2022 à 14h00

Sous la direction de Nicolas VISEZ

et la co-direction d'Hervé VEZIN

Rapporteurs : MILLET Maurice, Professeur des Universités, Université de Strasbourg
ROTH Estelle, Maître de conférences, HDR, Université de Reims

Examineurs BILLON Gabriel, Professeur des Universités, Université de Lille
DEBOUDT Karine, Professeur des Universités, Université du Littoral Côte d'Opale

Membres invités : PONCET Pascal, Chercheur scientifique, Institut Pasteur de Paris
GALSOMIES Laurence, Chargée de recherche, ADEME

Directeur de thèse : VISEZ Nicolas, Maître de conférences, HDR, Université de Lille

Co-encadrante : CHOEL Marie, Maître de conférences, Université de Lille



REMERCIEMENT

Il n'est pas facile de trouver les mots justes pour rédiger ma thèse, mais il est encore plus délicat de formuler des remerciements qui tentent d'exprimer mes reconnaissances. Sachez que ceux qui suivent viennent du cœur.

Nicolas Visez, mon directeur de thèse. Merci pour ta confiance, tes encouragements, tes conseils avisés. Merci pour l'aide que tu m'as apportée tout au long de ma thèse. Tu es un exemple de par tes vastes connaissances, ta passion pour la découverte et ta rigueur scientifique. Merci pour ton enthousiasme communicatif qui m'a encouragé même pendant les moments difficiles.

Je voudrais aussi remercier grandement mes co-encadrantes, Marie Choël et Yeny Tobon, qui m'ont encadrée tout au long de cette thèse et avec qui nous avons partagé ses brillantes intuitions. Je les remercie aussi pour leur gentillesse et leur disponibilité.

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Laboratoire de PhysicoChimie des Processus de Combustion et de l'Atmosphère (PC2A) et du Laboratoire Avancé de Spectroscopie pour les Interactions, la Réactivité et l'Environnement (LASIRE) à l'Université de Lille. Mes remerciements vont à Messieurs Laurent Gasnot (ancien directeur de PC2A), Benjamin Hanoune (actuel directeur de PC2A) et Hervé Vezin (directeur du LASIRE), qui m'ont accueilli pendant trois ans et 6 mois au sein de leurs laboratoires. C'est grâce à eux que j'ai pu concilier avec bonheur, la recherche théorique et appliquée pendant cette thèse.

J'adresse ma profonde gratitude à Madame Sylvie Gosselin, l'ingénieur de recherche qui, sans elle ce travail aurait été difficile à finir. Je remercie Nicolas, Marie et Sylvie pour leur collaboration lors des campagnes de prélèvements, pour leur disponibilité, leur expertise et leurs nombreux conseils.

Bien évidemment un merci pour les financeurs eux-mêmes ADEME et Région Hauts-de-France sans lesquels je n'aurais jamais commencé cette aventure de trois ans et quelques mois. Mes remerciements s'adressent également à Madame Laurence Galsomiès, mon ingénieur de référence ADEME pour m'avoir apporté conseil et expertise. Je remercie également chaleureusement, Pascal Poncet, pour ses conseils et sa bonne humeur. Je les remercie aussi pour leurs remarques qui m'ont permis d'envisager mon travail sous un autre angle.

J'adresse tous mes remerciements à Monsieur Maurice Millet, Professeur à l'Université de Strasbourg, ainsi qu'à Madame Estelle ROTH, Professeur à l'Université de Reims, pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse.

J'exprime ma gratitude à Madame Karine Deboudt, Professeur à l'Université de Littoral Côte d'Opale et à Monsieur Gabriel Billon, Professeur à l'Université de Lille, qui ont bien voulu être mes examinateurs.

Une mention particulière à Madame Valérie Pineau (Cellule thèse, ADEME), qui a toujours su répondre à mes demandes administratives. Je la remercie aussi pour sa bienveillance, sa patience et sa bonne humeur.

J'exprime aussi ma profonde gratitude à tous le personnel du PC2A. Je tiens à remercier surtout Amaury, Pascal et Sébastien pour leur bonne humeur et leur gentillesse.

Je tiens à remercier le fournisseur de pollen BONAPOL (fournisseur de pollen), le LOA, le RNSA, Anne-Marie, Isabelle De Waele et bien d'autres personnes qui se reconnaîtront pour leur participation à la réussite de ce travail (que ceux que j'oublie me pardonne).

Je remercie tous les doctorants et les post-doctorants avec qui j'ai partagé mes études et notamment ces années de thèse. Un remerciement spécial pour mes super-camarades Juan-carlos, Jessy, Kae-Kan, Carolina, Sonia et Mirna. Merci pour tous ces très nombreux moments de déprime, de joies et les fous rires passés ensemble ! J'ai vraiment été ravie de passer ces moments avec vous. Je garde vraiment de très bons souvenirs !

Un gros merci à ma compère de promotion de thèse, Lise avec qui j'ai vécu de très bons moments au bureau mais même au stade de foot et qui, je l'espère, concrétisera ses rêves autant sur le plan professionnel que sur le plan personnel.

Un grand merci à mes meilleures amies Amani Abdallah et Hiba El Mir qui m'ont apporté leur soutien moral pendant ces années d'études, je les remercie sincèrement. C'est une chance de vous avoir.

Je tiens également à adresser mes sincères remerciements à Moemen Baroudi et Denis Hamad qui m'ont soutenu et remotivé pendant toutes ces années.

Mes derniers remerciements vont naturellement à tous les membres de ma famille qui ont été présents à chaque étape de ma vie. A mes parents Ahmad Hamzé et Kalzahar Mojalled, mon frère Bilal et mes sœurs Fatat et Marwa qui, malgré la distance, ont su me motiver, me transmettre de la force et me donner le courage de continuer afin d'atteindre mes objectifs. Vous faites ma joie et vous êtes ma fierté. Merci à mon copain qui m'a soutenu et qui a été ma force dans les moments difficiles. Merci d'avoir été le moteur qui m'a permis de traverser les moments de doute, de découragement et pour tous les encouragements qui m'ont mené vers de belles périodes d'enthousiasme.

Merci à tous !

Et par-dessus tout, merci à Dieu pour la vie.

Mona

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENT	2
TABLE DES MATIERES	5
GLOSSAIRE	13
LISTE DES ABREVIATIONS	16
INTRODUCTION.....	19
CHAPITRE I ETAT DE L'ART.....	21
1. BIOLOGIE DU GRAIN DE POLLEN.....	22
1.1. Définition.....	22
1.2. Structure du grain de pollen	22
1.2.1. L'intine.....	23
1.2.2. L'exine	23
1.2.3. Revêtement pollinique	23
1.2.4. Les ouvertures	24
2. POLLENS ETUDIES	24
2.1. Arbres.....	25
2.2. Herbacées et graminées.....	27
2.3. Tableau récapitulatif des taxons	29
3. SURVEILLANCE ET METHODE D'ANALYSE DES POLLENS	30
3.1. Les périodes de pollinisation du pollen (Lille)	30
3.2. Instruments conventionnels de surveillance du pollen dans l'air	30
3.3. Les échantillonneurs personnels.....	33
3.4. Autres méthodes d'analyse des échantillons de grains de pollen	34
4. LA PRODUCTION POLLINIQUE DU BOULEAU	35

4.1.	Productivité pollinique par chaton	36
4.2.	Productivité pollinique par arbre	37
5.	LES CONCENTRATIONS POLLINIQUES.....	37
5.1.	Pollen dans l'air extérieur	37
5.1.1.	Concentrations dans l'atmosphère	37
5.1.2.	Exposition aux pollens et seuils d'apparition des symptômes.....	39
5.1.3.	Pollen sédimenté.....	41
5.2.	Le pollen allergisant en milieu intérieur	42
5.2.1.	Les vecteurs de transport des grains de pollen en milieu intérieur.....	42
5.2.2.	Concentrations des pollens en milieu intérieur	44
5.2.3.	Pollen de bouleau dans les poussières domestiques	46
5.2.4.	Exposition aux pollens en milieu intérieur	47
6.	VIEILLISSEMENT ATMOSPHERIQUE DU GRAIN DE POLLEN.....	48
6.1.	Altération de la fonction reproductive	48
6.2.	Modifications physiques des grains de pollen et libération des granules.....	49
6.3.	Modification de la fraction protéique des grains de pollen	49
6.4.	Changements dans la composition chimique élémentaire du grain de pollen	50
6.5.	Modifications de la fraction lipidique des grains de pollen.....	50
6.6.	L'impact de l'ozone sur l'allergénicité du pollen	51
6.7.	Formation de complexes pollen-particules dans l'atmosphère	54
6.8.	Présence des allergènes de pollen dans la fraction respirable de l'aérosol atmosphérique.....	57
6.9.	Rupture du grain de pollen	57
7.	L'ALLERGIE POLLINIQUE	59
7.1.	Généralités	59
7.2.	Manifestations cliniques.....	60
7.2.1.	Rhinite allergique.....	60
7.2.2.	Asthme allergique.....	60
7.2.3.	Mécanisme allergique.....	61
7.3.	Les facteurs de risque	62
7.3.1.	Age et sexe.....	62
7.3.2.	Prédisposition génétique	63
7.3.3.	La pollution atmosphérique.....	63
7.3.4.	Le changement climatique	63

7.3.5. Activité physique et mode de respiration.....	63
CHAPITRE II ETUDE PRELIMINAIRE	65
INTRODUCTION GENERALE.....	67
CHAPITRE II-A ANALYSE DE GRAINS DE POLLEN DE BOULEAU INDIVIDUELS PAR MICROSCOPIE RAMAN ET PAR MICROSCOPIE INFRAROUGE A TRANSFORMEE DE FOURIER (IRTF)	69
1. INTRODUCTION.....	69
2. GENERATION ET SUIVI DE L'OZONE	70
3. MICROSCOPIE RAMAN.....	71
3.1. Optimisation des conditions d'acquisition en microscopie Raman	71
3.2. Etude de la composition de la surface d'un grain de pollen avant et après exposition à l'ozone par microscopie Raman.....	74
4. MICROSCOPIE INFRAROUGE A TRANSFORMEE DE FOURIER (IRTF).....	79
5. CONCLUSION	81
CHAPITRE II-B DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE PRELEVEMENT INDIVIDUELLE PASSIVE DES GRAINS DE POLLENS EN MILIEU EXTERIEUR... 83	83
1. INTRODUCTION.....	83
2. TRAVAUX PRELIMINAIRES DE PRELEVEMENT ET D'ANALYSES DES GRAINS DE POLLEN	85
2.1. Analyses MEB	88
2.2. Conditions opératoires.....	88
2.3. Observation des pollens par microscopie électronique à balayage	89
2.4. Analyses MEB/EDX	93
3. DISCUSSION ET CONCLUSION	95
CHAPITRE III CAPACITE DE CAPTURE DE L'OZONE PAR LE POLLEN.....	97

1. INTRODUCTION.....	99
2. MATERIELS ET METHODES.....	100
2.1. Pollens étudiés	100
2.1.1. Pollen de bouleau (Lille).....	100
2.1.2. Pollen de bouleau (Bonapol)	100
2.1.3. Autres taxons (Bonapol)	103
2.2. Expositions du pollen <i>in vitro</i> à l'ozone	103
2.3. Génération et suivi de l'ozone.....	104
2.4. Paramètres susceptibles d'influencer la capacité de capture de l'ozone	105
2.4.1. Facteurs intrinsèques.....	105
2.4.2. Facteurs extrinsèques.....	106
3. ANALYSES STATISTIQUES.....	107
4. RESULTATS	108
4.1. Capture de l'ozone par les pollens	108
4.1.1. Calcul du taux de capture d'ozone par les pollens.....	108
4.1.2. Etude de répétabilité.....	108
4.1.3. Evolution de capture d'ozone	109
4.2. Effet de certains paramètres intrinsèques sur le taux de capture d'ozone par les pollens	112
4.2.1. Taux de lipides	112
4.2.2. Effet de la fraction lipidique sur le taux de capture d'ozone	114
4.2.3. Teneur en eau.....	117
4.2.4. Les corrélations entre les caractéristiques morphologiques du pollen et le taux de capture d'ozone	118
4.2.5. Relation entre le taux de capture d'ozone et la période de pollinisation et le risque allergique	119
4.3. Effet de certains paramètres extrinsèques sur le taux de capture de l'ozone par différents grains de pollen	119
4.3.1. L'effet de l'année de pollinisation sur le taux de capture d'ozone	119
4.3.2. Effet de la localisation de récolte du pollen.....	121
5. CONCLUSION	124

CHAPITRE IV MISE EN ŒUVRE D'UNE METHODE DE COMPTAGE DES GRAINS DE POLLEN DE BOULEAU EN MILIEUX INTERIEUR ET EXTERIEUR.....127

1. INTRODUCTION.....	129
2. MATERIELS ET METHODES.....	130
2.1. Mise au point de la méthode de comptage du pollen	130

2.1.1.	La méthode d'échantillonnage	130
2.1.2.	Extraction de la fraction lipidique des pollens fixés sur les lingettes	130
2.1.3.	Analyse par la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	131
2.1.4.	Argumentaire du choix des ions recherchés en mode SIR pour le dosage du pollen	132
2.1.5.	Composés caractéristiques du pollen de bouleau intact	134
2.1.6.	Composés caractéristiques du pollen de bouleau broyé	135
2.2.	Validation en laboratoire de la méthode de comptage du pollen	138
2.2.1.	Choix de l'étalon interne	138
2.2.2.	Poudre de dilution inerte à base de pollen de bouleau	139
2.2.3.	Validation de la méthode de comptage du pollen en laboratoire	140
2.2.4.	Conclusion.....	141
3.	ETUDE DE LA VARIABILITE DE LA FRACTION LIPIDIQUE DES GRAINS DE POLLEN DE BOULEAU ENTRE PLUSIEURS ARBRES ET SUR PLUSIEURS SAISONS POLLINIQUES	143
3.1.	Récolte des pollens de bouleau.....	143
3.2.	Identification et quantification des lipides externes des pollens de différentes années et de différentes localisations.....	143
3.3.	Profils lipidiques des pollens de bouleau des deux groupes : A et B.....	144
3.4.	Identification et quantification des lipides externes.....	148
3.4.1.	Variabilité des lipides pour le groupe A (même arbre, différentes années).....	148
3.4.2.	Variabilité des lipides pour le groupe B (même année, localisations différentes)	151
3.5.	Conclusion	154
4.	MILIEU EXTERIEUR : COMPTAGE DES POLLENS SEDIMENTES SOUS DES BOULEAUX.....	156
4.1.	Site d'échantillonnage.....	156
4.2.	Méthode d'échantillonnage	160
5.	MILIEU INTERIEUR : PRELEVEMENTS DE LA POUSSIERE DOMESTIQUE.	163
5.1.	Site d'échantillonnage.....	163
5.2.	Méthode d'échantillonnage	167
6.	VERIFICATION DE L'ETAT DES POLLENS	168
7.	ANALYSES STATISTIQUES.....	168
8.	RESULTATS DES COMPTAGES DE POLLEN.....	169

8.1. Evaluation du nombre et de l'état des grains de pollen prélevés en milieu extérieur	169
8.1.1. Estimation de la quantité de pollen (intact et rompu) sédimentée sous les arbres	169
8.1.2. Comparaison entre la quantité de pollen sédimentée sous et à 4 m de l'arbre	172
8.1.3. Estimation du pourcentage de pollens rompus	173
8.1.4. Observation en microscope électronique à balayage de grains de pollen prélevés au sol	174
8.1.5. Relation entre la sédimentation du pollen et les caractéristiques des arbres	178
8.1.6. Comparaison de la sédimentation avec les concentrations atmosphériques polliniques	179
8.1.7. Relation entre la quantité de grains de pollen sous les arbres et les facteurs météorologiques	182
8.1.8. Conclusion	183
8.2. Comptage de pollens intacts et rompus dans la poussière domestique	185
8.2.1. Estimation de la quantité de pollen (intact et rompu) dans la poussière domestique	185
8.2.2. Estimation de la quantité de pollen cumulée dans la poussière domestique	186
8.2.3. Etude de la relation entre les quantités de pollen cumulées en air intérieur et les caractéristiques de chaque habitation.....	187
8.2.4. Comparaison des quantités de pollen comptées en milieu intérieur avec la littérature.....	189
8.2.5. Estimation du pourcentage de pollens rompus dans la poussière domestique	192
8.2.6. Comparaison entre les concentrations de pollens dans l'atmosphère et en milieu intérieur	194
8.2.7. Comparaison entre la quantité de pollen trouvée dans la poussière domestique aspirée sur 1 m ² en milieu intérieur et la quantité de pollen déposée sur la vitre	195
8.2.8. Comparaison entre la quantité de pollen trouvée sur la vitre et les concentrations polliniques enregistrées en milieu extérieur.....	196
8.2.9. Conclusion.....	197
 CONCLUSION	 201
 RÉFÉRENCES	 205
 LISTE DES FIGURES	 227
 LISTE DES TABLEAUX.....	 231
 ABSTRACT.....	 233
 RÉSUMÉ	 235

GLOSSAIRE

Les sources du glossaire sont : le Grand dictionnaire terminologique de l'Office québécois de la langue française, le dictionnaire Antidote, et l'article « Recommended Terminology for Aerobiological Studies » (Galán et al., 2017).

Aérobiologie

Science des organismes biologiques dans l'air, de leur origine, de leur transport et de leur déposition, et de leur impact sur les êtres humains, les animaux ou les plantes.

Aéropalynologie

Partie de l'aérobiologie qui étudie plus précisément les grains de pollen.

Allergologie

Branche de la médecine qui s'intéresse aux allergies.

Allergie

Réaction anormale et exagérée du système immunitaire consécutive à un contact avec une substance étrangère (antigène).

Allergisant, allergénique

Capacité que possède une substance de provoquer une réaction allergique.

Allergénicité

Propriété spécifique des allergènes ou des antigènes de susciter la formation d'anticorps.

Allergène

Protéine responsable d'une réaction allergique à laquelle un sujet porteur d'un terrain allergique peut se sensibiliser. Un allergène est un antigène reconnu par des anticorps particuliers, les immunoglobulines E (IgE).

Bioaérosols

Particules aéroportées constituées d'organismes vivants ou provenant d'organismes vivants. Ce terme englobe les pollens, les spores de champignons ou encore les débris d'origine végétale ou animale.

Calendrier pollinique

Représentation graphique des caractéristiques annuelles des principaux pollens en suspension dans l'air enregistrées à un endroit donné (une moyenne sur un minimum de 5 ans est généralement recommandée).

Concentration atmosphérique en pollen (grains de pollen/m³ ou GP/m³)

Nombre de grains de pollen en suspension dans l'air par unité de volume d'air. La durée moyenne des concentrations peut varier, par exemple les périodes couramment utilisées sont d'un jour ou de deux heures (concentrations journalières et bihoraires). La période de calcul de la moyenne n'est pas reflétée

dans l'unité, qui reste toujours la quantité par volume, mais doit être mentionnée par rapport aux valeurs fournies.

Concentration d'allergènes

Quantité d'allergènes par unité de volume d'air exprimée en nanogrammes/m³ ou en picogrammes/m³.

Emission de pollen (Pollen/heure/m²)

C'est l'émission de pollen par heure et par zone. En fonction de l'utilisation et de la cible, les émissions de pollen sont parfois exprimées dans d'autres unités, telles que par plante ou par tonne de biomasse.

Flux pollinique

Nombre de grains que capte une surface par unité de temps ; il est exprimé par unité de volume d'air et par unité de temps.

Grain de pollen (GP)

Gamétophyte mâle de plantes à graines (angiospermes ou gymnospermes). Le pollen (singulier et pluriel) concerne un nombre quelconque de grains de pollen.

Plante angiosperme

Plante à fleurs du groupe des angiospermes, une sous-division du règne végétal, dont l'ovule est complètement enveloppé dans un ovaire fermé.

Plante gymnosperme

Plante à graines du groupe des gymnospermes, une sous-division du règne végétal, dont l'ovule est à nu non enveloppé dans un ovaire (contrairement aux angiospermes).

Production de pollen

Quantité de pollen produite par anthère dans les angiospermes ou par microsporange dans les gymnospermes. La production de pollen est parfois exprimée par fleur ou par inflorescence chez les angiospermes ou par cône mâle chez les gymnospermes.

Pollinisation

Émission, puis transport du pollen depuis les anthères jusqu'à son dépôt sur la partie réceptive de la fleur femelle (chez les angiospermes, la surface du stigmate ; chez les gymnospermes, la pointe de l'ovule).

Pollinose

Ensemble des manifestations allergiques survenant lors du contact du pollen avec les muqueuses (nasale, conjonctivale, bronchique) sensibilisées.

Pluie pollinique

Nombre de grains de pollen déposés par unité de surface horizontale pendant l'unité de temps considérée.

Phénologie

Étude de l'influence du climat sur l'occurrence d'un phénomène végétal saisonnier comme la feuillaison, la floraison, la pollinisation, la fructification...

Potentiel allergisant (pollen allergy potency)

Le potentiel allergisant d'une espèce végétale est la capacité de son pollen à provoquer une allergie pour une partie non négligeable de la population.

Réaction allergique

Une réaction allergique survient chez le sujet sensibilisé lorsque le corps répond à la présence d'un allergène (provenant par exemple des acariens, du pollen ou d'un aliment). Le système immunitaire commence à produire des anticorps pour tenter de protéger l'organisme. L'anticorps produit est appelé immunoglobuline E (IgE). Quand le corps entre en contact avec un allergène qu'il reconnaît, l'IgE se lie à lui. Ceci entraîne une libération de l'histamine et d'autres substances par les cellules du système immunitaire, et en conséquence une inflammation et d'autres symptômes (rhinite, conjonctivite, dermatite...).

Risque allergique d'exposition au pollen (RAEP)

Capacité d'un grain de pollen, seul ou associé à d'autres facteurs tels que la pollution de l'air, à avoir un impact sur la santé. Le risque d'allergie dépend de nombreux facteurs : la concentration atmosphérique en pollen, la production de pollen par plante, la date de la saison, les conditions météorologiques et les polluants de l'environnement. L'échelle de risque est de 0 à 5 selon le RNSA.

Sensibilisation allergique

C'est le fait de développer une réponse immunologique inadaptée vis-à-vis de certains antigènes, menant parfois en cas de réexposition à des manifestations cliniques de type allergique. La sensibilisation ne survient par définition que vis-à-vis de certains antigènes, appelés allergènes. Sur le plan immunologique, la sensibilisation est définie par la présence d'IgE spécifiques de l'allergène.

Saison pollinique

Période de l'année pendant laquelle le pollen est émis par les végétaux.

Saison principale du pollen (MPS Main Pollen Season)

Durée pendant laquelle les pollens sont présents dans l'atmosphère en concentrations significatives à un endroit. Il existe différentes méthodes pour définir le début et la fin de la saison principale. Le choix de la méthode la plus appropriée dépend de l'objectif principal de l'étude, par exemple en se concentrant sur la phénologie ou sur l'exposition au pollen. La méthode utilisée doit toujours être clairement identifiée.

LISTE DES ABREVIATIONS

ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
APM	Mesure Automatisée des Particules (Automated Particle Measurement)
BGP	Grain de pollen de bouleau (Birch Pollen Grain)
CGP	Chromatographie en phase gazeuse
EDS	Spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie
GCP	Granules Cytoplasmique de Pollen
CG-SM	Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse
CG-DIF	Chromatographie gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme
IgE	Immunoglobulines E
MEB	Microscopie électronique à balayage
NO ₂	Dioxyde d'azote
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
O ₃	Ozone
GP	Grain de pollen (Pollen Grain)
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
Phl p	Phleum pratense
PM	Particulate matter
RNSA	Réseau National de Surveillance Aérobiologique
ROS	Dérivé réactif de l'oxygène (Reactive Oxygen Species)
SIR	Mode particulier de fonctionnement du GCMS (Selected Ion Recording)
SO ₂	Dioxyde de soufre

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Notre atmosphère, même si elle semble claire, est en fait composée de milliards et de milliards de microorganismes métaboliquement actifs (bactéries, virus, moisissures, pollens...) et de particules inertes issues d'organismes vivants (microorganismes morts, toxines, ...). La plupart de ces particules présentent des dimensions qui les rendent respirables. Parmi les particules présentes dans l'air, les grains de pollen, particules porteuses du matériel génétique, sont nécessaires pour la reproduction des végétaux (pollinisation). Les grains de pollens sont aussi les principaux déclencheurs des allergies respiratoires. Ils sont responsables de la rhinite allergique saisonnière et contribuent à l'aggravation des symptômes de l'asthme.

En entrant en contact avec l'atmosphère, le grain de pollen (GP) subit ce qu'on l'appelle le vieillissement atmosphérique, ce qui peut causer des modifications de ces caractéristiques physiques, biologiques et chimiques. Les altérations des grains de pollen par la pollution atmosphérique sont multiples. Il est désormais acquis que les GP sont altérés par la pollution réelle ou simulée en laboratoire. La fragilisation de la paroi pollinique par la pollution atmosphérique a été étudiée pour son implication dans la rupture des grains de pollen ayant pour conséquence la dispersion des allergènes dans la fraction respirable de l'aérosol atmosphérique.

La littérature regorge d'exemples de modifications de GP provenant d'un grand nombre d'espèces végétales et soumis à un ensemble de polluants (seuls ou mélangés). Toutefois, les pollens étudiés ne sont pas soumis aux mêmes conditions expérimentales, ce qui rend la comparaison entre études peu évidente. De plus, la disponibilité limitée (quelques semaines par an) et la conservation de ces particules constituent une contrainte pour ces études. Certains auteurs ont montré par ailleurs que la sensibilité du grain de pollen à l'ozone dépend clairement de l'espèce et des conditions d'exposition.

La surveillance des pollens dans l'air constitue pour les professionnels de la santé et pour les personnes allergiques une problématique de premier ordre. Effectivement, la connaissance de la concentration des pollens est nécessaire au diagnostic et au traitement des maladies respiratoires saisonnières. Le capteur de Hirst, est le principal capteur utilisé en Europe pour l'enregistrement volumétrique continu des pollens dans l'air. L'identification et le dénombrement des grains de pollens recueillis sont basés sur la microscopie optique (la méthode conventionnelle). D'autres techniques, telles que les microscopies Raman et infrarouge, se prêtent à l'analyse des pollens, ces deux techniques ayant la capacité de donner une caractérisation biochimique des pollens.

La question qui se pose est : quel est l'état des grains de pollen respirés quotidiennement ? La connaissance de l'exposition individuelle (exposome) est un enjeu majeur pour éclaircir cette question.

Ce manuscrit débute par une étude bibliographique puis par une description de la biologie des pollens et la présentation des pollens étudiés. Le chapitre I fait l'état actuel des connaissances sur la surveillance et les méthodes d'analyse des pollens. Des données concernant la production pollinique du bouleau et leurs concentrations en environnement extérieur et intérieur sont également présentées dans ce chapitre. A partir des conclusions tirées de cette étude bibliographique, nous définissons les objectifs des études expérimentales réalisées dans le cadre de cette thèse.

Le chapitre II est découpé en deux parties, il constitue une étude préliminaire réalisée par des méthodes spectroscopiques et microscopiques (MEB-EDX, Raman et IRTF). La première partie concerne la

microscopie Raman et IRTF. L'objectif de cette partie est de déterminer les paramètres les plus adaptés pour la caractérisation de l'état d'altération du grain de pollen par l'ozone. Dans la seconde partie, nous présentons une nouvelle méthode d'étude de l'exposition individuelle par microscopie électronique à balayage.

Le chapitre III est consacré à la présentation de l'étude de la capacité de capture de l'ozone sur une vingtaine de taxons de pollen. C'est l'une des premières études de la littérature dans laquelle l'exposition d'un grand nombre de pollens à l'ozone a été faite dans les mêmes conditions expérimentales.

Nous exposons ensuite dans le chapitre IV de cette thèse une nouvelle méthode de comptage des grains de pollen de bouleau en milieux intérieur et extérieur. C'est une méthode de comptage rapide des pollens de bouleau, qui nous permet aussi de déterminer l'état du pollen (intact ou rompu) et de donner un aperçu du niveau de contamination des pollens par la pollution chimique. Cette étude a nécessité un travail sur la variabilité de la composition de la fraction lipidique de différents pollens de bouleau. Elle sera également présentée dans ce chapitre.

Enfin, une conclusion générale rappelle les résultats marquants de ce travail et les perspectives scientifiques.

CHAPITRE I ETAT DE L'ART

1. BIOLOGIE DU GRAIN DE POLLEN

1.1. Définition

Le grain de pollen est le gamétophyte mâle des végétaux supérieurs. Ce sont des grains microscopiques, généralement de forme sphérique. Leurs tailles varient entre 5 μm (pollen de myosotis) et 250 μm (pollen de conifères). Le pollen allergisant a généralement une taille comprise entre 15 et 40 μm (Guérin, 1993).

Le pollen est transféré de l'anthère au stigmate par différents mécanismes : transport par les insectes (entomophile), transport par le vent (anémophile) ou par l'eau (pour certaines espèces de plantes aquatiques). Le grain de pollen anémophile est libéré à maturité par déhiscence de l'anthère (Guérin, 1993). Il est produit au niveau des anthères à l'extrémité des étamines. Les plantes entomophiles produisent des pollens collants et huileux peu présents dans l'air ; leur risque allergique est généralement faible. Cependant, les plantes anémophiles produisent quant à elle des pollens qui se retrouvent en abondance dans l'air et qui constituent une source importante d'allergies respiratoires.

1.2. Structure du grain de pollen

Le cytoplasme du pollen contient des granules cytoplasmiques riches en protéines allergisantes appelées allergènes. Ces granules peuvent provoquer des réactions allergiques plus fortes que celles induites par le pollen (Behrendt and Becker, 2001; Motta et al., 2006; Taylor et al., 2002).

La paroi du grain de pollen est constituée, de l'intérieur vers l'extérieur, d'une paroi pecto-cellulosique qui comprend deux couches concentriques : l'intine et l'exine. Ces deux couches ont une composition chimique différente. L'exine est généralement imbibée d'un revêtement pollinique. Ce revêtement pollinique est connu dans la littérature sous le nom de « pollen coat » ou « pollenkitt » (Bashir et al., 2013a; Dickinson et al., 2000). La paroi des grains de pollen possède également des ouvertures appelées apertures, qui peuvent être des pores ou des sillons (**Figure 1**).

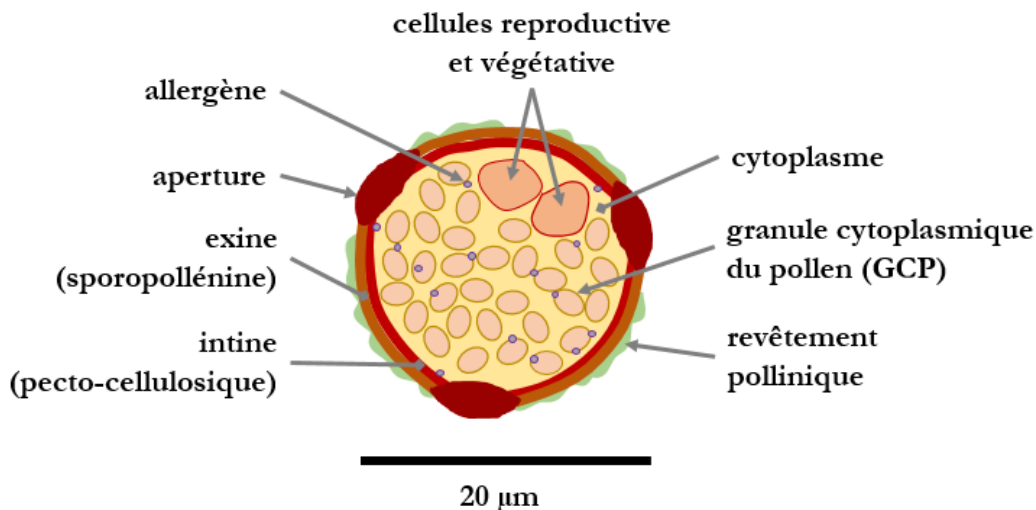


Figure 1: Structure d'un grain de pollen d'angiosperme (Thèse J. Farah, 2018).

1.2.1. L'intine

L'intine constitue la couche interne de la paroi. Elle délimite le cytoplasme du pollen qui contient les granules cytoplasmiques riches en protéines allergisantes (Grote, 1999; Grote et al., 1993) (détaillé dans la partie 6.9 de ce chapitre). Elle forme la surface du grain de pollen au niveau des pores où la surface de l'exine est fortement réduite (Knox, 1984). Généralement tendre et peu résistante, l'intine est de nature pectocellulosique : elle est composée de pectine, cellulose et hémicellulose (Heslop-Harrison, 1968). Elle peut également contenir des allergènes (Scott et al., 2004). Cette couche interne joue un rôle important dans la pollinisation : elle est essentielle pour la reconnaissance pollen-stigmate et la formation du tube pollinique (Knox, 1984).

1.2.2. L'exine

Les grains de pollen sont entourés par une couche externe résistante qui s'appelle l'exine. Elle est un véritable exosquelette constitué d'un copolymère de phénols et de dérivés d'acide gras appelé sporopollénine. Ce dernier est formé par la polymérisation oxydative des caroténoïdes et des esters caroténoïdes (Brooks and Shaw, 1978; Shaw, 1971). La sporopollénine est l'un des matériaux chimiques d'origine végétale les plus stables. Les propriétés de cette substance très originale confèrent aux grains de pollen une grande résistance aux agressions mécaniques et chimiques (Meuter-Gerhards et al., 1999).

L'exine comprend deux couches, l'endexine et l'ectexine externe. Ces deux couches sont caractéristiques du grain de pollen de chaque espèce végétale. L'ornementation de l'exine permet l'identification du pollen, parfois jusqu'à l'espèce, mais le plus souvent jusqu'au genre ou la famille.

1.2.3. Revêtement pollinique

Le revêtement pollinique est une couche imperméable qui recouvre l'exine. Cette matrice possède de nombreuses appellations dans la littérature : manteau pollinique (*pollen coat*), pollenkitt et tryphine (Bashir et al., 2013a; Pacini and Hesse, 2005). Le revêtement pollinique est sécrété par les cellules du tapetum, après la dégénérescence cellulaire de celui-ci (Heslop-Harrison, 1968). Cependant, quelques différences existent entre le pollenkitt et la tryphine, le terme *pollen coat* est le terme générique utilisé par les auteurs pour désigner le revêtement pollinique (Pacini and Hesse, 2005).

Le revêtement pollinique peut constituer jusqu'à 10-15% de la masse totale d'un grain de pollen (Piffanelli et al., 1997). Il est formé de lipides et de protéines (Abed El-Azim and Khalil, 2015; Bashir et al., 2013a; Henricsson et al., 1996; Naas et al., 2016; Piffanelli et al., 1997; Zhu et al., 2018). Le revêtement pollinique protège les gamétophytes mâles de la déshydratation au cours de leur transport des anthères jusqu'au stigmate (Dickinson et al., 2000; Swanson et al., 2004).

Certaines études montrent que les lipides et les protéines du revêtement pollinique peuvent agir sur le système immunitaire (Bashir et al., 2013a; Traidl-Hoffmann et al., 2002). En effet, suite à l'inhalation du grain de pollen, le revêtement pollinique constitue le premier contact avec la muqueuse des voies respiratoires.

1.2.4. Les ouvertures

Les grains de pollen possèdent sur leurs parois des ouvertures germinales appelées des ouvertures (pores ou sillons). Ces ouvertures permettent le passage du tube pollinique lors de la germination du grain de pollen sur le stigmate. Elles permettent également la libération des substances solubles lorsque le grain de pollen rencontre une surface humide. A ces endroits de la surface du grain de pollen, l'exine est manquante (Thanikaimoni, 1986). Les ouvertures possèdent également une fonction mécanique, car elles permettent l'accommodation des variations de volume (Payne, 1972; Wodehouse, 1935). Le nombre d'ouvertures peut varier de zéro (pour les pollens inaperturés) à plus d'une centaine, même si la plupart des espèces ont un nombre d'ouvertures généralement inférieur ou égal à six (Prieu, 2015).

Le pollen sans ouverture (sans sillon ni pore) est appelé inaperturé, comme par exemple le pollen de pin. Un pollen est dit poré lorsqu'il présente un pore, comme le pollen de fléole des prés, ou des pores. Un pollen est dit colpé (avec sillons), quand des lignées germinales sont réparties d'une façon équatoriale ou sur toute la surface du pollen, comme le pollen d'érable. En outre, un pollen est dit coloporé quand les ouvertures germinales présentent sur sa surface sont composites (sillon avec pores), comme le pollen de saule (**Figure 2**).

Selon le nombre d'ouvertures germinales, une distinction est faite entre mono- (un), tri- (trois) ou poly- (plus de trois dans le plan équatorial) (Halbritter et al., 2018).

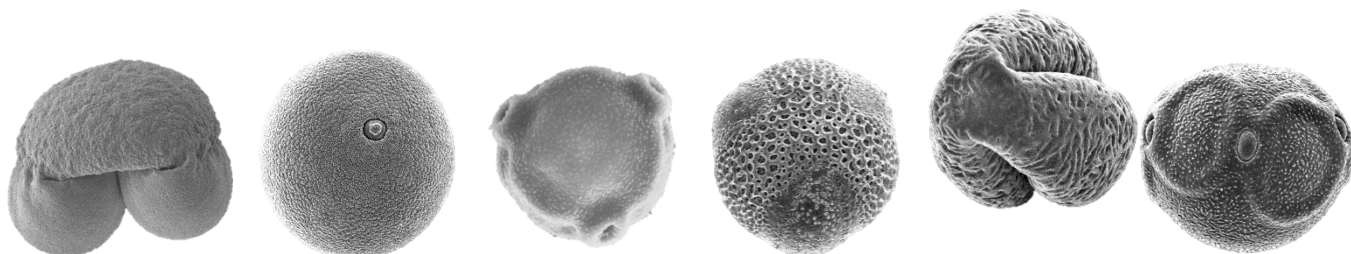


Figure 2: Différentes formes des pollens. De gauche à droite, pollen de pin (inaperturé), pollen de fléole des prés (monoporé), pollen de bouleau (triporé), pollen de saule (tricolporé), pollen d'érable (tricolpé), pollen d'aulne (pentaporé) (PalDat, 2022).

2. POLLENS ETUDIÉS

Les taxons originellement retenus pour ce travail étaient les suivants : le bouleau et la fléole des prés. Ils s'inscrivent parmi les plus allergisants en France et en Europe et font l'objet de nombreux articles scientifiques. L'étude sur la fléole des prés n'a pas pu être effectuée du fait des perturbations liées à la pandémie et donc nous avons concentré nos efforts sur le bouleau. En outre, dans le chapitre III de cette thèse nous avons élargi le spectre de notre travail en étudiant 21 autres types de pollens. Cette partie présente brièvement chaque taxon pour lequel la capture de l'ozone a été mesurée dans ce travail.

2.1. Arbres

L'érable

Les érables appartiennent à la famille des Acéracées. Il existe plus de 100 différentes espèces d'érable dans le monde. Nous nous intéressons dans cette thèse à l'*Acer negundo*. Cet arbre peut atteindre 15 à 20 m de hauteur. Il est originaire du nord des Etats-Unis et du Canada. C'est un arbre à pollinisation anémophile-entomophile. La période de pollinisation est d'avril à mai. Il possède un pouvoir allergisant moyen.

L'aulne

Les aulnes font partie de la famille des Bétulacées. Il existe 2 principales espèces : l'aulne glutineux (*Alnus glutinosa*) et l'aulne blanc (*Alnus incana*). Nous avons travaillé dans cette thèse sur l'aulne glutineux. L'aulne est un arbre à croissance lente, pouvant atteindre une hauteur de vingt mètres. Les fleurs mâles sont regroupées en chatons. La floraison a habituellement lieu dès la fin janvier et se poursuit jusqu'en avril. C'est une des premières floraisons anémophiles de l'année. Son pouvoir allergisant est fort.

Le bouleau

Le bouleau appartient à la famille des *Betulaceae* (Bétulacées). Cette famille regroupe des plantes dicotylédones comprenant 157 espèces. Elles sont réparties dans l'hémisphère Nord dans les régions tempérées et dans les régions froides. Le bouleau est un arbre pouvant atteindre 30 mètres de hauteur. On distingue plusieurs espèces en Europe : le bouleau verruqueux (*Betula pendula*) qui est le plus abondant, le bouleau pubescent (*Betula pubescens*) rencontré dans les régions humides et le bouleau nain (*Betula nana*) qu'on retrouve ponctuellement dans des zones montagneuses froides. Son tronc est cylindrique de couleur blanche. Ses feuilles caduques, triangulaires, sont disposées de façon alternée (Guérin, 1993). C'est un arbre largement présent dans la région Hauts-de-France.

Les grains de pollens de bouleau sont généralement isopolaires et sphériques. Ils sont ornementés, avec une taille comprise entre 18 et 25 μm . Les grains de pollen de bouleau possèdent trois pores. Ces trois pores sont équatoriaux et circulaires de 3 μm (Guérin, 1993).

Le bouleau fait l'objet de nombreuses études en raison de son fort potentiel allergisant. Le pollen de bouleau possède les aéroallergènes les plus problématiques, qui peut conduire à une hospitalisation sévère pour asthme au printemps (Dales et al., 2008). C'est aussi le pollen d'espèces arborescentes le plus abondant dans l'air en France surtout dans le Nord de la France (RNSA). Dans les régions où le bouleau est bien présent, la quantité annuelle des grains de pollens inhalée varie entre 0,3 à 0,6 mg (Guérin, 1993). Finalement, non seulement le pollen de bouleau peut libérer des allergènes puissants dans l'atmosphère, tels que Bet v1, v2 et v4, qui sont reconnus comme posant un risque pour les asthmatiques (Schäppi et al., 1997), mais également un mélange de substances pro-inflammatoires connu sous le nom de PALMs (Pollen-Associated Lipid Mediators) et d'adénosine (Traidl-Hoffmann et al., 2003) pouvant même affecter les sujets non-atopiques. A noter que le Bet v1 est l'allergène majeur de bouleau, il est responsable de 95% de l'allergénicité des grains de pollen de bouleau (Lavaud et al., 2014).

Le noisetier

Le noisetier est un arbuste de la famille des Corylacées provenant de la région montagneuse d'Avenline, en Italie, d'où le nom latin *Corylus avellana*. Arbuste anémophile de 3 à 5 m de hauteur, c'est le végétal forestier dont la floraison est la plus précoce, habituellement de janvier à mars. C'est une espèce monoïque puisque ses fleurs sont unisexuées (mâles ou femelles) et portées par le même arbre. De plus, le pollen est auto-incompatible, c'est-à-dire qu'il ne féconde pas les fleurs femelles portées par l'arbre qui le libère. Il possède un pouvoir allergisant fort.

Le cyprès

Le cyprès est un conifère de la famille des Cupressacées. Les espèces les plus présentes sont : le cyprès commun (*Cupressus sempervirens*), le cyprès d'Arizona (*Cupressus Arizonica*), et le cyprès de Leyland (*Cupressocyparis Leylandii*) utilisé souvent pour les haies. Notre travail est mené sur le *Cupressus sempervirens*. Ces conifères à feuilles persistantes peuvent mesurer de 5 à 40 m de hauteur. Très résistant au froid hivernal comme à la sécheresse, c'est le seul arbre résineux allergisant. La floraison commence de fin février jusqu'à avril, avec une quantité très importante de pollen transportée par le vent dans le quart Sud-Est de la France en raison d'une humidité plus faible que dans notre région du nord. Le pollen de cyprès est de pouvoir allergisant fort.

Le hêtre

Le hêtre est une espèce d'arbre appartenant à la famille des fagacées. L'espèce la plus commune en Europe est le *Fagus sylvatica*. Le hêtre est un arbre anémophile, il peut atteindre jusqu'à 40 m de hauteur. La période de pollinisation est d'avril à mai, avec des quantités de pollen restreintes la plupart du temps. Une importante pollinisation prend lieu tous les 3 à 8 ans seulement. Il possède un pouvoir allergisant moyen.

Le frêne

Le frêne est un arbre appartenant à la famille des Oléacées. Le frêne commun (*Fraxinus excelsior*) est le plus répandu sur le territoire français. Cet arbre peut atteindre 25 à 40 m de hauteur. La floraison a lieu en même temps que le bouleau de mars à mai avec une grande quantité de pollen anémophile. Il possède un pouvoir allergisant fort.

L'olivier

L'olivier est un arbre appartenant à la famille des Oléacées. L'*Olea europaea* est le plus répandu sur la partie méditerranéenne du territoire français. Cet arbre peut atteindre une quinzaine de mètres de hauteur. La pollinisation est anémophile. La floraison est plutôt courte, elle se déroule une fois par an en mai pendant à peine une semaine. La plupart des variétés d'oliviers sont auto-fertiles, ce qui signifie qu'il est possible d'obtenir des fruits avec un seul arbre. Il possède un pouvoir allergisant fort.

Le pin

Le pin est un conifère appartenant au genre *Pinus*, de la famille des Pinacées. Il existe au moins 111 espèces. Celui qui nous intéresse ici c'est le *Pinus halepensis* ou le pin d'Alep. Sa répartition géographique est essentiellement autour des côtes méditerranéennes et plus particulièrement en Afrique du Nord et en Espagne. C'est un arbre qui peut atteindre 10 à 15 m de hauteur. Ce sont des espèces monoïques.

La pollinisation est anémophile. La période de pollinisation se déroule en avril. Son potentiel allergisant est faible.

Le platane

Le platane est un grand arbre hybride appartenant à la famille des Platanacées, avec le platane commun ou platane à feuilles d'érable (*Platanus hispanica* × *Platanus acerifolia*), le plus courant en France. Le platane est un arbre anémophile, il peut atteindre 30 m de hauteur. La période de pollinisation est plutôt courte, d'avril à mai, avec des quantités de pollen importantes localement. Il possède un pouvoir allergisant moyen.

Le peuplier

Les peupliers sont des arbres du genre *Populus* de la famille des Salicacées. Ces arbres sont à croissance rapide. Il existe 35 espèces différentes, notre travail est mené sur le peuplier noir (*Populus nigra*). Cet arbre peut atteindre 20 à 30 m de hauteur. Ce sont des espèces dioïques. Les fleurs mâles sont regroupées en chatons. La floraison a habituellement lieu en mars et se poursuit jusqu'en avril. La pollinisation est anémophile. Son pouvoir allergisant est faible.

Le chêne

Le chêne est un arbre de la famille des fagacées ou cupulifères. Il existe plusieurs espèces et les plus répandues en France sont *Quercus petraea*, *Quercus pubescens*, *Quercus pyrenaica* et *Quercus robur*. Notre travail est mené sur le *Quercus robur*. C'est un arbre anémophile de 30 à 50 m de hauteur. La période de pollinisation a lieu d'avril à mai, avec des quantités de pollen importantes émises dans l'air. Il possède un pouvoir allergisant moyen.

Le saule

Le saule (*Salix*) est un genre d'arbre (et grands arbustes) appartenant à la famille des Salicacées. Il comprend 360 espèces environ. Les espèces les plus répandues sont *S. caprea*, *S. atrocinerea*, *S. aurita*, *S. cinerea*, *S. purpurea*, *S. alba* et *S. fragilis*. Nos travaux sont menés sur le *Salix caprea*. C'est un arbre anémophile de 6 à 14 m de hauteur, la floraison se déroule habituellement de février à avril avec des quantités de pollen importantes localement. Il possède un pouvoir allergisant moyen.

2.2. Herbacées et graminées

L'ambroisie

L'herbe à poux, ou ambroisie (*Ambrosia artemisiifolia*) est une plante de la famille des Astéracées, originaire d'Amérique du Nord. Elle a été introduite en France sans doute à cause de graines présentes dans un lot de semences fourragères provenant d'Amérique du Nord. Cette plante, considérée comme mauvaise herbe, a la particularité de se développer très rapidement et d'être très résistante, c'est la raison pour laquelle il est nécessaire de l'éliminer rapidement avant son installation. L'ambroisie produit de très grandes quantités de pollens dispersées par le vent. La floraison tardive, en août et septembre, prolonge la saison du pollen lors de la diminution des pollens de graminées. Son pollen possède un pouvoir allergisant fort.

L'armoise

L'armoise est une plante herbacée vivace de la famille des Astéracées. Nous travaillons sur l'*Artemisia vulgaris*. L'armoise est une plante à odeur désagréable pouvant mesurer jusqu'à 2 m de hauteur. La pollinisation est anémophile et a lieu habituellement entre juillet et septembre. Son pollen possède un pouvoir allergisant moyen.

La Marguerite

La marguerite (*Chrysanthemum leucanthemum*) est une plante herbacée vivace de la famille des Astéracées. C'est une plante à fleur avec une hauteur d'environ 80 cm. La floraison est entomophile et se déroule de juin à décembre. Les allergies causées par cette plante sont uniquement de type dermatite (le pollen entomophile ne déclenche généralement pas d'allergies respiratoires).

Le plantain

Le plantain est une herbacée vivace rustique originaire d'Europe de la famille des Plantaginacées. Il y a trois espèces dominantes dans la région du nord, le plantain lancéolé (*Plantago lanceolata*), le plantain à larges feuilles, ou plantain majeur (*Plantago major*), et le plantain moyen (*Plantago media*). Nous nous intéressons dans cette thèse à étudier le plantain lancéolé (*Plantago lanceolata*). La dispersion du pollen de cette plante est effectuée par le vent et par les insectes, c'est une plante ambophile (anémophile). La quantité de pollen dans l'air est relativement restreinte. La période de floraison est fonction de l'espèce, elle s'étend d'avril à septembre pour le plantain lancéolé. Le plantain majeur fleurit de juin à septembre, alors que le plantain moyen possède une période plus restreinte, de fin avril à juillet. La majorité des personnes allergiques à ce type de pollen le sont également au pollen de graminées. Il possède un pouvoir allergisant modéré.

La pariétaire

La pariétaire officinale (*Parietaria officinalis*) est une plante herbacée vivace, de la famille des Urticacées. La floraison s'étale d'avril-mai à octobre. Cette plante peut atteindre 10 à 70 cm de haut. Elle est plus abondante dans le sud de l'Europe qu'au nord. En France, elle est présente dans la région méditerranéenne et à l'Ouest ; elle est beaucoup plus rare dans le Nord. La pollinisation est anémophile. La floraison prend lieu en juillet. Son pollen est moyennement allergisant.

L'oseille

Les oseilles sont des herbacées du genre *Rumex* de la famille des Polygonacées. Cette plante atteint 10 à 50 cm de haut. Il existe plusieurs espèces, parmi elles l'oseille commune ou surette (*Rumex acetosa*), la rhubarbe des moines (*Rumex alpinus*) et la petite oseille (*Rumex acetosella*). Nous travaillons sur le *Rumex acetosella*. La plante est dioïque. La durée de floraison est longue, de mai à octobre, avec une quantité de pollen dans l'air relativement restreinte. Son pouvoir allergisant est modéré.

L'ortie

Les orties appartiennent à la famille des Urticacées. Il existe une trentaine d'espèces en Europe. Nous nous intéressons à l'*Urtica dioica*. Elle est appelée également la grande ortie. C'est une plante vivace de 20 à 200 cm de hauteur. Elle est considérée très envahissante. Son mode de pollinisation est anémophile. Son pouvoir allergisant est faible.

La fléole des prés

La fléole des prés (*Pbleum pratense*) appartient à la famille des Poacées (graminées). Cette famille regroupe 12 000 espèces. Elles sont réparties partout, depuis les zones équatoriales jusqu'aux cercles polaires. Les graminées sont des plantes pouvant atteindre 1,5 m de haut. La pollinisation de la fléole des prés se déroule du printemps et tout l'été dans les régions de l'Europe méridionale. De par sa large distribution géographique, elle possède un pouvoir allergisant très fort. Elle libère de plus de grandes quantités de grains de pollen. La taille du grain de pollen de fléole des prés est de 35 μm . Leur dispersion dans l'air est importante. Les allergènes majeurs des graminées sont les Phl p 1 et Phl p 5. Ces deux allergènes sont responsables de 80% de l'allergénicité des grains de pollen des graminées (Niederberger et al., 1998; Valenta et al., 1999; van Ree et al., 1998).

2.3. Tableau récapitulatif des taxons

Le **Tableau 1** reprend les informations caractéristiques des 22 pollens ayant fait l'objet d'une étude de la capture d'ozone (chapitre III). Les informations suivantes sont récapitulées : l'année de récolte (année de collecte pour le lot disponible au laboratoire), le niveau de risque allergique selon l'échelle du RNSA, la période de démarrage de la pollinisation (mois de l'année), le type et le nombre d'ouvertures et enfin la taille moyenne du pollen (μm).

Tableau 1: Récapitulatif de quelques caractéristiques des différents pollens étudiés dans cette thèse.

Genre et espèce	Année de récolte	Potentiel allergisant (RNSA)*	Période de pollinisation (mois de démarrage)	Types Apertures (nombre de pores)	Taille du pollen (μm)
Arbres					
<i>Acer negundo</i>	2018	2	3	Tricolpé (3)	26
<i>Alnus glutinosa</i>	2017	3	1	Pentaporé (5)	26,2
<i>Betula pendula</i>	2016	3	3	Tripore (3)	28,5
<i>Corylus avellana</i>	2018	3	1	Tripore (3)	25,4
<i>Cupressus sempervirens</i>	2009	2	3	Inaperturé (0)	29,8
<i>Fagus sylvatica</i>	2016	2	4	Tricolporé (3)	48,6
<i>Fraxinus excelsior</i>	2018	3	3	Tricolpé (3)	27,3
<i>Olea europaea</i>	2017	3	5	Tricolporé (3)	21-25
<i>Pinus halepensis</i>	2014	1	4	Vésiculé	88
<i>Platanus x hispanica</i>	2011	2	4	Tricolpé (3)	20–30
<i>Populus nigra</i>	2016	1	3	Inaperturé (0)	16
<i>Quercus rubra</i>	2018	2	4	Tricolporé (3)	30
<i>Salix caprea</i>	2007	2	3	Tricolporé (3)	17,6
Herbacées					
<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	nd	3	8	Tricolporé (3)	25
<i>Artemisia vulgaris</i>	2018	2	7	Tricolporé (3)	26,2
<i>Chrysanthemum leucanthemum</i>	nd	0	6	Tricolpé (3)	27-33
<i>Plantago lanceolata</i>	2018	1	4	Péripore (>6)	34,8

<i>Parietaria officinalis</i>	2017	2	7	Triporé (3)	11-15
<i>Rumex acetosella</i>	2018	1	4	Tricolporé (3)	21-25
<i>Urtica dioica</i>	2017	1	6	Triporé (3)	20,3
Graminées					
<i>Phleum pratense</i>	2018	3	6	Monoporé (1)	36-40

nd : information non disponible

*Echelle du potentiel allergisant : 0=nul ; 1=faible ; 2=modéré ; 3=fort

3. SURVEILLANCE ET METHODE D'ANALYSE DES POLLENS

La surveillance des pollens dans l'air sert de support initial aux patients allergiques et aux médecins allergologues, pour mettre en œuvre une prévention efficace. Ces informations sont diffusées régulièrement par les réseaux nationaux de surveillance qui sont spécifiques à chaque pays. Cette surveillance est réalisée par des instruments de prélèvements de pollen (capteur volumétrique de type Hirst le plus souvent). Ensuite, les pollens collectés sont identifiés le plus souvent par microscopie optique.

3.1. Les périodes de pollinisation du pollen (Lille)

A Lille, la saison pollinique s'étend de janvier jusqu'à septembre (RNSA, 2018). D'une manière générale il existe trois saisons polliniques à Lille (**Tableau 2**) : celle des arbres se déroule de janvier jusqu'à la fin de mai, celle des graminées de mi-avril jusqu'à la fin de juillet et celle des herbacées de juillet jusqu'à la fin de septembre.

Tableau 2: Calendrier pollinique à Lille.

	Janvier	Février	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet	Août	Septembre
Arbres									
Graminées									
Herbacées									

3.2. Instruments conventionnels de surveillance du pollen dans l'air

Plusieurs types d'instruments sont utilisés pour mesurer la concentration des pollens dans l'air. Deux principaux capteurs sont déployés actuellement dans le monde : les capteurs passifs qui sont basés sur le principe de la sédimentation ou de l'impaction (capteurs rotatifs) et les capteurs actifs qui sont basés sur le principe de l'aspiration d'air ambiant. Le piégeage des grains de pollen sur un capteur actif peut se faire par filtration ou par impaction. Ces capteurs permettent une quantification et une caractérisation de l'exposition humaine. Ils constituent aussi un moyen pour évaluer l'efficacité des mesures de prévention et de protection de la santé mises en place (politique de réduction de la présence de végétaux allergisants comme pour l'ambrosie par exemple).

Les capteurs volumétriques sont basés sur le **capteur Hirst**. Ce capteur est largement utilisé dans les réseaux de surveillance de la concentration des grains de pollen dans l'atmosphère. L'air est aspiré à travers une buse de 2 mm sur 14 mm à un débit d'air constant d'environ 10 L/min (**Figure 3**). Les particules aspirées sont récoltées sur une bande enduite d'une substance adhésive fixée sur un tambour

rotatif associé à un mécanisme d'horlogerie faisant avancer la bande de 2 mm par heure (Hirst, 1952). Après une semaine de prélèvements, la bande est découpée en segments équivalents à une journée. Chaque segment est recouvert d'une solution de montage pour être analysé directement par microscopie optique (Galán et al., 2007; Hasnain et al., 2007; Sofiev et al., 2009).



Figure 3 : Capteur volumétrique de type Hirst.

Pour que les capteurs soient représentatifs de l'exposition des habitants d'une région assez large dans une masse d'air bien mélangée, le capteur de type Hirst doit être installé en ville sur des terrasses d'immeubles de préférence à une hauteur comprise entre 15 et 20 m. Il est généralement admis qu'un capteur de Hirst installé selon ces recommandations fournit des données représentatives d'une zone correspondant à environ 20 à 30 km de rayon (Hirst, 1952).

Aux Etats-Unis, les **capteurs rotatifs** à impaction sont largement utilisés (**Figure 4**). La tête de prélèvement est constituée de deux lamelles en plastique de 32 mm. Ces deux lamelles sont enduites d'un adhésif. La durée réelle d'échantillonnage est de 144 min/jour. Les deux lamelles tournent en décrivant un cercle à une vitesse importante de 80 km/h. Cette vitesse de rotation permet de minimiser les effets de la vitesse et de la direction du vent (Frenz, 2000). Le débit d'échantillonnage de ce capteur est élevé et n'est pas sensible aux variations de direction de vent. De plus, il doit être utilisé sur des périodes de temps courtes afin d'éviter la saturation des lamelles.



Figure 4 : Capteur rotatif de type Cour (Calleja et al., 2005).

Il existe encore d'autres types de capteurs dont l'utilisation est peu répandue en raison de leur performance insatisfaisante. Par exemple, le **capteur Durham** est un capteur gravimétrique (**Figure 5**). Il est basé sur le principe de sédimentation pollinique.

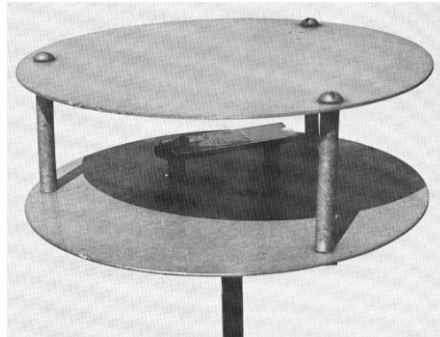


Figure 5 : Capteur gravimétrique Durham (Calleja et al., 2005).

Le dépôt est souvent collecté sur des lames de microscopie ($2,5 \times 7,5$ cm) déposées entre deux plaques circulaires horizontales et recouvertes d'une substance collante (graisse de silicone par exemple) (Durham, 1946). La lame est enduite d'une substance adhésive puis analysée par examen microscopique. Les résultats sont exprimés en grains de pollen par mètre cube d'air. Malgré leur simplicité, l'interprétation des résultats est difficile en termes de quantité de pollen dans l'air car la capture ne peut pas être reliée au volume échantillonné. Le dépôt mesuré dépend de la taille et de la forme de la surface d'échantillonnage (May and Clifford, 1967). La localisation de ces capteurs nécessite de répondre à différents critères logistiques, physiques et géographiques afin d'assurer une bonne représentativité des données polliniques.

Le capteur Tauber- est un capteur passif qui repose aussi sur le principe de sédimentation. Il recueille les pollens par la gravité ainsi que par la turbulence de l'air (Tauber, 1974). Ce capteur présente plusieurs déclinaisons. Son couvercle est décalé d'un trou de 5 cm de diamètre. Cette méthode de prélèvement présente les mêmes inconvénients que celui de Durham, particulièrement une très forte sélection des pollens les plus gros (Latorre et al., 2008; Levetin et al., 2000) .

En général, la surveillance aérobiologique des grains de pollen en Europe se fait par le capteur Hirst qui est le capteur opérationnel le plus utilisé (entre 400 et 500 stations en Europe). Pourtant, ces capteurs rapportent des données à une situation déjà révolue au moment où les informations sont diffusées. Effectivement, il faut attendre 7 jours entre le début du fonctionnement d'un tambour entouré d'une bande de cellophane, sur laquelle sont impactés les pollens présents dans l'air ambiant, et son relevé, puis encore environ 2 jours pour qu'il soit envoyé à l'analyste, que la bande soit analysée et les résultats diffusés. Or, pour plusieurs pollens allergisants, une très forte variabilité interannuelle existe pour les dates de début de pollinisation ou d'apparition de concentrations susceptibles de gêner les populations allergiques. Cela montre qu'un calendrier pollinique moyen ne suffit pas à déterminer la date à laquelle doit débuter un traitement préventif, à moins de l'initier plus tôt.

Toutes ces méthodes de prélèvement nécessitent une étape préliminaire de calibration afin d'avoir des mesures représentatives. De surcroît, elles reposent entièrement sur un examen manuel au microscope. Cette méthode, bien documentée et standardisée dans la littérature, exige un investissement en temps très important et nécessite du personnel qualifié.

Selon certains auteurs, les concentrations des grains de pollen dans l'air peuvent différer au sein d'une même zone urbaine (Fernández-Rodríguez et al., 2014a; Rodríguez-Rajo et al., 2010) et selon la hauteur à laquelle est placée le capteur (Fernández-Rodríguez et al., 2014b; Spiekma et al., 2000). Les comptes polliniques donnés par les capteurs classiques ne donnent probablement qu'une idée approximative de l'exposition réelle des personnes. En effet, certaines études ont révélé que la concentration des grains de pollen enregistrée dans la zone de respiration humaine est différente de la concentration enregistrée par les capteurs placés sur les toits des bâtiments à des hauteurs élevées (Peel et al., 2013; Tormo Molina et al., 2002). Selon Rojo et al. (2019), la concentration des grains de pollen enregistrée à des hauteurs faibles (autour de 1.5 m) est généralement plus élevée que les concentrations enregistrées à des hauteurs supérieures à 33 m dans un ratio allant de 1 à 4 (Rojo et al., 2019). Une étude sur le pollen d'ambrosie a montré que les concentrations relevées diffèrent significativement selon la position en hauteur du capteur, notamment entre un capteur installé au sol, qui est censé capter ce que respire un individu se déplaçant dans une rue, et un autre placé à 15 m de hauteur (Alcázar and Comtois, 2000).

Les plus fortes concentrations observées proche du sol peuvent être dues à la proximité immédiate des sources de pollen, à une faible élévation verticale du pollen ou encore à la présence de grains de pollen sur le sol (sédimentation du pollen) susceptibles d'être dispersés facilement par le vent ou une turbulence liée au passage d'un véhicule par exemple. Par conséquent, les seuils de déclenchement d'une réaction allergique chez les personnes sensibilisées devraient être basés sur des capteurs représentatifs de l'exposition réelle (De Weger et al., 2013). Les capteurs de pollen pour l'air extérieur sont par ailleurs peu adaptés à l'air intérieur du fait de leur fort encombrement.

3.3. Les échantillonneurs personnels

Un capteur situé à une hauteur représentative de l'exposition réelle (à 1,5-1,7 m du sol) semblerait être la solution la plus efficace pour évaluer le plus fidèlement ce que peut respirer un individu. Par ailleurs, pour que la concentration mesurée soit représentative de l'exposition réelle, il faut que l'échantillonnage se fasse dans la zone de respiration. Cet échantillonnage est réalisé par des échantillonneurs individuels portatifs. Ces échantillonneurs sont basés sur le principe d'aspiration. Ils sont généralement portés par un individu pour caractériser l'air qu'il inhale. En effet, l'exposition de chaque personne varie en fonction de différents facteurs : mode de vie, microenvironnement, activités quotidiennes, etc. Il existe de nombreux types d'échantillonneurs personnels comme le Partrap FA52, le Personal Air Sampler PAS, l'échantillonneur volumétrique personnel Burkard, le Personal AeroAllergen Sampler PAAS ou encore le Nasal Air Sampler NAS (Fiorina et al., 1997; Graham et al., 2000; Okuda et al., 2005; Peel et al., 2013; Riediker et al., 2000; Sehlinger et al., 2013; Yamamoto et al., 2007). La littérature présente de nombreuses études sur les échantillonneurs personnels de pollen. Malheureusement, ces capteurs ont des méthodes d'échantillonnage et des débits différents. En outre, l'efficacité de collecte de l'échantillonneur, son emplacement (nez, poitrine, hanche, etc...) et les durées d'exposition rendent les résultats difficilement comparables les uns avec les autres (Berger et al., 2014). Il n'existe effectivement pas de normes en ce qui concerne la surveillance pollinique avec ces échantillonneurs portatifs (Berger et al., 2014). En outre, ces capteurs sont basés sur des comptages de grains par microscopie, ce qui limite leur déploiement à grande échelle.

3.4. Autres méthodes d'analyse des échantillons de grains de pollen

Les méthodes d'analyse des échantillons de grains de pollen prélevés par les instruments conventionnels reposent entièrement sur l'examen microscopique (Galán et al., 2007; Kämpilä, 1981; Makinen et al., 1981). Ces analyses permettent une identification et une quantification des grains de pollen. L'identification des grains de pollen par l'examen microscopique nécessite une base de données bien documentée et standardisée. Elle se fait soit par comparaison avec des diapositives de référence, soit en utilisant une clé de détermination (Sulmont et al., 2007) et des atlas (Reille, 1999; Smith, 1984), soit sur des banques d'images de microscopes (Bonton et al., 2002; Boucher et al., 2002; Chen et al., 2006; Costa and Yang, 2009). Le choix de l'objectif de microscope utilisé pour l'observation des grains de pollen est dépendant des caractéristiques de chaque taxon.

En effet, l'efficacité des systèmes de surveillance par les capteurs de pollen repose notamment sur la rapidité du comptage des pollens et la précision quant à l'identification des pollens en question. La concentration des pollens est généralement exprimée en grains de pollen par mètre cube d'air. La méthode de dénombrement la plus simple et la moins coûteuse en terme d'équipement est certainement le comptage par microscope. Bien que cette méthode soit abondamment utilisée, elle exige beaucoup de temps, elle peut être longue et fastidieuse, même pour du personnel expérimenté. Par ailleurs, elle diffuse des informations déjà dépassées au moment où elles sont délivrées. D'où la nécessité de développer des systèmes qui délivrent des informations en temps réel (Demers et al., 2013). Les méthodes automatisées sont regroupées en trois catégories (Levetin, 2004): la méthode de reconnaissance automatique par analyse d'image, l'identification des pollens par biologie moléculaire (PCR : réaction de polymérisation en chaîne), et l'identification des pollens sur la base de leurs propriétés spectrales et optiques (spectroscopie infrarouge, microspectrométrie Raman, autofluorescence, diffusion de la lumière et polarisation).

La méthode de reconnaissance automatique par analyse d'image permet d'identifier et de compter les pollens visuellement en se basant sur leurs caractéristiques morphologiques (taille, forme, texture). L'identification de pollens par cette méthode est basée sur des banques d'images de microscopie développées par différentes équipes (Bonton et al., 2002; Boucher et al., 2002; Chen et al., 2006; Costa and Yang, 2009; Mainelis, 2020).

Une autre méthode développée par Ronneberger et al. (2007), permet une analyse des grains de pollen par un microscope confocal à balayage laser. En effet, cette méthode d'analyse repose sur des images 3D. En moyenne, le taux de reconnaissance obtenu est supérieur à 90%. Cependant, la reconnaissance de pollens se limite à 6 pollens allergisants (noisetier, aulne, bouleau, graminées, seigle, armoise) (Ronneberger, 2007).

De plus, il existe un autre dispositif qui consiste en une caractérisation des grains de pollen par la réfraction et la dispersion des rayonnements de la lumière laser (Kawashima et al., 2017). Ces rayonnements sont capables de livrer la quantité totale des grains de pollen grâce à la mesure de la diffraction de la lumière causée par le passage des particules devant un rayon laser. Cependant, cette méthode ne fournit pas une identification des différents taxons.

D'autres instruments sont également développés en Europe comme le WIBS-4 (*Waveband Integrated Bioaerosol Sensor*). Cette méthode se base sur la diffusion de la lumière laser avec des mesures spectroscopiques 2D.

L'identification des pollens par biologie moléculaire permet de quantifier et d'identifier les pollens à partir de leur ADN. Les chercheurs ont montré que la PCR donne des résultats satisfaisants, statistiquement comparables avec la méthode traditionnelle d'analyse microscopique (Longhi et al., 2009). En outre, elle est 6 fois plus rapide que la méthode traditionnelle. Cependant, le coût très élevé de cette méthode constitue la principale contrainte (Rittenour et al., 2012). Au Québec, les chercheurs ont travaillé sur cette méthode dans le but de réduire le coût et la rendre plus efficace pour le dénombrement et l'identification des pollens (Demers et al., 2013).

L'identification des pollens sur la base de leurs propriétés spectrales et optiques recouvre plusieurs méthodes : la méthode d'analyse par spectroscopie infrarouge, la microspectrométrie Raman, l'autofluorescence et la cytométrie de flux.

Pappas et al. (2003) ont été les premiers à démontrer que la **spectroscopie infrarouge** est une méthode qui peut donner des résultats satisfaisants en terme de détermination de différentes espèces des grains de pollen (Pappas et al., 2003). Toutefois, cette méthode a été effectuée sur un petit nombre de taxons et jamais à notre connaissance en conditions réelles d'observations atmosphériques.

La **microscopie Raman** est également un outil intéressant pour la caractérisation et l'identification des pollens (Schulte et al., 2008). Ces méthodes demandent un investissement temporel lors de l'acquisition des spectres sur l'ensemble des espèces des grains de pollen étudiées (Dell'Anna et al., 2010).

Ils existent d'autres méthodes pour l'exploitation des propriétés optiques des pollens comme par exemple l'autofluorescence (Bohlmann et al., 2019; Maya-Manzano et al., 2021; Shang et al., 2020). Cette méthode est en cours de développement, c'est pourquoi il est encore difficile pour l'instant de juger leur potentiel.

Enfin, il existe désormais des **compteurs automatiques de pollen**. Ils sont actuellement en fonctionnement dans des conditions réelles de surveillance (Maya-Manzano et al., 2021). Ils donnent des mesures en temps réel ayant pour objectif d'améliorer l'information sur les risques d'allergie aux pollens. Ils existent plusieurs compteurs automatiques des grains de pollen : BAA500, KH3000, FIDAS 200, Pollen Sense et Rapid-E. Ces compteurs de pollen sont reproductibles et permettent le transfert des données en ligne en temps réel (3-6h). En outre, ils possèdent l'avantage d'être entièrement automatisés contrairement aux autres méthodes (Oteros et al., 2015). En revanche, le déploiement de ces compteurs en grand nombre est compliqué du fait de leur coût d'achat (env. 100 k€) et de maintenance annuelle (env. 10k€).

4. LA PRODUCTION POLLINIQUE DU BOULEAU

Le principal taxon étudié dans cette thèse est le pollen de bouleau (cf partie 2.1). Pour que le pollen puisse remplir sa fonction de base, les plantes anémophiles doivent le produire en très grande quantité. Le volume de cette production dépend principalement de la longueur et du nombre des anthères et de la taille des grains de pollen (Piotrowska, 2008).



Figure 6 : Chaton mâle de bouleau.

Les inflorescences mâles du bouleau blanc se forment pendant l'été. En août, elles sont déjà clairement visibles (longueur de 1,5 à 2 cm). Les chatons de bouleau commencent à s'allonger pendant les mois de l'été pour entrer ensuite dans une phase de dormance pendant l'hiver. A ce stade les chatons sont courts, denses et contiennent des microspores. Un peu avant le démarrage de la saison pollinique, le développement des grains de pollen est renouvelé. A la sortie de l'hiver, les inflorescences atteignent une longueur d'environ 4 cm. Au cours de la floraison, l'inflorescence s'allonge jusqu'à environ 7-10 cm (Piotrowska, 2008) (Figure 6). Une corrélation est généralement observée entre la longueur de l'anthere et le nombre de GP produit.

4.1. Productivité pollinique par chaton

La production de pollen par l'arbre dépend du nombre de grains de pollens de bouleau (BGP) produit par étamine et par fleur ainsi que du nombre de fleurs et d'inflorescences sur l'arbre. Il existe peu de données dans la littérature sur la quantité des grains de pollen émise par chaton pour une même espèce de bouleau. Le **Tableau 3** représente la masse des grains de pollen produits par chaton pour différentes espèces de *Betula*. La masse d'un grain de pollen de bouleau individuel a été prise égale à 6,25 ng pour toutes les espèces (Brown and Irving, 1973). La quantité de grains de pollen émise par chaton varie donc entre 10 et 152 mg de pollen selon les études et les espèces.

Tableau 3: Masse des grains de pollen produits par un chaton pour différentes espèces de *Betula*. Lorsqu'une conversion d'un nombre de grains de pollen vers une masse fut nécessaire, la masse d'un grain de pollen de bouleau individuel a été prise égale à 6,25 ng quelle que soit l'espèce.

Genre et espèce	masse de grains de pollen par chaton/mg	Références
<i>Betula pendula</i>	>10	(Visez et al., 2015)
<i>Betula verrucosa</i>	65	(Piotrowska, 2008)
<i>Betula alba</i>	30-50	(Jato et al., 2007)
<i>Betula pubescens</i>	38	(Erdtman, 1943)
<i>Betula papyfera</i>	152	(Katz et al., 2020)
<i>Betula verrucosa</i>	34	(Erdtman, 1943)

4.2. Productivité pollinique par arbre

L'arbre de bouleau se caractérise par une production de pollen élevée, avec une productivité environ dix fois supérieure à celle d'autres espèces telles que *Corylus*, *Fraxinus* et *Ulmus* (Broström et al., 2008). De plus, des variations du nombre de grains récoltés dans l'air sont observées d'une année à l'autre (Frei and Gassner, 2008; Sugita et al., 2010). En effet, la concentration pollinique dans l'air est influencée par le biorythme de la plante (à une année de forte production de pollen de bouleau succèdent souvent deux années de production moindre) et par les conditions atmosphériques lors de la formation des inflorescences et de la libération du pollen (Kubik-Komar et al., 2021; Latalowa et al., 2002).

Peu de données sont disponibles dans la littérature sur la quantité de pollen produite par les bouleaux. Le **Tableau 4** représente la masse des grains de pollen produits par un arbre de bouleau pour différentes espèces de *Betula*. Les données varient d'une étude à l'autre.

D'après Jato et al. (2007), un chaton de *Betula alba* produit entre 4,8 et 8,2 millions de grains de pollen. Ces chiffres sont calculés en faisant une moyenne sur 6 arbres. Le nombre de chatons par arbre est compris entre 8 700 et 11 200 chatons (moyenne sur 6 arbres) soit une quantité de 250 et 600 g de pollen par arbre *Betula alba* (Jato et al., 2007). Une masse légèrement plus grande est donnée par l'étude de Katz et al. (2020) : 625 g de pollen par arbre (Katz et al., 2020).

Selon Erdtman (1943), un arbre de pollen de *Betula verrucosa* produit 34 g de pollen. Cette masse correspond à environ 1000 inflorescences par arbre (Erdtman, 1943). Il est 10 fois plus faible que les données de Jato et al. (2007) et Katz et al. (2020). En considérant un nombre de chaton compris entre 1000 et 10 000 par arbre et une masse de pollen par chaton de 36 mg (moyenne *B. pubescens* et *B. verrucosa* à partir de Erdtman, 1943), un bouleau pourrait alors produire entre 6 et 60 milliards de grains de pollen (soit entre 36 et 360 grammes de pollen par arbre).

Tableau 4: Masse des grains de pollen produits par un arbre de bouleau pour différentes espèces de Betula. Lorsque qu'une conversion d'un nombre de grains de pollen vers une masse fut nécessaire, la masse d'un grain de pollen de bouleau individuel a été prise égale à 6,25 ng pour toutes les espèces.

Genre et espèce	Masse de pollen produite par arbre (g/arbre)	Références
<i>Betula alba</i>	260-560	(Jato et al., 2007)
<i>Betula verrucosa</i>	34-360	(Erdtman, 1943)
<i>Betula papyrifera</i>	625	(Katz et al., 2020)

5. LES CONCENTRATIONS POLLINIQUES

5.1. Pollen dans l'air extérieur

5.1.1. Concentrations dans l'atmosphère

Le réseau de surveillance des pollens en France est opéré par le Réseau National de Surveillance Aérobiologique (RNSA). Il a été créé en 1996 et son objectif principal est de fournir aux médecins généralistes, aux industries pharmaceutiques et aux allergiques une information sur le contenu de l'air

en pollens et en moisissures. Il comporte plus de 72 capteurs répartis sur le territoire français pour fournir des données tout au long de la saison pollinique. Le capteur volumétrique Hirst (*Burkard volumetric spore sampler*) est utilisé dans toutes les stations du réseau. Le **Tableau 5** montre une comparaison des concentrations de plusieurs types des grains de pollen mesurées par différents capteurs. D'après la littérature, la concentration des grains de pollen dans l'atmosphère varie de quelques grains à plusieurs milliers de grains par mètre cube. En effet, les concentrations des grains de pollen dans l'atmosphère varient en fonction de différents facteurs. Les conditions météorologiques (la photopériode, les précipitations, la température et le vent) sont les principales causes de cette variation. Également, la concentration des grains de pollen est influencée par le type de capteur employé, la localisation du capteur (dont sa hauteur) et la composition de la végétation locale.

Tableau 5: Exemples de concentrations de grains de pollen mesurées en milieu extérieur dans différents environnements.

Type de pollen	Type de capteur	Localisation du capteur	Grains de pollen /m ³	Méthode d'analyse	Référence
Graminées	Capteur volumétrique de type Hirst	Urbaines	87	Microscope optique	(Damialis et al., 2019)
		Montagneuses	18		
Bouleau	Capteur volumétrique de type Hirst	Urbaines	30-100	Microscope optique	(Borycka and Kasprzyk, 2018)
Graminées	Capteur de type Rotorod	Urbaines	>30	Microscope optique	(Hugg et al., 2017)
Graminées	Capteur volumétrique de type Hirst	Urbaines	25	Microscope optique	(Osborne et al., 2017)
Graminées	Capteur volumétrique de type Hirst	Urbaines	100-1200	Microscope optique	(Plaza et al., 2016)
Plusieurs types de pollens	Capteur volumétrique de type Lanzoni	Banlieues (suburbaines)	0-700	Microscope optique	(Pichot et al., 2015)
Plusieurs types de pollens	Capteur de type Rotorod	Urbaines	7-196	Microscope optique	(Sterling and Lewis, 1998)
Graminées	Capteur volumétrique de type Hirst	Urbaines et rurales	>30	Microscope optique	(Yli-Panula et al, 1997)
Plusieurs types de pollens	Capteur gravimétrique de type Rotorod	Urbaines	30	Microscope optique	(O'rourke and Lebowitz, 1984)

Effectivement, le temps de floraison et la libération du pollen sont affectés par l'ensoleillement, les courants de convection, le vent et la turbulence. Par conséquent, les saisons polliniques sont

caractérisées par une grande variabilité interannuelle (Puc et al., 2015). L'hétérogénéité des concentrations des pollens dans l'air (temporellement et spatialement) a été mise en évidence à partir des mesures des stations permanentes (Mullins and Emberlin, 1997).

En Pologne, des concentrations annuelles jusqu'à 12 830 BGP.m⁻³ ont été enregistrées (Kubik-Komar et al., 2021). Selon Hicks et al. (1994), les concentrations annuelles en pollen de bouleau peuvent atteindre 12 000 BGPs.m⁻³ correspondant à un dépôt annuel de 6 300 BGP.cm⁻² (Hicks et al., 1994). Monnier et al. (2021) ont suggéré que les concentrations polliniques du bouleau en France ont une tendance à la hausse (Monnier et al., 2021).

5.1.2. Exposition aux pollens et seuils d'apparition des symptômes

D'après la littérature, on constate que les seuils polliniques déclenchant des réactions allergiques ne sont pas encore bien définis. Le **Tableau 6** représente une comparaison des seuils polliniques d'apparition des symptômes allergiques attribués aux grains de pollen de bouleau, de graminée et d'ambrosie. A noter que la mesure de la concentration des grains de pollen est une approximation de la présence de leurs allergènes dans l'air (cause principale des réactions allergiques). Pourtant, l'activité antigénique et le nombre de BGP dans l'atmosphère ne sont pas nécessairement corrélés (Rantio-Lehtimäki et al., 1994).

Tableau 6: Seuils polliniques d'apparition des symptômes allergiques attribués à plusieurs espèces de pollen.

Type de pollen	Concentrations des pollens (grains/m ³)	Manifestations cliniques	Références
Alnus	45	Seuils cliniques d'apparition des premiers symptômes	(Rapiejko et al., 2007)
	85	Seuils cliniques d'apparition des symptômes modérés ou sévères chez la majorité des personnes allergiques	
Ambrosia	1 à 3	Seuils cliniques d'apparition des premiers symptômes	(Comtois and Gagnon, 1988)
	3	Seuils cliniques d'apparition des premiers symptômes chez les personnes allergiques	(Laaidi et al., 1997)
	10 à 50	Seuils cliniques d'apparition des symptômes modérés ou sévères chez la majorité des personnes allergiques	(Solomon et al., 1980)
Artemisia	30	Seuils cliniques d'apparition des premiers symptômes	(Rapiejko et al., 2007)
	55	Seuils cliniques d'apparition des symptômes modérés ou sévères chez la majorité des personnes allergiques	
Corylus	35	Seuils cliniques d'apparition des premiers symptômes	(Rapiejko et al., 2007)
	80	Seuils cliniques d'apparition des symptômes modérés ou sévères chez la majorité des personnes allergiques	
Cupressaceae	10-50	Seuils cliniques d'apparition des premiers symptômes	(Waisel et al., 2004)

Poaceae	20	Seuils cliniques d'apparition des premiers symptômes	(Rapiejko et al., 2007)
Poaceae	37	Seuils cliniques d'apparition des symptômes modérés ou sévères chez la majorité des personnes	(Antepara et al., 1995)
Poaceae	10-50	Seuils cliniques d'apparition des premiers symptômes chez la majorité des personnes	(Davies and Smith, 1973)
Poaceae	>50	Symptômes importants	(Katelaris et al., 2004)
Poaceae	50	Seuils cliniques d'apparition des premiers symptômes chez la majorité des personnes	(Davies and Smith, 1973)
	37		(Antepara et al., 1995)
Betula	20	Seuils cliniques d'apparition des premiers symptômes chez les personnes allergiques	(Rapiejko et al., 2007)
	75	Seuils cliniques d'apparition des premiers symptômes chez la majorité des personnes	
	30-80	Seuils cliniques d'apparition des premiers symptômes	(Koivikko et al., 1986)
Platanus	>50	Seuils cliniques d'apparition des premiers symptômes chez la majorité des personnes	(Alcázar et al., 2004)

D'après la littérature, le seuil de déclenchement d'une réaction allergique varie entre 1 et 4 grains de pollen/m³ pour les personnes hypersensibles (Comtois and Gagnon, 1988) et de 40 grains/m³ pour la majorité des personnes allergiques (Guerin, 1993; Laaidi et al., 1997). D'après la littérature, le seuil de déclenchement des symptômes pour le pollen de bouleau est entre 8 et 100 grains/m³ et celui des graminées varie entre 4 et 50 grains/m³ (De Weger et al., 2013). Caillaud et al. (2013) ont montré une absence de symptômes chez des patients atteints de pollinose au bouleau jusqu'à un seuil de 30 grains de pollen/m³. Une relation linéaire est observée pour les symptômes nasaux, oculaires et bronchiques jusqu'à une centaine de grains de pollen par mètre cube (Caillaud et al., 2013).

Selon une étude menée aux Etats-Unis sur des enfants de 4 à 12 ans asthmatiques et sensibilisés (ne prenant pas de traitements de fond) l'apparition des symptômes d'essoufflement, de toux persistante, de sifflements et des symptômes nocturnes est visible après une exposition à 2 grains/m³ (DellaValle et al., 2012). Ces relations « dose-réponse » sont toutefois très complexes. Ces seuils ne sont pas définitivement arrêtés et ils peuvent varier d'une personne à une autre. En effet, ils sont influencés par différents facteurs tels que la sensibilité de l'individu, son mode de vie et les facteurs environnementaux (pollution) et météorologiques (Jacobs et al., 2012).

5.1.3. Pollen sédimenté

Le pollen libéré est confronté à différents facteurs avant et durant sa déposition, principalement dû à son poids, sa vitesse de sédimentation, l'impaction, la turbulence, la vitesse du vent et la convection de l'air (Di-Giovanni and Kevan, 1991; Miki et al., 2021). Une fois le pollen déposé au sol, il est ensuite soit remis en suspension dans l'atmosphère, soit soumis à d'autres processus pour s'intégrer dans le sol, en particulier par la pluie ou les vers de terre. Il peut être également transporté par l'eau et sédimenté dans des cours d'eau (Davidson et al., 1999; Faegri et al., 1989).

Tableau 7: Densité surfacique maximale de pollen de bouleau sédimenté en extérieur.

Lieu de collecte	Type de collecteur	Durée d'exposition	BGP.m ⁻²	mg.m ⁻² ou kg.km ⁻²	Références
Métropole de Berlin	Echantillonneur gravimétrique	1 semaine	38 x 10 ⁶	234	(Werchan et al., 2017)
Plusieurs localisations en Finlande	Echantillonneur gravimétrique (Tauber modifié)	1 an	110 x 10 ⁶	656	(Sugita et al., 2010)
Métropole de Londres	Echantillonneur gravimétrique (Durham)	1 semaine	38 x 10 ⁵	24	(Emberlin and Norris-Hill, 1991)
Grande Bretagne	Echantillonneur gravimétrique (Durham)	1 an	71 x 10 ⁴	4	(Hyde, 1950)
Finlande (lac Kevo)	Echantillonneur gravimétrique (Tauber modifié)	1 an	63 x 10 ⁶	394	(Hicks et al., 1994)

Le **Tableau 7** représente une comparaison des quantités maximales de pollen sédimenté en extérieur. Nous observons qu'une grande différence existe parmi l'ensemble des données présentes dans la littérature. De plus, la durée d'exposition varie d'une étude à l'autre. La sédimentation du pollen sur un capteur de Durham est notamment influencée par la vitesse du vent, ce qui complique la relation entre la concentration atmosphérique et le dépôt sur le capteur (Miki et al., 2021). Par ailleurs, au sein d'une même ville, des variations spatiales et temporelles importantes de la sédimentation pollinique ont déjà été observées (Werchan et al., 2017). Du point de vue de la pollinisation, chaque mètre carré de l'habitat de la plante devrait recevoir environ un million de GP pour que la pollinisation soit raisonnablement efficace (Rojo et al., 2020).

Il est supposé que la circulation routière peut permettre une resuspension du pollen déposé au sol, comme il l'a été parfois observé pour les graines de plantes (Vitalos and Karrer, 2009). La saison pollinique, en partie en raison de la resuspension du pollen, peut se terminer plus tard au niveau du sol comparativement aux prélèvements à une quinzaine de mètre de hauteur (Rojo et al., 2020).

5.2. Le pollen allergisant en milieu intérieur

Il est reconnu que les personnes passent la majorité de leur temps en milieu intérieur (Zeghnoun and Dor, 2010). C'est la raison pour laquelle la qualité de l'air intérieur constitue un enjeu de santé crucial pour les personnes atteintes d'asthme allergique, de rhinite ou encore de dermatite (D'Amato et al., 1996; Enomoto et al., 2004; Takahashi et al., 2008; Tormo-Molina et al., 2009).

Les allergènes sont omniprésents dans l'air intérieur. Les sources d'allergènes courantes trouvées dans les milieux intérieurs comprennent les acariens, les végétaux, les cafards, les chats, les chiens, les rongeurs et les moisissures (Pomés et al., 2016). De nombreuses personnes atopiques éprouvent des symptômes, comme la rhinite ou l'asthme, à cause de ces allergènes présents dans l'environnement intérieur. La poussière domestique présente en milieu intérieur est un donc mélange complexe qui peut contenir plusieurs allergènes (Glorennec et al., 2019).

Dans cette thèse, nous nous intéresserons exclusivement aux grains de pollens allergisants présents en milieu intérieur. L'étude des allergènes polliniques présents en milieu intérieur a fait l'objet de nombreux travaux de recherche (**Tableau 8**). Les grains de pollen sont des transporteurs d'allergènes, et les comptages de pollen peuvent inclure des grains de pollen avec une charge en allergènes plus ou moins forte (*pollen potency*). La détermination de la concentration des allergènes polliniques en milieu intérieur est utile sur le plan clinique (O'Rourke and Lebowitz, 1984). Il faut garder à l'esprit que le comptage en nombre de grains ne représente pas une charge allergique et n'est pas nécessairement proportionnel à l'exposition aux allergènes.

5.2.1. Les vecteurs de transport des grains de pollen en milieu intérieur

L'efficacité de pénétration du pollen de l'extérieur vers l'intérieur d'un bâtiment est relativement peu documentée. Bien que le pollen soit généralement considéré comme un allergène extérieur, il est omniprésent en milieu intérieur. En effet, les fenêtres, les portes, les systèmes de ventilation non filtrés permettent sa pénétration vers l'air intérieur. Le pollen peut être également transporté par les chaussures, les vêtements, les cheveux et les poils des animaux de compagnie qui constituent aussi des vecteurs d'entrées importants des pollens en milieu intérieur (Ishibashi et al., 2008).

Une fois en air intérieur, les pollens sont éliminés par resuspension, par ventilation ou par aspiration et/ou nettoyage. Les allergènes peuvent également être dégradés par réaction physicochimique (Hugg et al., 2011).

Les portes et les fenêtres ouvertes permettent l'entrée des pollens en milieu intérieur. Farrera et al. (2002) ont montré que 60% des taxons trouvés en milieu intérieur, dans une maison de la vallée du Rhône, étaient également présents pendant la même période de l'année dans l'environnement extérieur qui l'entoure (Farrera et al., 2002). Cependant, certaines études ont montré que les allergènes polliniques pourraient être détectés en dehors de leur saison pollinique (Holmquist et al., 1999). Fahlbusch et al. (2000) ont révélé qu'une quantité considérable de pollens de graminées reste à l'intérieur, même après la fin de la saison pollinique (Fahlbusch et al., 2000). De plus, Enomoto et al. (2004) ont montré que le pollen de cèdre japonais est trouvé en milieu intérieur (sur les canapés et les rideaux) après la fin de sa saison pollinique (Enomoto et al., 2004).

Les vêtements et les chaussures constituent un vecteur de transport de pollens vers le milieu intérieur. Les vêtements agissent comme un collecteur passif de pollens (Jantunen and Saarinen, 2011;

Okuda et al., 2005). Zavada et al. (2007) ont mesuré qu'un t-shirt peut piéger jusqu'à 7 millions grains de pollen (Zavada et al., 2007). De même, Takahashi et al. (2008) ont compté 2 à 3 millions de grains de pollen sur du linge mouillé (Takahashi et al., 2008). Jantunen et al. (2011) suggèrent notamment qu'un grand nombre de grains de pollen de graminées (12-230 GP.cm⁻²) peut être piégé sur les vêtements et les chaussures après passage dans une prairie (Jantunen and Saarinen, 2011). Ishibashi et al. (2008) ont montré que le dépôt de pollen sur les chaussures est 4,1 fois plus élevé que celui compté sur les épaules, le dos et les jambes d'une personne qui marche dans une zone urbaine (Ishibashi et al., 2008).

Ces analyses dépendent des méthodes d'échantillonnages employées et des tissus utilisés ; le **Tableau 8** présente un résumé de la littérature de la quantité de pollens piégés sur les vêtements et les différentes méthodes d'échantillonnages utilisées.

Finalement, des chercheurs ont constaté que les concentrations des grains de pollen dans le milieu intérieur augmentent lorsque les pièces sont plus fréquentées par des personnes venant du milieu extérieur (Holmquist et al., 1999; Hugg and Rantio-Lehtimäki, 2007).

Les cheveux constituent également un vecteur de transport de pollen. De Weger et al. (2013) ont collecté des pollens par lavage des cheveux d'un volontaire. Ils ont trouvé que 36% des pollens trouvés sur ces cheveux étaient hors de leur saison pollinique. Cela est expliqué par le fait que cette personne était en voyage dans un autre pays qui présente un profil pollinique différent (De Weger et al., 2013). Penel et al. (2017), ont montré que les cheveux permettent notamment la collecte des pollens de grande taille, comme les *Mimosaceae*, qui ne peuvent pas être collectés par un capteur statique placé sur le toit (Penel et al., 2017).

Les **poils d'animaux** sont considérés aussi comme un vecteur de transport de pollens en milieu intérieur. Selon Jantunen et al. (2011), le pelage d'un chien peut retenir jusqu'à 240 grains de pollen par cm² après une journée passée à l'extérieur (Jantunen and Saarinen, 2011).

Par ailleurs, la plupart des **plantes utilisées pour la décoration** en milieu intérieur ne constituent généralement pas une source de pollen allergisant, soit en raison d'une floraison insuffisante ou soit en raison du caractère entomophile du pollen produit (Patterson et al et al., 1993). Il existe des exceptions, comme par exemple les allergènes de *Ficus benjamina* (figuier pleureur) qui peuvent provoquer un asthme allergique et une rhinite allergique chez certaines personnes (Patterson et al et al., 1993).

Tableau 8: Résumé de la littérature sur la quantité de pollens piégés sur les vêtements et les différentes méthodes d'échantillonnages utilisées.

Taxon pollinique	Type des vêtements	Flux de grains de pollen /cm ² /heure	Durée d'exposition	Méthode de collection	Méthode d'analyse	Référence
Plusieurs types de pollen	Coton/Laine/Soie/Lin	59	24 heures	Solution	Hémocytométrie	(Zavada et al., 2007)
Pollen de cèdre du Japon	Manteau en laine	9,4	4 heures	Ruban adhésif	Microscopie	(Takahashi et al., 2008)
	Pantalon en laine	14,5				
	T-shirt	10,2				
Bouleau et Pin	Blouse en mailles serrées	11,1	-	Ruban adhésif	Microscopie	(Jantunen and Saarinen, 2011)
	T-shirt en coton	19,2				
	Manteau à fourrure	10,4				
	Blouse en mailles serrées	0,83	-	Aspirateur		
	T-shirt en coton	2,44				
	Manteau à fourrure	3,1				
Graminées	T-shirt humide	12 à 63	30 min	Ruban adhésif		
	Face avant du pantalon	64	30 min	Ruban adhésif		
	Face arrière du pantalon	38				

5.2.2. Concentrations des pollens en milieu intérieur

Une concentration de l'ordre de quelques dizaines à quelques centaines de BGP.m⁻³ est observée en air intérieur. Selon Menzel et al. (2017), les concentrations des grains de pollen en milieu intérieur varie en moyenne entre 16 et 83 BGP.m⁻³ pour des concentrations extérieures supérieures à 300 BGP.m⁻³ (Menzel et al., 2017). Les taxons de pollen dans l'air intérieur sont généralement les mêmes que dans l'air extérieur, mais les concentrations sont différentes (moins à l'intérieur qu'à l'extérieur) (Hugg et al., 2011).

Le ratio des BGP entre l'air intérieur et l'air extérieur dépend de la proximité des bouleaux et du schéma de ventilation. Ce ratio dépend également de la météorologie : augmentation avec la température et avec un vent perpendiculaire aux fenêtres. Le ratio intérieur/extérieur varie de 0,75 (fenêtres ouvertes en grand et ventilation mécanique) à 0,07 (périodes de ventilation courtes) (Menzel et al., 2017).

La détermination de la concentration des grains de pollen en milieu intérieur a été réalisée par différentes méthodes de prélèvements (**Tableau 9**).

Tableau 9: Résumé de la littérature des pollens étudiés en milieu intérieur, les différentes méthodes de prélèvements utilisées et les différentes concentrations polliniques trouvées.

Type de pollen	Méthode de mesure ou de prélèvement	Type de milieu intérieur	Grains de pollen /m ³	Référence
Bouleau	Échantillonneur personnel portable (Burkard Manufacturing)	Université	16-83	(Menzel et al., 2017)
Bouleau	Capteur de type Rotorod	Habitations	0-17	(Hugg and Rantio-Lehtimäki, 2007)
Bouleau	Capteur de type Rotorod	Habitations	600	(Jantunen et al and Saarinen, 2009)
Bouleau	Burkard Sampler	Ecole	6-195	(Holmquist et al., 1999)
Plusieurs types de pollen	Capteurs de type Rotorod	Habitations et cliniques	15-253	(Solomon et al., 1980)
Plusieurs types de pollen	Capteur de type Rotorod	Habitations	0-4	(O'Rourke and Lebowitz, 1984)
Plusieurs types de pollen	Échantillonneur personnel (Burkard Manufacturing)	Habitations	16	(O'Rourke et al., 1989)
Plusieurs types de pollen	Échantillonneur personnel portable	Hôpital	10	(Tormo Molina et al., 2002)
Plusieurs types de pollen	Capteur de type Lanzoni VPPS 1000	Université	<150	(Cariñanos et al., 2004)
Plusieurs types de pollen	Échantillonneur personnel de l'aérosol inhalable-(SKC inc.)	Habitations	1-71	(Lee et al., 2006)
Plusieurs types de pollen	Échantillonneur personnel de l'aérosol inhalable	Habitations	0-2	(Lee et al., 2006)
Plusieurs types de pollen	Échantillonneur personnel portable (Burkard Manufacturing)	Hôpital	25	(Tormo-Molina et al., 2009)
Plusieurs types de pollen	Échantillonneur personnel portable (Burkard Manufacturing)	Marché	10-70	(Nayar and Jothish, 2013)
		Scierie	5-18	
		Ferme d'élevage des volailles	8-58	
		Etable	9-15	
Pin	Capteur de type Rotorod	Habitations	1 980	(Jantunen et al and Saarinen, 2009)

On constate que les concentrations de pollens mesurées en air intérieur varient énormément dans la littérature. Ces concentrations dépendent de plusieurs facteurs : le type de pollen étudié, la méthode de prélèvement employée, le type de milieu intérieur (ainsi que son usage et les habitudes des usagers), la végétation en proximité immédiate et l'intensité de la saison pollinique (O'Rourke and Lebowitz, 1984; Sterling and Lewis, 1998; Stock and Morandi, 1988). Tous ces facteurs jouent un rôle très important dans la variabilité des concentrations trouvées en milieu intérieur.

Par exemple, dans deux études différentes réalisées dans une même région (sud-est de la Finlande), les concentrations enregistrées en milieu intérieur n'étaient pas similaires. Les concentrations polliniques enregistrées dans l'étude de Jantunen et al. (2009) en milieu intérieur est plus élevée que celles enregistrées par Hugg et Rantio-Lehtimäki (2007) (**Tableau 9**) (Hugg and Rantio-Lehtimäki, 2007; Jantunen et al., 2009). En effet, ces différences de concentrations trouvées en milieu intérieur sont peut-être liées en grande partie aux concentrations des pollens en milieu extérieur. Dans l'étude de Jantunen et al., les concentrations de pollen enregistrées à l'extérieur ont été supérieures à 100 grains/m³. Cependant, dans l'autre étude les concentrations en milieu extérieur étaient plus faibles (Hugg and Rantio-Lehtimäki, 2007).

Par ailleurs, de très faibles concentrations ont été observées en air intérieur (10 fois moins qu'en air extérieur), alors que des quantités de pollens importantes ont été détectées dans les poussières (en moyenne 500 000 GP.g⁻¹). O'Rourke et Lebowitz (1984) ont conclu que le pollen est apporté en air intérieur par les chaussures et les vêtements plutôt que par transfert aérien à partir de l'air extérieur (O'Rourke and Lebowitz, 1984). Une absence de corrélation entre la mesure des pollens en air extérieur avec celle en air intérieur a déjà été observée par ailleurs. Cette non-corrélation est probablement due à la fois à l'éloignement entre les deux points de mesure et à la présence de végétaux pollinisant à proximité du point de collecte en air intérieur (Holmquist et al., 2001).

Concernant le pollen de bouleau, les concentrations en air intérieur sont généralement de quelques dizaines de grains par mètre cube avec un maximum reporté à 600 GP.m⁻³ (**Tableau 9**). Les concentrations de pollen de *Betula* sont substantiellement plus faibles à l'intérieur qu'à l'extérieur, et d'autant plus si l'on prélève vers le centre du bâtiment. Ceci semble indiquer des propriétés de pénétration du pollen relativement faibles et/ou la présence de courte durée des grains de pollen dans l'air intérieur (Hugg and Rantio-Lehtimäki, 2007). Les concentrations intérieures reflètent les concentrations extérieures avec des rapports intérieur/extérieur moyens allant de 0,01 à 0,22 (Hugg and Rantio-Lehtimäki, 2007).

5.2.3. Pollen de bouleau dans les poussières domestiques

En tant que source d'antigènes, la poussière domestique peut être une cause importante de l'allergie au pollen et notamment source de symptômes d'allergie au pollen après la saison pollinique (Yli-Panula and Rantio-Lehtimäki, 1995).

L'activité antigénique des grains de pollen de bouleau dans les poussières domestiques est plus faible que dans les poussières extérieures (Yli-Panula and Rantio-Lehtimäki, 1995). Dans cette étude, il a été observé que la concentration moyenne de l'activité antigénique à l'intérieur atteint son maximum 3 semaines plus tard qu'à l'extérieur. Ce décalage semble indiquer que le moyen préférentiel par lequel les antigènes sont transportés à l'intérieur est via les chaussures et les vêtements, plutôt que via la

ventilation. Ces auteurs ont également détecté une activité antigénique dans les poussières domestiques 2 mois après le pic de pollinisation (Yli-Panula and Rantio-Lehtimäki, 1995).

Hugg et Rantio-Lehtimäki (2007) ont réalisé un comptage des pollens de bouleau sur différentes surfaces à l'intérieur de domiciles en employant une méthode de prélèvement qui consiste à utiliser une bande adhésive. Sur l'ensemble des sites étudiés, le nombre de grains de pollen était plus élevé à proximité des points de ventilation (cadres de fenêtres) et/ou des endroits nettoyés moins fréquents. Les concentrations de pollen en milieu intérieur sont généralement faibles, entre 0 et 70 GP.cm⁻² (soit une masse d'environ 4,4 mg.m⁻² de pollen en prenant la masse d'un grain de pollen égale à 6,25 ng). Cependant, de fortes concentrations de pollen ont été découvertes à proximité des fenêtres avec un maximum de 2 926 GP.cm⁻² (soit une masse d'environ 183 mg.m⁻²) (Hugg and Rantio-Lehtimäki, 2007).

Dans une autre étude de la littérature, des concentrations de bouleau de l'ordre de 130 000 GP.g⁻¹ sont enregistrées à proximité de la fenêtre (soit environ 0,8 mg.g⁻¹) (Yli-Panula and Rantio-Lehtimäki, 1994). A noter que la quantité de poussière peut varier considérablement selon la zone de prélèvement considérée, entre 0,2 et 13 g.m⁻² (Dybendal et al., 1989). En conséquence, l'utilisation de cette unité (GP.g⁻¹) sans mentionner la surface de récolte des poussières rend impossible toute comparaison avec d'autres travaux.

Enfin, il a été observé une adsorption de l'allergène *Bet v 1* sur la surface de suies prélevées en air intérieur (Ormstad et al., 1998) ; ce qui signifie donc une possible présence de l'allergène majeur du bouleau dans la fraction respirable (PM<2.5 µm) de l'aérosol intérieur.

5.2.4. Exposition aux pollens en milieu intérieur

La connaissance des concentrations de pollen en air intérieur est plus pertinente que la concentration de fond extérieure pour les personnes qui passent la plupart de leur temps à l'intérieur (Menzel et al., 2017). Les concentrations de pollen à l'intérieur des habitations constituent probablement un enjeu sanitaire sous-estimé (Menzel et al., 2017). Les études épidémiologiques devraient s'appuyer sur les concentrations de pollen réelles en air intérieur, en plus de la concentration de pollen de fond au niveau des toits (Menzel et al., 2017).

Les grains de pollen étant retrouvés en concentrations inférieures en environnement intérieur comparé à l'atmosphère, certains auteurs postulent que la pénétration du pollen allergisant en air intérieur ne causerait des symptômes qu'aux personnes les plus sensibles (Hugg et al., 2011). Il existe cependant un faisceau d'information indiquant une présence, éventuellement abondante, du pollen dans les poussières domestiques. L'accumulation du pollen allergisant dans ces dernières pourrait être une source d'expositions aux allergènes polliniques sur une période plus longue que la seule saison pollinique.

6. VIEILLISSEMENT ATMOSPHERIQUE DU GRAIN DE POLLEN

La bibliographie de cette thèse est principalement centrée sur les polluants ayant fait l'objet du plus grand nombre d'études : NO₂, O₃ et les particules atmosphériques. SO₂ n'a pas été retenu en raison de la baisse importante de la concentration atmosphérique de ce polluant en Europe.

Avant de parler de l'effet de la pollution sur le pollen, il faut bien entendu mentionner que les polluants ont un effet direct sur les personnes allergiques. L'ozone est par exemple un gaz agressif provoquant une diminution de la fonction pulmonaire et un déclenchement des crises d'asthme (OMS, 2011). Ce polluant altère les muqueuses respiratoires en augmentant leur perméabilité (De Blay et al., 2000). Le NO₂ est un gaz irritant pour l'appareil respiratoire et il favorise l'hyperréactivité bronchique (Peters et al., 2019). Les populations asthmatiques semblent être plus sensibles également à ce polluant, et chez l'enfant il peut favoriser des infections pulmonaires (OMS, 2011). Les polluants gazeux comme l'ozone (O₃), les oxydes d'azote (NO, NO₂) et le dioxyde de soufre (SO₂) sont considérés comme des facteurs aggravants de la réaction allergique par irritation des voies respiratoires (Peters et al., 2019). Les effets sanitaires de la pollution sur l'allergique sont en dehors du cadre de cette thèse et seuls les effets directs de la pollution sur le grain de pollen seront traités.

Le pollen est modifié par la pollution atmosphérique (Sénéchal et al., 2015). Selon certaines études, un effet direct des polluants atmosphériques est observé lors de la production du grain dans l'anthere ou lors de la pollinisation lorsque le grain de pollen est dispersé dans l'atmosphère. Les effets directs de la pollution sont constatés à plusieurs niveaux tels que : l'altération de la fonction reproductive du pollen, des changements physico-chimiques de la surface du grain et une fragilisation de la membrane cytoplasmique, des modifications du potentiel allergisant ou encore une augmentation de la production des espèces réactives de l'oxygène et donc par extension, une aggravation des effets pro-inflammatoires (Sénéchal et al., 2015). Ces modifications pourraient altérer par conséquent leur potentiel allergisant (Annesi-Maesano et al., 2012; Bartra et al., 2007; Behrendt et al., 1999; Kanter et al., 2013; Motta et al., 2006).

6.1. Altération de la fonction reproductive

La pollution cause une altération des fonctions reproductives du pollen. Généralement, une exposition réelle ou simulée à des polluants de différentes natures peut aboutir à une diminution de la viabilité et/ou de la germination des grains de pollen (Wolters and Martens, 1987).

Les nombreuses différences entre espèces rendent impossible de tirer des conclusions quantitatives sur l'effet des polluants atmosphériques sur les grains de pollen (Iannotti et al., 2000). Le pollen exposé *in vivo* semble être toutefois plus sensible à la pollution comparé à une exposition *in vitro* (Wolters and Martens, 1987), ce qui laisse prévoir un rôle protecteur de l'anthere.

Par exemple, la germination des grains de pollen de graminées *Phleum pratense* n'est pas modifiée après une exposition *in vitro* à une atmosphère polluée (Albertini et al., 2000; Huss-Marp et al., 2008). Au contraire, Cuinica et al. (2014, 2013) ont observé une diminution de la germination des grains de pollen de bouleau *Betula pendula* après une exposition *in vitro* à l'ozone (61-192 ppb pendant 6/12h) et au dioxyde d'azote (34-67 ppb pendant 6/48h) (Cuinica et al., 2014, 2013b).

6.2. Modifications physiques des grains de pollen et libération des granules

Les pollens collectés dans des zones polluées présentent souvent des altérations physiques. Ces altérations se traduisent par des fissures voire une déchirure de l'exine (Amjad and Shafighi, 2012; Azzazy, 2016; Ouyang et al., 2016; Peltre, 1998; Shahali et al., 2009b), par la présence d'un dépôt extrapollinique (cf partie 6.7) provenant de particules atmosphériques ou par des résidus de précipitation liés à l'évaporation de gouttelettes d'eau (Amjad and Shafighi, 2012; Okuyama et al., 2007; Visez et al., 2015).

Ces modifications physiques ont été associées à des formes anormales des grains de pollen. Par exemple, certains auteurs ont observé des grains de pollen ayant une taille plus petite que la taille habituelle avec une plus forte fragilité de l'exine (Amjad and Shafighi, 2012; Guedes et al., 2009; Schoene et al., 2004; Tretyakova and Noskova, 2004). La fragilisation de l'exine par la pollution atmosphérique joue un rôle essentiel dans la libération des granules cytoplasmiques (cf. partie 6.9) (Amjad and Shafighi, 2012; Bianchimano et al., 2014; Depciuch et al., 2016a; Kalkar Surekha and Renu, 2014; Reshetova et al., 2015; Rezanejad, 2009; Shahali et al., 2009b).

Certains auteurs ont montré que dans des zones polluées, les grains de pollen sont vidés de leurs contenus cytoplasmiques (Puc et al., 2016). En outre, une pollution artificielle de NO₂ ou/et d'O₃ du pollen de fléole cause une augmentation de la libération des granules cytoplasmiques (Motta et al., 2006). Ces granules libérées ont une taille comprise entre 0,5 à 4,5 µm selon les espèces (Bacsi et al., 2006). En raison de cette taille réduite, ces granules peuvent pénétrer plus profondément que le grain de pollen dans l'appareil respiratoire (Motta et al., 2006) et ils peuvent provoquer des réactions allergiques plus fortes que celles induites par le pollen (Behrendt and Becker, 2001; Motta et al., 2006; Taylor et al., 2002)

Il faut préciser que certaines espèces ne présentent pas de modifications physiques des grains de pollen suite à une exposition à des polluants gazeux (Kanter et al., 2013; Zhu et al., 2018). Il n'est généralement pas possible de généraliser les résultats d'un taxon à l'autre.

6.3. Modification de la fraction protéique des grains de pollen

Des chercheurs ont observé que les polluants atmosphériques sont susceptibles d'entraîner une altération de la fraction protéique du pollen (Depciuch et al., 2016a; Frank and Ernst, 2016; Shahali and Dadar, 2018). Cette altération peut causer une modification des potentiels allergisants des grains de pollen.

Les modifications de la quantité des protéines et d'allergènes causées par la pollution atmosphérique ne sont pas encore complètement élucidées. Par exemple, il a été observé une augmentation (Eckl-Dorna et al., 2010; Lu et al., 2014), une diminution (Cuinica et al., 2013b, 2014; Ribeiro et al., 2013; Shahali et al., 2009a; Smiljanic et al., 2019) et même une absence d'effet (Duque et al., 2012; Kanter et al., 2013; Rezanejad, 2009) sur les protéines et les allergènes sous l'effet des polluants.

Ces allergènes sont souvent considérés comme des protéines de défense. Suarez-Cervera et al. (2008) ont en effet proposé l'augmentation des allergènes comme un mécanisme de défense employé par les pollens suite à un stress extérieur. Une augmentation de la quantité des allergènes a été par exemple observée suite à un stress chimique induit par la pollution pour le pollen de *Cupressus arizonica* (Suárez-Cervera et al., 2008). Le pollen d'ambrosie collecté en bordure de route à fort trafic présente également

une forte allergénicité en comparaison avec celui collecté près de route à faible trafic (Ghiani et al., 2012).

6.4. Changements dans la composition chimique élémentaire du grain de pollen

En terme de composition chimique élémentaire, le potassium (K) et le phosphore (P) sont les éléments détectés chez un grain de pollen de *Poaceae* et d'*Alnus spp* non pollué (Cerceau-Larrival et al., 1994, 1991). Cependant, plusieurs autres minéraux sont également présents comme le soufre (S), nickel (Ni), cuivre (Cu), zinc (Zn), brome (Br), aluminium (Al), calcium (Ca), plomb (Pb) (Shahali et al., 2009b).

D'après la littérature, il semble difficile de trouver une composition chimique élémentaire 'type' du pollen pollué (Duque et al., 2013; Kalbande et al., 2008; Shahali et al., 2009b; Yousefi et al., 2011). Plusieurs éléments minéraux peuvent être considérés comme marqueur de pollution. Par exemple le pollen de *Cupressus arizonica* collecté sur des sites urbains pollués a présenté d'importantes variations dans certains éléments caractéristiques d'un milieu pollué tels que nickel (Ni), soufre (S), fer (Fe) et cuivre (Cu) (Shahali et al., 2009b). A Stockholm, Nilsson et al. (1991) ont observé une augmentation de la quantité de Zn chez le pollen de *Betula* collecté dans des zones polluées (Nilsson and Berggren, 1991).

La modification de la composition chimique élémentaire du grain de pollen a par ailleurs été liée à une diminution de sa germination (Chropeňová et al., 2016; Wang et al., 2015, 2014).

6.5. Modifications de la fraction lipidique des grains de pollen

La fraction lipidique du grain de pollen est répartie entre son cytoplasme et son enveloppe. Cette fraction lipidique peut jouer un rôle dans l'inflammation des voies aériennes lors de l'inhalation du grain de pollen. Les lipides polliniques peuvent notamment agir comme ligands avec les protéines allergisantes et comme des adjuvants à la réaction allergique (Dahl, 2018; Gilles et al., 2012).

Cette fraction lipidique peut être modifiée *in vitro* par la pollution atmosphérique (Farah et al., 2019; Naas et al., 2016; Zhu et al., 2018). En exposition réelle, Beck et al. (2013) n'ont pas observé chez le pollen de bouleau une modification de la concentration en prostaglandine GPE2 (composé de la famille des PALMs : Pollen Associated Lipid Mediators) selon l'exposition à l'ozone (Beck et al., 2013). Rezanejad et al. (2012,2009) ont observé que le taux de flavonoïdes chez les grains de pollen *Thuja orientalis* collectés en zone polluée par le trafic routier est supérieur par rapport aux pollens présents en zone peu polluée (Rezanejad, 2012, 2009). Smiljanic et al. (2019) ont montré que les pollens de fléole des prés prélevés en zone polluée présentent des concentrations élevées en composés phénoliques (Smiljanic et al., 2019). A l'inverse, les grains de pollen de *Corylus avellana* collectés en zone à forte pollution contenaient une plus faible fraction lipidique (Depciuch et al., 2016a).

La couche lipidique externe du grain de pollen est affectée par l'ozone. Naas et al. (2016) ont montré que les acides gras présents sur la surface externe des grains de pollen de *Pinus halepensis* sont oxydés en aldéhydes et en acides dicarboxyliques (Naas et al., 2016). De plus, les alcènes présents dans la fraction lipidique externe des grains de pollen de bouleau sont oxydés en aldéhydes et en acides carboxyliques sous une concentration de 100 ppb d'ozone (Zhu et al., 2018). Farah et al. (2019) ont montré dans leur étude menée sur le pollen de *Phleum pratense* que la fraction lipidique de ce pollen est également modifiée après une exposition à 100 ppb d'ozone (Farah et al., 2019).

6.6. L'impact de l'ozone sur l'allergénicité du pollen

Cette thèse contient un chapitre qui s'intéresse à l'étude de la capture de l'ozone sur 21 échantillons de grains de pollens issus de différents végétaux (Chapitre III). Nous présentons donc dans cette partie les différentes études de la littérature qui s'intéressent uniquement à l'effet de l'ozone sur la pollinose et les pollens.

D'après la littérature, sur l'ensemble des polluants, c'est l'ozone et les particules qui ont été les plus souvent incriminés dans l'augmentation, en jours consécutifs, de la prévalence des manifestations allergiques (rhinite, conjonctivite, toux et asthme) (Davidson et al., 2005; Kim et al., 2015).

La production de l'ozone est favorisée lors des situations anticycloniques calmes, vent modéré et fort ensoleillement. Ces conditions sont également adéquates pour la libération et à la dissémination des pollens dans l'air. De ce fait, il n'est pas surprenant que les pics de pollinisation se superposent souvent aux pics d'ozone car les deux phénomènes sont favorisés par les mêmes conditions météorologiques (Ørby et al., 2015).

Des corrélations positives ont été retrouvées entre l'ozone et la rhinite, la conjonctivite, la toux et l'asthme, pendant la pollinisation des arbres (février-mai) et durant celle des herbacées (mai-septembre) (Laaidi et al., 2002). Chez les sujets sensibilisés, les polluants atmosphériques peuvent accentuer la réaction allergique en abaissant le seuil de réactivité bronchique et/ou en accentuant l'irritation des muqueuses nasales ou oculaires (ANSES, 2014). De Blay et al. (2000) ont montré que pour chaque augmentation de 10 ppb d'ozone, la probabilité de symptômes allergiques augmente de 20 % (De Blay et al., 2000). En effet, l'ozone altère les muqueuses respiratoires et augmente leur perméabilité, ce qui provoque une réaction allergique à des concentrations de pollen plus faibles (De Blay et al., 2000). L'ozone abaisse également le seuil de réponse aux allergènes et peut entraîner une réaction allergique pour des concentrations en pollen qui, sans la présence de l'ozone, n'engendreraient pas ou peu de symptômes (Strand et al., 1998).

Par contre, Molfino et al. (1991) ont montré que des concentrations d'ozone bien supérieures au seuil préétabli de $100 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ (valeur reportée à la périphérie des grandes villes lors des jours ensoleillés et chauds) n'ont entraîné aucune aggravation des symptômes en fin de la saison pollinique où le seul pollen présent était l'ortie qui n'est quasiment jamais responsable d'allergies (Molfino et al., 1991). Pourtant cette concentration d'ozone suffit à accentuer la réponse bronchique chez les asthmatiques réagissant aux pollens de Poacées et d'ambroisie (Molfino et al., 1991).

L'ozone peut agir sur les allergènes ainsi que sur les lipides des grains de pollen mais également altérer leur structure avec pour effets de modifier leur allergénicité et de provoquer une exacerbation des manifestations allergiques (Bist et al., 2004; D'Amato et al., 2010; Motta et al., 2006; Ruffin et al., 1986). De nombreuses études ont porté sur l'effet de l'ozone sur les pollens allergisants (**Tableau 10**).

Tableau 10 : Synthèse des études de la littérature en rapport avec l'effet de l'ozone sur le pollen.

Taxon	Type d'étude (concentration en ozone)	Effets	Références
<i>Acer negundo</i>	Exposition <i>in vitro</i> (100 ppb/6h)	Diminution de la quantité totale des protéines	(Ribeiro et al., 2013)
<i>Acer negundo</i>	Exposition <i>in vitro</i> (30-235 ppb/6h)	Augmentation de la production d'IgE	(Ribeiro et al., 2013)
<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	Exposition à l'air ambiant (proche de la route)	Augmentation de niveau des allergènes <i>Amb a 1</i> et <i>Amb a 2</i>	(Ghiani et al., 2012)
<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	Exposition <i>in vitro</i> (100 ppb/ 5 h)	Diminution de la viabilité du pollen	(Pasqualini et al., 2011)
<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	Exposition <i>in vitro</i> (100 ppb/7 jours)	Pas de changement au niveau de l'allergène <i>Amb a 1</i>	(Pasqualini et al., 2011)
<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	Exposition <i>in vitro</i> (40-80 ppb/3 semaines)	Pas de modifications physiques du grain ni d'influence sur l'allergène majeur	(Kanter et al., 2013)
<i>Betula</i>	Exposition <i>in vitro</i> (60-192 ppb /6-12h)	Diminution de la viabilité et de la germination du pollen	(Cuinica et al., 2013a, 2013b)
<i>Betula</i>	Exposition <i>in vitro</i> (42 ppb/ 7 jours)	Augmentation de l'allergène <i>Bet v 1</i>	(Beck et al., 2013)
<i>Betula pendula</i>	Exposition <i>in vitro</i> (130 ppb/16h)	Modification de la fraction lipidique	(Zhu et al., 2018)
<i>Betula papyrifera</i>	Exposition de la plante à l'air ambiant / 9 ans	Diminution de la germination et de la viabilité du pollen	(Darbah et al., 2007)
<i>Betula alba</i>	Exposition <i>in vitro</i> (300 ppb /4h)	Augmentation de la libération des protéines	(Thomas et al., 1997)
<i>Brassica napus</i>	Exposition <i>in vitro</i> (100 ppb/ 6 h)	Inhibition de la reproduction	(Bosac et al., 1993)
<i>Corylus avellana</i>	Exposition à l'air ambiant (25-100 ppb)	Diminution de la viabilité	(Gottardini et al., 2004)
<i>Cupressus arizonica</i>	Exposition à l'air ambiant (proche d'une route)	Augmentation de l'expression de l'allergène <i>Cup a 3</i>	(Cortegano et al., 2004)
<i>Crocus vernus</i>	Exposition <i>in vitro</i> (300 ppb/2h)	Inhibition de la germination	(Chichiriccò and Picozzi, 2007)
<i>Dactylis glomerata</i>	Exposition <i>in vitro</i> (100 ppb/4h)	Diminution de la production d'IgE	(Rogerieux et al., 2007)
<i>Dactylis glomerata</i>	Exposition <i>in vitro</i> (100 ppb/4h)	Pas de modification au niveau des protéines	(Rogerieux et al., 2007)
<i>Fraxinus pensylvanica</i>	Exposition <i>in vitro</i> (300 ppb/4h)	Augmentation de la libération des protéines	(Thomas et al., 1997)
<i>Nicotiana tabacum</i>	Exposition <i>in vitro</i> (25-100 ppb/5,5 h)	Réduction de la taille du tube pollinique	(Feder, 1968)
<i>Platanus spp</i>	Exposition <i>in vitro</i> (100 ppb /6h)	Diminution du nombre totale des protéines	(Ribeiro et al., 2013)
<i>Pinus halepensis</i>	Exposition <i>in vitro</i> (175 ppb /1h)	Modification de la fraction lipidique	(Naas et al., 2016)
<i>Pinus strobus</i>	Exposition <i>in vitro</i> (100 ppb/8 h)	Pas de modification de la capacité de germination	(Benoit et al., 1983)
<i>Phleum pratense</i>	Exposition <i>in vitro</i> (100 ppb/4h)	Diminution de la production d'IgE	(Rogerieux et al., 2007)
<i>Phleum pratense</i>	Exposition <i>in vitro</i> (30-80 ppb/4h)	Inhibition de l'allergène <i>Pbl p 1</i>	(Albertine et al., 2014)

<i>Phleum pratense</i>	Exposition <i>in vitro</i> (100 ppb/4h)	Pas de modification au niveau des protéines	(Rogerieux et al., 2007)
<i>Phleum pratense</i>	Exposition <i>in vitro</i> (100 ppb/16h)	Modification de la fraction lipidique	(Farah et al., 2019)
<i>Quercus robur</i>	Exposition <i>in vitro</i> (100 ppb/6h)	Diminution du nombre total des protéines	(Ribeiro et al., 2013)
<i>Secale cereale</i>	Exposition <i>in vitro</i> (80 ppb/107 jours)	Augmentation de l'allergène <i>Phl p 1</i>	(Eckl-Dorna et al., 2010)
<i>Secale cereale</i>	Exposition <i>in vitro</i> (300 ppb/4h)	Augmentation de la libération des protéines	(Thomas et al., 1997)
<i>Zea Maize</i>	Exposition <i>in vitro</i> (120 ppb/5,5 h durant 60 jours)	Réduction de l'élongation du tube pollinique	(Mumford et al., 1972)

L'ozone ne semble pas avoir les mêmes effets sur le pollen selon le taxon. Pour certaines espèces végétales, l'ozone semble inerte alors que pour d'autres, des effets contraires sont observés, par exemple sur la quantité totale de protéines. Il n'est clairement pas possible d'extrapoler les effets de l'ozone d'une espèce à une autre espèce. Il est notable que l'ozone semble agir sur certains taxons à partir de faibles doses. Par exemple, l'exposition à l'O₃ *in vitro* à une concentration de 60 ppb durant 6 h induit une réduction significative du taux de viabilité et de germination du pollen de *Betula pendula* (Cuinica et al., 2013b).

La tendance principale est toutefois à la hausse de l'allergénicité du pollen suite à une exposition à l'ozone, que ce soit par l'augmentation des teneurs en allergènes, la modification d'adjuvants polliniques à la réaction allergique, ou encore par la facilitation de la rupture du grain de pollen qui engendre une meilleure dispersion des allergènes.

Même si une hausse de l'allergénicité potentielle du pollen est observée expérimentalement, le lien avec les symptômes n'a pas été clairement établi. Il apparaît dans la littérature que l'ozone aggrave les symptômes mais sans pouvoir apporter de réponse à la question du mécanisme d'action de l'ozone sur le pollen ou sur la personne allergique elle-même. Il a en effet été démontré récemment qu'une augmentation de la concentration d'ozone cause une aggravation des symptômes allergiques durant la saison pollinique du bouleau, des graminées et de l'ambrosie (Berger et al., 2020).

L'augmentation du taux en allergènes est une piste d'explication pour cette exacerbation des symptômes. Beck et al. (2013) ont par exemple montré que la teneur des allergènes *Bet v 1* est positivement corrélée à l'augmentation des niveaux d'ozone (Beck et al., 2013). Par ailleurs, Rogerieux et al. (2007) ont montré une acidification de certains allergènes d'un extrait aqueux de pollen de fléole après l'exposition de ce pollen à l'ozone. En revanche, Rogerieux et al. (2007) ont observé une diminution de la quantité des allergènes du pollen de fléole suite à une exposition artificielle à l'ozone (Rogerieux et al., 2007). Ribeiro et al. (2013) ont quant à eux conclu que l'ozone cause une diminution de la fraction soluble des protéines (*Acer negundo*, *Quercus robur* et *Platanus* spp.) effet qui semble être lié à la nature du grain de pollen et à la concentration d'ozone (Ribeiro et al., 2013).

Parmi les mécanismes reliant l'ozone et les symptômes, Naas et al. (2016) ont montré que la fraction lipidique du pollen de pin est modifiée après une exposition *in vitro* à l'ozone (Naas et al., 2016). Cette modification chimique de la fraction lipidique des pollens pourrait moduler la réaction allergique et le

potentiel allergisant du pollen (Beck et al., 2013; Behrendt et al., 1991). Zhu et al. (2018) ont également montré que l'ozone s'adsorbe en surface du pollen de bouleau avec des implications potentielles sur le stress oxydant induit par le pollen (Zhu et al., 2018). De plus, Pasqualini et al. (2011) ont étudié la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS *Reactive Oxygen Species*) sur du pollen d'*Ambrosia artemisiifolia* exposé à l'ozone à des teneurs atmosphériques pendant plusieurs jours (Pasqualini et al., 2011). Ces auteurs montrent que les ROS ne sont pas directement augmentées par le traitement à l'ozone mais que l'activité d'une enzyme, la NADPH oxidase est stimulée, celle-ci pouvant en retour augmenter la production de ROS (Pasqualini et al., 2011).

Le lien entre l'ozone et les symptômes nécessite plus d'études systématiques avec des conditions d'exposition identiques sur différents types de pollens et avec une extension des moyens analytiques tant physicochimiques que biologiques pour identifier les modifications induites par la pollution. La susceptibilité des pollens à l'ozone est différente selon les taxons et elle pourrait être influencée par les cocktails de polluants. La relation dose-réponse sur le pollen n'est également pas connue.

6.7. Formation de complexes pollen-particules dans l'atmosphère

La pollution de l'air est l'une des causes principales de déclenchement et d'aggravation des allergies respiratoires (Barraza-Villarreal et al., 2008; Cakmak et al., 2002; Chen et al., 2012). D'après l'organisation mondiale de la santé (OMS), les particules atmosphériques affectent plus de personnes que tout autre polluant (OMS, 2011). Une augmentation de la concentration particulaire dans l'air induit une augmentation des entrées aux urgences pour crise d'asthme (Kim et al., 2015; Phosri et al., 2017; Polosa, 2001; Pope and Dockery, 1994).

Bien que l'exposition aux particules atmosphériques seules puisse induire une augmentation des réponses allergiques au niveau de l'appareil respiratoire, de nombreux travaux ont montré que l'association des allergènes aux particules atmosphériques peuvent aggraver les symptômes allergiques (effet adjuvant) (Motta et al., 2006).

Plusieurs voies de contamination du pollen par les particules atmosphériques peuvent s'envisager. La contamination peut survenir avant que le pollen ne quitte la plante au moment de l'ouverture des anthères. Successivement, le grain de pollen peut se polluer par coagulation avec d'autres particules en suspension au cours de son transport atmosphérique. Il est aussi concevable que le pollen se contamine après sédimentation au contact de particules sur une surface polluée (Choël and Visez, 2019).

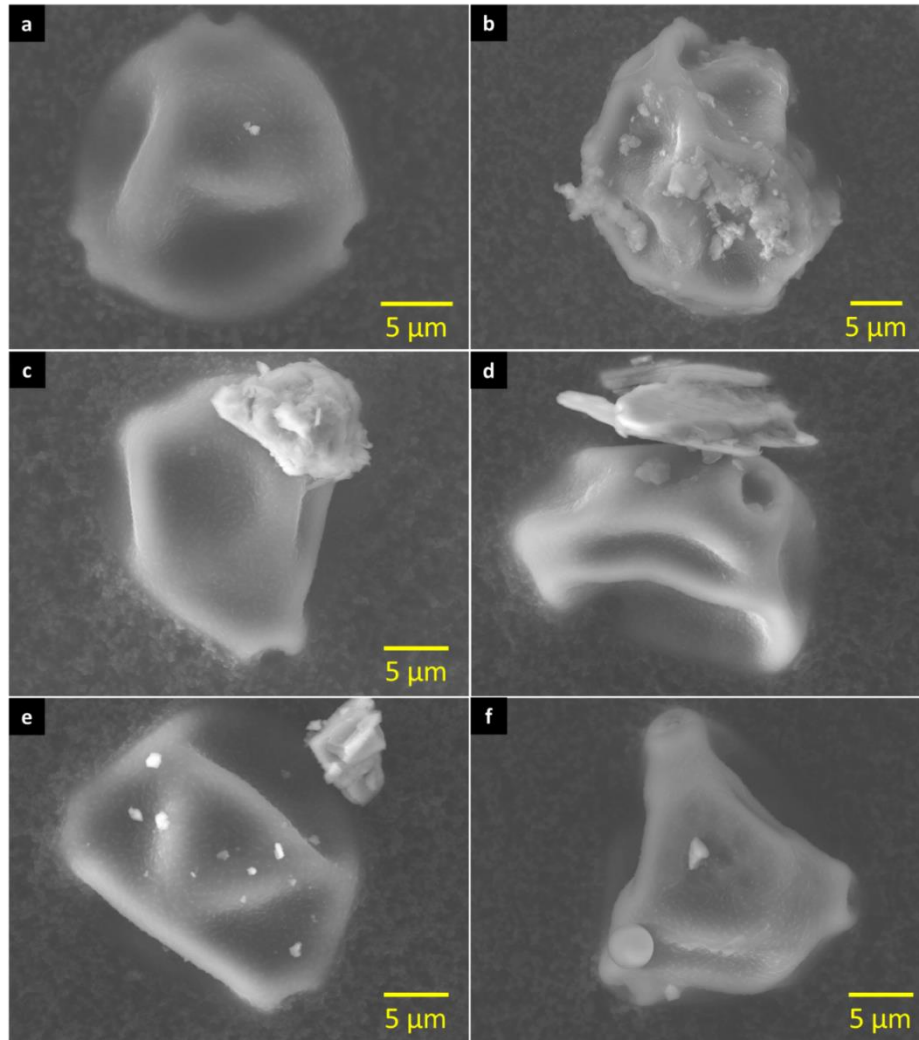


Figure 7 : Clichés de microscopie électronique de grains de pollen de bouleau pollués portant : (a) une particule de silicate de calcium de $1\ \mu\text{m}$; (b) des particules d'aluminosilicate; (c) une grosse particule de poussière de sol ; (d) une grosse particule de phyllosilicate, (e) une particules supermicronique et une douzaine de particules de dolomite submicroniques; (f) une particule sphérique de cendres volantes de charbon (riche en O-Al-Si diam $3,5\ \mu\text{m}$), une particule de calcite (vers le haut) et une particule de gypse (vers le bas) (Choël et al., 2022).

La présence de ces particules sur la surface des grains de pollen cause une modification de la structure des grains de pollen, une modification de leur contenu allergénique et une fragilisation de leur membrane cytoplasmique entraînant ainsi la libération de leur contenu allergénique dans l'air (Motta et al., 2006; Rogerieux et al., 2007; Sénéchal et al., 2015). Les particules atmosphériques peuvent jouer un rôle d'adjuvant dans la survenue de crises d'asthme en adhérant sur la surface des grains de pollen formant ainsi le complexe pollen-particules (González-Díaz et al., 2016; Kim et al., 2013; Schiavoni et al., 2017; Visez et al., 2019).

Par ailleurs, ces particules peuvent affecter la germination des grains de pollen (Visez et al., 2019). Par exemple, la germination du pollen de *Camellia japonica* est perturbée par la présence d'un grand nombre de particules PM sur sa surface (Aoyagi and Ugwu, 2011). Par contre, Gottardini et al. (2004) ont montré une corrélation négative entre la germination et la présence des particules PM sur la surface

des grains de pollen de pin récoltés sur 3 zones distinctes avec différents niveaux de pollution de l'air (Gottardini et al., 2004).

L'effet des polluants gazeux sur les grains de pollens est bien documenté dans la littérature (Frank and Ernst, 2016; Sénéchal et al., 2015). Toutefois, celle de l'interaction entre les grains de pollen et la fraction particulaire de l'atmosphère est moins étudiée (Visez et al., 2019). Cette contradiction est due à la complexité de mener des études systématiques au niveau d'un grain de pollen individuel afin de détecter, compter et analyser la nature chimique des particules adhérentes sur sa surface. En outre, la difficulté de reproduire une pollution particulaire au laboratoire similaire à celle que l'on trouve en conditions réelles rend la tâche également plus délicate.

D'après la littérature, les grains de pollens récoltés en milieu rural présentent moins de particules atmosphériques sur leurs surfaces que les grains récoltés en milieu urbain (Amjad and Shafiqhi, 2012; Azzazy, 2016; Bianchimano et al., 2014; Cerceau-Larrival et al., 1991; Peltre, 1998). Par exemple, Sedghy et al. (2016) ont montré que 20 à 70 % des grains de pollen collectés en milieux urbains présentent des particules atmosphériques sur leurs surfaces. Par contre, les grains de pollen récoltés en milieux ruraux présentent moins des particules sur leurs surfaces, entre 0 et 9% (Sedghy et al., 2016). De façon surprenante, il est remarquable que Guedes et al. (2009) n'aient pas observé de particules diesel sur les grains de pollen collectés dans un milieu urbain caractérisé par un trafic routier fort (Guedes et al., 2009).

Après adhésion sur les grains de pollen, ces particules peuvent être chargées en allergènes par diffusion des protéines en présence d'eau (Kim et al., 2015; Phosri et al., 2017; Polosa, 2001; Pope and Dockery, 1994). Il a été en effet montré que les allergènes *Bet v 1* et *Lol p 1* peuvent se lier aux particules diesel et y rester malgré un nettoyage aqueux (Knox et al., 1997; Ormstad et al., 1998). Ces allergènes associés à des particules fines peuvent pénétrer plus profondément dans les poumons. Ils pourraient aussi rester présents dans l'atmosphère sur des périodes plus longues que les seules périodes de pollinisation.

Les particules diesel jouent un rôle dans la genèse des maladies allergiques et plus particulièrement l'asthme (Riedl and Diaz-Sanchez, 2005; Saxon and Diaz-Sanchez, 2005). D'après la littérature, l'exposition aux particules diesel peut accroître les niveaux en différentes cytokines et chemokines. Ces deux molécules sont des messagers chimiques clés dans le processus inflammatoire de l'asthme. Diaz-Sanchez et al. (1997) ont montré que l'action des particules diesel est aggravée en présence d'allergène d'ambrosie. En effet, ils ont détecté une augmentation de l'expression de toutes les cytokines de type Th2 dans le fluide nasal (Diaz-Sanchez, 1997). Par ailleurs, ils ont montré que ce complexe induit une forte production d'IgE spécifiques de l'ambrosie même quatre jours après l'exposition (Diaz-Sanchez, 1997).

Un fois chargées en allergènes sur la surface du pollen, ces particules pourraient être remises en suspension et ainsi participer à la dispersion des allergènes de pollen dans la fraction fine de l'aérosol atmosphérique (Solomon, 2002).

6.8. Présence des allergènes de pollen dans la fraction respirable de l'aérosol atmosphérique

Les particules de l'aérosol atmosphérique pourraient être un support de transport des allergènes dans l'air. Le transfert de ces derniers sur des particules atmosphériques se fait par contact physique avec les allergènes ou avec des eaux de lessivage du grain de pollen. Les mécanismes précis qui aboutissent à ce contact entre les allergènes et les particules atmosphériques ne sont pas connus avec certitude pour le moment.

Ormstad et al. (2000) ont observé que les particules de suies (taille plus petite que 10 μm) collectées dans l'air intérieur, présentent sur leurs surfaces des allergènes *Bet v 1* de bouleau (Ormstad et al., 2000). Buters et al. (2010) ont détecté aussi des allergènes de bouleau *Bet v 1* dans la fraction $\text{PM}_{2.5}$ de l'aérosol atmosphérique (Buters et al., 2010). A noter que les particules de suies sont aptes à pénétrer profondément dans le système respiratoire. De surcroît, des allergènes des grains de pollen sont détectés sur des particules émises par les transports automobiles (Namork et al., 2006). Vinckier et al. (2006) ont montré, à partir d'un chaton de bouleau, qu'un petit nombre d'orbicules (1 à 3) peuvent quitter l'anthère sous forme de particules libres, jouant un rôle dans la dissémination des allergènes de bouleau (un allergène mineur *Bet v 7* et des traces de *Bet v 1* allergène majeur de bouleau) (Vinckier et al., 2006).

La présence des allergènes dans la fraction PM_{10} de l'aérosol atmosphérique est généralement proportionnelle à la présence de pollen dans l'air (Buters et al., 2010; Jochner et al., 2015; Schäppi et al., 1997). Cependant, la gravité des symptômes allergiques est plutôt liée à la concentration des allergènes présents dans l'air (Buters et al., 2012; Jochner et al., 2015). Feo Brito et al. (2010) ont montré que les symptômes d'allergies polliniques des graminées sont liés principalement à la concentration des allergènes de pollen de graminées dans l'air (Feo Brito et al., 2010).

La dispersion des allergènes dans la fraction fine de l'aérosol atmosphérique peut avoir lieu en dehors de la saison pollinique. En effet, des allergènes de pollen ont été détectés dans la fraction $\text{PM}_{2.5}$ et PM_{10} de l'aérosol atmosphérique en dehors des périodes de pollinisation (Dockery et al., 1993; Namork et al., 2006; Takahashi et al., 1991; Wang et al., 2008). Par exemple, des allergènes de fléole des prés ont été détectés sur des particules PM_{10} collectées en hiver (Namork et al., 2006).

6.9. Rupture du grain de pollen

La taille moyenne des grains de pollen varie entre 20 et 60 μm . Cette taille ne leur permet de pénétrer que dans les voies aériennes supérieures. Cependant, le cytoplasme de pollen contient des granules cytoplasmiques riches en protéines allergisantes appelées allergènes (Grote, 1999; Grote et al., 1993). Ces allergènes sont de nature protéique ou glycoprotéique. Ils sont très solubles dans l'eau (Taylor et al., 2004; Vrtala et al., 1993). Ils peuvent contenir des composés ayant des effets pro-inflammatoires ou adjuvants à la réaction allergique. En outre, les pollens de bouleau ne possèdent pas le même contenu en allergènes. Par exemple, dans une étude menée à Stockholm, Hjelmroos et al. (1995) ont trouvé que les grains de pollen de bouleau qui se trouvent sur la face de l'arbre le plus exposé à la lumière solaire sont plus riches en allergènes que ceux prélevés sur la face de l'arbre qui reçoit moins de lumière solaire (Hjelmroos et al., 1995).

Les granules cytoplasmiques ont une taille comprise entre 0,5 à 4,5 μm selon les espèces (Bacsi et al., 2006). En raison de cette taille réduite, ces granules peuvent pénétrer plus profondément que le grain de pollen dans l'appareil respiratoire (Motta et al., 2006). De ce fait, ils peuvent provoquer des réactions allergiques plus fortes que celles induites par le grain de pollen (Behrendt and Becker, 2001; Motta et al., 2006; Taylor et al., 2002).

Les granules cytoplasmiques sont libérés du pollen de différentes façons. Lorsque le grain de pollen entre en contact avec la muqueuse nasale, le pollen se rompt et les allergènes hydrosolubles diffusent dans le mucus épithélial où ils deviennent disponibles pour le système immunitaire (Behrendt and Becker, 2001).

Cependant, ces allergènes peuvent être libérés avant inhalation. Dans une atmosphère sèche, le pollen est très stable, il peut garder son contenu cytoplasmique (ses allergènes) pendant des années (Stanley and Linskens, 2012). Cependant, la rupture des grains de pollen et la libération de son contenu cytoplasmique dépendent des facteurs intrinsèques (la fraîcheur du pollen et l'espèce des grains de pollen) et extrinsèques tels que les facteurs météorologiques (humidité relative, orage, forte pluie) et les polluants atmosphériques.

Plus le pollen est frais, plus il libère facilement son contenu cytoplasmique. Taylor et al. (2002) ont observé qu'au contact de l'eau, 72% de pollens d'ivraie (*Lolium perenne*), fraîchement récoltés, libèrent leur contenu cytoplasmique, y compris les granules cytoplasmiques. Ce pourcentage diminue de 10 % après un stockage à température ambiante pendant 48h. En outre, cette proportion est réduite à 1 % pour le pollen commercial stocké à 4 °C pendant plus d'un an (Taylor et al., 2002).

La rupture et la dispersion du contenu cytoplasmique dépendent de l'espèce de pollen. Certaines espèces libèrent leurs granules cytoplasmiques plus facilement que d'autres. Par exemple, la libération des allergènes est plus élevée chez les espèces comme *Phleum pratense* et *Lolium perenne* que chez d'autres espèces allergisantes (Behrendt and Becker, 2001). De plus, les pollens de graminées ont une paroi plus mince que celle du pollen de bouleau (Schäppi et al., 1997). Cela peut expliquer le fait que les grains de pollen de graminées libèrent plus facilement leurs granules cytoplasmiques.

Le mécanisme de libération des granules cytoplasmiques est caractéristique de chaque espèce. Par exemple, les grains de pollen de graminées se rompent via leur pore de germination et non pas le long de leur paroi pollinique (Schäppi et al., 1997). De plus, Taylor et al. (2002) ont observé que les différentes espèces de pollen de graminées ne libèrent pas le même nombre de granules cytoplasmiques. Effectivement, le pollen de fléole libère 5 fois plus de granules que celui d'ivraie (Taylor et al., 2002).

Grote et al. (2001) ont suggéré que la différence entre les mécanismes de libération peut être expliquée par les différences dans la composition chimique du contenu cytoplasmique des grains de pollen (Grote et al., 2001). Par exemple, le cytoplasme de pollen de bouleau et de graminées contient des amyloplast. Ces amyloplast sont osmotiquement inactifs. En revanche, le cytoplasme des grains de pollen des graminées contient de grandes quantités de particules polysaccharidiques. Ces particules sont aptes à former des molécules osmotiques. Ces molécules osmotiques permettent un développement des pressions osmotiques capables de causer une expulsion du contenu cytoplasmique (Grote et al., 2001).

La libération des grains de pollen dépend des facteurs climatiques. Schäppi et al. (1997) ont montré que la concentration des allergènes de pollen de bouleau dans l'atmosphère est liée à la quantité des grains de pollen de bouleau présentés dans l'air (Schäppi et al., 1997). En outre, il a montré que la concentration des particules fines associées au Bet v1 augmente fortement lors d'une pluie fine (Levetin and Van de Water, 2008). En effet, les granules cytoplasmiques lessivés par la pluie, libèrent des allergènes qui peuvent induire des réponses allergiques et inflammatoires plus graves que le grain de pollen intact (Chakra et al., 2010). Par exemple, à Derby (Angleterre), Lewis et al. (2000) ont observé une augmentation du nombre des personnes asthmatiques hospitalisées pour crise d'asthme dans des journées de pluie fine (Lewis et al., 2000).

Durant les orages, la quantité d'allergènes détectée est de 20 à 50 fois plus importante que durant les conditions météorologiques normales. Suite à un orage, il a été par exemple enregistré une explosion des réactions allergiques chez les patients allergiques aux graminées (Pulimood et al., 2007). Il a été suggéré que les grains de pollen libèrent les granules cytoplasmiques avec les premières gouttes de pluie. Ces granules cytoplasmiques sont ensuite transportés par les vents violents sur une zone pouvant atteindre 1 km de hauteur. Ce transport des allergènes décrit par Marks et al. (2001) peut causer des pics d'admission aux urgences pour des crises d'asthme chez les sujets asthmatiques qui se trouvent dans cette zone (Marks et al., 2001).

Par ailleurs, les allergènes peuvent être libérés suite à l'action des polluants atmosphériques. La pollution atmosphérique peut causer un changement morphologique du grain de pollen. Selon Shahali et al. (2009) la pollution atmosphérique peut fragiliser la membrane pollinique (Shahali et al., 2009a). Cette fragilisation peut faciliter la biodisponibilité des granules cytoplasmiques. En effet, Peltre et al. (1991) ont observé une augmentation de la quantité de granules de pollens de graminées détectées suite à une exposition aux échappements des voitures (Peltre et al., 1991). Par ailleurs, l'exposition des pollens à O₃, SO₂, NO₂ peut causer une augmentation de la quantité des granules libérées (Rogerieux et al., 2007).

7. L'ALLERGIE POLLINIQUE

7.1. Généralités

L'air contient des aérocontaminants biologiques et chimiques. Ces aérocontaminants peuvent être des gaz, des particules inertes ou biologiques. Ils peuvent avoir des effets néfastes sur la santé. Parmi ces effets, nous nous intéressons principalement à « la pollinose », maladie respiratoire causée par l'inhalation des grains de pollen.

Il est estimé que plus de 10% de la population générale en France est touchée par des réactions allergiques dues aux pollens (ANSES, 2014). Le processus de développement d'allergies se passe en deux étapes : une phase de sensibilisation et une phase effective avec déclenchements de symptômes. Lors de la première phase, aucun symptôme n'est développé, car il s'agit du premier contact avec l'allergène, où l'individu atopique (c.-à-d. génétiquement prédisposé) devient sensibilisé et il résulte de cette étape une production d'anticorps (IgE). La deuxième étape se manifeste par des symptômes d'allergie, causés par une exposition subséquente à cet allergène, entraînant ainsi la libération d'histamines suite à la reconnaissance des allergènes par les anticorps (Valenta, 2002). Les

manifestations cliniques de cette pathologie se présentent sous deux formes : la rhinite allergique et l'asthme allergique.

7.2. Manifestations cliniques

7.2.1. Rhinite allergique

Il s'agit de la manifestation clinique la plus fréquente, elle touche 10 à 30% de la population mondiale (Pawankar et al., 2011). La rhinite allergique, souvent appelée « rhume des foins », est une inflammation de la paroi nasale consécutive à une réaction immunitaire immédiate. Elle est déclenchée par un allergène respiratoire tel que les grains de pollen, les poils d'animaux, les acariens, la poussière, etc.

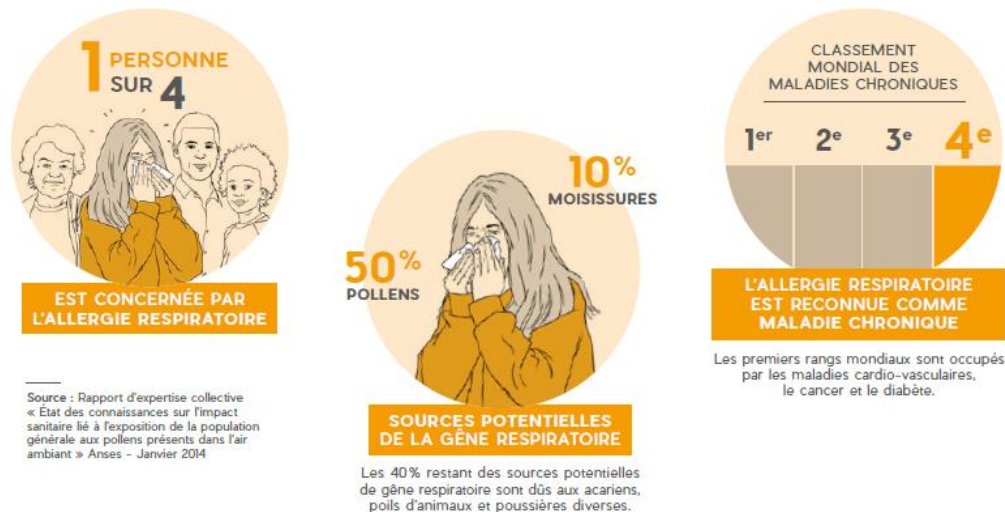


Figure 8: Estimation du nombre de personnes concernées par les allergies respiratoires (RNSA, 2018).

A présent plus de 16% des Français sont affectés par les différentes pathologies liées au pollen. Ce pourcentage a doublé par rapport au taux généralement admis au début des années 1980 (Besancenot, 2007). L'inspiration ou le contact direct avec le pollen cause une libération d'histamine chez les personnes allergiques. Ce contact se manifeste par différents symptômes : prurit, anosmie, rhinorrhée (écoulement nasale), éternuements et obstruction nasale (Moneret-Vautrin, 1994). La rhinite allergique est occasionnée par l'augmentation de la concentration des grains de pollen dans l'air. La rhinite allergique constitue un terrain favorable pour la survenue de l'asthme : la rhinite allergique multiplie le risque d'apparition de l'asthme d'un facteur 4 environ (ANSES, 2014).

7.2.2. Asthme allergique

L'asthme allergique est une maladie chronique, potentiellement mortelle. Il se manifeste par une inflammation des bronches (gonflement de la paroi des conduits aériens), conséquence de l'inhalation des allergènes en suspension dans l'air respiré. Il est reconnu que la présence des allergènes comme le pollen peut aggraver les symptômes de l'asthme (Jacques, 2008). Les manifestations allergiques liées à l'asthme sont l'inflammation des voies aériennes, l'hyperréactivité bronchique, l'œdème et l'hypersécrétion de mucus (ANSES, 2014).

7.2.3. Mécanisme allergique

L'allergie aux pollens est typiquement un mécanisme d'hypersensibilité de type I. C'est une hypersensibilité médiée principalement par les immunoglobulines d'isotype E (IgE). Ces IgE représentent une classe d'immunoglobulines un peu particulières. Leur rôle principal est la sensibilisation des mastocytes tissulaires et des basophiles du sang, deux lignées cellulaires semblables mais non identiques présentant dans leur cytoplasme des granules contenant des médiateurs de l'inflammation et de la réponse allergique (Lane et al., 1994).

Phase de sensibilisation

La phase de sensibilisation prend lieu lors du premier contact de l'allergène avec le corps humain, dans notre cas l'inhalation du pollen. Lorsque le pollen est inhalé, il entre en contact direct avec les muqueuses respiratoires et les protéines, naturellement extraites, vont être prises en charge par des cellules présentatrices d'antigène (CPA - cellules dendritiques, monocytes, macrophages...), comme n'importe quel antigène. Les antigènes (ou allergènes dans notre cas) sont apprêtés, c'est-à-dire dégradés et ré-exprimés en surface des CPA pour être présentés aux cellules T de l'immunité acquise dans un contexte qui va favoriser l'expression de cytokines pro-allergiques de la part des cellules T activées. Les cellules B (cellules sécrétrices d'anticorps) spécifiques de l'allergène, stimulées par ces cytokines, les contacts cellulaires et les allergènes sont sélectionnés et vont, *in fine*, produire des anticorps d'isotype IgE. Les IgE secrétées vont alors se fixer sur des récepteurs de haute affinité spécifiques de l'IgE (FcεRI) présents sur les mastocytes dans les tissus et les basophiles dans le sang circulant. Cette phase de sensibilisation est muette, elle passe inaperçue (Lane et al., 1994).

Phase symptomatique

La réintroduction dans l'organisme du pollen contenant les allergènes auxquels l'individu est maintenant sensibilisé, correspond à la phase symptomatique ou de déclenchement des symptômes. L'allergène se fixe sur les IgE spécifiques présents sur les mastocytes et les basophiles et permet ainsi le pontage entre, au moins, deux FcεRI. Les cellules mastocytaires ou basophiles reçoivent alors un signal d'activation qui entraîne la libération de différents médiateurs inflammatoires (histamine, prostaglandines...) contenus dans les granules et vésicules cytoplasmiques, provoquant ainsi les manifestations cliniques immédiates telles que la rhinite, la conjonctivite, le prurit, la bronchoconstriction et une sécrétion importante de fluide et de mucus (Traidl-Hoffmann et al., 2009).

L'activation des mastocytes est caractérisée par plusieurs événements. En premier, il y a une dégranulation et une libération des médiateurs préformés tels que l'histamine. Ces médiateurs entraînent une vasodilatation importante, une augmentation du flux sanguin local et de la perméabilité vasculaire ce qui aboutit à une accumulation de liquide dans les tissus environnants (œdème). Puis, une synthèse et une libération des médiateurs lipidiques ont lieu. La majorité de ces médiateurs proviennent des phospholipides membranaires tels que la prostaglandine, le thromboxane et certains leucotriènes. Ces derniers permettent d'entretenir la réaction inflammatoire.

Facteurs adjuvants de la réponse inflammatoire et allergique

A noter que les grains de pollen contiennent des molécules similaires à ces médiateurs lipidiques (Mueller, 1998). Ces médiateurs lipidiques sont libérés suite au contact du grain de pollen avec la muqueuse nasale. Ces médiateurs polliniques vont jouer un rôle adjuvant dans la réaction allergique et inflammatoire (Behrendt et al., 2001; Plötz et al., 2004; Traidl-Hoffmann et al., 2002). En outre, des protéines et des lipides bioactifs présents sur le revêtement pollinique du grain de pollen peuvent, par leurs caractéristiques physico-chimiques et fonctionnelles, jouer un rôle adjuvant important dans la réaction allergique et inflammatoire. Ces lipides peuvent causer une activation des neutrophiles et des éosinophiles humains (Bashir et al., 2013a; Plötz et al., 2004; Traidl-Hoffmann et al., 2002). Certains allergènes, outre leur capacité à susciter une réponse IgE peuvent avoir une activité protéolytique (Bashir et al., 2013b). Par exemple, des cystéine-protéases présentes dans le revêtement pollinique du grain de pollen peuvent causer une déstabilisation de l'intégrité de la barrière épithéliale des voies respiratoires en clivant les jonctions cellulaires (Bashir et al., 2013b) favorisant ainsi la pénétration des allergènes. Allakhverdi et al. (2005) ont montré que les grains de pollen intacts jouent un rôle important dans la phase d'induction de la réponse immunitaire allergique (Allakhverdi et al., 2005) grâce aux propriétés intrinsèques de molécules adjuvantes arrivant avec le grain de pollen. Une fois inhalés, ils sont capables d'initier et favoriser des réactions allergiques relayées principalement par les IgE en quelques secondes après le contact avec la muqueuse respiratoire (Grote et al., 2003; Schäppi et al., 1997).

Les allergènes sont non seulement associés à la membrane du pollen mais aussi aux organites intra cytoplasmiques du grain de pollen tels que les mitochondries et les granules cytoplasmiques (Howlett et al., 1973). Lorsque le pollen est fracturé, les granules, sont déversés dans le milieu ambiant et ont la capacité, à cause de leurs petites tailles, de descendre plus profondément dans l'arbre bronchique. En contact avec l'épithélium des voies respiratoires profondes, les allergènes sont libérés et se rendent accessibles au système immunitaire pour tout d'abord sensibiliser l'individu et par la suite déclencher une réaction allergique chez les personnes sensibilisées (Behrendt and Becker, 2001).

D'autres facteurs tels que les facteurs climatiques et la pollution atmosphérique (gazeuse ou particulaire) font partie des facteurs adjuvants qui causent une aggravation de la fréquence et/ou de la gravité des crises d'asthme ou de rhinites allergiques (Dockery and Stone, 2007). D'Amato et al. (2010) ont montré une corrélation positive entre la pollution de l'air en milieu urbain et les maladies respiratoires observées chez les adultes et chez les enfants (D'Amato et al., 2010).

7.3. Les facteurs de risque

7.3.1. Age et sexe

Certaines études indiquent que l'âge et le sexe sont des facteurs de risques dans les allergies. La rhinite allergique et l'asthme affectent principalement les enfants et les adultes et moins les personnes âgées. Selon Banken et al. (1990), l'incidence maximale de la rhinite allergique, causée par *Ambrosia trifida* dans les deux municipalités de Laurentides, est observée chez le groupe d'âges entre 0 et 24 ans, qui représente 70,2% de la totalité des cas (Banken and Comtois, 1990). Rancé et al. (2007) ont révélé que les symptômes des allergies tendent à diminuer avec l'âge et disparaissent avec le vieillissement du système immunitaire (Rancé et al., 2007). La fréquence de l'asthme est dépendante du genre : elle est 2

fois plus élevée chez les garçons que chez les filles. A l'opposé, cette différence n'était pas observée entre les 2 sexes pour les rhinites (Sears et al., 1993).

7.3.2. Prédisposition génétique

La prédisposition génétique est un facteur de risque important pour le développement des allergies respiratoires. Quelques études révèlent que 50% de cas d'asthme dans la population générale sont liés à des facteurs héréditaires (Pearce et al., 1999). En effet, si l'un des parents est asthmatique, cela multiplie par 2 le risque d'être un sujet asthmatique (Bousquet and van Cauwenberge, 2002).

7.3.3. La pollution atmosphérique

Les polluants gazeux et particulaires sont considérés comme facteurs aggravants de la réaction allergique puisqu'ils agissent d'une manière directe en fragilisant l'appareil respiratoire. Ils peuvent agir sur les aéroallergènes tels que les grains de pollen en modifiant leur allergénicité, ou encore leur structure (Sénéchal et al., 2015). Seuls les effets de l'ozone sur les voies respiratoires sont abordés dans cette partie. Des nombreuses études ont évalué les effets de l'ozone sur les voies respiratoires. D'après la littérature, l'exposition immédiate à l'ozone aggrave l'obstruction bronchique chez les sujets asthmatiques (Ball et al., 1996). Ce polluant peut altérer également la muqueuse respiratoire en augmentant sa perméabilité (De Blay et al., 2000). Un des effets les plus conséquent de l'ozone est peut-être l'aggravation de l'inflammation chronique des voies aériennes (Vagaggini et al., 2002).

7.3.4. Le changement climatique

Le changement climatique est devenu, au cours de ces dernières années, un des plus grands enjeux environnementaux de la planète. Les conséquences du changement climatique sont de plus en plus préoccupantes au niveau de la saison pollinique (Besancenot and Thibaudon, 2012). Les observations polliniques et les systèmes de prévision ont montré des modifications de la productivité pollinique, qui pourraient générer des impacts sur la période et l'intensité des allergies, provoquant une aggravation des problèmes respiratoires comme l'asthme (Thibaudon, 2007). En outre, les hausses de température peuvent causer des allongements des saisons polliniques et peuvent également entraîner une augmentation de la quantité d'allergènes des pollens dans l'air (Damialis et al., 2007).

7.3.5. Activité physique et mode de respiration

Berry et al. (1996) montrent qu'après une activité physique d'une heure la fréquence respiratoire augmente d'un facteur de 7 (Berry et al., 1996). Zhang et al. (2012) ont montré que l'augmentation de la fréquence respiratoire augmente la quantité d'allergènes de pollen de bouleau dans le plasma humain (Zhang, 2012). En outre, le mode de respiration affecte la quantité des aérocontaminants déposés dans les poumons. En effet, la respiration par la bouche augmente considérablement le risque de dépôt de particules dans les poumons (Martonen and O'rourke, 1993).

CHAPITRE II ETUDE PRELIMINAIRE

INTRODUCTION GENERALE

Ce chapitre est séparé en deux parties A et B. Il présente les études préliminaires menées au laboratoire. Le chapitre II-A présente l'analyse de grains de pollen individuels par microscopie Raman et par microscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF). La partie B de ce chapitre concerne le développement d'une méthode de prélèvement individuelle passive des grains de pollens en milieu extérieur.

CHAPITRE II-A ANALYSE DE GRAINS DE POLLEN DE BOULEAU INDIVIDUELS PAR MICROSCOPIE RAMAN ET PAR MICROSCOPIE INFRAROUGE A TRANSFORMEE DE FOURIER (IRTF)

1. INTRODUCTION

Les grains de pollen sont des particules de tailles typiquement comprises entre 10 et 100 μm , ce qui explique que la microscopie optique soit parfaitement adaptée à leur observation. Il n'est donc pas surprenant que la méthode conventionnelle d'identification et de dénombrement des grains de pollen ambiants recueillis par les capteurs de type Hirst utilise la microscopie optique. D'autres techniques microscopiques se prêtent à l'analyse du pollen, notamment les microscopies Raman et infrarouge qui ont l'avantage de permettre une caractérisation biochimique du pollen (Zimmermann, 2010).

La microscopie Raman confocale est la combinaison de la microscopie optique et de la spectroscopie Raman. C'est une méthode d'analyse laser non destructive qui, de par sa sélectivité spatiale, est clairement adaptée à l'étude des grains de pollen. Grâce à sa résolution latérale de l'ordre de 1 μm , il est non seulement possible d'analyser des grains de pollen individuels, mais aussi d'étudier des détails à l'échelle de la microstructure du grain de pollen, en positionnant le faisceau laser au milieu du grain pour sonder l'intérieur de la cellule, ou sur le bord du grain pour sonder spécifiquement la membrane pollinique. Selon les conditions de focalisation du laser d'excitation, des profondeurs de quelques micromètres peuvent être sondées dans le grain de pollen (membrane et cytoplasme).

Dans les études antérieures rapportées dans la littérature, la microscopie Raman du pollen est principalement réalisée dans le but de discriminer les types de pollens (taxons) en fonction de leur signatures spectrales (Guedes et al., 2009; Ivleva et al., 2005; Pereira et al., 2021b; Schulte et al., 2008). Des spectres Raman caractéristiques ont été enregistrés pour des pollens courants, souvent choisis pour leur caractère allergisant, afin de constituer des bases de données spectrales. Bien que de nombreuses caractéristiques spectrales soient assez similaires entre les pollens étudiés, ce qui est logique étant donné les éléments constitutifs communs du pollen, des différences suffisamment importantes dans les spectres Raman ont été observées pour permettre une discrimination fiable entre espèces végétales (Bağcıoğlu et al., 2015).

La résolution latérale typique de la microscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) est de l'ordre de 20 à 50 μm . C'est donc une technique de spectroscopie vibrationnelle plutôt adaptée à l'analyse en mode individuel de grains de pollen entiers de tailles supérieures à 20 μm , ou l'analyse d'un ensemble de grains de pollens en mode multi-grains. Dans la littérature, la spectroscopie infrarouge du pollen est présentée comme une technique permettant non seulement d'identifier le genre mais aussi l'espèce de la plante (Bağcıoğlu et al., 2015; Depciuch et al., 2018; Pappas et al., 2003; Zimmermann and Kohler, 2014).

Récemment, ces deux techniques vibrationnelles, Raman et infrarouge, ont été appliquées à l'étude des effets de la pollution atmosphérique sur le pollen (Depciuch et al., 2016b, 2016a; Gong et al., 2019; Kanter et al., 2013; Pereira et al., 2021b). Gong et al. (2019) ont conclu que les lipides et les acides gras insaturés d'un fragment de pollen de *Broussonetia papyrifera* étaient plus sensibles aux attaques de l'ozone que les protéines. Kanter et al. (2013) ont mis en évidence des modifications chimiques pour le pollen d'ambrosie (*Ambrosia artemisiifolia*) après exposition des plantes à une concentration élevée d'ozone (80 ppb) pendant toute une saison de croissance. Les polysaccharides, notamment de la pectine, augmentent et les lipides sont clairement réduits en raison du traitement à l'ozone car ils ont observé une nette réduction des bandes FTIR du pollen traité à l'ozone correspondant aux glycérolipides (Kanter et al., 2013).

Ce chapitre a pour objectif de déterminer les conditions et les paramètres les plus adaptés pour l'étude des grains individuels de pollen de bouleau par microscopie Raman et microscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF). Plus spécifiquement, les conditions opératoires doivent permettre d'identifier si des composés moléculaires apparaissent ou disparaissent en comparant les spectres vibrationnels de grains de pollen de bouleau exposés et non exposés à l'ozone. L'étude a été menée sur des grains de pollen de bouleau (*Betula pendula*) collectés sur le campus de l'Université de Lille, faculté des Sciences et Technologies en mars-avril 2019.

2. GENERATION ET SUIVI DE L'OZONE

La génération de l'ozone est effectuée *in vitro* par la photolyse du dioxygène sous l'action d'une lampe émettant un rayonnement UV centré sur la longueur d'onde de 254 nm (modèle SOG-2 fournisseur UVP). Une lampe à mercure parallèle à un tube en quartz dans lequel circule un flux d'air synthétique de débit de 1,5 L.min⁻¹ est utilisée pour générer le rayonnement UV. La concentration d'ozone produite peut être ajustée en changeant la longueur d'exposition du flux de dioxygène à la lampe UV en déplaçant un cache (**Figure 9**) ou en modifiant le débit d'air synthétique.

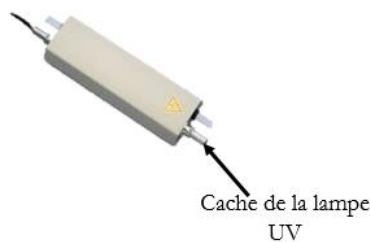


Figure 9: Générateur d'ozone.

Le flux d'ozone est ensuite introduit dans un réacteur en acier où les pollens sont immobilisés entre deux filtres papiers en cellulose (Whatman, diamètre 55 mm). Les grains de pollen sont exposés durant 24 heures à une concentration de 1000 ppb d'ozone. Cette concentration est bien plus élevée que celles

couramment rencontrées dans l'atmosphère. Toutefois, cette concentration est utilisée pour faciliter l'identification des espèces chimiques et d'éventuelles changements de rapport de bandes.

La concentration d'ozone est mesurée toutes les 10 secondes en sortie de réacteur par un analyseur d'ozone (Thermo Fisher Scientific, modèle 49i) avec une limite de détection de 1 ppb. Le dispositif expérimental est présenté dans la **Figure 10**.

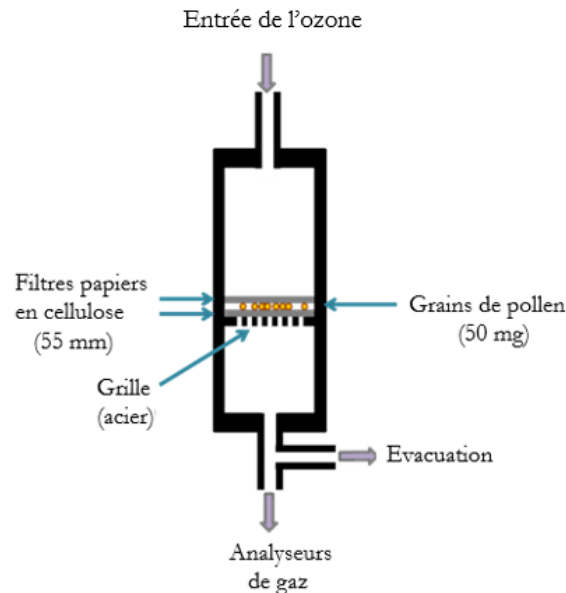


Figure 10 : Schéma du dispositif d'exposition des grains de pollen aux polluants gazeux (O_3). Les grains de pollen sont placés entre les deux filtres en cellulose (diamètre 55 mm). La concentration d'ozone est mesurée à la sortie du réacteur par un analyseur d'ozone photométrique UV.

3. MICROSCOPIE RAMAN

3.1. Optimisation des conditions d'acquisition en microscopie Raman

Des premiers tests ont été réalisés par microspectrométrie Raman afin de déterminer les paramètres d'acquisition les plus adaptés pour l'analyse des grains de pollen de bouleau individuels. Le pollen est constitué de nombreuses molécules organiques (Visez et al., 2021). La couche externe (exine) est constituée de sporopollénine, qui est l'une des substances les plus résistantes que l'on trouve dans la nature. L'exine est un site d'accumulation de pigments flavonoïdes et caroténoïdes qui confèrent la couleur jaune du pollen de bouleau. La couche interne (intine) est constituée de matières cellulosiques et de pectine. Ces molécules, souvent fluorescentes, rendent les mesures par spectroscopie Raman difficiles en raison de la très faible intensité du signal Raman en comparaison de l'intensité de la fluorescence (faible rapport signal sur bruit). En effet, les raies Raman peuvent être complètement masquées par la forte interférence du signal de fond de fluorescence. L'une des techniques utilisées pour éviter cet inconvénient consiste à modifier la longueur d'onde d'excitation Raman. Ainsi, afin de déterminer la longueur d'onde la mieux adaptée à l'étude du pollen, des spectres Raman ont été

mesurés avec cinq longueurs d'onde d'excitation disponibles dans le laboratoire LASIRE : 473, 514, 532, 633 et 785 nm.

Ces expériences ont été conduites sur un microscope confocal Raman LabRAM HR (Horiba Scientific) de focale 800 mm équipé avec des objectifs de microscope $\times 10$, $\times 50$ et $\times 100$, des réseaux de diffraction de 300, 600 et 1800 traits/mm et d'un système DuoScan qui est un mode d'imagerie confocale utilisant des miroirs pour permettre de balayer le faisceau laser sur une surface prédéterminée à cartographier sans déplacer l'échantillon et d'obtenir un spectre moyen de la région balayée. Les grains de pollen intacts ont été déposés sur une lame de verre placée directement sur la platine du microscope (sans aucune préparation préalable) et analysés dans des conditions atmosphériques ambiantes. Les grains de pollen ont d'abord été inspectés visuellement en lumière blanche pour sélectionner un grain isolé à étudier. Une fois le grain de pollen focalisé sous l'objectif du microscope, la lumière blanche a été éteinte et le laser a été allumé. Le spectre Raman a été enregistré avec chacune des cinq lignes d'excitation et affiché avec le logiciel LabSpec6 (Horiba Scientific).

La **Figure 11** montre les spectres Raman moyennés (en unités de longueur d'onde) mesurés avec chacune des lignes d'excitation disponibles au laboratoire. L'allure de l'ensemble des spectres met en évidence une forte bande de fluorescence avec un maximum centré vers 560 nm. Dans une étude antérieure, le spectre de fluorescence du pollen de *Betula pendula* obtenu avec une ligne excitatrice à 370 nm présente plusieurs maxima, dont un dans la région spectrale 500-600 nm attribué à la présence de caroténoïdes, lipopigments et flavines (O'Connor et al., 2011). Les raies Raman dans les spectres collectés avec les lignes 473, 514 et 532 nm sont masquées par la forte fluorescence. Des raies Raman sont plus distinctement observables sur les spectres collectés avec les lignes d'excitation à 633 et 785 nm. Ces deux lignes excitatrices sont également celles qui ont été retenues dans des études antérieures pour d'autres types de pollens d'arbres (Laucks et al., 2000; Schulte et al., 2008). Sur la **Figure 11**, le spectre obtenu avec la ligne d'excitation à 633 nm montre un bon ratio signal/bruit tandis que les intensités Raman collectées avec la ligne excitatrice à 785 nm sont de faible intensité pour le même temps de mesure. Ceci s'explique par l'efficacité de l'excitation : le signal de diffusion Raman est proportionnel à λ^{-4} , où λ est la longueur d'onde du laser d'excitation. La diffusion Raman à 633 nm est 2,4 fois plus importante qu'à 785 nm. Ainsi, la ligne excitatrice à 633 nm est la plus favorable à l'étude du pollen de bouleau.

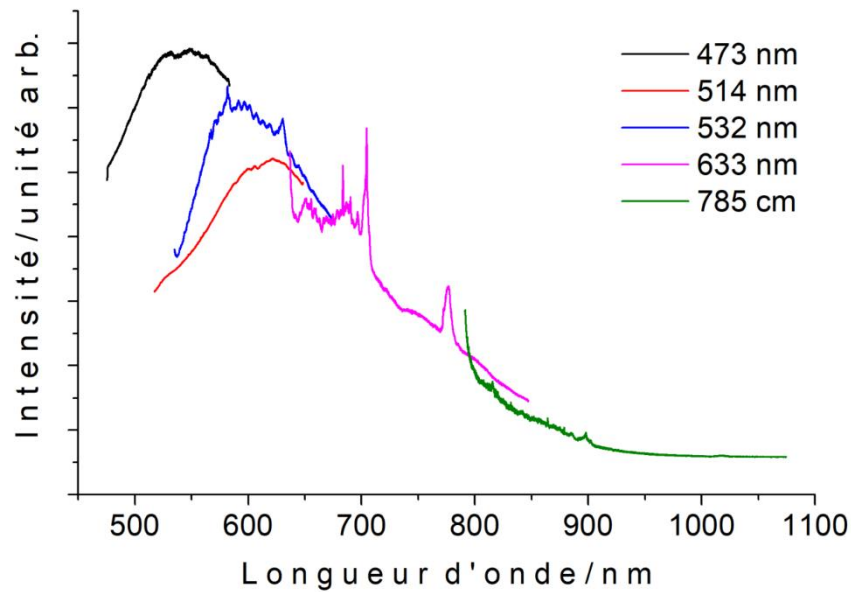


Figure 11: Spectres d'intensité Raman en fonction de la longueur d'onde obtenus pour un grain de pollen de bouleau avec cinq lignes d'excitation : 473, 514, 532, 633 et 785 nm.

Après avoir choisi la ligne d'excitation Raman appropriée, la distribution des espèces chimiques à la surface des grains de pollen individuels a été explorée par imagerie Raman. Les conditions d'acquisition des cartographies Raman des grains de pollen de bouleau sont indiquées dans le **Tableau 11**. En utilisant ces paramètres d'acquisition, la puissance laser transmise à l'échantillon est d'environ 10 mW, la résolution latérale d'analyse est de l'ordre de 1 μm et la résolution spectrale est de 2 cm^{-1} (correspondant à $3 \times 0,7 \text{ cm}^{-1}/\text{pixel}$).

Tableau 11 : Conditions d'acquisition des spectres Raman des grains de pollen de bouleau

Temps acquisition (s)	10
Accumulation (nombre de spectres par point)	3
Gamme spectrale (cm^{-1})	100-4000
Objectif	100x (NA 0,9)
Réseau (traits/mm)	600
Laser (λ)	633 nm
Trou confocal	1000 μm
Fente d'entrée du spectromètre	100 μm
Pas (xxy) pour les cartographies	2x2 μm

3.2. Etude de la composition de la surface d'un grain de pollen avant et après exposition à l'ozone par microscopie Raman

Dans un premier temps, des spectres Raman ont été acquis en mode ponctuel en focalisant le laser en différents points de la surface de grains de pollen de bouleau. On observe que certains spectres ponctuels présentent un fond de fluorescence plus important que d'autres (**Figure 12**). Cette variabilité du fond de fluorescence peut avoir plusieurs origines. La paroi externe du pollen (exine) est un site d'accumulation de divers pigments flavonoïdes et caroténoïdes, qui sont des fluorophores ; l'intensité du fond de fluorescence pourrait varier selon la concentration de ces pigments non uniformément répartis sur la surface du grain. Une autre explication possible de cette variabilité du fond de fluorescence est la non planéité de la surface pollinique. Si l'on considère que le diamètre des grains de pollen de bouleau est de l'ordre de 20 μm et que la profondeur de pénétration du laser d'excitation dans la matière pollinique est de l'ordre de quelques micromètres, on peut supposer que l'on sonde la paroi externe du pollen (exine), la couche intine riche en cellulose située en dessous et l'intérieur cellulaire du pollen. Nous rechercherons donc les signatures spectrales des bases nucléotidiques, des acides aminés aromatiques des chaînes latérales des protéines, des molécules lipidiques, des squelettes amides des acides nucléiques et des protéines, des pigments caroténoïdes et flavonoïdes, des sucres et de leurs polymères.

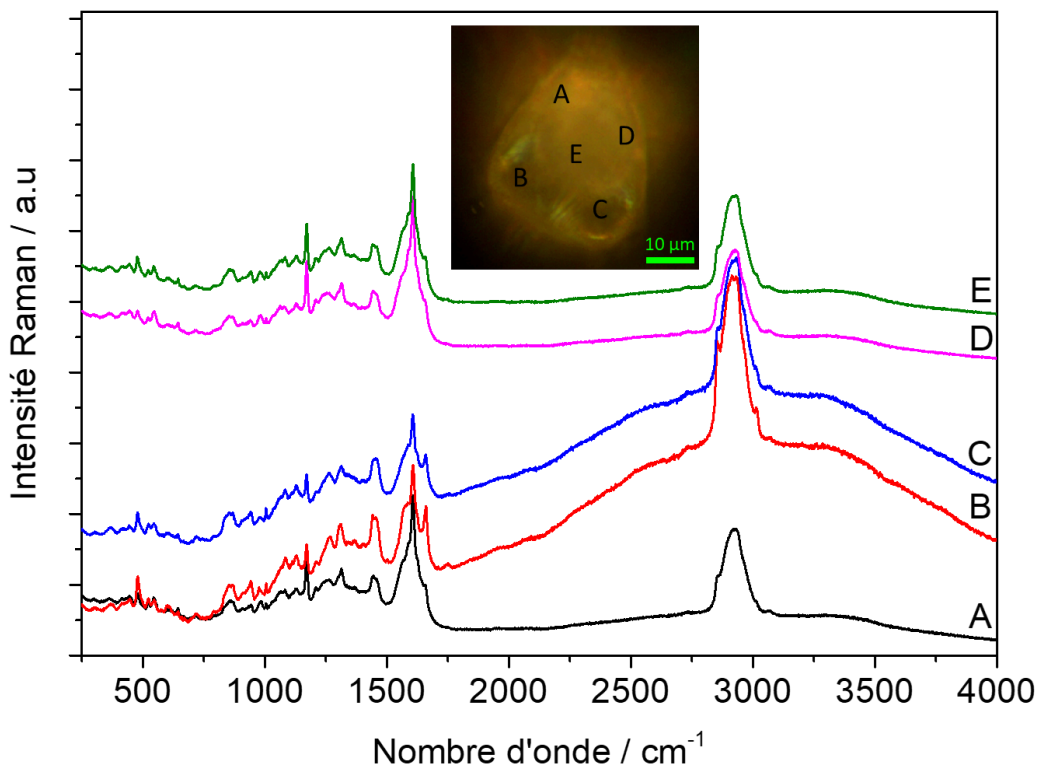


Figure 12 : Fond de fluorescence variable selon la localisation du faisceau laser à la surface du grain de pollen de bouleau.

A la lumière de la variabilité intra-grain du fond de fluorescence mise en évidence par les acquisitions spectrales en mode ponctuel, des cartographies Raman ont été acquises sur la totalité de la surface du grain de pollen de bouleau avec un pas de 2 μm dans les deux directions (x et y). Pour éliminer le fond de fluorescence variable entre chaque spectre point, une correction de ligne de base polynomiale a été appliquée en utilisant l'algorithme de traitement spectral de LabSpec6.

La **Figure 13** montre (a) l'image optique, (b) un spectre typique d'un pixel de la surface et (c) les images Raman d'un grain de pollen de bouleau avant exposition à l'ozone. Les spectres polliniques se composent de signaux superposés provenant de diverses biomolécules, telles que les acides nucléiques, les lipides et les protéines. Les images Raman montrent des espèces chimiques distribuées de façon hétérogène à la surface du grain.

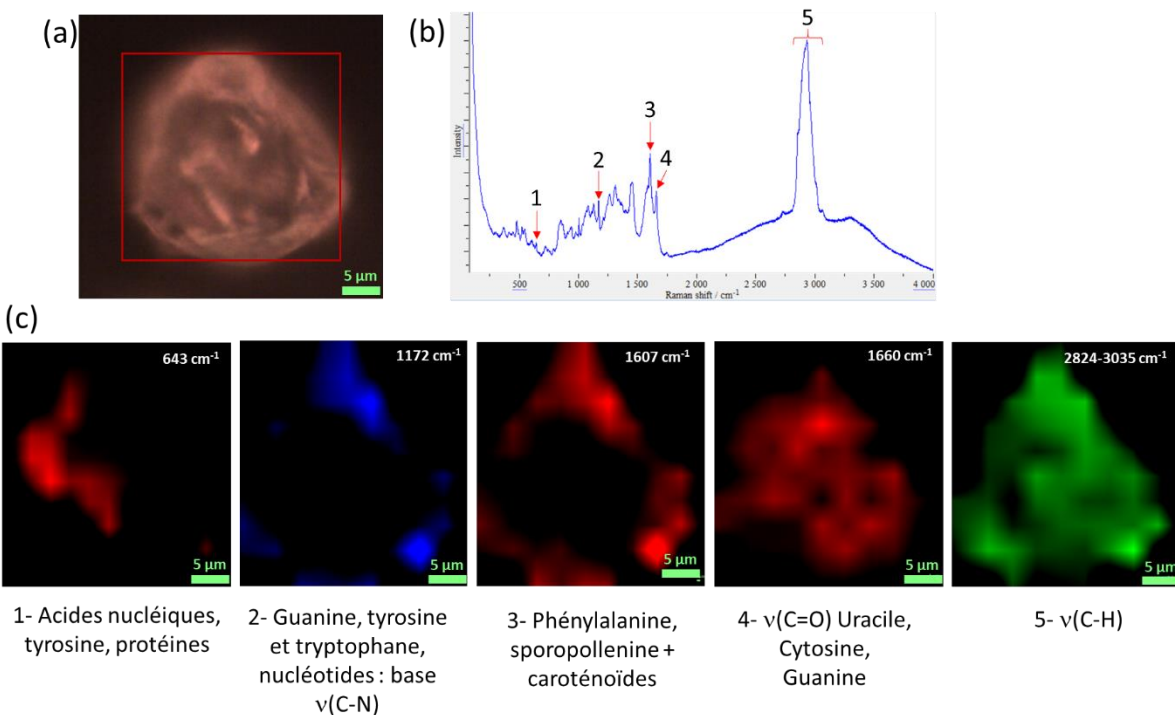


Figure 13: a) Image optique d'un grain de pollen de bouleau non exposé à l'ozone, b) Spectre Raman avec un pointé de pics, c) Images Raman reconstruites pour les cinq bandes indiquées en b). La taille de la cartographie est de 30x30 μm .

Le **Tableau 12** liste les nombres d'onde des raies Raman obtenues pour un grain de pollen de bouleau avant exposition à l'ozone. Schulte et al. (2008) ont proposé une interprétation des spectres Raman attribuables à la paroi externe pour 15 taxons de pollens (Schulte et al., 2008). Ces spectres présentent des signaux provenant de plusieurs biomolécules telles que les acides nucléiques, lipides et protéines. Dans le **Tableau 12**, nous avons reporté les attributions possibles des bandes spectrales présentes dans la région entre 312 et 3015 cm^{-1} pour nos propres spectres par analogie avec les attributions trouvées dans la littérature (Boyain-Goitia et al., 2003; Ivleva et al., 2005; Laucks et al., 2000; Mondol et al., 2019; Pereira et al., 2021a; Pummer et al., 2013).

Tableau 12: Nombres d'onde et attributions des pics observés sur le spectre Raman d'un grain de pollen de bouleau intact.

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Attribution ^{a,b}	Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Attribution ^{a,b}
312		1060	
368		1084	v _{as} (C-O-C) glycosidique
416		1130	caroténoïde v ₃ , v(C-H), v(C-C)
446		1172	Guanine, tyrosine et tryptophane, nucléotides: base v(C-N)
479	vibrations squelettiques δ(C-C-C), pectine	1207	Phosphate
523	v(S-S) cystéine	1237	
545	δ (C-O-C) glycosidique	1262	protéine: amide III
604	phénylalanine, sporopollénine + caroténoïdes	1312	δ(N-H), δ(C-H) protéines
617	phénylalanine, protéines (anneau)	1441	lipides, protéines, δ(CH ₂ , CH ₃)
643	Acides nucléiques, tyrosine, protéines	1455	δ(H-C-H), sporopollénine + caroténoïdes, lipides
715	Acides nucléiques, tyrosine, protéines : v(C-S) méthionine	1569	Acides nucléiques puriniques Guanine, Adénine
795	Acides nucléiques, tyrosine, protéines	1588	protéines: phénylalanine, tyrosine
854	δ(C-C-H) aliphatique, tyrosine (anneau), protéines,	1607	Phénylalanine, sporopollénine + caroténoïdes
867	v _s (C-O-C) glycosidique, v(C-C)	1660	v(C=O) Uracile, Cytosine, Guanine
908		2856	v(C-H)
942	phénylalanine, sporopollénine + caroténoïdes	2914	v(C-H)
980	caroténoïde	2932	v(C-H)

	Phénylalanine, protéines, C=C (mode de respiration)		
1007	caroténoïde ν_6 , C=C (mode de respiration de l'anneau aromatique)	3015	$\nu(\text{C-H})$

^a d'après Pummer et al., 2013; ^b d'après Schulte et al., 2008

La **Figure 14** présente (a) l'image optique, (b) un spectre typique d'un pixel de la surface et (c) les images Raman d'un grain de pollen de bouleau après exposition à l'ozone pour les mêmes bandes repérées sur la cartographie du grain de pollen de bouleau non traité à l'ozone (**Figure 14**). On constate que la répartition des espèces chimiques est hétérogène, comme observé pour le grain de pollen non traité à l'ozone.

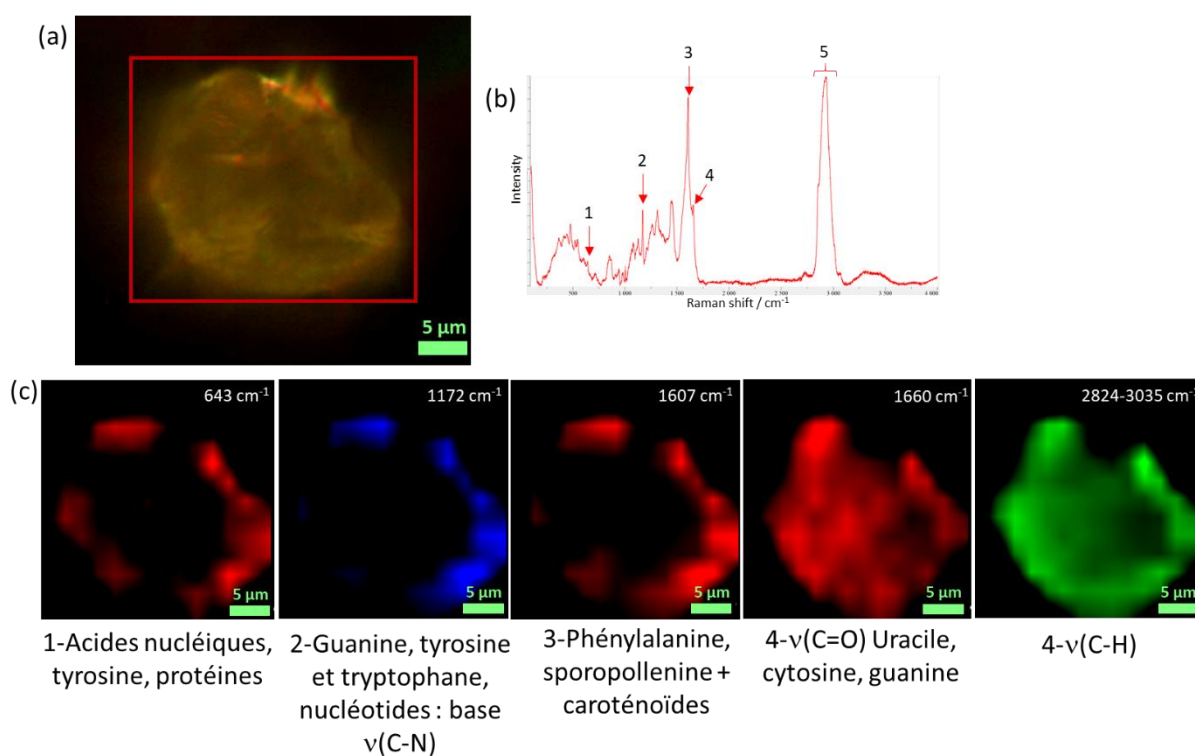


Figure 14: a) Image optique d'un grain de pollen de bouleau exposé à l'ozone, b) Spectre Raman après soustraction de la ligne de base avec un pointé de pics, c) Images Raman reconstruites pour les cinq bandes indiquées en b). La taille de la cartographie est de $26 \times 24 \mu\text{m}$.

Afin de tenir compte de l'hétérogénéité de la surface des grains, des spectres Raman moyennés des grains de pollen intacts (non exposés à l'ozone) et exposés à 1000 ppb d'ozone pendant 24 heures ont été enregistrés en utilisant un objectif $\times 10$ avec le système DuoScan du microspectromètre Raman paramétré pour que le faisceau laser balaie une surface circulaire équivalente à la taille du grain (environ $20 \mu\text{m}$ de diamètre). La **Figure 15** montre les spectres moyennés mesurés pour un grain de pollen

intact et un grain exposé à l'ozone. Quelques petites variations ont été observées sur les spectres, principalement sur les bandes à 545 cm^{-1} et 1455 cm^{-1} attribuées respectivement aux déformations des groupements C-O-C et CH_2 . En outre, une nouvelle raie de faible intensité semble croître vers 1643 cm^{-1} , probablement due à la formation d'un composé contenant un groupement C=O. Cependant, avant de conclure de manière définitive quant aux changements d'intensités à ces positions spectrales, et en raison de la variabilité de la composition inter- et intra-grain de pollen, ces observations ont besoin d'être confortées par d'autres analyses afin de confirmer la répétabilité des résultats.

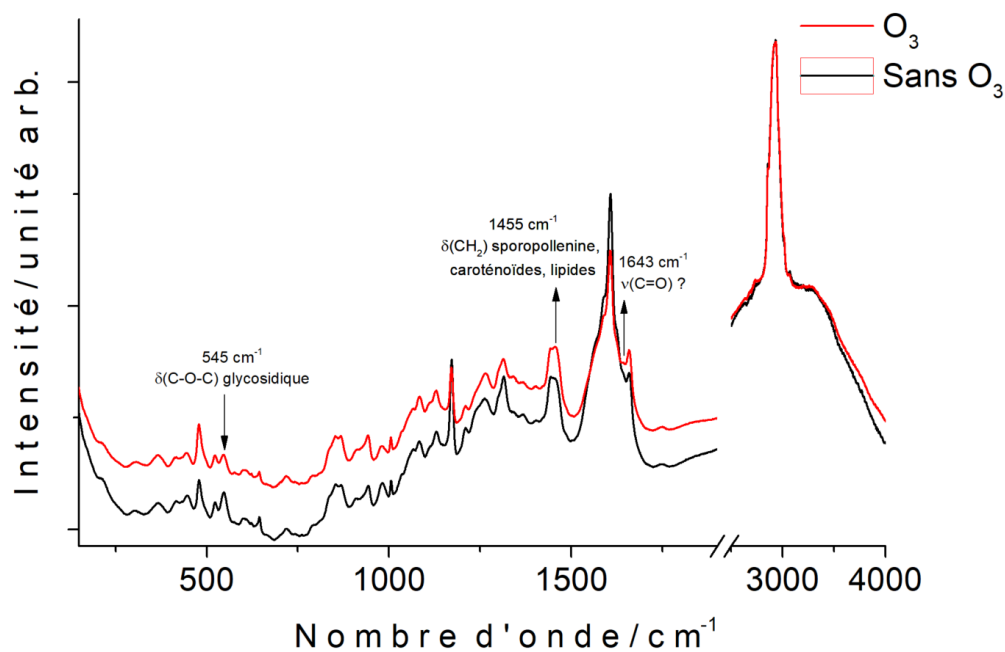


Figure 15: Spectres Raman moyennés d'un grain de pollen intact et un grain de pollen exposé à l'ozone.

4. MICROSCOPIE INFRAROUGE A TRANSFORMEE DE FOURIER (IRTF)

La microscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) est une technique de spectroscopie vibrationnelle basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par l'échantillon à analyser. Plus précisément, le principe de la microscopie IRTF repose sur l'absorption du rayonnement infrarouge lorsque des longueurs d'onde (énergies) du faisceau infrarouge sont égales aux énergies de vibrations des molécules présentes au sein de l'échantillon. Elle permet donc de déterminer la présence de certaines fonctions chimiques présentes dans l'échantillon via l'absorption des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques.

Le dispositif utilisé pour l'analyse des grains de pollen est un microscope IRTF Hyperion (Bruker). Afin de caractériser les structures moléculaires de nos grains de pollen, nous avons sondé les vibrations des molécules, en travaillant dans le moyen IR entre 2,5 et 25 μm ($400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) comme pour le Raman. La résolution spectrale est 4 cm^{-1} . Chaque mesure a été répétée trois fois. Avant chaque mesure, un background est réalisé afin de soustraire le bruit de fond. Le logiciel OPUS (Bruker) est utilisé pour l'acquisition et le traitement des spectres.

Les grains de pollen intacts ont été déposés sur les substrats transparents en IR, soit sur lame de KBr ou CaF_2 ou ZnSe placée directement sous l'objectif du microscope (sans aucune préparation préalable) (**Figure 16**).

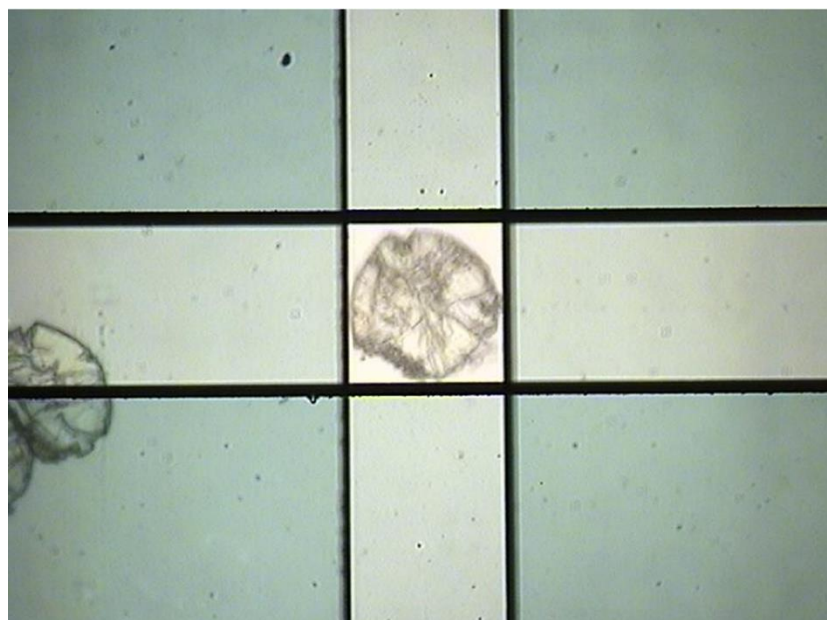


Figure 16: Image optique d'un grain de pollen de bouleau observé au microscope IRTF Hyperion (Bruker). Les diaphragmes permettent d'adapter le spot de mesure à la taille de l'échantillon pour acquérir un spectre de grain de pollen individuel.

L'absorption du rayonnement infrarouge par le matériau de l'échantillon est mesurée en fonction de la longueur d'onde. La gamme spectrale étudiée va de $650\text{ à }1800\text{ cm}^{-1}$. Afin de tenir compte de l'hétérogénéité de la surface des grains, des spectres moyennés sont présentés dans la **Figure 17** pour

des grains de pollen de bouleau intacts non exposés à l’ozone et des grains de pollens exposés à 1000 ppb d’ozone durant 24 heures. Cette concentration est loin d’être représentative des concentrations d’ozone enregistrées dans l’atmosphère, mais a été choisie pour bien mettre en évidence d’éventuels changements spectraux. Même avec une telle concentration, seules de légères différences sont observées sur les bandes à 1016 cm^{-1} , 1417 cm^{-1} , 1525 cm^{-1} et 1747 cm^{-1} (**Figure 17**).

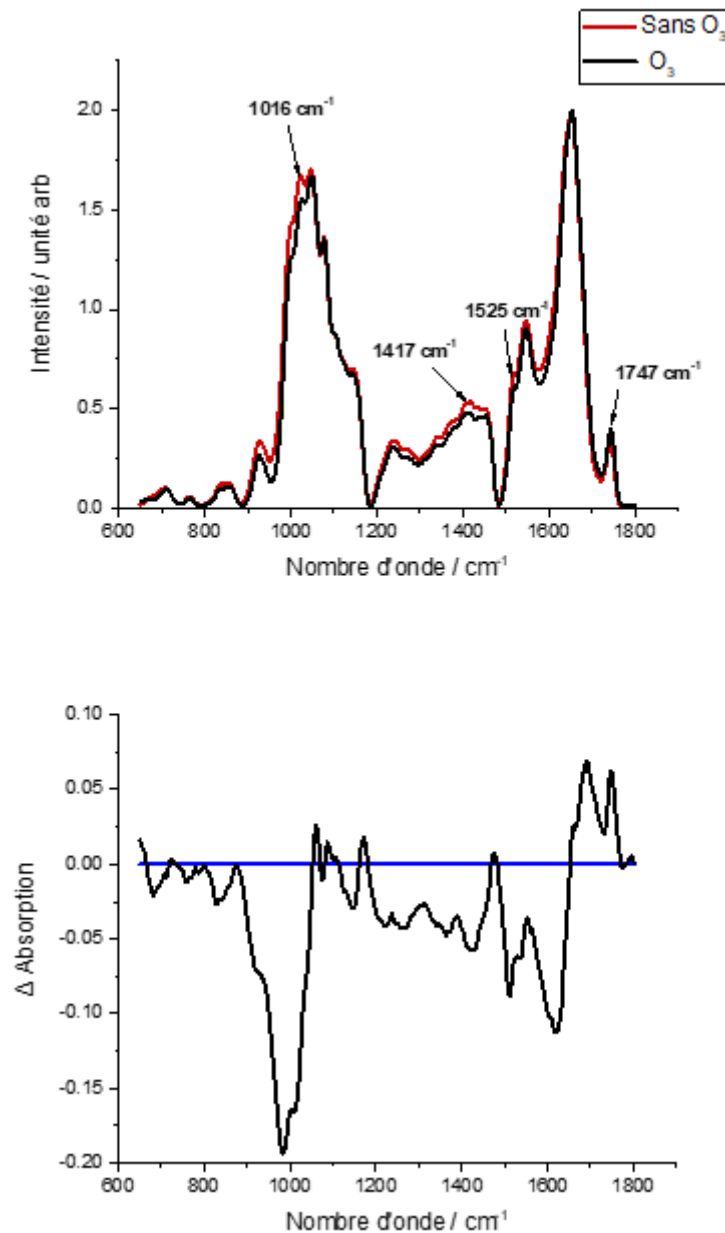


Figure 17: Spectres infrarouges moyennés mesurés pour un grain de pollen non exposé (spectre témoin) et un grain exposé à l’ozone (en haut) et différence (Δ Absorption) entre le spectre témoin et le spectre du pollen traité à l’ozone (en bas).

Cela suggère que le traitement à l’ozone modifie certaines liaisons dont les nombres d’onde des vibrations se situent dans cette zone spectrale entre 650 et 1800 cm^{-1} . Ces bandes se trouvent dans une région caractéristique des modes d’élongation des liaisons C=C et des vibrations des squelettes C-C, mais encore des modes de déformation des liaisons C-H. L’analyse de cette gamme spectrale est relativement complexe. En fait, selon Depciuch et al. (2018), cette zone correspond à la région qui constitue l’empreinte de chaque espèce de pollen de bouleau, car dans cette gamme spectrale chaque espèce de pollen présente des vibrations spécifiques (Depciuch et al., 2018).

Le **Tableau 13** montre les nombres d’onde des raies obtenues pour un grain de pollen de bouleau avant exposition à l’ozone (Depciuch et al., 2018).

Tableau 13: Nombres d’onde et attributions des pics observés sur le spectre IRTF d’un grain de pollen de bouleau

Nombre d’onde (cm^{-1})	Attribution ^a
1032	Elongation C-O-C
1000-1075	Elongation C-O
1460	Elongation CH_2
1515-1570	-CNH (amide II)
1600	Elongation C=O (protéines)
1650	Déformation N-H ₂ (amide I)
1738	Elongation C=O (lipides)
2850	Elongation CH_2 (lipides)
2930	Elongation CH_3 (lipides)
3007	C=C-O-H
3300	Elongation O-H (eau)

^a d’après Depciuch et al. (2018)

Nous observons qu’après expositions de pollen de bouleau à l’ozone les bandes 1016 cm^{-1} , 1417 cm^{-1} sont devenues moins intenses. Cela peut être dû à une déformation des groupements C-O et CH_2 . Par contre, le cas contraire est observé pour la bande 1747 cm^{-1} qui semble augmenter d’intensité après exposition à l’ozone, qui peut correspondre à une formation d’un groupement C=O. En ce qui concerne la bande 1525 cm^{-1} nous remarquons qu’elle a presque disparue après exposition à l’ozone. Une hypothèse est que l’ozone a réagi avec le groupement -CNH, causant la formation d’un autre composé (Kanter et al., 2013).

5. CONCLUSION

La spectroscopie Raman constitue avec la spectroscopie infrarouge une des branches de la spectroscopie de vibration. Elles permettent la caractérisation chimique d’échantillons biologiques tels qu’ici les pollens. Elles sont deux techniques complémentaires importantes utilisées déjà fréquemment pour la discrimination de différentes espèces de pollen à partir de leurs signatures spectrales (Ivleva et

al., 2005; Laucks et al., 2000; Schulte et al., 2009). Dans cette étude préliminaire, les analyses ont été effectuées à l'échelle du grain de pollen en utilisant ces deux techniques.

La forte fluorescence rend les mesures par spectroscopie Raman difficiles mais pas insurmontables. Par rapport à la microscopie IRTF, la microspectrométrie Raman présente l'avantage de fournir des informations sur la composition chimique avec une résolution spatiale de l'ordre de $1 \mu\text{m}^2$. L'étude de la distribution spatiale des espèces sur la surface extérieure d'un grain de pollen peut refléter sa composition chimique très complexe. En conséquence, la réactivité chimique, face aux polluants, peut varier et dépendre de la composition locale. Ainsi, une étude sur des grains de pollen individuels par imagerie Raman a été conduite afin de prouver le potentiel de la technique pour étudier la composition à l'échelle microscopique de la surface. La variabilité intra-grain de la composition chimique des grains de pollen a pu être montrée.

Les observations spectrales faites concernant l'effet d'un traitement à l'ozone à 1000 ppb pendant 24h ne sont pas définitives et ont besoin d'être confortées par d'autres analyses pour confirmer la répétabilité des résultats. Par ailleurs, la recherche d'un indicateur de pollution par l'ozone d'un grain de pollen de bouleau doit se poursuivre par le suivi microspectroscopique de l'exposition à l'ozone *in situ* et l'utilisation de méthodes chimiométriques afin d'obtenir des informations spectrales exploitables avec des concentrations d'ozone proches de la réalité.

CHAPITRE II-B DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE PRELEVEMENT INDIVIDUELLE PASSIVE DES GRAINS DE POLLENS EN MILIEU EXTERIEUR

1. INTRODUCTION

Les grains de pollen présentent une structure aérodynamique complexe, autrement dit une morphologie qui diffère fortement d'une forme purement sphérique (Frenguelli, 2004). Outre leur morphologie spécifique, les grains de pollen présentent une membrane externe finement sculptée, appelée ornementation de l'exine, caractéristique de l'espèce végétale (Diethart et al., 2007). Historiquement, la microscopie électronique à balayage (MEB), avec une résolution latérale de l'ordre de 5 nm en mode d'imagerie en électrons secondaires qui permet d'observer l'ultrastructure de l'exine, est employée pour identifier les différentes variétés de pollens, dans la plupart des cas sans ambiguïté (Halbritter et al., 2018; House and Balkwill, 2013). Quand elle est couplée à la spectrométrie d'émission de rayons X dispersive en énergie (EDX), la MEB rend possible à la fois l'observation de surfaces polliniques mais également l'analyse de la composition élémentaire à l'échelle du grain de pollen (Iwano et al., 1999). Ainsi, le MEB/EDX est devenue une technique de choix dans les études sur les effets de la pollution atmosphérique sur le grain de pollen, tant pour examiner l'intégrité de la membrane pollinique (Motta et al., 2006; Visez et al., 2015) que pour explorer la contamination particulaire de sa surface (Behrendt et al., 1992). Dans une précédente étude, du pollen de bouleau (*Betula verrucosa*), fraîchement recueilli dans les anthères puis placé le long d'une route à fort trafic, s'est révélé être un excellent marqueur de la pollution, en termes d'altération de la composition inorganique de l'exine et de présence de particules de polluants inorganiques collées à la surface du pollen (Cerceau-Larrival et al., 1991). La présence de particules adhérentes en surface du pollen peut exacerber la réaction allergique d'une personne sensible (D'amato, 2000). C'est pourquoi par la suite, de nombreuses autres études se sont intéressées à l'adhésion de microparticules de pollution à la surface du pollen (Duque et al., 2013; Okuyama et al., 2007; Sedghy et al., 2016; Shahali et al., 2009a; Wang et al., 2012).

Dans notre revue de la littérature, nous avons recensé toutes les études relatives à la contamination particulaire du grain de pollen connues à ce jour (Visez et al., 2019). Dans l'objectif de connaître le degré réel de pollution particulaire du pollen respiré, nous avons souligné que dans la plupart des cas, la stratégie de prélèvement du pollen utilisée dans les études antérieures n'était pas adaptée. En effet, les techniques de prélèvement du pollen employées (capteur de Hirst, notamment), pouvaient elles-mêmes entraîner une pollution particulaire, conduisant à une surestimation de celle-ci (artefact de prélèvement) (Choël et al., 2020). Pour quantifier le degré de contamination particulaire du pollen ambiant de manière réaliste, il faut avoir recours à un préleveur muni d'étages de collecte pour les différentes fractions de taille des particules atmosphériques, tel qu'un impacteur en cascade PM10, dans lequel un étage permet de collecter la fraction grossière d'appartenance du pollen. En utilisant un tel dispositif, nous avons quantifié une contamination de la surface pollinique de 2 ± 1 particules par grain de pollen de bouleau en moyenne pour 38 % des grains de pollen de bouleau pollués échantillonnés dans des conditions de pollution atmosphérique modérée (PM10 moyenne = $26,3 \mu\text{g m}^{-3}$) (Choël et al., 2022). Cette étude, la première du genre, a été menée sur une plateforme d'observation des aérosols située sur le toit d'un bâtiment du campus de l'Université de Lille, à environ 20 mètres de hauteur.

Les mesures des capteurs de pollens situés au niveau du sol sont fortement influencées par les sources proches issues de la végétation locale, tandis que les mesures des capteurs de pollens situés sur les toits fournissent des niveaux de pollen de fond représentatifs de grandes zones à l'échelle de l'agglomération urbaine (Rojo et al., 2020). De plus, il existe de grandes variations spatiales en termes de concentrations de pollens anémophiles au sein des villes (Werchan et al., 2017). Afin de connaître le degré de contamination particulière du pollen ambiant auquel un individu est réellement exposé, il est souhaitable d'échantillonner les pollens ambiants à hauteur d'homme. L'impacteur en cascade utilisé (Dekati-PM10TM) dans notre précédente étude pesant 2,5 kg, et nécessitant un raccordement à une pompe à air, est un dispositif trop lourd à porter pour raisonnablement en faire un préleveur portatif personnel de pollens. Récemment, de Weger et al. (2020) ont décrit le « Pollensniffer », un préleveur personnel léger (environ 0,6 kg) alimenté sur batterie pour caractériser l'exposition individuelle (de Weger et al., 2020). Ce capteur portatif est dit actif, c'est-à-dire basé sur le principe d'aspiration de l'air. Il est porté par un seul individu pour caractériser son exposition individuelle au cours de ses déplacements en ville. De Weger et al. (2020) ont montré que l'exposition individuelle aux pollens allergisants de bouleau dans les rues de la ville était effective 11 jours avant que le capteur de Hirst situé sur une plateforme-toit ne détecte la présence de ces pollens, ce qui explique le déclenchement des symptômes de l'allergie chez les personnes sensibilisées, bien avant l'alerte du bulletin pollinique. Les auteurs n'ont pas étudié la contamination particulière des pollens sur les échantillons qu'ils ont collecté. Cela nécessiterait l'estimation de l'artefact de prélèvement.

Dans ce chapitre, nous présentons une méthode de prélèvement mobile développée par notre équipe pour étudier l'exposition individuelle aux pollens. Cette méthode passive, sans aspiration de l'air, est simple à mettre en œuvre. Son principe est basé sur le dépôt naturel/spontané du pollen sur pastille adhésive portée par un individu au cours de ses activités de plein air. En parallèle, nous avons prélevé les pollens ambiants de manière active mais statique en un point fixe au centre-ville au moyen de l'impacteur en cascade. L'analyse de nos échantillons est effectuée par microscopie électronique à balayage couplée à la spectrométrie d'émission X dispersive en énergie (MEB/EDX).

2. TRAVAUX PRELIMINAIRES DE PRELEVEMENT ET D'ANALYSES DES GRAINS DE POLLEN

Des grains de pollen ambiants ont été prélevés au cours d'activités de plein air dans deux parcs urbains et en plein centre-ville (**Figure 18**).

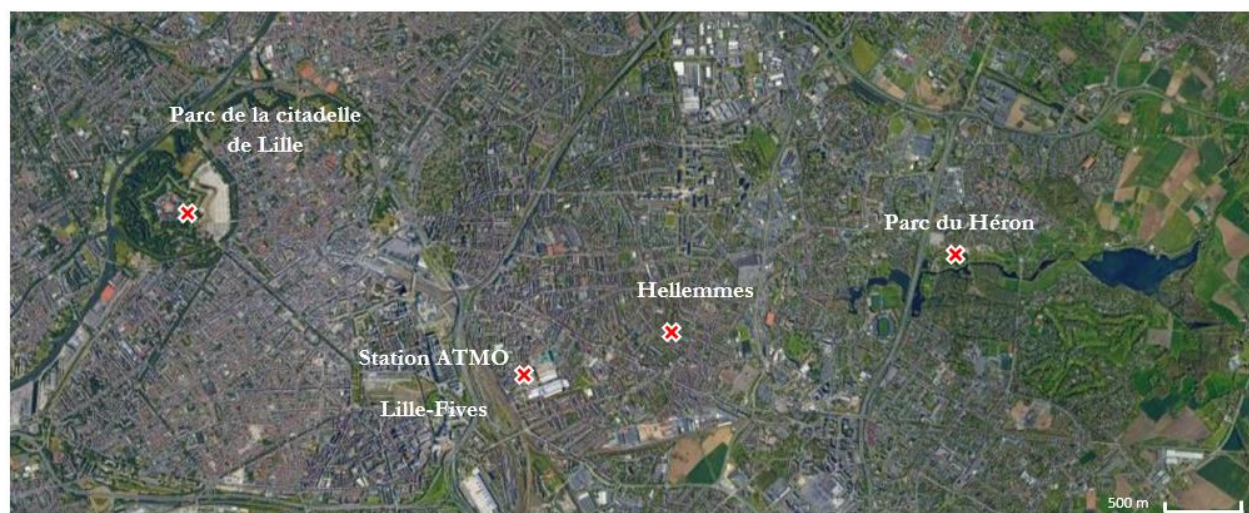


Figure 18 : Image satellitaire présentant la position relative des trois sites de prélèvement et la station Lille-Fives (ATMO Hauts-de-France) la plus proche des sites de prélèvement (Google maps).

Les deux premiers sites de prélèvements (Parc de la Citadelle de Lille et Parc du Héron à Villeneuve d'Ascq) sont des parcs urbains caractérisés par la présence d'un grand nombre d'arbres de bouleau et constituent des lieux très fréquentés pour les activités sportives et récréatives familiales. Le troisième site est localisé dans l'agglomération lilloise à Hellemmes, ville marquée par une forte densité de population avec 5 562 hab/km² soit 18 577 habitants en 2019 (mairie d'Hellemmes). Cette agglomération présente un grand nombre de sources d'émission de particules comme par exemple, une centrale à charbon (fermée en 2021), des voies ferrées, un important trafic routier avec en moyenne 5 700 véhicules/jour sur l'axe principal (MEL, 2021) et des chantiers de construction. Des détails sur les sites choisis et les conditions de prélèvement sont présentés dans le **Tableau 14**. Les prélèvements de pollens ambiants ont été réalisés le 30 mars 2019, début de la saison pollinique du bouleau, entre 12h00 et 15h30. Le milieu de la journée est en effet le moment où généralement la concentration en pollen de bouleau est la plus élevée lorsque la température de l'air est maximale (Berggren et al., 1995).

Tableau 14 : Détails sur les sites choisis et les conditions de prélèvement.

Site	Coordonnées GPS	Type de site	Type de prélèvement	Trajet parcouru (km)	Temps d'exposition (min)
Parc de la citadelle	50°38'32.5"N, 3°02'18.1"E	Urbain	Passif, mobile	2,7	33
Parc du Héron	50°38'08.5"N, 3°10'15.4"E	Péri-urbain	Passif, mobile	3,2	39
Centre-ville d'Hellemmes-Lille	50°37'52.7"N, 3°06'38.6"E	Urbain	Actif, statique	0	120

Les trois sites sont présentés en vue élargie sur la **Figure 19** avec les parcours en pointillés pour les deux premiers sites.



Figure 19 : Images satellitaires élargies des sites de prélèvements : A) le parc de la citadelle de Lille B) le parc du Héron à Villeneuve d'Ascq et C) le centre-ville d'Hellemmes-Lille (Google maps).



Figure 20: Pastille adhésive collée sur un plot de MEB fixé sur une casquette.

Dans les deux premiers sites, les grains de pollen ont été prélevés directement sur une pastille adhésive collée sur un plot MEB fixé sur une casquette (**Figure 20**). En ce qui concerne le prélèvement en plein centre-ville, la pastille adhésive a été placée dans un impacteur en cascade (Dekati-PM10TM) installé dans un jardin privé à Hellemmes-Lille. Cet impacteur a un orifice d'entrée de 8 mm de diamètre, l'air est aspiré sous un débit de 10 L.min⁻¹, soit 3,3 m.s⁻¹. Le premier étage d'impaction PM>10 a été choisi pour la collecte des pollens sans artefact de prélèvement (Choël et al., 2020). A la fin de chaque prélèvement, la pastille a été gardée à l'abri de toute pollution dans une boîte de Pétri en verre. Les paramètres météorologiques ont été mesurés par une station météo (Davis Vantage ProTM) installée sur le toit d'un bâtiment du campus de l'Université de Lille, faculté de Sciences et Technologies. Le jour des prélèvements, la température moyenne était de 14°C, le temps était sec, la vitesse du vent était de 3±2 m.s⁻¹ et l'humidité relative de 68±15%. Les données de concentrations en PM10 et PM2.5 ont été obtenues pour la station Lille-Fives (ATMO Hauts-de-France) la plus proche des sites de prélèvement. Les concentrations massiques journalières des particules PM2.5 et PM10 étaient respectivement de 79 µg.m⁻³ et 93 µg.m⁻³ le jour des prélèvements. Ces concentrations excédaient largement les limites journalières fixées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) qui est de 15 µg.m⁻³ pour les PM2.5 et de 45 µg.m⁻³ pour les PM10 (**Figure 21**) (OMS, 2021).

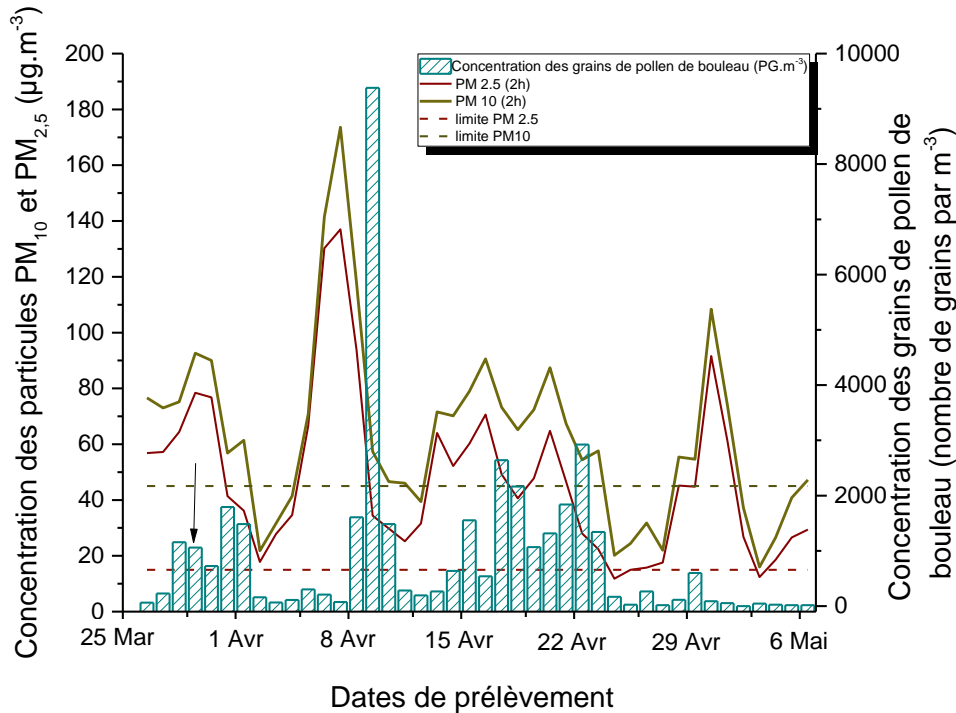


Figure 21 : Variations des concentrations journalières des pollens de bouleau dans la métropole lilloise présentées sous forme d'histogramme et des concentrations ambiantes des particules $PM_{2.5}$ et PM_{10} représentées respectivement en rouge et en marron clair. Les limites journalières recommandées par l'organisation mondiale de la santé (OMS) pour les $PM_{2.5}$ ($15 \mu g.m^{-3}$) sont présentées par une ligne pointillée rouge et celles des PM_{10} ($45 \mu g.m^{-3}$) par une ligne pointillée marron clair.

Les concentrations polliniques mesurées par le Réseau National de Surveillance Aérobiologique (RNSA) indiquent que la concentration de pollens de bouleau était de $1\ 060 \text{ grains de pollen.m}^{-3}$ le jour des prélèvements. Le pic pollinique pour le bouleau a été enregistré le 10 avril avec $9\ 381 \text{ grains de pollen.m}^{-3}$ (Figure 21).

2.1. Analyses MEB

2.2. Conditions opératoires

Les observations des pollens ont été effectuées par MEB (Hitachi, modèle FlexSEM 1000) à filament de tungstène. La distance de travail est de 25 mm. Le microscope est équipé d'un détecteur d'électrons secondaires (Thornley-Everhart-Photomultiplier R6249), d'un détecteur d'électrons rétrodiffusés (BSE) de type scintillateur à quatre quadrants avec diode Si, placé à un angle de 30° , et d'un détecteur de rayons X dispersif en énergie (EDX) équipé d'une fenêtre ultramince permettant la détection des éléments à partir du bore ($Z \geq 6$). Ce détecteur est constitué d'une plaque semi-conductrice en silicium d'une surface active de 10 mm^2 et d'environ $300 \mu\text{m}$ d'épaisseur. Les spectres ont été acquis à une tension d'accélération prise entre 10 et 15 kV avec des temps de comptage relativement de 15 à 30 s.

Pour chaque grain de pollen une image de haute résolution a été acquise à l'aide du détecteur d'électrons secondaires (SE), puis un spectre a été acquis en positionnant le faisceau électronique sur chaque particule repérée à la surface du grain de pollen considéré.

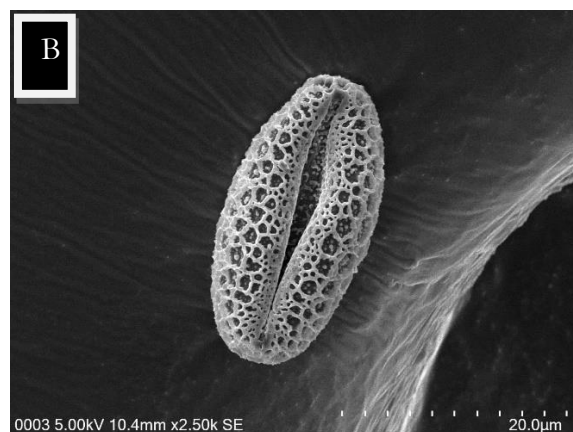
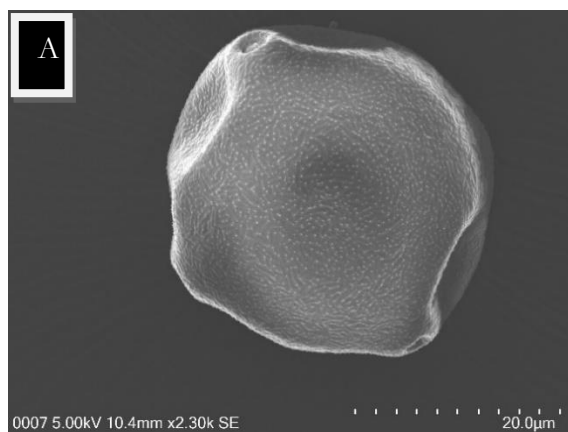
2.3. Observation des pollens par microscopie électronique à balayage

Les grains de pollen en suspension dans l'air se sont collés directement sur une pastille de carbone adhésive double face fixée sur une casquette. L'observation est effectuée sous vide poussé. Les grains de pollen sont des échantillons biologiques peu conducteurs ce qui cause une accumulation des électrons à leur surface lors du balayage par le faisceau électronique. La surface du grain de pollen observé sans préparation d'échantillon se charge et provoque une surbrillance qui gêne l'observation (**Figure 22**). Les échantillons ont donc été métallisés au carbone avant observation au MEB. Cette préparation des échantillons consiste d'une part à leur permettre de résister au faisceau d'électron et à l'exposition au vide partiel ou poussé, et d'autre part à les rendre conducteurs. Comme les grains de pollen contiennent de l'eau et que la pression dans la chambre d'observation du MEB est très faible, les grains de pollens se déshydratent, ce qui explique qu'on les observe « dégonflés ».



Figure 22 : Grain de pollen de bouleau observé avec un mauvais écoulement des charges électroniques.

L'observation des échantillons prélevés sur les casquettes dans les deux parcs urbains a révélé des pollens d'arbres pollinisant en mars-avril, dont le bouleau, le saule, l'aulne et le peuplier (**Figure 23**).



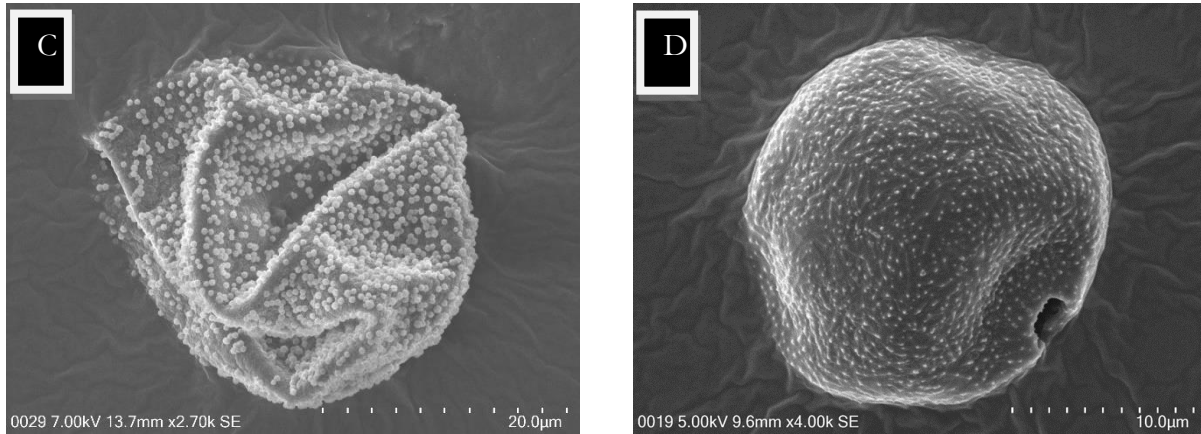


Figure 23 : Différents types de pollens observés : A : aulne , B : saule , C : peuplier ou cyprès, D : bouleau.

D'autres bioaérosols tels des spores de champignon ont été observés (**Figure 24**) (Wittmaack et al., 2005). Pour certains grains de pollen de bouleau, nous avons observé la présence de champignons filamenteux (hyphae) qui ont colonisé la surface (**Figure 24**). Ces champignons sont reconnaissables par leurs hyphes (chaînes de cellules à structure tubulaire) allongés, formant un réseau filamenteux qui recouvrent progressivement la surface sur laquelle ils se développent (Steinberg et al., 2017). Ces organismes fongiques peuvent provenir du microbiote viable de la surface du pollen (Ambika Manirajan et al., 2016).

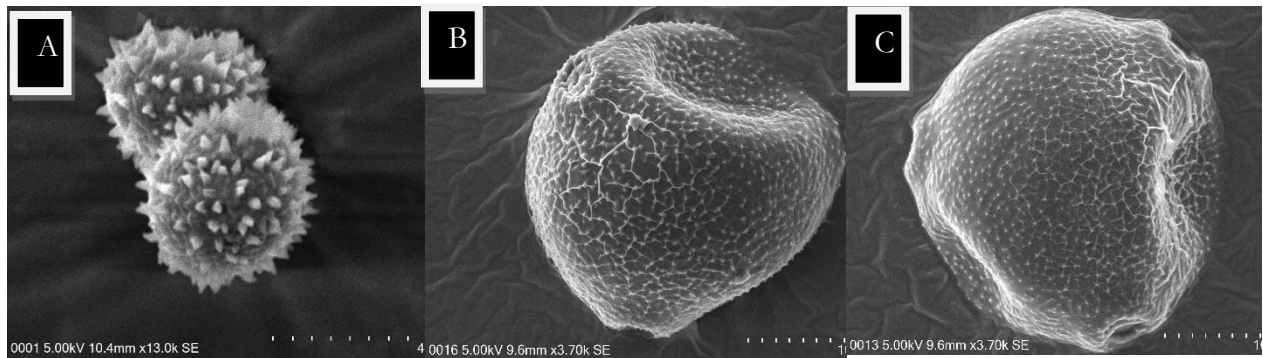


Figure 24 : Autres particules d'origine biologique : A : Probablement des spores de champignon et B : champignons filamenteux colonisant l'exine.

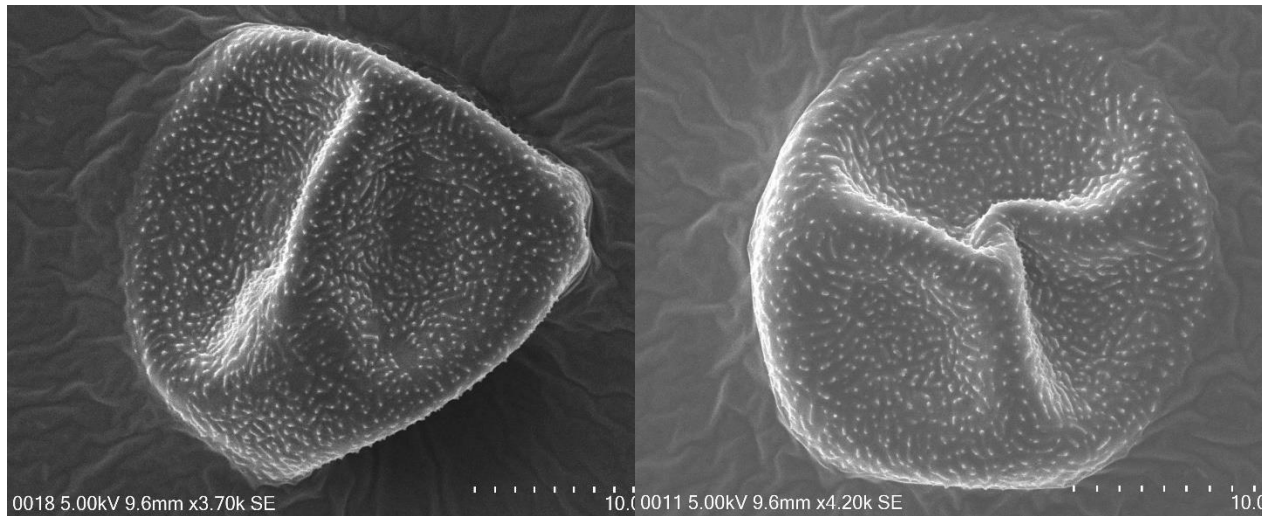


Figure 25 : Grains de pollen de bouleau observés sans particules extrapolliniques à leur surface.

Un grand nombre des pollens observés présentent clairement des particules adhérentes sur leur surface (**Figure 26**). Au total 33 ± 11 grains de pollen de bouleau sont comptés dans les échantillons prélevés à l'aide de la casquette. Ce nombre s'élève à 50 grains de pollen pour l'échantillon placé dans l'impacteur (**Tableau 15**). Dans les deux parcs urbains, du Héron et de la Citadelle, respectivement à 6% et 10% de la totalité des pollens comptés présentent des particules sur leur surface. Ce pourcentage s'élève à 30% pour les pollens de bouleau prélevés en plein centre-ville par l'impacteur en cascade (**Tableau 15**).

L'échantillon placé dans l'impacteur en cascade n'a subi aucune métallisation, ceci afin de mieux analyser la nature des particules présentes sur la surface des pollens. Dans ces prélèvements, seuls des grains de pollen de bouleau ont été observés. Cela indique une moindre diversité végétale environnante sur le site de centre-ville.

Tableau 15 : Récapitulatif du nombre de grain de pollens de bouleau observés et de leur pollution particulaire pour chaque site.

Site	Type de capteur	Nombre de grains de pollens de bouleau	Nombre de grains de pollens de bouleau pollués	Nombre moyen de particules par grain de pollen pollué
Citadelle de Lille	Passif	40	4	2±2
Parc du Héron	Passif	25	2	2±2
Hellemmes	Actif	50	15	6±5

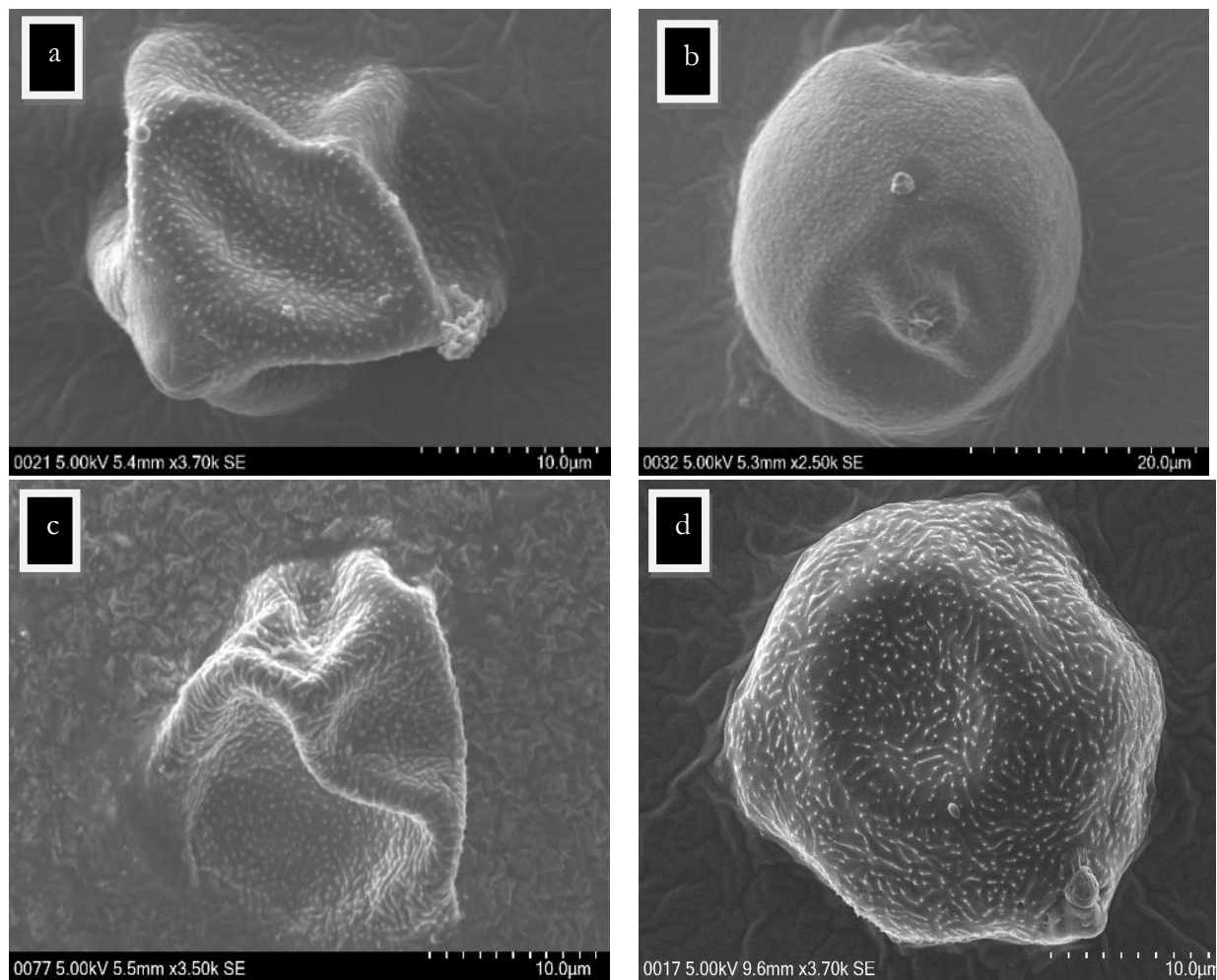


Figure 26 : Grains de pollens de bouleau présentant des particules sur leur surface.

2.4. Analyses MEB/EDX

Des analyses par MEB/EDX ont été réalisées pour déterminer la nature de la pollution particulaire. La **Figure 27** présente les grains de pollens pollués après analyse EDX : les particules (a) et (b) sont celles de la **Figure 26** et sont des grains de pollens non métallisés observés pour l'échantillon prélevé dans l'impacteur. Clairement, ces trois particules ont subi un échauffement sous le faisceau électronique lors de l'analyse X qui utilise un courant de sonde et une tension accélératrice plus élevés que celui du mode imagerie topographique. Ces dégradations dues au faisceau pendant l'analyse X des particules de la surface des grains de pollen provoquent des boursouflures sur la membrane pollinique.

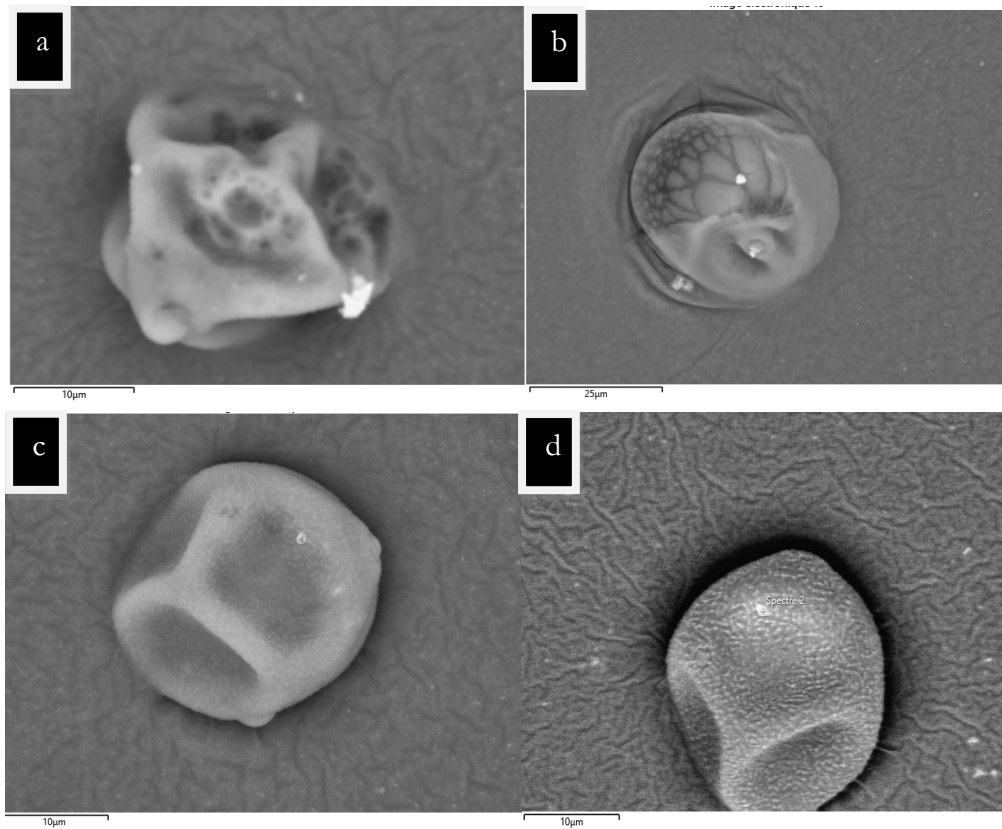


Figure 27 : Images électroniques en mode d'imagerie d'électrons rétrodiffusés (BSE) de certains pollens de bouleau présentant des particules sur leur surface acquises après analyse EDX.

L'analyse EDX des particules présentes sur la surface des pollens prélevés montre que les particules trouvées sur les grains de pollen sont de différentes natures : certaines contiennent du chlorure de sodium NaCl (sels marins), d'autres sont des minéraux argileux riches en Si et Na, et certaines contiennent des métaux (Fe, Al, Cu, Ca). Leur présence peut être due à des travaux de construction à côté du site de prélèvement avec l'impacteur. En fait, des particules de type Al et Fe ont également été trouvées seules sur le support de prélèvement (**Figure 28** et **Figure 29**). Cela suggère que ces particules métalliques ont pu se déposer sur le pollen dans l'impacteur au moment du prélèvement.

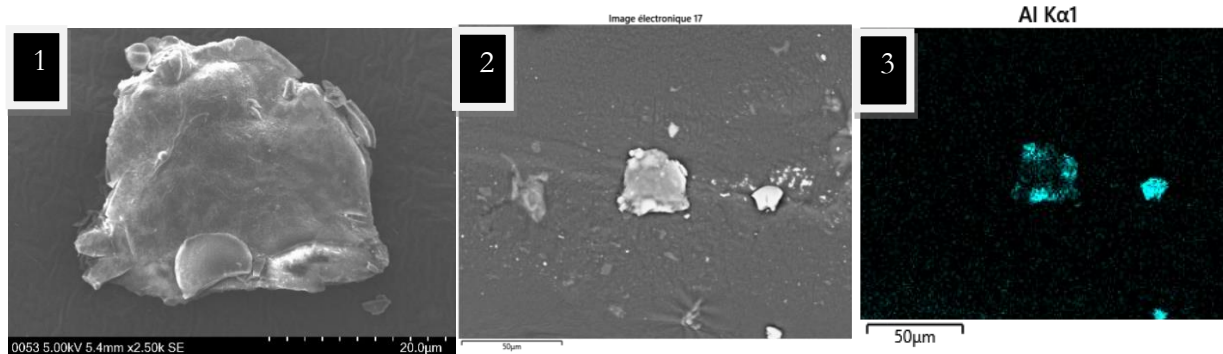


Figure 28 : (1) Image d'une particule grossière en mode SE. (2) Image électronique de particules en mode BSE. (3) Analyse cartographique élémentaire (Al Kα1) des particules en mode EDX.

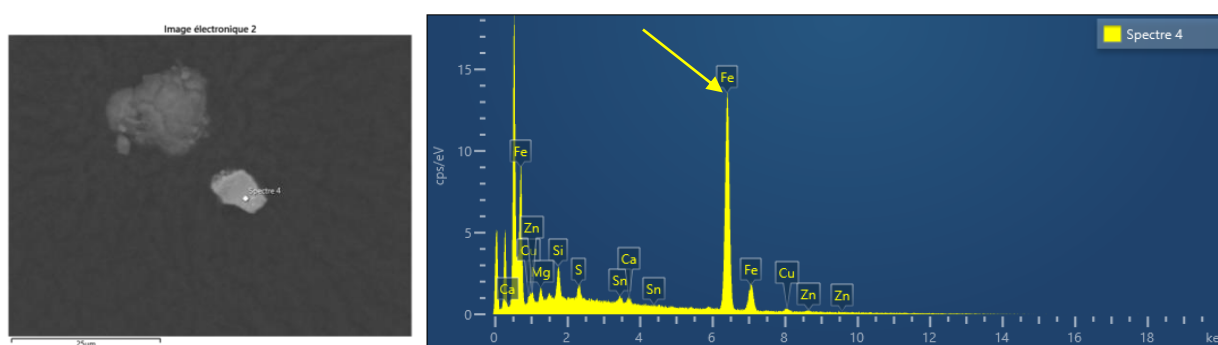


Figure 29 : Image électronique de particules en mode BSE (à gauche) et spectre EDX de la particule riche en oxyde de fer (à droite).

Le prélèvement des pollens par l'impacteur en cascade a été mis en place pour comparer l'efficacité de notre méthode qui consiste à prélever les pollens par une pastille adhésive carbonée fixée sur une casquette de manière passive. Les pollens prélevés par l'impacteur présentent plus de particules (6 ± 5) sur leur surface que celles prélevées par la caquette (2 ± 2) (**Tableau 15**). Les pollens prélevés par les deux méthodes étant collés à la surface de l'adhésif, nous ne pouvons pas estimer la pollution particulaire sur la face qui adhère au substrat, d'où une probable sous-estimation du niveau de pollution des pollens par les particules (**Figure 30**). Il est à noter que sur l'ensemble des sites étudiés nous n'avons pas observé de pollens de bouleau rompus.

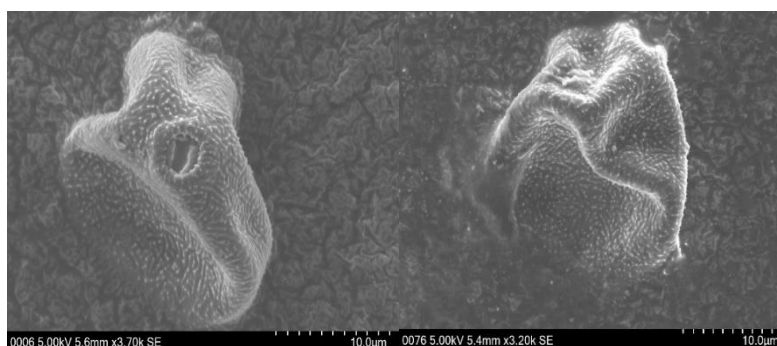


Figure 30 : Grains de pollen prélevés par l'impacteur en cascade.

3. DISCUSSION ET CONCLUSION

De manière surprenante, notre méthode d'échantillonnage passive (pastille adhésive fixée sur une casquette) s'est révélée efficace pour le prélèvement de grains de pollen de bouleau. Environ 33 ± 11 grains de pollen de bouleau ont été comptés sur les plots de MEB fixés sur une casquette après une exposition à l'air libre de seulement 30 à 40 min au cours d'activités de promenade dans deux parcs urbains. L'exposition à un tel nombre de pollens constitue un problème majeur pour les personnes allergiques. D'après la littérature, 8 à 20 grains de pollen de bouleau suffisent pour déclencher une réaction allergique chez les personnes sensibilisées (Comtois and Gagnon, 1988).

La présence de particules sur la surface des pollens est susceptible de causer une aggravation des symptômes allergiques (Choël et al., 2022). Nos prélèvements ont été réalisés dans des conditions de pollution particulaire $PM_{2.5}$ et PM_{10} importantes, $79 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ et $93 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ respectivement. Ces concentrations excédaient largement les limites fixées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) qui est de $15 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ pour les $PM_{2.5}$ et de $45 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ pour les PM_{10} , ce qui augmente la probabilité de présence de particules sur les pollens. Nous avons en effet observé un nombre important de particules sur la surface des grains de pollen prélevés. Le pourcentage de ces pollens constitue 6% à 10% de la totalité des pollens comptés dans les échantillons prélevés dans les deux parcs. Ce pourcentage s'élève à plus de 30% pour les pollens de bouleau prélevés en ville par impaction. Les analyses EDX réalisées ont montré que la majorité des particules présentes sur la surface des grains de pollen sont de nature minérale et certaines autres présentent des résidus de métaux.

D'après nos premiers essais réalisés en 2019, nous pouvons constater que cette méthode de prélèvement employée est efficace et permet aussi d'évaluer la nature de la pollution particulaire des grains de pollen auxquels les personnes sont exposées durant la saison pollinique. Le confinement généralisé lié à la pandémie n'a pas permis d'effectuer de tels prélèvements en 2020 mais uniquement en 2021. Le traitement des données de chromatographie n'a pas permis d'analyser au MEB cette nouvelle série de prélèvements passifs dans le cadre de ce travail de thèse. L'analyse de ces échantillons permettra de continuer à évaluer l'efficacité de la méthode de prélèvement, notamment afin de savoir si le nombre de grains de pollen adhérents sur le plot de MEB fixé sur la casquette varie en fonction de l'intensité de la saison pollinique ou encore si le niveau de pollution particulaire ambiant influence la contamination des grains de pollens.

**CHAPITRE III CAPACITE DE CAPTURE
DE L'OZONE PAR LE POLLEN**

1. INTRODUCTION

Les polluants chimiques peuvent agir soit directement sur les sujets sensibilisés mais également sur les grains de pollen en altérant par exemple leur paroi et leur contenu allergénique. L'ozone peut altérer la muqueuse respiratoire, notamment en augmentant sa perméabilité (De Blay et al., 2000). De faibles concentrations de ce polluant peuvent augmenter la réponse bronchique chez les personnes asthmatiques (Molfino et al., 1991). L'ozone peut également agir directement sur le pollen et la littérature regorge de publications sur l'effet de l'ozone sur les pollens allergisants (Sénéchal et al., 2015).

A l'heure actuelle, il est possible d'affirmer que la pollution atmosphérique change le potentiel allergisant du pollen avec des différences d'effets observées selon les taxons. A notre connaissance, il n'existe que très peu d'études permettant une comparaison de pollens de différents taxons soumis à un polluant gazeux dans des conditions strictement identiques d'exposition. Quelques études ont en effet montré, sur un nombre limité de taxons, que des pollens de différents taxons réagissent différemment à une exposition à des polluants atmosphériques effectuée dans des conditions expérimentales strictement identiques (Gute et al., 2020; Pereira et al., 2021b; Ribeiro et al., 2013; Roshchina and Mel'nikova, 2001). L'effet sur le pollen dépend vraisemblablement en effet à la fois de la dose reçue en polluant et du grain de pollen considéré (et d'éventuels effets synergétiques ou antagonistes lors d'une exposition simultanée avec d'autres polluants).

La sensibilité à l'ozone du grain de pollen varie clairement selon les espèces, et également selon les conditions d'exposition (Sénéchal et al., 2015; Wolters and Martens, 1987). De ce fait, il est difficile d'estimer si une ou des espèces sont plus sensibles à l'ozone ou si d'autres sont plus résistantes. C'est pourquoi nous proposons dans ce travail une exposition en laboratoire d'une vingtaine de taxons de pollens dans les mêmes conditions expérimentales afin de quantifier la quantité d'ozone capturée par différentes espèces et ultimement de comprendre la cause de ces différences.

Dans un premier temps, nous décrirons le dispositif expérimental mis en place pour réaliser les expositions à l'ozone, ensuite nous présenterons les analyses effectuées sur les différents facteurs qui pourraient modifier la capacité de capture d'ozone par les pollens. Enfin, nous donnerons une conclusion à la fin de ce chapitre.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Pollens étudiés

Les pollens étudiés sont présentés dans la partie 2 du chapitre I. Les pollens utilisés dans cette étude proviennent de trois sources : du pollen de bouleau récolté sur le campus de l'Université de Lille sur plusieurs années et pour le même arbre, du pollen de bouleau récolté pour cette étude par Bonapol sur différents sites en 2020 en République Tchèque, et enfin, tous les autres taxons proviennent du catalogue commercial de Bonapol.

2.1.1. Pollen de bouleau (Lille)

Le campus universitaire de Lille est de 110 hectares, il se trouve en zone urbaine à Villeneuve d'Ascq à proximité de plusieurs autoroutes. Le campus présente une très grande surface d'espaces verts, avec une biodiversité spécifique. Il existe de nombreuses espèces d'arbres sur le campus comme l'aulne, le bouleau, le cèdre du Liban, le charme, le châtaignier, le chêne, le cyprès, l'érable, ou encore le frêne. Dans cette partie de la thèse, nous nous intéressons au pollen d'arbre de bouleau (**Figure 31**). Les pollens de bouleau ont été récoltés sur le campus de l'Université de Lille, faculté des Sciences et Technologies de l'année 2016 à 2020 aux mois de mars ou avril, juste avant la déhiscence des anthères, et par conséquent avant la pollinisation des bouleaux.

2.1.2. Pollen de bouleau (Bonapol)

D'autres pollens de bouleau ont été gracieusement fournis par Bonapol (fournisseur de pollen). Ces derniers ont été récoltés en Croatie (région de Zagreb) et en Tchéquie (Bohème et Moravie du sud) (**Tableau 16**) sur 9 localisations durant la saison pollinique de 2020. Les pollens ont été récoltés sur trois sites de différentes typologies : en forêt, en zone urbaine et en zone rurale (**Figure 32**).

Les pollens de bouleau sont récoltés juste avant la déhiscence. Les chatons sont séchés à l'air ambiant en laboratoire puis tamisés à 40 μm . Le pollen est ensuite placé dans un dessiccateur afin de leur faire perdre leur contenu en eau ; la teneur en eau des pollens ainsi traitée est de l'ordre de 1 à 2 %. Les pollens sont finalement stockés dans des vials hermétiques à une température de 4°C jusqu'à leur utilisation.



Figure 31 : Vue satellite du site de l'arbre de bouleau qui est indiqué par une croix rouge (image de gauche). Photographie de l'arbre (image de droite). Les coordonnées GPS de l'arbre sont 50°36'35.7"N 3°08'34.6"E (Google maps).

Tableau 16: Coordonnées GPS et types de sites de prélèvement des pollens pour le pollen fourni par Bonapol.

Pollen de bouleau	Coordonnées GPS	Site de prélèvement
1	45°47'06.9"N 15°57'55.0"E	Urbain
2	45°58'47.9"N 16°08'21.3"E	Forêt
3	45°54'12.7"N 16°04'02.0"E	Rural/Forêt
4	48°58'56.3"N 14°22'12.5"E	Forêt
5	48°49'05.4"N 16°21'07.4"E	Forêt
6	48°59'11.5"N 14°25'00.1"E	Forêt
7	48°56'35.3"N 17°01'01.0"E	Rural
8	49°01'27.2"N 14°20'40.1"E	Forêt
9	48°53'34.1"N 17°18'40.8"E	Urbain





Figure 32 : Images satellites de localisation des zones de prélèvements effectués en République Tchèque par Bonapol (Google maps).

2.1.3. Autres taxons (Bonapol)

Les autres taxons de pollens ont été commandés chez Bonapol. Aucun des pollens commandés n'a subi de lavage préalable par solvant organique (dénomination commerciale : non-defatted). De plus, les fournisseurs ont certifié que leurs pollens sont récoltés dans des zones non polluées. Le **Tableau 17** récapitule tous les taxons des pollens étudiés.

Tableau 17: Résumé des taxons de pollen utilisés dans les expériences de capture de l'ozone

Genre et espèce	Genre et espèce (suite)
Arbres	<i>Platanus × hispanica</i>
<i>Acer negundo</i>	<i>Populus nigra</i>
<i>Alnus glutinosa</i>	Herbacées
<i>Betula pendula</i>	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>
<i>Corylus avellana</i>	<i>Artemisia vulgaris</i>
<i>Cupressus sempervirens</i>	<i>Chrysanthemum leucanthemum</i>
<i>Fagus sylvatica</i>	<i>Parietaria officinalis</i>
<i>Fraxinus excelsior</i>	<i>Plantago lanceolata</i>
<i>Quercus rubra</i>	<i>Rumex acetosella</i>
<i>Salix caprea</i>	<i>Urtica dioica</i>
<i>Olea europaea</i>	Graminées
<i>Pinus halepensis</i>	<i>Phleum pratense</i>

2.2. Expositions du pollen *in vitro* à l'ozone

La **Figure 33** représente le schéma du dispositif d'exposition *in vitro* des grains de pollen à l'ozone d'après le travail de Zhu et al. (Zhu et al., 2018). L'exposition à l'ozone a été réalisée à une concentration d'environ 100 ppb pour tous les pollens (mesurée avec une précision de 1 ppb). Cette concentration a été choisie afin de s'approcher des conditions atmosphériques réelles. La durée d'exposition est d'en moyenne de 25 minutes (1500 secondes). La capacité de capture des grains de pollen est étudiée par la mesure de la quantité d'ozone adsorbée (NO_3) jusqu'à un retour de l'ozone à son niveau antérieur à l'introduction du pollen (exprimée en $\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}$). Cette quantité est calculée par

l'exposition d'une masse de 5 mg de grains de pollen (balance précise à $\pm 0,1$ mg.) Cette masse est mesurée dans un vial de 2 mL qui est ensuite connecté au dispositif d'exposition (**Figure 33**). La concentration d'ozone est mesurée avant l'introduction des pollens et, lorsque la concentration en ozone est stable à l'intérieur du système d'exposition, le pollen est libéré du vial vers un filtre en PTFE pour subir l'exposition à l'ozone.

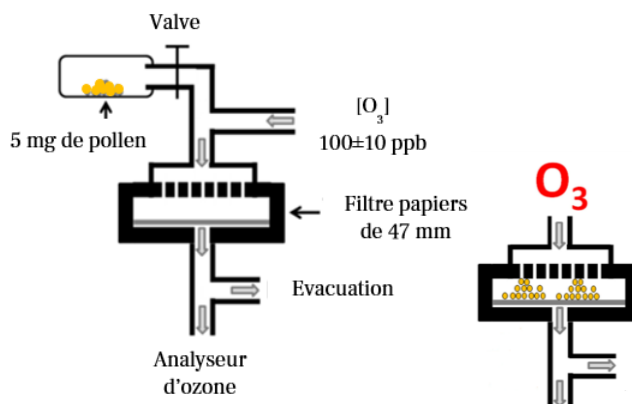


Figure 33: Schéma du dispositif d'exposition in vitro des grains de pollen à l'ozone (Zhu et al., 2018).

2.3. Génération et suivi de l'ozone

Pour la génération de l'ozone, une photolyse du dioxygène s'effectue sous l'action d'une lampe émettant un rayonnement UV centré sur la longueur d'onde de 254 nm (modèle SOG-2 fournisseur UVP). Une lampe à mercure parallèle à un tube en quartz dans lequel circule un flux d'air synthétique de débit de $1,5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ est utilisée pour générer le rayonnement UV. Pour faire varier la quantité d'ozone générée, une partie de la lampe est occultée en déplaçant un cache ou alors en modifiant le débit d'air synthétique.

Le pollen est exposé une fois la concentration d'ozone stabilisée à environ 100 ppb. Une masse de pollen de 5 mg est alors introduite dans le dispositif après ouverture de la valve reliée au vial contenant les pollens. Une fois envoyés dans le dispositif, les grains de pollen sont piégés sur un filtre (Merck FluoroporeTM, PTFE Membrane, diamètre 47 mm). Les grains de pollen sont alors exposés à l'ozone. La concentration d'ozone est mesurée toutes les 10 secondes en sortie de réacteur par un analyseur d'ozone (Thermo Fisher Scientific, modèle Megatec 49i) avec une limite de détection de 1 ppb. L'exposition du pollen a été répétée entre trois et quatre fois pour chaque taxon.

Il a par ailleurs été vérifié en effectuant ces manipulations sans pollen que la capture de l'ozone est négligeable après ouverture de la vanne reliant le vial de 2 mL au reste du système.

2.4. Paramètres susceptibles d'influencer la capacité de capture de l'ozone

2.4.1. Facteurs intrinsèques

2.4.1.1. Détermination de la fraction lipidique pollinique

Afin de mesurer la quantité des lipides totaux des pollens étudiés, une masse de 500 mg de pollen a été extraite par du dichlorométhane (DCM). La méthode d'extraction des pollens de bouleau consiste à rincer une masse de 500 mg de pollen, déposé sur du coton (préalablement nettoyé par le méthanol et le DCM) dans une pipette pasteur, par un volume de 8 mL de DCM. Le temps de contact entre le pollen et le solvant était de l'ordre de quelques minutes. Après filtration, le solvant a été évaporé et le résidu sec pesé ($\pm 0,1$ mg). La procédure a été répétée entre trois et quatre fois pour chaque taxon.

2.4.1.2. Préparation de pollens 'défattés'

Pour étudier l'effet de la fraction lipidique sur la capacité de capture d'ozone par les pollens, des expériences ont été menées sur quatre taxons de pollen défattés de leurs fractions lipidiques. Les grains de pollen étudiés sont *Betula pendula*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Pinus halepensis* et *Fagus sylvatica*. Le défattage des grains de pollen consiste à laver les grains de pollen par un solvant organique, celui-ci favorisant l'extraction des espèces organiques localisées dans la fraction lipidique du revêtement pollinique. Une masse de 50 mg de pollen est extraite par un volume de 5 mL de DCM, puis filtrée à l'aide d'un coton préalablement nettoyé au DCM. Le temps de contact entre le pollen et le solvant était de quelques minutes. Les pollens extraits ont été séchés sous flux d'azote, puis placés dans des vials fermés hermétiquement avant d'être exposés à l'ozone. A noter que l'exposition de ces pollens défattés à l'ozone a été réalisée directement après défattage sans conservation préalable.

2.4.1.3. Teneur en eau

La teneur en eau a été déterminée comme étant la masse d'eau contenue dans le grain de pollen. Elle est exprimée en pourcentage de la masse totale du pollen. Les échantillons de pollens destinés à la mesure ont été placés dans un récipient en verre puis ont été séchés dans une étuve à une température de 110°C. Trois masses de 150 mg ont été pesées pour chaque pollen, puis le poids sec d'une quantité donnée de pollen a été mesuré après dessiccation pendant 24 h et 48 h. Cette étude a été menée sur 7 grains de pollen choisis pour leurs différentes capacités de capture d'ozone : *Betula pendula*, *Alnus glutinosa*, *Salix caprea*, *Urtica dioica*, *Fraxinus excelsior*, *Pinus halepensis* et *Cupressus sempervirens*.

2.4.1.4. Caractéristiques morphologiques

Les caractéristiques morphologiques sont en rapport direct avec les pollens tels que leur taille, leur masse, le type et le nombre d'ouvertures présent sur leur surface.

La taille et la masse du pollen ainsi que le nombre et le type d'ouvertures des pollens sont extraits de PalDat (PalDat, 2022), une base de données palynologiques en ligne et de la littérature (Chapman, 2015; González-Mancera et al., 2021; Guérin, 1993).

2.4.1.5. Risque allergique et période de pollinisation

Tous les pollens ne sont pas équivalents du point de vue allergique. Le risque allergique des pollens est la capacité du pollen d'une espèce à provoquer une réaction allergique pour une partie de la population. Il peut être faible ou négligeable (0/1), modéré (2) ou fort (3). La période de pollinisation correspond au mois de démarrage de la saison pollinique. Ces deux paramètres sont extraits du site du RNSA (RNSA, 2018).

2.4.2. Facteurs extrinsèques

2.4.2.1. Durée de stockage depuis la récolte du pollen

L'objectif de cette étude est de savoir si la capacité des pollens à capturer de l'ozone varie d'une période pollinique à une autre pour le pollen de bouleau issu d'un même arbre. L'étude a été menée sur des pollens de bouleau *Betula pendula* récoltés sur le campus de l'Université de Lille, faculté des Sciences et des Technologies, pendant 5 périodes de pollinisation différentes de 2016 à 2020 (cf. partie 2.1.1 de ce chapitre). Les expositions à l'ozone ont eu lieu en 2021, soit entre 1 et 5 ans après récolte.

2.4.2.2. Localisation de récolte

Les pollens de bouleau *Betula pendula* fournis par l'entreprise Bonapol ont été récoltés dans 9 localisations différentes : urbaine, rurale et en forêt (cf. partie 2.1.2 de ce chapitre). La question que nous nous posons est de comprendre si la capacité de capture de l'ozone diffère d'une localisation de récolte à une autre pour un même taxon.

3. ANALYSES STATISTIQUES

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel XLSTAT (pour Windows version 16.8). Ces analyses ont pour objectif d'étudier l'existence de corrélations entre le taux de capture d'ozone par les pollens et les différents paramètres susceptibles d'influencer la capacité de capture de l'ozone. Les associations entre les variables étudiées avec le taux de capture d'ozone ont été testées en utilisant les coefficients de détermination et les coefficients de corrélation (Spearman et Pearson).

Le test Pearson s'applique dans le cas des séries de données provenant de l'échantillonnage d'une ou de deux variables métriques (quantitatives). Il est utilisé pour étudier les données dont la distribution suit une loi Normale. Si deux variables X et Y sont parfaitement dépendantes, alors $r_p = 1$ ou $r_p = -1$. Les deux variables sont parfaitement indépendantes si $r_p = 0$. Plus le coefficient de corrélation r_p de Pearson est proche de 1, plus la relation linéaire positive entre les variables est forte. Inversement, plus le coefficient est proche de -1, plus la relation linéaire négative entre les variables est forte. Plus le coefficient est proche de 0, plus la relation linéaire entre les variables est faible.

Le test de normalité nous indique que la distribution de la plupart des données étudiées ne suit pas une loi Normale, donc nous avons effectué des tests statistiques non paramétriques. Les données ont été soumises à une analyse de corrélation non paramétrique en calculant le coefficient de corrélation r_s de Spearman qui permet de calculer la dépendance entre deux variables aléatoires de relation non affine. Ce test de corrélation non paramétrique utilise pour cela des variables de rang, calculées à partir des échantillons X, Y.

Le coefficient de Spearman détecte des tendances monotones. Lorsque la tendance est affine il se comporte de façon similaire au coefficient de Pearson, il sera alors plus élevé si la tendance est monotone. Si la tendance suit parfaitement une fonction monotone, alors $r_s = 1$ ou $r_s = -1$.

D'autres analyses statistiques sont menées en calculant la valeur 'p-value'. Elle représente le niveau de signification marginale mettant en avant la probabilité d'occurrence d'un résultat donné. Pour la comparaison entre deux paramètres, les calculs ont été effectués par le test de Wilcoxon. C'est un test statistique non paramétrique qui permet de tester l'hypothèse selon laquelle les distributions de chacun de deux groupes de données sont proches.

Pour la comparaison de plus de deux échantillons, les calculs sont effectués par le test de Kruskal-Wallis. C'est une méthode non paramétrique utilisée pour tester si des échantillons trouvent leur origine dans la même distribution.

Les résultats des tests sont considérés comme significatifs lorsque la p-value du test est inférieure à 5%. Ainsi, si $p\text{-value} < 0,05$, nous pouvons accepter l'hypothèse selon laquelle le paramètre étudié influence le taux de capture d'ozone avec un risque d'erreur $\alpha = 5\%$. Au contraire, si $p\text{-value} > 0,05$ alors nous ne pouvons pas affirmer l'hypothèse selon laquelle le paramètre étudié influence le taux de capture de l'ozone par le pollen.

4. RESULTATS

4.1. Capture de l'ozone par les pollens

4.1.1. Calcul du taux de capture d'ozone par les pollens

La concentration d'ozone normalisée ($[O_3]_t/[O_3]_0$) en fonction du temps de contact entre un pollen de bouleau intact et l'ozone est présenté dans la **Figure 34**. La concentration initiale d'ozone $[O_3]_0$ est comprise entre 90 et 100 ppb pour toutes les expériences. La valeur initiale est calculée pour chaque expérience par la moyenne sur 100 secondes avant l'introduction de pollen dans le flux d'ozone. Une décroissance rapide de la concentration d'ozone est observée dès l'introduction des grains de pollen dans le réacteur. La concentration $[O_3]_t$ correspond aux concentrations d'ozone après l'introduction des pollens dans le système. La masse d'ozone capturée par le pollen est calculée par intégration du signal en prenant en compte $[O_3]_0 - [O_3]_t$, le temps d'analyse (10 s) et le débit ($1,3 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$). Après cette décroissance initiale, la concentration d'ozone revient vers sa valeur initiale, ce qui signifie que la surface de pollen est saturée.

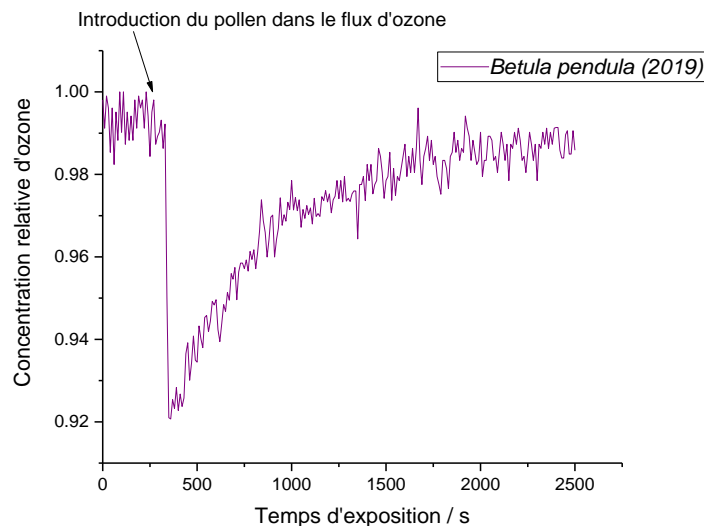


Figure 34: Concentration relative normalisée d'ozone en fonction de la durée d'exposition après l'introduction de 5 mg de grains de pollen de bouleau.

4.1.2. Etude de répétabilité

Afin d'étudier la répétabilité des essais, un exemple de 4 essais identiques sur le pollen d'*Olea europaea* est présenté dans la **Figure 35**. Les expériences ont été menées pour une masse de $5 \pm 0,2$ mg de pollen d'olivier. Les pollens sont exposés à une concentration d'ozone $[O_3]$ proche de 100 ppb. La concentration de la capture de l'ozone pour ce pollen est de $141 \pm 3 \text{ ng}\cdot\text{mg}^{-1}$. Cette valeur correspond à la moyenne plus ou moins l'écart-type des quatre mesures observés dans la **Figure 35** pendant 2500 secondes environ (42 minutes).

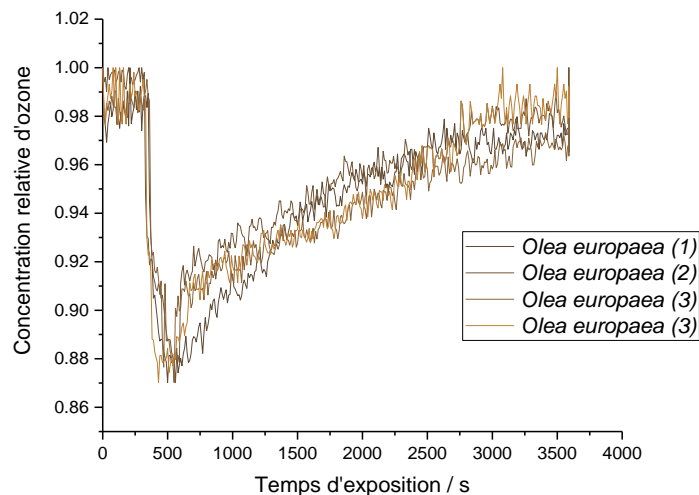


Figure 35: Comparaison des expériences de captures effectuées sur le même pollen. Les résultats concernent le pollen d'*Olea europaea*.

Pour les 4 essais réalisés, le taux de capture de l'ozone par le pollen d'*Olea europaea* varie entre 137 et 144 ng.mg^{-1} . Les variations entre les essais sont faibles et sont de l'ordre de 2 %. C'est le cas pour toutes les autres expositions de pollen réalisées avec des variations faibles comprises entre 1 et 3 %. De plus, le générateur produit de l'ozone à une concentration $[\text{O}_3]$ entre 90 et 110 ppb, ce qui constitue une variation faible de l'ordre 9 %. Compte tenu de ces résultats et de la stabilité du générateur d'ozone, les expériences apparaissent répétables.

4.1.3. Evolution de capture d'ozone

La quantité d'ozone adsorbée sur la surface des pollens étudiés et le nombre d'expériences réalisées pour chaque pollen sont présentés dans le **Tableau 18**. Nous observons que les quantités d'ozone adsorbées sur la surface des grains de pollen font apparaître une grande variation entre les pollens étudiés. Les quantités d'ozone mesurées varient entre 0 et 141 ng.mg^{-1} . La durée de capture de l'ozone s'étend jusqu'à 2500 secondes d'exposition (*Olea europaea*). Le pollen d'*Olea europaea* capture la plus grande quantité d'ozone (141 ng.mg^{-1}) suivi par *Parietaria officinalis* (130 ng.mg^{-1}), *Acer negundo* (82 ng.mg^{-1}) et *Urtica dioica* (66 ng.mg^{-1}). Une exposition de 1000 secondes est suffisante pour une capture importante de l'ozone par certains pollens comme *Betula pendula*, *Cupressus sempervirens*, *Phleum pratense*, *Fraxinus excelsior* et *Alnus glutinosa*. La capture d'ozone pour ces pollens varie entre 12 et 50 ng.mg^{-1} . Certains autres échantillons de pollen ne capturent pas d'ozone ; ces pollens sont *Fagus Sylvatica*, *Platanus x hispanica*, *Plantago lanceolata*, *Pinus halepensis*, *Salix caprea*, *Populus nigra*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Chrysanthemum leucanthemum*, *Artemisia vulgaris* et *Rumex acetosella*. La quantité d'ozone capturée par ces derniers varie entre 0 et 2 ng.mg^{-1} (**Tableau 18**).

Tableau 18: Capture de l'ozone selon les différents taxons des grains de pollen étudiés. Tous les pollens sont intacts et exposés à une concentration proche de 110 ppb d'ozone.

Genre et espèce	N(O ₃) / ng.mg ⁻¹
Arbres	
<i>Acer negundo</i>	82±2 (n=3)
<i>Alnus glutinosa</i>	12±2 (n=3)
<i>Betula pendula</i>	37±2 (n=3)
<i>Corylus avellana</i>	34±2 (n=3)
<i>Cupressus sempervirens</i>	17±3 (n=4)
<i>Fagus sylvatica</i>	1±1 (n=4)
<i>Fraxinus excelsior</i>	50±3 (n=4)
<i>Olea europaea</i>	141±3 (n=4)
<i>Pinus halepensis</i>	1±1 (n=4)
<i>Platanus x hispanica</i>	0±0 (n=4)
<i>Populus nigra</i>	1±1 (n=4)
<i>Quercus rubra</i>	25±3 (n=4)
<i>Salix caprea</i>	1±1 (n=4)
Herbacées	
<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	1±1 (n=4)
<i>Artemisia vulgaris</i>	1±1 (n=3)
<i>Chrysanthemum leucanthemum</i>	1±1 (n=4)
<i>Parietaria officinalis</i>	130±4 (n=4)
<i>Plantago lanceolata</i>	0±0 (n=3)
<i>Rumex acetosella</i>	2±2 (n=4)
<i>Urtica dioica</i>	66±3 (n=4)
Graminées	
<i>Phleum pratense</i>	15±2 (n=4)

D'après les calculs de la quantité d'ozone capturée sur la surface des grains de pollen, nous distinguons deux groupes de pollen. Le premier groupe comprend les grains de pollen présentant un taux de capture d'ozone négligeable avec des valeurs comprises entre 0 et 2 ng.mg⁻¹ (**Figure 36-A**). Le deuxième groupe comprend quant à lui les espèces dont les grains de pollen présentent un taux de capture entre 12 et 141 ng.mg⁻¹ d'ozone (**Figure 36-B**).

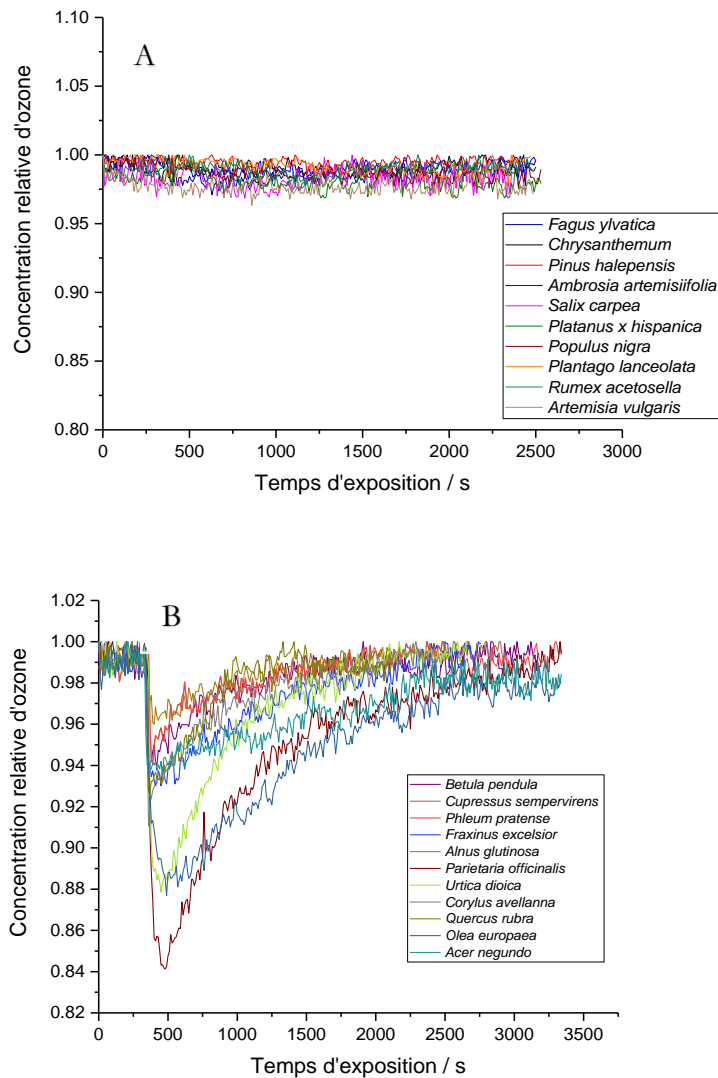


Figure 36: Concentration relative normalisée d'ozone en fonction de la durée d'exposition pour les 21 échantillons de grains de pollen étudiés (période de pollinisation 2019). A) pollens avec une capture inférieure à 2 ng.mg^{-1} B) Pollens avec une capture comprise entre 12 et 141 ng.mg^{-1} .

Nous constatons que les différents pollens étudiés n'ont pas la même capacité de capture de l'ozone. Après l'introduction de pollen, nous observons une chute des concentrations d'ozone, puis un retour à la concentration initiale après un certain temps. Nous pouvons en déduire que dès l'introduction de pollen dans le système, l'ozone est capturé par ces derniers. Cependant, le taux de capture de l'ozone diffère d'un pollen à l'autre.

D'après la littérature, les effets de l'ozone sur la germination du pollen ont été rapportés pour la première fois par Feder en 1968 (Feder, 1968). Depuis lors, un ensemble d'effets ont été décrits consécutivement à l'exposition de pollen de nombreux taxons à l'ozone. Une diversité de réponses

aux stress environnementaux est évidemment attendue selon les espèces, tant pour la partie végétale, le pollen ou les allergènes (Feder, 1986, 1981; Shahali and Dadar, 2018, 2018).

Parmi les effets de l'ozone sur le pollen, nous pouvons citer : une modification de la fraction lipidique extractible (Farah et al., 2021; Naas et al., 2016; Zhu et al., 2018), une modification chimique de la sporopollénine par réaction avec les doubles liaisons des polycaroténoïdes (Naas et al., 2016), une diminution de la viabilité (Cuinica et al., 2013a, 2013b; Wolters and Martens, 1987), la germination d'un tube pollinique plus petit ou une inhibition de la formation du tube pollinique (Chichiriccò and Picozzi, 2007; Cuinica et al., 2013a, 2013b; Feder, 1986, 1981, 1968; Ferreira et al., 2016; Harrison and Feder, 1974; Leisner and Ainsworth, 2012; Masaru et al., 1976; Roshchina and Mel'nikova, 2001; Wolters and Martens, 1987), une promotion des réactions de nitration des protéines ou une modification de certaines protéines lors d'une exposition simultanée à l'ozone et au dioxyde d'azote (Franze et al., 2005), un changement dans la quantité totale de protéines extractibles (Cuinica et al., 2013a, 2013b; Ferreira et al., 2016; Ribeiro et al., 2013, 2014), une augmentation de la quantité d'allergènes (Eckl-Dorna et al., 2010; Masuch et al., 1997), une propension à la rupture plus importante (Rogerieux et al., 2007) et/ou une modification de la réactivité IgE aux allergènes (Eckl-Dorna et al., 2010; Ribeiro et al., 2014).

D'ailleurs, les effets des polluants sur le pollen diffèrent selon le taxon. En effet, il est observé une augmentation de la production d'anticorps IgE suite à une exposition aux pollens d'*Acer negundo* et *Quercus robur* préalablement à l'ozone. L'inverse est observé pour le pollen de *Platanus x acerifolia* (Ribeiro et al., 2014). Ces différences pourraient être un facteur supplémentaire pouvant expliquer leurs pouvoirs allergisants différents. La capture de l'ozone (et plus généralement de polluants) pourrait être le mécanisme le plus simple expliquant l'aggravation des symptômes lors des pics de pollution. Après les travaux précédents de notre groupe de recherche effectués sur un seul taxon à la fois (Chassard et al., 2015; Zhu et al., 2018), cette étude est la première du genre à fournir des informations sur la capture de l'ozone par la surface du grain de pollen.

Afin de comprendre les causes de ces différences, nous avons cherché des corrélations entre quelques paramètres intrinsèques (masse et taille du pollen / types, nombre des ouvertures/ risque allergique, teneur en eau, taux de lipides et la surface spécifique BET) et d'autres extrinsèques (année de récolte, localisation de récolte) et le taux de capture d'ozone par les pollens.

4.2. Effet de certains paramètres intrinsèques sur le taux de capture d'ozone par les pollens

4.2.1. Taux de lipides

Nous avons mesuré le taux de lipides totaux pour tous les grains de pollen étudiés sauf pour le pollen de *Parietaria officinalis* faute d'une quantité disponible suffisante. Le but est de comprendre si le taux de lipides totaux influence le taux de capture d'ozone par les pollens. Il faut noter que pour la plupart des taxons il s'agit ici de la première détermination de la masse de lipides extractibles (**Tableau 19**).

Tableau 19: Masse des lipides extractibles pour les 21 taxons de l'étude (hors *Parietaria officinalis*).

Arbres	Masse de lipides (mg.g ⁻¹)	N(O ₃) sec / ng.mg ⁻¹
<i>Acer negundo</i>	51,4	82±2
<i>Alnus glutinosa</i>	33,6	12±2
<i>Betula pendula</i>	27	37±2
<i>Corylus avellana</i>	20,5	34±2
<i>Cupressus sempervirens</i>	13,98	17±3
<i>Fagus sylvatica</i>	18	1±1
<i>Fraxinus excelsior</i>	18,6	50±3
<i>Olea europaea</i>	73,8	141±3
<i>Pinus halepensis</i>	17	1±1
<i>Platanus x hispanica</i>	39	0±0
<i>Populus nigra</i>	30	1±1
<i>Quercus rubra</i>	19,6	25±3
<i>Salix caprea</i>	39	1±1
Herbacées		
<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	120	1±1
<i>Artemisia vulgaris</i>	25	1±1
<i>Chrysanthemum leucanthemum</i>	49	1±1
<i>Parietaria officinalis</i>	nd	130±4
<i>Plantago lanceolata</i>	15	0±0
<i>Rumex acetosella</i>	43	2±2
<i>Urtica dioica</i>	43	66±3
Graminées		
<i>Phleum pratense</i>	22	15±2

nd non disponible

La **Figure 37** représente la quantité d’ozone capturée par les grains de pollen en fonction de la masse de lipides totaux mesurée. Aucune corrélation n’est observée ($r_p=0,27$) entre la capacité des pollens à capturer de l’ozone et la masse de lipides polliniques (**Figure 37-A**). Les pollens avec de faibles (ou absence) taux de capture d’ozone sont *Platanus x hispanica*, *Plantago lanceolata*, *Pinus halepensis*, *Salix caprea*, *Populus nigra*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Chrysanthemum leucanthemum*, *Artemisia vulgaris* et *Rumex acetosella*. Effectivement, Ils présentent un faible taux de capture d’ozone sur leur surface entre 0 et 2 ng.mg^{-1} , pourtant leurs masses de lipides varient entre 15 et 120 mg.g^{-1} . Nous observons une corrélation avec un coefficient de corrélation $r_p=0,8$ quand nous prenons seulement en compte les pollens ayant un taux de capture supérieur à 2 ng.mg^{-1} (**Figure 37-B**). Ainsi, le coefficient de détermination traduit une relation positive entre le taux de capture d’ozone et le taux de lipides ($r_p=0,8$). La droite est de type linéaire (passant par l’origine) pour cette variable.

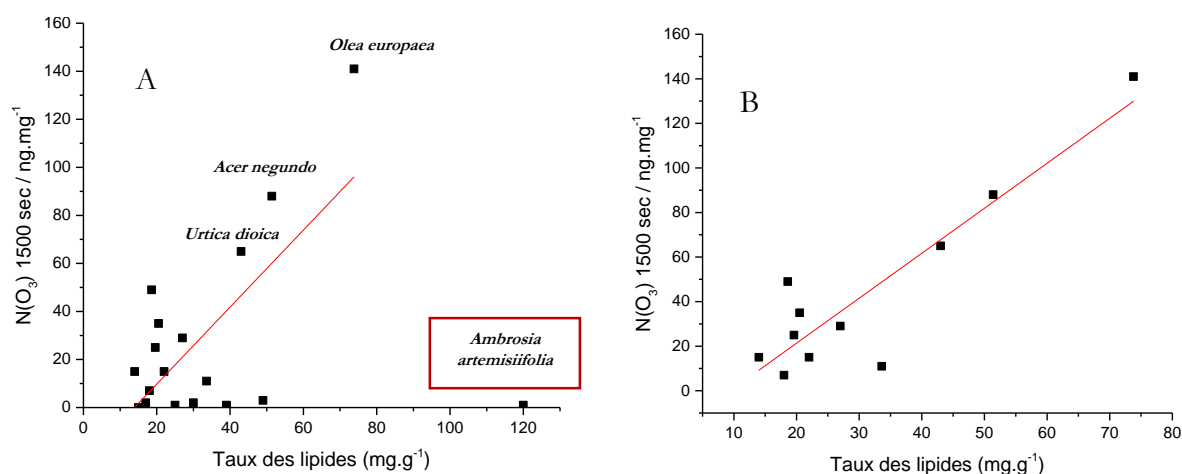


Figure 37: Quantité d’ozone adsorbée sur la surface des grains de pollen et taux de lipides totaux des pollens A) en prenant en considération le pollen d’ambrosie et B) sans prendre en compte les pollens ayant un taux de capture inférieur à 2 ng.mg^{-1} .

L’hypothèse est que la richesse en lipides pourrait augmenter le taux de capture d’ozone par certains pollens. Ces lipides sont composés de différentes familles chimiques telles que des acides gras (saturés, insaturés), alcanes, alcènes, alcools, aldéhydes et stérols. Ces composés ont été identifiés dans la fraction lipidiques de certains pollens étudiés (Bashir et al., 2013a; Farah et al., 2019; Naas et al., 2016; Rejón et al., 2016; Zhu et al., 2018).

4.2.2. Effet de la fraction lipidique sur le taux de capture d’ozone

Ces expériences ont été menées afin d’évaluer l’influence de l’extraction de la fraction lipidique externe du pollen sur leur taux de capture de l’ozone. Les pollens choisis sont *Betula pendula* ($37\pm 2 \text{ ng.mg}^{-1}$), *Fagus sylvatica* ($1\pm 1 \text{ ng.mg}^{-1}$), *Pinus halepensis* ($1\pm 1 \text{ ng.mg}^{-1}$) et *Ambrosia artemisiifolia* ($1\pm 1 \text{ ng.mg}^{-1}$). Ces pollens ont été exposés à une concentration de 110 ppb d’ozone après avoir subi un lavage au solvant organique afin de retirer la fraction lipidique (« défatting »). La **Figure 38** représente la concentration relative d’ozone en fonction de l’état du pollen (intact et « défatté »). La quantité d’ozone capturée à

la surface des 4 pollens étudiés est plus importante dans leur état défatté que dans leur état intact (**Figure 38**). A noter que les pollens sont exposés directement à l’ozone après lavage et séchage.

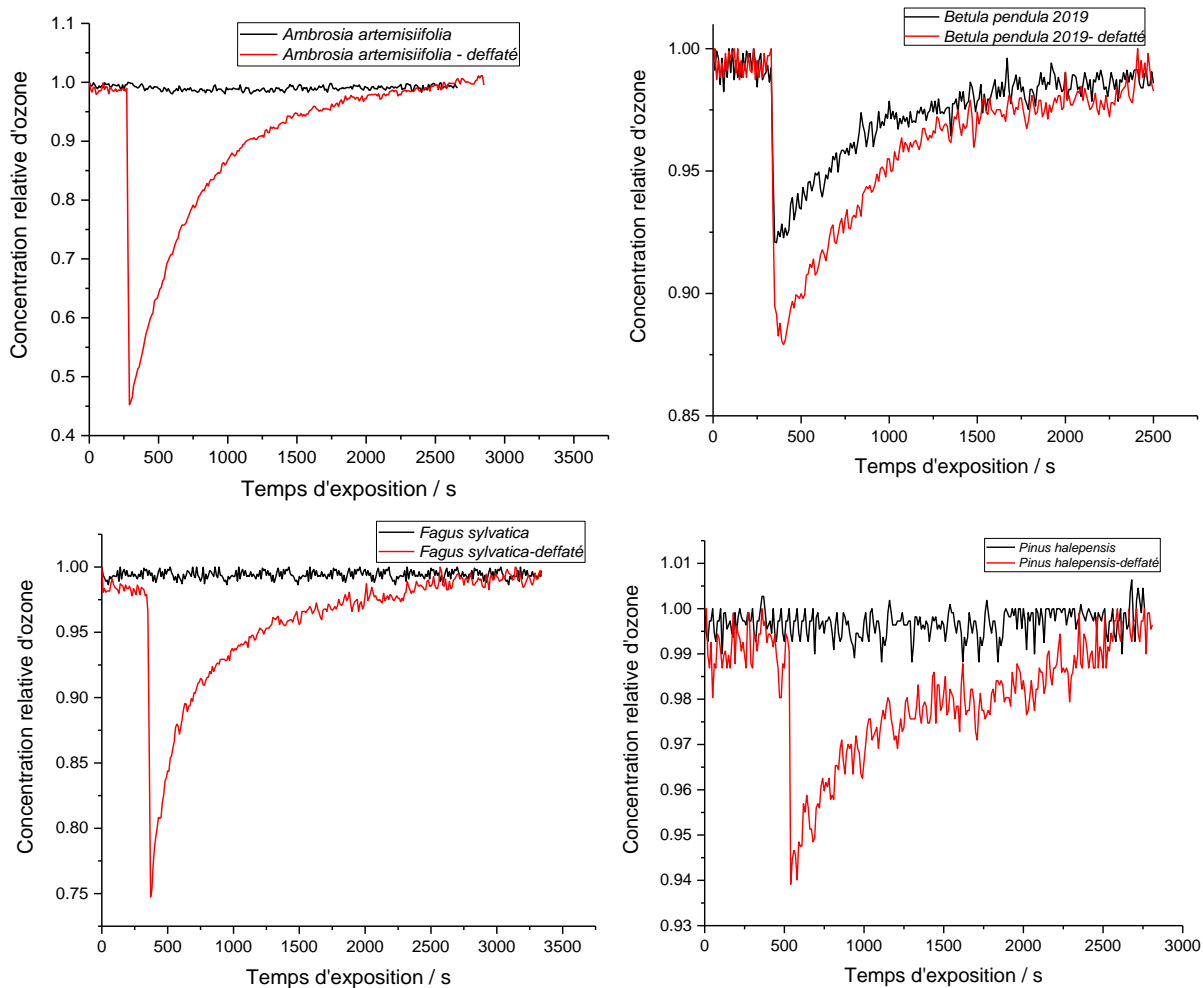


Figure 38: Comparaison de la concentration relative d’ozone en fonction de l’état du pollen intact (ligne noire) et défatté (ligne rouge). Tous les pollens sont exposés à une concentration proche de 110 ppb d’ozone.

Nous observons que le taux de capture d’ozone par les pollens dans leur état défatté est plus important que dans leur état intact. Effectivement, la quantité d’ozone capturée sur la surface des pollens défattés est multipliée par un facteur de 343 pour le pollen d’ambrosie (*Ambrosia artemisiifolia*), par un facteur de 95 pour le pollen de hêtre (*Fagus sylvatica*) et par un facteur de 41 pour le pollen de pin (*Pinus halepensis*) (**Tableau 20**).

Tableau 20: Comparaison de la quantité d’ozone capturée sur la surface de grains de pollen en fonction de son état (intact et défatté). Tous les pollens sont exposés à une concentration proche de 110 ppb d’ozone.

Pollen	N(O ₃) / ng.mg ⁻¹	
	Etat intact	Etat défatté
<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	1±1	343±5
<i>Betula pendula (2019)</i>	37±2	49±2
<i>Fagus sylvatica</i>	1±1	95±2
<i>Pinus halepensis</i>	1±1	41±2

La plus légère modification est observée pour le pollen de bouleau où la quantité d’ozone capturée par un pollen défatté est multipliée par un facteur de 1,3 par rapport à la quantité capturée par ce même pollen dans son état intact. Nous constatons ainsi que la fraction lipidique du grain de pollen influence énormément la capacité de capture de l’ozone par les pollens. Nous déduisons que la fraction lipidique externe protège le pollen (au moins pour certains taxons) de la capture d’ozone.

Ces résultats peuvent s’expliquer de différentes manières. Le pollen est doté d’une double paroi : l’intine et l’exine. La paroi externe est constituée principalement de sporopollénine. C’est un biopolymère physiquement robuste et chimiquement résistant qui constitue la couche de parois de pollen la plus externe et constitue la première ligne de défense contre les conditions environnementales difficiles (Meuter-Gerhards et al., 1999). De plus, c’est la première barrière qui entre en contact avec les polluants. Ces lipides recouvrant la paroi externe sont abondamment étudiés dans la littérature pour de nombreuses espèces végétales (Bashir et al., 2013a; Henricsson et al., 1996; Piffanelli et al., 1997). Cette fraction est facilement extractible après lavage par un solvant organique (**Figure 39**) (Bashir et al., 2013a; Piffanelli et al., 1997; Rejón et al., 2016).

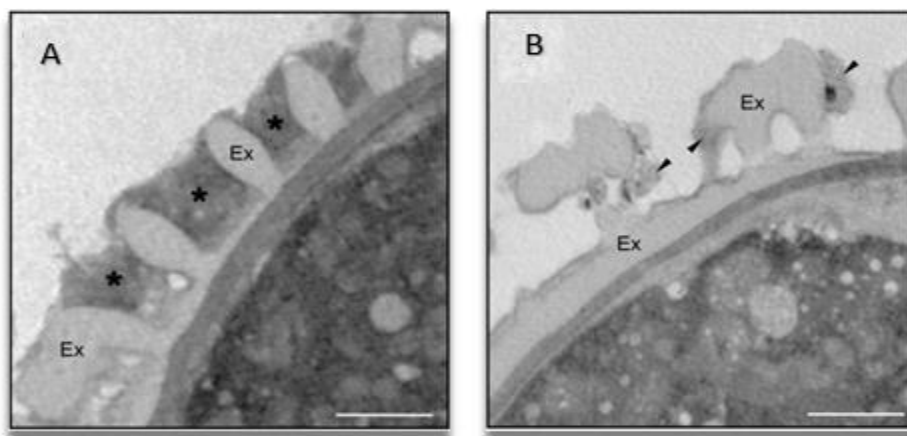


Figure 39: Image en microscopie électronique à transmission de la paroi d’un grain de pollen d’olivier (a) avant et (b) après extraction du revêtement pollinique avec un solvant organique (cyclohexane) (Rejón et al., 2016).

Il est mis en évidence dans la littérature que la modification de la composition chimique de la fraction lipidique externe du pollen provient uniquement de la réactivité de l’ozone sur des alcènes, des acides gras insaturés et sur des doubles liaisons de la structure de la sporopollénine (Farah et al., 2021, 2019;

Naas et al., 2016; Zhu et al., 2018). Zhu et al. (2018) ont montré que les alcènes présents sur la surface lipidique externe des pollens de bouleau peuvent réagir comme anti-oxydant envers l’ozone, protégeant ainsi les molécules nécessaires à la reproduction de la plante (Zhu et al., 2018).

Nous expliquons les différences observées entre un pollen intact et un autre défatté par le fait que la structure interne d’un pollen dépourvu de sa fraction lipidique est plus accessible à l’ozone qu’un autre protégé par cette dernière. L’élimination de cette couche lipidique peut également permettre à l’ozone de s’adsorber sur la surface de pollen dépourvue de ses lipides. En d’autres termes, l’élimination des lipides externes par un solvant organique engendre une augmentation de la surface d’adsorption disponible et/ou rend disponible des composés réactifs avec l’ozone qui étaient préalablement protégés par les lipides. Ces expériences sur le défatting confirment l’importance de la fraction lipidique dans la capture de l’ozone. Cette hypothèse devra être confirmée par la réalisation de mesure de l’aire spécifique des pollens qui n’ont pas pu être réalisées dans le temps imparti à cette thèse.

4.2.3. Teneur en eau

La teneur en eau a été mesurée pour quelques pollens (*Betula pendula*, *Alnus glutinosa*, *Salix caprea*, *Urtica dioica*, *Fraxinus excelsior*, *Pinus halepensis* et *Cupressus sempervirens*) en comparant la masse du pollen avant et après séchage de ces derniers à l’étuve à 110°C pendant 24 et 48 heures. Les pollens choisis possèdent des capacités de capture différentes envers l’ozone.

La teneur en eau est inférieure à 2% pour tous les pollens testés ce qui est cohérent avec le protocole de collecte incluant une étape de dessiccation du pollen (**Tableau 21**). L’effet de ce facteur semble donc négligeable sur la capacité de capture de l’ozone par les pollens.

Tableau 21: Teneur en eau mesurée pour 7 taxons. Cette teneur a été mesurée pour deux durées de séchage à 110 °C (24 h et 48 h).

Taxons	Teneur en eau (%)	
	24 h	48 h
<i>Alnus glutinosa</i>	1	1
<i>Betula pendula</i> (2019)	1	1
<i>Cupressus sempervirens</i>	2	2
<i>Fraxinus excelsior</i>	1	1
<i>Pinus halepensis</i>	1	1
<i>Salix caprea</i>	1	1
<i>Urtica dioica</i>	2	2

4.2.4. Les corrélations entre les caractéristiques morphologiques du pollen et le taux de capture d'ozone

4.2.4.1. Taille du pollen

Le coefficient de corrélation de Spearman montre une corrélation positive entre la taille des pollens et le taux de capture d'ozone avec un r_s voisin de 0,5. La p-value de $0,005 < 0,05$ confirme cette hypothèse en montrant bien qu'il existe une association significative entre les deux variables étudiées.

Le taux de capture de l'ozone est plus important lorsque la taille du pollen est plus grande, dépendrait donc de la surface disponible sur le pollen. Nous constatons que l'ozone capturé par les pollens est adsorbé sur leurs surfaces. Ce paramètre n'explique toutefois pas les variations entre taxons puisque le pollen ayant la taille la plus importante de notre série est le pin, qui entraîne une capture de l'ozone quasi nulle. Mais le pollen de pin est le seul à être de type vésiculé.

4.2.4.2. Nombre et type d'ouvertures

La paroi des grains de pollen possède des ouvertures (également appelées pores ou sillons) qui sont caractérisées par un fort amincissement local, voire d'une disparition, de l'exine et d'un épaissement de l'intine (Thanikaimoni, 1986). D'après Prieu (2015), un nombre élevé d'ouvertures est favorable en termes de germination. Les ouvertures sont des éléments clés de la paroi pollinique. C'est au niveau des ouvertures que se font les échanges avec le milieu extérieur et que croît le tube pollinique (Edlund et al., 2004; Heslop-Harrison, 1968). Par ailleurs, un grand nombre d'ouvertures réduit la survie face à un stress osmotique (Prieu, 2015). Nous supposons que les pollens avec plus d'ouvertures sur leurs surfaces adsorbent plus d'ozone que les pollens sans. L'hypothèse est que l'absence d'exine pourrait permettre aux polluants de réagir plus facilement avec les composants internes du pollen.

Pourtant, les analyses statistiques montrent que le type et le nombre d'ouvertures ne semble pas influencer le taux de capture d'ozone par les pollens avec une p-value de 0,3 (type d'ouverture) et de 0,5 (nombre d'ouvertures). Cette p-value est supérieure à 0,05. Cela signifie que notre hypothèse est rejetée, donc qu'il n'existe aucune corrélation entre ces deux paramètres et la capture d'ozone.

Par ailleurs, l'analyse de l'influence de ces deux facteurs sur le taux de capture d'ozone nécessite un plus grand nombre d'échantillons de pollen. Effectivement, le faible nombre d'échantillons empêche d'affirmer quoi que ce soit. En ce qui concerne les types d'ouvertures tricolporé, tripolé et tricolpé les effectifs disponibles sont entre 4 et 7 pollens. De surcroît, pour les autres types il n'existe qu'un seul effectif pour chaque nombre et type d'ouverture, ce qui est insuffisant. Un plus grand nombre de taxons est nécessaire pour effectuer des analyses plus représentatives sur l'effet des ouvertures sur la réactivité avec des polluants gazeux.

4.2.5. Relation entre le taux de capture d'ozone et la période de pollinisation et le risque allergique

Période de pollinisation

La période de pollinisation est la période de démarrage de la saison pollinique, qui débute lors de la détection du premier pollen dans l'air. La période de démarrage des pollens commence dès le mois de février et se poursuit jusqu'à décembre (RNSA, 2018). Les conditions météorologiques propices à la pollinisation, à savoir un temps calme et ensoleillé, sont également propices à la formation de l'ozone. Par exemple à Copenhague, des concentrations importantes en ozone dans l'air surviennent à la fois avec les saisons polliniques de bouleau et des graminées et également avec les pics journaliers de pollen (Ørby et al., 2015). Autre exemple, il existe également une coïncidence entre la saison pollinique des graminées et les plus hautes concentrations troposphériques en ozone (Bastl et al., 2021).

Nous faisons ici l'hypothèse que les taxons dont la saison pollinique est en été sont moins sensibles à l'ozone (capturent moins d'ozone), du fait que les niveaux moyens relevés en ozone sont généralement plus élevés au printemps et les pics de concentrations s'observent en période estivale (EPA, 2003).

Le taux de capture de l'ozone par les pollens n'est pas corrélé à la période de pollinisation avec une p -value = 0,5 > 0,05. Par conséquent, un pollen qui pollinise en été semble n'adsorber pas moins d'ozone qu'un pollen qui pollinise en janvier. Par exemple, le pollen d'*Artemisia vulgaris* pollinise en juillet (été) comme le pollen de *Parietaria officinalis*. Pourtant, ce dernier présente un taux de capture ($130 \pm 4 \text{ ng.mg}^{-1}$) 130 fois plus important que celui d'*Artemisia vulgaris* ($1 \pm 1 \text{ ng.mg}^{-1}$). Comme le nombre d'effectif par échantillon est assez faible, il est difficile de conclure.

Risque allergique

Il semble qu'il n'existe aucune corrélation entre le risque allergique et le taux de capture d'ozone par les pollens (coefficient de corrélation Spearman r_s voisin de 0,3). Effectivement, la majorité des pollens qui n'adsorbent ou qui adsorbent des quantités très négligeables d'ozone sur leurs surfaces présentent un risque allergique faible et modéré, sauf le pollen d'*Ambrosia artemisiifolia* qui n'adsorbe pas d'ozone sur sa surface et qui présente un risque allergique fort.

Tous les pollens qui adsorbent de l'ozone sur leur surface présentent un risque allergique modéré ou fort, sauf le pollen d'*Urtica dioica* qui adsorbe une grande quantité d'ozone sur sa surface et présente un risque allergique faible. En ne prenant pas les deux pollens d'*Ambrosia artemisiifolia* et d'*Urtica dioica* en considération, le coefficient de corrélation Spearman r_s s'élève à 0,6, montrant la présence de corrélation entre le risque allergique et le taux de capture d'ozone.

4.3. Effet de certains paramètres extrinsèques sur le taux de capture de l'ozone par différents grains de pollen

4.3.1. L'effet de l'année de pollinisation sur le taux de capture d'ozone

Nous avons décidé d'étudier la capture d'ozone pour des pollens de bouleau *Betula pendula* disponibles dans notre laboratoire récoltés sur le campus de l'Université de Lille, Faculté des Sciences et Technologies de 2016 à 2020 (**Figure 31**). Ils ont été exposés à une concentration proche de 100 ppb d'ozone. La **Figure 40** présente une comparaison de la concentration relative d'ozone en fonction de l'année de récolte des grains de pollens de bouleau intact. Nous remarquons que la capacité de capture de l'ozone par les grains de pollen de bouleau diffère légèrement d'une année de récolte à une autre.

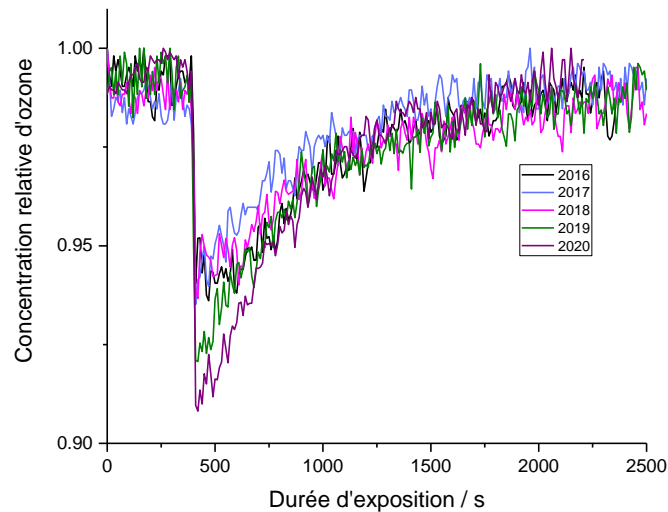


Figure 40: Comparaison de la concentration relative en fonction de l'année de récolte des grains de pollen de *Betula pendula*.

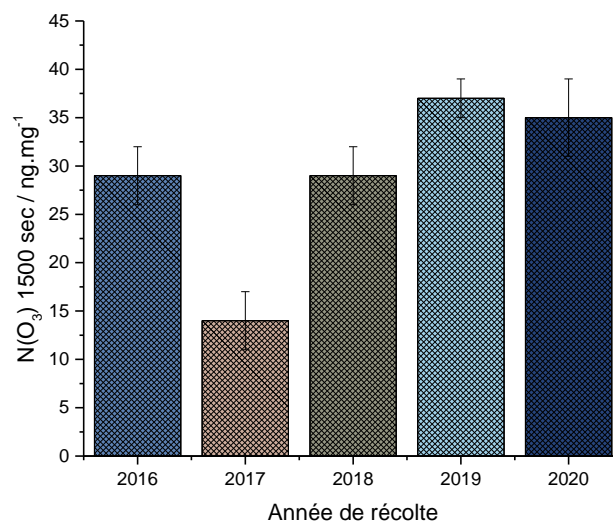


Figure 41: Quantité d'ozone absorbée par les grains de pollens de bouleau intact issus de 5 différentes années de récolte.

Après calcul, nous remarquons que les pollens de bouleau récoltés en 2017 capturent la plus petite quantité d’ozone ($14\pm 3 \text{ ng.mg}^{-1}$). Par contre, les pollens les plus récents de 2019 ($37\pm 2 \text{ ng.mg}^{-1}$) et de 2020 ($35\pm 2 \text{ ng.mg}^{-1}$) capturent la plus grande quantité d’ozone (**Figure 41**). Les pollens récoltés en 2016 et 2018 présentent la même capacité de capture envers l’ozone ($29\pm 2 \text{ ng.mg}^{-1}$). La capacité de capture des pollens est dépendante de l’année de récolte pour un pollen de la même espèce, dans notre cas le pollen de *Betula pendula*. La variation reste cependant limitée avec une valeur moyenne de $27\pm 8 \text{ ng.mg}^{-1}$.

La différence entre les pollens est peut-être liée en grande partie aux différents stress environnementaux qui sont caractéristiques de chaque saison pollinique (Feder, 1986, 1981; Shahali and Dadar, 2018; Wolters and Martens, 1987).

4.3.2. Effet de la localisation de récolte du pollen

Des pollens de *Betula pendula* récoltés sur 9 localisations différentes (**Tableau 16**) ont été exposés à une concentration d’ozone proche de 100 ppb. La **Figure 42** présente une comparaison de la concentration relative d’ozone en fonction de la localisation de récolte. Ces pollens ont tous été récoltés en 2020 par l’entreprise Bonapol.

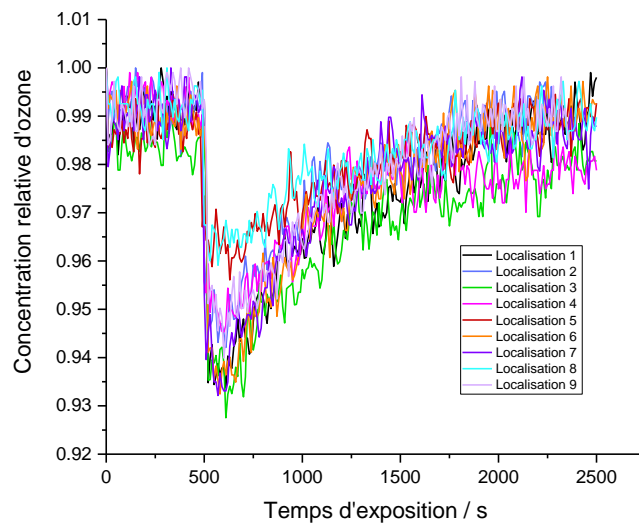


Figure 42 : Comparaison de la concentration relative d’ozone en fonction de la localisation de récolte. Les pollens sont exposés à une concentration d’ozone proche de 100 ppb.

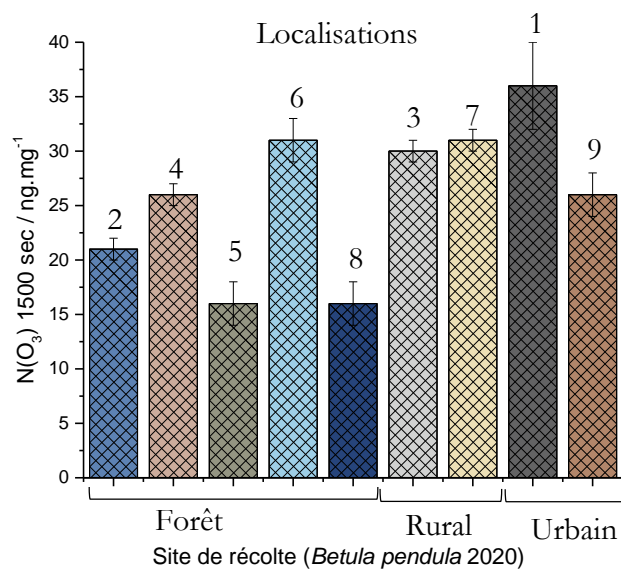


Figure 43: Quantité d’ozone absorbée sur la surface des grains de pollens de bouleau intact récoltés en 2020 dans 9 localisations différentes.

D’après la **Figure 43**, nous observons que la capacité de capture de l’ozone par les pollens dépend de la localisation de récolte. La quantité d’ozone capturée sur la surface des grains de pollen récoltés en République Tchèque en 2020 de 9 différentes localisations varie entre 16 et 36 ng.mg⁻¹.

Cette quantité varie entre 16 ± 2 et 31 ± 2 ng.mg⁻¹ pour les pollens récoltés en forêt. Pour les pollens récoltés en milieu rural cette quantité est presque constante de 30 ± 1 ng.mg⁻¹ (localisation 3) et 31 ± 1 ng.mg⁻¹ (localisation 7). En ce qui concerne les pollens récoltés en milieu urbain la quantité d’ozone capturée par ces pollens varie entre 26 ± 2 ng.mg⁻¹ et 36 ± 4 ng.mg⁻¹.

Donc la capacité de capture d’ozone par les pollens de *Betula pendula* est dépendante de la localisation de récolte de ces pollens et ne semble pas présenter un lien direct avec la nature du site de récolte. En effet, nous pouvons conclure qu’il n’existe pas une quantité d’ozone spécifique capturée par les pollens d’un endroit rural, urbain ou en forêt. Ces différences peuvent être expliquées par le fait que le pollen utilisé peut provenir d’une plante (population) ayant développé une certaine résistance à l’ozone. De larges différences de sensibilité à l’ozone ont été observées entre des clones de *Betula* (Päkkönen et al., 1997).

L’absence d’une corrélation entre la localisation de prélèvement et le taux de capture d’ozone, nous amène à penser que ces différences sont corrélées à de nombreux facteurs liés aux arbres (physiologiques, anatomiques, biochimiques) et d’autres facteurs environnementaux.

Tableau 22 : Résumé de tous les paramètres intrinsèques et extrinsèques étudiés.

Genre et espèce	Taille du pollen (µm)	Types d'ouvertures (nombre de pores)	Année de récolte	Potentiel allergisant (RNSA)*	Période de pollinisation (mois de démarrage)	Masse de lipides (mg.g ⁻¹)	N(O ₃) ng.mg ⁻¹
Arbres							
<i>Acer negundo</i>	26	Tricolpé (3)	2018	2	3	51,4	82±2
<i>Alnus glutinosa</i>	26,2	Pentaporé (5)	2017	3	1	33,6	12±2
<i>Betula pendula</i>	28,5	Tripore (3)	2016	3	3	27	37±2
<i>Corylus avellana</i>	25,4	Tripore (3)	2018	3	1	20,5	34±2
<i>Cupressus sempervirens</i>	29,8	Inaperturé (0)	2009	3	2	13,98	17±3
<i>Fagus sylvatica</i>	48,6	Tricolporé (3)	2016	2	4	18	1±1
<i>Fraxinus excelsior</i>	27,3	Tricolpé (3)	2018	3	3	18,6	50±3
<i>Olea europaea</i>	21-25	Tricolporé (3)	2017	3	5	73,8	141±3
<i>Pinus halepensis</i>	20-30	Tricolpé(3)	2011	2	4	17	1±1
<i>Platanus x hispanica</i>	88	Vésiculé	2014	1	4	39	0±0
<i>Populus nigra</i>	16	Inaperturé (0)	2016	1	3	30	1±1
<i>Quercus rubra</i>	26,98 x 22,58	Tricolporé (3)	2018	2	4	19,6	25±3
<i>Salix caprea</i>	17,6	Tricolporé (3)	2007	2	3	39	1±1
Herbacées							
<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	15-25	Tricolporé (3)	nd	3	8	120	1±1
<i>Artemisia vulgaris</i>	26,2	Tricolporé (3)	2018	2	7	25	1±1
<i>Chrysanthemum leucanthemum</i>	27-33	Tricolpé (3)	nd	0	6	49	1±1
<i>Parietaria officinalis</i>	11-15	Tripore (3)	2017	2	7	nd	130±4
<i>Plantago lanceolata</i>	34,8	Péripore (>6)	2018	1	4	15	0±0
<i>Rumex acetosella</i>	21-25	Tricolporé (3)	2018	1	4	43	2±2
<i>Urtica dioica</i>	20,3	Tripore (3)	2017	1	6	43	66±3
Graminées							
<i>Phleum pratense</i>	36-40	Monopore (1)	2018	3	6	22	15±2

nd non disponible

*Echelle du potentiel allergisant : 0=nul ; 1= faible ; 2=modéré ; 3=fort

5. CONCLUSION

Nous avons présenté dans ce chapitre une première étude de la littérature sur une exposition à l'ozone en laboratoire d'une vingtaine de taxons de pollen dans les mêmes conditions expérimentales.

La quantification du taux d'ozone capturée par différentes espèces montre que la sensibilité des grains de pollen diffère clairement d'un taxon à l'autre. Le taux de capture d'ozone varie entre 0 et 141 ng.mg⁻¹ selon les taxons étudiés. Notre méthode de capture d'ozone est répétable avec une incertitude de 2 % pour une masse de pollen exposée de 5 mg.

Certains manques de l'étude sont à souligner. La mesure de la surface spécifique (m².g⁻¹) n'a pas pu être réalisée dans le cadre de cette thèse alors que ce paramètre est important pour l'adsorption. Ces mesures sont prévues et représenteront un jeu de données inédit car actuellement quasiment absent de la littérature en aérobiologie. L'influence du défatting sur la surface spécifique est également à étudier plus en détail. Ensuite, les mesures ont été faites sur des pollens secs non représentatifs du taux d'humidité du pollen dans l'atmosphère. Le système d'exposition devra être perfectionné pour permettre d'étudier l'influence du taux d'humidité sur la capture. Enfin, les pollens ont été exposés à un seul gaz polluant. Or, pour un mécanisme de type Langmuir-Hinshelwood une compétition est attendue avec d'autres gaz candidats à l'adsorption comme le dioxyde d'azote (Farah et al., 2021). Les mesures présentées dans ce travail sont donc probablement des valeurs maximales de la capture de l'ozone.

Nous avons montré que le taux de capture d'ozone par les pollens est corrélé positivement à la fois à la taille des pollens et à la masse de lipides polliniques. Nous avons constaté que la fraction lipidique joue un rôle protecteur envers le pollen empêchant la capture d'une plus grande quantité d'ozone par les pollens. La quantité d'ozone capturée sur la surface des pollens défattés est multipliée par un facteur de 343 pour le pollen d'ambrosie (*Ambrosia artemisiifolia*), par un facteur de 95 pour un pollen de hêtre (*Fagus sylvatica*) et par un facteur de 41 pour le pollen de pin (*Pinus halepensis*). L'influence de la taille (et donc probablement de la surface) est également marquée, mais présente des singularités comme pour le pollen de pin, particulièrement grand mais avec une capture excessivement faible. Nous avons montré que le taux de capture d'ozone est également dépendant mais dans une autre moindre mesure de l'année et de la localisation de récolte des pollens.

La mise en contact entre du pollen et de l'ozone en laboratoire se traduit par une rapide diminution de la concentration en ozone suite à deux mécanismes : l'adsorption de l'ozone sur la surface du pollen et la réactivité de l'ozone avec des constituants des grains de pollen (Alebic-Juretic et al., 1997). Il est possible que les lipides jouent un rôle protecteur en bouchant physiquement l'accès du polluant aux parties internes de son enveloppe et son cytoplasme. Il s'agit d'un effet protecteur supplémentaire des lipides, ceux-ci sont en effet également mentionnés dans la littérature comme des antioxydants efficaces vis-à-vis de l'ozone grâce à la présence de composés lipidiques insaturés (Zhu et al., 2018).

La capture de l'ozone par les pollens n'est qu'un indicateur. Le pin a une capture proche de 0 et pourtant une réactivité a été observée sur les lipides (Naas et al., 2016). La capture proche de 0 signifie avant tout que le pollen ne transporte que peu d'ozone mais qu'il n'est pas à l'abri d'une réactivité par

un mécanisme où l’ozone en phase gazeuse réagit directement avec des composés en surface du grain de pollen (mécanisme de type Eley-readel). Un mécanisme de type adsorption/réactivité (Langmuir Hinshelwood) est par ailleurs suspecté dans la littérature sur le pollen de bouleau (Farah et al., 2021), ce qui est confirmé par la capture d’ozone mesurée sur ce taxon.

Ces mesures de la capture de l’ozone par les pollens sont un bon indicateur de la charge en ozone portée par le pollen lors de son transport atmosphérique et donc de la charge potentiellement transmise lors de l’interaction du pollen avec les muqueuses. Les effets sanitaires de cette capture ne sont actuellement pas connus, notamment au niveau de l’inflammation potentiellement induite par cette adsorption. L’ozone adsorbé sur le pollen peut engendrer une cascade de réactions biochimiques aboutissant à la formation d’espèces réactives de l’oxygène. Celles-ci sont particulièrement étudiées pour leurs effets sur l’appareil respiratoire et pourraient jouer un rôle dans l’aggravation des symptômes lors de la co-exposition pollen-polluants (Shiraiwa et al., 2012, 2011). La présence de polluants adsorbés n’est probablement pas prise en compte expérimentalement dans les études de laboratoires sur le potentiel inflammatoire du pollen pollué. En effet, il existe dans ces études un découplage temporel entre l’exposition du pollen à un polluant en laboratoire et son utilisation (très probablement dans un autre laboratoire) pour ses effets sur des cellules. Il est probable que la durée de vie de ces espèces capturées n’est que de quelques minutes voire quelques heures (Shiraiwa et al., 2011). La prise en compte de l’ozone adsorbée dans les études de laboratoire sur l’inflammation de cellules à du pollen nécessite une exposition du pollen et une mise en contact immédiate avec des cellules. La présence de polluants adsorbés sur le pollen pourrait être par exemple une explication simple de l’aggravation des symptômes de l’allergie lors de pics de pollution. D’une manière assez similaire, la présence de polluants gazeux transportés sur le pollen pourrait avoir un rôle actuellement non renseigné sur la reproduction des végétaux.

Cette étude est à replacer dans un contexte plus large de profondes modifications atmosphériques et climatiques. L’ozone est l’un des rares polluants réglementaires à voir sa concentration stagner et même augmenter en France (ATMO FR, 2022) notamment en lien avec une élévation des températures moyennes. Le dioxyde de carbone et le changement climatique influencent par ailleurs les rythmes de reproduction des végétaux avec une tendance à la hausse de l’exposition aux pollens allergisants prévues ces prochaines décennies. La co-exposition des allergiques aux pollens et à l’ozone sera donc très vraisemblablement à la hausse et d’autres études systématiques sont nécessaires pour comprendre les relations complexes entre plante, pollen, polluants et le système immunitaire.

**CHAPITRE IV MISE EN ŒUVRE D'UNE
METHODE DE COMPTAGE DES GRAINS
DE POLLEN DE BOULEAU EN MILIEUX
INTERIEUR ET EXTERIEUR**

1. INTRODUCTION

Les concentrations polliniques dans l'air extérieur sont bien connues grâce aux mesures réglementaires centralisées en France par le Réseau National de Surveillance Aérobiologique (RNSA). Elles sont mesurées par le capteur Hirst qui est le capteur opérationnel le plus utilisé en Europe (entre 400 et 500 stations). Du fait de son encombrement, ce type de capteur est principalement adapté aux prélèvements en milieu extérieur.

Les concentrations de pollens en air intérieur ont fait l'objet d'un grand nombre d'études mais leurs valeurs varient considérablement dans la littérature, de sorte que l'exposition en milieux confinés reste relativement moins bien connue qu'en extérieur, notamment sur son importance dans la survenue des symptômes.

Dans cette thèse, nous avons développé une méthode de comptage des grains de pollen permettant de s'affranchir d'un décompte visuel par microscopie optique. Notre objectif est de concevoir une méthode de comptage rapide qui permette également de connaître l'état du pollen (intact ou rompu), mais aussi de fournir un niveau de contamination chimique. Cette méthode a été testée pour le pollen allergisant du bouleau sédimenté en environnement intérieur et sous les arbres en environnement extérieur (avec l'avantage de concentrations polliniques très importantes dans cette condition particulière). Les grains de pollen produits par les arbres sont destinés à être dispersés par les mouvements de l'air environnant, mais une partie d'entre eux sédimentent directement sous l'arbre. Cette partie de pollen perdue par sédimentation rapide n'est actuellement pas documentée. Aussi, la connaissance de la production pollinique (quantité totale de pollen produite par un arbre) n'est pas suffisante à des fins de modélisation des concentrations atmosphériques si celle-ci diffère trop de la quantité de pollen réellement émise dans l'atmosphère (puisque une partie est « perdue » par sédimentation). Il est également intéressant d'avoir une estimation de la quantité de pollens sédimentés au sol, car ces derniers sont considérés plus pollués que les pollens transportés dans l'air (Choël et al., 2020; Visez et al., 2019). Ces pollens peuvent être remis en suspension dans l'atmosphère principalement par le vent et auront tendance à augmenter la concentration des pollens pollués dans l'atmosphère. Une exposition à ces pollens pourrait causer des symptômes allergiques plus graves. De plus, ces pollens sont largement transportés vers le milieu intérieur. En effet, en marchant sous un arbre, un individu rapporte du pollen en environnement intérieur par le biais de ses chaussures (cf. chapitre I partie 5.2.1).

Ce chapitre est consacré à la présentation du travail mené au laboratoire et sur le terrain pour le développement de cette méthode de comptage des grains de pollen par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CGP-SM).

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Mise au point de la méthode de comptage du pollen

2.1.1. La méthode d'échantillonnage

La méthode d'échantillonnage consiste à prélever les grains de pollen sédimentés au sol ou déposés sur une surface verticale par un aspirateur à main (NVB, 5.4Wh, 3.6V BLACK+DECKER dustbuster). Tous les pollens aspirés sont piégés sur des lingettes électrostatiques (lingettes dépoussiérantes 10,5 cm x 13 cm) fixées sur la buse de l'aspirateur par un ruban adhésif (**Figure 44**). Les lingettes contenant le pollen sont ensuite rincées par un solvant organique puis analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (CGP-SM) en mode SIR (Selected Ion Recording).



Figure 44: Fixation de la lingette électrostatique sur la buse de l'aspirateur avant d'effectuer les prélèvements (trois premières images) et lingette pliée après le prélèvement (dernière image).

2.1.2. Extraction de la fraction lipidique des pollens fixés sur les lingettes

Produits chimiques utilisés

D'une façon générale, les solvants organiques utilisés dans la littérature pour l'extraction des lipides externes des grains de pollen sont les suivants: éthanol, méthanol, acétone, acétonitrile, éther de pétrole, éther diéthylique, toluène, diméthyle sulfoxyde, N,N-diméthylformamide, chloroforme, benzène, hexane, cyclohexane, dichlorométhane (Bashir et al., 2013a; Farah et al., 2019; Naas et al., 2016; Rejón et al., 2016). Dans cette thèse, le dichlorométhane (DCM, CH_2Cl_2 , 99,8%) a été choisi comme solvant organique pour extraire la fraction lipidique externe des grains de pollen. Le solvant a été choisi pour sa bonne efficacité d'extraction testée pendant la thèse de Jinane Farah (2018), et pour sa propension à s'évaporer rapidement.

Extraction en phase organique

La méthode consiste en une extraction des lingettes avec 10 mL de DCM. Les lingettes pliées sont placées dans une seringue de 10 mL contenant un coton préalablement nettoyé au méthanol et au DCM. Le temps de contact entre les lingettes contenant les pollens prélevés et le solvant est de 8 minutes (**Figure 45**). Le flacon contenant la lingette est également rincé avec 1 mL de DCM. Ce rinçage consiste à minimiser la perte des échantillons. L'extrait organique est évaporé sous flux d'azote jusqu'à obtenir un résidu sec. A la fin, le résidu sec est solubilisé avec 5 μL de BSTFA-TMCS et 50 μL d'une solution étalon. Cette solution étalon est préparée en utilisant l'hexadécane (détaillé dans la partie 2.2.1

de ce chapitre). La masse finale avant l'injection dans la CGP-SM est de 100 mg (ajustée par du DCM pur).

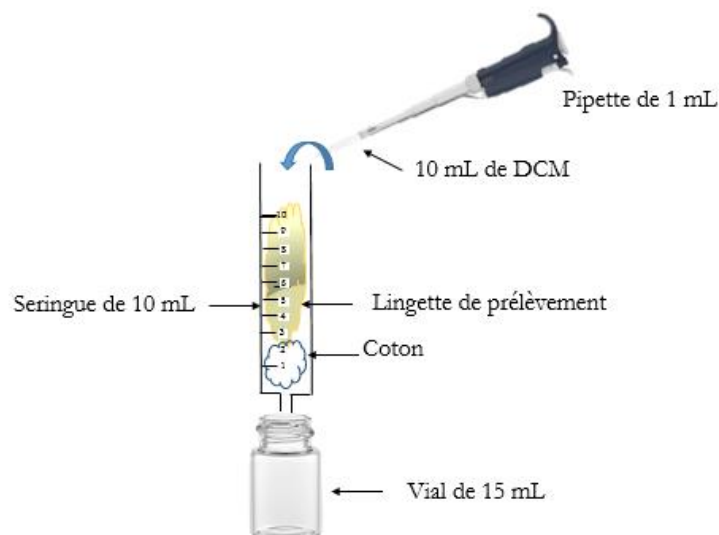


Figure 45 : Schéma de l'extraction des lingettes de prélèvement.

L'ajout de BSTFA (N, O-bis (triméthylsilyl) trifluoroacetamide) et de TMCS (triméthylchlorosilane) (98,5-1,5 %) consiste à remplacer les hydrogènes liés à un oxygène dans les familles des composés organiques (alcools, acides carboxyliques et des phénols) par un groupement de triméthylsilane ($-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$). L'objectif de cette silylation est de rendre plus volatils et thermiquement plus stables ces composés afin d'améliorer leur détection en chromatographie.

2.1.3. Analyse par la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Les analyses chromatographiques ont été réalisées par chromatographie gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse CGP-SM (PerkinElmer Clarus 500). La CGP-SM a été utilisée pour les analyses de quantification et d'identification des pollens prélevés par les lingettes.

Le volume d'injection est de $1 \mu\text{L}$. Le temps de fermeture des vannes de l'injecteur (splitless) est de 30 s. Une rampe de température du four a été programmée à chaque analyse : 50°C pendant 1 min, ensuite chauffe à $4^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ pour obtenir un palier à 310°C de 19 min à la fin de l'analyse. Le débit d'hélium est de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. La température de l'injecteur est 250°C . La durée totale de l'analyse est de 85 min. La colonne utilisée est de type HP5 (Crossbond 5 % diphényl- 95 % diméthylpolysiloxane) de dimensions : 30 m x 0,25 mm (d.i.) et $0,25 \mu\text{m}$ de phase stationnaire.

Le spectromètre de masse de type quadripôle est utilisé en mode SIR (Selected Ion Recording) L'ionisation se fait à un impact électronique de 70 eV. Pour chaque molécule recherchée, deux ions sont analysés, notamment pour contrôler l'intensité relative entre ces deux ions (marqueur d'une co-élution). Le spectre du mode scan est un second point de contrôle afin de s'assurer que le bon composé

est dosé. Les débuts et fins de fonctionnement pour le mode SIR sont présentés dans le **Tableau 23**. Le choix des ions recherchés est décrit dans la partie 2.1.4 de ce chapitre.

Tableau 23 : Paramètres du CGP-SM employés en mode SIR.

Début (min)	Fin (min)	Ions recherchés (m/z)	Composés recherchés	Marqueur
28	29	57/71	Hexadécane	Etalon (Hexadécane)
46,5	48,5	75/335	Acide α -linoléique	Cytoplasme (pollen rompu)
55,5	57	57/380	Heptacosane	Pollen intact

Un test « blanc » a été effectué sur des lingettes et le ruban adhésif suivant le même protocole d'extraction en phase organique mais sans pollen (lingettes qui suivent les mêmes manipulations que les échantillons mais sans fonctionnement de l'aspirateur). La quantité totale extraite des espèces organiques visées est négligeable par rapport à celle des pollens.

Des ions marqueurs de l'oxydation des lipides polliniques avaient également été ajoutés à cette méthode dans le test préliminaire (nonanal). Cet aldéhyde a en effet été identifié comme l'un des produits les plus abondants lors de la réactivité de l'ozone avec les lipides du pollen de bouleau (Farah et al., 2021). Pour des raisons de manque de temps liée à la pandémie, en particulier pour la calibration de ce composé, le dosage du nonanal a dû être mis de côté dans ce travail de thèse.

2.1.4. Argumentaire du choix des ions recherchés en mode SIR pour le dosage du pollen

Notre méthode de prélèvement consiste à aspirer les pollens de bouleau sur le sol (pour les prélèvements en milieu extérieur et intérieur). Mais en aspirant on ne prélève évidemment pas que du pollen mais un mélange très hétérogène constitué de pollens, de fragments de végétaux et de graviers. Afin d'identifier par CGP-SM les grains de pollen de bouleau uniquement, il faut choisir des composés spécifiques pour ce dernier.

D'après la littérature, il est bien expliqué que la fraction lipidique de pollen de bouleau contient une importante masse de lipides. Ces lipides sont répartis entre la fraction lipidique externe (3591 ± 394 ng.mg⁻¹) et la fraction lipidique interne (4131 ± 668 ng.mg⁻¹) (Farah et al., 2021).

Ces lipides sont composés de plusieurs familles chimiques des alcènes, alcools, alcanes et des aldéhydes. Leur répartition entre la fraction interne et externe de pollen de bouleau est homogène (**Figure 46**). Les acides gras insaturés, spécifiquement les acides α -linoléique et linoléique sont majoritairement présents dans la fraction lipidique interne de pollen de bouleau (**Figure 47**). La libération de ces lipides internes est favorisée par une dégradation de la paroi externe de pollen par l'effet de certains polluants atmosphériques et/ou par les facteurs environnementaux. Il a été démontré dans la thèse de Jinane Farah que l'extraction de ces acides gras insaturés n'est en effet possible que si le pollen est préalablement fracturé. En effet, avec une membrane pollinique intacte, le solvant ne pénètre pas dans le cytoplasme (Thèse J. Farah, 2018).

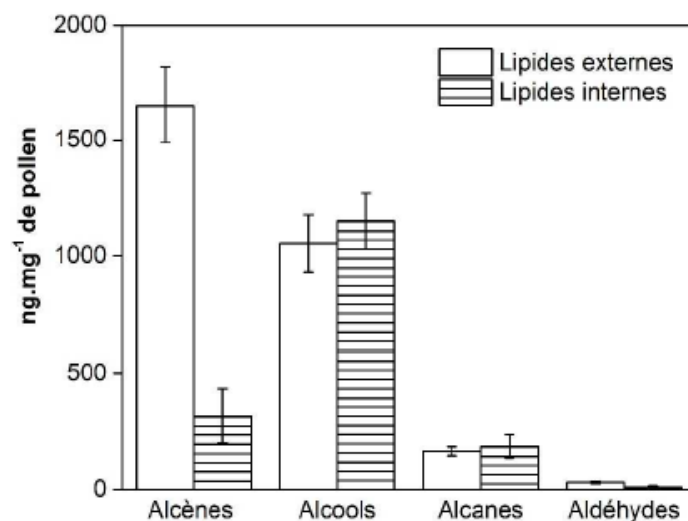


Figure 46 : Répartition des concentrations massiques des alcènes, alcools, alcanes et aldéhydes dans les fractions lipidiques externe et interne du pollen de bouleau (extraction par le dichlorométhane) (Farah et al., 2021).

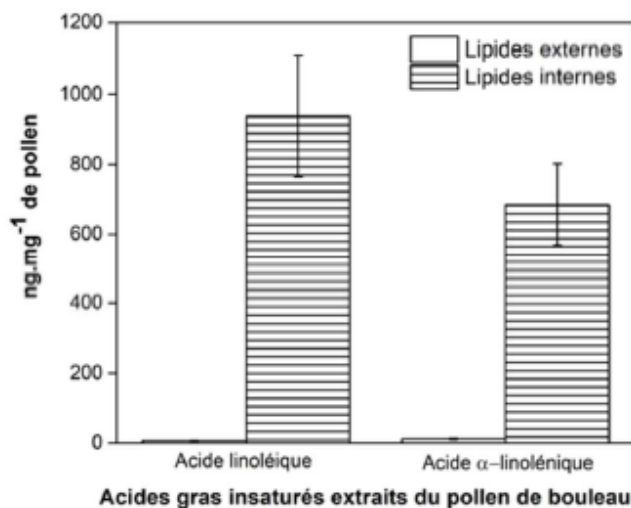


Figure 47 : Répartition des acides gras insaturés dans les lipides externes et internes des pollens (extraction par le dichlorométhane) (Farah et al., 2021).

Le chromatogramme sur la **Figure 48** représente les lipides du pollen de bouleau extraits par le dichlorométhane. Les composés lipidiques externes sont représentés sur le chromatogramme en couleur noir et ceux de la fraction lipidique interne sont représentés par le chromatogramme en rouge. La comparaison entre les deux chromatogrammes du pollen de bouleau intact et broyé montre une similarité d'extraction pour certains pics, notamment correspondant à la fraction lipidique externe. Par contre, des nouveaux pics sont observés pour le pollen de bouleau broyé. L'augmentation importante des intensités des pics élués entre le temps de rétention 40 et 45 min et 62 et 68 min sur le

chromatogramme rouge de pollen broyé signifie que ces composés sont fortement libérés de la composition interne du pollen de bouleau (Thèse J. Farah, 2018).

La structure extérieure du pollen est en effet un frein à la pénétration lors de l'extraction du solvant organique dans le cytoplasme. Les composés lipidiques du cytoplasme ne peuvent être extraits que si la membrane extérieure du pollen est rompue (Farah et al., 2019). C'est cette particularité que nous avons exploitée dans cette thèse pour quantifier la fraction de pollen rompu.

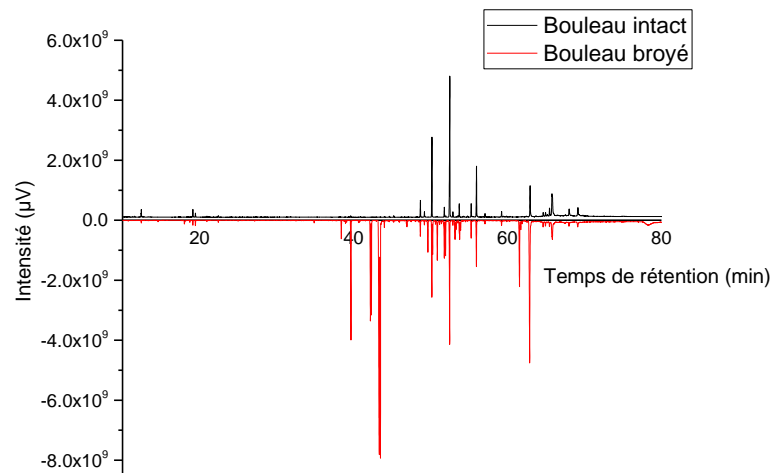


Figure 48 : Comparaison entre les chromatogrammes des lipides extraits du pollen de bouleau intact et artificiellement broyé en laboratoire (Thèse J. Farah, 2018).

2.1.5. Composés caractéristiques du pollen de bouleau intact

La fraction lipidique externe du pollen de bouleau comprend une masse importante d'espèces chimiques de classes d'alcools et d'alcènes. Farah et al. (2021) ont identifié 37 composés dans la fraction lipidique extractible de pollen de bouleau. Afin de choisir un composé qui sert à identifier et quantifier le pollen de bouleau intact, il faut que ce dernier soit présent en grande quantité dans la fraction lipidique de pollen et il est important qu'il soit stable- c'est-à-dire ne réagit pas avec les polluants.

Notre choix s'est porté sur l'heptacosane comme composé caractéristique de pollen de bouleau intact. En effet, il constitue l'alcane avec la masse la plus abondante de sa famille présente dans la fraction lipidique de pollen de bouleau intact (Farah et al., 2021) (**Tableau 25**). Il constitue 48% de la masse des alcanes totale. Ce composé est stable, selon Farah et al. (2021), il ne réagit pas avec l'ozone et le dioxyde d'azote. Contrairement aux alcènes, aldéhydes et des acides gras qui ont montré quant à eux une réactivité importante envers l'ozone et le dioxyde d'azote. Ces composés ne sont pas stables, leurs compositions massiques sont modifiées après expositions aux polluants.

Les alcools n'ont pas été choisis en raison de la nécessaire utilisation de BSTFA/TMCS (pour leur quantification). Cette méthode consiste à remplacer les hydrogènes liés à un oxygène dans les familles des composés organiques (alcools, acides carboxyliques et des phénols) par un groupement de triméthylsilane ($-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), ce qui permet de perturber leur quantification. Nous avons fait face à des problèmes importants d'encrassement de la source d'ions du SM et une moindre utilisation de

BSTFA/TMCS nous a permis de limiter ce problème. Dans la poursuite de ces travaux de thèse, il sera prévu de reconsidérer l'utilisation des alcools comme marqueurs de pollen en raison notamment de leurs concentrations bien plus importantes que celle des alcanes.

2.1.6. Composés caractéristiques du pollen de bouleau broyé

La fraction lipidique externe du pollen intact n'est pas similaire à sa fraction lipidique interne (**Figure 46** et **Figure 47**). La fraction lipidique interne du pollen de bouleau est extraite selon un protocole de broyage mécanique défini par Farah et al (2021). La rupture artificielle de pollen est réalisée en laboratoire par agitation magnétique d'un barreau aimanté placé dans un flacon en verre contenant les grains de pollen. Le broyage des grains de pollen est fait à une vitesse de 1400 tours/min pendant 4 h.

Les lipides internes de pollen de bouleau sont riches en acide linoléique ($938 \pm 173 \text{ ng.mg}^{-1}$) et en acide α -linoléique ($685 \pm 117 \text{ ng.mg}^{-1}$) (**Tableau 26**). Par ailleurs, ces deux acides (acides linoléique (C18:2) et α -linoléique (C18:3)) sont présents en quantités très faibles dans les lipides externes (Farah et al., 2021). Dans cette thèse, l'acide α -linoléique ($685 \pm 117 \text{ ng.mg}^{-1}$) est choisi pour identifier et quantifier les grains de pollen broyés car c'est l'acide majoritaire de la fraction lipidique interne de pollen de bouleau (**Tableau 26**).

Pour résumer, la formule chimique des composés recherchés, leurs masses moléculaires et leurs temps de rétention sont présentés dans le **Tableau 24**. La durée de l'analyse chromatographique est de 85 min.

Tableau 24 : Formule chimique, masse moléculaire et temps de rétention de tous les composés recherchés.

Composés recherchés	Marqueur	Formule chimique	Masse moléculaire (g.mol^{-1})	Temps de rétention CGP/SM (min)	Fragments principaux
Heptacosane	Pollen intact	$\text{C}_{27}\text{H}_{56}$	380	56,1	57/380
Acide α -linoléique	Cytoplasme (pollen rompu)	$\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{O}_2$	335	47,5	75/335

Tableau 25 : Concentrations massiques des espèces organiques identifiées et quantifiées dans la fraction lipidique externe du pollen de bouleau intact et pollué extraite par le dichlorométhane (Farab et al., 2021).

T _R GC/FID (min)	Masse (ng.mg ⁻¹ de pollen)					
	Formules brutes	Intact	[NO ₂]= 100 ppb	[O ₃]= 130 ppb +[NO ₂]= 100 ppb	[O ₃]= 130 ppb	
ALCANES extraits du pollen de bouleau						
Hénéicosane	42,5	C ₂₁ H ₄₄	8 ±1	10 ±2	10 ±1	11 ±2
Tricosane	46,8	C ₂₃ H ₄₈	20 ±3	18 ±4	17 ±3	20 ±3
Pentacosane	50,8	C ₂₅ H ₅₂	58 ±5	62 ±11	62 ±7	61 ±12
Heptacosane	54,6	C₂₇H₅₆	78 ±10	78 ±12	81 ±6	75 ±12
Masse totale			164 ±19	168 ±29	170 ±17	167 ±29
ALCOOLS extraits du pollen de bouleau						
Hexadécanol	39,0	C ₁₆ H ₃₄ O	1 ±1	1 ±1	1 ±1	1 ±1
Octadécanol	43,5	C ₁₈ H ₃₆ O	2 ±1	2 ±1	2 ±1	2 ±1
Eicosanol	47,5	C ₂₀ H ₄₂ O	12 ±1	12 ±1	14 ±1	14 ±2
Hénéicosanol	49,6	C ₂₁ H ₄₄ O	7 ±1	7 ±1	8 ±2	8 ±1
Docosanol	51,5	C ₂₂ H ₄₆ O	861 ±92	826 ±101	787 ±144	821 ±84
Tricosanol	53,3	C ₂₃ H ₄₈ O	21 ±4	22 ±4	21 ±3	19 ±2
Tétracosanol	55,1	C ₂₄ H ₅₀ O	103 ±18	99 ±9	115 ±13	86 ±25
Hexacosanol	58,8	C ₂₆ H ₅₄ O	27 ±3	26 ±2	27 ±4	25 ±2
Octacosanol	61,6	C ₂₈ H ₅₈ O	18 ±2	18 ±3	17 ±2	18 ±2
Masse totale			1052 ±123	1013 ±123	992 ±171	994 ±120
ALCÈNES						
Décène	27,5	C ₁₀ H ₂₀	4 ±1	4 ±1	2 ±1	1 ±1
Pentacosène	50,4	C ₂₅ H ₅₀	52 ±4	51 ±6	31 ±4	22 ±3
Heptacosène	54,2	C ₂₇ H ₅₄	824 ±73	817 ±70	560 ±81	316 ±53
Nonacosène	57,3	C ₂₉ H ₅₈	596 ±62	527 ±44	368 ±53	145 ±22
Hentriacontène	60,9	C ₃₁ H ₆₂	179 ±27	155 ±15	86 ±9	28 ±4
Masse totale			1655 ±167	1554 ±136	1047 ±148	512 ±83
ACIDES GRAS SATURÉS						
Acide Hexanoïque	13,0	C ₆ H ₁₄ O ₂	2 ±2	2 ±1	3 ±1	4 ±1
Acide Heptanoïque	16,3	C ₇ H ₁₆ O ₂	1 ±1	1 ±1	2 ±1	2 ±1
Acide Octanoïque	19,7	C ₈ H ₁₈ O ₂	2 ±1	3 ±1	3 ±1	3 ±1
Acide Nonanoïque	22,8	C ₉ H ₂₀ O ₂	13 ±2	15 ±1	118 ±14	148 ±19
Acide Dodécanoïque	31,5	C ₁₂ H ₂₆ O ₂	2 ±1	1 ±1	2 ±2	4 ±1
Acide Hexadécanoïque	41,4	C ₁₆ H ₃₄ O ₂	16 ±3	15 ±2	14 ±1	18 ±3
Acide Octadécanoïque	45,7	C ₁₈ H ₃₈ O ₂	13 ±2	20 ±2	36 ±9	58 ±6
Acide Eicosanoïque	49,8	C ₂₀ H ₄₂ O ₂	8 ±1	8 ±1	48 ±9	68 ±11
Acide Hénéicosanoïque	51,7	C ₂₁ H ₄₄ O ₂	3 ±1	2 ±1	7 ±1	10 ±1
Acide Docosanoïque	53,5	C ₂₂ H ₄₆ O ₂	238 ±25	228 ±16	268 ±19	254 ±20
Acide Tricosanoïque	55,3	C ₂₃ H ₄₈ O ₂	46 ±4	42 ±4	48 ±4	45 ±5
Acide Tétracosanoïque	57,0	C ₂₄ H ₅₀ O ₂	308 ±36	303 ±25	307 ±23	326 ±35
Acide Hexacosanoïque	58,8	C ₂₆ H ₅₄ O ₂	19 ±3	20 ±1	21 ±2	20 ±3
Masse totale			671 ±82	660 ±57	877 ±87	960 ±107
ALDÉHYDES						
Nonanal	14,1	C ₉ H ₁₈ O	14 ±2	21 ±3	139 ±25	181 ±32
Octadécanal	40,8	C ₁₈ H ₃₆ O	6 ±1	9 ±1	66 ±11	97 ±16
Eicosanal	45,3	C ₂₀ H ₄₀ O	4 ±1	7 ±1	71 ±11	97 ±18
Docosanal	49,6	C ₂₂ H ₄₄ O	6 ±1	5 ±1	28 ±3	38 ±6
Masse totale			30 ±5	42 ±6	304 ±50	413 ±72

Tableau 26 : Familles des espèces chimiques identifiées et quantifiées dans les lipides externes et internes du pollen de bouleau extraits par le dichlorométhane (Farah et al., 2021).

T _R GC/FID (min)	Masse (ng.mg ⁻¹ de pollen)			
	Formules brutes	Lipides externes Pollen intact	Lipides internes	Lipides totaux Pollen broyé
ALCÈNES				
Décène	27,5	C ₁₀ H ₂₀	4 ±1	- - 4 ±1
Pentacosène	50,4	C ₂₅ H ₅₀	52 ±4	13 ±8 65 ±8
Heptacosène	54,2	C ₂₇ H ₅₄	824 ±73	304 ±113 1128 ±113
Nonacosène	57,3	C ₂₉ H ₅₈	596 ±62	- - 622 ±87
Hentriacontène	60,9	C ₃₁ H ₆₂	179 ±27	- - 183 ±27
Masse totale			1655 ±167	317 ±121 2002 ±236
ALCOOLS				
Hexadécanol	39,0	C ₁₆ H ₃₄ O	1 ±1	1 ±1 2 ±1
Octadécanol	43,5	C ₁₈ H ₃₆ O	2 ±1	5 ±1 7 ±1
Eicosanol	47,5	C ₂₀ H ₄₂ O	12 ±1	2 ±2 10 ±2
Hénéicosanol	49,6	C ₂₁ H ₄₄ O	7 ±1	- - 7 ±1
Docosanol	51,5	C ₂₂ H ₄₆ O	861 ±92	- - 816 ±66
Tricosanol	53,3	C ₂₃ H ₄₈ O	21 ±4	1136 ±12 1157 ±12
Tétracosanol	55,1	C ₂₄ H ₅₀ O	103 ±18	- 102 ±11
Hexacosanol	58,8	C ₂₆ H ₅₄ O	27 ±3	3 ±3 24 ±3
Octacosanol	61,6	C ₂₈ H ₅₈ O	18 ±2	3 ±2 15 ±2
Masse totale			1052 ±123	1150 ±21 2140 ±99
ALCANES				
Hénéicosane	42,5	C ₂₁ H ₄₄	8 ±1	2 ±1 6 ±1
Tricosane	46,8	C ₂₃ H ₄₈	20 ±3	- - 21 ±3
Pentacosane	50,8	C ₂₅ H ₅₂	58 ±5	- - 59 ±8
Heptacosane	54,6	C ₂₇ H ₅₆	78 ±10	183 ±49 261 ±49
Masse totale			165 ±19	185 ±50 347 ±61
ALDÉHYDES				
Nonanal	14,1	C ₉ H ₁₈ O	14 ±2	5 ±2 9 ±1
Octadécanal	40,8	C ₁₈ H ₃₆ O	6 ±1	6 ±2 12 ±2
Eicosanal	45,3	C ₂₀ H ₄₀ O	4 ±1	- - - -
Docosanal	49,6	C ₂₂ H ₄₄ O	6 ±1	1 ±1 5 ±1
Masse totale			30 ±5	11 ±5 26 ±4
ACIDES GRAS SATURÉS				
Acide Hexanoïque	13,0	C ₆ H ₁₄ O ₂	2 ±1	- - 2 ±1
Acide Heptanoïque	16,3	C ₇ H ₁₆ O ₂	1 ±1	2 ±1 3 ±1
Acide Octanoïque	19,7	C ₈ H ₁₈ O ₂	2 ±1	10 ±2 12 ±2
Acide Nonanoïque	22,8	C ₉ H ₂₀ O ₂	13 ±2	5 ±3 18 ±3
Acide Dodécanoïque	31,5	C ₁₂ H ₂₆ O ₂	2 ±1	5 ±2 7 ±2
Acide Hexadécanoïque	41,4	C ₁₆ H ₃₄ O ₂	16 ±3	598 ±43 614 ±43
Acide Octadécanoïque	45,7	C ₁₈ H ₃₈ O ₂	13 ±2	26 ±11 39 ±11
Acide Eicosanoïque	49,8	C ₂₀ H ₄₂ O ₂	8 ±1	9 ±3 17 ±3
Acide Hénéicosanoïque	51,7	C ₂₁ H ₄₄ O ₂	3 ±1	2 ±1 5 ±1
Acide Docosanoïque	53,5	C ₂₂ H ₄₆ O ₂	238 ±25	54 ±43 292 ±43
Acide Tricosanoïque	53,5	C ₂₃ H ₄₈ O ₂	46 ±4	14 ±11 60 ±11
Acide Tétracosanoïque	57,0	C ₂₄ H ₅₀ O ₂	308 ±36	120 ±61 428 ±61
Acide Octacosanoïque	64,3	C ₂₆ H ₅₄ O ₂	19 ±3	- - 22 ±4
Masse totale			671 ±81	845 ±181 1519 ±186
ACIDES GRAS INSATURÉS				
Acide Linoléique	44,7	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	7 ±1	938 ±173 945 ±174
Acide α-Linolénique	45,0	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	12 ±2	685 ±117 697 ±117
Masse totale			19 ±3	1623 ±290 1642 ±291

2.2. Validation en laboratoire de la méthode de comptage du pollen

2.2.1. Choix de l'étalon interne

La solution étalon sert à vérifier le bon fonctionnement de l'appareil de mesure à savoir la CGP-SM. Le choix de l'étalon interne est déterminant pour la qualité de l'analyse. L'étalon interne doit être ajouté en quantité connue et fixe à chaque échantillon. Ainsi les variabilités dans la réponse de l'instrument ou dans les volumes pourront être corrigées. A cet effet, l'étalon interne doit présenter des propriétés représentatives des composés à analyser afin de fournir une réponse instrumentale proche de celle engendrée par l'analyte. Il doit avoir un temps de rétention différent des composés recherchés et être physico-chimiquement le plus proche possible de l'analyte avec des groupements fonctionnels identiques.

L'étalon qui correspond à ces critères dans notre cas est l'hexadécane $C_{16}H_{34}$, qui est un hydrocarbure saturé de la famille des alcanes. L'étalon est ajouté après l'extraction à une concentration de $0,1 \text{ mg.g}^{-1}$ (soit $0,05 \text{ mg.g}^{-1}$ dans l'extrait final) (**Figure 49**).



Figure 49 : Étapes de traitement d'un échantillon.

Les préparations étalons sont issues d'une solution mère (SM) de concentration en hexadécane $C = 1 \text{ mg.g}^{-1}$ diluée dix fois afin d'obtenir des solutions filles (SF) de concentration $C = 0,1 \text{ mg.g}^{-1}$. Pour évaluer la répétabilité de cette manipulation, les solutions filles des solutions mères SM1, SM2, SM3, SM4, SM5, SM6 et SM7 ont été préparées. L'opération a été effectuée six fois pendant six jours. Ensuite, différentes masses des solutions filles ont été placées dans la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en mode SIR (CGP-SM-SIR). La **Figure 50** représente la droite d'étalonnage finale de l'étalon. La fonction qui relie l'aire chromatographique à la concentration de la solution injectée en hexadécane est $Y=10^7 X - 191674$. La valeur absolue du coefficient de corrélation est de 0,97. Nous pouvons donc considérer que la CGP-SM est en bon fonctionnement.

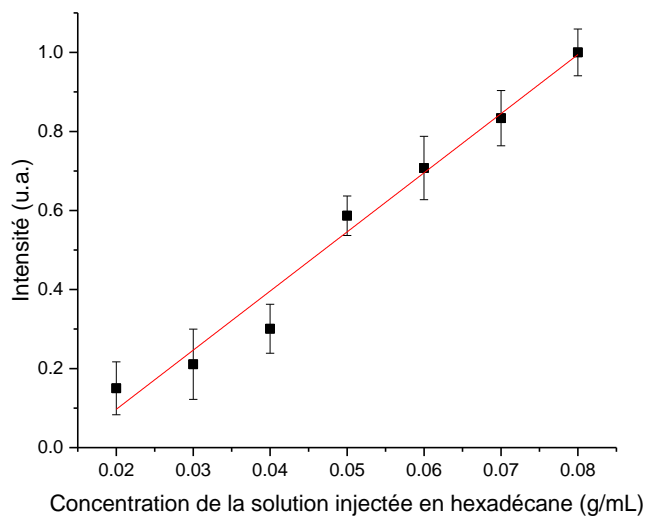


Figure 50 : Aire chromatographique en fonction de la concentration de la solution injectée en hexadécane (g/mL).

2.2.2. Poudre de dilution inerte à base de pollen de bouleau

Deux poudres de dilution à base de 10 % et 1,5 % pollen de bouleau sec (saison pollinique 2019) et de silice (SILICA GEL, HIGH PURITY, 60 Å) sont préparées. La masse finale de la poudre (pollens + silice) est de 2000 mg. L'homogénéisation est effectuée manuellement pendant quelques minutes jusqu' à obtenir une poudre homogène de couleur jaune (**Figure 51**). Cette poudre est préparée afin de nous permettre de mesurer des masses de pollen faibles (inférieur au mg) avec une meilleure précision. Les **Tableau 27** et **Tableau 28** représentent les différentes masses de la poudre pesées et la quantité de pollen présente dans chaque masse.



Figure 51 : Poudre de dilution à 1,5 % de pollen de bouleau intact à gauche (jaune clair) et celle à 10% de pollen à gauche (jaune foncé).

Tableau 27 : Répartition massique de pollen de bouleau dans la poudre de dilution à 1,5 % de pollen de bouleau.

Masse de la poudre (mg)	5	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Masse de pollen de bouleau dans la poudre (mg)	0,075	0,15	0,3	0,45	0,6	0,75	0,9	1,05	1,2	1,35	1,5

Tableau 28 : Répartition massique de pollen de bouleau dans la poudre de dilution à 10 % de pollen de bouleau.

Masse de la poudre (mg)	20	40	60	80	100
Masse de pollen de bouleau dans la poudre (mg)	2	4	6	8	10

2.2.3. Validation de la méthode de comptage du pollen en laboratoire

Cette étape constitue le cœur d'une validation analytique de la méthode de prélèvement et d'extraction employée. Il s'agit de vérifier que l'on détecte les composés chimiques visés pour la quantification des pollens de bouleau intact et broyé. En outre, nous voulons vérifier que le signal chromatographique est proportionnel à la quantité des grains de pollen présents dans la poudre extraite. Chaque opération est réalisée 4 fois pendant 4 jours afin d'évaluer l'incertitude liée à la méthode.

Les poudres de dilution du pollen sont pesées et déposées sur une surface plane en laboratoire. Les poudres sont ensuite aspirées et piégées sur une lingette puis sont soumises au protocole d'extraction des lipides du pollen. La **Figure 52** représente la courbe d'étalonnage des différentes masses des poudres de dilution préparées à partir de pollen de bouleau intact et rompu (saison pollinique 2019).

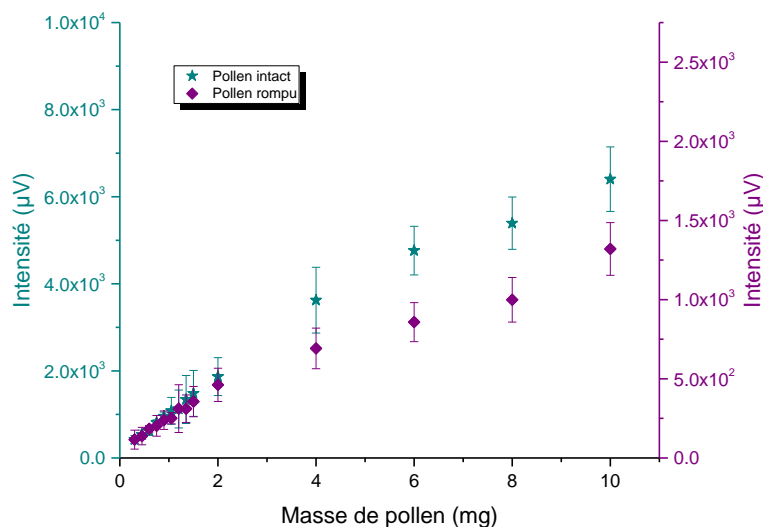


Figure 52 : Courbe d'étalonnage des différentes masses des poudres de dilution préparées à partir de pollen de bouleau intact (heptacosane) et rompu (acide α -linoléinique) (saison pollinique 2019).

Les pollens de bouleau rompus sont obtenus par un broyage artificiel du pollen en laboratoire (cf partie 2.1.6 de ce chapitre). Nous remarquons qu'il existe une relation linéaire entre l'intensité chromatographique et la quantité de pollen présente dans les échantillons avec un coefficient de corrélation r^2 supérieur à 0,95 pour les deux composés quantifiés (**Figure 52**). L'incertitude est de 21 % en moyenne.

A noter que le signal de l'acide α -linoléinique (marqueur de pollen de bouleau rompu) n'est détectable qu'après broyage du pollen, sinon l'intensité chromatographique pour ce composé est très faible quand il s'agit d'une extraction de pollen de bouleau intact (**Figure 53**). Donc, la détection de ce composé est bien dépendante de l'état du pollen présent dans l'échantillon.

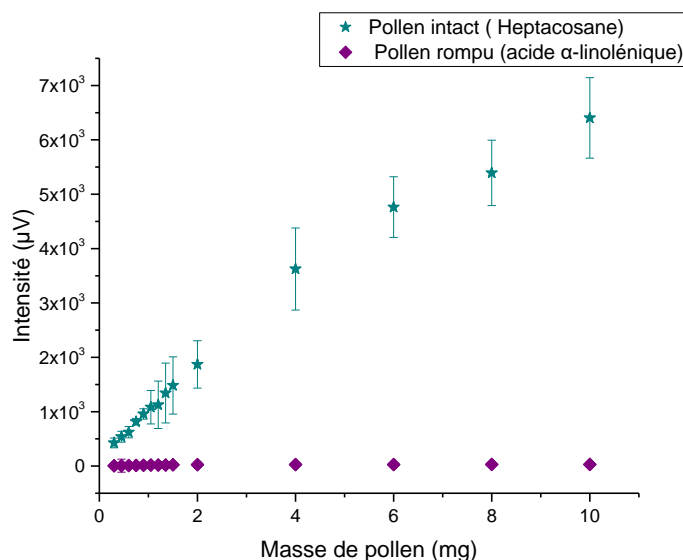


Figure 53 : Courbe d'étalonnage des différentes masses des poudres de dilution préparées à partir de pollen de bouleau intact (saison pollinique 2019).

2.2.4. Conclusion

Dans cette partie nous avons démontré la faisabilité d'un comptage des grains de pollen par une méthode chromatographique en utilisant des traceurs chimiques dont l'un est extrait uniquement si le solvant peut accéder au cytoplasme (marqueur rompu). La méthode doit donc permettre de compter à la fois le nombre de grains de pollen et leur pourcentage de rupture (ou plus exactement le pourcentage de pollen dont le cytoplasme est accessible par le solvant).

Une méthode de pesée utilisant une dilution de pollen par une poudre inerte a été mise en œuvre pour obtenir des masses de pollen faible (jusqu'à 150 µg) mais avec une bonne précision de pesée. Cette méthode a permis d'effectuer un étalonnage des marqueurs chimiques pour le pollen intact (heptacosane) et rompu (acide α -linoléinique). Après extraction par du dichlorométhane, l'analyse chromatographique montre une réponse proportionnelle pour les deux états du pollen (intact et rompu) pour des masses allant de 0,075 à 10 mg de pollen.

La méthode d'analyse CGP-SM-SIR permet une quantification du pollen présent dans l'échantillon selon son état (intact ou rompu). La plus petite masse de pollen quantifiable en CGP-SM-SIR est estimée à environ 0,075 mg de pollen de bouleau. Cette limite de quantification estimée correspond à environ 12 000 grains de pollen de bouleau en prenant une masse d'un grain égale à 6,25 ng. La limite de quantification de la méthode de comptage des grains est donc estimée à environ 1 GP.cm⁻² pour un échantillonnage (aspiration) sur une surface de 1 m² et d'environ 17 GP.cm⁻² pour un échantillonnage sur une surface équivalente à une feuille A4 (21 x 29,7cm).

La mise au point de la méthode a été effectuée à partir de pollen de bouleau collecté sur le campus de l'Université de Lille pendant la saison pollinique 2019. Il convient ensuite de vérifier que les traceurs chimiques choisis ont des concentrations massiques relativement constantes dans des échantillons de pollen de bouleau de différentes provenances.

3. ETUDE DE LA VARIABILITE DE LA FRACTION LIPIDIQUE DES GRAINS DE POLLEN DE BOULEAU ENTRE PLUSIEURS ARBRES ET SUR PLUSIEURS SAISONS POLLINIQUES

La méthode de détection des pollens par le dosage d'un traceur chimique requiert une certaine constance dans la fraction lipidique pollinique. C'est pourquoi nous avons cherché à quantifier la variabilité de la composition lipidique externe des grains de pollen de bouleau sur plusieurs années sur un même arbre mais également sur plusieurs arbres pour une même saison pollinique. La variabilité de la fraction lipidique interne n'a pas pu être effectuée en raison de la faible masse disponible pour la plupart des échantillons de pollen.

3.1. Récolte des pollens de bouleau

Nous avons mené l'étude sur deux groupes de grains de pollen de bouleau :

- le groupe A. Ce sont des pollens de bouleau récoltés sur le même arbre présent sur le campus de l'Université de Lille, Faculté Sciences et Technologies, à différentes années de pollinisation entre 2016 et 2020 (cf. chapitre III partie 2.1.1).
- le groupe B. Ce sont des pollens de bouleau récoltés en République Tchèque par le fournisseur Bonapol sur 9 localisations durant la saison pollinique de 2020 (cf. chapitre III partie 2.1.2).

3.2. Identification et quantification des lipides externes des pollens de différentes années et de différentes localisations

La méthode d'extraction des pollens de bouleau consiste à rincer une masse de 50 mg (pollen groupe A) ou 25 mg (pollen groupe B, disponibles en faible quantité) de pollen de bouleau, déposé sur du coton dans une pipette pasteur, par un volume de 5 mL de dichlorométhane (DCM). Le temps de contact entre le pollen et le solvant est de l'ordre de quelques minutes. Le solvant est ensuite évaporé sous flux d'azote jusqu'à l'obtention d'un résidu sec. Finalement, le résidu sec est solubilisé par 20 μ L de BSTFA (N, O-bis (triméthylsilyl) trifluoroacétamide) et de TMCS (triméthylchlorosilane) (98,5-1,5 %), 50 μ L de DCM et 30 μ L de la solution d'étalon d'injection de concentration 0,1 mg.g⁻¹ d'hexadécane (la préparation est détaillée dans la partie 2.2.1 de ce chapitre). L'analyse a été répétée au moins 3 fois pour chaque échantillon.

Dans cette partie, deux types de chromatographie sont utilisés :

- La chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (CGP-DIF) (Perkin Elmer Clarus 580) est utilisée pour faire la comparaison quantitative entre les profils lipidiques des pollens de bouleau.
- La chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CGP-SM) (Perkin Elmer Clarus 580) utilisée pour l'identification et la quantification des différents

composés extraits. Les conditions opératoires de la CGP-SM sont détaillées dans la partie 2.1.3 de ce chapitre.

À propos du détecteur DIF, les conditions de fonctionnement sont les suivantes : température de 300°C, débit d'hydrogène de 40 mL.min⁻¹ et celui de l'air de 400 mL.min⁻¹.

Quantification des composés

La quantification des composés organiques est faite par la méthode du nombre équivalent de carbone (ECN : Equivalent Carbon Number) (Scanlon and Willis, 1985). Cette méthode consiste à utiliser des coefficients de réponse d'alcane, corrigés d'un coefficient dépendant du nombre d'atomes de carbone et des fonctions organiques présentes dans la molécule. Cette méthode permet de faire l'économie de l'étalonnage de toutes les espèces organiques identifiées. Cette technique nécessite simplement un calibrage du détecteur à ionisation de flamme du chromatographe pour une série d'alcane. Dans cette thèse, nous avons utilisé un étalonnage des alcanes de 8 à 40 atomes de carbone dans des gammes de concentrations massiques de 6 à 36 µg.g⁻¹.

$$y(A_i) = \frac{ECN(alcane)}{ECN(A_i)} \times \frac{M(A_i)}{M(alcane)} \times \frac{Aire\ chromatographique(A_i)}{masse\ du\ pollen\ extraite} \times R_{alcane} \times 0,1$$

y(A_i) est la masse (µg.g⁻¹ de pollen) du composé organique A_i, ECN(alcane) est le nombre de carbone équivalent pour l'alcane linéaire avec le même nombre d'atomes de carbone, ECN(A_i) est le facteur de réponse corrigé qui dépend des fonctions organiques présente dans la molécule A_i, M est la masse moléculaire de A_i, la masse du pollen extraite est égale à 50 mg, R_{alcane} est le facteur de réponse déterminé pour chaque alcane (µg par unité d'aire chromatographique), et 0,1 correspond à la masse de la solution finale (en gramme).

En ce qui concerne les acides insaturés (α-linolénique et linoléique), leur concentration a été calculée à partir de droites d'étalonnages réalisées à partir de solutions diluées de ces deux composés.

3.3. Profils lipidiques des pollens de bouleau des deux groupes : A et B

Les chromatogrammes des **Figure 54** et **Figure 55** représentent les analyses en CGP-DIF des lipides externes extraits par le DCM des grains de pollen respectivement pour les groupes A et B. Les axes verticaux des chromatogrammes représentent les intensités des pics chromatographiques en µV et les axes horizontaux représentent les temps de rétention en minutes.

Ces chromatogrammes comportent environ deux cents pics ayant une intensité supérieure à 5x10⁵ µV entre les temps 10 et 85 min. Chaque pic sur le chromatogramme représente (au moins) un composé organique extrait de la fraction lipidique externe du pollen. Les pics des composés élués avant le temps de rétention de 10 min ne sont pas représentés sur les chromatogrammes (présence des pics du solvant, des impuretés du solvant et des résidus de la dérivatisation).

D'après les chromatogrammes de deux **Figure 54** et **Figure 55**, les extraits organiques des grains de pollen de bouleau récoltés sur plusieurs années et localisations présentent des profils lipidiques extractibles visuellement très semblables.

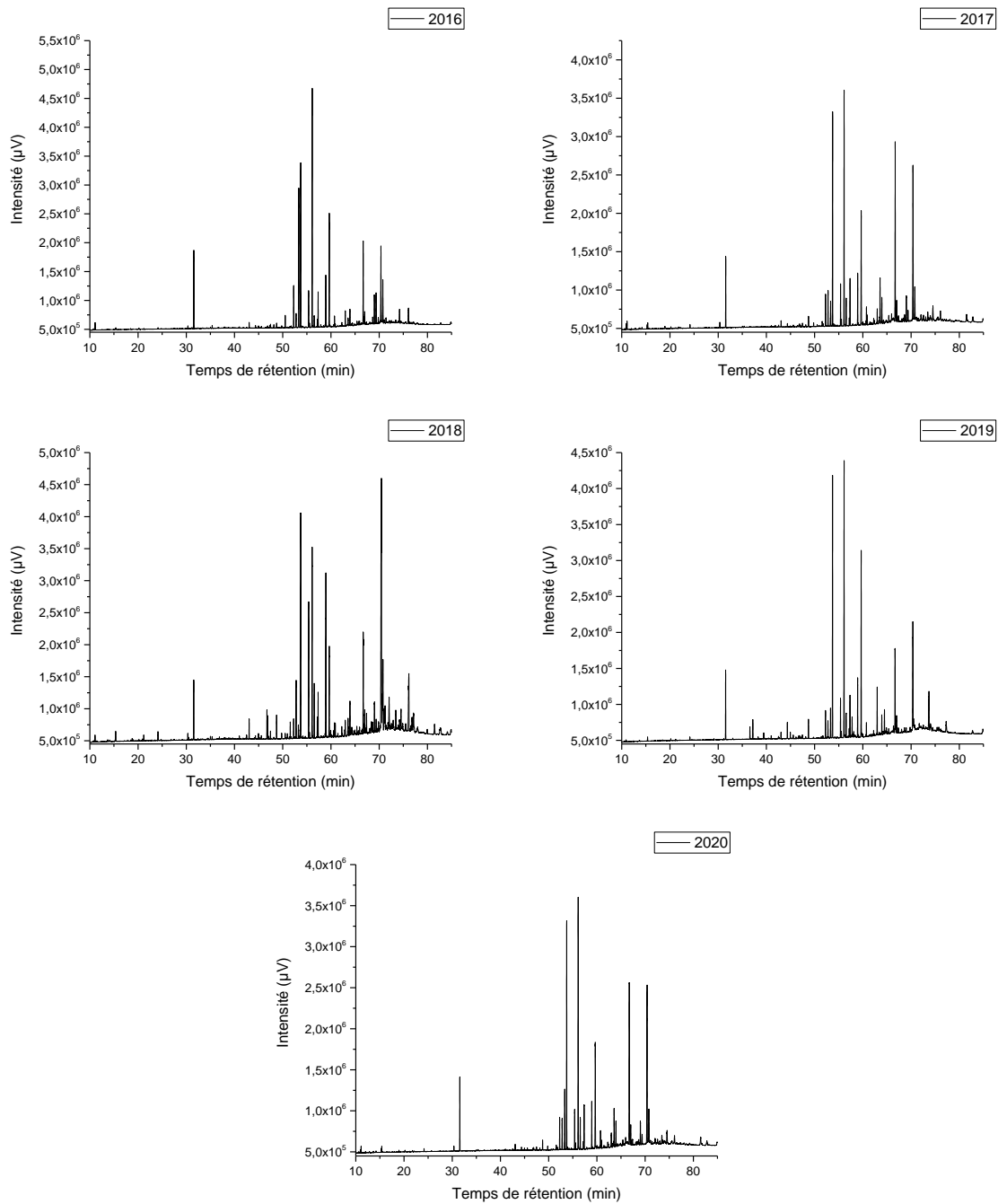
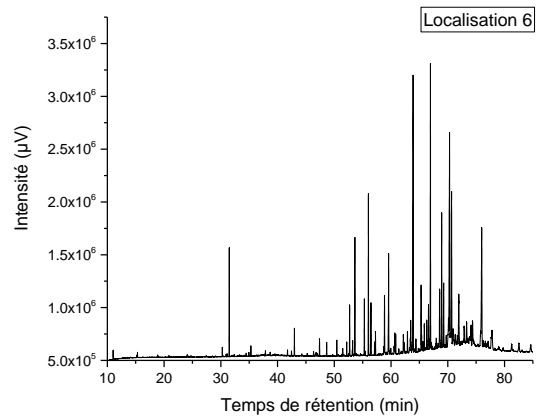
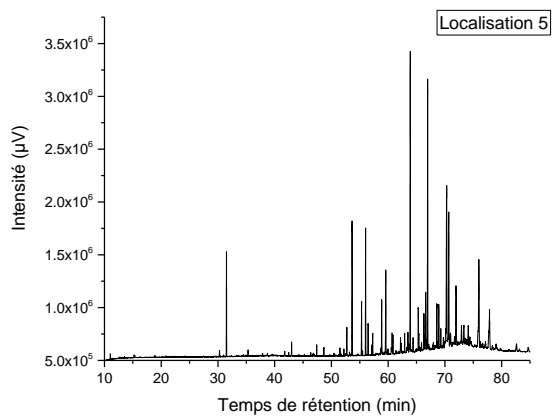
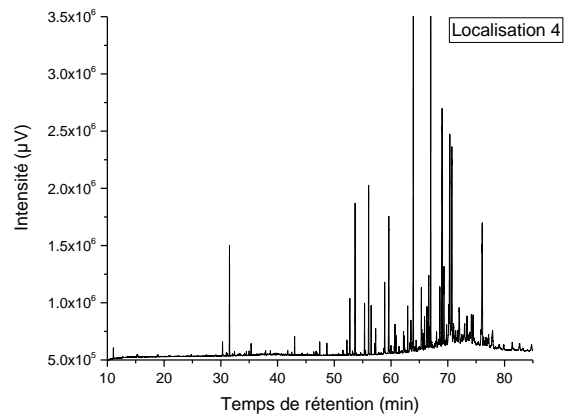
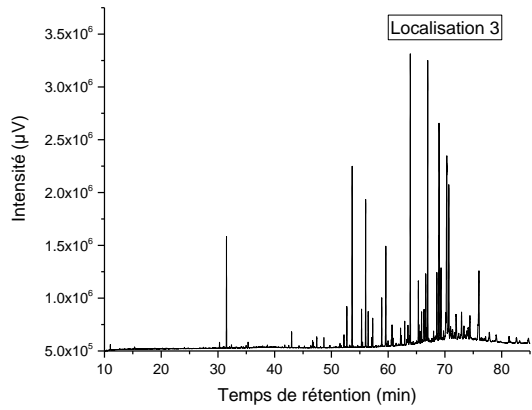
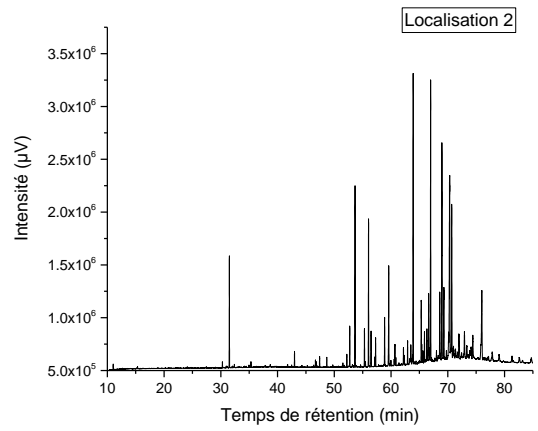
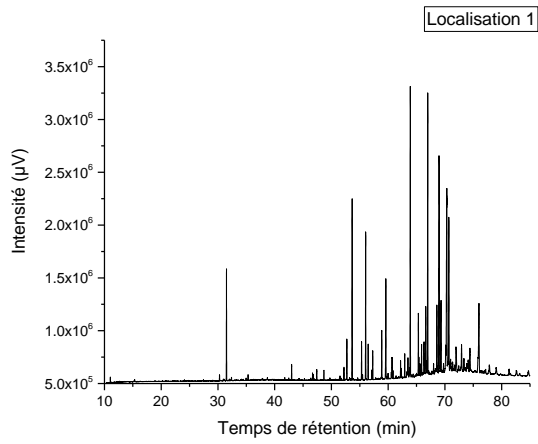


Figure 54 : Chromatogrammes (CGP-DIF) des lipides externes extraits du pollen de hêtre intact récoltés sur différentes saisons polliniques entre 2016 et 2020 sur le campus de l'Université de Lille (Villeneuve d'Ascq).



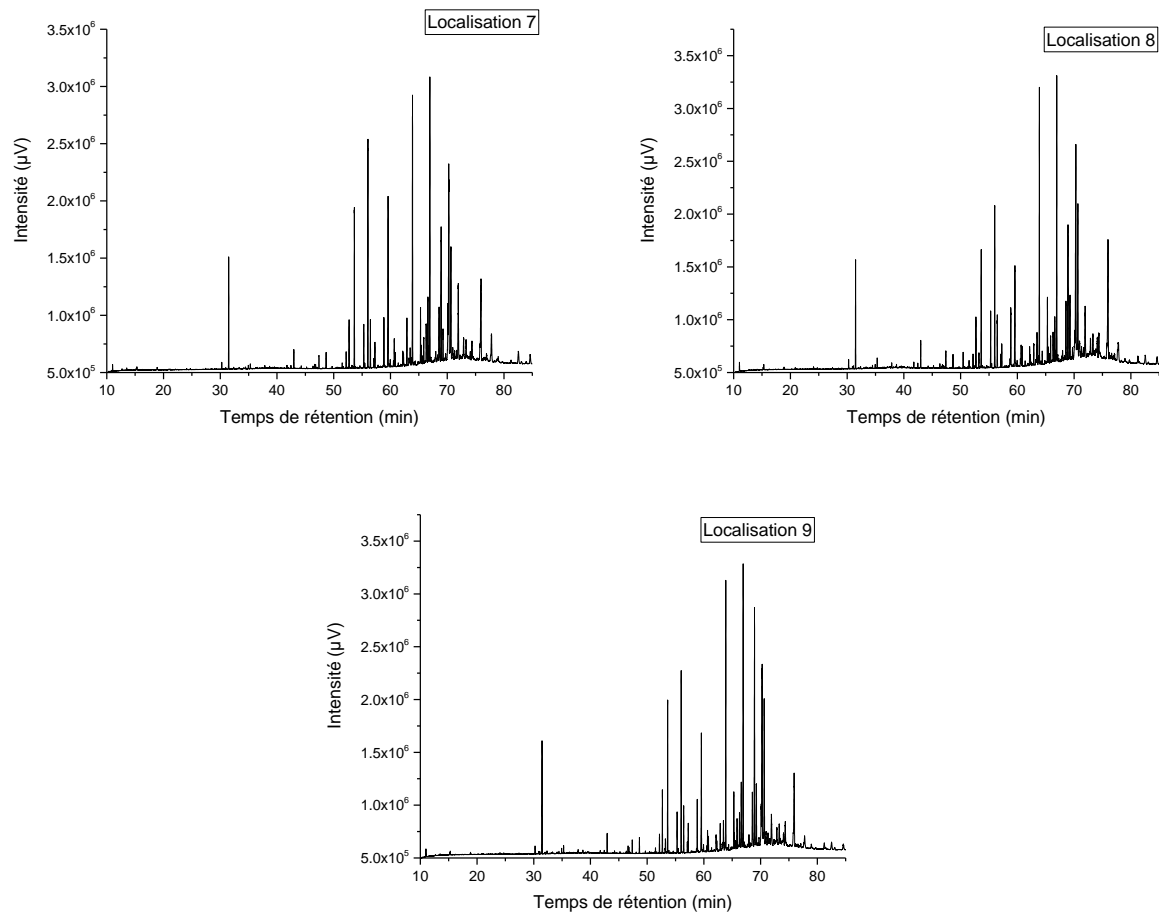


Figure 55 : Exemples de chromatogrammes (CGP-DIF) des lipides externes extraits du pollen de bouleau intact récoltés sur les sites 1 à 9 en République Tchèque lors de la saison pollinique 2020 (fournisseur Bonapoli). Les chromatogrammes non présentés sont similaires.

3.4. Identification et quantification des lipides externes

Afin de vérifier l'hypothèse que les quantités de traceurs polliniques sont indépendantes des saisons polliniques et de localisation de prélèvement, une identification des lipides a été faite par CGP-SM en se basant sur le travail préalable de la thèse de Jinane Farah (2018). La quantification des lipides a été faite par CGP-DIF.

3.4.1. Variabilité des lipides pour le groupe A (même arbre, différentes années)

Les pollens de bouleau du groupe A ont été collectés sur le même arbre de bouleau pendant cinq saisons polliniques successives. La **Figure 56** présente les concentrations massiques en $\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}$ des composés organiques quantifiés ainsi que les valeurs totales pour les six familles chimiques.

La fraction lipidique externe des différents pollens de bouleau du groupe A contient une masse importante d'alcènes (5 composés) et d'alcools (9 composés). En ce qui concerne les alcènes, l'identification est remarquable pour une série d'alcènes (5 composés) de nombre impair de carbone C23, C27, C29, et C31. Le C27 est l'alcène majoritairement extrait pour tous les pollens de ce groupe avec une masse moyenne de $973\pm 73 \text{ ng}\cdot\text{mg}^{-1}$. L'abondance de cet alcène a déjà été confirmée par d'autres études (Farah et al., 2021; Henricsson et al., 1996). Les masses totales des alcènes extraits de la fraction lipidique externe des pollens du groupe A sont 1510 ± 38 , 1423 ± 35 , 1475 ± 36 , 1614 ± 48 et $1662\pm 38 \text{ ng}\cdot\text{mg}^{-1}$ respectivement pour les années 2016, 2017, 2018, 2019 et 2020 (**Figure 56**). La masse totale moyenne pour l'ensemble de pollen de ce groupe est de $1537\pm 99 \text{ ng}\cdot\text{mg}^{-1}$. La différence relative entre les concentrations massiques totales des alcènes identifiés et quantifiés pour les pollens de ce groupe est de 6%.

En ce qui concerne les alcools, ils présentent des masses totales de 1049 ± 33 , 1055 ± 64 , 1040 ± 6 , 1052 ± 665 et $1031\pm 54 \text{ ng}\cdot\text{mg}^{-1}$ respectivement pour les saisons 2016, 2017, 2018, 2019 et 2020 (**Figure 56**). La différence relative entre l'ensemble des alcools quantifiés pour les pollens de ce groupe est de 1 %. La masse totale moyenne pour l'ensemble de pollen de ce groupe est de $1045\pm 10 \text{ ng}\cdot\text{mg}^{-1}$. L'abondance des alcools dans la fraction lipidique externe est due à la présence du C22 en quantité importante : $701\pm 18 \text{ ng}\cdot\text{mg}^{-1}$ (**Tableau 29**).

Les concentrations massiques moyennes des autres familles organiques identifiées pour tous les grains de pollen de ce groupe sont les suivantes : $767\pm 45 \text{ ng}\cdot\text{mg}^{-1}$ pour les acides gras saturés (13 composés), $138\pm 31 \text{ ng}\cdot\text{mg}^{-1}$ pour les alcanes (4 composés), $20\pm 3 \text{ ng}\cdot\text{mg}^{-1}$ pour les aldéhydes (4 composés) et $22\pm 7 \text{ ng}\cdot\text{mg}^{-1}$ pour les acides gras insaturés (2 composés). La différence relative entre l'ensemble de ces composés quantifiés pour les pollens de ce groupe est respectivement de 2 %, 9 %, 5 % et 15 %.

D'après ces résultats on peut constater que les différences observées sont faibles entre les récoltes successives de pollens sur un bouleau du campus universitaire de Villeneuve d'Ascq.

L'utilisation de la méthode de comptage des grains de pollen par CGP/SM nécessite un étalonnage avec un échantillon de pollen. Si nous nous intéressons donc en particulier au marqueur du pollen de bouleau intact, l'heptacosane, sa concentration est de 51 ± 8 , 69 ± 25 , 52 ± 10 , 79 ± 28 et $51\pm 32 \text{ ng}\cdot\text{mg}^{-1}$ respectivement pour les années 2016 à 2020 avec une moyenne de $60\pm 13 \text{ ng}\cdot\text{mg}^{-1}$. Il existe un écart de presque $30 \text{ ng}\cdot\text{mg}^{-1}$ entre la valeur la plus basse et celle la plus élevée. La variabilité interannuelle sur

un même arbre de la fraction lipidique en heptacosane peut entraîner au maximum une erreur systématique d'un facteur 2 lors du décompte des grains avec notre méthode chromatographique.

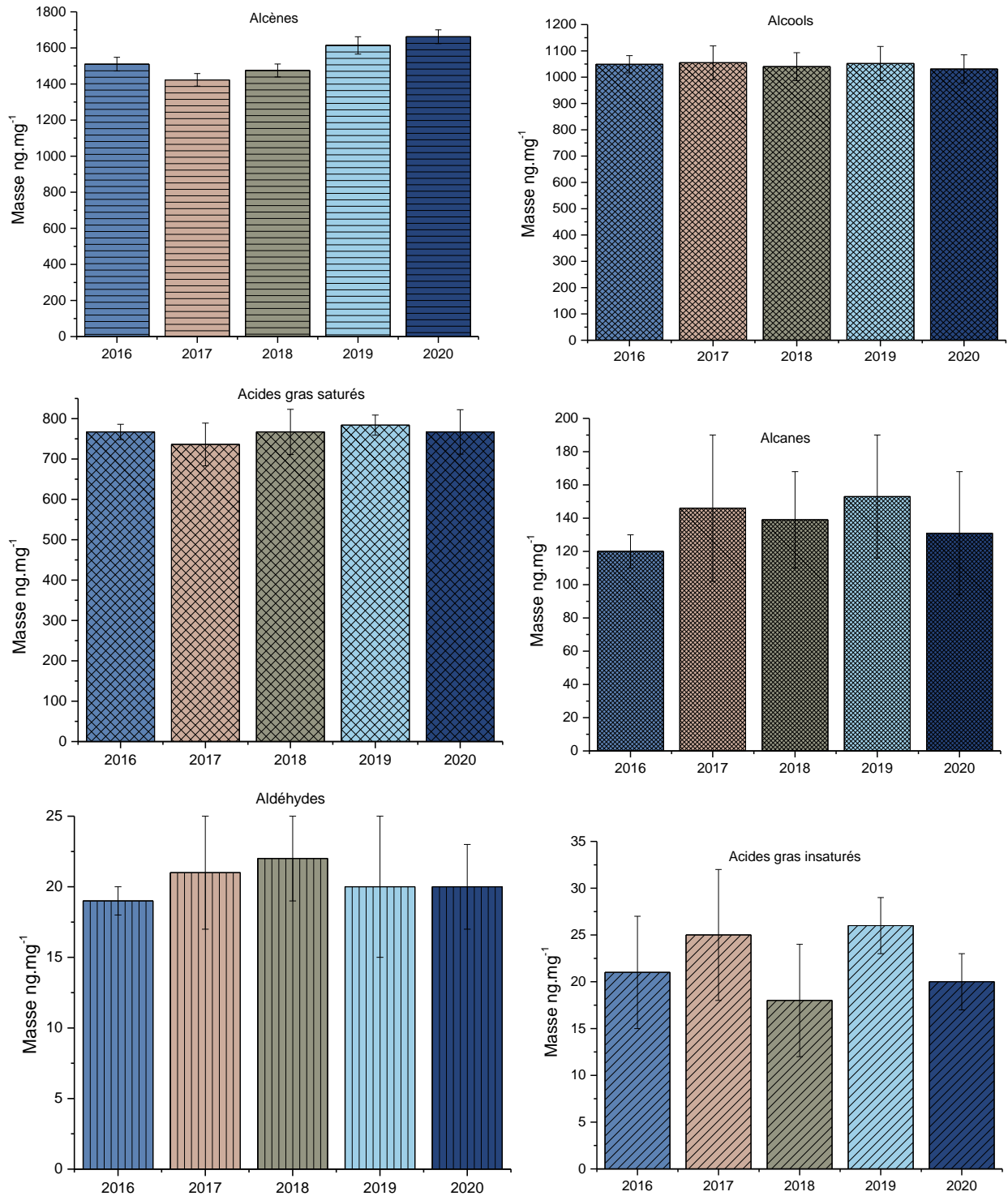


Figure 56 : Concentrations massiques en ng.mg^{-1} des cinq familles organiques identifiées dans les lipides externes extraits par le dichlorométhane du pollen de bouleau récoltés en différentes années sur le même arbre sur le campus de l'Université de Lille (groupe A).

Tableau 29 : Concentrations massiques des espèces organiques identifiées et quantifiées après extraction par le dichlorométhane des pollens de bouleau récoltés en différentes années sur le même arbre sur le campus de l'Université de Lille (groupe A).

ANNÉE DE POLLINISATION	T _R GC/FID (min)	Masse (ng.mg ⁻¹ de pollen)		2016	2017	2018	2019	2020
		Formules brutes	Pollen intact					
ALCÈNES								
Décène	45,9	C ₂₃ H ₄₆	10±1	10±1	8±1	9±1	9±1	9±1
Pentacosène	50,4	C ₂₅ H ₅₀	102±29	117±2	97±5	105±4	114±3	114±3
Heptacosène	54,2	C ₂₇ H ₅₄	905±1	905±1	954±2	1028±2	1071±3	1071±3
Nonacosène	57,3	C ₂₉ H ₅₈	437±6	333±17	363±15	415±29	412±28	412±28
Hentriacontène	60,9	C ₃₁ H ₆₂	56±1	58±2	53±21	57±12	57±6	57±6
Masse totale			1510±38	1423±35	1475±36	1614±48	1662±38	1662±38
ALCOOLS								
Hexadécanol	41	C ₁₆ H ₃₄ O	53±2	43±2	46±2	46±1	56±1	56±1
Octadécanol	45,5	C ₁₈ H ₃₆ O	41±1	55±1	49±1	46±1	44±1	44±1
Eicosanol	47,5	C ₂₀ H ₄₂ O	5±1	5±2	7±1	7±2	8±3	8±3
Hénéicosanol	49,6	C ₂₁ H ₄₄ O	4±1	7±2	8±1	8±2	9±5	9±5
Docosanol	51,5	C ₂₂ H ₄₆ O	709±5	716±21	696±21	713±16	673±20	673±20
Tricosanol	53,3	C ₂₃ H ₄₈ O	12±17	15±20	15±16	14±22	13±24	13±24
Tétracosanol	57,3	C ₂₄ H ₅₀ O	157±3	147±5	146±14	151±4	154±4	154±4
Hexacosanol	60,8	C ₂₆ H ₅₄ O	42±2	41±4	44±5	41±1	46±3	46±3
Octacosanol	63,6	C ₂₈ H ₅₈ O	27±2	26±4	28±1	26±2	28±1	28±1
Masse totale			1049±33	1055±64	1040±53	1052±65	1031±54	1031±54
ACIDES GRAS SATURÉS								
A hexanoïque	15,2	C ₆ H ₁₄ O ₂	1±1	1±1	1±1	1±1	1±1	1±1
A heptanoïque	18,8	C ₇ H ₁₆ O ₂	1±1	1±1	1±1	1±1	1±1	1±1
A octanoïque	22,1	C ₈ H ₁₈ O ₂	2±1	2±2	2±2	2±1	2±1	2±1
A nonanoïque	24,8	C ₉ H ₂₀ O ₂	6±1	5±1	6±2	5±1	7±2	7±2
A dodécanoïque	34,5	C ₁₂ H ₂₆ O ₂	2±1	1±1	2±1	1±1	3±1	3±1
A hexadécanoïque	43	C ₁₆ H ₃₄ O ₂	39±2	38±3	37±4	38±2	37±1	37±1
A octadécanoïque	47,4	C ₁₈ H ₃₈ O ₂	16±1	12±3	18±1	16±1	15±1	15±1
A eicosanoïque	51,7	C ₂₀ H ₄₂ O ₂	14±1	18±1	13±1	11±1	14±1	14±1
A hénéicosanoïque	53,5	C ₂₁ H ₄₄ O ₂	9±1	9±2	10±1	12±2	11±1	11±1
A docosanoïque	55,3	C ₂₂ H ₄₆ O ₂	311±1	296±8	319±8	288±8	322±9	322±9
A tricosanoïque	56,5	C ₂₃ H ₄₈ O ₂	60±1	58±22	54±20	73±5	61±3	61±3
A tétracosanoïque	58,9	C ₂₄ H ₅₀ O ₂	306±7	283±13	291±16	308±3	298±38	298±38
A hexacosanoïque	66,7	C ₂₆ H ₅₄ O ₂	14±2	13±4	13±2	12±5	14±3	14±3
Masse totale			781±19	736±53	767±56	767±25	784±55	784±55
ACIDES GRAS INSATURÉS								
A linoléique	46,7	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	6±2	7±4	5±7	7±2	6±1	6±1
A α-linolénique	47,5	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	15±4	17±3	13±8	20±1	14±2	14±2
Masse totale			21±1	25±1	18±2	26±1	20±1	20±1
ALCANES								
Hénéicosane	44,3	C ₂₁ H ₄₄	7±1	7±2	7±1	7±2	7±1	7±1
Tricosane	48,7	C ₂₃ H ₄₈	16±1	23±6	21±3	17±3	24±1	24±1
Pentacosane	52,7	C ₂₅ H ₅₂	47±1	47±11	60±15	51±28	50±32	50±32
Heptacosane	56,1	C ₂₇ H ₅₆	51±8	69±25	52±10	79±28	51±32	51±32
Masse totale			120±10	146±44	139±29	153±37	131±37	131±37
ALDEHYDES								
Nonanal	16,3	C ₉ H ₁₈ O	9±1	10±1	11±1	10±2	11±1	11±1
Octadécanal	42,5	C ₁₈ H ₃₆ O	4±1	5±2	6±1	5±1	4±1	4±1
Eicosanal	47	C ₂₀ H ₄₀ O	2±1	2±1	3±1	2±1	1±1	1±1
Docosanal	51,7	C ₂₂ H ₄₄ O	4±1	3±1	2±1	4±2	4±1	4±1
Masse totale			19±1	21±4	22±3	20±5	20±3	20±3

3.4.2. Variabilité des lipides pour le groupe B (même année, localisations différentes)

Les pollens de bouleau de ce groupe sont collectés dans 9 localisations différentes. Le lot 1 et le lot 9 sont collectés en zone urbaine. Les autres sont collectés en zone rurale et/ou en pleine forêt.

La **Figure 57** présente les concentrations massiques en ng.mg^{-1} des cinq familles organiques identifiées dans les lipides externes extraits par le dichlorométhane pour les pollens du groupe B. Les chiffres sont plus détaillés dans le **Tableau 30**.

La fraction lipidique externe de ces pollens contient une concentration massique importante d'alcènes. La concentration massique moyenne des alcènes pour tous les pollens de ce groupe est de $1304 \pm 83 \text{ ng.mg}^{-1}$. L'identification est remarquable pour une série d'alcènes (5 composés) de nombre impair de carbone C23, C27, C29, et C31. Le C27 est aussi l'alcène majoritairement extrait avec une masse moyenne de $822 \pm 58 \text{ ng.mg}^{-1}$ pour tous les pollens de bouleau de ce groupe (Farah et al., 2021; Henricsson et al., 1996). La différence entre l'ensemble des alcènes identifiés et quantifiés pour les pollens de ce groupe est de 6 %.

Les lipides externes de bouleau contiennent aussi deux autres familles majoritaires qui sont les acides gras et les alcools. Les acides gras présentent une masse moyenne de $767 \pm 33 \text{ ng.mg}^{-1}$ et celles des alcools est de $783 \pm 39 \text{ ng.mg}^{-1}$ pour l'ensemble des grains de pollen de ce groupe B. La différence entre l'ensemble de ces deux composés identifiés et quantifiés pour les pollens de ce groupe est respectivement de 4 % et de 5 %.

En ce qui concerne les alcools, leur abondance dans la fraction lipidique externe est due à la présence du C22 en quantité importante de $498 \pm 25 \text{ ng.mg}^{-1}$.

Les trois dernières familles sont présentes en quantités plus faibles (alcanes, aldéhydes et acides gras insaturés). Au total 4 alcanes, 4 aldéhydes et 2 acides gras insaturés sont identifiés dans la fraction lipidique externe des pollens de bouleau étudiés. La concentration massique moyenne des alcanes est de $137 \pm 15 \text{ ng.mg}^{-1}$. En ce qui concerne les aldéhydes, ils présentent une concentration massique moyenne de $19 \pm 2 \text{ ng.mg}^{-1}$ et pour les acides gras insaturés cette concentration est de $21 \pm 4 \text{ ng.mg}^{-1}$. La différence entre l'ensemble de ces composés identifiés et quantifiés pour les pollens de ce groupe est de 11 %, 9 % et 17 % respectivement pour les alcanes, aldéhydes et les acides gras.

D'après les analyses de ces résultats, on constate que les différences entre les concentrations massiques des différentes familles sont faibles entre les pollens de bouleau récoltés sur 9 différentes localisations en 2020.

En ce qui concerne l'heptacosane (marqueur du pollen intact), sa concentration est pour les localisations 1 à 9 respectivement de 54 ± 5 , 52 ± 3 , 49 ± 4 , 53 ± 2 , 48 ± 5 , 47 ± 6 , 50 ± 16 , 48 ± 5 , $53 \pm 20 \text{ ng.mg}^{-1}$, avec une moyenne de $51 \pm 4 \text{ ng.mg}^{-1}$. La variabilité de l'heptacosane sur une même année et des localisations différentes dans une même région (groupe B) semble moins importante que la variation interannuelle sur un même arbre (groupe A) (**Tableau 31**). Il est possible que les conditions météorologiques jouent un rôle dans la variabilité de la fraction lipidique pollinique.

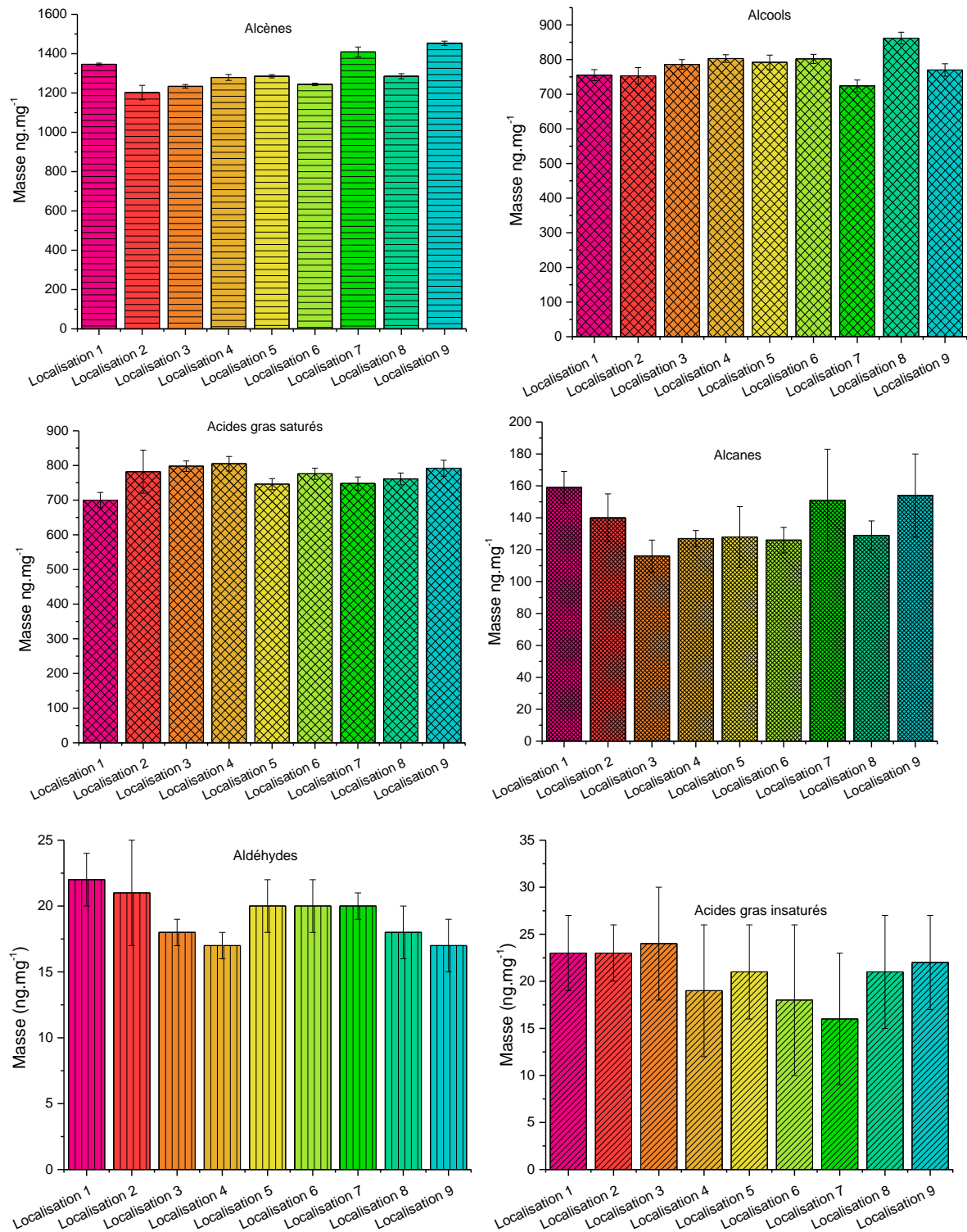


Figure 57 : Concentrations massiques en ng.mg⁻¹ des cinq familles organiques identifiées dans les lipides externes extraits par le dichlorométhane du pollen de bouleau récolté sur 9 différentes localisations en République Tchèque en 2020 (groupe B).

Tableau 30 : Concentrations massiques des espèces organiques identifiées et quantifiées après extraction par le dichlorométhane du pollen de bouleau récolté sur 9 différentes localisations en 2020 (groupe B).

T _R GC/FID (min)	Masse (ng.mg ⁻¹ de pollen)										
	Formules brutes		Intact								
LOCALISATION	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
ANNÉE DE POLLINISATION	2020										
ALCÈNES											
Décène	45,9	C ₁₀ H ₁₈	13±1	10±1	8±1	9±1	8±1	10±1	13±1	11±1	12±1
Pentacosène	50,4	C ₂₅ H ₅₀	144±1	116±2	120±1	125±11	131±1	124±1	138±2	126±1	128±2
Heptacosène	54,2	C ₂₇ H ₅₄	871±3	792±24	787±4	786±1	788±4	775±3	842±1	803±1	952±1
Nonacosène	57,3	C ₂₉ H ₅₈	258±2	227±7	263±4	298±3	296±2	279±2	343±20	267±10	288±5
Hentriacontène	60,9	C ₃₁ H ₆₂	61±1	57±1	56±1	61±1	61±1	57±1	73±2	78±1	73±2
Masse totale			1346±6	1202±37	1234±9	1279±15	1285±8	1244±6	1409±25	1285±13	1453±11
ALCOOLS											
Hexadécanol	39	C ₁₆ H ₃₄ O	34±1	44±1	44±1	41±1	40±1	44±2	34±1	41±2	35±1
Octadécanol	43,5	C ₁₈ H ₃₆ O	39±1	44±1	43±1	44±1	44±2	42±2	40±2	41±1	40±1
Eicosanol	47,5	C ₂₀ H ₄₂ O	4±1	8±1	7±1	9±1	10±1	7±1	3±3	6±2	4±1
Hénéicosanol	49,6	C ₂₁ H ₄₄ O	8±1	9±1	7±1	8±1	12±2	8±2	8±1	11±1	9±1
Docosanol	51,5	C ₂₂ H ₄₆ O	516±6	505±7	491±4	508±3	466±2	510±3	461±6	539±6	483±4
Tricosanol	53,3	C ₂₃ H ₄₈ O	18±5	19±5	19±8	14±1	17±5	16±6	12±2	19±7	24±6
Tétracosanol	55,1	C ₂₄ H ₅₀ O	110±2	95±4	132±1	117±5	132±11	124±1	117±1	125±1	115±3
Hexacosanol	58,8	C ₂₆ H ₅₄ O	15±1	20±3	24±1	29±2	43±3	29±1	25±4	42±3	47±1
Octacosanol	61,6	C ₂₈ H ₅₈ O	10±1	9±2	20±1	32±1	28±3	23±1	25±3	40±3	13±3
Masse totale			755±16	753±23	786±15	803±12	792±24	802±13	724±18	862±19	770±18
ACIDES GRAS SATURÉS											
A hexanoïque	13	C ₆ H ₁₂ O ₂	1±1	2±1	1±1	2±1	1±1	1±1	2±1	2±1	2±3
A heptanoïque	16,3	C ₇ H ₁₄ O ₂	2±2	3±2	2±1	2±1	2±1	2±2	1±2	1±2	1±2
A octanoïque	19,7	C ₈ H ₁₆ O ₂	1±1	2±1	1±4	2±2	2±2	2±3	1±1	2±1	1±3
A nonanoïque	22,8	C ₉ H ₁₈ O ₂	5±2	6±2	5±3	6±1	5±3	4±1	5±1	6±1	7±1
A dodécanoïque	31,5	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	4±1	3±1	2±2	3±2	3±2	9±2	3±2	5±1	4±0
A hexadécanoïque	41,4	C ₁₆ H ₃₄ O ₂	34±4	33±3	29±1	32±4	28±1	35±4	28±4	39±1	34±4
A octadécanoïque	45,4	C ₁₈ H ₃₈ O ₂	16±1	18±6	20±2	22±5	20±5	20±5	16±2	22±5	17±5
A eicosanoïque	49,6	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	9±2	6±1	10±5	13±2	10±2	10±1	10±3	11±1	9±1
A hénéicosanoïque	51,7	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	6±1	6±2	6±1	6±1	7±3	6±2	6±2	6±2	6±2
A docosanoïque	53,5	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	239±2	286±9	330±2	316±6	287±	266±5	301±5	285±1	307±3
A tricosanoïque	54,9	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	58±3	79±6	63±3	79±1	59±6	98±2	79±2	97±5	90±5
A tétracosanoïque	57	C ₂₄ H ₅₀ O ₂	309±4	323±8	321±4	316±2	316±5	315±2	290±6	270±2	299±2
A hexacosanoïque	64,3	C ₂₆ H ₅₄ O ₂	15±9	17±31	8±2	8±6	8±1	7±1	8±3	16±3	15±4
Masse totale			700±21	784±62	800±15	808±21	747±16	776±17	750±19	762±17	792±23
ACIDES GRAS INSATURÉS											
A linoléique	46,7	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	8±1	9±8	8±1	5±4	6±1	2±1	4±2	4±1	8±4
A α-linolénique	47,5	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	15±7	14±10	16±6	14±6	15±9	15±7	12±5	17±13	14±29
Masse totale			23±4	23±2	24±4	19±4	21±5	18±4	16±2	21±9	22±4
ALCANES											
Hénéicosane	42,5	C ₂₁ H ₄₄	5±1	4±1	3±1	4±1	3±1	3±0	5±1	3±1	6±1
Tricosane	46,8	C ₂₃ H ₄₈	25±1	23±4	18±2	20±1	22±8	21±1	26±1	24±1	28±1
Pentacosane	50,8	C ₂₅ H ₅₂	75±4	61±8	46±4	50±2	55±4	55±2	70±5	55±2	67±4
Heptacosane	54,6	C ₂₇ H ₅₆	54±5	52±3	49±4	53±2	48±5	47±6	50±16	48±5	53±20
Masse totale			159±10	140±15	116±10	126±5	129±19	126±8	151±23	130±9	154±26
ALDEHYDES											
Nonanal	14,1	C ₉ H ₁₈ O	9±1	8±1	6±1	6±1	7±1	7±1	9±1	6±1	7±1
Octadécanal	40,8	C ₁₈ H ₃₆ O	5±1	6±1	5±1	4±1	4±1	5±1	5±1	6±1	5±1
Eicosanal	45,3	C ₂₀ H ₄₀ O	3±1	2±2	3±1	4±1	5±1	4±1	3±1	3±1	2±1
Docosanal	49,8	C ₂₂ H ₄₄ O	4±1	5±1	3±1	2±1	4±1	4±1	3±1	3±1	3±1
Masse totale			21±2	21±4	18±1	17±1	20±2	20±2	20±1	18±2	17±2

Tableau 31 : Récapitulatif des concentrations massiques en ng.mg^{-1} des espèces organiques identifiées et quantifiées après extraction par le dichlorométhane du pollen de bouleau des deux groupes A et B.

Famille chimique	Masse (ng.mg^{-1} de pollen)	
	Pollen du groupe A (Univ. Lille)	Pollen du groupe B (Croatie et Tchéquie)
Alcènes (C27)	1535±99 (973±73)	1304±83 (822±58)
Alcools (C22)	1045±10 (701±18)	783±39 (498±25)
Acides gras saturés	767±45	767±33
Alcanes (C27)	138±31 (60±13)	137±15 (51±4)
Aldéhydes	20±3	19±2
Acides gras insaturés	22±7	21±4

3.5. Conclusion

A notre connaissance, il s'agit de la première étude de la littérature qui permet d'estimer la variabilité du profil lipidique de grains de pollen de bouleau sur plusieurs saisons polliniques pour un même arbre et entre plusieurs arbres pour une même saison pollinique. Le but de cette étude était de vérifier que la composition lipidique des différents pollens de bouleau est indépendante de la localisation et de la période pollinisation.

Tous les pollens de bouleau étudiés (groupe A et B) contiennent les mêmes six familles de composés chimiques : les alcanes, les alcènes, les acides gras saturés et insaturés, les aldéhydes et les alcools. Au total 37 composés organiques sont identifiés dans les lipides externes des différents pollens de bouleau quels que soient l'année ou le lieu de collecte.

Ces lipides identifiés se trouvent dans la fraction lipidique externe de la matrice extracellulaire (revêtement pollinique) du pollen de bouleau. Ils présentent un rôle crucial dans les interactions pollen-stigmate au cours de la pollinisation (cf. chapitre I partie 1.2) (Wolters-Arts et al., 1998). De plus, la localisation de ces lipides à la surface du pollen de bouleau leur permet de jouer un rôle actif dans les nombreuses facettes de la réponse immunitaire au pollen. Selon Bashir et al. (2013), le pollen est une source de lipides bioactifs qui pourraient jouer un rôle important dans la provocation de l'hyperréactivité immunitaire (Bashir et al., 2013a).

Dans cette étude, nous avons constaté que tous les pollens de bouleau étudiés sont riches en alcènes, en alcools et en acides gras saturés. Les pollens récoltés à Lille présentent une masse plus importante en alcools ($1045\pm 86 \text{ ng.mg}^{-1}$) que les pollens prélevés en Croatie et Tchéquie ($789\pm 39 \text{ ng.mg}^{-1}$) avec une différence de 35 % entre les deux groupes. Le composé le plus abondant parmi les alcools est le C22 pour les deux groupes de pollens A ($701\pm 18 \text{ ng.mg}^{-1}$) et B ($498\pm 25 \text{ ng.mg}^{-1}$).

En outre, les deux groupes de pollens ont montré la présence importante des alcènes C23, C27, C29, et C31 et le C27 qui représentent la masse la plus abondante parmi tous les alcènes. La fraction lipidique externe de tous les pollens de bouleau étudiés semble être plus riche en acide gras saturés qu'en acides gras insaturés. Les acides gras les plus abondants sont les C22 et C24 pour les deux groupes de pollen

étudiés. La masse totale des composés identifiés dans les deux groupes A et B est respectivement de $3530 \pm 107 \text{ ng.mg}^{-1}$ et de $3032 \pm 83 \text{ ng.mg}^{-1}$ avec une différence de 10 %.

L'heptacosane (composé choisi comme marqueur du pollen de bouleau intact) est un composé stable avec une moyenne de $60 \pm 13 \text{ ng.mg}^{-1}$ pour le groupe A (même arbre, différentes années) et $51 \pm 4 \text{ ng.mg}^{-1}$ pour les pollens du groupe B (même année, localisations différentes). Une légère variation (de 14 %) de la masse d'heptacosane est observée entre les deux groupes de pollen étudiés.

Cette comparaison nous a permis de supposer que les pollens de bouleau récoltés sur plusieurs localisations et périodes polliniques possèdent des espèces chimiques similaires, à des concentrations massiques relativement similaires. Ce qui nous permet de supposer dans un premier temps que la composition chimique des pollens de bouleau est indépendante de la période pollinique et la de localisation du prélèvement, qu'elle soit urbaine, rurale ou forestière. Ainsi, l'étalonnage du CGP-SM pour la détection des pollens par traceurs lipidiques peut être faite avec un seul échantillon de pollen et les résultats pourront être extrapolés au pollen provenant d'arbres différents. Toutefois, pour plus de précision, il sera utile d'utiliser pour l'étalonnage du CGP-SM du pollen de la même saison pollinique et de la même région géographique que les prélèvements de pollen dans l'environnement.

4. MILIEU EXTERIEUR : COMPTAGE DES POLLENS SEDIMENTES SOUS DES BOULEAUX

4.1. Site d'échantillonnage

Le site d'échantillonnage est le campus de l'Université de Lille, Faculté des Sciences et Technologies. Six bouleaux ont été choisis pour la campagne de prélèvements. Ces derniers sont répartis en deux zones sur le campus de l'Université : zone 1 et zone 2 (**Figure 58**, **Figure 59**, **Figure 60**). Les 6 arbres sont nommés A, B, C, D, E et F. Les coordonnées GPS et le site de chaque arbre sont présentés dans le **Tableau 32**. La **Figure 61** représente des images photographiques et satellites des arbres choisis pour la campagne de prélèvement.



Figure 58 : Vue globale du site de prélèvement. Les points rouges représentent les 6 sites des bouleaux sélectionnés pour la campagne de prélèvement en 2021 (Google maps).



Figure 59 : Vue globale de la zone 1 de prélèvements. Les points rouges représentent les deux boulevards sélectionnés dans cette zone (Google maps).



Figure 60 : Vue globale de la zone 2 de prélèvements. Les points rouges représentent les 4 boulevards sélectionnés dans cette zone (Google maps).

Tableau 32 : Coordonnées GPS et l'endroit de prélèvement pour les 6 arbres.

Arbres	Coordonnées GPS	Entourage de l'arbre
A	50°36'33.9"N 3°08'40.0"E	Route passante
B	50°36'32.9"N 3°08'07.3"E	Parking proche route avec circulation
C	50°36'37.1"N 3°08'38.5"E	Parking
D	50°36'33.8"N 3°08'43.1"E	Route passante
E	50°36'38.3"N 3°08'39.5"E	Parking proche route avec circulation
F	50°36'38.0"N 3°08'14.3"E	Route avec circulation

A



B



C



D



E



F

Figure 61 : Six arbres choisis pour la campagne d'échantillonnage. Photographiques à gauche et images satellites à droite pour chaque arbre. Les zones de prélèvement sont repérées par une croix rouge sur les images satellites (Google maps).

4.2. Méthode d'échantillonnage

La campagne d'échantillonnage a été effectuée en 2021, durant la saison pollinique du bouleau, sous 6 bouleaux présents sur le campus de l'Université de Lille. Les prélèvements ont été réalisés tous les jours avant, pendant et après la saison pollinique de mi-mars jusqu'à début mi-mai à l'aide aspirateur à main (cf partie 2.1.1 de ce chapitre).

La plage horaire des prélèvements était entre 14h00 et 16h30. Sur l'ensemble de la campagne d'échantillonnage, 300 échantillons journaliers ont été collectés, auxquels s'ajoutent 2 blancs de terrain. Ces blancs correspondent à des échantillons prélevés avant et après la saison pollinique.

Ces blancs ont été prélevés les 25 mars et 13 mai pour les échantillons prélevés sous les arbres et les 28 mars et 13 mai pour les échantillons prélevés en milieu intérieur (ces deux jours sont marqués par une absence de pollen dans l'air et sous les arbres de bouleau). La surface de prélèvement correspond à une feuille A4 (0,06 m²) et le prélèvement journalier a été effectué systématiquement au même endroit du sol (autrement dit la zone de prélèvement est donc nettoyée du pollen sédimenté chaque jour). Les prélèvements sont réalisés à une distance de 1 à 3 m du tronc, sur le sol (trottoir ou route). Les zones de prélèvements sont marquées d'une croix rouge sur la **Figure 61**. Des prélèvements supplémentaires ont été réalisés pour deux bouleaux (B et C) à une distance de 4 m du tronc (croix bleues).

Tableau 33 : Caractéristiques des bouleaux choisis pour la campagne de prélèvements de pollen sur le sol.

Arbres	Endroit de prélèvement	Distance de prélèvements par rapport au tronc de l'arbre (m)	Circonférence de l'arbre (cm)	Hauteur des arbres (m)	Diamètre de la couronne (m)
A	Trottoir	2	102	14	7
B	Parking	1 et 4	85	10	6
C	Parking	1,3 et 4	118	13	9
D	Trottoir	1	120	10	8
E	Parking	2,5	165	13	9
F	Trottoir	3	98	13	8

Chaque arbre présente un environnement spécifique. Les arbres B, C et E se trouvent sur un parking très fréquenté par les personnels et les étudiants de l'Université de Lille. Les 3 autres sont proches d'un bord de route et leur pollen tombe sur un trottoir fréquenté par des piétons. Les arbres A, B, D, E et F se trouvent dans une zone dégagée (pas de bâtiment de plus d'un étage), contrairement à l'arbre C qui se trouve entre deux grands bâtiments de 4 étages (**Figure 61**). Les arbres s'élèvent entre 10 à 14 m de hauteur. La circonférence du tronc des arbres est mesurée à 1,3 m de hauteur à l'aide d'un mètre ruban; elle varie entre 85 et 165 cm (**Tableau 33**). Le diamètre de la couronne est calculé par une moyenne de deux diamètres perpendiculaires. La mesure de ce diamètre dépend de chaque arbre (**Figure 62**).

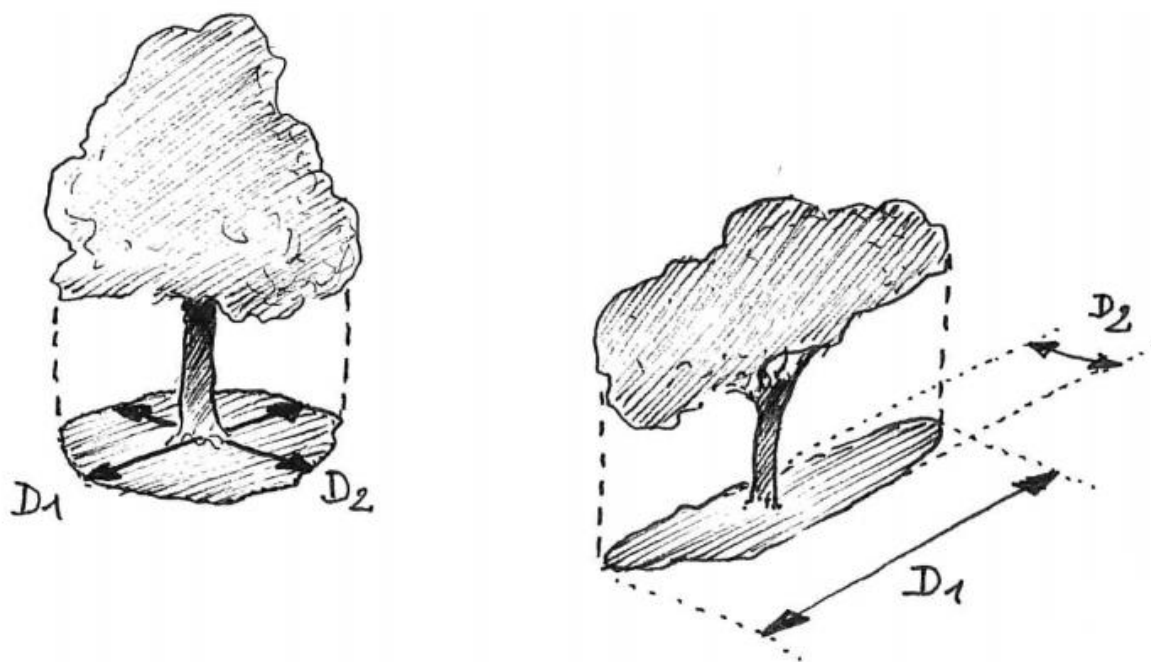


Figure 62 : Représentation schématique de la méthode de calcul du diamètre de la couronne des arbres (Freytet, 2020).

La méthode d'échantillonnage consiste à prélever les grains de pollen par un aspirateur à main (NVB, 5.4Wh, 3.6V BLACK+DECKER Dustbuster®). L'analyse des lingettes est faite par chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (CGP-SM) en mode SIR (cf. partie 2.1 de ce chapitre).

Pour cette étude, l'étalonnage du CGP-SM a été effectué avec lot de pollen récolté en 2019 sur le campus de l'Université de Lille. Les pollens comptés sous les arbres de bouleau ont été comparés avec la concentration de pollen dans l'air ambiant. Ces données sont fournies par le Réseau National de Surveillance Aérobiologique (RNSA). En 2020, en raison de la situation pandémique, le RNSA a recueilli les données polliniques avec le capteur Hirst du LASIRE (

Figure 63) installé à une hauteur de 20 m sur le toit d'un bâtiment présent sur le campus de l'Université de Lille. En 2021, les données polliniques sont recueillies par le capteur Hirst de l'Association pour la Prévention de la Pollution Atmosphérique (APPA) installé sur le toit du CHU de Lille à 24 m de hauteur. Les résultats journaliers sont exprimés en grains de pollen/m³ d'air.



Figure 63 : Capteur volumétrique Hirst (Lanzoni, VPPS 2000) sur le toit-terrasse d'un bâtiment du campus Cité Scientifique à Villeneuve d'Ascq. Image photographique à gauche et image satellite à droite (la croix indique la localisation du capteur sur le toit). Les coordonnées GPS de la localisation du capteur sont 50°36'40.5"N 3°08'25.6"E (Google maps).

5. MILIEU INTERIEUR : PRELEVEMENTS DE LA POUSSIERE DOMESTIQUE

5.1. Site d'échantillonnage

Les prélèvements en milieu intérieur sont effectués dans 3 habitations sur Lille. Ces habitations sont réparties dans 3 villes : Villeneuve d'Ascq, Willems et Estaires (**Figure 64**). La **Figure 65** présente les lieux d'habitation choisis (étoiles jaunes) et les arbres de bouleau à proximité (étoiles orange). La distance entre les lieux de prélèvement et le capteur est présentée dans le **Tableau 34**.

Tableau 34 : Distance entre le capteur Hirst et les trois habitations étudiées.

Habitations	Ville	Distance entre le lieu de prélèvement et le capteur
1	Villeneuve d'Ascq	7 km
2	Willems	14 km
3	Estaires	23 km



Figure 64 : Vue satellite des trois sites de prélèvements (Google maps).



Habitation 3



Figure 65 : Images satellites des habitations marquées par une étoile jaune (Google maps). Les arbres de bouleau à proximité sont repérés par des étoiles oranges.

Les localisations de prélèvement sont indiquées dans le **Tableau 35**. Le **Tableau 36** présente tous les facteurs susceptibles d'influencer les résultats tels que : l'environnement du site de prélèvement, la présence d'animaux domestiques, le nombre de personnes, le temps d'aération, la présence ou l'absence des plantes à l'intérieur de l'appartement, le temps d'aération et le nombre de bouleaux à proximité. .

Tableau 35 : Localisations des prélèvements dans chaque appartement

Habitations	Localisation de prélèvement
1	Sous une fenêtre rarement ouverte
2	Salle à manger au rez-de-chaussée face au jardin
3	Près de la baie vitrée coulissante à l'arrière de la maison (vers le jardin)

Tableau 36 : Facteurs susceptibles d'influencer les prélèvements.

Habitations	Environnement	Présence d'un animal	Nombre d'occupants	Plantes en milieu intérieur	Temps d'aération moyenne (min)	Nombre de bouleaux à proximité (20 à 450 m)
1	Urbain	Non	1	Non	20 min	9
2	Rural	Oui (chat)	2	<i>Schlumbergera</i>	10 min	8
3	Rural	Non	4	<i>Areca</i> <i>Spathiphyllum</i>	60 min	12

L'habitation 1 est occupée par une personne avec des visiteurs variables en fonction des jours. La deuxième présente un niveau d'occupation de deux personnes en moyenne (une personne est présente en permanence et deux personnes supplémentaires une semaine sur deux) avec un chat présent continuellement (le nombre moyen de personnes (2) est indiqué dans le **Tableau 36**. En ce qui concerne la troisième habitation, 4 personnes (2 adultes et 2 adolescents) y logent tout au long de l'année. A noter qu'une des personnes occupant la deuxième habitation est allergique au pollen de bouleau, ce qui explique le faible temps d'aération. Nous notons l'absence de plante de décoration dans l'habitation 1. Par contre, une plante d'intérieur fleurissant à Noël dans l'habitation 2 et deux plantes de décoration sont présentes dans l'habitation 3. Le **Tableau 37** présente les différentes caractéristiques des plantes présentes dans les habitations 2 et 3.

Tableau 37 : Différentes caractéristiques des Trois plantes de décoration présentent dans les habitations 2 et 3.

Habitation	plante	Usage	Type	Floraison	Type de pollinisation
2	<i>Schlumbergera</i>	Décoration	Cactus	Novembre à janvier	Entomophile (ornithophile : colibris)
3	<i>Areca</i>	Décoration	Palmier	Juin à août	Entomophile
	<i>Spathiphyllum</i>	Décoration	Fleur	Mai à octobre	Entomophile

Les floraisons des plantes d'intérieur se situent donc en dehors de la période de pollinisation du bouleau de mars-avril.

Des prélèvements supplémentaires ont été effectués dans l'habitation 1 sur la vitre de la fenêtre. Deux fenêtres sont présentes dans cet appartement : les vitres 1 et 2 (**Figure 66**). Les prélèvements ont été réalisés sur une surface de 0,5 m² de la vitre 1 (indiqué en bleu haché sur la figure ci-dessous).

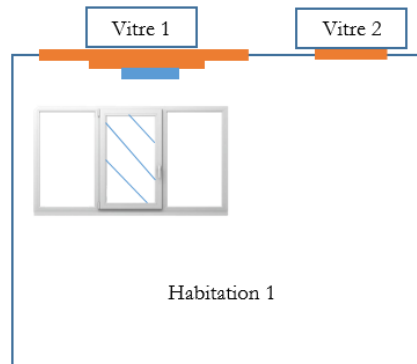


Figure 66 : Localisation des vitres dans l'habitation 1.

5.2. Méthode d'échantillonnage

La campagne de prélèvement en milieu intérieur a été effectuée en même temps que la campagne en milieu extérieur. La même procédure de prélèvement est employée qu'en milieu extérieur (cf. partie 2.1.1 de ce chapitre) mais avec une surface de prélèvement plus importante afin de s'adapter aux faibles concentrations attendues en milieu intérieur (1 m² pour le milieu intérieur alors que le prélèvement est effectué sur une surface A4 (0,06 m²) dans le milieu extérieur). En raison de la fréquence d'échantillonnage qui peut être dérangement, les habitations choisies appartiennent à des collègues. Ces prélèvements ont été réalisés par les habitants eux-mêmes avant de faire le ménage. Les prélèvements ont été faits durant toute la saison pollinique de bouleaux 2020 et 2021. La fréquence de prélèvement était d'un prélèvement par semaine en 2020 puis en 2021 elle est passée à un prélèvement toutes les 48 heures. Le **Tableau 38** représente une comparaison des conditions de prélèvement entre l'année 2020 et l'année 2021 pour les échantillons prélevés en milieu extérieur et en milieu intérieur.

Tableau 38 : Comparaison des conditions de prélèvement entre l'année 2020 et l'année 2021.

Année de prélèvement		Milieu intérieur		Milieu extérieur	
		2020	2021	2020	2021
Conditions de prélèvement	<i>Fréquence</i>	1 fois par semaine	Toutes les 48h	1 fois par jour (sur un seul arbre)	Tous les jours de la saison pollinique (1 fois par jour sous les 6 arbres)

6. VERIFICATION DE L'ETAT DES POLLENS

Les lingettes contenant les pollens sont séchées après extraction par le dichlorométhane (DCM). Ensuite, les pollens sur les lingettes sont tamisés à l'aide d'un tamis de 38 μm de diamètre. Puis, les pollens sont déposés sur un support conducteur (scotch de carbone). Après, l'ensemble est métallisé au chrome (épaisseur de 30 \AA) pour éviter les effets de charge. Afin d'obtenir des images topographiques qui permettent d'identifier l'état des pollens (intact, rompu), les images sont acquises à l'aide d'un détecteur d'électrons secondaires (SE) à une tension d'accélération de 5 kV. Il avait été vérifié durant la thèse de Jinane Farah que l'extraction du pollen de bouleau au dichlorométhane n'engendre pas de rupture.

Plusieurs échantillons de chaque arbre sont choisis pour être observés par le MEB. L'objectif principal est de vérifier l'état du pollen de bouleau (intact, rompu) dans les échantillons analysés en chromatographie.

7. ANALYSES STATISTIQUES

Les analyses statistiques ont été réalisées pour étudier les corrélations entre les différents paramètres étudiés. Elles sont effectuées à l'aide du logiciel R (pour Windows version 3.6.1). Les données ont été soumises à une analyse de corrélation linéaire en calculant le coefficient de corrélation r de Pearson qui permet de calculer la dépendance entre deux variables quantitatives. Si deux variables X et Y sont parfaitement dépendantes, alors $r_p = 1$ ou $r_p = -1$. Les deux variables sont parfaitement indépendantes pour $r_p = 0$. Plus le coefficient corrélation r de Pearson est proche de 1, plus la relation linéaire positive entre les variables est forte, plus le coefficient est proche de -1, plus la relation linéaire négative entre les variables est forte et plus le coefficient est proche de 0, plus la relation linéaire entre les variables est faible.

8. RESULTATS DES COMPTAGES DE POLLEN

8.1. Evaluation du nombre et de l'état des grains de pollen prélevés en milieu extérieur

8.1.1. Estimation de la quantité de pollen (intact et rompu) sédimentée sous les arbres

Afin de compter les grains de pollen dans nos échantillons, l'heptacosane, traceur de la fraction lipidique (externe et interne) de pollen de bouleau, est identifiée et quantifiée dans tous nos échantillons (cf. partie 2.1.4 de ce chapitre). Les masses de grains de pollen présentées dans ce chapitre sont toutes calculées à partir de l'analyse des traces d'heptacosane dans les poussières prélevées au sol. Seules les concentrations atmosphériques ont été obtenues par comptage des grains de pollen en microscopie optique.

La **Figure 67** présente la quantité de pollens dans les poussières prélevées au sol sous les six bouleaux étudiés durant toute la période de prélèvement en 2021 (les résultats préliminaires obtenus en 2020 ne concernent qu'un seul arbre et ne sont pas présentés dans ce manuscrit). Les quantités de grains de pollens sédimentés diffèrent d'un arbre à l'autre. Elles varient énormément en fonction de l'arbre et des jours de prélèvement (**Figure 68**). De plus, la quantité maximale de pollen sédimentée en 24 heures ne survient pas forcément au même moment de la saison pollinique pour les six bouleaux étudiés. Pour l'arbre D, la quantité maximale est enregistrée le 4 avril, cette date est retardée de 5 jours (9 avril) pour les arbres A, B, C et F et de 6 jours (10 avril) pour l'arbre E. La saison pollinique 2021 a présenté un profil atypique (**Figure 69**), en raison des conditions météorologiques particulières (froid et neige la semaine du 5 avril 2021), avec des pics de concentrations atmosphériques de pollen de bouleau le 30 mars et les 21 et 28 avril.

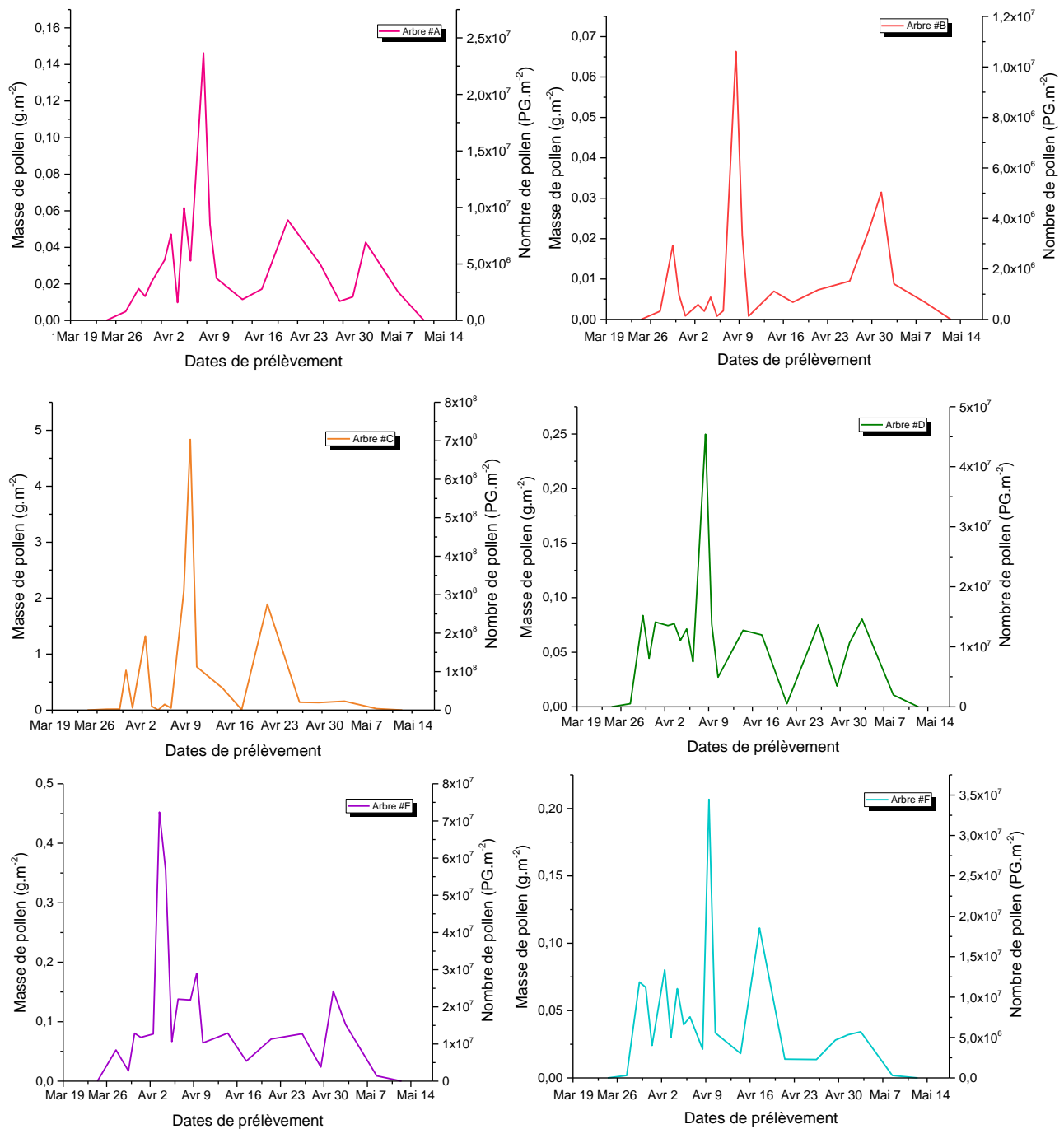


Figure 67 : Quantité de pollen sédimentée sous les six arbres de bouleau durant la saison pollinique 2021. Masse et nombre de grains de pollens obtenus par la méthode de dosage de l'heptacosane en CGP-SM.

La **Figure 68** présente le cumul journalier des grains de pollen (en g.m^{-2} et en GP.m^{-2}) sédimentés sous les six bouleaux étudiés. Pour rappel, les prélèvements sont effectués tous les jours à un endroit strictement identique sous chaque arbre, ce qui permet de compter les pollens se déposant sur cette surface en 24 heures. Nous remarquons que la quantité de pollen cumulée par m^2 varie énormément

d'un arbre à l'autre de $0,2 \pm 0,04 \text{ g.m}^{-2}$ à presque $12,9 \pm 2,6 \text{ g.m}^{-2}$ avec une moyenne de $3 \pm 0,6 \text{ g.m}^{-2}$. Si l'on retire des données l'arbre C (plus grande valeur de déposition), la moyenne passe à $1 \pm 0,2 \text{ g.m}^{-2}$.

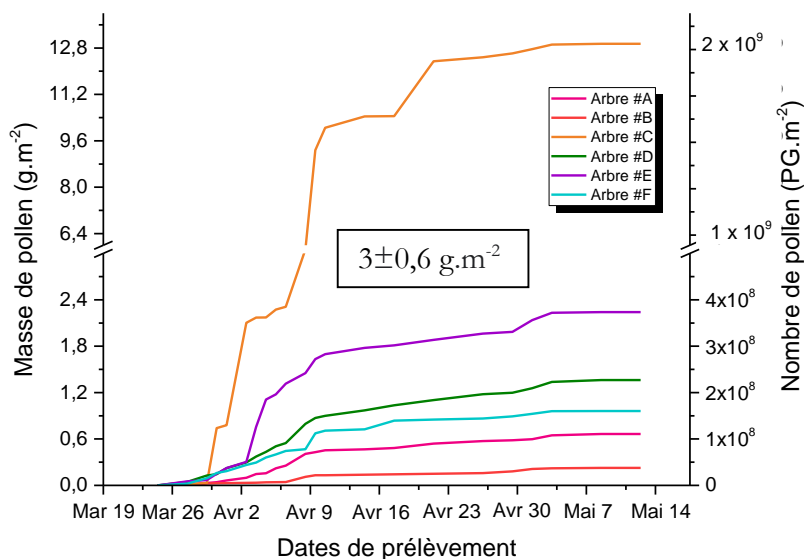


Figure 68 : Cumul de la quantité journalière de grains de pollen sédimentée sous les 6 bouleaux (g.m^{-2} et en GP.m^{-2}).

La quantité la plus élevée de pollen cumulée est trouvée sous l'arbre C ($12,9 \pm 2,6 \text{ g.m}^{-2}$). Cet arbre est considéré comme exceptionnel dans cette étude par rapport aux autres arbres. La grande quantité de pollen trouvée sous cet arbre peut être expliquée par l'environnement immédiat de ce dernier. En effet, cet arbre est entouré par des bâtiments (cf. partie 4.1 de ce chapitre). Ces bâtiments agissent comme des obstacles offrant probablement une moindre exposition de l'arbre aux vents. Les autres arbres se trouvent dans des zones plus dégagées et pour la majorité de ces arbres, les bâtiments proches ne dépassent pas un étage (cf. partie 4.1 de ce chapitre).

En l'absence de vent, le pollen tombe rapidement au sol, avec une vitesse de sédimentation de l'ordre de 2 à 5 cm par seconde pour les grains de taille moyenne (20 à 40 μm) (Di-Giovanni and Kevan, 1991). Le moindre souffle d'air cause une remise en suspension du pollen (Tourin et al., 1969a, 1969b). Nous pouvons considérer que la vitesse d'une faible brise est de l'ordre de quelques mètres par seconde. Les effets thermiques par convection (l'air chaud est plus léger que l'air froid qui s'élève) et les turbulences causées par des obstacles (arbres, bâtiments, etc.) constituent les principaux phénomènes qui causent le brassage de l'air et la dispersion des particules. Ces mouvements entraînent une dispersion des pollens dans la couche d'air proche du sol.

L'arbre C présente la plus grande quantité de pollen sédimentée au sol ($12,9 \pm 2,6 \text{ g.m}^{-2}$). Il se situe entre des bâtiments. Lorsque le courant d'air qui transporte le pollen est dévié par un obstacle, le pollen a tendance à précipiter sur le sol. Ce phénomène est observé principalement en forêt, environnement qui exerce un considérable effet de filtration. D'une part, l'absence de vent favorise la sédimentation du pollen au sol et, d'autre part, un vent fort favorise la collision du pollen au sol ou sur les surfaces

végétales (feuilles, tronc...). Un arbre disperse d'autant plus facilement son pollen quand les obstacles sont moins nombreux (Clot, 2007).

Les quantités de pollen sédimentées sous l'arbre dépendent de divers facteurs tels que le nombre de grains de pollen produit par l'arbre, l'environnement proche de l'arbre et des facteurs météorologiques locaux : pluie, humidité relative, vitesse et direction du vent.

8.1.2. Comparaison entre la quantité de pollen sédimentée sous et à 4 m de l'arbre

Après avoir donné des estimations de la quantité de pollen sédimentée sous les arbres, nous nous intéressons à savoir si cette dernière change en s'éloignant de l'arbre. Effectivement, le pollen tombe sous l'arbre sous l'effet de la gravité terrestre (sédimentation). Aussi, avant de se déposer sur le sol, le pollen a tendance à se disperser plus ou moins loin de la source. Par ailleurs, il est susceptible d'être soulevé à nouveau par des bourrasques ou des mouvements d'air convectifs locaux, c'est ce que nous appelons la remise en suspension (resuspension). Ce phénomène cause une dispersion des pollens tout autour de l'arbre et, quand le vent est fort, la quantité de pollen transportée a tendance à augmenter.

Afin d'étudier la quantité de pollen dispersée loin de l'arbre, des prélèvements à 4 m de distance de l'arbre ont été effectués pour les arbres B et C. La **Figure 69** présente une comparaison entre la quantité de pollen trouvée directement sous la ramure et à 4 m des arbres B et C.

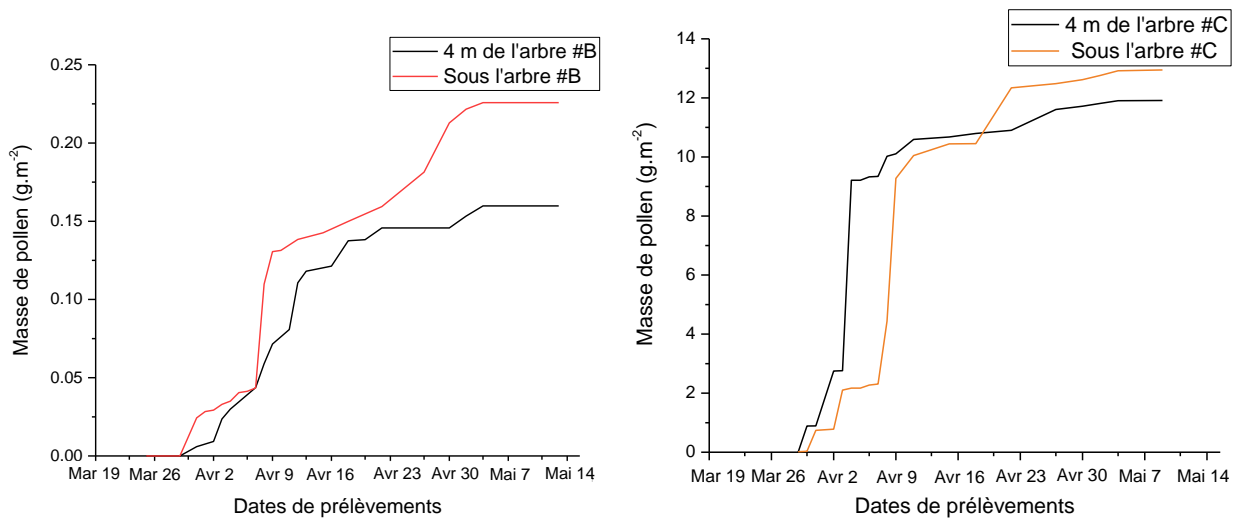


Figure 69 : Comparaison entre la quantité de pollen trouvée directement sous la ramure et à 4 m des arbres.

D'après la **Figure 69**, nous remarquons que la quantité totale de pollen à 4 m des deux arbres est légèrement plus faible que celle trouvée sous l'arbre. La masse totale de pollen trouvée à 4 m de l'arbre B est divisée par un facteur de 1,4 par rapport à celle trouvée sous la ramure de cet arbre ($0,16 \pm 0,03$ g.m⁻² comparé à $0,23 \pm 0,04$ g.m⁻²). En ce qui concerne l'arbre C, cette quantité est divisée par un facteur de 1,09 par rapport à la masse de pollen trouvée sous la ramure de l'arbre ($11,91 \pm 2,3$ g.m⁻² comparé à $12,9 \pm 2,6$ g.m⁻²). Anderson (1990) a montré que les pollens de *Sequoiadendron giganteum* (une espèce de conifère) sont déposés à moins de 100 m de la source, et de moindres quantités sont trouvées à 5000 m (Anderson, 1990). Nos prélèvements sont réalisés à une distance qui reste relativement proche de la

source (4 m de l'arbre), ce qui peut expliquer la faible différence entre la quantité trouvée sous la ramure et à 4 m de l'arbre de bouleau.

Dans de futures études, il sera nécessaire de faire des prélèvements à plusieurs endroits autour de l'arbre et à des distances variables afin de savoir si cette quantité est répartie d'une façon homogène ou non autour des arbres.

8.1.3. Estimation du pourcentage de pollens rompus

Les bouleaux choisis se trouvent à proximité de routes passantes ou sur des parkings. Ces deux facteurs peuvent causer une altération (cassure, pollution) des grains de pollen par écrasement ou piétinement. Afin de vérifier l'état des pollens trouvés sous les arbres et afin de donner une estimation du taux des pollens rompus, l'acide α -linoléinique (produit majeur de la fraction lipidique interne de pollen de bouleau) a été identifié et quantifié dans tous nos échantillons (cf partie 2.1.4 de ce chapitre). La **Figure 70** présente les taux de rupture moyens des pollens trouvés dans la totalité des échantillons prélevés sous chaque arbre.

Ces taux sont influencés grandement par la localisation des arbres. En effet, les arbres B, C et E qui se trouvent sur un parking et des routes passantes présentent les taux moyens les plus élevés de pollens rompus, ils sont respectivement de 17, 15 et 16% (**Figure 70**). Ce taux est inférieur à 10% pour les autres arbres.

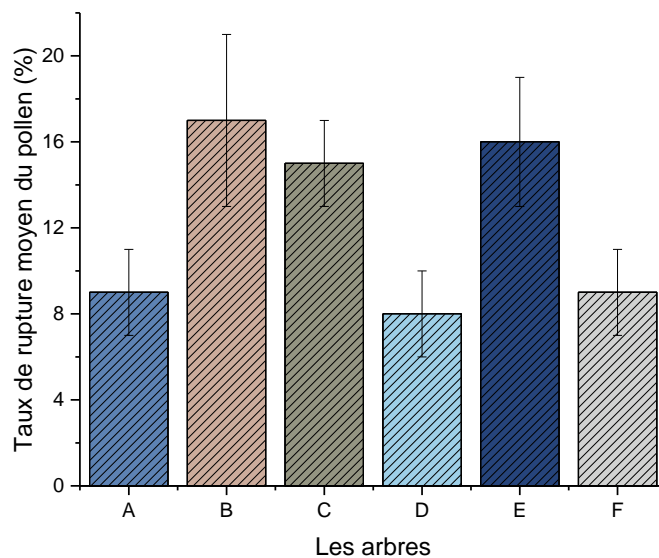


Figure 70 : Taux de rupture moyenne des pollens prélevés sous 6 arbres sur le campus de l'Université de Lille.

Le taux des pollens rompus dépend fortement des jours de prélèvement. La **Figure 71** présente une comparaison de l'état des pollens trouvés sous les arbres de bouleau selon les jours de prélèvement en semaine (de lundi à vendredi) et le week-end (samedi et dimanche).

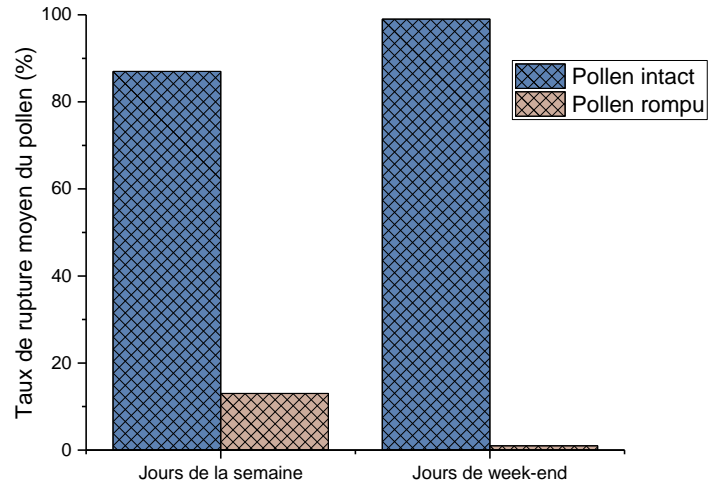


Figure 71 : Comparaison de l'état des pollens trouvés sous les arbres de bouleau selon que le prélèvement a été effectué en semaine (de lundi à vendredi) ou le week-end (samedi et dimanche).

Le taux des pollens rompus est de 13% dans les échantillons prélevés les jours de la semaine. Ce taux diminue jusqu'à 1% dans les échantillons prélevés durant les week-ends où les déplacements des personnes et des voitures sur le campus universitaire (site de prélèvement) se raréfient. Des observations de grains de pollens récoltés durant la saison pollinique 2021 ont été faites par microscopie électronique à balayage afin de confirmer ces résultats.

8.1.4. Observation en microscope électronique à balayage de grains de pollen prélevés au sol

Des observations microscopiques par microscopie électronique à balayage (MEB) sont réalisées pour vérifier l'état des pollens identifiés dans nos échantillons par CGP-SM-SIR.

Différents échantillons de chaque arbre sont sélectionnés afin d'être observés par MEB. Le but est de vérifier l'état du pollen de bouleau (intact, rompu) dans les échantillons analysés en chromatographie. Les échantillons choisis pour l'observation comportent entre 30 à 50% de pollen rompu et 50 à 70% de pollen intact selon les analyses chromatographiques.

Les figures suivantes représentent les images observées en MEB des grains de pollen de bouleau présents dans les échantillons (quelques images sont choisies) (**Figure 72**). Nous observons des pollens intacts présentant des particules sur leurs surfaces (indiquées par des flèches blanches). Les pollens rompus sont identifiés par leurs cassures (indiqués par des rectangles blancs) observées sur la surface des pollens et par leurs contenus cytoplasmiques fortement déversés à l'extérieur du grain de pollen de bouleau (**Figure 72**).

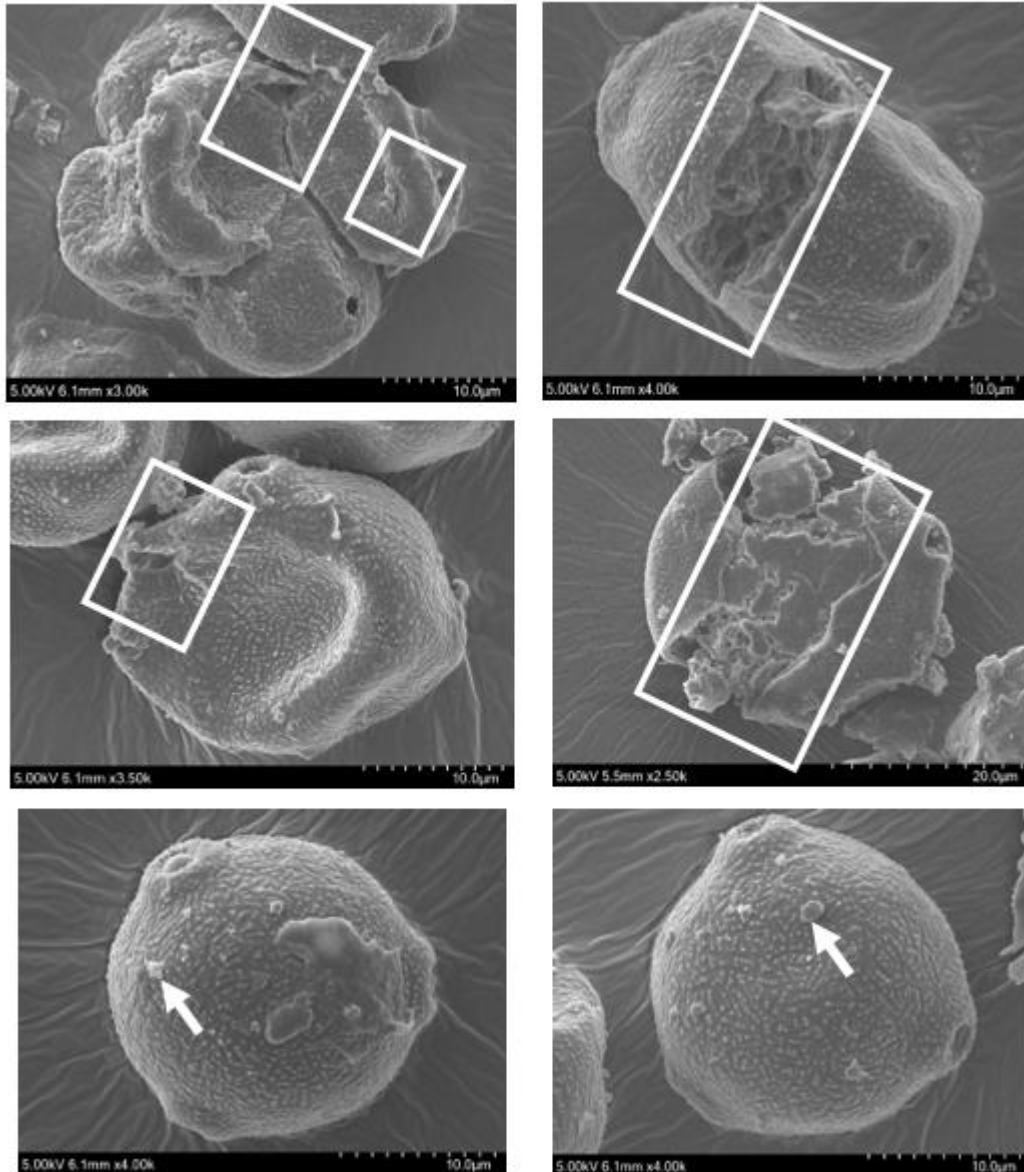


Figure 72 : Grains de pollen de bouleau présents dans les échantillons prélevés sous les arbres par un aspirateur à main.

Nous avons confirmé visuellement ce que nous avons identifié par CGP-SM-SIR sans toutefois fournir un taux de rupture d'après les observations microscopiques. Le pollen est en effet imbriqué dans la fibre et il est très difficile d'effectuer un dénombrement des pollens cassés. Toutefois, il est clairement confirmé par microscopie que les échantillons avec un taux de rupture important contiennent un nombre important de pollens rompus alors que les échantillons avec un taux de rupture faible ou nulle ne présentent que des pollens intacts.

Nous avons observé également que les pollens sédimentés sous les arbres présentent des particules sur leurs surfaces. Ces particules observées sur la surface des pollens prélevés sous les arbres sont probablement liées à la déposition de ces derniers sur le sol, où ils deviennent chargés en particules.

La présence de particules sur la surface des BGP observés dans l'atmosphère peut s'expliquer par plusieurs mécanismes de dépôt sur la surface des grains de pollens (**Figure 73**) : (a) dépôt sec et humide sur les chatons avant pollinisation, (b) coagulation dans l'atmosphère, (c) contact après dépôt sur une surface polluée par des particules, suivi d'une remise en suspension du GP.

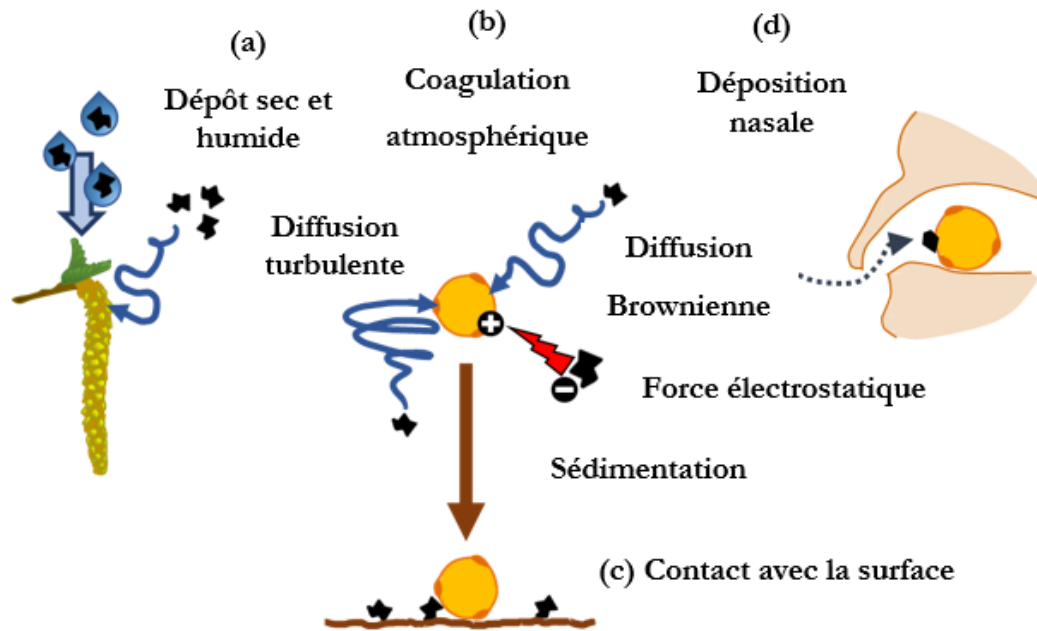


Figure 73 : Mécanismes proposés pour la coagulation des particules sur la surface des grains de pollen. Les boules jaunes représentent les grains de pollen de bouleau. Les pictogrammes noirs symbolisent les particules atmosphériques (Choël et al., 2022).

La pollution particulaire observée sur nos pollens sédimentés aux pieds des arbres est liée au mécanisme (c). D'après la littérature, les pollens récoltés en milieux urbains présentent un grand nombre de particules sur leurs surfaces (Amjad and Shafiqhi, 2012; Azzazy, 2016; Bianchimano et al., 2014; Cerceau-Larrival et al., 1991; Peltre, 1998). Choël et al. (2021) ont montré que les pollens de bouleau dans l'air présentent un faible nombre de particules sur leurs surfaces avec en moyenne 2 ± 1 particules par pollen, couvrant ainsi 0,95 % de la surface de pollen (Choël et al., 2022). Les pollens sédimentés observés en microscopie présentent clairement un plus grand nombre de particules sur leur surface que cette valeur fournie par Choël et al. 2021. Certains pollens prélevés dans l'atmosphère possèdent un plus grand nombre de particules (jusqu'à 16) et les auteurs ont émis l'hypothèse que la resuspension pourrait expliquer la présence de ces pollens très pollués (Choël et al., 2022). Plus de travaux sont nécessaires pour quantifier à la fois la pollution particulaire et la resuspension des pollens après sédimentation, y compris pour les pollens rompus au sol qui vont possiblement créer un aérosol de granules cytoplasmiques lors de leur resuspension.

Par ailleurs, ces pollens au sol sont facilement transportables vers le milieu intérieur. En effet, en marchant sur ces pollens, nous les ramenons en intérieur par le biais des chaussures, causant ainsi une augmentation des quantités de pollen en milieu intérieur. D'après la littérature, l'apport de pollens par les chaussures est une voie d'intrusion considérée comme importante (cf. chapitre I partie 5.2.1). A la lumière de nos travaux et d'après nos mesures en environnement intérieur, cette voie d'introduction pourrait de plus engendrer une pénétration de pollens préalablement rompus au sol (cf. partie 8.1.3 de ce chapitre).

Estimation de la masse totale de pollen sédimentée sous un arbre

Il existe peu de données dans la littérature sur la quantité de grains de pollen émise par chaton pour une même espèce de bouleau (cf. chapitre I partie 4.1). La quantité de grains de pollen émise par chaton donnée par la littérature est comprise entre 10 et 152 mg de pollen pour *Betula*.

D'après Jato et al. (2007), un chaton de *Betula alba* produit entre 4,8 et 8,2 millions de grains de pollen. Ces chiffres sont calculés en faisant une moyenne sur 6 arbres de *Betula alba*. Le nombre de chatons par arbre est compris entre 8 700 et 11 200 chatons (moyennes sur 6 arbres) soit entre 250 et 600 g de pollen par arbre de *Betula alba* (Jato et al., 2007).

Ainsi, les quantités de pollen sédimentées sous un arbre de bouleau représentent entre 1 et 10% de la production totale de l'arbre (en prenant la moyenne des valeurs de Jato et al. (2007) : 425 g de pollen par arbre et une surface de sédimentation sous l'arbre comprise entre 15 et 20 m²). La quantité de pollen sédimentée sous l'arbre C (hautes valeurs de sédimentation) pourrait ainsi atteindre 40 à 60% de la production totale de l'arbre.

Ces valeurs sont des estimations visant à fournir des ordres de grandeur de comparaison entre les quantités sédimentées et la production pollinique totale. Il sera nécessaire dans une étude future de quantifier à la fois la production pollinique totale et la quantité déposée par sédimentation. Pourtant, il faut analyser ces données avec prudence. En effet, la productivité pollinique varie considérablement d'une année sur l'autre pour un arbre. Plusieurs années de mesures sont donc nécessaires pour une meilleure estimation de celle-ci (Sugita et al., 2010). Il est également recommandé de ne pas extrapoler la production pollinique d'une espèce à partir d'une autre, même si celles-ci sont étroitement apparentées (Katz and Batterman, 2020).

8.1.5. Relation entre la sédimentation du pollen et les caractéristiques des arbres

Les quantités cumulées de pollen sédimenté sous les arbres varient d'un arbre à un autre. Afin de comprendre ces différences, nous avons cherché à trouver une corrélation entre ces quantités et les caractéristiques des arbres comme la circonférence du tronc à 1,3 m du sol, le diamètre de la couronne et la hauteur de l'arbre. La **Figure 74** présente la relation entre la masse totale de pollen par m^2 et ces trois caractéristiques de l'arbre (excluant l'arbre C).

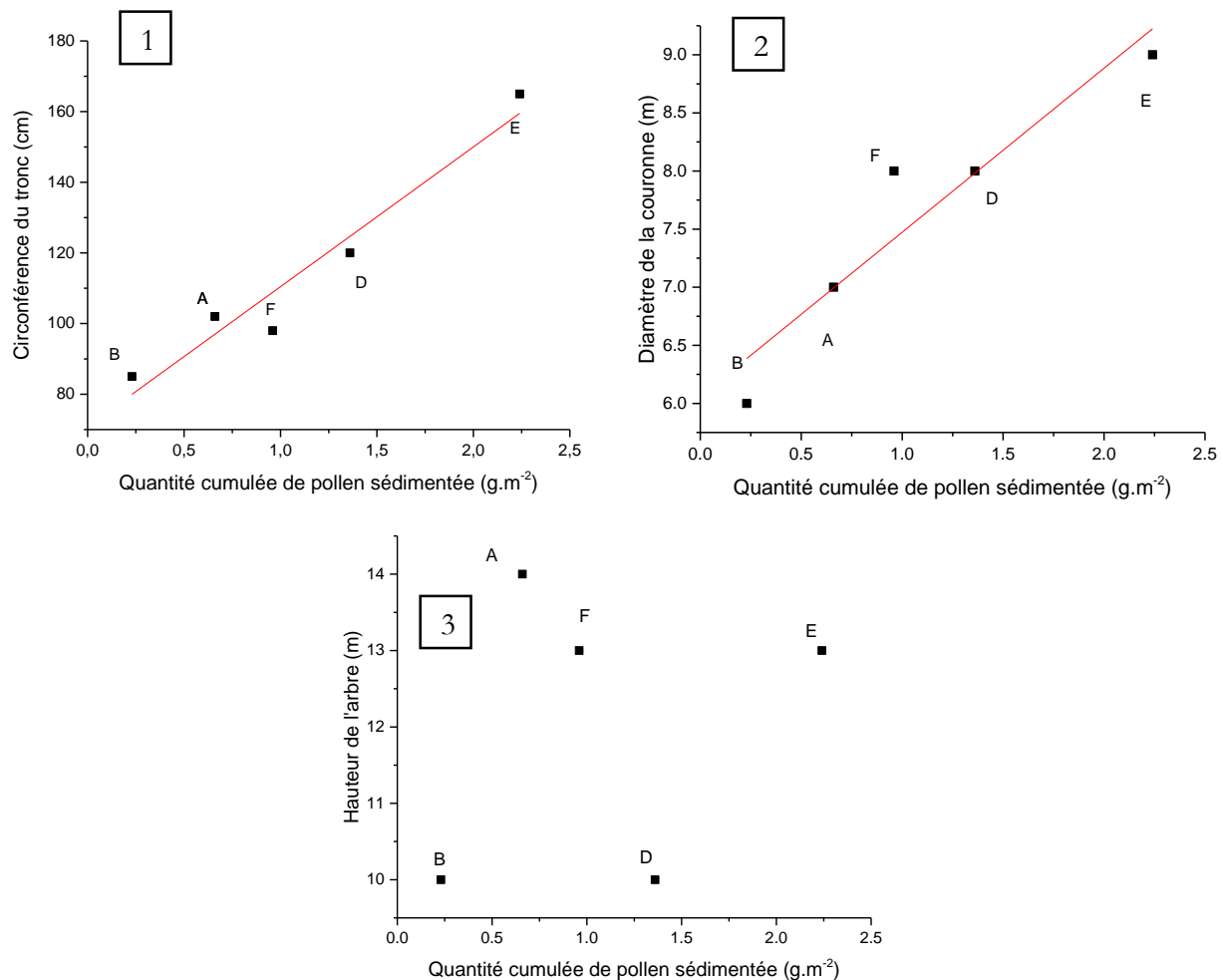


Figure 74 : Relation entre la masse totale de pollen trouvée en $1 m^2$ sous les arbres et les trois caractéristiques prises en compte 1) la circonférence de l'arbre mesuré à 1,3 m du sol, 2) le diamètre de la couronne et 3) la hauteur de l'arbre.

Une corrélation linéaire positive est observée entre la masse de pollen sédimentée par m^2 et la circonférence de l'arbre mesurée à 1,3 m du sol avec un coefficient de corrélation de 0,94. Une relation linéaire positive est aussi observée avec le diamètre de la couronne avec un coefficient de corrélation de 0,91. Cependant, il n'existe aucune tendance entre la masse totale de pollen trouvée sur $1 m^2$ sous l'arbre et la hauteur de l'arbre.

A noter que dans cette partie de l'étude l'arbre C, qui est considéré comme un cas exceptionnel par rapport aux autres arbres choisis dans cette étude, n'a pas pris en compte. En prenant l'arbre C en considération, les coefficients de corrélation entre la circonférence de l'arbre, le diamètre de la couronne et la masse de pollen trouvée sous les 6 arbres (A, B, C, D, E et F) sont inférieurs à 0,3.

8.1.6. Comparaison de la sédimentation avec les concentrations atmosphériques polliniques

Il est bien montré dans la littérature que les concentrations des grains de pollen de bouleau dans l'air sont reliées aux facteurs météorologiques tels que la température, l'humidité relative, le taux de précipitation et la vitesse du vent (Mullins and Emberlin, 1997; Stach et al., 2007). La **Figure 75** représente les concentrations journalières des grains de pollen de bouleau en suspension dans l'air enregistrées en 2021 par le Réseau National de Surveillance Aérobiologique (RNSA) durant la période de la campagne de prélèvement.

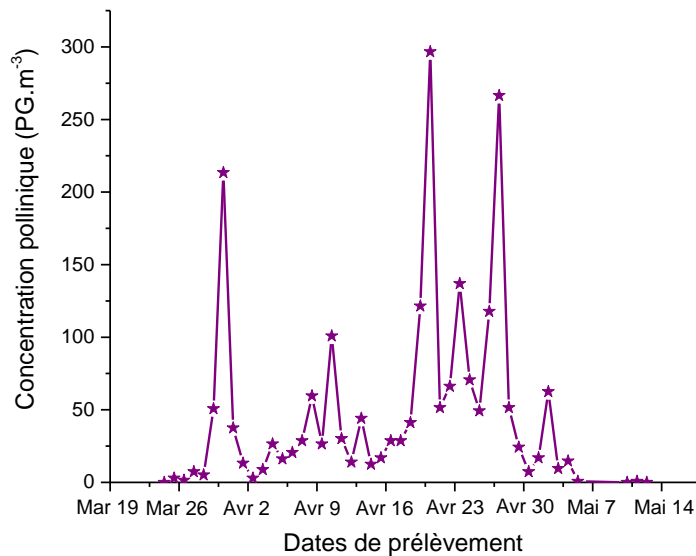


Figure 75 : Concentrations journalières des grains de pollen de bouleau en suspension dans l'air enregistrées en 2021 par le Réseau National de Surveillance Aérobiologique (RNSA) durant de la période de la campagne de prélèvement.

La date du 28 mars marque le début de la saison pollinique de bouleau où la première concentration de pollen est enregistrée par le RNSA. Le premier pic de pollen a eu lieu le 31 mars (213 GP.m⁻³) et le dernier le 3 mai (62 GP.m⁻³). La valeur maximale a été enregistrée le 21 avril avec 297 GP.m⁻³.

Afin d'analyser la relation entre les données polliniques de 2021 et les facteurs météorologiques, des coefficients de corrélations r sont calculés en utilisant le logiciel R. Les températures journalières moyennes sont positivement corrélées aux concentrations de pollen de bouleau enregistrées dans l'air avec un coefficient de corrélation de Pearson $r_p=0,6$. En ce qui concerne l'humidité, le taux de précipitation et la vitesse du vent, ces derniers sont négativement associés à la concentration des pollens dans l'air, avec des coefficients de corrélation de Pearson négatifs entre $-0,1 \leq r_p \leq -0,4$. Effectivement, le jour de 31 mars 2021 qui correspond au premier pic de pollen de la saison pollinique 2021, le taux de précipitation était nul, l'humidité relative (43 %) et la vitesse du vent (1,2 m.s⁻¹) étaient faibles. Les

mêmes conditions météorologiques ont été rencontrées les autres jours où les concentrations de pollen dans l'air étaient fortes.

Durant la saison pollinique, les températures sont restées fraîches sur la cité scientifique (site de prélèvement) avec une moyenne de 9 ± 3 °C, puis la température a brutalement chuté de 18 à 2 °C après le premier pic de pollen qui a eu lieu le 31 mars, où nous avons observé une chute de la concentration de pollen de 213 GP.m^{-3} à 3 GP.m^{-3} (**Figure 75**). Les précipitations n'étaient pas très fréquentes durant la saison pollinique du bouleau 2021 (à noter une faible chute de neige le 6 avril).

Par ailleurs, la saison pollinique 2021 est assez exceptionnelle : les concentrations des pollens enregistrées en 2020 sont 10 fois plus importantes que celles de 2021. En outre, la saison pollinique de 2021 est caractérisée par plusieurs pics majeurs de pollen les 31 mars (213 GP.m^{-3}), 21 avril (297 GP.m^{-3}), 24 avril (137 GP.m^{-3}) et 28 avril (267 GP.m^{-3}). Les concentrations maximales enregistrées en 2020 sont quant à elles concentrées sur quelques jours consécutifs entre le 5 et le 9 avril avec des concentrations qui fluctuent entre 2378 GP.m^{-3} et 2863 GP.m^{-3} (**Figure 76**). Le profil de concentration du pollen dans l'air de l'année 2020 correspond plus à une année habituelle avec une saison pollinique du bouleau courte, début avril, et avec des concentrations en pollen de bouleau de l'ordre de quelques milliers de grains par m^3 .

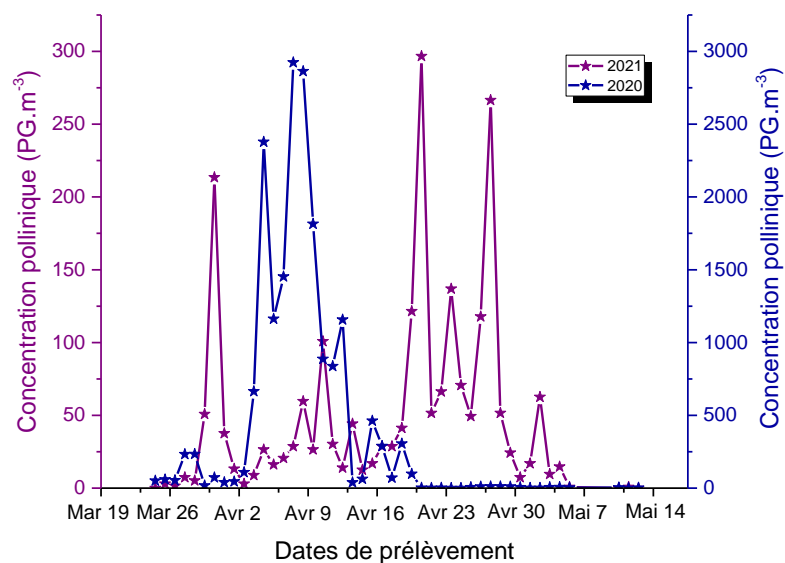


Figure 76 : Comparaison des concentrations polliniques (GP.m^{-3}) enregistrées en 2020 (courbe bleue) et en 2021 (courbe violette) (données RNSA).

Nous avons cherché des corrélations entre la quantité de pollen sédimentée et les concentrations de grains de pollen enregistrées dans l'air par le RNSA pour l'année 2021. Les coefficients de corrélation r calculés pour les 6 bouleaux varient entre -0,02 et 0,04 ; ces valeurs sont proches de zéro, ce qui signifie qu'aucune tendance n'existe entre les concentrations de pollen dans l'air et la quantité de pollen sédimentée au sol (**Figure 77**).

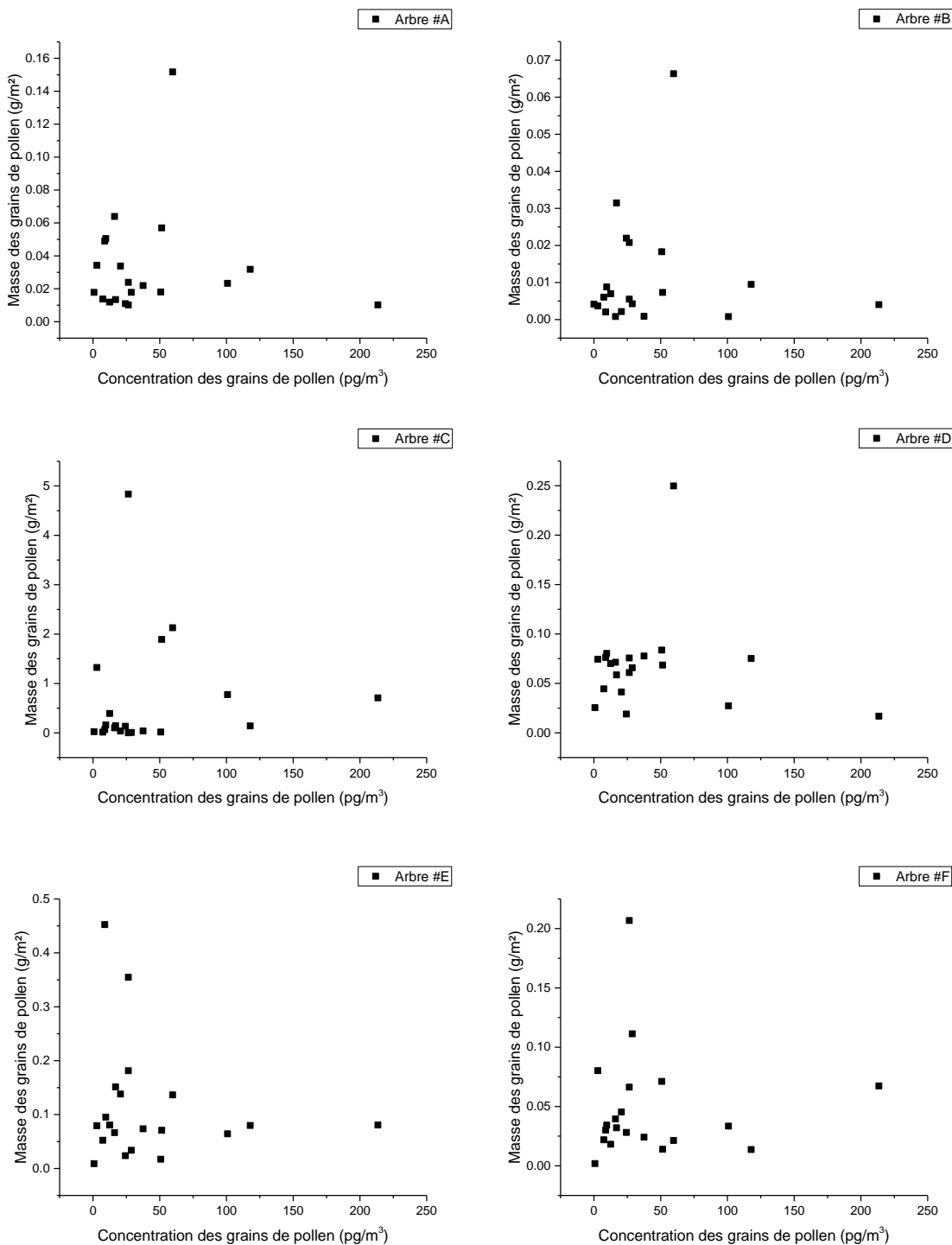


Figure 77 : Corrélations entre le nombre des grains de pollen sédimentés en fonction des concentrations de grains de pollen enregistrées dans l'air par le Réseau National de Surveillance Aérobiologique (RNSA) pour l'année 2021.

La surveillance des grains de pollen en France par le RNSA est faite par des capteurs volumétriques Hirst placés sur une hauteur de 15-20 mètres pour qu'ils soient représentatifs d'une région assez large. Donc, les concentrations polliniques du RNSA reflètent la production de pollen des arbres présents

dans la région couverte par le capteur (20 à 50 km de rayon) (Katelaris et al., 2004). Notre étude est réalisée sur des arbres de bouleau qui possèdent chacun un microenvironnement spécifique, et des caractéristiques individuelles propres (âge, maladies, niveau de pollution, taux de CO₂ local).

8.1.7. Relation entre la quantité de grains de pollen sous les arbres et les facteurs météorologiques

Les facteurs météorologiques influencent fortement les concentrations des grains de pollen de bouleau dans l'air (Mullins and Emberlin, 1997; Stach et al., 2007). Nous nous posons la question si les quantités de pollen comptées sous les arbres sont aussi bien corrélées avec ces derniers. C'est pourquoi, il convient au cours de cette étude, de considérer les paramètres issus de la station météorologique du Laboratoire d'Optique Atmosphérique (LOA) proche du site de prélèvement (campus de la cité scientifique).

Le **Tableau 39** présente les coefficients de corrélation calculés entre la quantité de pollen sédimentée et les facteurs météorologiques. D'après ce tableau, aucune relation n'existe, dans la majeure partie des cas, entre le pollen sédimenté et la température, l'humidité relative et la vitesse de vent (coefficients de corrélation calculés proches de zéro avec des valeurs r entre -0,17 et 0,09). Par contre, des corrélations positives ont été trouvées entre la masse de pollen sédimentée pour les arbres C et F et le taux de précipitation avec un coefficient de corrélation supérieur à 0,8.

Tableau 39 : Coefficients de corrélation calculés entre la quantité de pollen trouvée sous les arbres et les facteurs météorologiques.

Arbres	Coefficient de corrélation			
	Température	Humidité relative	Vitesse de vent	Taux de précipitation
A	-0,01	-0,15	-0,12	0,06
B	-0,15	-0,16	-0,10	0,04
C	0,09	-0,10	-0,15	0,85
D	0,02	-0,16	-0,07	0,03
E	-0,17	-0,08	-0,05	0,06
F	0,04	-0,11	-0,17	0,82

La direction du vent est un autre facteur météorologique capable d'influencer la quantité de grains de pollen comptés sous les arbres. Une fois les grains de pollen déposés au sol, il arrive qu'ils soient portés par le vent. Cependant, une étude plus fine de l'influence locale de la direction du vent sur la dispersion des pollens nécessitera pour de futures études le déploiement d'un anémomètre à proximité immédiate de chaque arbre.

A noter que l'étude de la présence de corrélation entre les facteurs météorologiques, la concentration des pollens dans l'air et la quantité de pollen comptée sous les arbres est très complexe. Il faut prendre en compte le microenvironnement spécifique de chaque arbre et les facteurs météorologiques locaux. La concentration pollinique de l'air est influencée par le biorythme de la plante (à une année de forte

production de pollen de bouleau succèdent souvent deux années de production moindre). Chaque arbre est influencé par un ensemble de facteurs, dont certains dépendent (du moins en partie) de la biologie et de l'écologie de l'arbre considéré. De plus, la difficulté majeure réside dans le fait que tous ces facteurs apparemment indépendants sont en réalité susceptibles d'être inter-dépendants.

8.1.8. Conclusion

A travers l'exemple du pollen sédimenté pendant la saison pollinique sous six bouleaux, nous avons montré que notre méthode de prélèvement et d'analyse permet un dénombrement des pollens sédimentés sous les arbres. Ces quantités détectées montrent une grande variabilité des pollens sédimentés selon l'arbre étudié, avec une moyenne de $3 \pm 0,6 \text{ g.m}^{-2}$. Ces données constituent une première détermination dans la littérature et elles ont une importance notamment pour la modélisation de la concentration des pollens dans l'air. La connaissance de la production pollinique (quantité totale de pollen produite par un arbre) n'est en effet pas suffisante à des fins de modélisation des concentrations atmosphériques si celle-ci diffère trop de la quantité de pollen réellement émise dans l'atmosphère.

Nous avons trouvé des corrélations positives entre la masse totale de pollen sédimentée sur 1 m^2 , la circonférence de l'arbre et le diamètre de la couronne, avec des coefficients de corrélation supérieurs à 0,91. Par contre, aucune corrélation n'a été trouvée avec la hauteur des arbres étudiés. Par ailleurs, nous n'avons trouvé aucune corrélation entre les quantités de pollens sédimentées sous les arbres et les concentrations de pollens observées dans l'atmosphère. Nous expliquons l'absence de corrélation entre ces deux variables par le fait que notre étude consiste à quantifier et identifier les grains de pollen de bouleau sous un arbre de bouleau qui possède un microenvironnement local et des spécificités individuelles. Les données polliniques enregistrées par les capteurs Hirst à une hauteur de quelques dizaines de mètres correspondent quant à elles au cumul des émissions liées à la phénologie d'un grand nombre d'arbres présents dans la zone couverte par le capteur.

Par ailleurs, nous avons donné une estimation du taux de rupture des pollens sédimentés sous les arbres. A notre connaissance, il s'agit de la première étude de la littérature présentant la rupture du pollen sédimenté en milieu urbain. Il s'agit en fait de la découverte d'un nouveau mécanisme de rupture du pollen spécifique à l'environnement urbain. En effet, la présence à la fois d'un sol dur et d'une source d'écrasement du pollen (cause de rupture qui reste à déterminer mais très probablement les véhicules et/ou piétons) sont nécessaires. Ce mécanisme spécifique de rupture dans l'environnement urbain pourrait s'avérer être une hypothèse supplémentaire pour expliquer la prévalence plus importante de l'allergie et de l'asthme en milieu urbain.

Le taux de rupture le plus élevé a été trouvé sous les arbres plantés sur des parkings. Ces pollens présentent des pourcentages moyens de rupture entre 15 et 17%. En outre, ces pourcentages varient selon les jours. Ils sont inférieurs à 1% durant les week-ends (samedi et dimanche) quand il y a moins de déplacements de véhicules et de piétons sur le site de prélèvement. Nous avons validé ces résultats sur la rupture par des images en microscopie électronique, montrant que les pollens prélevés sous les arbres sont bien répartis entre intacts et rompus dans nos échantillons. Le taux de rupture sous un arbre peut varier entre 1 et 38 % (cas de l'arbre A par exemple).

De plus, nous avons observé que le pollen au sol présente une pollution particulière importante, ce qui peut les rendre plus allergisants. Connaître l'état de ces pollens est d'une grande importance dans le domaine de l'allergologie. Pourtant, les études sur les pollens sédimentés et leur remise en suspension sont quasiment absentes de la littérature.

Ces pollens sédimentés sont remis en suspension dans l'air soit par le vent, soit par la circulation routière. Cette remise en suspension cause une augmentation de la quantité des pollens pollués dans l'atmosphère. En outre, ces pollens sont transportés de façon importante vers le milieu intérieur. En effet, en marchant sous un arbre ou en passant du temps sous ce dernier, les piétons peuvent rapporter du pollen directement via leurs vêtements et chaussures dans des environnements intérieurs. En démontrant que les pollens sédimentés sont en partie rompus, une nouvelle hypothèse apparaît concernant l'exposition en environnement intérieur des personnes allergiques aux pollens rompus : est-il possible de transporter les pollens rompus au sol en extérieur vers l'intérieur par le biais des chaussures ?

Dans les futurs travaux, nous utiliserons cette méthode d'analyse pour étudier l'état de pollution des pollens par l'ozone. De la même façon qu'il existe des marqueurs pour identifier et quantifier les pollens de bouleau intacts (heptacosane) et rompus (acide α -linoléinique), il existe aussi des marqueurs du pollen de bouleau pollué par l'ozone. En effet, l'acide nonanoïque et le nonanal ont été identifiés comme étant les produits majoritaires des réactions d'ozonolyse après exposition du pollen de bouleau à d'ozone durant 16 heures. De fait, une exposition à 100 ppb d'ozone induit une élimination entre 59% et 85% de la fraction massique totale des alcènes extraits du pollen de bouleau (Farah et al., 2021). Le nonanal est le produit majoritaire des réactions d'ozonolyse des alcènes identifiés dans les pollens de bouleau (**Tableau 25**) (Farah et al., 2021). Un étalonnage du CGP-SM avec des pollens ayant reçu artificiellement une dose d'ozone sera nécessaire. Un suivi des masses spécifiques des aldéhydes devrait alors permettre non seulement de quantifier et d'identifier l'état du pollen, mais aussi de déterminer l'état de pollution à l'ozone. Le pollen de bouleau n'est sans doute pas le meilleur candidat car les niveaux d'ozone sont faibles en avril à Lille mais une étude similaire est envisageable sur des pollens présents aux mois de l'année plus propices aux fortes concentrations d'ozone comme les graminées ou l'ambrosie.

8.2. Comptage de pollens intacts et rompus dans la poussière domestique

8.2.1. Estimation de la quantité de pollen (intact et rompu) dans la poussière domestique

Les mêmes traceurs chimiques du pollen quantifiés dans les échantillons en milieu extérieur ont été utilisés pour l'estimation de la quantité et de l'état des pollens dans le milieu intérieur. A noter que tous les prélèvements de 2021 ont été réalisés toutes les 48 heures et avant toute autre opération de nettoyage. Les résultats préliminaires obtenus en 2020 n'étaient pas faits à la même fréquence (1 prélèvement/semaine, 4 prélèvements durant toute la saison pollinique). Ces tests effectués en 2020 ne présentent pas une résolution temporelle suffisante et les analyses ont montré des quantités de pollen faibles, en liaison possible avec une compétition entre déposition et remise en suspension. Par ailleurs, ces prélèvements ont été effectués pendant le confinement de mars-mai 2020, qui fut très strict, limitant très fortement le déplacement des occupants vers l'extérieur et donc l'apport de pollens par les chaussures et les vêtements. Par conséquent, ces résultats ne sont pas présentés dans ce manuscrit.

La **Figure 78** présente la quantité de pollen comptée dans la poussière domestique prélevée au sol en milieu intérieur dans trois habitations. La quantité de pollen sédimentée durant la saison pollinique en milieu intérieur est de l'ordre de quelques milligrammes par m²; cette quantité est environ mille fois plus faible que celle trouvée sous les arbres. La quantité de pollen comptée dans la poussière domestique varie en effet entre 0,01 et 1,4 mg.m⁻²/48 h. Cette quantité varie en fonction de l'habitation et du jour de prélèvement (**Figure 78**). Le premier pic de pollen en milieu intérieur est enregistré le 31 mars 2021 dans les trois habitations. Il varie entre 0,6 et 1,4 mg.m⁻²/48 h. Par contre, les autres quantités maximales des pollens comptées dans la poussière domestique en 48 heures ne se produisent pas nécessairement au même moment de la saison pollinique pour les 3 habitations. En ce qui concerne l'habitation 1, les deux autres pics sont enregistrés le 11 avril (0,4 mg.m⁻²/48 h) et le 4 avril (0,2 mg.m⁻²/48 h). Pour les habitations 2 et 3, le deuxième pic est enregistré le 8 avril et les masses de pollens correspondantes à ce jour sont respectivement de 0,5 mg.m⁻²/48 h et 0,9 mg.m⁻²/48 h. Le troisième pic de pollen dans l'habitation 2 (0,3 mg.m⁻²/48 h) est enregistré le 25 avril et le 24 avril pour l'habitation 3 (1,3 mg.m⁻²/48 h). A la fin de la saison pollinique (15 mai) les quantités de pollen enregistrées dans les 3 habitations sont nulles.

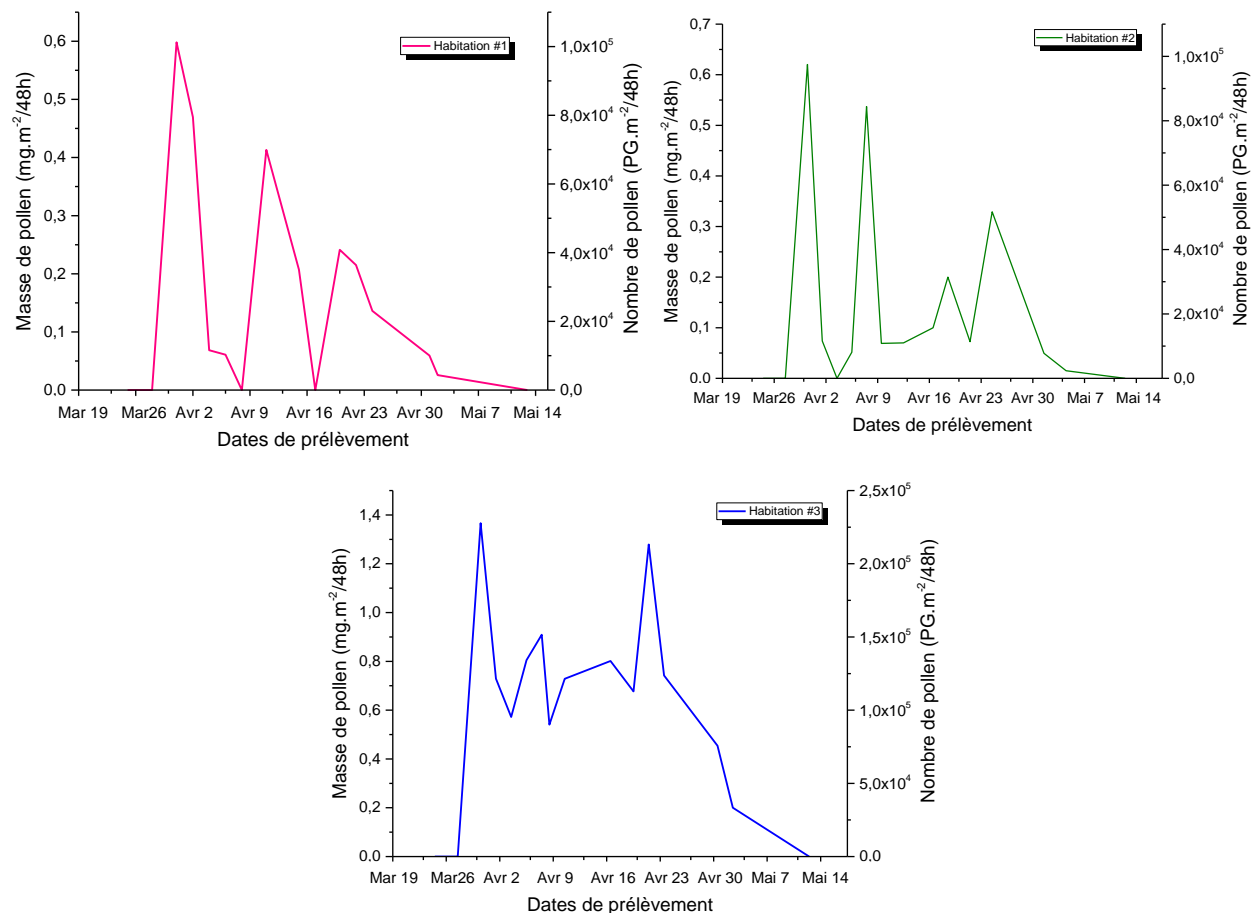


Figure 78 : Quantité de pollen prélevée dans la poussière domestique des trois habitations durant la saison pollinique de bouleau 2021. Masse et nombre de grains de pollens obtenus par la méthode de dosage de l'heptacosane en CGP-SM.

8.2.2. Estimation de la quantité de pollen cumulée dans la poussière domestique

La **Figure 79** présente la quantité cumulée de grains de pollen dans la poussière domestique prélevée en milieu intérieur (aspiration sur une surface de 1 m²) durant la saison pollinique du bouleau de 2021 (en mg.m⁻² et en GP.m⁻²). Les prélèvements ont été réalisés exactement au même endroit pour chaque habitation durant toute la saison pollinique, ce qui nous permet de calculer le cumul de dépôt du pollen. Nous observons que la quantité totale de pollen sédimentée durant la saison pollinique varie d'une habitation à une autre avec une moyenne de 3 mg.m⁻².

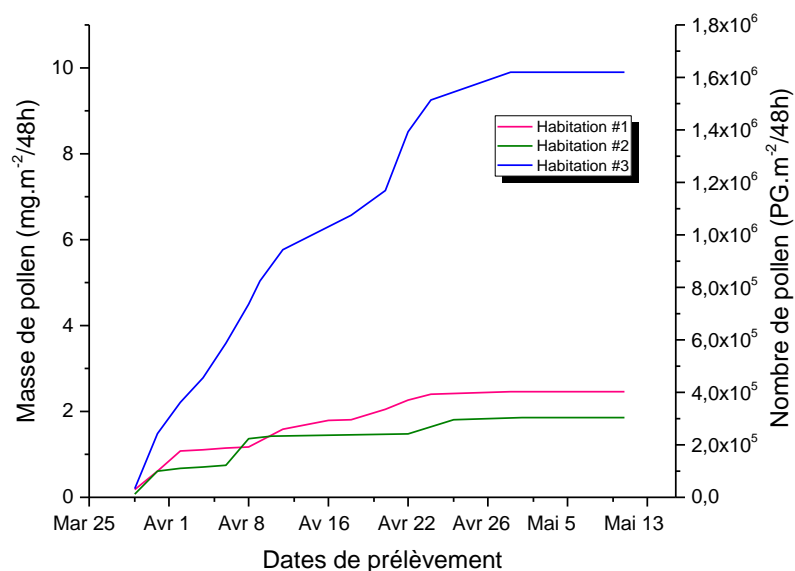


Figure 79 : Quantité cumulée de grains de pollen dans la poussière domestique durant toute la saison pollinique de bouleau ($mg.m^{-2}/48 h$ et en $GP.m^{-2}/48 h$).

La plus grande quantité cumulée de pollen est trouvée dans l'habitation 3 ($10 \pm 2 mg.m^{-2}$). Cette quantité est divisée par un facteur de 4,16 pour l'habitation 1 ($2,4 \pm 0,5 mg.m^{-2}$) et par un facteur de 5,6 pour l'habitation 2 ($1,8 \pm 0,4 mg.m^{-2}$). Par ailleurs, il faut retenir que la quantité de pollen déposée par m^2 en 48 heures est de l'ordre de quelques dixièmes de milligrammes et le cumul de l'ordre de plusieurs milligrammes.

8.2.3. Etude de la relation entre les quantités de pollen cumulées en air intérieur et les caractéristiques de chaque habitation

Le **Tableau 40** présente la masse de pollen cumulée sur $1 m^2$ dans les trois habitations étudiées avec les différents facteurs susceptibles d'expliquer les différences observées entre les trois habitations.

Tableau 40 : Masse de pollen cumulée sur $1 m^2$ dans les trois habitations étudiées avec les différents facteurs susceptibles d'expliquer les différences observées entre les trois habitations.

Habitations	Masse de pollen $mg.m^{-2}$	Arbre de bouleau à proximité (de 20 à 450 m)	Distance de bouleau le plus proche	Nombre d'occupants	Temps d'aération moyenne (min)
1	2,4	9	16 m	1	20 min
2	1,8	8	10 m	2	10 min
3	10	12	10 m	4	60 min

La littérature met en évidence la relation entre les quantités de pollen trouvées en milieu intérieur et le type de végétation présente aux alentours du logement. Les trois habitations présentent des bouleaux

à proximité (**Tableau 40**). L'habitation 1 présente 9 arbres bouleaux à proximité et le plus proche se trouve à 16 m du logement. A propos de l'habitation 3 qui présente la plus grande masse de pollen de bouleau cumulée en intérieur ($10 \pm 2 \text{ mg.m}^{-2}$), elle présente 12 arbres de bouleaux à proximité dont un dans le jardin à 10 m de l'habitation (**Tableau 40**). En ce qui concerne l'habitation 2, elle présente aussi un arbre dans le jardin à 10 m du logement avec 8 arbres de bouleau à proximité (**Tableau 40**). La présence de ces derniers dans le jardin de la maison à une telle distance constitue un facteur dominant pour avoir plus de pollen chez soi (Morgan et al., 2014). Pourtant, une grande différence est observée entre l'habitation 2 ($1,8 \pm 0,4 \text{ mg.m}^{-2}$) et l'habitation 3 ($10 \pm 2 \text{ mg.m}^{-2}$). La quantité de pollen cumulée sur 1 m^2 dans l'habitation 3 est 5,6 fois plus importante que celle comptée dans l'habitation 2. Une légère différence de la quantité de pollen cumulée est observée entre les deux premières habitations 1 et 2.

L'hypothèse est que les grandes différences observées entre l'habitation 3 et les autres habitations sont liées à la production pollinique des arbres à proximité des habitations. En effet, selon nos analyses, les masses de pollen de bouleau cumulées sous les six arbres étudiés varient entre 0,2 et $12,9 \text{ g.m}^{-2}$. A savoir que chaque arbre individuel affecte localement son microenvironnement et peut aussi influencer l'environnement local qui l'entoure (Shugart et al., 1991). L'hypothèse est que si, par exemple, l'habitation 3 présente à proximité un arbre qui produit une grande quantité de pollen, les concentrations polliniques à proximité de cet arbre (en air extérieur et en air intérieur) seront plus fortes que celles à proximité des arbres à faible production pollinique, ce qui est peut-être le cas des habitations 1 et 2 (**Tableau 40**).

D'autres facteurs viennent probablement en considération pour expliquer ces différences d'exposition en air intérieur parmi lesquelles : la durée d'aération, la direction du vent par rapport aux fenêtres lors de l'aération, les habitudes des occupants. On voit ici la difficulté de caractériser l'exposition individuelle aux pollens allergisants, notamment lors d'études épidémiologiques impliquant un grand nombre de participants.

Relation avec le nombre d'occupants de chaque habitation

La littérature met en évidence l'existence d'une corrélation positive entre le nombre de personnes présentes dans le logement et la quantité de pollen trouvée en milieu intérieur (Fahlbusch et al., 2001; Holmquist et al., 1999; Sterling and Lewis, 1998). Ici, l'habitation 3 présentant la plus grande quantité de pollen cumulée ($10 \pm 2 \text{ mg.m}^{-2}$) est occupée par 4 personnes (**Tableau 40**). Cette quantité de pollen est 4,2 fois plus importante que celle trouvée dans l'habitation 1 ($2,4 \pm 0,5 \text{ mg.m}^{-2}$) qui est occupée par une personne et 5,6 fois plus importante que celle trouvée dans l'habitation 2 ($1,8 \pm 0,4 \text{ mg.m}^{-2}$) qui est occupée par deux personnes (**Tableau 40**).

Relation avec la localisation du prélèvement et le temps d'aération

La quantité de pollen trouvée en milieu intérieur varie d'un endroit à l'autre. D'après la littérature, le nombre de grains de pollen le plus élevé est enregistré à proximité des points de ventilation (cadres de fenêtres) et/ou des endroits moins fréquemment nettoyés (Hugg and Rantio-Lehtimäki, 2007).

L'habitation 3 présente la plus grande quantité de pollen cumulée sur 1 m^2 ; elle peut être attribuée à l'endroit de prélèvement dans cette habitation. Effectivement, les prélèvements sont réalisés près d'une

baie vitrée coulissante à l'arrière de la maison (vers le jardin) régulièrement ouverte pour ventilation. Contrairement à l'habitation 1 où les prélèvements sont effectués près d'une fenêtre rarement ouverte. En ce qui concerne l'habitation 2, les prélèvements ont été effectués dans la salle à manger au rez-de-chaussée face au jardin. Pourtant, cette habitation présente une quantité de pollen cumulée 1,3 fois plus faible que l'habitation 1 et 5,6 fois plus faible que l'habitation 3.

Il est bien mis en évidence dans la littérature que la pénétration du pollen en milieu intérieur est directement influencée par l'importance de la ventilation dans une pièce (Menzel et al., 2017). Le temps d'aération dans l'habitation 3 est de 60 min en moyenne par jour, 3 fois plus important que l'habitation 1 et 6 fois plus important que l'habitation 2 (**Tableau 40**). Ce qui peut aussi expliquer les différences entre les masses de pollen cumulées en air intérieur dans les habitations étudiées.

Relation avec la présence des plantes en milieu intérieur

L'habitation 1 ne présente pas de plantes à l'intérieur du logement. Pourtant, les habitations 2 et 3 présentent trois plantes de décoration, *Schlumbergera* dans l'habitation 2 et *Areca* et *Spathiphyllum* dans l'habitation 3 (**Tableau 40**). Ce sont trois plantes de décoration à pollinisation entomophile. En outre, il est hautement improbable que ce pollen interfère avec nos analyses. En effet, la période de pollinisation des deux plantes est différente de celle du bouleau. De plus, la concentration des pollens émis par des plantes entomophiles est négligeable par rapport à ceux émis par des plantes anémophiles (Preusche and Weber, 2014).

Pour conclure, la comparaison des quantités de pollen déposées dans chaque habitation reste un exercice difficile. Cette quantité dépend notamment du nombre et de la production pollinique des bouleaux à proximité (et de leur position par rapport au vent et aux fenêtres), du nombre d'occupants (et de leurs déplacements à l'extérieur), du rythme de ventilation du logement et de la direction du vent par rapport aux fenêtres (Enomoto et al., 2004; Fahlbusch et al., 2001; Holmquist et al., 1999; Hugg and Rantio-Lehtimäki, 2007; Sterling and Lewis, 1998). Il faut analyser les données avec une grande précaution car notre étude se limite à trois logements et par conséquent, elle ne permet pas d'estimer finement les paramètres influençant la quantité de pollen pénétrant dans un logement.

8.2.4. Comparaison des quantités de pollen comptées en milieu intérieur avec la littérature

Les données disponibles dans la littérature sur le pollen de bouleau en air intérieur sont en grains de pollen par m³ et/ou en grains de pollen par gramme de poussière. Notre méthode d'échantillonnage est basée sur le prélèvement de la poussière domestique sur 1 m² en utilisant un aspirateur à main. Les résultats sont exprimés en mg de pollen de bouleau sur 1 m² de surface de prélèvement. Pour comparer nos résultats avec les données de la littérature en GP.m⁻³, nous avons utilisé nos mesures des flux de dépôt sec des pollens et la vitesse de sédimentation pour fournir une estimation des concentrations dans l'air intérieur.

Flux de dépôt sec des pollens F

Le flux de dépôt sec est la conséquence des interactions entre une surface et les particules qui y sont amenées par différents processus. Le flux de dépôt est la quantité de particules qui traverse une surface réceptrice en fonction du temps. Cette quantité peut être choisie en masse ($\text{kg.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) et/ou en nombre ($\#. \text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Le flux de dépôt sec est donné par la formule suivante (Seinfeld and Pandis, 2016) :

$$F = C v_d$$

Avec,

F : flux de dépôt (nous avons choisi de présenter F comme une valeur positive, un flux de dépôt étant normalement négatif) ($\text{g.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

C : concentration des pollens dans l'air à proximité de la surface (g.m^{-3})

v_d : vitesse de dépôt d'un grain de pollen de bouleau de 1 cm.s^{-1} soit $0,01 \text{ m.s}^{-1}$ (Sofiev et al., 2006)

Les flux de dépôt sec et les concentrations des pollens de bouleau (en $\mu\text{g.m}^{-3}$ et en GP.m^{-3}) pour les trois habitations sont présentés dans le **Tableau 41**. Les concentrations maximales calculées d'après nos mesures du flux de déposition dans les trois habitations étudiées varient entre 56 et 120 GP.m^{-3} . Sur la même période, la concentration maximale de pollen enregistrée en milieu extérieur en 2021 est de 297 GP.m^{-3} (données RNSA). Les concentrations en air intérieur sont bien inférieures à celles reportées fréquemment dans la littérature (Hugg et al., 2011).

Tableau 41 : Flux de dépôt sec (mesure) et concentrations (calculées) des pollens de bouleau dans les trois habitations étudiées.

Habitations	Masse de pollen maximale mesurée ($\text{mg.m}^{-2}/48\text{h}$)	Flux de dépôt sec horaire ($\mu\text{g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$)	Concentration de pollen ($\mu\text{g.m}^{-3}$)	Concentration de pollen (GP.m^{-3})
1	0,6	12,5	0,35	56
2	0,6	12,5	0,35	56
3	1,3	27	0,75	120

Tableau 42 présente une comparaison avec la littérature des concentrations de pollen de bouleau obtenues en air intérieur. Les concentrations de pollen enregistrées en milieu intérieur dans notre étude sont proches de celles enregistrées dans l'étude de Menzel et al. (2007), avec des concentrations de pollen en air extérieur presque similaires (400 GP.m^{-3} dans l'étude de Menzel et al. et 297 GP.m^{-3} pour notre étude).

Les concentrations de pollen de bouleau enregistrées en milieu intérieur dans l'étude de Jantunen et al. (2009) sont jusqu'à 10 fois plus importantes que celles enregistrées dans ce travail mais assez

logiquement, la concentration de pollen de bouleau enregistrée en milieu extérieur dans l'étude de Jantunen et al. (2009) est 11 fois plus élevée que celle enregistrée en air extérieur durant ce travail.

Il est bien mis en évidence dans la littérature que les concentrations de pollen en milieu intérieur sont influencées par les concentrations de pollen en milieu extérieur (Fahlbusch et al., 2001; Jantunen et al and Saarinen, 2009; Pichot et al., 2015; Preusche and Weber, 2014; Sterling and Lewis, 1998; Tormo-Molina et al., 2009).

Tableau 42 : Comparaison de nos résultats avec la littérature sur des pollens de bouleau.

Références	Type de milieu intérieur	Méthode de mesure ou de prélèvement	Concentration maximale en extérieur GP.m ⁻³	Concentration maximale en intérieur GP.m ⁻³
(Hugg and Rantio-Lehtimäki, 2007) (Finlande)	Habitations	Capteur de type Rotorod	855	17
(Jantunen et al and Saarinen, 2009) (Finlande)	Habitations	Capteur de type Rotorod	3 250	600
(Menzel et al., 2017) (Allemagne)	Université	Échantillonneur personnel portable (Burkard Manufacturing)	400	83
Ce travail (France)	Habitation 1	Aspirateur à main et CGP-SM	297	56
	Habitation 2			56
	Habitation 3			120

D'autres études sont disponibles dans la littérature sur la quantité des pollens de bouleau trouvée dans la poussière prélevée sur 1 m² (**Tableau 43**). La quantité de pollen de bouleau trouvée dans la poussière domestique dans les trois habitations varie entre 0-9,6 BGPs.cm⁻² pour les deux habitations 1 et 2 et entre 0-22,4 BGPs.cm⁻² pour l'habitation 3. La quantité trouvée dans l'étude de Hugg et Rantio-Lehtimäki (2007) est 304 fois plus importante que celle trouvée dans les habitations 1 et 2 et 131 fois plus importante que celle trouvée dans l'habitation 3. A noter que les quantités de pollen de bouleau dans cette étude sont comptées dans les prélèvements réalisés sur le cadre de la fenêtre (Yli-Panula and Rantio-Lehtimäki, 1994). En effet, le nombre de grains de pollen le plus élevé est enregistré à proximité des points de ventilation (cadres de fenêtres) et/ou des endroits nettoyés moins fréquemment (Hugg and Rantio-Lehtimäki, 2007).

Tableau 43 : Comparaison du nombre de grains de pollen de bouleau trouvés dans les trois habitations avec une étude de la littérature.

	Type de milieu intérieur	Méthode de mesure ou de prélèvement	Concentration en extérieur GP.m ⁻³	Quantité de bouleau BGP.cm ⁻²
(Hugg and Rantio-Lehtimäki, 2007) (Finland)	Habitations	Capteur de type Rotorod	0-855	6- 2 926
Ce travail (France)	Habitation 1	Aspirateur à main	0-297	0-9,6
	Habitation 2			0-9,6
	Habitation 3			0-22,4

Yli-Panula et Rantio-Lehtimäki (1994) ont trouvé dans leur étude que dans un gramme de poussière prélevé à proximité de la fenêtre il y avait 130 000 BGPs. A noter que la quantité de poussière varie considérablement selon la zone de prélèvement, entre 0,2 et 13 g.m⁻² (Dybendal et al., 1989). Par conséquent, l'utilisation de cette unité sans mention de la surface rend impossible toute comparaison avec d'autres travaux.

8.2.5. Estimation du pourcentage de pollens rompus dans la poussière domestique

Pour la première fois dans la littérature, grâce à la méthode de détection des pollens par CGP-SM-SIR, nous avons estimé le taux de rupture de grains de pollen sur 1 m² à l'intérieur de logements. La **Figure 80** présente le taux de rupture de pollen dosé par CGP-SM. Ce taux est calculé en quantifiant l'acide α -linoléinique (marqueur de pollen de bouleau rompu). Ce taux oscille entre 3 et 7%.

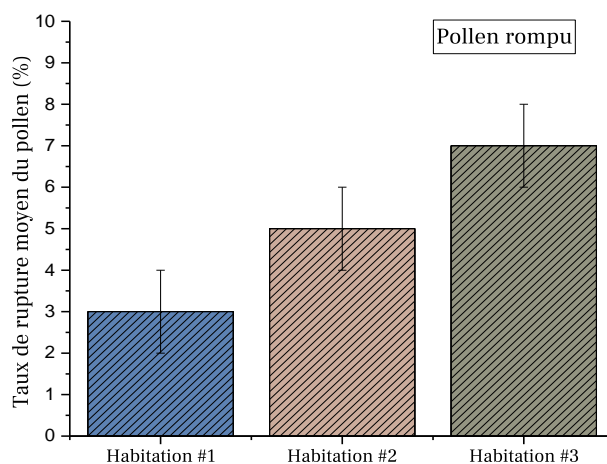


Figure 80 : Taux de rupture du pollen dosé par CGP-SM dans les poussières domestiques.

Le taux de rupture moyen le plus élevé est trouvé dans l'habitation 3 (7%), ce taux est 1,4 fois plus élevé que celui de l'habitation 2 (5%) et 2,3 fois plus élevé que ce trouvé dans l'habitation 1 (3%).

De plus, le taux des pollens rompus et intacts varie selon les jours de prélèvement (les jours de la semaine et les jours de week-end). La **Figure 81** présente une comparaison des taux de rupture moyen des pollens trouvés en milieu intérieur selon que le prélèvement a été effectué en semaine (lundi à vendredi) ou le week-end (samedi et dimanche). Le taux de rupture moyen des pollens trouvés dans les échantillons prélevés durant les jours de la semaine (lundi à vendredi) (n=13) des trois habitations est de 7%. Ce taux diminue à 2% pour les échantillons prélevés durant les week-ends (samedi et dimanche) (n=5).

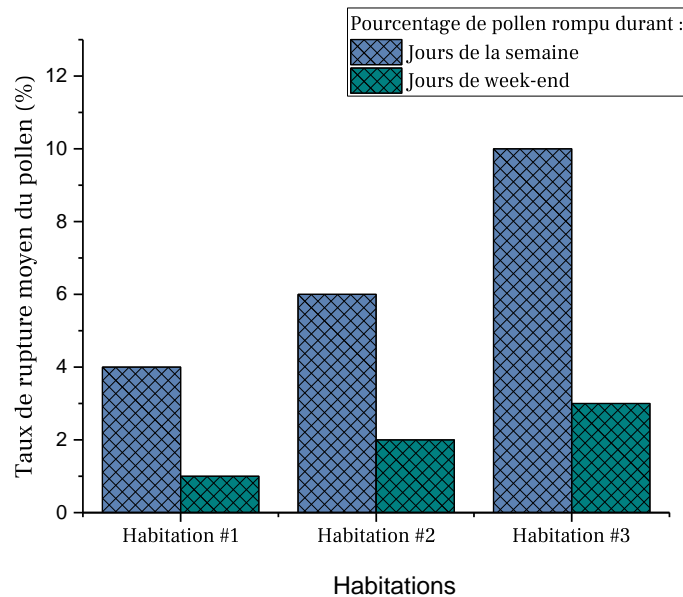


Figure 81 : Comparaison du taux de rupture moyen des pollens sédimentés en milieu intérieur pour des prélèvements en semaine (lundi à vendredi) et le week-end (samedi et dimanche).

D'après la **Figure 81**, le taux de pollens rompus trouvés en milieu intérieur dans les trois habitations, oscille entre 4 et 10% pour les jours de la semaine et entre à 1 à 3% durant les jours de week-ends (samedi et dimanche) en fonction des habitations (**Figure 81**).

Ces taux de rupture en environnement intérieur sont à mettre en parallèle avec les taux de rupture observés pour le pollen prélevé directement sous les arbres. Les pollens seraient rompus de façon plus importante en semaine du fait de la circulation automobile plus importante et du fait que les personnes se déplacent davantage durant la semaine. Ces mesures en air intérieur semblent donc indiquer que le pollen n'est pas (ou peu) rompu dans les habitations mais qu'il y pénètre déjà rompu. Ces données nécessitent confirmation. Par exemple, il serait intéressant de déposer des quantités de pollen en environnement intérieur en dehors de la saison pollinique et de suivre son état sur plusieurs jours afin de vérifier si les activités intérieures contribuent significativement à sa rupture. Ce type d'expérience pose évidemment le problème d'une exposition des occupants à du pollen allergisant.

Cette quantité de pollen rompu plus importante le week-end pourrait également indiquer que la resuspension en milieu extérieur est importante. Des expériences de dépôt au sol en extérieur de pollen de bouleau en dehors de la saison pollinique pourraient permettre d'examiner le rôle du passage de véhicule sur les phénomènes de rupture et de resuspension.

8.2.6. Comparaison entre les concentrations de pollens dans l'atmosphère et en milieu intérieur

Il est bien montré dans la littérature que les concentrations de pollen en milieu extérieur sont bien corrélées avec les concentrations de pollen en milieu intérieur (Fahlbusch et al., 2000; Jantunen et al and Saarinen, 2009; Pichot et al., 2015; Platts-Mills et al., 1987; Sterling and Lewis, 1998; Tormo-Molina et al., 2009). Les corrélations entre les quantités de pollen trouvées en milieu intérieur et les concentrations enregistrées dans l'atmosphère sont calculées en utilisant le logiciel R. Les données polliniques dans l'atmosphère sont fournies par les capteurs Hirst du RNSA.

Une corrélation positive est trouvée entre les concentrations de pollen enregistrées dans l'atmosphère et les quantités de pollen trouvées dans les habitations étudiées avec des coefficients de corrélation r entre 0,7 et 0,4 (**Tableau 44**).

Tableau 44 : Corrélations entre la quantité de pollen enregistrée en air intérieur dans les trois habitations et les concentrations de pollen enregistrées en air extérieur, en prenant en compte la distance entre l'habitation et le capteur Hirst.

Habitations	Ville	Distance entre le lieu de prélèvement et le capteur	Coefficient de corrélation
1	Villeneuve d'Ascq	7 km	0,7
2	Willems	14 km	0,6
3	Estaires	23 km	0,4

Nous remarquons que les corrélations entre ces deux variables deviennent plus faibles en s'éloignant du capteur Hirst. En effet, la plus forte corrélation est observée pour l'habitation 1 ($r = 0,7$) qui est située à 7 km du capteur Hirst. La corrélation entre ces deux variables devient moins forte ($r = 0,6$) pour l'habitation 2 située à 14 km du capteur. L'habitation 3 qui est située à 23 km du capteur Hirst enregistre la plus faible corrélation de Pearson ($r = 0,4$). Pour mieux étudier la corrélation entre les quantités de pollen trouvées en milieu intérieur, il serait nécessaire de placer un capteur à proximité de chaque habitation. Cette variabilité de corrélation entre la mesure des pollens en air extérieur avec celle en air intérieur est probablement due à la fois à l'éloignement avec le point de mesure et à la présence de végétaux pollinisant à proximité du point de collecte en air intérieur (Holmquist et al., 2001). Toutefois, nos données sur trois logements sont insuffisantes pour conclure définitivement sur la distance de « représentativité » des données polliniques du capteur de Hirst.

8.2.7. Comparaison entre la quantité de pollen trouvée dans la poussière domestique aspirée sur 1 m² en milieu intérieur et la quantité de pollen déposée sur la vitre

Des prélèvements supplémentaires ont été réalisés dans l'habitation 1 afin de comparer la quantité de pollen déposé sur la vitre de la fenêtre et celle comptée dans la poussière domestique prélevée au sol. L'objectif était de tester la déposition du pollen sur une surface verticale.

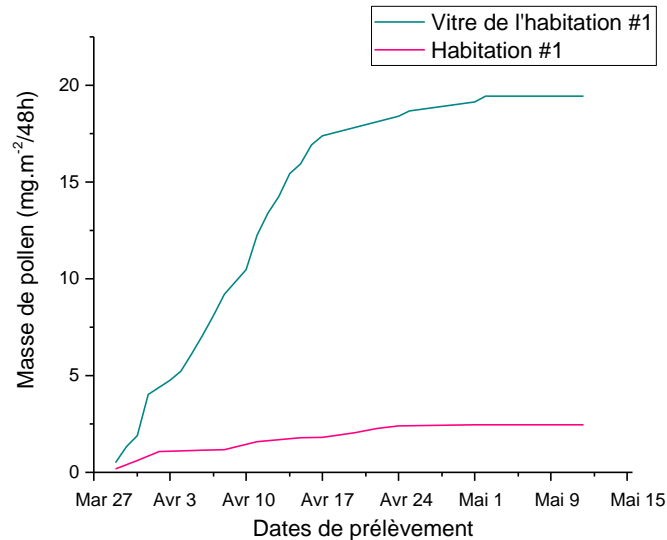


Figure 82 : *Quantité cumulée des grains de pollen dans la poussière domestique et sur une vitre dans l'habitation 1 durant la saison pollinique 2021 (mg.m⁻²/48 h).*

D'après la **Figure 82**, la masse de pollen cumulée sur la vitre externe ($20 \pm 4 \text{ mg.m}^{-2}$) est 8 fois plus grande que la masse de pollen comptée dans la poussière domestique prélevée sur 1 m² au sol en milieu intérieur ($2,4 \pm 0,5 \text{ mg.m}^{-2}$). D'après la littérature, la concentration du pollen en milieu extérieur est plus importante qu'en milieu intérieur (D'Amato et al., 1996; O'rourke and Lebowitz, 1984).

Ces pollens déposés sur la vitre peuvent être remis en suspension et pénétrer en milieu intérieur. Donc, les pollens déposés sur les vitres constituent un vecteur de transport supplémentaire des pollens en milieu intérieur. Cette masse de 20 mg de pollen cumulée sur une vitre de fenêtre est très importante et peut certainement affecter les personnes allergiques si elle est transportée vers un milieu intérieur.

En effet, il est bien conseillé aux personnes allergiques de ne pas ouvrir les portes et les fenêtres durant la journée pour éviter la pénétration des pollens vers l'intérieur et causer une aggravation de leur état allergique. Donc, il faut nettoyer les vitres régulièrement pour éviter l'entrée de ces pollens qui peuvent augmenter leur concentration dans le milieu intérieur. Effectivement, les plus grandes quantités de pollens en milieu intérieur sont trouvées à proximité des points de ventilation (cadres de fenêtres) et/ou les endroits nettoyés moins fréquemment (Hugg and Rantio-Lehtimäki, 2007). Yli Panula et al. (1994) ont trouvé sur un appui de fenêtre $130\ 000 \text{ BGPs.g}^{-1}$ de poussière (Yli-Panula and Rantio-Lehtimäki, 1994).

D'autres prélèvements sur des surfaces verticales comme les fenêtres sont nécessaires pour vérifier si cette mesure peut servir à estimer l'imprégnation du milieu intérieur par les pollens, et donc l'exposition des occupants.

8.2.8. Comparaison entre la quantité de pollen trouvée sur la vitre et les concentrations polliniques enregistrées en milieu extérieur

Nous nous sommes posés la question de savoir si la quantité de pollen déposée sur la vitre est corrélée à la concentration de pollen enregistrée dans l'atmosphère. Une corrélation positive existe entre les quantités de pollen enregistrées en milieu extérieur et celles comptées sur la vitre avec un coefficient de corrélation de Pearson r de 0,8.

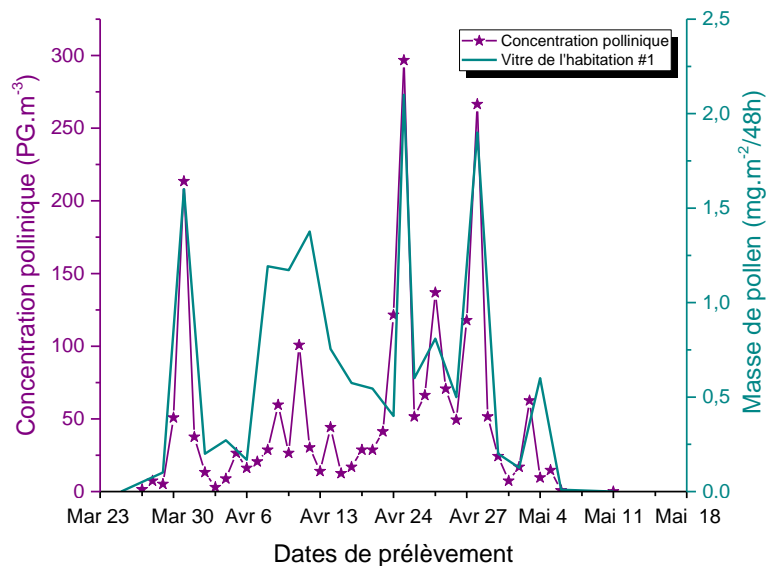


Figure 83 : Comparaison entre les concentrations polliniques enregistrées en milieu extérieur par le RNSA et les quantités de pollen trouvées sur la vitre de la fenêtre de l'habitation 1.

La **Figure 83** présente une comparaison entre les concentrations polliniques enregistrées en milieu extérieur par le RNSA et les quantités de pollen trouvées sur la vitre de l'habitation 1. D'après la figure ci-dessus, nous observons que les masses de pollen trouvées sur la vitre correspondent aux concentrations des pollens enregistrées dans l'atmosphère. Les masses maximales de pollen trouvées sur la vitre de l'habitation 1 le 31 mars (1,5 mg.m⁻²/48h), 21 avril (2,1 mg.m⁻²/48h) et 28 avril (1,9 mg.m⁻²/48h) correspondent aux jours des concentrations maximales de pollens enregistrées dans l'atmosphère respectivement de 213 GP.m⁻³, 297 GP.m⁻³ et 266 GP.m⁻³. De plus, nous observons que les quantités de pollens trouvées sur la vitre sont faibles les jours où les concentrations de pollen dans l'atmosphère sont faibles. En effet, les jours où une faible quantité de pollen est comptée sur la vitre sont le 29 mars (0,3 mg.m⁻²/48h), 4 avril (0,2 mg.m⁻²/48h), 6 avril (0,2 mg.m⁻²/48h), 2 mai (0,1 mg.m⁻²/48h) et 6 mai (0,1 mg.m⁻²/48h). Ces jours correspondent à des faibles concentrations polliniques dans l'atmosphère, respectivement de 5 GP.m⁻³, 13 GP.m⁻³, 16 GP.m⁻³, 17 GP.m⁻³ et 1 GP.m⁻³.

8.2.9. Conclusion

Ce travail constitue un apport notable à la compréhension de l'état du pollen (intact ou rompu) sédimenté en milieu intérieur. Il est extrêmement délicat de comparer les données entre les différentes habitations au vu du très grand nombre de variables qui interviennent. Nous avons trouvé que la quantité de pollen varie d'une habitation à l'autre avec une moyenne de $3 \text{ mg.m}^{-2}/48 \text{ h}$. Cette masse est environ 1000 fois plus faible que les masses comptées en milieu extérieur sous les arbres. La plus grande quantité de pollen est trouvée dans l'habitation 3 qui présentent un grand nombre de bouleaux à proximité (12 arbres à quelques mètres du logement), un nombre d'occupants plus important que les deux autres habitations (4 personnes) et un temps d'aération plus important que les deux autres habitations. En outre, la comparaison de nos données avec la littérature nous a permis de constater que nos données sont cohérentes avec les autres études quand les concentrations de pollen en air extérieur sont proches de celles enregistrées durant notre étude.

A notre connaissance, la détermination de l'état des grains de pollen en air intérieur n'a jamais été documentée dans la littérature. Notre méthode d'analyse mise au point dans cette étude nous a permis d'estimer le taux de pollens rompus en milieu intérieur. Ainsi, nous avons trouvé que ce taux est plus important durant les jours de la semaine (4 à 10 %) que durant les week-ends (1 à 3 %). Nous avons expliqué ces résultats par le fait que la circulation automobile est plus forte les jours ouvrés, ce qui peut augmenter la quantité de pollens rompus en milieu intérieur qui peuvent pénétrer par les voies d'aération. En outre, les gens se déplacent plus les jours de semaine pour exercer leurs activités, ramenant plus de pollens rompus via les chaussures et les vêtements (Yli-Panula and Rantio-Lehtimäki, 1995).

En outre, en appliquant notre méthode de prélèvement sur la vitre de la fenêtre de l'habitation 1, nous avons trouvé que la quantité de pollen sur la vitre de la fenêtre est 8 fois plus importante que celle comptée dans la poussière prélevée sur 1 m^2 au sol. Ces quantités trouvées sur la vitre de la fenêtre sont corrélées positivement avec les concentrations de pollen enregistrées dans l'air extérieur avec un coefficient de corrélation de Pearson de 0,8. De plus, ces pollens présents sur la vitre peuvent être transférés en milieu intérieur, ce qui peut constituer un problème pour les habitants. La quantité de pollen sur la vitre varie entre 0,1 et $2,1 \text{ mg.m}^{-2}/48\text{h}$, ce qui peut correspondre à des concentrations en 1 m^3 d'air entre 0 et 194 GP.m^{-3} . Effectivement, d'après la littérature des concentrations de pollen de bouleau entre 8 et 21 GP.m^{-3} peuvent déclencher des réactions chez les personnes allergiques (Comtois and Gagnon, 1988).

La connaissance des concentrations de pollens en milieu intérieur est plus pertinente que la concentration de fond extérieure pour les personnes qui passent la majorité de leur temps à l'intérieur (Menzel et al., 2017). Les concentrations de pollen à l'intérieur des habitations constituent un enjeu sanitaire sous-estimé (Menzel et al., 2017). Les études épidémiologiques devraient s'appuyer sur les concentrations de pollen réelles en air intérieur, en plus de la concentration de pollen de fond au niveau des toits (Menzel et al., 2017). Ainsi, notre méthode d'analyse ne permet pas seulement de quantifier les grains de pollen en milieu intérieur, elle permet aussi une identification de l'état du pollen auquel nous sommes exposés, ce qui n'a jamais été étudié dans la littérature. De plus, la durée de nos analyses

est courte. En 2 heures (analyse + traitement de données), elles peuvent fournir des données en temps réel permettant ainsi une prévention plus efficace auprès des personnes allergiques.

CONCLUSION

CONCLUSION

Cette thèse constitue une contribution pour une meilleure connaissance de l'état (intact, rompu) des pollens allergisants et de leurs altérations par la pollution de l'air.

Le premier objectif correspondait à la recherche des paramètres et des conditions les plus adaptés pour identifier par microscopie Raman et Infrarouge à Transformée de Fourier les modifications des composants moléculaires des pollens avant et après exposition à l'ozone. Nous avons pu repérer des variabilités intra-grain de la composition chimique des grains de pollen de bouleau. Ces mesures préliminaires nécessitent d'être confortées à d'autres analyses afin de s'assurer de la répétabilité des résultats. Afin de promouvoir l'étude des modifications spectrales au niveau d'un grain de pollen individuel, il serait intéressant de faire des mesures *in-situ*, afin de suivre les modifications spectrales au cours d'une exposition à l'ozone.

Dans le cadre de cette étude préliminaire nous avons développé une méthode d'échantillonnage passive (pastille adhésive fixée sur une casquette), pour les prélèvements des grains de pollen dans l'atmosphère. Cette méthode permet une étude de l'exposition des personnes avec indication de l'état de pollution des grains de pollen. Elle permet notamment de collecter des pollens à une hauteur proche de la zone de respiration humaine. L'analyse des pollens a été réalisée par microscopie électronique à balayage, ce qui nous a permis d'étudier l'état de pollution particulaire des grains de pollen que nous respirons. Nous avons trouvé qu'une exposition de 30-40 min permet de collecter quelques dizaines de grains de pollen de bouleau. Sur la totalité des grains de pollens comptés, entre 6 et 10 % présentent des particules sur leurs surfaces. Ce pourcentage devient plus important (env 30 %) pour les pollens prélevés en ville.

Des prélèvements supplémentaires ont été réalisés durant la saison pollinique 2021. Ces échantillons ont été collectés à différentes périodes de la saison pollinique. Ils vont nous permettre de continuer l'étude de l'efficacité de cette méthode afin de vérifier si les quantités de pollen varient en fonction de l'intensité de la saison pollinique et aussi de savoir si le niveau de pollution des grains de pollen est influencé par la pollution atmosphérique locale.

Le troisième chapitre a pour originalité d'étudier la capture de l'ozone pour une vingtaine de pollens dans les mêmes conditions expérimentales, ce qui n'a jamais été fait auparavant dans la littérature. Nous avons exposé ces pollens à une concentration proche de 100 ppb d'ozone. Nous avons pu montrer que le taux de capture d'ozone dépend de chaque pollen avec un taux de capture entre 0 et 141 ng.mg⁻¹. Ce taux de capture est corrélé à la taille des pollens et à la masse des lipides polliniques. Nous avons pu montrer que la fraction lipidique présente un rôle protecteur empêchant la capture d'ozone par les pollens. Cette différence n'est pas liée seulement au pollen mais aussi à l'année et à la localisation de récolte. Le changement climatique et les concentrations de CO₂ affectent les rythmes de reproduction des végétaux. Le phénomène tend d'ailleurs à s'intensifier, depuis plusieurs années les allergologues s'aperçoivent d'une accentuation de la sévérité et de la durée des manifestations chez les

patients affectés (Besancenot, 2007). La présence des polluants adsorbés sur les pollens pourrait contribuer à une aggravation des symptômes allergiques.

Le quatrième chapitre de la thèse est séparé en trois parties. Dans la première partie nous avons montré la faisabilité de notre nouvelle méthode de prélèvement et de comptage en utilisant des traceurs chimiques afin d'identifier et de quantifier les pollens de bouleau intacts et rompus par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. La réponse chromatographique est linéaire pour les traceurs des pollens intacts et rompus pour des masses allant de 0,075 mg à 10 mg de pollen.

Dans la seconde partie nous avons pu réellement conclure que le profil lipidique des pollens de bouleau est faiblement dépendant de la localisation et de la période de pollinisation. Nous avons pu clairement montrer que les deux groupes de pollens étudiés A (même arbre, différentes années) et B (même année, localisations différentes) présentent les mêmes familles de composés chimiques les alcanes, les alcènes, les acides monocarboxyliques, les aldéhydes et les alcools. Tous les pollens de bouleau étudiés sont riches en alcènes, en alcools et en acides gras saturés. La masse totale des composés identifiés dans les deux groupes A et B est respectivement de $3530 \pm 107 \text{ ng.mg}^{-1}$ et de $3032 \pm 83 \text{ ng.mg}^{-1}$ avec une différence de 10 %. Ces informations permettent de conclure que nos résultats d'étalonnage pourront être extrapolés aux pollens de bouleau quelle que soit sa provenance.

Dans la troisième partie du quatrième chapitre nous avons mené une campagne de prélèvement de pollen en utilisant notre méthode de prélèvement et de comptage. Nous avons pu identifier et quantifier les pollens de bouleau intacts et rompus sédimentés sous les arbres (environnement extérieur) et dans la poussière domestique (environnement intérieur). Il s'agit de la première étude de la littérature présentant le taux de rupture de pollen sédimenté en milieu urbain et en environnement intérieur. Nous avons montré que le taux de rupture de pollen au sol varie en fonction de l'emplacement de l'arbre. Les arbres localisés sur un parking présentent un taux de rupture élevé qui se situe entre 15 et 17 %. Nous suggérons que la présence de ces pollens rompus est un facteur supplémentaire pour expliquer la prévalence élevée des allergies respiratoires en milieu urbain. Des études complémentaires semblent nécessaires à plus grande échelle (un nombre plus important d'arbres) afin de comprendre l'effet du microenvironnement de l'arbre à la fois sur la quantité de pollen de bouleau sédimenté au sol mais également sur la productivité pollinique (g de pollen par arbre). Ces données semblent être nécessaires pour les travaux de modélisation de la production pollinique. L'hypothèse que nous avons émise est que les concentrations de pollen dans l'air ne semblent pas être suffisantes pour les travaux de modélisation vu qu'une quantité non négligeable sédimente au sol, sous et près de l'arbre.

Déterminer la quantité de pollen présent en environnement intérieur constitue une façon indirecte de renseigner sur l'exposition individuelle. Nous avons ainsi pu quantifier et identifier l'état du pollen à l'intérieur de trois logements. La masse moyenne de pollen de bouleau trouvée dans les trois habitations est de 3 mg.m^{-2} sur toute la saison pollinique. Cette masse est divisée par un facteur mille par rapport à celle trouvée au sol sous les arbres. L'aboutissement de ce travail nous a permis de donner une estimation du taux de rupture des pollens en environnement intérieur, ce qui n'a jamais été fait dans la

littérature. Ce taux de rupture varie selon les jours (4 à 10% durant les jours de la semaine et de 1 à 3% durant les week-ends) en raison des déplacements des occupants pour leurs activités, qui sont un des vecteurs de transport de pollen en milieu intérieur.

La surveillance des pollens en air extérieur est importante. Pourtant, afin d'étudier les expositions individuelles il faut se baser sur les données trouvées en environnement intérieur où nous passons la majorité de notre temps. Dans ces travaux, nous donnons non seulement une quantification des pollens en air intérieur mais aussi une détermination du taux de rupture de ces derniers, ce qui est tout aussi important que de connaître la quantité totale de pollen.

L'approche développée dans cette thèse peut fournir de nouvelles perspectives sur les conséquences de l'état du pollen respiré sur le déclenchement et la gravité des manifestations allergiques. Effectivement, nous avons commencé par ces travaux à savoir l'état du pollen auquel nous sommes très probablement exposé (intact, rompu). La question qui s'ouvre après est quelle est l'influence de l'état de pollution du pollen sur la sensibilisation allergique et sur la sévérité des symptômes ?

Nous pourrions dans de futurs travaux déterminer l'état de pollution des pollens de bouleau en utilisant des traceurs chimiques comme le nonanal et l'acide nonanoïque qui constituent les produits majoritaires des réactions d'ozonolyse sur le pollen de bouleau. La méthode développée pour le bouleau sera applicable à d'autres espèces végétales qui pollinisent durant des périodes de fortes concentrations d'ozone (comme l'ambroisie), après l'étude de la composition de leur fraction lipidique et l'effet des polluants sur cette dernière.

Il est nécessaire d'étudier dans le futur les effets de synergie entre polluants et pollen (effet cocktail). En effet, nous ne respirons pas seulement du pollen frais ou du pollen pollué seulement par des particules ou par un seul polluant. Nous avons montré dans ce travail que les pollens capturent différemment l'ozone, ce qui peut aussi être le cas pour d'autres polluants. Il est important de continuer à développer nos travaux dans le but de comprendre le vieillissement des pollens dans l'atmosphère.

RÉFÉRENCES

- Abed El-Azim, A.M.D., Khalil, S.A., 2015. Identification phenolic and biological activities of methanolic extract of date palm pollen (*Phoenix dactylifera*). *J Microb Biochem Technol* 7, 047–050.
- Albertine, J.M., Manning, W.J., DaCosta, M., Stinson, K.A., Muilenberg, M.L., Rogers, C.A., 2014. Projected carbon dioxide to increase grass pollen and allergen exposure despite higher ozone levels. *PLoS One* 9, e111712.
- Albertini, R., Ciancianaini, P., Pinelli, S., Lunghi, P., Ridolo, E., Dall'aglio, P., 2000. Air purification and indoor biologic pollutants. *Allergy* 55, 780–781. <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2000.00648.x>
- Alcázar, P., Cariñanos, P., De Castro, C., Guerra, F., Moreno, C., Dominguez-Vilches, E., Galán, C., 2004. Airborne plane-tree (*Platanus hispanica*) pollen distribution in the city of Córdoba, South-western Spain, and possible implications on pollen allergy. *Journal of investigational allergology & clinical immunology* 14, 238–243.
- Alcázar, P., Comtois, P., 2000. The influence of sampler height and orientation on airborne Ambrosia pollen counts in Montreal. *Grana* 39, 303–307.
- Alebic-Juretic, A., Cvitas, T., Klasinc, L., 1997. Ozone destruction on solid particles. *Environmental monitoring and assessment* 44, 241–247.
- Allakhverdi, Z., Bouguermouh, S., Rubio, M., Delespesse, G., 2005. Adjuvant activity of pollen grains. *Allergy* 60, 1157–1164.
- Ambika Manirajan, B., Ratering, S., Rusch, V., Schwiertz, A., Geissler-Plaum, R., Cardinale, M., Schnell, S., 2016. Bacterial microbiota associated with flower pollen is influenced by pollination type, and shows a high degree of diversity and species-specificity. *Environmental Microbiology* 18, 5161–5174.
- Amjad, L., Shafiqhi, M., 2012. The effect of air pollution on *Chenopodium album* L. pollen structure. *Journal of Agricultural Science and Technology. A* 2, 143.
- Anderson, R.S., 1990. Modern pollen rain within and adjacent to two giant sequoia (*Sequoiadendron giganteum*) groves, Yosemite and Sequoia national parks, California. *Canadian Journal of Forest Research* 20, 1289–1305.
- Annesi-Maesano, I., Rouve, S., Desqueyroux, H., Jankovski, R., Klossek, J.M., Thibaudon, M., Demoly, P., Didier, A., 2012. Grass Pollen Counts, Air Pollution Levels and Allergic Rhinitis Severity. *International Archives of Allergy and Immunology* 158, 397–404.
- ANSES, 2014. État des connaissances sur l'impact sanitaire lié à l'exposition de la population générale aux pollens présents dans l'air ambiant.
- Antepara, I., Fernandez, J.C., Gamboa, P., Jauregui, I., Miguel, F., 1995. Pollen allergy in the Bilbao area (European Atlantic seaboard climate): pollination forecasting methods. *Clinical & Experimental Allergy* 25, 133–140.
- Aoyagi, H., Ugwu, C.U., 2011. Fullerene fine particles adhere to pollen grains and affect their autofluorescence and germination. *Nanotechnology, science and applications* 4, 67.
- ATMO FR, 2022. Atmo Hauts-de-France [WWW Document]. URL <https://www.atmo-hdf.fr/atmo/atmo-hauts-de-france.html>
- Azzazy, M., 2016. Environmental impacts of industrial pollution on pollen morphology of *Eucalyptus globulus* Labill.(Myrtaceae). *J. App. Biology Biotech* 4, 057–062.
- Bacsi, A., Choudhury, B.K., Dharajiya, N., Sur, S., Boldogh, I., 2006. Subpollen particles: carriers of allergenic proteins and oxidases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 118, 844–850.

- BAF, B.A., 1995. Airborne pollen and spores: a guide to trapping and counting. British Aerobiology Federation. Natural Resources Management Department, Natural Resources Institute, University of Greenwich, Chatham, Kent, UK p1-59.
- Bağcıoğlu, M., Zimmermann, B., Kohler, A., 2015. A multiscale vibrational spectroscopic approach for identification and biochemical characterization of pollen. *PLoS One* 10, e0137899.
- Ball, B.A., Folinsbee, L.J., Peden, D.B., Kehrl, H.R., 1996. Allergen bronchoprovocation of patients with mild allergic asthma after ozone exposure. *Journal of allergy and clinical immunology* 98, 563–572.
- Banken, R., Comtois, P., 1990. Concentration du pollen de l'herbe à poux et prévalence de la rhinite allergique dans deux municipalités des Laurentides. *Union médicale du Canada* 119, 178–181.
- Barraza-Villarreal, A., Sunyer, J., Hernandez-Cadena, L., Escamilla-Nuñez, M.C., Sienra-Monge, J.J., Ramírez-Aguilar, M., Cortez-Lugo, M., Holguin, F., Diaz-Sánchez, D., Olin, A.C., 2008. Air pollution, airway inflammation, and lung function in a cohort study of Mexico City schoolchildren. *Environmental health perspectives* 116, 832–838.
- Bartra, J., Mullol, J., Del Cuvillo, A., Dávila, I., Ferrer, M., Jáuregui, I., Montoro, J., Sastre, J., Valero, A., 2007. Air pollution and allergens. *J Investig Allergol Clin Immunol* 17, 3–8.
- Bashir, M.E.H., Lui, J.H., Palnivelu, R., Naclerio, R.M., Preuss, D., 2013a. Pollen lipidomics: lipid profiling exposes a notable diversity in 22 allergenic pollen and potential biomarkers of the allergic immune response. *PLoS One* 8, e57566.
- Bashir, M.E.H., Ward, J.M., Cummings, M., Karrar, E.E., Root, M., Mohamed, A.B.A., Naclerio, R.M., Preuss, D., 2013b. Dual function of novel pollen coat (surface) proteins: IgE-binding capacity and proteolytic activity disrupting the airway epithelial barrier. *PloS one* 8.
- Bastl, M., Bastl, K., Dirr, L., Berger, M., Berger, U., 2021. Variability of grass pollen allergy symptoms throughout the season: Comparing symptom data profiles from the Patient's Hayfever Diary from 2014 to 2016 in Vienna (Austria). *World Allergy Organization Journal* 14, 100518.
- Beck, I., Jochner, S., Gilles, S., McIntyre, M., Buters, J.T., Schmidt-Weber, C., Behrendt, H., Ring, J., Menzel, A., Traidl-Hoffmann, C., 2013. High environmental ozone levels lead to enhanced allergenicity of birch pollen. *PloS one* 8, e80147.
- 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., Becker, W.M., Friedrichs, K.H., Darsow, U., Tomingas, R., 1992. Interaction between aeroallergens and airborne particulate matter. *International Archives of Allergy and Immunology* 99, 425–428.
- Behrendt, H., Friedrich, K.H., Kainka-Stänicke, E., Darsow, U., Becker, W.M., Tomingas, R., 1991. Allergens and pollutants in the air—a complex interaction, in: *New Trends in Allergy III*. Springer, pp. 467–478.
- Behrendt, H., Kasche, A., Von Eschenbach, C.E., Risse, U., Huss-Marp, J., Ring, J., 2001. Secretion of proinflammatory eicosanoid-like substances precedes allergen release from pollen grains in the initiation of allergic sensitization. *International archives of allergy and immunology* 124, 121–125.
- Behrendt, H., Tomczok, J., Sliwa-Tomczok, W., Kasche, A., von Eschenbach, C.E., Becker, W.M., Ring, J., 1999. Timothy grass (*Phleum pratense* L.) pollen as allergen carriers and initiators of an allergic response. *International archives of allergy and immunology* 118, 414–418.
- Benoit, L.F., Skelly, J.M., Moore, L.D., Dochinger, L.S., 1983. The influence of ozone on *Pinus strobus* L. pollen germination. *Canadian Journal of Forest Research* 13, 184–187.
- Berger, M., Bastl, K., Bastl, M., Dirr, L., Hutter, H.-P., Moshhammer, H., Gstöttner, W., 2020. Impact of air pollution on symptom severity during the birch, grass and ragweed pollen period in Vienna, Austria: importance of O₃ in 2010–2018. *Environmental Pollution* 263, 114526.

- Berger, U., Kmenta, M., Bastl, K., 2014. Individual pollen exposure measurements: are they feasible? *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 14, 200–205. <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000060>
- Berggren, B., Nilsson, S., Boëthius, G., 1995. Diurnal variation of airborne birch pollen at some sites in Sweden. *Grana* 34, 251–259.
- Berry, M.J., Dunn, C.J., Pittman, C.L., Kerr, W.C., Adair, N.E., 1996. Increased ventilation in runners during running as compared to walking at similar metabolic rates. *European journal of applied physiology and occupational physiology* 73, 245–250.
- Besancenot, J.-P., 2007. Notre santé à l'épreuve du changement climatique. Delachaux et Niestlé.
- Besancenot, J.-P., Thibaudon, M., 2012. Changement climatique et pollinisation. *Revue des Maladies Respiratoires* 29, 1238–1253.
- Bianchimano, A.S., Murray, M.G., Aztiria, M.E., Montes, B., Calfuán, M.L., Prat, M.I., 2014. Morphological and immunochemical characterization of the pollen grains of *Chenopodium album* L.(Chenopodiaceae) in a temperate urban area in Argentina. *Phyton, International Journal of Experimental Botany* 83, 9–15.
- Bist, A., Pandit, T., Bhatnagar, A.K., Singh, A.B., 2004. Variability in protein content of pollen of Castor bean (*Ricinus communis*) before and after exposure to the air pollutants SO and NO. *Grana* 43, 94–100. <https://doi.org/10.1080/00173130410019316>
- Bohlmann, S., Shang, X., Giannakaki, E., Filioglou, M., Saarto, A., Romakkaniemi, S., Komppula, M., 2019. Detection and characterization of birch pollen in the atmosphere using a multiwavelength Raman polarization lidar and Hirst-type pollen sampler in Finland. *Atmospheric Chemistry and Physics* 19, 14559–14569. <https://doi.org/10.5194/acp-19-14559-2019>
- Bonton, P., Boucher, A., Thonnat, M., Tomczak, R., Hidalgo, P.J., Belmonte, J., Galan, C., 2002. colour image in 2D and 3D microscopy for the automation of pollen rate measurement. *Image Analysis & Stereology* 21, 25–30.
- Borycka, K., Kasprzyk, I., 2018. Do the threats of alder and birch allergenic pollen differ within an urban area? *Urban Forestry & Urban Greening* 34, 281–293. <https://doi.org/10.1016/j.ufug.2018.07.013>
- Bosac, C., Black, V.J., Black, C.R., Roberts, J.A., Lockwood, F., 1993. Impact of O₃ and SO₂ on reproductive development in oilseed rape (*Brassica napus* L.). I. Pollen germination and pollen tube growth. *New Phytologist* 124, 439–446. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1993.tb03834.x>
- Boucher, A., Hidalgo, P., Thonnat, M., Belmonte, J., Galan, C., Bonton, P., Tomczak, R., 2002. Development of a semi-automatic system for pollen recognition. *Aerobiologia* 18, 195–201.
- Bousquet, J., van Cauwenberge, P., 2002. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) In collaboration with the World Health Organisation. *Primary Care Respiratory Journal* 11, 18–19. <https://doi.org/10.1038/pcrj.2002.7>
- Boyain-Goitia, A.R., Beddows, D.C., Griffiths, B.C., Telle, H.H., 2003. Single-pollen analysis by laser-induced breakdown spectroscopy and Raman microscopy. *Applied Optics* 42, 6119–6132.
- Brooks, J., Shaw, G., 1978. Sporopollenin: a review of its chemistry, palaeochemistry and geochemistry. *Grana* 17, 91–97.
- Broström, A., Nielsen, A.B., Gaillard, M.-J., Hjelle, K., Mazier, F., Binney, H., Bunting, J., Fyfe, R., Meltsov, V., Poska, A., Räsänen, S., Soepboer, W., von Stedingk, H., Suutari, H., Sugita, S., 2008. Pollen Productivity Estimates of Key European Plant Taxa for Quantitative Reconstruction of Past Vegetation: A Review. *Veget Hist Archaeobot* 17, 461–478. <https://doi.org/10.1007/s00334-008-0148-8>

- Brown, H.M., Irving, K.R., 1973. The size and weight of common allergenic pollens: an investigation of their number per microgram and size distribution. *Allergy* 28, 132–137.
- Buters, J.T., Thibaudon, M., Smith, M., Kennedy, R., Rantio-Lehtimäki, A., Albertini, R., Reese, G., Weber, B., Galan, C., Brandao, R., 2012. Release of Bet v 1 from birch pollen from 5 European countries. Results from the HIALINE study. *Atmospheric Environment* 55, 496–505.
- Buters, J.T.M., Weichenmeier, I., Ochs, S., Pusch, G., Kreyling, W., Boere, A.J.F., Schober, W., Behrendt, H., 2010. The allergen Bet v 1 in fractions of ambient air deviates from birch pollen counts. *Allergy* 65, 850–858.
- Caillaud et al., D., 2013. Non linear short-term effects of airborne pollen levels on clinical symptoms of seasonal allergic rhinitis in a panel study of 61 patients in France.
- Cakmak, S., Dales, R.E., Burnett, R.T., Judek, S., Coates, F., Brook, J.R., 2002. Effect of airborne allergens on emergency visits by children for conjunctivitis and rhinitis. *The Lancet* 359, 947–948.
- Calleja, M., Farrera, I., Almeras, T., Richard, P., Rossi, O., Vernier, D., Belmonte, J., Puigdemont, R., Plaisant, I., 2005. *Métrieologie des pollens dans l'air: Étude intercomparative en région Languedoc-Roussillon. Rapport final. Etude DRASS Languedoc-Roussillon 2.*
- Cariñanos, P., Alcázar, P., Galán, C., Navarro, R., Domínguez, E., 2004. Aerobiology as a tool to help in episodes of occupational allergy in work places. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 14, 300–308.
- Cerceau-Larrival, M.-T., Cauneau-Pigot, A., Bocquel, C., Carbonnier-Jarreau, M.C., Derouet, L., 1994. Elemental analysis of pollen grain surface: relation to allergenic character and use as a pollution marker. *Journal of trace and microprobe techniques* 12, 37–50.
- Cerceau-Larrival, M.-T., Nilsson, S., Cauneau-Pigot, A., Berggren, B., Derouet, L., Verhille, A.-M., Carbonnier-Jarreau, M.-C., 1991. The influence of the environment (natural and experimental) on the composition of the exine of allergenic pollen with respect to the deposition of pollutant mineral particles. *Grana* 30, 532–545.
- Chakra, O.A., Lacroix, G., Senechal, H., Thibaudon, M., 2010. Synergie pollen–polluants et rôle des facteurs météorologiques sur le risque de pollinose: évolution des consultations dans la région amiénoise pendant la saison pollinique 2007. *Revue française d'allergologie* 50, 443–449.
- Chapman, N., 2015. *Pollen microscopy.*
- Chassard, G., Choël, M., Gosselin, S., Vorng, H., Petitprez, D., Shahali, Y., Tsicopoulos, A., Visez, N., 2015. Kinetic of NO₂ uptake by *Phleum pratense* pollen: chemical and allergenic implications. *Environmental pollution* 196, 107–113.
- Chen, B.-Y., Chan, C.-C., Lee, C.-T., Cheng, T.-J., Huang, W.-C., Jhou, J.-C., Han, Y.-Y., Chen, C.-C., Guo, Y.L., 2012. The association of ambient air pollution with airway inflammation in schoolchildren. *American journal of epidemiology* 175, 764–774.
- Chen, C., Hendriks, E.A., Duin, R.P., Reiber, J.H., Hiemstra, P.S., Weger, L.A., Stoel, B.C., 2006. Feasibility study on automated recognition of allergenic pollen: grass, birch and mugwort. *Aerobiologia* 4, 275–284.
- Chichiriccò, G., Picozzi, P., 2007. Reversible inhibition of the pollen germination and the stigma penetration in *Crocus vernus* ssp. *vernus* (Iridaceae) following fumigations with NO₂, CO, and O₃ gases. *Plant Biology* 9, 730–735.
- Choël, M., Ivanovsky, A., Roose, A., Hamzé, M., Blanchenet, A.-M., Deboudt, K., Visez, N., 2020. Evaluation of Hirst-type sampler and PM 10 impactor for investigating adhesion of atmospheric particles onto allergenic pollen grains. *Aerobiologia* 36, 657–668.
- Choël, M., Ivanovsky, A., Roose, A., Hamzé, M., Blanchenet, A.-M., Visez, N., 2022. Quantitative assessment of coagulation of atmospheric particles onto airborne birch pollen grains. *Journal of Aerosol Science* 105944. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2021.105944>

- Choël, M., Visez, N., 2019. Altérations du grain de pollen par la pollution atmosphérique. *Revue française d'allergologie* 59, 555–562.
- Chropeňová, M., Gregušková, E.K., Karásková, P., Příbylová, P., Kukučka, P., Baráková, D., Čupr, P., 2016. Pine needles and pollen grains of *Pinus mugo* Turra—A biomonitoring tool in high mountain habitats identifying environmental contamination. *Ecological Indicators* 66, 132–142.
- Clot, B., 2007. Pollen dans l'air du Plateau suisse: paramètres climatiques et nouveaux risques pour les allergies (PhD Thesis). Université de Neuchâtel.
- Comtois, P., Gagnon, L., 1988. Concentration pollinique et fréquence des symptômes de pollinose: une méthode pour déterminer les seuils cliniques. *Revue française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* 28, 279–286.
- Cortegano, I., Civantos, E., Aceituno, E., Del Moral, A., Lopez, E., Lombardero, M., Del Pozo, V., Lahoz, C., 2004. Cloning and expression of a major allergen from *Cupressus arizonica* pollen, Cup a 3, a PR-5 protein expressed under polluted environment. *Allergy* 59, 485–490.
- Costa, C.M., Yang, S., 2009. Counting pollen grains using readily available, free image processing and analysis software. *Annals of Botany* 104, 1005–1010.
- Cuinica, Abreu, I., da Silva, J.C.E., 2013a. In vitro exposure of *Ostrya carpinifolia* and *Carpinus betulus* pollen to atmospheric levels of CO, O₃ and SO₂. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 2256–2262.
- Cuinica, L.G., Abreu, I., da Silva, J.C.E., 2014. In vitro exposure of *Ostrya carpinifolia* and *Carpinus betulus* pollen to atmospheric levels of CO, O₃ and SO₂. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 2256–2262.
- Cuinica, L.G., Abreu, I., Gomes, C.R., Esteves da Silva, J.C.G., 2013b. Exposure of *Betula pendula* Roth pollen to atmospheric pollutants CO, O₃ and SO₂. *Grana* 52, 299–304.
- Dahl, A., 2018. Pollen lipids can play a role in allergic airway inflammation. *Frontiers in immunology* 9, 2816.
- Dales, R.E., Cakmak, S., Judek, S., Coates, F., 2008. Tree pollen and hospitalization for asthma in urban Canada. *International archives of allergy and immunology* 146, 241–247.
- D'amato, G., 2000. Urban air pollution and plant-derived respiratory allergy. *Clin Exp Allergy* 30, 628–636.
- D'Amato, G., Cecchi, L., D'Amato, M., Liccardi, G., 2010. Urban air pollution and climate change as environmental risk factors of respiratory allergy: an update. *Journal of investigational allergology & clinical immunology* 20, 95.
- D'Amato, G., Russo, M., Liccardi, G., Saggese, M., Gentili, M., Mistrello, G., D'Amato, M., Falagiani, P., 1996. Comparison Between Outdoor and Indoor Airborne Allergenic Activity. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 77, 147–152. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)63501-6](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)63501-6)
- Damialis, A., Halley, J.M., Gioulekas, D., Vokou, D., 2007. Long-term trends in atmospheric pollen levels in the city of Thessaloniki, Greece. *Atmospheric Environment* 41, 7011–7021.
- Damialis, A., Häring, F., Gökkaya, M., Rauer, D., Reiger, M., Bezold, S., Bounas-Pyrros, N., Eyerich, K., Todorova, A., Hammel, G., Gilles, S., Traidl-Hoffmann, C., 2019. Human exposure to airborne pollen and relationships with symptoms and immune responses: Indoors versus outdoors, circadian patterns and meteorological effects in alpine and urban environments. *Science of The Total Environment* 653, 190–199. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.366>
- Darbah, J.N., Kubiske, M.E., Nelson, N., Oksanen, E., Vaapavuori, E., Karnosky, D.F., 2007. Impacts of elevated atmospheric CO₂ and O₃ on paper birch (*Betula papyrifera*): reproductive fitness. *TheScientificWorldJOURNAL* 7, 240–246.

- Davidson, C.I., Phalen, R.F., Solomon, P.A., 2005. Airborne particulate matter and human health: a review. *Aerosol Science and Technology* 39, 737–749.
- Davidson, D.A., Carter, S., Boag, B., Long, D., Tipping, R., Tyler, A., 1999. Analysis of pollen in soils: processes of incorporation and redistribution of pollen in five soil profile types. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 643–653.
- Davies, R.R., Smith, L.P., 1973. Forecasting the start and severity of the hay fever season. *Clinical & Experimental Allergy* 3, 263–267.
- De Blay, F., Lieutier-Colas, F., Krieger, P., Casel, S., Pauli, G., 2000. Asthme, allergie et polluants de l'habitat (à l'exception du tabac). *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* 40, 193–215.
- De Weger et al., L.A., 2013. Impact of pollen. in: sofiev m, bergmann k.(eds.) *Allergenic Pollen. A Review of the Production, Release, Distribution and Health Impacts*. Dordrecht, Springer Science+ Business Media.
- de Weger, L.A., Molster, F., de Raat, K., den Haan, J., Romein, J., van Leeuwen, W., de Groot, H., Mostert, M., Hiemstra, P.S., 2020. A new portable sampler to monitor pollen at street level in the environment of patients. *Science of the Total Environment* 741, 140404.
- Dell'Anna, R., Cristofori, A., Gottardini, E., Monti, F., 2010. A critical presentation of innovative techniques for automated pollen identification in aerobiological monitoring networks. US.
- DellaValle, C.T., Triche, E.W., Bell, M.L., 2012. Spatial and temporal modeling of daily pollen concentrations. *International journal of biometeorology* 56, 183–194.
- Demers, I., Institut national de santé publique du Québec, Direction de la santé environnementale et de la toxicologie, 2013. État des connaissances sur le pollen et les allergies: les assises pour une gestion efficace.
- Depciuch, J., Kasprzyk, I., Drzymala, E., Parlinska-Wojtan, M., 2018. Identification of birch pollen species using FTIR spectroscopy. *Aerobiologia* 34, 525–538.
- Depciuch, J., Kasprzyk, I., Roga, E., Parlinska-Wojtan, M., 2016a. Analysis of morphological and molecular composition changes in allergenic *Artemisia vulgaris* L. pollen under traffic pollution using SEM and FTIR spectroscopy. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 23203–23214.
- Depciuch, J., Kasprzyk, I., Sadik, O., Parlińska-Wojtan, M., 2016b. FTIR analysis of molecular composition changes in hazel pollen from unpolluted and urbanized areas. *Aerobiologia* 33, 1–12.
- Diaz-Sanchez, D., 1997. The role of diesel exhaust particles and their associated polyaromatic hydrocarbons in the induction of allergic airway disease. *Allergy* 52, 52–56; discussion 57–58. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1997.tb04871.x>
- Dickinson, H.G., Elleman, C.J., Doughty, J., 2000. Pollen coatings—chimaeric genetics and new functions. *Sexual Plant Reproduction* 12, 302–309.
- Diethart, B., Sam, S., Weber, M., 2007. Walls of allergenic pollen: Special reference to the endexine. *Grana* 46, 164–175.
- Di-Giovanni, F., Kevan, P.G., 1991. Factors affecting pollen dynamics and its importance to pollen contamination: a review. *Canadian Journal of Forest Research* 21, 1155–1170.
- Dockery, D.W., Pope, C.A., Xu, X., Spengler, J.D., Ware, J.H., Fay, M.E., Ferris Jr, B.G., Speizer, F.E., 1993. An association between air pollution and mortality in six US cities. *New England journal of medicine* 329, 1753–1759.
- Dockery, D.W., Stone, P.H., 2007. *Cardiovascular Risks from Fine Particulate Air Pollution*. Mass Medical Soc.
- Domínguez, E., Mercado, J.A., Quesada, M.A., Heredia, A., 1999. Pollen sporopollenin: degradation and structural elucidation. *Sexual Plant Reproduction* 12, 171–178.

- Duque, L., Guimarães, F., Ribeiro, H., Sousa, R., Abreu, I., 2013. Elemental characterization of the airborne pollen surface using Electron Probe Microanalysis (EPMA). *Atmospheric Environment* 75, 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2013.04.040>
- Duque, L., Guimarães, F., Ribeiro, H., Sousa, R., Abreu, I., 2012. Airborne Platanus Pollen Analysis by EPMA. *Microscopy and Microanalysis* 18, 39.
- Durham, O.C., 1946. The volumetric incidence of atmospheric allergens: III. Rate of fall of pollen grains in still air. *Journal of Allergy* 17, 70–78.
- Dybendal, T., Vik, H., Elsayed, S., 1989. Dust from carpeted and smooth floors. *Allergy* 44, 401–411. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1989.tb04171.x>
- Eckl-Dorna, J., Klein, B., Reichenauer, T.G., Niederberger, V., Valenta, R., 2010. Exposure of rye (*Secale cereale*) cultivars to elevated ozone levels increases the allergen content in pollen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 126, 1315–1317.
- Edlund, A.F., Swanson, R., Preuss, D., 2004. Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. *The Plant Cell* 16, S84–S97.
- Emberlin, J., Norris-Hill, J., 1991. Spatial variation of pollen deposition in North London. *Grana* 30, 190–195.
- Enomoto, T., Onishi, S., Sogo, H., Dake, Y., Ikeda, H., Funakoshi, H., Shibano, A., Sakoda, T., 2004. Japanese cedar pollen in floating indoor house dust after a pollinating season. *Allergology International* 53, 279–285.
- EPA, U., 2003. Ozone. Good up high Bad nearby. Washington.
- Erdtman, G., 1943. An introduction to pollen analysis *Chronica Botanica Company*. Company, Waltham, Massachusetts, USA.
- Faegri, K., Kaland, P.E., Krzywinski, K., 1989. Textbook of pollen analysis. John Wiley & Sons Ltd.
- Fahlbusch, B., Hornung, D., Heinrich, J., Dahse, H.-M., Jäger, L., 2000. Quantification of group 5 grass pollen allergens in house dust. *Clinical & Experimental Allergy* 30, 1646–1652.
- Fahlbusch, B., Hornung, D., Heinrich, J., Jäger, L., 2001. Predictors of group 5 grass-pollen allergens in settled house dust: comparison between pollination and nonpollination seasons. *Allergy* 56, 1081–1086. <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2001.00106.x>
- Farah, J., Choël, M., de Nadaï, P., Balsamelli, J., Gosselin, S., Visez, N., 2021. Organic and aqueous extraction of lipids from birch pollen grains exposed to gaseous pollutants. *Environmental Science and Pollution Research* 1–12.
- Farah, J., Choël, M., de Nadaï, P., Gosselin, S., Petitprez, D., Baroudi, M., Visez, N., 2019. Extractable lipids from *Phleum pratense* pollen grains and their modifications by ozone exposure. *Aerobiologia*. <https://doi.org/10.1007/s10453-019-09617-8>
- Farrera, I., Calleja, M., Dechamp, C., 2002. Indoor and outdoor pollen sedimentation in the Rhone-Alpes region during the ragweed pollination season. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* 42, 750–753.
- Feder, W.A., 1986. Predicting species response to ozone using a pollen screen, in: *Biotechnology and Ecology of Pollen*. Springer, pp. 89–94.
- Feder, W.A., 1981. Bioassaying for ozone with pollen systems. *Environmental Health Perspectives* 37, 117–123.
- Feder, W.A., 1968. Reduction in tobacco pollen germination and tube elongation, induced by low levels of ozone. *Science* 160, 1122–1122.
- Feo Brito, F.F., Gimeno, P.M., Carnés, J., Fernández-Caldas, E., Lara, P., Alonso, A.M., García, R., Guerra, F., 2010. Grass pollen, aeroallergens, and clinical symptoms in Ciudad Real, Spain. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 20, 295–302.

- Fernández-Rodríguez, S., Tormo-Molina, R., Maya-Manzano, J.M., Silva-Palacios, I., Gonzalo-Garijo, Á., 2014a. Comparative study of the effect of distance on the daily and hourly pollen counts in a city in the south-western Iberian Peninsula. *Aerobiologia*.
- Fernández-Rodríguez, S., Tormo-Molina, R., Maya-Manzano, J.M., Silva-Palacios, I., Gonzalo-Garijo, Á., 2014b. comparative study on the effects of altitude on daily and hourly airborne pollen counts. *Aerobiologia*.
- Ferreira, B., Ribeiro, H., Pereira, M.S., Cruz, A., Abreu, I., 2016. Effects of ozone in *Plantago lanceolata* and *Salix atrocinerea* pollen. *Aerobiologia* 32, 421–430.
- Fiorina, A., Scordamaglia, A., Mincarini, M., Fregonese, L., Canonica, G.W., 1997. Aerobiologic particle sampling by a new personal collector (Partrap FA52) in comparison to the Hirst (Burkard) sampler. *Allergy* 52, 1026–1030.
- Frank, U., Ernst, D., 2016. Effects of NO₂ and ozone on pollen allergenicity. *Frontiers in plant science* 7, 91.
- Franze, T., Weller, M.G., Niessner, R., Pöschl, U., 2005. Protein nitration by polluted air. *Environmental science & technology* 39, 1673–1678.
- Frei, T., Gassner, E., 2008. Climate change and its impact on birch pollen quantities and the start of the pollen season an example from Switzerland for the period 1969–2006. *International Journal of Biometeorology* 52, 667.
- Frenguelli, G., 2004. Pollen structure and morphology. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii* 20, 200–204.
- Frenz, D.A., 2000. The effect of windspeed on pollen and spore counts collected with the Rotorod Sampler and Burkard spore trap. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 85, 392–394. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)62553-7](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)62553-7)
- Freytet, F., 2020. Mesurer des arbres.
- Galán, C., Ariatti, A., Bonini, M., Clot, B., Crouzy, B., Dahl, A., Fernandez-González, D., Frenguelli, G., Gehrig, R., Isard, S., 2017. Recommended terminology for aerobiological studies. *Aerobiologia* 33, 293–295.
- Galán, C.G., González, P.C., Teno, P.A., Vilches, E.D., 2007. Spanish Aerobiology Network (REA): Management and Quality Manual.
- Ghiani, A., Aina, R., Asero, R., Bellotto, E., Citterio, S., 2012. Ragweed pollen collected along high-traffic roads shows a higher allergenicity than pollen sampled in vegetated areas. *Allergy* 67, 887–894.
- Gilles, S., Behrendt, H., Ring, J., Traidl-Hoffmann, C., 2012. The pollen enigma: modulation of the allergic immune response by non-allergenic, pollen-derived compounds. *Current pharmaceutical design* 18, 2314–2319.
- Glorennec, P., Chaigneau, T., Coftier, A., Delannoy, M., Esteve, W., Herrera, H., Le-Bot, B., Noack, Y., Pelfrêne, A., Nadif, R., 2019. Exposition aux poussières sédimentées dans les environnements intérieurs (PhD Thesis). ANSES: Glorennec, Philippe Chaigneau, Thomas Coftier, Aline Delannoy
- Gong, Z., Pan, Y.-L., Videen, G., Wang, C., 2019. Chemical reactions of single optically trapped bioaerosols in a controlled environment. *Aerosol Science and Technology* 53, 853–859.
- González-Díaz, S.N., Arias-Cruz, A., Macouzet-Sánchez, C., Partida-Ortega, A.B., 2016. Impact of air pollution in respiratory allergic diseases. *Medicina Universitaria* 18, 212–215.
- González-Mancera, G., Gómez-Lizarraga, L.E., Morales-García, J., 2021. SEM and TEM Cross-section films Study of *Chrysanthemum leucanthemum* (Asteraceae) Pollen from Costa Rica. *Microscopy and Microanalysis* 27, 1722–1723. <https://doi.org/10.1017/S1431927621006292>
- Goschnick, J., Schuricht, J., 1996. Surface and depth analysis of pollen treated with atmospheric trace gases. *Journal of Aerosol Science* S229–S230.

- Gottardini, E., Cristofolini, F., Paoletti, E., Lazzeri, P., Peponi, G., 2004. Pollen Viability for Air Pollution Bio-Monitoring. *Journal of Atmospheric Chemistry* 49, 149–159.
- Graham, J.A.H., Pavlicek, P.K., Sercombe, J.K., Xavier, M.L., Tovey, E.R., 2000. The nasal air sampler: a device for sampling inhaled aeroallergens. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 84, 599–604.
- Grote, M., 1999. In situ localization of pollen allergens by immunogold electron microscopy: allergens at unexpected sites. *International archives of allergy and immunology* 118, 1–6.
- Grote, M., Valenta, R., Reichelt, R., 2003. Abortive pollen germination: a mechanism of allergen release in birch, alder, and hazel revealed by immunogold electron microscopy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111, 1017–1023.
- Grote, M., Vrtala, S., Niederberger, V., Wiermann, R., Valenta, R., Reichelt, R., 2001. Release of allergen-bearing cytoplasm from hydrated pollen: a mechanism common to a variety of grass (Poaceae) species revealed by electron microscopy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 108, 109–115.
- Grote, M., Vrtala, S., Valenta, R., 1993. Monitoring of two allergens, Bet v I and profilin, in dry and rehydrated birch pollen by immunogold electron microscopy and immunoblotting. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 41, 745–750.
- Guedes, A., Ribeiro, N., Ribeiro, H., Oliveira, M., Noronha, F., Abreu, I., 2009. Comparison between urban and rural pollen of *Chenopodium alba* and characterization of adhered pollutant aerosol particles. *Journal of Aerosol Science* 40, 81–86.
- Guérin, B., 1993. *Pollen et allergies* Ed. Allerbio.
- Gute, E., David, R.O., Kanji, Z.A., Abbatt, J.P.D., 2020. Ice Nucleation Ability of Tree Pollen Altered by Atmospheric Processing. *ACS Earth Space Chem.* <https://doi.org/10.1021/acsearthspacechem.0c00218>
- Halbritter, H., Ulrich, S., Grímsson, F., Weber, M., Zetter, R., Hesse, M., Buchner, R., Svojtka, M., Frosch-Radivo, A., 2018. *Illustrated pollen terminology*. Springer.
- Harrison, B.H., Feder, W.A., 1974. Ultrastructural changes in pollen exposed to ozone. *Phytopathology*.
- Hasnain, S.M., Katelaris, C.H., Newbegin, E., Singh, A.B., 2007. Aeroallergen monitoring standard for the Asia Pacific Region. World Allergy Organization: Milwaukee, MI, USA.
- Henricsson, S., Westerholm, R., Nilsson, S., Berggren, B., 1996. Chemical characterisation of extractable compounds found in the coating of birch (*Betula*) pollen. *Grana* 35, 179–184.
- Heslop-Harrison, J., 1968. Tapetal origin of pollen-coat substances in *Lilium*. *New Phytologist* 67, 779–786.
- Hicks, S., Helander, M., Heino, S., 1994. Birch pollen production, transport and deposition for the period 1984–1993 at Kevo, northernmost Finland. *Aerobiologia* 10, 183–191.
- Hirst, J.M., 1952. An Automatic Volumetric Spore Trap. *Annals of Applied Biology* 39, 257–265.
- Hjelmroos, M., Schumacher, M.J., Van Hage-Hamsten, M., 1995. Heterogeneity of pollen proteins within individual *Betula pendula* trees. *International archives of allergy and immunology* 108, 368–376.
- Holmquist, L., Vesterberg, O., Munksgaard International Publishers, 1999. *Quantification of Birch and Grass Pollen Allergens in Indoor Air*.
- Holmquist, L., Weiner, J., Vesterberg, O., 2001. Airborne birch and grass pollen allergens in street-level shops. *Indoor Air* 11, 241–245.
- Hong, Q., Zhou, S., Zhao, H., Peng, J., Li, Y., Shang, Y., Wu, M., Zhang, W., Lu, S., Li, S., 2018. Allergenicity of recombinant *Humulus japonicus* pollen allergen 1 after combined exposure to ozone and nitrogen dioxide. *Environmental pollution* 234, 707–715.

- House, A., Balkwill, K., 2013. FIB-SEM: an additional technique for investigating internal structure of pollen walls. *Microscopy and Microanalysis* 19, 1535–1541.
- Howlett, B.J., Knox, R.B., Heslop-Harrison, J., 1973. Pollen-wall proteins: release of the allergen antigen E from intine and exine sites in pollen grains of ragweed and *Cosmos*. *Journal of cell science* 13, 603–619.
- Hugg, T., Rantio-Lehtimäki, A., 2007. Indoor and outdoor pollen concentrations in private and public spaces during the *Betula* pollen season. *Aerobiologia* 23, 119–129. <https://doi.org/10.1007/s10453-007-9057-z>
- Hugg, T., Yli-Panula, E., Rantio-Lehtimäki, A., 2011. Pollen and pollen allergens in indoor environments, in: *In Microorganisms in Home and Indoor Work Environments: Diversity, Health Impacts, Investigation and Control*. pp. 45–53.
- Hugg, T.T., Hjort, J., Antikainen, H., Rusanen, J., Tuokila, M., Korkonen, S., Weckström, J., Jaakkola, M.S., Jaakkola, J.J.K., 2017. Urbanity as a determinant of exposure to grass pollen in Helsinki Metropolitan area, Finland. *PLOS ONE* 12, e0186348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186348>
- Huss-Marp, J., Brockow, K., Darsow, U., Pfab, F., Krämer, U., Ring, J., Behrendt, H., 2008. Exposure of grass pollen to volatile organic compounds enhances skin prick test reactivity.
- Hyde, H.A., 1950. Studies in atmospheric pollen. IV. Pollen deposition in Great Britain, 1943. Part I. The influence of situation and weather. *The New Phytologist* 49, 398–406.
- Iannotti, O., Mincigrucci, G., Bricchi, E., Frenguelli, G., 2000. Pollen viability as a bio-indicator of air quality. *Aerobiologia* 16, 361–365.
- Ishibashi, Y., Ohno, H., Oh-ishi, S., Matsuoka, T., Kizaki, T., Yoshizumi, K., 2008. Characterization of pollen dispersion in the neighborhood of Tokyo, Japan in the spring of 2005 and 2006. *International journal of environmental research and public health* 5, 76–85.
- Ivleva, N.P., Niessner, R., Panne, U., 2005. Characterization and discrimination of pollen by Raman microscopy. *Analytical and bioanalytical chemistry* 381, 261–267.
- Iwano, M., Wada, M., Morita, Y., Shiba, H., Takayama, S., Isogai, A., 1999. X-ray microanalysis of papillar cells and pollen grains in the pollination process in *Brassica* using a variable-pressure scanning electron microscope. *Microscopy* 48, 909–917.
- Jacobs, R.L., Harper, N., He, W., Andrews, C.P., Rather, C.G., Ramirez, D.A., Ahuja, S.K., 2012. Responses to ragweed pollen in a pollen challenge chamber versus seasonal exposure identify allergic rhinoconjunctivitis endotypes. *Journal of allergy and clinical immunology* 130, 122–127.
- Jacques, L., 2008. Prévalence des manifestations allergiques associées à l’herbe à poux chez les enfants de l’Île de Montréal. Direction de santé publique, Agence de la santé et des services sociaux de
- Jantunen et al, J., Saarinen, K., 2009. Intrusion of airborne pollen through open windows and doors. *Aerobiologia* 25, 193–201.
- Jantunen, J., Saarinen, K., 2011. Pollen transport by clothes. *Aerobiologia* 27, 339–343. <https://doi.org/10.1007/s10453-011-9200-8>
- Jato, Rodríguez-Rajo, F.J., Aira, M.J., 2007. Use of phenological and pollen-production data for interpreting atmospheric birch pollen curves. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 14.
- Jochner, S., Lüpke, M., Laube, J., Weichenmeier, I., Pusch, G., Traidl-Hoffmann, C., Schmidt-Weber, C., Buters, J.T., Menzel, A., 2015. Seasonal variation of birch and grass pollen loads and allergen release at two sites in the German Alps. *Atmospheric environment* 122, 83–93.
- Kalbande, D.M., Dhadse, S.N., Chaudhari, P.R., Wate, S.R., 2008. Biomonitoring of heavy metals by pollen in urban environment. *Environmental monitoring and assessment* 138, 233.

- Kalkar Surekha, A., Renu, J., 2014. Effects of industrial pollution on pollen morphology of Cassia species. *International journal of Life Sciences* 2, 17–22.
- Kanter, U., Heller, W., Durner, J., Winkler, J.B., Engel, M., Behrendt, H., Holzinger, A., Braun, P., Hauser, M., Ferreira, F., 2013. Molecular and immunological characterization of ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) pollen after exposure of the plants to elevated ozone over a whole growing season. *PloS one* 8, e61518.
- Käpälä, M., 1981. An evaluation of the microscopical counting methods of the tape in Hirst-Burkard pollen and spore trap. *Grana* 20, 131–141.
- Katellaris, C.H., Burke, T.V., Byth, K., 2004. Spatial variability in the pollen count in Sydney, Australia: can one sampling site accurately reflect the pollen count for a region? *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 93, 131–136.
- Katz, D.S., Batterman, S.A., 2020. Urban-scale variation in pollen concentrations: A single station is insufficient to characterize daily exposure. *Aerobiologia* 36, 417–431.
- Katz, D.S., Morris, J.R., Batterman, S.A., 2020. Pollen production for 13 urban North American tree species: allometric equations for tree trunk diameter and crown area. *Aerobiologia* 36, 401–415.
- Kawashima, S., Thibaudon, M., Matsuda, S., Fujita, T., Lemonis, N., Clot, B., Oliver, G., 2017. Automated pollen monitoring system using laser optics for observing seasonal changes in the concentration of total airborne pollen. *Aerobiologia* 1–12. <https://doi.org/10.1007/s10453-017-9474-6>
- Kim, K.-H., Jahan, S.A., Kabir, E., 2013. A review on human health perspective of air pollution with respect to allergies and asthma. *Environment international* 59, 41–52.
- Kim, K.-H., Kabir, E., Kabir, S., 2015. A review on the human health impact of airborne particulate matter. *Environment international* 74, 136–143.
- Knox, R.B., 1984. The pollen grain, in: *Embryology of Angiosperms*. Springer, pp. 197–271.
- Knox, R.B., Suphioglu, C., Taylor, P., Desai, R., Watson, H.C., Peng, J.-L., Bursill, L.A., 1997. Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution. *Clinical & Experimental Allergy* 27, 246–251.
- Koivikko, A., Kupias, R., Mäkinen, Y., Pohjola, A., 1986. Pollen seasons: Forecasts of the most important allergenic plants in Finland. *Allergy* 41, 233–242.
- Kubik-Komar, A., Piotrowska-Weryszko, K., Kuna-Broniowska, I., Weryszko-Chmielewska, E., Kaszewski, B.M., 2021. Analysis of changes in *Betula* pollen season start including the cycle of pollen concentration in atmospheric air. *Plos one* 16, e0256466.
- Laaidi, K., Laaidi, M., Besancenot, J.-P., 1997. Pollens, pollinoses et météorologie.
- Laaidi, M., Laaidi, K., Besancenot, J.-P., 2002. Synergy between pollen and air chemical pollutants: The cross risks. *Environnement, Risques et Sante* 1, 42–49.
- Lane, S.J., Sousa, A.R., Lee, T.H., 1994. The role of the macrophage in asthma. *Allergy* 49, 201.
- Latalowa, M., Miętus, M., Uruska, A., 2002. Seasonal variations in the atmospheric *Betula* pollen count in Gdańsk (southern Baltic coast) in relation to meteorological parameters. *Aerobiologia* 18, 33–43.
- Latorre, F., Romero, E.J., Mancini, M., 2008. Comparative study of different methods for capturing airborne pollen, and effects of vegetation and meteorological variables. *Aerobiologia* 24, 107–120.
- Laucks, M.L., Roll, G., Schweiger, G., Davis, E.J., 2000. Physical and chemical (Raman) characterization of bioaerosols—pollen. *Journal of Aerosol Science* 31, 307–319.
- Lavaud, F., Fore, M., Fontaine, J.-F., Pérotin, J.M., de Blay, F., 2014. Allergie au pollen de bouleau. *Revue des maladies respiratoires* 31, 150–161.

- Lee, Grinshpun, S.A., Martuzevicius, D., Adhikari, A., Crawford, C.M., Luo, J., Reponen, T., 2006. Relationship between indoor and outdoor bioaerosols collected with a button inhalable aerosol sampler in urban homes. *Indoor Air* 16, 37–47. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0668.2005.00396.x>
- Leisner, C.P., Ainsworth, E.A., 2012. Quantifying the effects of ozone on plant reproductive growth and development. *Global Change Biology* 18, 606–616.
- Levetin, E., 2004. Methods for aeroallergen sampling. *Curr Allergy Asthma Rep* 4, 376–383. <https://doi.org/10.1007/s11882-004-0088-z>
- Levetin, E., Rogers, C.A., Hall, S.A., 2000. Comparison of pollen sampling with a Burkard Spore Trap and a Tauber Trap in a warm temperate climate. *Grana* 39, 294–302.
- Levetin, E., Van de Water, P., 2008. Changing pollen types/concentrations/distribution in the United States: fact or fiction? *Current allergy and asthma reports* 8, 418–424.
- Lewis, S.A., Corden, J.M., Forster, G.E., Newlands, M., 2000. Combined effects of aerobiological pollutants, chemical pollutants and meteorological conditions on asthma admissions and A & E attendances in Derbyshire UK, 1993–96. *Clinical & Experimental Allergy* 30, 1724–1732.
- Liu, F., Lakey, P.S., Berkemeier, T., Tong, H., Kunert, A.T., Meusel, H., Cheng, Y., Su, H., Fröhlich-Nowoisky, J., Lai, S., 2017. Atmospheric protein chemistry influenced by anthropogenic air pollutants: nitration and oligomerization upon exposure to ozone and nitrogen dioxide. *Faraday discussions* 200, 413–427.
- Longhi, S., Cristofori, A., Gatto, P., Cristofolini, F., Grando, M.S., Gottardini, E., 2009. Biomolecular identification of allergenic pollen: a new perspective for aerobiological monitoring? *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 6, 508–514.
- Lu, S., Ren, J., Hao, X., Liu, D., Zhang, R., Wu, M., Yi, F., Lin, J., Shinich, Y., Wang, Q., 2014. Characterization of protein expression of *Platanus* pollen following exposure to gaseous pollutants and vehicle exhaust particles. *Aerobiologia* 30, 281–291.
- Mainelis, G., 2020. Bioaerosol sampling: Classical approaches, advances, and perspectives. *Aerosol Science and Technology* 54, 496–519.
- Makinen et al, 1981. Makinen Y. 1981, Random sampling in the study of microscopic slides.
- Marks, G.B., Colquhoun, J.R., Girgis, S.T., Koski, M.H., Treloar, A.B.A., Hansen, P., Downs, S.H., Car, N.G., 2001. Thunderstorm outflows preceding epidemics of asthma during spring and summer. *Thorax* 56, 468–471.
- Martonen, T.B., O’rourke, M.K., 1993. Disposition of mulberry pollen in the human respiratory system: a mathematical model. *Grana* 32, 290–301.
- Masaru, N., Syozo, F., Saburo, K., 1976. Effects of exposure to various injurious gases on germination of lily pollen. *Environmental Pollution (1970)* 11, 181–187.
- Masuch, G., Franz, J.-T., Schoene, K., Müsken, H., Bergmann, K.-C., 1997. Ozone increases group 5 allergen content of *Lolium perenne*. *Allergy* 52, 874–875.
- May, K.R., Clifford, R., 1967. The impaction of aerosol particles on cylinders, spheres, ribbons and discs. *Annals of Occupational Hygiene* 10, 83–95.
- Maya-Manzano, J.M., Smith, M., Markey, E., Hourihane Clancy, J., Sodeau, J., O’Connor, D.J., 2021. Recent developments in monitoring and modelling airborne pollen, a review. *Grana* 60, 1–19. <https://doi.org/10.1080/00173134.2020.1769176>
- MEL, 2021. Métropole Européenne de Lille [WWW Document]. URL <https://opendata.lillemetropole.fr/>
- Menzel, A., Matiu, M., Michaelis, R., Jochner, S., 2017. Indoor birch pollen concentrations differ with ventilation scheme, room location, and meteorological factors. *Indoor Air* 27, 539–550. <https://doi.org/10.1111/ina.12351>

- Meusel, H., Elshorbany, Y., Kuhn, U., Bartels-Rausch, T., Reinmuth-Selzle, K., Kampf, C.J., Li, G., Wang, X., Lelieveld, J., Pöschl, U., 2017. Light-induced protein nitration and degradation with HONO emission. *Atmospheric Chemistry and Physics* 17, 11819–11833.
- Meuter-Gerhards, A., Riegert, S., Wiermann, R., 1999. Studies on sporopollenin biosynthesis in *Cucurbita maxima* (DUCH.)—II. The involvement of aliphatic metabolism. *Journal of Plant Physiology* 154, 431–436.
- Miki, K., Kawashima, S., Kobayashi, S., Takeuchi, S., Tseng, Y.-T., Nakamura, K., 2021. Evaluating inaccurate pollen concentrations caused by turbulence using passive sampler. *Aerobiologia* 1–12.
- Molfino, N.A., Wright, S., Katz, I., Tarlo, S., Silverman, F., McClean, P.A., Slutsky, A.S., Zamel, N., Szalai, J.P., Raizenne, M., 1991. Effect of low concentrations of ozone on inhaled allergen responses in asthmatic subjects. *The Lancet* 338, 199–203.
- Mondol, A.S., Patel, M.D., Rüger, J., Stiebing, C., Kleiber, A., Henkel, T., Popp, J., Schie, I.W., 2019. Application of high-throughput screening Raman spectroscopy (HTS-RS) for label-free identification and molecular characterization of Pollen. *Sensors* 19, 4428.
- Moneret-Vautrin, D.A., 1994. Guide du praticien en immuno-allergologie. (DEPRECIATED).
- Monnier, S., Thibaudon, M., Besancenot, J.P., Sindt, C., Oliver, G., 2021. Pollens et changement climatique. *Revue Française d'Allergologie* 61, 246.
- Morgan, R.M., Allen, E., King, T., Bull, P.A., 2014. The spatial and temporal distribution of pollen in a room: Forensic implications. *Science & Justice* 54, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2013.03.005>
- Motta, A.C., Marliere, M., Peltre, G., Sterenberg, P.A., Lacroix, G., 2006. Traffic-related air pollutants induce the release of allergen-containing cytoplasmic granules from grass pollen. *International archives of allergy and immunology* 139, 294–298.
- Mueller, M.J., 1998. Radically novel prostaglandins in animals and plants: the isoprostanes. *Chemistry & biology* 5, R323–R333.
- Mullins, J., Emberlin, J., 1997. Sampling pollens. *Journal of Aerosol Science, Sampling and Rapid Assay of Bioaerosols* 28, 365–370. [https://doi.org/10.1016/S0021-8502\(96\)00439-9](https://doi.org/10.1016/S0021-8502(96)00439-9)
- Mumford, R.A., Lipke, H., Laufer, D.A., Feder, W.A., 1972. Ozone-induced changes in corn pollen. *Environmental Science & Technology* 6, 427–430.
- Naas, O., Mendez, M., Quijada, M., Gosselin, S., Farah, J., Choukri, A., Visez, N., 2016. Chemical modification of coating of *Pinus halepensis* pollen by ozone exposure. *Environmental pollution* 214, 816–821.
- Namork, E., Johansen, B.V., Løvik, M., 2006. Detection of allergens adsorbed to ambient air particles collected in four European cities. *Toxicology letters* 165, 71–78.
- Nayar, T.S., Jothish, P.S., 2013. An assessment of the air quality in indoor and outdoor air with reference to fungal spores and pollen grains in four working environments in Kerala, India. *Aerobiologia* 29, 131–152. <https://doi.org/10.1007/s10453-012-9269-8>
- Niederberger, V., Laffer, S., Kraft, D., Rumpold, H., Valenta, R., Spitzauer, S., 1998. IgE antibodies to recombinant pollen allergens (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, and Bet v 2) account for a high percentage of grass pollen-specific IgE. *Journal of allergy and clinical immunology* 101, 258–264.
- Nilsson, S., Berggren, B., 1991. Various methods to determine air pollutants on pollen grains. *Grana* 30, 553–556.
- O'Connor, D.J., Iacopino, D., Healy, D.A., O'Sullivan, D., Sodeau, J.R., 2011. The intrinsic fluorescence spectra of selected pollen and fungal spores. *Atmospheric Environment* 45, 6451–6458.

- Okuda, M., Ohkubo, K., Gotoh, M., Hiroshima, K., Ishida, Y., Hori, K., 2005. Dynamics of airborne pollen particles from inhalation to allergic reaction in the nose. *Rhinology* 43, 29–33.
- Okuyama, Y., Matsumoto, K., Okochi, H., Igawa, M., 2007. Adsorption of air pollutants on the grain surface of Japanese cedar pollen. *Atmospheric Environment* 41, 253–260.
- OMS, 2021. Lignes directrices OMS relatives à la qualité de l'air: particules (PM_{2,5} et PM₁₀), ozone, dioxyde d'azote, dioxyde de soufre et monoxyde de carbone: résumé d'orientation, in: Lignes Directrices OMS Relatives à La Qualité de l'air: Particules (PM_{2,5} et PM₁₀), Ozone, Dioxyde d'azote, Dioxyde de Soufre et Monoxyde de Carbone: Résumé d'orientation.
- OMS, 2011. OMS. (2011). Santé et qualité de l'air. Aide-mémoire N°313.
- Ørby, P.V., Peel, R.G., Skjøth, C., Schlünssen, V., Bønløkke, J.H., Ellermann, T., Brændholt, A., Sigsgaard, T., Hertel, O., 2015. An assessment of the potential for co-exposure to allergenic pollen and air pollution in Copenhagen, Denmark. *Urban Climate* 14, 457–474.
- Ormstad et al., H., 2000. Suspended particulate matter in indoor air: adjuvants and allergen carriers. *Toxicology* 152, 53–68.
- Ormstad, H., Johansen, B., Gaarder, P., 1998. Airborne house dust particles and diesel exhaust particles as allergen carriers. *Clinical and Experimental Allergy* 28, 702–708.
- O'Rourke, M.K., Lebowitz, M.D., 1984. A comparison of regional atmospheric pollen with pollen collected at and near homes. *Grana* 23, 55–64. <https://doi.org/10.1080/00173138409428877>
- O'Rourke, M.K., Quackenboss, J.J., Lebowitz, M.D., 1989. An epidemiological approach investigating respiratory disease response in sensitive individuals to indoor and outdoor pollen exposure in Tucson, Arizona. *Aerobiologia* 5, 104–110. <https://doi.org/10.1007/BF02486508>
- Osborne, N.J., Alcock, I., Wheeler, B.W., Hajat, S., Sarran, C., Clewlow, Y., McInnes, R.N., Hemming, D., White, M., Vardoulakis, S., Fleming, L.E., 2017. Pollen exposure and hospitalization due to asthma exacerbations: daily time series in a European city. *Int J Biometeorol* 61, 1837–1848. <https://doi.org/10.1007/s00484-017-1369-2>
- Oteros, J., Pusch, G., Weichenmeier, I., Heimann, U., Möller, R., Röseler, S., Traidl-Hoffmann, C., Schmidt-Weber, C., Buters, J.T., 2015. Automatic and online pollen monitoring. *International archives of allergy and immunology* 167, 158–166.
- Ouyang, Y., Xu, Z., Fan, E., Li, Y., Zhang, L., 2016. Effect of nitrogen dioxide and sulfur dioxide on viability and morphology of oak pollen, in: *International Forum of Allergy & Rhinology*. Wiley Online Library, pp. 95–100.
- Pacini, E., Hesse, M., 2005. Pollenkitt—its composition, forms and functions. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 200, 399–415.
- Päkkönen, E., Holopainen, T., Kärenlampi, L., 1997. Variation in ozone sensitivity of *Betula pendula* and *Betula pubescens* clones from southern and central Finland. *Environ. Pollut* 95, 37–44.
- PalDat, 2022. Society for the Promotion of Palynological Research in Austria.
- Pappas, C.S., Tarantilis, P.A., Harizanis, P.C., Polissiou, M.G., 2003. New method for pollen identification by FT-IR spectroscopy. *Applied spectroscopy* 57, 23–27.
- Pasqualini, S., Tedeschini, E., Frenguelli, G., Wopfner, N., Ferreira, F., D'Amato, G., Ederli, L., 2011. Ozone affects pollen viability and NAD (P) H oxidase release from *Ambrosia artemisiifolia* pollen. *Environmental Pollution* 159, 2823–2830.
- Patterson et al, R, Burge H, editors., Council, N.R., 1993. Indoor allergens: assessing and controlling adverse health effects. National Academies Press.
- Pawankar, R., Canonica, G.W., Holgate, S.T., Lockey, R.F., 2011. White book on allergy 2011–2012 executive summary. World Allergy Organization.
- Payne, W.W., 1972. Observations of harmomegathy in pollen of Anthophyta. *Grana* 12, 93–98.
- Pearce, N., Pekkanen, J., Beasley, R., 1999. How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax* 54, 268–272.

- Peel, R.G., Hertel, O., Smith, M., Kennedy, R., 2013. Personal exposure to grass pollen: relating inhaled dose to background concentration. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 111, 548–554. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2013.09.002>
- Peltre, G., 1998. Inter-relationship between allergenic pollens and air pollution. *Allerg Immunol (Paris)* 30, 324–326.
- Peltre, G., Derouet, L., Cerceau-Larrival, M.-T., 1991. Model treatments simulating environmental action on allergenic *Dactylis glomerata* pollen. *Grana* 30, 59–61.
- Penel, V., Calleja, M., Pichot, C., Charpin, D., 2017. Static and elevated pollen traps do not provide an accurate assessment of personal pollen exposure. *European annals of allergy and clinical immunology* 49, 59–65.
- Pereira, S., Fernández-González, M., Guedes, A., Abreu, I., Ribeiro, H., 2021. The Strong and the Stronger: The Effects of Increasing Ozone and Nitrogen Dioxide Concentrations in Pollen of Different Forest Species. *Forests* 12, 88. <https://doi.org/10.3390/f12010088>
- Pereira, S., Fernández-González, M., Guedes, A., Abreu, I., Ribeiro, H., 2021b. The strong and the stronger: the effects of increasing ozone and nitrogen dioxide concentrations in pollen of different forest species. *Forests* 12, 88.
- Pereira, S.G., Guedes, A., Abreu, I., Ribeiro, H., 2021a. Testing the Raman parameters of pollen spectra in automatic identification. *Aerobiologia* 37, 15–28.
- Peters, A., Hoffmann, B., Brunekreef, B., Künzli, N., Kutlar Joss, M., Probst-Hensch, N., Ritz, B., Straif, K., Wichmann, E., 2019. Les effets des polluants atmosphériques sur la santé. *Bulletin des médecins suisses* 100, 796–799.
- Phosri, A., Ueda, K., Tasmin, S., Kishikawa, R., Hayashi, M., Hara, K., Uehara, Y., Phung, V.L.H., Yasukouchi, S., Konishi, S., 2017. Interactive effects of specific fine particulate matter compositions and airborne pollen on frequency of clinic visits for pollinosis in Fukuoka, Japan. *Environmental research* 156, 411–419.
- Pichot, C., Calleja, M., Penel, V., Bues-Charbit, M., Charpin, D., 2015. Inference of the pollen penetration and remanence into dwellings using seasonal variation of indoor/outdoor pollen counts. *Aerobiologia* 31, 315–322. <https://doi.org/10.1007/s10453-015-9366-6>
- Piffanelli, P., Ross, J.H., Murphy, D.J., 1997. Intra-and extracellular lipid composition and associated gene expression patterns during pollen development in *Brassica napus*. *The plant journal* 11, 549–562.
- Piotrowska, K., 2008. Pollen production in selected species of anemophilous plants. *Acta Agrobotanica* 61, 41–52.
- Platts-Mills, T.A.E., Hayden, M.L., Chapman, M.D., Wilkins, S.R., 1987. Seasonal variation in dust mite and grass-pollen allergens in dust from the houses of patients with asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 79, 781–791. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(87\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0091-6749(87)90211-9)
- Plaza, M.P., Alcázar, P., Hernández-Ceballos, M.A., Galán, C., 2016. Mismatch in aeroallergens and airborne grass pollen concentrations. *Atmospheric Environment* 144, 361–369. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2016.09.008>
- Plötz, S.G., Traidl-Hoffmann, C., Feussner, I., Kasche, A., Feser, A., Ring, J., Jakob, T., Behrendt, H., 2004. Chemotaxis and activation of human peripheral blood eosinophils induced by pollen-associated lipid mediators. *Journal of allergy and clinical immunology* 113, 1152–1160.
- Polosa, R., 2001. The interaction between particulate air pollution and allergens in enhancing allergic and airway responses. *Current allergy and asthma reports* 1, 102–107.
- Pomés, A., Chapman, M.D., Wünschmann, S., 2016. Indoor allergens and allergic respiratory disease. *Current allergy and asthma reports* 16, 43.

- Pope, C.A., Dockery, D., 1994. Acute Respiratory Effects of Particulate Air Pollution. Annual Review of Public Health.
- Preusche, P., Weber, M., 2014. Monitoring indoor pollen over two years. Grana 53, 133–146. <https://doi.org/10.1080/00173134.2014.911954>
- Prieu, 2015. Evolution et Developpement des grains de pollen chez les angiospermes Charlotte Prieu [WWW Document]. URL <https://www.google.com/search> (accessed 2.13.22).
- Puc, M., Kotrych, D., Lipiec, A., Rapiejko, P., Siergiejko, G., 2016. Birch pollen grains without cytoplasmic content in the air of Szczecin and Bialystok. Alergoprofil 12, 101–105.
- Puc, M., Wolski, T., Camacho, I.C., Myszkowska, D., Kasprzyk, I., Grewling, Ł., Nowak, M., Weryszko-Chmielewska, E., Piotrowska-Weryszko, K., Chłopek, K., Dąbrowska-Zapart, K., Majkowska-Wojciechowska, B., Balwierz, Z., Malkiewicz, M., Grinn-Gofroń, A., Stacewicz, A., Kruczek, A., Borycka, K., 2015. Fluctuation of birch (*Betula* L.) pollen seasons in Poland. Acta Agrobotanica 68, 303–313. <https://doi.org/10.5586/aa.2015.041>
- Pulimood, T.B., Corden, J.M., Bryden, C., Sharples, L., Nasser, S.M., 2007. Epidemic asthma and the role of the fungal mold *Alternaria alternata*. Journal of Allergy and Clinical Immunology 120, 610–617.
- Pummer, B.G., Bauer, H., Bernardi, J., Chazallon, B., Facq, S., Lendl, B., Whitmore, K., Grothe, H., 2013. Chemistry and morphology of dried-up pollen suspension residues. Journal of Raman Spectroscopy 44, 1654–1658.
- Rancé, F., Navarro-Rouimi, R., Dutau, G., 2007. Les allergies polliniques. Expansion formation et éditions.
- Rantio-Lehtimäki, A., Viander, M., Koivikko, A., 1994. Airborne Birch Pollen Antigens in Different Particle Sizes. Clinical & Experimental Allergy 24, 23–28.
- Rapiejko, P., Stanlaewicz, W., Szczygielski, K., Jurkiewicz, D., 2007. Threshold pollen count necessary to evoke allergic symptoms. Otolaryngologia Polska. The Polish Otolaryngology 61, 591–594.
- Reille, M., 1999. Pollen et spores d'Europe et d'Afrique du Nord: index. Laboratoire de botanique historique et de palynologie.
- Rejón, J., Delalande, F., Schaeffer-Reiss, C., Alché, J., Rodríguez-García, M., Van Dorselaer, A., Castro, A., 2016. The pollen coat proteome: at the cutting edge of plant reproduction. Proteomes 4, 5.
- Reshetova, S.A., Solodukhina, M.A., Yurgenson, G.A., 2015. The interrelation between pollen abnormalities and polymorphism and the increased contents of toxic elements in flowers and flower buds in *Aconogonon angustifolium* (Pall.) Hara. and *Papaver nudicaule* L. Russian journal of ecology 46, 36–42.
- Rezanejad, F., 2012. Air pollution effects on flavonoids in pollen grains of some ornamental plants. Turkish Journal of Botany 36, 49–54.
- Rezanejad, F., 2009. Air pollution effects on structure, proteins and flavonoids in pollen grains of *Thuja orientalis* L.(Cupressaceae). Grana 48, 205–213.
- Ribeiro, Duque, L., Sousa, R., Abreu, I., 2013a. Ozone effects on soluble protein content of *Acer negundo*, *Quercus robur* and *Platanus* spp. pollen. Aerobiologia.
- Ribeiro, Duque, Sousa, R., Abreu, I., 2013b. Ozone effects on soluble protein content of *Acer negundo*, *Quercus robur* and *Platanus* spp. pollen. Aerobiologia 29, 443–447.
- Ribeiro, H., Duque, L., Sousa, R., Cruz, A., Gomes, C., Esteves da Silva, J., Abreu, I., 2014. Changes in the IgE-reacting protein profiles of *Acer negundo*, *Platanus x acerifolia* and *Quercus robur* pollen in response to ozone treatment. International Journal of Environmental Health Research 1–13. <https://doi.org/10.1080/09603123.2013.865716>
- Riediker, M., Keller, S., Wüthrich, B., Koller, T., Monn, C., 2000. Personal pollen exposure compared to stationary measurements. J Investig Allergol Clin Immunol 10, 200–203.

- Riedl, M., Diaz-Sanchez, D., 2005. Biology of diesel exhaust effects on respiratory function. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 115, 221–228.
- Rittenour, W.R., Hamilton, R.G., Beezhold, D.H., Green, B.J., 2012. Immunologic, spectrophotometric and nucleic acid based methods for the detection and quantification of airborne pollen. *Journal of immunological methods* 383, 47–53.
- RNSA, 2018. Le Réseau National de Surveillance Aérobiologique -RNSA-Guide d'information Végétation en ville.
- Rodríguez-Rajo, F.J., Fdez-Sevilla, D., Stach, A., Jato, V., 2010. Assessment between pollen seasons in areas with different urbanization level related to local vegetation sources and differences in allergen exposure. *Aerobiologia* 26, 1–14.
- Rogerieux, F., Godfrin, D., Senechal, H., Motta, A.C., Marliere, M., Peltre, G., Lacroix, G., 2007. Modifications of Phleum pratense grass pollen allergens following artificial exposure to gaseous air pollutants (O₃, NO₂, SO₂). *International archives of allergy and immunology* 143, 127–134.
- Royo, J., Oteros, J., Pérez-Badia, R., Cervigón, P., Ferencova, Z., Gutiérrez-Bustillo, A.M., Bergmann, K.-C., Oliver, G., Thibaudon, M., Albertini, R., 2019. Near-ground effect of height on pollen exposure. *Environmental Research* 174, 160–169.
- Royo, J., Oteros, J., Picornell, A., Ruëff, F., Werchan, B., Werchan, M., Bergmann, K.-C., Schmidt-Weber, C.B., Buters, J., 2020. Land-use and height of pollen sampling affect pollen exposure in Munich, Germany. *Atmosphere* 11, 145.
- Ronneberger, O., 2007. 3D invariants for automated pollen recognition (PhD Thesis). Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.
- Roshchina, V.V., Mel'nikova, E.V., 2001. Pollen Chemosensitivity to Ozone and Peroxides. *Russian Journal of Plant Physiology* 48, 74–83.
- Ruffin, J., Liu, M.Y., Sessoms, R., Banerjee, S., Banerjee, U.C., 1986. Effects of certain atmospheric pollutants (SO₂, NO₂ and CO) on the soluble amino acids, molecular weight and antigenicity of some airborne pollen grains. *Cytobios* 46, 119–129.
- Saxon, A., Diaz-Sanchez, D., 2005. Air pollution and allergy: you are what you breathe. *Nature immunology* 6, 223–226.
- Schäppi, G.F., Suphioglu, C., Taylor, P.E., Knox, R.B., 1997. Concentrations of the major birch tree allergen Bet v 1 in pollen and respirable fine particles in the atmosphere. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 100, 656–661.
- Schiavoni, G., D'Amato, G., Afferni, C., 2017. The dangerous liaison between pollens and pollution in respiratory allergy. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 118, 269–275.
- Schoene, K., Franz, J.-T., Masuch, G., 2004. The effect of ozone on pollen development in *Lolium perenne* L. *Environmental Pollution* 131, 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.03.014>
- Schulte, F., Lingott, J., Panne, U., Kneipp, J., 2008. Chemical characterization and classification of pollen. *Analytical chemistry* 80, 9551–9556.
- Schulte, F., Mäder, J., Kroh, L.W., Panne, U., Kneipp, J., 2009. Characterization of pollen carotenoids with in situ and high-performance thin-layer chromatography supported resonant Raman spectroscopy. *Analytical chemistry* 81, 8426–8433.
- Scott, R.J., Spielman, M., Dickinson, H.G., 2004. Stamen structure and function. *The Plant Cell* 16, S46–S60.
- Sears, M.R., Burrows, B., Flannery, E.M., Herbison, G.P., Holdaway, M.D., 1993. Atopy in childhood. I. Gender and allergen related risks for development of hay fever and asthma. *Clinical & Experimental Allergy* 23, 941–948.

- Sedghy, F., Sankian, M., Moghadam, M., Ghasemi, Z., Mahmoudi, M., Varasteh, A.-R., 2016. Impact of traffic-related air pollution on the expression of *Platanus orientalis* pollen allergens. *International journal of biometeorology* 61, 1–9.
- Sehlinger, T., Boehm, K., Goergen, F., Bergmann, K.-C., 2013. Measuring Individual Pollen Exposure. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131, AB79. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.12.946>
- Seinfeld, J.H., Pandis, S.N., 2016. *Atmospheric chemistry and physics: from air pollution to climate change*. John Wiley & Sons.
- Sénéchal, H., Visez, N., Charpin, D., Shahali, Y., Peltre, G., Biolley, J.-P., Lhuissier, F., Couderc, R., Yamada, O., Malrat-Domenge, A., 2015. A review of the effects of major atmospheric pollutants on pollen grains, pollen content, and allergenicity. *The Scientific World Journal* 2015.
- Shahali, Y., Dadar, M., 2018. Plant food allergy: Influence of chemicals on plant allergens. *Food and Chemical Toxicology* 115, 365–374.
- Shahali, Y., Pourpak, Z., Moin, M., Mari, A., Majd, A., 2009a. Instability of the structure and allergenic protein content in Arizona cypress pollen. *Allergy* 64, 1773–1779.
- Shahali, Y., Pourpak, Z., Moin, M., Zare, A., Majd, A., 2009b. Impacts of air pollution exposure on the allergenic properties of Arizona cypress pollens, in: *Journal of Physics: Conference Series*. IOP Publishing, p. 012027.
- Shang, X., Giannakaki, E., Bohlmann, S., Filioglou, M., Saarto, A., Ruuskanen, A., Leskinen, A., Romakkaniemi, S., Komppula, M., 2020. Optical characterization of pure pollen types using a multi-wavelength Raman polarization lidar. *Atmospheric Chemistry and Physics* 20, 15323–15339.
- Shaw, G., 1971. The chemistry of sporopollenin, in: *Sporopollenin*. Elsevier, pp. 305–350.
- Shiraiwa, M., Selzle, K., Pöschl, U., 2012. Hazardous components and health effects of atmospheric aerosol particles: reactive oxygen species, soot, polycyclic aromatic compounds and allergenic proteins. *Free Radical Research* 46, 927–939. <https://doi.org/10.3109/10715762.2012.663084>
- Shiraiwa, M., Sosedova, Y., Rouvière, A., Yang, H., Zhang, Y., Abbatt, J.P., Ammann, M., Pöschl, U., 2011. The Role of Long-Lived Reactive Oxygen Intermediates in the Reaction of Ozone With Aerosol Particles. *Nature chemistry* 3, 291–295.
- Shugart, H. H., Smith, T. M., Shugart, Herman H., Smith, Thomas M., 1991. *Modélisation de la dynamique de la forêt boréale en fonction des changements de l'environnement*.
- Smiljanic, K., Prodic, I., Apostolovic, D., Cvetkovic, A., Veljovic, D., Mutic, J., van Hage, M., Burazer, L., Velickovic, T.C., 2019. In-depth quantitative profiling of post-translational modifications of Timothy grass pollen allergome in relation to environmental oxidative stress. *Environment international* 126, 644–658.
- Smith, E.G., 1984. *Sampling and identifying allergenic pollens and molds. An illustrated manual for physicians and lab technicians*. Blewstone Press.
- Sofiev, M., Bousquet, J., Linkosalo, T., Ranta, H., Rantio-Lehtimäki, A., Siljamo, P., Valovirta, E., Damialis, A., 2009. Pollen, allergies and adaptation, in: *Biometeorology for Adaptation to Climate Variability and Change*. Springer, pp. 75–106.
- Sofiev, M., Siljamo, P., Ranta, H., Rantio-Lehtimäki, A., 2006. Towards numerical forecasting of long-range air transport of birch pollen: theoretical considerations and a feasibility study. *International Journal of Biometeorology* 50, 392–402.
- Solomon, W.R., 2002. Airborne pollen: a brief life. *Journal of allergy and clinical immunology* 109, 895–900.

- Solomon, W.R., Burge, H.A., Boise, J.R., 1980. Exclusion of particulate allergens by window air conditioners. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 65, 305–308. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(80\)90160-8](https://doi.org/10.1016/0091-6749(80)90160-8)
- Spiekma, F.T.M., van Noort, P., Nikkels, H., 2000. Influence of nearby stands of *Artemisia* on street-level versus roof-top-level ratios of airborne pollen quantities. *Aerobiologia* 1, 21–24.
- Stach, A., García-Mozo, H., Prieto-Baena, J.C., Czarnecka-Operacz, M., Jenerowicz, D., Silny, W., Galán, C., 2007. Prevalence of *Artemisia* species pollinosis in western Poland: Impact of climate change on aerobiological trends. *J Investig Allergol Clin Immunol* 17, 39–47.
- Stanley, R.G., Linskens, H.F., 2012. *Pollen: biology biochemistry management*. Springer Science & Business Media.
- Steinberg, G., Peñalva, M.A., Riquelme, M., Wösten, H.A., Harris, S.D., 2017. Cell biology of hyphal growth. *Microbiology spectrum* 5, 5–2.
- Sterling, D.A., Lewis, R.D., 1998. Pollen and Fungal Spores Indoor and Outdoor of Mobile Homes. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 80, 279–285. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)62971-7](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)62971-7)
- Stock, T.H., Morandi, M.T., 1988. A characterization of indoor and outdoor microenvironmental concentrations of pollen and spores in two Houston neighborhoods. *Environment International* 14, 1–9. [https://doi.org/10.1016/0160-4120\(88\)90370-4](https://doi.org/10.1016/0160-4120(88)90370-4)
- Strand, V., Svartengren, M., Rak, S., Barck, C., Bylin, G., 1998. Repeated exposure to an ambient level of NO₂ enhances asthmatic response to a nonsymptomatic allergen dose. *European respiratory journal* 12, 6–12.
- Suárez-Cervera, M., Castells, T., Vega-Maray, A., Civantos, E., del Pozo, V., Fernández-González, D., Moreno-Grau, S., Moral, A., López-Iglesias, C., Lahoz, C., 2008. Effects of air pollution on Cup a 3 allergen in *Cupressus arizonica* pollen grains. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 101, 57–66.
- Sugita, S., Hicks, S., Sormunen, H., 2010. Absolute pollen productivity and pollen–vegetation relationships in northern Finland. *Journal of Quaternary Science* 25, 724–736.
- Sulmont, G., Laine, C., Sulmont, D., 2007. *Le contenu pollinique de l'air: clé d'identification*. Saint-Genis-L'Argentière: RNSA.
- Swanson, R., Edlund, A.F., Preuss, D., 2004. Species specificity in pollen–pistil interactions. *Annu. Rev. Genet.* 38, 793–818.
- Takahashi, Y., Sakaguchi, M., Inouye, S., Miyazawa, H., Imaoka, K., Katagiri, S., 1991. Existence of exine-free airborne allergen particles of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. *Allergy* 46, 588–593.
- Takahashi, Y., Takano, K., Suzuki, M., Nagai, S., Yokosuka, M., Takeshita, T., Saito, A., Yasueda, H., Enomoto, T., 2008. Two routes for pollen entering indoors: ventilation and clothes. *J Investig Allergol Clin Immunol* 18, 382–388.
- Tauber, H., 1974. static non-overload pollen collector. *New phytologist*.
- Taylor, P.E., Flagan, R.C., Miguel, A.G., Valenta, R., Glovsky, M.M., 2004. Birch pollen rupture and the release of aerosols of respirable allergens. *Clinical & Experimental Allergy* 34, 1591–1596.
- Taylor, P.E., Flagan, R.C., Valenta, R., Glovsky, M.M., 2002. Release of allergens as respirable aerosols: A link between grass pollen and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 109, 51–56. <https://doi.org/10.1067/mai.2002.120759>
- Thanikaimoni, G., 1986. *Pollen apertures: form and function*. Pollen and spores: form and function.
- Thèse J. Farah, J., 2018. *Etude de la fraction lipidique de pollens allergisants et de ses modifications chimiques causées par les polluants atmosphériques (PhD Thesis)*. Lille 1.
- Thibaudon, M., 2007. Pollens, allergies et changements climatiques. *Presse Therm Clim* 144, 117–20.

- Thomas, P., Strube, W., Przybilla, B., 1997. Exposure of pollen to SO₂, NO₂ or O₃: influence on protein release and histamine releasing capacity in vitro, in: *New Trends in Allergy IV*. Springer, pp. 105–108.
- Tormo Molina, R., Gonzalo Garijo, M.A., Muñoz Rodríguez, A.F., Silva Palacios, I., 2002. Pollen and spores in the air of a hospital out-patient ward. *Allergol Immunopathol (Madr)* 30, 232–238.
- Tormo-Molina, R., Gonzalo-Garijo, Á., Silva-Palacios, I., Fernández-Rodríguez, S., 2009. Seasonal and Spatial Variations of Indoor Pollen in a Hospital. *Int J Environ Res Public Health* 6, 3169–3178. <https://doi.org/10.3390/ijerph6123169>
- Tourin, M.H., Shen, W.C., Rickett, R.J., 1969a. Deciduous Forest Diffusion Study. Volume 3. Detailed Technical Data Supplement. litton systems inc minneapolis mn applied science div.
- Tourin, M.H., Shen, W.C., Rickett, R.J., 1969b. Deciduous Forest Diffusion Study. Volume 1. Diffusion Studies in a Deciduous Forest. litton systems inc minneapolis mn applied science div.
- Traidl-Hoffmann, C., Jakob, T., Behrendt, H., 2009. Determinants of allergenicity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123, 558–566.
- Traidl-Hoffmann, C., Kasche, A., Jakob, T., Huger, M., Plötz, S., Feussner, I., Ring, J., Behrendt, H., 2002. Lipid mediators from pollen act as chemoattractants and activators of polymorphonuclear granulocytes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 109, 831–838.
- Traidl-Hoffmann, C., Kasche, A., Menzel, A., Jakob, T., Thiel, M., Ring, J., Behrendt, H., 2003. Impact of pollen on human health: more than allergen carriers? *International archives of allergy and immunology* 131, 1–13.
- Tretyakova, I.N., Noskova, N.E., 2004. Scotch Pine Pollen under Conditions of Environmental Stress. *Russian Journal of Ecology* 35, 20–26. <https://doi.org/10.1023/B:RUSE.0000011105.90297.07>
- Vagaggini, B., Taccola, M., Cianchetti, S., Carnevali, S., Bartoli, M.L., Bacci, E., Dente, F.L., Di Franco, A., Giannini, D., Paggiaro, P.L., 2002. Ozone Exposure Increases Eosinophilic Airway Response Induced by Previous Allergen Challenge. *American journal of respiratory and critical care medicine* 166, 1073–1077.
- Valenta, R., 2002. The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. *Nature Reviews Immunology* 2, 446–453.
- Valenta, R., Lidholm, J., Niederberger, V., Hayek, B., Kraft, D., Grönlund, H., 1999. The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clinical and experimental allergy* 29, 896–904.
- van Ree, R., van Leeuwen, W.A., Aalberse, R.C., 1998. How far can we simplify in vitro diagnostics for grass pollen allergy?: A study with 17 whole pollen extracts and purified natural and recombinant major allergens. *Journal of allergy and clinical immunology* 102, 184–190.
- Vinckier, S., Cadot, P., Grote, M., Ceuppens, J., Smets, E., 2006. Orbicules do not significantly contribute to the allergenic micro-aerosol emitted from birch trees. *Allergy* 61, 1243–1244.
- Visez, N., Chassard, G., Azarkan, N., Naas, O., Sénéchal, H., Sutra, J.-P., Poncet, P., Choël, M., 2015. Wind-induced mechanical rupture of birch pollen: Potential implications for allergen dispersal. *Journal of Aerosol Science* 89, 77–84.
- Visez, N., de Nadaï, P., Choël, M., Farah, J., Hamzé, M., Sénéchal, H., Pauwels, M., Frérot, H., Thibaudon, M., Poncet, P., 2021. Biochemical composition of *Phleum pratense* pollen grains: A review. *Molecular Immunology* 136, 98–109.
- Visez, N., Ivanovsky, A., Roose, A., Gosselin, S., Sénéchal, H., Poncet, P., Choël, M., 2019. Atmospheric particulate matter adhesion onto pollen: a review. *Aerobiologia* 36, 49–62.
- Vitalos, M., Karrer, G., 2009. Dispersal of *Ambrosia artemisiifolia* seeds along roads: the contribution of traffic and mowing machines. *Neobiota* 8, 53–60.

- Vrtala, S., Grote, M., Duchêne, M., Kraft, D., Scheiner, O., Valenta, R., 1993. Properties of tree and grass pollen allergens: reinvestigation of the linkage between solubility and allergenicity. *International archives of allergy and immunology* 102, 160–169.
- Waisel, Y., Mienis, Z., Kosman, E., Geller-Bernstein, C., 2004. The partial contribution of specific airborne pollen to pollen induced allergy. *Aerobiologia* 3, 197–208.
- Wang, Q., Kurihara, K., Kiryu, H., Sakamoto, K., Miwa, M., Uchiyama, I., 2008. Daily variation differences between airborne Japanese cedar pollen and its respirable allergen particulate matters during the most severe pollination seasons. *Eurozoru Kenkyu* 23, 120–126.
- Wang, Q., Nakamura, S., Lu, S., Xiu, G., Nakajima, D., Suzuki, M., Sakamoto, K., Miwa, M., 2012. Release behavior of small sized daughter allergens from *Cryptomeria japonica* pollen grains during urban rainfall event. *Aerobiologia* 28, 71–81.
- Wang, X., Gao, Y., Feng, Y., Li, X., Wei, Q., Sheng, X., 2014. Cadmium stress disrupts the endomembrane organelles and endocytosis during *Picea wilsonii* pollen germination and tube growth. *PLoS One* 9.
- Wang, X., Zhang, S., Gao, Y., Lü, W., Sheng, X., 2015. Different heavy metals have various effects on *Picea wilsonii* pollen germination and tube growth. *Plant signaling & behavior* 10, e989015.
- Werchan, B., Werchan, M., Mücke, H.-G., Gauger, U., Simoleit, A., Zuberbier, T., Bergmann, K.-C., 2017. Spatial distribution of allergenic pollen through a large metropolitan area. *Environmental monitoring and assessment* 189, 169.
- Wittmaack, K., Wehnes, H., Heinzmann, U., Agerer, R., 2005. An overview on bioaerosols viewed by scanning electron microscopy. *Science of The Total Environment* 346, 244–255. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.11.009>
- Wodehouse, R.P., 1935. *Pollen grains*. McGraw-Hill Book Company, Inc; New York; London.
- Wolters, J.H.B., Martens, M.J.M., 1987. Effects of air pollutants on pollen. *The Botanical Review* 53, 372–414.
- Wolters-Arts, M., Lush, W.M., Mariani, C., 1998. Lipids are required for directional pollen-tube growth. *Nature* 392, 818–821.
- Yamamoto, N., Matsuki, H., Yanagisawa, Y., 2007. Application of the personal aeroallergen sampler to assess personal exposures to Japanese cedar and cypress pollens. *Journal of exposure science & environmental epidemiology* 17, 637–643.
- Yli-Panula, E., Rantio-Lehtimäki, A., 1995. Birch-pollen antigenic activity of settled dust in rural and urban homes. *Allergy* 50, 303–307.
- Yli-Panula, E., Rantio-Lehtimäki, A., 1994. Antigenic activity in settled dust outdoors; a study of birch pollen antigens. *Grana* 33, 177–180.
- Yli-Panula et al, E., 1997. Allergenicity of grass pollen in settled dust in rural and urban homes in Finland. *Grana* 36, 306–310. <https://doi.org/10.1080/00173139709362622>
- Yousefi, N., Chehregani, A., Malayeri, B., Lorestani, B., Cheraghi, M., 2011. Investigating the effect of heavy metals on developmental stages of anther and pollen in *Chenopodium botrys* L.(Chenopodiaceae). *Biological Trace Element Research* 140, 368–376.
- Zavada, M.S., McGraw, S.M., Miller, M.A., 2007. The role of clothing fabrics as passive pollen collectors in the north-eastern United States. *Grana* 46, 285–291. <https://doi.org/10.1080/00173130701780104>
- Zeghnoun, A., Dor, F., 2010. Description du budget espace-temps et estimation de l'exposition de la population française dans son logement [in French]. Saint-Maurice, France: Institut de veille sanitaire.
- Zhang, S.-L., 2012. *Raman spectroscopy and its application in nanostructures*. Wiley, Chichester, Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord.

- Zhu, C., Farah, J., Choël, M., Gosselin, S., Baroudi, M., Petitprez, D., Visez, N., 2018. Uptake of ozone and modification of lipids in *Betula Pendula* pollen. *Environmental pollution* 242, 880–886.
- Zimmermann, B., 2010. Characterization of pollen by vibrational spectroscopy. *Applied spectroscopy* 64, 1364–1373.
- Zimmermann, B., Kohler, A., 2014. Infrared spectroscopy of pollen identifies plant species and genus as well as environmental conditions. *PLoS One* 9, e95417.

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Structure d'un grain de pollen d'angiosperme (Thèse J. Farah, 2018).....	22
Figure 2: Différentes formes des pollens. De gauche à droite, pollen de pin (inaperturé), pollen de fléole des prés (monoporé), pollen de bouleau (triporé), pollen de saule (tricolporé), pollen d'érable (tricolpé), pollen d'aulne (pentaporé) (PalDat, 2022).....	24
Figure 3: Capteur volumétrique de type Hirst.....	31
Figure 4 : Capteur rotatif de type Cour (Calleja et al., 2005).....	31
Figure 5 : Capteur gravimétrique Durham (Calleja et al., 2005).....	32
Figure 6 : Chaton mâle de bouleau.....	36
Figure 7 : Clichés de microscopie électronique de grains de pollen de bouleau pollués portant : (a) une particule de silicate de calcium de 1 μm ; (b) des particules d'aluminosilicate; (c) une grosse particule de poussière de sol ; (d) une grosse particule de phyllosilicate, (e) une particules supermicronique et une douzaine de particules de dolomite submicroniques; (f) une particule sphérique de cendres volantes de charbon (riche en O-Al-Si diam 3,5 μm), une particule de calcite (vers le haut) et une particule de gypse (vers le bas) (Choël et al., 2022).....	55
Figure 8: Estimation du nombre de personnes concernées par les allergies respiratoires (RNSA, 2018).....	60
Figure 9: Générateur d'ozone.....	70
Figure 10 : Schéma du dispositif d'exposition des grains de pollen aux polluants gazeux (O_3). Les grains de pollen sont placés entre les deux filtres en cellulose (diamètre 55 mm). La concentration d'ozone est mesurée à la sortie du réacteur par un analyseur d'ozone photométrique UV.....	71
Figure 11: Spectres d'intensité Raman en fonction de la longueur d'onde obtenus pour un grain de pollen de bouleau avec cinq lignes d'excitation : 473, 514, 532, 633 et 785 nm.....	73
Figure 12 : Fond de fluorescence variable selon la localisation du faisceau laser à la surface du grain de pollen de bouleau.....	74
Figure 13: a) Image optique d'un grain de pollen de bouleau non exposé à l'ozone, b) Spectre Raman avec un pointé de pics, c) Images Raman reconstruites pour les cinq bandes indiquées en b). La taille de la cartographie est de 30x30 μm	75
Figure 14: a) Image optique d'un grain de pollen de bouleau exposé à l'ozone, b) Spectre Raman après soustraction de la ligne de base avec un pointé de pics, c) Images Raman reconstruites pour les cinq bandes indiquées en b). La taille de la cartographie est de 26x24 μm	77
Figure 15: Spectres Raman moyennés d'un grain de pollen intact et un grain de pollen exposé à l'ozone.....	78
Figure 16: Image optique d'un grain de pollen de bouleau observé au microscope IRTF Hyperion (Bruker). Les diaphragmes permettent d'adapter le spot de mesure à la taille de l'échantillon pour acquérir un spectre de grain de pollen individuel.....	79
Figure 17: Spectres infrarouges moyennés mesurés pour un grain de pollen non exposé (spectre témoin) et un grain exposé à l'ozone (en haut) et différence (Δ Absorption) entre le spectre témoin et le spectre du pollen traité à l'ozone (en bas).....	80
Figure 18 : Image satellitaire présentant la position relative des trois sites de prélèvement et la station Lille-Fives (ATMO Hauts-de-France) la plus proche des sites de prélèvement (Google maps).....	85
Figure 19 : Images satellitaires élargies des sites de prélèvements : A) le parc de la citadelle de Lille B) le parc du Héron à Villeneuve d'Ascq et C) le centre-ville d'Hellemmes-Lille (Google maps).....	86
Figure 20: Pastille adhésive collée sur un plot de MEB fixé sur une casquette.....	87
Figure 21 : Variations des concentrations journalières des pollens de bouleau dans la métropole lilloise présentées sous forme d'histogramme et des concentrations ambiantes des particules $\text{PM}_{2,5}$ et PM_{10} représentées respectivement en rouge et	

<i>en marron clair. Les limites journalières recommandées par l'organisation mondiale de la santé (OMS) pour les PM_{2.5} (15 µg.m⁻³) sont présentées par une ligne pointillée rouge et celles des PM₁₀ (45 µg.m⁻³) par une ligne pointillée marron clair.</i>	88
<i>Figure 22 : Grain de pollen de bouleau observé avec un mauvais écoulement des charges électroniques</i>	89
<i>Figure 23 : Différents types de pollens observés : A : aulne , B : saule , C : peuplier ou cyprès, D : bouleau</i>	90
<i>Figure 24 : Autres particules d'origine biologique : A : Probablement des spores de champignon et B : champignons filamenteux colonisant l'exine.</i>	90
<i>Figure 25 : Grains de pollen de bouleau observés sans particules extrapolliniques à leur surface.</i>	91
<i>Figure 26 : Grains de pollens de bouleau présentant des particules sur leur surface.</i>	92
<i>Figure 27 : Images électroniques en mode d'imagerie d'électrons rétrodiffusés (BSE) de certains pollens de bouleau présentant des particules sur leur surface acquises après analyse EDX.</i>	93
<i>Figure 28 :(1) Image d'une particule grossière en mode SE. (2) Image électronique de particules en mode BSE. (3) Analyse cartographique élémentaire (Al Ka) des particules en mode EDX.</i>	94
<i>Figure 29 : Image électronique de particules en mode BSE (à gauche) et spectre EDX de la particule riche en oxyde de fer (à droite).</i>	94
<i>Figure 30 : Grains de pollen prélevés par l'impacteur en cascade.</i>	94
<i>Figure 31 : Vue satellite du site de l'arbre de bouleau qui est indiqué par une croix rouge (image de gauche). Image photographie de l'arbre (image de droite). Les coordonnées GPS de l'arbre sont 50°36'35.7"N 3°08'34.6"E (Google maps).</i>	101
<i>Figure 32 : Images satellites de localisation des zones de prélèvements effectués en République Tchèque par Bonapol (Google maps).</i>	103
<i>Figure 33: Schéma du dispositif d'exposition in vitro des grains de pollen à l'ozone (Zhu et al., 2018).</i>	104
<i>Figure 34: Concentration relative normalisée d'ozone en fonction de la durée d'exposition après l'introduction de 5 mg de grains de pollen de bouleau.</i>	108
<i>Figure 35: Comparaison des expériences de captures effectuées sur le même pollen. Les résultats concernent le pollen d'Olea europaea.</i>	109
<i>Figure 36: Concentration relative normalisée d'ozone en fonction de la durée d'exposition pour les 21 échantillons de grains de pollen étudiés (période de pollinisation 2019). A) pollens avec une capture inférieure à 2 ng.mg⁻¹ B) Pollens avec une capture comprise entre 12 et 141 ng.mg⁻¹.</i>	111
<i>Figure 37: Quantité d'ozone adsorbée sur la surface des grains de pollen et taux de lipides totaux des pollens A) en prenant en considération le pollen d'ambroisie et B) sans prendre en compte les pollens ayant un taux de capture inférieur à 2 ng.mg⁻¹.</i>	114
<i>Figure 38: Comparaison de la concentration relative d'ozone en fonction de l'état du pollen intact (ligne noire) et défatté (ligne rouge). Tous les pollens sont exposés à une concentration proche de 110 ppb d'ozone.</i>	115
<i>Figure 39: Image en microscopie électronique à transmission de la paroi d'un grain de pollen d'olivier (a) avant et (b) après extraction du revêtement pollinique avec un solvant organique (cyclohexane) (Rejón et al., 2016).</i>	116
<i>Figure 40: Comparaison de la concentration relative en fonction de l'année de récolte des grains de pollen de Betula pendula.</i>	120
<i>Figure 41: Quantité d'ozone absorbée par les grains de pollens de bouleau intact issus de 5 différentes années de récolte.</i>	120
<i>Figure 42 : Comparaison de la concentration relative d'ozone en fonction de la localisation de récolte. Les pollens sont exposés à une concentration d'ozone proche de 100 ppb.</i>	121
<i>Figure 43: Quantité d'ozone absorbée sur la surface des grains de pollens de bouleau intact récoltés en 2020 dans 9 localisations différentes.</i>	122

<i>Figure 44: Fixation de la lingette électrostatique sur la buse de l'aspirateur avant d'effectuer les prélèvements (trois premières images) et lingette pliée après le prélèvement (dernière image).....</i>	<i>130</i>
<i>Figure 45 : Schéma de l'extraction des lingettes de prélèvement.....</i>	<i>131</i>
<i>Figure 46 : Répartition des concentrations massiques des alcènes, alcools, alcanes et aldéhydes dans les fractions lipidiques externe et interne du pollen de bouleau (extraction par le dichlorométhane) (Farah et al., 2021).....</i>	<i>133</i>
<i>Figure 47 : Répartition des acides gras insaturés dans les lipides externes et internes des pollens (extraction par le dichlorométhane) (Farah et al., 2021).</i>	<i>133</i>
<i>Figure 48 : Comparaison entre les chromatogrammes des lipides extraits de pollen de bouleau intact et artificiellement broyé en laboratoire (Thèse J. Farah, 2018).</i>	<i>134</i>
<i>Figure 49 : Étapes de traitement d'un échantillon.</i>	<i>138</i>
<i>Figure 50 : Aire chromatographique en fonction de la concentration de la solution injectée en hexadécane (g/ mL). ..</i>	<i>139</i>
<i>Figure 51 : Poudre de dilution à 1,5 % de pollen de bouleau intact à gauche (jaune clair) et celle à 10% de pollen à gauche (jaune foncé).</i>	<i>139</i>
<i>Figure 52 : Droite d'étalonnage des différentes masses des poudres de dilution préparées à partir de pollen de bouleau intact (heptacosane) et rompu (acide α-linoléinique) (saison pollinique 2019).....</i>	<i>140</i>
<i>Figure 53 : Droite d'étalonnage des différentes masses des poudres de dilution préparées à partir de pollen de bouleau intact (saison pollinique 2019).</i>	<i>141</i>
<i>Figure 54 : Chromatogrammes (CGP-DIF) des lipides externes extraits du pollen de bouleau intact récoltés sur différentes saisons polliniques entre 2016 et 2020 sur le campus de l'Université de Lille (Villeneuve d'Ascq).....</i>	<i>145</i>
<i>Figure 55 : Exemples de chromatogrammes (CGP-DIF) des lipides externes extraits du pollen de bouleau intact récoltés sur les sites 1 à 9 en République Tchèque lors de la saison pollinique 2020 (fournisseur Bonapol). Les chromatogrammes non présentés sont similaires.....</i>	<i>147</i>
<i>Figure 56 : Concentrations massiques en ng.mg^{-1} des cinq familles organiques identifiées dans les lipides externes extraits par le dichlorométhane du pollen de bouleau récoltés en différentes années sur le même arbre sur le campus de l'Université de Lille (groupe A).</i>	<i>149</i>
<i>Figure 57 : Concentrations massiques en ng.mg^{-1} des cinq familles organiques identifiées dans les lipides externes extraits par le dichlorométhane du pollen de bouleau récolté sur 9 différentes localisations en République Tchèque en 2020 (groupe B).....</i>	<i>152</i>
<i>Figure 58 : Vue globale du site de prélèvement. Les points rouges représentent les 6 sites des bouleaux sélectionnés pour la campagne de prélèvement en 2021 (Google maps).</i>	<i>156</i>
<i>Figure 59 : Vue globale de la zone 1 de prélèvements. Les points rouges représentent les deux bouleaux sélectionnés dans cette zone (Google maps).....</i>	<i>157</i>
<i>Figure 60 : Vue globale de la zone 2 de prélèvements. Les points rouges représentent les 4 bouleaux sélectionnés dans cette zone (Google maps).....</i>	<i>157</i>
<i>Figure 61 : Six arbres choisis pour la campagne d'échantillonnage. Photographiques à gauche et images satellites à droite pour chaque arbre. Les zones de prélèvement sont marquées d'une croix rouge sur les images satellites (Google maps).</i>	<i>160</i>
<i>Figure 62 : Représentation schématique de la méthode de calcul du diamètre de la couronne des arbres (Freytet, 2020).</i>	<i>161</i>
<i>Figure 63 : Capteur volumétrique Hirst (Lanzoni. VPPS 2000) sur le toit-terrasse d'un bâtiment du campus Cité Scientifique à Villeneuve d'Ascq. Image photographique à gauche et image satellites à droite (le croix indique la localisation du capteur sur le toit).....</i>	<i>162</i>
<i>Figure 64 : Vue satellite des trois sites de prélèvements (Google maps).....</i>	<i>163</i>

Figure 65 : Images satellites des habitations marquées par une étoile jaune (Google maps). Les arbres de bouleau à proximité sont repérés par des étoiles oranges.	165
Figure 66 : Localisation des vitres dans l'habitation 1.	167
Figure 67 : Quantité de pollen sédimentée sous les six arbres de bouleau durant la saison pollinique 2021. Masse et nombre de grains de pollens obtenus par la méthode de dosage de l'heptacosane en CGP-SM.	170
Figure 68 : Cumul de la quantité journalière de grains de pollen sédimentée sous les 6 bouleaux ($g.m^{-2}$ et en $GP.m^{-2}$).	171
Figure 69 : Comparaison entre la quantité de pollen trouvée directement sous la ramure et à 4 m des arbres.	172
Figure 70 : Taux de rupture moyenne des pollens prélevés sous 6 arbres sur le campus de l'Université de Lille.	173
Figure 71 : Comparaison de l'état des pollens trouvés sous les arbres de bouleau selon que le prélèvement a été effectué en semaine (de lundi à vendredi) ou le week-end (samedi et dimanche).	174
Figure 72 : Grains de pollen de bouleau présents dans les échantillons prélevés sous les arbres par un aspirateur à main.	175
Figure 73 : Mécanismes proposés pour la coagulation des particules sur la surface des grains de pollen. Les boules jaunes représentent les grains de pollen de bouleau. Les pictogrammes noirs symbolisent les particules atmosphériques (Choël et al., 2022).	176
Figure 74 : Relation entre la masse totale de pollen trouvée en $1 m^2$ sous les arbres et les trois caractéristiques prises en compte 1) la circonférence de l'arbre mesuré à 1,3 m du sol, 2) le diamètre de la couronne et 3) la hauteur de l'arbre.	178
Figure 75 : Concentrations journalières des grains de pollen de bouleau en suspension dans l'air enregistrées en 2021 par le Réseau National de Surveillance Aérobiologique (RNSA) durant de la période de la campagne de prélèvement.	179
Figure 76 : Comparaison des concentrations polliniques ($GP.m^{-3}$) enregistrées en 2020 (courbe bleue) et en 2021 (courbe violette) (données RNSA).	180
Figure 77 : Corrélations entre le nombre des grains de pollen sédimentés en fonction des concentrations de grains de pollen enregistrées dans l'air par le Réseau National de Surveillance Aérobiologique (RNSA) pour l'année 2021.	181
Figure 78 : Quantité de pollen prélevée dans la poussière domestique des trois habitations durant la saison pollinique de bouleau 2021. Masse et nombre de grains de pollens obtenus par la méthode de dosage de l'heptacosane en CGP-SM.	186
Figure 79 : Quantité cumulée de grains de pollen dans la poussière domestique durant toute la saison pollinique de bouleau ($mg.m^{-2}/48 h$ et en $GP.m^{-2}/48 h$).	187
Figure 80 : Taux de rupture du pollen dosé par CGP-SM dans les poussières domestiques.	192
Figure 81 : Comparaison du taux de rupture moyen des pollens sédimentés en milieu intérieur pour des prélèvements en semaine (lundi à vendredi) et le week-end (samedi et dimanche).	193
Figure 82 : Quantité cumulée des grains de pollen dans la poussière domestique et sur une vitre dans l'habitation 1 durant la saison pollinique 2021 ($mg.m^{-2}/48 h$).	195
Figure 83 : Comparaison entre les concentrations polliniques enregistrées en milieu extérieur par le RNSA et les quantités de pollen trouvées sur la vitre de la fenêtre de l'habitation 1.	196

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Récapitulatif de quelques caractéristiques des différents pollens étudiés dans cette thèse.....	29
Tableau 2: Calendrier pollinique à Lille.....	30
Tableau 3: Masse des grains de pollen produits par un chaton pour différentes espèces de <i>Betula</i> . Lorsqu'une conversion d'un nombre de grains de pollen vers une masse fut nécessaire, la masse d'un grain de pollen de bouleau individuel a été prise égale à 6,25 ng quelle que soit l'espèce.....	36
Tableau 4: Masse des grains de pollen produits par un arbre de bouleau pour différentes espèces de <i>Betula</i> . Lorsque qu'une conversion d'un nombre de grains de pollen vers une masse fut nécessaire, la masse d'un grain de pollen de bouleau individuel a été prise égale à 6,25 ng pour toutes les espèces.....	37
Tableau 5: Exemples de concentrations de grains de pollen mesurées en milieu extérieur dans différents environnements.....	38
Tableau 6: Seuils polliniques d'apparition des symptômes allergiques attribués à plusieurs espèces de pollen.....	39
Tableau 7: Densité surfacique maximale de pollen de bouleau sédimenté en extérieur.....	41
Tableau 8: Résumé de la littérature de la quantité de pollens piégés sur les vêtements et les différentes méthodes d'échantillonnages utilisées.....	44
Tableau 9: Résumé de la littérature des pollens étudiés en milieu intérieur, les différentes méthodes de prélèvements utilisées et les différentes concentrations polliniques trouvées.....	45
Tableau 10 : Synthèse des études de la littérature en rapport avec l'effet de l'ozone sur le pollen.....	52
Tableau 11 : Conditions d'acquisition des spectres Raman des grains de pollen de bouleau.....	73
Tableau 12: Nombres d'onde et attributions des pics observés sur le spectre Raman d'un grain de pollen de bouleau intact.....	76
Tableau 13: Nombres d'onde et attributions des pics observés sur le spectre IRTF d'un grain de pollen de bouleau.....	81
Tableau 14 : Détails sur les sites choisis et les conditions de prélèvement.....	86
Tableau 15 : Récapitulatif du nombre de grain de pollens de bouleau observés et de leur pollution particulière pour chaque site.....	92
Tableau 16: Coordonnées GPS et le type des sites de prélèvement des pollens pour le pollen fourni par Bonapol.....	101
Tableau 17: Résumé des taxons de pollen utilisés dans les expériences de capture de l'ozone.....	103
Tableau 18: Capture de l'ozone selon les différents taxons des grains de pollen étudiés. Tous les pollens sont intacts et exposés à une concentration proche de 110 ppb d'ozone.....	110
Tableau 19: Masse des lipides extractibles pour les 21 taxons de l'étude (hors <i>Parietaria officinalis</i>).....	113
Tableau 20: Comparaison de la quantité d'ozone capturée sur la surface de grains de pollen en fonction de son état (intact et défatté). Tous les pollens sont exposés à une concentration proche de 110 ppb d'ozone.....	116
Tableau 21: Teneur en eau mesurée pour 7 taxons. Cette teneur a été mesurée pour deux durées de séchage à 110 °C (24 h et 48 h).....	117
Tableau 22 : Résumé de tous les paramètres intrinsèques et extrinsèques étudiés.....	123
Tableau 23 : Paramètres du CGP-SM employés en mode SIR.....	132
Tableau 24 : Formule chimique, masse moléculaire et temps de rétention de tous les composés recherchés.....	135
Tableau 25 : Concentrations massiques des espèces organiques identifiées et quantifiées dans la fraction lipidique externe de pollen de bouleau intact et pollué extraite par le dichlorométhane (Farah et al., 2021).....	136
Tableau 26 : Familles des espèces chimiques identifiées et quantifiées dans les lipides externes et internes du pollen de bouleau extraits par le dichlorométhane (Farah et al., 2021).....	137
Tableau 27 : Répartition massique de pollen de bouleau dans la poudre de dilution à 1,5 % de pollen de bouleau.....	140
Tableau 28 : Répartition massique de pollen de bouleau dans la poudre de dilution à 10 % de pollen de bouleau.....	140

Tableau 29 : Concentrations massiques des espèces organiques identifiées et quantifiées après extraction par le dichlorométhane des pollens de bouleau récoltés en différentes années sur le même arbre sur le campus de l'Université de Lille (groupe A).....	150
Tableau 30 : Concentrations massiques des espèces organiques identifiées et quantifiées après extraction par le dichlorométhane du pollen de bouleau récolté sur 9 différentes localisations en 2020 (groupe B).	153
Tableau 31 : Récapitulatif des concentrations massiques des espèces organiques identifiées et quantifiées après extraction par le dichlorométhane du pollen de bouleau des deux groupes A et B.	154
Tableau 32 : Coordonnées GPS et l'endroit de prélèvement pour les 6 arbres.	158
Tableau 33 : Caractéristiques des bouleaux choisis pour la campagne de prélèvements de pollen sur le sol.....	161
Tableau 34 : Distance entre le capteur Hirst et les trois habitations étudiées.	163
Tableau 35 : Localisations des prélèvements dans chaque appartement.....	165
Tableau 36 : Facteurs susceptibles d'influencer les prélèvements.....	166
Tableau 37 : Différentes caractéristiques des Trois plantes de décoration présentent dans les habitations 2 et 3.....	166
Tableau 38 : Comparaison des conditions de prélèvement entre l'année 2020 et l'année 2021.	167
Tableau 39 : Coefficients de corrélation calculés entre la quantité de pollen trouvée sous les arbres et les facteurs météorologiques.....	182
Tableau 40 : Masse de pollen cumulée sur 1 m ² dans les trois habitations étudiées avec les différents facteurs susceptibles d'expliquer les différences observées entre les trois habitations.....	187
Tableau 41 : Flux de dépôt sec (mesure) et concentrations (calculées) des pollens de bouleau dans les trois habitations étudiées.	190
Tableau 42 : Comparaison de nos résultats avec la littérature sur des pollens de bouleau.	191
Tableau 43 : Comparaison du nombre de grains de pollen de bouleau trouvés dans les trois habitations avec une étude de la littérature.....	192
Tableau 44 : Corrélations entre la quantité de pollen enregistrée en air intérieur dans les trois habitations et les concentrations de pollen enregistrées en air extérieur, en prenant en compte la distance entre l'habitation et le capteur Hirst.	194

ABSTRACT

Although it is now accepted that allergenic pollen grains are altered by air pollution, the role of these alterations on allergy is not yet clearly known. The (bio)chemical mechanisms involved are not completely elucidated, especially with regard to the exacerbation of symptoms by air pollution. The main objective of this thesis is to improve the knowledge on the exposure to allergenic pollen grains by taking into account their degree of alteration: pollution and pollen grain rupture.

A first laboratory study was carried out in order to explore the potential of several techniques for the characterization of the degree of alteration of the pollen grain. Pollen artificially polluted with ozone was analyzed by spectroscopic (Raman and infrared), microscopic and chromatographic techniques. Ozone uptake was also measured on a set of 22 pollen taxa with different bio-physical-chemical characteristics (grain size and mass, degree of allergenicity, lipid fraction...) to investigate possible determinants of ozone uptake.

The potential of pollen analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was exploited and a new method of counting pollen grains was developed. This method required a study on the variability of the lipid fraction on different batches of birch pollen from different geographical origins and depending on the year of harvest. In order to test this counting method in real conditions, a sampling campaign was carried out on sedimented birch pollen in indoor and outdoor environments. The determination of chemical tracers of pollen grains by GC-MS has a great potential for the rapid counting of pollen grains, the determination of their state (broken or intact) and their degree of pollution.

RÉSUMÉ

S'il est aujourd'hui admis que les grains de pollens allergisants sont altérés par la pollution atmosphérique, le rôle de ces altérations sur l'allergie n'est pas encore clairement connu. Les mécanismes (bio)chimiques en jeu ne sont pas complètement élucidés, notamment en ce qui concerne l'exacerbation des symptômes par la pollution atmosphérique. L'objectif principal de cette thèse est d'améliorer les connaissances sur l'exposition aux grains de pollens allergisants en prenant en compte leur état d'altération : état de pollution et rupture du grain de pollen.

Une première étude de laboratoire a été effectuée afin d'explorer le potentiel de plusieurs techniques pour la caractérisation de l'état d'altération du grain de pollen. Du pollen pollué artificiellement à l'ozone a été analysé par des techniques spectroscopiques (Raman et infrarouge), microscopiques et chromatographiques. La capture de l'ozone a été également mesurée sur un ensemble de 22 taxons de pollens ayant différentes caractéristiques bio-physico-chimiques (taille et masse du grain, degré d'allergénicité, fraction lipidique...) pour rechercher de possibles facteurs influençant cette capture d'ozone.

Le potentiel de l'analyse du pollen par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CGP-SM) a été exploité et une nouvelle méthode de comptage des grains de pollen a été mise au point. Cette méthode a nécessité une étude de la variabilité de la fraction lipidique de différents lots de pollen de bouleau de différentes origines géographiques et pour différentes années de récolte. Afin de tester cette méthode de comptage en conditions réelles, une campagne de prélèvements a été effectuée sur du pollen de bouleau sédimenté en milieu intérieur et extérieur. Le dosage de traceurs chimiques des grains de pollens par CGP-SM présente un grand potentiel à la fois pour le comptage rapide des grains de pollen, la détermination de leur état (rompu ou intact) et leur degré de pollution.