

## **THESE de doctorat en Cotutelle**

Pour obtenir le grade de Docteur délivré par

**L'Université de Lille**

**Ecole Doctorale : Sciences de la Matière, du Rayonnement  
et de l'Environnement**

Discipline : Optique, Lasers, Physico-chimie, Atmosphère

**Et**

**L'Université Libanaise**

**Ecole Doctorale des Sciences et Technologie**

Discipline : Sciences de la terre et de l'environnement

Présentée par

**Jinane FARAH**

---

### **ETUDE DE LA FRACTION LIPIDIQUE DE POLLENS ALLERGISANTS ET DE SES MODIFICATIONS CHIMIQUES CAUSEES PAR LES POLLUANTS ATMOSPHERIQUES**

---

Soutenue le : 21 Décembre 2018

#### **Membres du Jury**

ROTH Estelle, Maître de conférences, HDR, Université de Reims

Rapporteur

HUBER Laurent, Directeur de recherche, INRA AgroParisTech

Rapporteur

PONCET Pascal, Chargé de recherche, Institut Pasteur Paris

Examineur

SAAB Joseph, Professeur, Université Saint-Esprit de Kaslik

Examineur

VISEZ Nicolas, Maître de conférences, HDR, Université de Lille

Directeur de thèse

BAROUDI Moomen, Professeur, Université Libanaise

Directeur de thèse

PETITPREZ Denis, Professeur, Université de Lille

Co-directeur



# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, pour être mon meilleur confident et pour me permettre de réaliser ce modeste travail avec patience et force.

Je tiens à remercier les différents membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Merci à Laurent Huber, rapporteur, pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Je remercie également la seconde rapporteuse, Estelle Roth pour les remarques intéressantes sur ce manuscrit et lors de la présentation. Je remercie Joseph Saab et Pascal Poncet pour avoir accepté d'examiner mon travail. Un grand merci à Pascal Poncet pour les échanges que nous avons eu lors de la soutenance, pour ses conseils, ses encouragements et pour sa collaboration lors de ce travail.

Je désire exprimer ma profonde gratitude à mes directeurs de thèse Nicolas Visez et Moomen Baroudi et mon co-directeur Denis Petitprez. J'ai énormément profité des discussions que nous avons pu avoir. Je tiens spécialement à les remercier pour leur soutien constant, leur disponibilité et leur humour.

Merci à Denis Petitprez d'avoir répondu à mon email concernant ma recherche d'un sujet de thèse en mai 2015 et que depuis mon rêve de commencer la recherche a débuté. Un grand merci pour Nicolas Visez de m'avoir proposé cette thèse. Je te remercie Nicolas pour ta confiance, ta disponibilité et ton soutien permanent durant ces trois années. Nicolas a été un directeur formidable, qui a su me laisser suffisamment d'autonomie tout en étant présent quand j'en avais besoin. Je souhaite de tout cœur aux étudiants qui commencent un doctorat d'avoir un tel directeur pendant leur thèse. Je te remercie également pour la proposition de post doc. J'espère que nos collaborations futures seront aussi enrichissantes.

Je souhaite remercier ici Laurent Gasnot, directeur du laboratoire PC2A pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire. Je le remercie également pour toutes les discussions qu'on a eu pendant ces années.

Bien évidemment, ce travail ne serait pas ce qu'il est sans les conseils de Sylvie Gosselin, Marie Choël et Patricia De Nadaï. Merci à toi Sylvie pour ta présence à côté de moi durant ces années, je n'aurais pas appris à utiliser les GC-FID/MS sans ton aide. Grâce à toi Marie j'ai pu observer la forme réelle de mes pollens de fléole des prés et de bouleau. Merci à toi Patricia pour le cours d'immunologie et surtout d'avoir passé des semaines à traiter nos quarantaine échantillons.

Merci à toi Alessandro car sans tes conseils sur l'utilisation d'Origin mes figures de ce manuscrit ne seraient pas aussi propres. Merci Hélène pour avoir gardé ce contact avec moi depuis notre rencontre à mon comité de suivi de thèse.

Ma reconnaissance va aussi à l'ensemble des techniciens et ingénieurs du laboratoire pour leur disponibilité et leur aide. Plus particulièrement, merci à Béatrice, les deux Sébastien (B. et G.), Pascal pour les discussions qu'on a eu chaque matin. Je suis très contente de t'avoir rencontré Béa avant que tu partes en retraite .... Merci à Valérie Vilain pour ses conseils et surtout pour les réservations de mes billets d'avion et d'hôtel sans oublier celles de la mission italienne inoubliable...

Je te remercie Ranime pour les voyages, les soirées, les appels téléphoniques partagés ensemble durant ces trois années.

Je tiens également à remercier les thésards et post-docs rencontrés depuis mon arrivée au laboratoire avec qui j'ai partagé de bons moments et en particulier les repas du midi au restaurant universitaire avec les filles (Lise, Mona, Dorra, Sonia, Lucia, Camille, Carolina et Eliane). Un grand merci à Mona et Lise de m'avoir préparée la table de mon pot de thèse, pour les moments qu'on a partagé dans le bureau et sans oublier nos séances selfies...

La fin de mes remerciements est réservée à mon entourage qui m'a toujours soutenue. Un grand merci à ma famille ici à Lille avec laquelle j'ai partagé des moments inoubliables. Je remercie très chaleureusement mes parents, mes sœurs et mon frère qui ont supporté mon éloignement et m'ont encouragée pendant ces années. Merci à mes nièces Erenie, Mélanie, Nectaria, Maria et mon neveu Paysios de rendre mes retours au Liban les plus beaux.

# Sommaire



<b>Introduction.....</b>	<b>9</b>
<b>Chapitre I. Etat de l'art .....</b>	<b>17</b>
1. Généralités sur le grain de pollen .....	19
2. La fraction lipidique du grain de pollen .....	30
3. Les allergies polliniques .....	37
4. Vieillessement atmosphérique du grain de pollen par les polluants atmosphériques.....	49
5. Conclusion.....	60
6. Références bibliographiques .....	61
<b>Chapitre II. Dispositif expérimental .....</b>	<b>77</b>
1. Introduction .....	80
2. Grains de pollen étudiés .....	80
3. Exposition des pollens <i>in vitro</i> aux polluants gazeux .....	81
4. Rupture artificielle du pollen.....	83
5. Extraction de la fraction lipidique pollinique .....	84
6. Analyses chromatographiques .....	90
7. Dosage des protéines totales Extraction de la fraction lipidique pollinique.....	91
8. Observation microscopique électronique à balayage et optique.....	92
9. Références bibliographiques .....	93
<b>Chapitre III. Etude de la fraction lipidique pollinique.....</b>	<b>97</b>
1. Identification des espèces organiques extraites de la fraction lipidique externe du pollen par le dichlorométhane .....	100
2. Identification des espèces organiques extraites de la fraction lipidique du pollen par le PBS...116	
3. Références bibliographiques .....	131

**Chapitre IV. Modification de la fraction lipidique du pollen par les polluants atmosphériques (ozone et dioxyde d'azote).....133**

1. Introduction .....	136
2. Effets des polluants sur les fractions lipidiques des pollens de fléole des prés et de bouleau ..	137
3. Etude de la composition chimique du pollen pollué <i>in vitro</i> et extrait par le dichlorométhane	143
4. Etude de la composition chimique du pollen pollué <i>in vitro</i> et extrait par le PBS .....	154
5. Effets de l'exposition du pollen à la pollution sur la réponse inflammatoire .....	158
6. Discussion et conclusion .....	160
7. Références bibliographiques .....	164

**Chapitre V. Etude de la fraction lipidique interne du pollen et de des modifications causées par une exposition *in vitro* à l'ozone .....167**

1. Introduction .....	170
2. Observation en microscopie électronique des grains de pollens ayant subi une rupture artificielle.....	170
3. Comparaison du profil lipidique extrait des pollens intacts et broyés .....	172
4. Identification et quantification des lipides internes extraits du pollen par le dichlorométhane	173
5. Modification des lipides internes du pollen de fléole des prés par l'ozone.....	183
6. Discussion et conclusion .....	190
7. Références bibliographiques .....	194

**Conclusions générales et perspectives.....197**

**Résumé.....205**

**Abstract.....206**

Le grain de pollen est une particule atmosphérique particulière, associée d'une part au transport du matériel génétique nécessaire à la reproduction végétale, et d'autre part, à un impact négatif sur la qualité de vie et la santé de millions de personnes à travers des réactions allergiques et asthmatiques. La prévalence des pathologies allergiques a pratiquement doublé ces vingt dernières années pour atteindre jusqu'à 20% de la population dans les pays industrialisés. La pollution atmosphérique pourrait jouer un rôle dans l'incidence des allergies aux pollens.

En entrant en contact avec l'atmosphère, à savoir au moment de la déhiscence des anthères, plusieurs changements sont possibles sur cette particule. L'ensemble des processus de vieillissement atmosphérique peut en effet aboutir à des modifications des caractéristiques physiques, biologiques et chimiques. Ces différentes facettes du vieillissement atmosphérique sur le grain de pollen peuvent venir changer son caractère allergisant. La réactivité de polluants atmosphériques peut faciliter la rupture du pollen et permettre la libération des granules cytoplasmiques de taille micrométriques qui sont les principaux déclencheurs des crises d'asthme allergiques.

Pour comprendre l'impact de la pollution atmosphérique sur l'aggravation des réactions allergiques aux pollens il faut non seulement se renseigner sur les modifications de ses allergènes mais également sur l'altération de ses lipides qui peuvent moduler son potentiel allergisant.

La vision du grain de pollen comme un simple transporteur d'allergènes est dépassée. Pour comprendre l'allergie, il faut être renseigné sur la composition chimique du grain pollen. Récemment son profil lipidique a reçu de plus en plus l'attention en tant qu'objet de recherche. Les lipides du pollen sont non seulement essentiels à la réussite des différentes étapes de reproduction chez les végétaux mais ils interviennent également durant la réaction allergique en jouant un rôle adjuvant (ou inhibiteur). La fraction lipidique du pollen est située dans son revêtement pollinique ainsi que dans son contenu cytoplasmique, on parle alors des lipides externes et internes. Les lipides externes présents dans le revêtement pollinique peuvent être présents (i) sous forme d'un film mince sur la surface du pollen, (ii) sous forme de gouttelettes en surface du pollen (iii) ils peuvent remplir des anfractuosités en surface du pollen. Les lipides internes se répartissent dans les membranes intracellulaires et les corps de stockage des lipides. Au moment de l'inhalation, le revêtement pollinique est la première structure du grain de pollen qui entre en contact avec l'épithélium des voies respiratoires. Suite au contact du pollen avec la phase aqueuse de la muqueuse, les lipides externes et internes du pollen peuvent être libérés.

## Introduction

La composition de la fraction lipidique externe a été étudiée pour le pollen de plusieurs espèces de plantes. Les familles chimiques qui ont été identifiées dans cette fraction sont les suivantes : alcanes, alcènes, aldéhydes, acides gras monocarboxyliques et dicarboxyliques alcools, amino-alcools, éthers, et composés aromatiques. Par ailleurs, l'identification des espèces chimiques des lipides internes du pollen est peu détaillée dans la littérature. Plus généralement, il est essentiel de connaître la composition chimique des grains de pollen allergisants et en particulier la façon dont celle-ci est altérée par la pollution de l'environnement. La connaissance de la modification de la fraction lipidique des pollens allergisants est cruciale afin de comprendre les impacts potentiels de cette altération sur la santé des sujets allergiques, là est tout le sens de mes travaux de thèse.

Notre étude porte tout particulièrement sur les grains de pollen allergisants la fléole des prés et le bouleau qui sont parmi les premiers responsables des pollinoses sur le territoire français et plus particulièrement dans le nord de la France. Mon travail de thèse est basé sur les points suivants qui doivent être mieux compris :

- 1) *La fraction lipidique externe et interne des pollens allergisants n'est que partiellement connue, en particulier les analyses quantitatives sont absentes dans la littérature.*
- 2) *Quels sont les effets chimiques d'une exposition in vitro à des polluants atmosphériques (l'ozone et le dioxyde d'azote) sur la fraction lipidique pollinique extractible ?*
- 3) *La rupture des grains de pollen peut survenir dans l'atmosphère, un grain de pollen cassé subit-il les mêmes effets de la pollution atmosphérique qu'un grain intact ?*
- 4) *La fraction lipidique pollinique est-elle extractible par les fluides du système respiratoire ?*

Pour répondre à ces différents points, les échantillons suivants ont été préparés à partir de pollens de fléole des prés et de bouleau :

- Pollen sans aucun traitement particulier (le terme "intact" sera employé au sens où le pollen provient directement de la plante sans autre traitement que le stockage).
- Pollen exposé *in-vitro* à l'ozone et au dioxyde d'azote (pollen pollué).
- Pollen ayant subi une rupture artificielle (pollen broyé).
- Pollen exposé à l'ozone après sa rupture.

Le manuscrit débute par une revue bibliographique présentant le contexte de l'étude. Après avoir donné des généralités sur les grains de pollen nous décrivons la biogenèse de ses fractions lipidiques externe et interne ainsi que les différentes espèces chimiques identifiées dans ces deux fractions. Nous

détaillons par la suite les interventions de ses lipides et de ses allergènes durant le mécanisme de la réaction allergique. Les facteurs influençant le risque de développer une allergie aux pollens sont également présentés par la suite. Enfin, nous évoquons les différentes études concernant les effets de vieillissement atmosphérique du pollen sur la modification de ses caractéristiques physiques, biologiques et chimiques.

Le chapitre II est consacré à la description du dispositif expérimentale de mes travaux de recherche. Tout d'abord nous présentons les lieux et les dates de récolte des grains de pollen étudiés ainsi que la mise en œuvre expérimentale de leurs expositions *in vitro* aux polluants gazeux. Les grains de pollen de fléole des prés ont été exposés à une concentration de 100 ppb d'ozone et ceux de bouleau à une concentration de 130 ppb d'ozone, les deux pollens ont été également exposés à une concentration de 100 ppb de dioxyde d'azote. Nous présentons par la suite la technique de rupture artificielle mise en place dans le but d'extraire la fraction lipidique interne des pollens. Nous détaillons ensuite les deux méthodes expérimentales d'extraction par le solvant organique le dichlorométhane (DCM) et le solvant aqueux le Phosphate Buffered Saline (PBS) de la fraction lipidique des pollens sous forme intacte et polluée. Les méthodes chromatographiques en phase gazeuse et les deux détecteurs de spectromètre de masse et à ionisation de flamme nécessaires pour réaliser respectivement les études d'identification et de quantification des lipides sont ensuite décrites. À la fin de ce chapitre j'expose les travaux réalisés en collaboration. En bref deux études ont été initiées durant ma thèse avec les collègues du Centre d'Infection et d'Immunologie de Lille, Patricia de Nadaï et Joanne Balsamelli ; concernant (i) la réponse inflammatoire induite par les extraits de pollen chez des sujets allergiques ou non en particulier le rôle de la fraction lipidique et (ii) le dosage des quantités de protéines totales extraites des pollens en fonction de l'exposition aux polluants. Seuls les résultats concernant l'altération de la quantité des protéines totales extraites du pollen de fléole des prés exposé *in vitro* à l'ozone sont représentés dans ce travail. Un autre travail a également été réalisé en collaboration avec Marie Choël (LASIR Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman) sur l'observation en microscopie électronique à balayage et optique des grains de pollen de fléole des prés sous forme intacte, polluée et broyée.

Le chapitre III est découpé en deux parties, la première partie est consacrée à l'identification et la quantification des espèces chimiques extraites de la fraction lipidique externe des pollens par le dichlorométhane. Dans la seconde partie, nous présentons la liste des lipides identifiés et quantifiés après extraction des pollens par le solvant aqueux le PBS.

## Introduction

Nous exposons ensuite dans le chapitre IV les modifications chimiques induites par une exposition *in vitro* à l'ozone et au dioxyde d'azote des grains de pollen de fléole des prés et de bouleau. Une étude de comparaison entre les lipides extraits des pollens intacts et pollués par les deux solvants (organique et aqueux) est présentée. Ces travaux nous permettent d'identifier les espèces chimiques du pollen qui peuvent être modifiées par une exposition aux polluants atmosphériques dans les conditions réelles. Nous présentons également dans ce chapitre les résultats préliminaires concernant l'altération de la quantité de protéines totales par une exposition expérimentale des grains de pollen de fléole des prés à l'ozone.

Enfin le chapitre V est consacré à l'identification des lipides internes extraits des pollens par le dichlorométhane. Ce travail a été effectué afin d'identifier la composition lipidique interne du grain de pollen et qui peut être libérée après la rupture des grains de pollen de fléole des prés et de bouleau sous l'effet de vieillissement atmosphérique.

# Introduction



# Chapitre I

Etat de l'art



<b>1. Généralités sur le grain de pollen.....</b>	<b>19</b>
1.1 Description morphologique du grain de pollen.....	20
1.2 Les parois polliniques.....	21
1.2.1 L'intine .....	22
1.2.2 L'exine .....	22
1.2.3 Revêtement pollinique .....	23
1.3 Les apertures .....	23
1.4 Les orbicules.....	24
1.5 Dispersion des grains de pollen.....	24
1.6 La pollinose .....	26
1.6.1 Généralités.....	26
1.6.2 Les graminées.....	28
1.6.3 Les betulacées.....	29
<b>2. La fraction lipidique du grain de pollen.....</b>	<b>30</b>
2.1 La biogenèse de la fraction lipidique .....	31
2.1.1 La biogenèse des lipides de l'exine.....	32
2.1.2 La biogenèse des lipides externes et internes.....	32
2.1.3 Finalisation de la biogenèse et maturation du pollen.....	33
2.2 Les lipides externes.....	33
2.3 Les lipides internes .....	34
2.3.1 Les lipides membranaires internes.....	35
2.3.2 Les corps de stockage des lipides.....	36
<b>3. Les allergies polliniques.....</b>	<b>37</b>
3.1 Généralités .....	38
3.2 Les acteurs de l'allergie .....	39
3.2.1 Les cellules effectrices de l'allergie.....	39
3.2.2 Les médiateurs moléculaires de l'allergie .....	40
3.3 Interaction du pollen avec le système immunitaire.....	41

## Chapitre I. Etat de l'art

3.3.1	Intervention des allergènes durant le mécanisme de la réaction allergique.....	42
3.3.2	Intervention des lipides durant le mécanisme de la réaction allergique.....	44
3.4	Facteurs de risque de développer une allergie aux pollens .....	46
3.4.1	La prédisposition génétique, le sexe et l'âge.....	46
3.4.2	Influence du changement climatique.....	47
3.4.3	Les polluants atmosphériques .....	47
<b>4.</b>	<b> Vieillissement atmosphérique du grain de pollen par les polluants atmosphériques .....</b>	<b>49</b>
4.1	Modifications chimiques du pollen.....	51
4.1.1	Enrichissement de la surface pollinique en différents éléments chimiques .....	51
4.1.2	Modification de la fraction lipidique .....	51
4.2	Modification des caractéristiques biologiques du grain de pollen.....	53
4.2.1	Altération des protéines (dont les allergènes) .....	54
4.2.2	Altération de la fonction reproductive.....	55
4.3	Modifications physiques du grain de pollen et libération des granules.....	55
4.3.1	La libération des granules cytoplasmiques en milieu aqueux .....	56
4.3.2	La libération des granules cytoplasmiques facilitée par les polluants atmosphériques.....	58
<b>5.</b>	<b> Conclusion.....</b>	<b>60</b>
<b>6.</b>	<b> Références bibliographiques.....</b>	<b>61</b>

## 1. Généralités sur le grain de pollen

*Le grain de pollen, pourvoyeur des gamètes mâles chez les végétaux supérieurs, est une structure de dispersion et de reproduction. Lors de la pollinisation, il est transporté sur le stigmate de la fleur où il va germer et produire le tube pollinique. Ce tube assurera la fécondation en transportant les gamètes mâles jusqu'à l'ovule (Guerin, 1993).*

*Le microgamétophyte est doté d'une double paroi particulière : sa couche externe l'exine constituée principalement de sporopollénine et sa couche interne intine faisant surface au niveau des ouvertures. Chez certaines espèces l'exine est recouverte d'un revêtement pollinique connu dans la littérature par le terme « pollen coat » (Pacini and Hesse, 2005). Une très grande partie de mon travail de thèse a été effectuée sur les lipides de ce revêtement (les lipides externes) car ils possèdent un rôle adjuvant durant la réaction allergique (Bashir et al., 2013a; Traidl-Hoffmann et al., 2002).*

*Selon les espèces, les grains de pollen sont transportés soit par les insectes (plantes entomophiles) soit par le vent (plantes anémophiles). Cette étude est centrée sur deux pollens allergisants anémophiles, celui de la fléole des prés et de bouleau, car leurs grains sont émis dans l'atmosphère en plus grandes quantités et sont parmi les premiers responsables des pollinoses sur le territoire français et plus particulièrement dans le Nord de la France (ANSES, 2014).*

## 1.1 Description morphologique du grain de pollen

Le grain de pollen est l'élément reproducteur microscopique ou microgamétophyte produit par les organes mâles des plantes (anthères des étamines). Il est généralement de forme sphérique ou ovoïde. Sa taille varie entre 5  $\mu\text{m}$  (pollen de myosotis) et 250  $\mu\text{m}$  (pollen de conifères) avec une taille commune située entre 20 et 60  $\mu\text{m}$  (Guerin, 1993). Le grain de pollen contient les deux gamètes mâles nécessaires à la naissance des générations successives chez les phanérogames (gymnospermes et angiospermes) (Berger and Twell, 2011). La figure I.1 représente la structure en coupe d'un grain de pollen. Chez la plupart des angiospermes, il est composé de deux cellules situées dans son cytoplasme :

- La cellule reproductrice, contenant le matériel génétique fécondant, est dotée d'une paroi très mince. Elle progressera tout au long du tube pollinique et se scindera en deux gamètes mâles nécessaires à la double fécondation et donc à la reproduction (Guerin, 1993).
- La cellule végétative, possédant une paroi très épaisse, caractérise les grains de pollen des angiospermes. Elle comprend un noyau, des organites, une vacuole et des réserves sous forme d'amidon et de lipides (les lipides internes). Sa fonction est d'assurer la survie du pollen et de gérer son métabolisme et en particulier la croissance de son tube pollinique (Guerin, 1993).

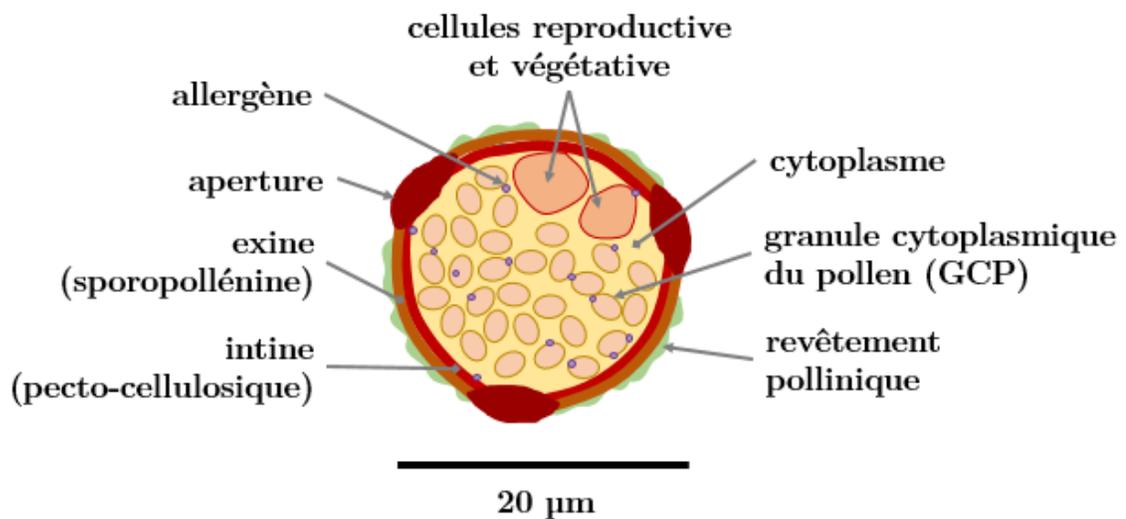


Figure I. 1: Vue schématisée en coupe d'un grain de pollen (crédit Farah & Visez).

La composition biochimique d'un grain de pollen est assez complexe ; il renferme des composés lipidiques (composés aliphatiques et aromatiques entre autres), des glucides (cellulose, hémicellulose, callose et divers polysaccharides), des protéines et des éléments minéraux (Rancé et al., 2007).

La morphologie des grains de pollen est caractéristique de chaque espèce de plante. Elle est identifiable par sa forme générale, sa taille, la répartition de ces apertures et les ornements de la couche externe appelée « exine ». Certaines de ces caractéristiques permettent une identification de la plante productrice du pollen.

Les grains de pollens sont libérés à maturité par déhiscence de l'anthere et passent par les différentes phases du processus de pollinisation (transport des grains de pollen) : (1) déshydratation, (2) libération, (3) transport, (4) atterrissage et adhésion sur le stigmate, (5) réhydratation et (6) germination.

De l'anthere au stigmate, le gamétophyte mâle assure sa mission de reproduction qui se terminera peu après la germination quand toutes les conditions rencontrées seront optimales (après des échanges d'eau, de lipides et de protéines). Avant d'être libéré des anthères, le grain de pollen peut perdre en eau de 20 à 35% de sa masse (selon les conditions de température et d'humidité) par l'intermédiaire de ces apertures (Heslop-Harrison, 1979). Après cette étape il entre en contact avec l'atmosphère et subit plusieurs changements (physiques, biologiques ou chimiques) (Sénéchal et al., 2015). L'ensemble des effets de vieillissement atmosphériques sur le grain de pollen peut provoquer une fragilisation de sa structure, induire à la libération de son contenu pollinique (Motta et al., 2006) et donc modifier son potentiel allergisant (Sénéchal et al., 2015). La paroi pollinique est le rempart de protection du matériel génétique face à ces agressions extérieures.

## **1.2 Les parois polliniques**

La paroi cellulaire des grains de pollen a fait l'objet de très nombreuses recherches, en grande partie en raison de sa composition chimique particulière. Le grain de pollen est en effet doté d'une double paroi, une couche interne ou intine de nature pecto-cellulosique et une couche externe ou exine qui est un véritable exosquelette constituée de sporopollénine (Dominguez et al., 1999; Wehling et al., 1989).

Il existe aussi à la surface du pollen un revêtement pollinique qui est souvent identifié dans la littérature par le terme « pollen coat » (Bashir et al., 2013a; Dickinson et al., 2000; Murphy, 2006; Pacini and Hesse, 2005). Sa couche interne, l'intine ainsi que les espèces contenues dans le cytoplasme sont synthétisées par le pollen lui-même. Par contre son revêtement pollinique et son exine proviennent du contenu des cellules du tapetum (paroi de l'anthere) après avoir subi une mort cellulaire programmée (apoptose) (Honys and Twell, 2004; Piffanelli et al., 1997; Swanson et al., 2004).

### 1.2.1 L'intine

L'intine délimite le cytoplasme et se trouve sur tout le pourtour du grain de pollen en épaisseur plus ou moins importante. Elle est assez perméable, lisse et souple et de nature pecto-cellulosique composée principalement de cellulose et de pectine (Heslop-Harrison, 1968). Cette couche interne est un site de stockage des enzymes hydrolytiques et contient aussi certains allergènes (Scott et al., 2004). Elle joue un rôle essentiel durant la germination pollinique ; en contact avec la surface stigmatique le pollen se réhydrate et son intine est expulsée du grain par une ouverture pour former le tube pollinique et déclencher ainsi le processus de germination (Kuprianova, 1967).

### 1.2.2 L'exine

L'exine, externe, est imperméable et peu flexible. Elle est un véritable exosquelette constituée principalement d'un copolymère de phénols et des dérivés d'acide gras appelé sporopollénine (Dominguez et al., 1999; Wehling et al., 1989). C'est un bio-polymère réticulé et l'un des matériaux chimiquement les plus stables d'origine végétale. Grâce à la sporopollénine le grain de pollen est bien protégé des agressions extérieures biologiques et chimiques (Meuter-Gerhards et al., 1999).

L'exine se différencie en deux couches chimiquement différentes, l'endexine et l'ectexine qui sont caractéristiques du grain de pollen de chaque espèce végétale. L'endexine forme une couche continue alors que l'ectexine présente une structure plus complexe (Guerin, 1993).

Les variations de l'ornementation de l'exine peuvent donc être parfois mises en relation avec le type de pollinisation. Généralement, le pollen lisse est associé à l'anémophilie (pollinisation par le vent) ou à l'hydrophilie (pollinisation par l'eau pour certaines espèces aquatiques), alors que les sculptures présentées par les pollens réticulés facilitent leur agrégation entre eux ainsi que leur adhésion aux insectes (Tanaka et al., 2004).

### 1.2.3 Revêtement pollinique

L'exine est généralement recouverte d'un revêtement pollinique. Cette matrice possède plusieurs appellations dans la littérature : «manteau pollinique», «pollenkitt» et «tryphine » (Bashir et al., 2013a, 2013b; Pacini et al., 1999). Malgré certaines différences qui existent entre le pollenkitt et la tryphine, le terme pollen coat est utilisé par les auteurs comme étant un terme générique pour désigner le revêtement pollinique (Pacini and Hesse, 2005).

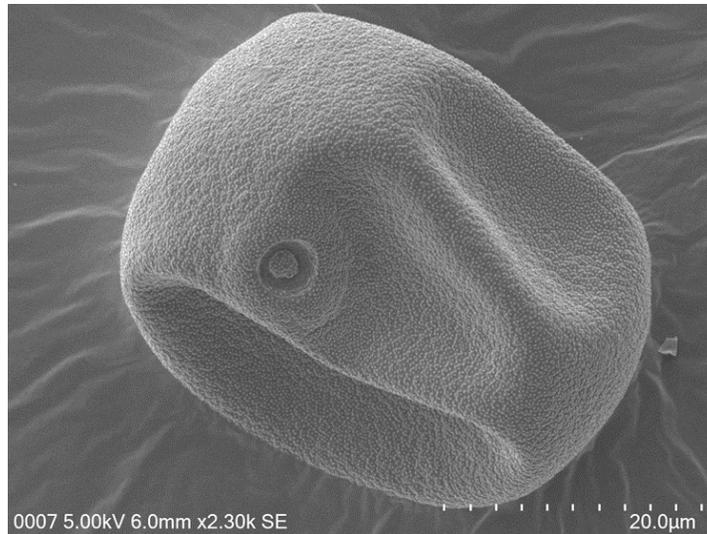
Le revêtement pollinique est secrété par le tapetum, après la dégénérescence cellulaire de celui-ci (Heslop-Harrison, 1968). Les analyses de ce revêtement montre qu'il contient une fraction protéique et une fraction lipidique (Abed El Azim, 2015; Bashir et al., 2013a; Henricsson et al., 1996; Naas et al., 2016; Piffanelli et al., 1997; Swanson et al., 2004; Zhu et al., 2018). La composition de la fraction lipidique du pollen est détaillée dans la deuxième partie de ce chapitre.

Ce revêtement pollinique est essentiel au pollen pour réussir les différentes étapes de reproduction (Dickinson et al., 2000; Swanson et al., 2004). Il contient aussi certaines substances qui permettent de rendre le pollen entomophile plus attractif et visible par les pollinisateurs (Dobson and Bergström, 2000; Lunau, 1995; Nepi et al., 2003). Des autres études montrent également que les lipides et les protéines du revêtement pollinique peuvent agir sur le système inflammatoire et immunitaire après l'inhalation des grains de pollen (Bashir et al., 2013a; Traidl-Hoffmann et al., 2002) (**cf. partie 3.3.2.**).

## 1.3 Les apertures

La paroi des grains de pollen possède aussi des apertures (couramment appelées pores dans la littérature) qui sont caractérisées par un fort amincissement local, voire d'une disparition, de l'exine et d'un épaissement de l'intine (Thanikaimoni, 1986) (figure I.2).

Ces apertures sont impliquées à la fois durant la survie et la germination du grain de pollen. Elles assurent l'échange des substances avec l'extérieur (par exemple avec les cellules de tapetum et avec une surface humide) (Edlund et al., 2004; Fernández and Rodríguez-García, 1989; Heslop-Harrison, 1979). Les apertures jouent également un rôle important durant la fécondation en permettant le passage du tube pollinique lors de la germination du grain de pollen sur l'organe reproducteur femelle (Kuprianova, 1967).



*Figure I. 2: Observation en microscopie électronique à balayage du grain de pollen de fléole des prés intact (pollen provenant de République tchèque, Bohême du Sud (2007)). Image en microscopie électronique à balayage réalisée par Marie Choël.*

#### 1.4 Les orbicules

L'exine est tapissée pour certaines espèces végétales de petites structures appelées orbicules qui peuvent être considérées comme des vecteurs d'allergènes (Stefan Vinckier and Smets, 2001). Ces orbicules sont par exemples collées en quantités importantes sur la surface du pollen de cyprès et en plus petites quantités pour certains pollens de graminées (Taylor et al., 2007). Par contre pour d'autres espèces les orbicules ne sont présentes que sur les parois intérieures de l'anthère et rarement en surface du grain (bouleau par exemple) (Vinckier and Smets, 2001; Vinckier and Smets, 2002). Un allergène mineur Bet v 7 et des traces de Bet v 1 ont été détectés dans les orbicules du bouleau (Vinckier et al., 2006). Toutefois, en raison de leur très faible nombre et de leur faible charge en allergène, les orbicules ont un rôle négligeable dans les allergies aux pollens du bouleau.

#### 1.5 Dispersion des grains de pollen

Les grains de pollen matures sont libérés par déhiscence de l'anthère. Etant dépourvue de mobilité propre, la pollinisation est assurée soit par des facteurs abiotiques surtout par le vent pour les plantes dites anémophiles soit par des facteurs biotiques comme par exemple par : (i) les insectes pour les plantes entomophiles, (ii) les animaux pour les chéiroptérophiiles et (iii) les oiseaux pour les ornithophiles. Plus rarement la pollinisation peut se faire aussi par l'eau (hydrophilie) plus

particulièrement pour certaines espèces aquatiques qui dispersant leur pollen directement dans l'eau c'est le cas des espèces du genre *Ceratophyllum* (Prieu, 2015).

La réussite de la pollinisation et de la fécondation chez les plantes supérieures dépend des interactions entre les grains de pollen et les tissus du pistil (Lord and Russell, 2002). C'est surtout l'interaction des parois polliniques (le revêtement pollinique et l'exine) avec la surface du stigmate qui favorise la réussite des étapes de l'adhérence, la reconnaissance et la germination du tube pollinique (Dickinson et al., 2000; Doughty et al., 1993; Luu et al., 1997; Zinkl et al., 1999).

Les grains de pollen anémophiles ont généralement une taille entre 10 et 40  $\mu\text{m}$ , lisses (sans ornementation), et secs pour faciliter leur transport par le vent. Certains parmi eux présentent des ballonnets pour améliorer la flottabilité dans l'air comme par exemple le pollen de pin (Guerin, 1993).

Certains pollens ont une taille moins de 10  $\mu\text{m}$ , cette taille réduite leur permet d'entrer plus facilement en contact avec les muqueuses respiratoires et oculaires et déclencher ainsi des réactions allergiques. Cependant, on peut trouver des plantes anémophiles qui ne provoquent pas d'allergies malgré une production importante de pollens, c'est le cas du pollen de certains conifères comme les épicéas et les pins (Guerin, 1993).

En fonction du vent, mais également de la taille, de la forme, du poids des grains, de leur hauteur d'émission et des milieux dans lesquels ils sont émis (milieux ouverts ou fermés), les grains de pollen peuvent être transportés loin de leur source d'émission comme l'ont montré de nombreuses études. À une distance de 300-400 mètres les concentrations polliniques se stabilisent et ensuite traduisent une ambiance pollinique moyenne qui évolue peu avec la distance (Calleja et al., 1993; Cecchi et al., 2007; Fernández-Llamazares et al., 2012; Rousseau et al., 2006). Cependant les grains de pollen anémophiles peuvent être transportés sur des distances maximales de plusieurs milliers de kilomètres par rapport à leur source émettrice (D'amato et al., 2007; Siljamo et al., 2008; Sofiev and Bergmann, 2012).

Les grains de pollen transportés sur des longues distances sont considérés comme des alertes de danger pour les patients allergiques car ces derniers ne seront pas protégés durant les épisodes polliniques pré-saisonniers (Skjoth et al., 2007). En effet, les réactions allergiques se déclenchent une fois que les grains de pollen dépassent une certaine concentration dans l'air. En général il faut que les pollens

soient assez abondants dans l'atmosphère pour provoquer des allergies (au moins quarante grains par mètre cube pour les graminées) (Guerin, 1993).

## 1.6 La pollinose

### 1.6.1 Généralités

Le pollen présent dans l'atmosphère est important non seulement pour la reproduction des plantes mais il est aussi la principale cause d'une des maladies environnementales les plus répandues dans les sociétés industrialisées : les allergies aux pollens ou pollinoses.

Les pollens présents dans l'air ne sont pas tous allergisants, ils doivent être libérés sous forme d'aérosol et en quantités importantes pour provoquer des symptômes allergiques. Les pollens allergisants anémophiles sont responsables de nombreuses pollinoses car ils entrent naturellement en contact avec les muqueuses respiratoires et oculaires du fait de leurs tailles réduites. Le mécanisme de la réaction allergique pollinique sera décrit dans la **partie 3.3** de ce chapitre.

Les allergènes sont localisés à l'intérieur des grains, principalement dans leur cytoplasme (Emilsson et al., 1996; Grote, 1999). Toutefois en contact avec l'eau, ils peuvent migrer rapidement et être détectés dans les parois polliniques : exine et intine (Staff et al., 1999). Leur libération peut également se faire avant l'inhalation suite à l'action des polluants atmosphériques qui peuvent fragiliser la paroi pollinique et entraîner la rupture du pollen et la libération de son contenu cytoplasmique (Motta et al., 2006).

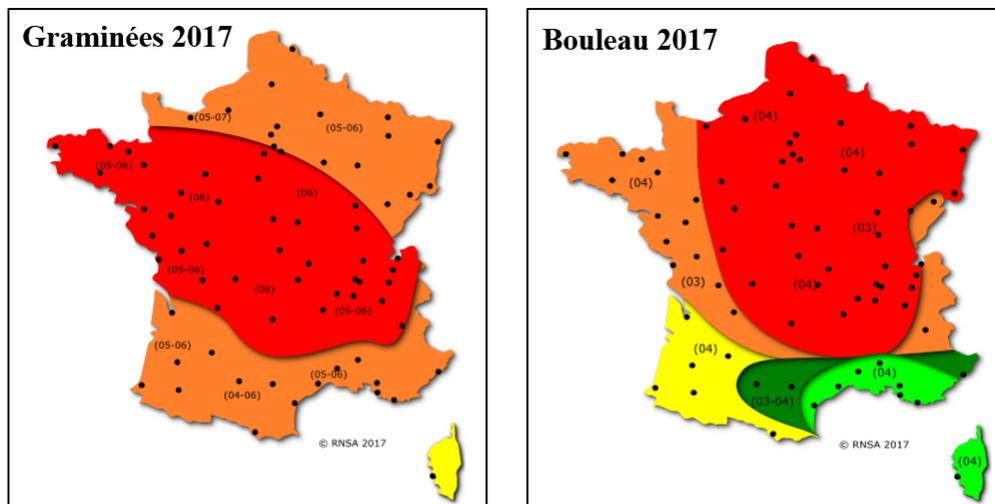
Le pollen est souvent classé en trois groupes dans les domaines de l'allergologie et de l'aérobiologie : les arbres, les herbacées et les poacées (Tableau I.1). Les deux familles qui nous intéressent durant ce travail sont celles des bétulacées et des graminées qui tombent dans les groupes de plante des angiospermes et font partie respectivement des groupes des arbres et des poacées.

	Saison pollinique	Familles	Principaux pollens
<b>Arbres</b>	Janvier-Mai	Betulacées Corylacées Cupressacées Fagacées Oléacées Platanacées Salicacées Tiliacées	Bouleau, Aulne Charme, Noisetier Cyrès Chêne, châtaigner Olivier, Frêne Platane Peuplier, Saule Tilleul
<b>Poacées</b>	Mai-Juillet	Graminées	Dactyle, Fléole
<b>Herbacées</b>	Juillet-Septembre	Composées Plantaginacées Polygonacées Urticacées	Armoise, Ambroisie Plantain Oseille Pariétaire

Tableau I. 1: Principales espèces et familles botaniques dont les pollens sont impliqués dans les pollinoses en France (RNSA, 2018).

Le Réseau National de Surveillance Aérobiologique (RNSA) édite le bulletin allergo-pollinique spécifique ainsi que l'indice de Risque Allergique d'Exposition au Pollen (RAEP). Cet indice est coté de 0 à 5 (d'un risque nul à très fort).

Selon les données publiées par le RNSA pour l'année 2017, il paraît que les grains de pollen des graminées et du bouleau sont répartis sur une grande partie du territoire métropolitain français (figure I.3).



□ : nul    ■ : très faible    ■ : faible    ■ : moyen    ■ : élevé    ■ : très élevé

Figure I. 3: Cartes de risque allergique en 2017 pour les Graminées et le Bouleau (RNSA, 2018).

### 1.6.2 Les graminées

Les grains de pollen des différents genres et espèces de graminées ont une morphologie relativement homogène. Ils ont un diamètre compris entre 15 à 55  $\mu\text{m}$ . Les grains de pollen sont monoporés (pore distal operculé), de forme sphérique à ovoïdes avec une exine plus ou moins granuleuse et une intine d'épaisseur moyenne plus marquée à l'hémisphère distal. Leurs cytoplasmes contiennent : (i) les organites cellulaires tels que mitochondries, chloroplastes et des granules, (ii) trois noyaux dont un végétatif et deux génératifs (Guerin, 1993; Rancé et al., 2007).

Les périodes de pollinose couvrent une partie du printemps et tout l'été dans les régions de l'Europe méridionale. En effet on suspecte aussi que la production pollinique peut varier d'une année à l'autre en fonction des conditions climatiques et de la pollution atmosphérique. Ces variations vont influencer les concentrations polliniques annuelles ainsi que les manifestations allergiques. Un grand nombre de pollens de la famille des graminées possèdent un potentiel allergisant très fort en particulier ceux des graminées fourragères (brome, chiendent, dactyle, sainfoin, fétuque, fléole, flouve, folle, houlque, ivraie, pâturin, roseau, vulpin) (Jaeger, 2008; Minero et al., 1998). Les quantités hebdomadaires maximales inhalées des pollens des graminées peuvent atteindre un maximum de 8 à 10 mg en une semaine en cours de la pleine période de floraison dans les régions de pâturage et au voisinage de celles-ci (Guerin, 1993).

#### *La fléole des prés (*Phleum pratense*)*

Une grande partie de mes travaux de thèse a été effectuée sur le pollen d'une graminée : la fléole de près (*Phleum pratense*). Cette graminée est un modèle de grand intérêt applicable dans le domaine de l'allergologie car elle possède une large répartition géographique ainsi qu'une importante allergénicité qui a été déjà largement étudiée (Behrendt et al., 1999; Hejl et al., 2009; Motta et al., 2004; Vrtala et al., 1999).

La fléole des prés est une graminée vivace appartenant à la famille des *Poaceae* (sous famille *Pooideae*), elle est présente dans tous les départements de la métropole Française. Le grain de pollen de *Phleum pratense* a une taille de 35  $\mu\text{m}$  (Wilson et al., 1973). Son potentiel allergisant est attribué à la libération rapide de son contenu allergénique après hydratation en contact des muqueuses (Bashir et al., 2013b;

Traidl-Hoffmann et al., 2002). L'action des polluants atmosphériques sur les parois polliniques de cette graminée peut induire aussi à la libération de son contenu allergénique (Motta et al., 2006).

### 1.6.3 Les betulacées

La deuxième famille étudiée dans ce travail est celle des Bétulacées (Betulaceae) qui représente une famille des plantes comprenant 157 espèces. Cette famille est subdivisée en deux sous-familles : les Betuloideae et les Coryloideae. Cette famille provienne des régions tempérées et subarctiques de l'Hémisphère Nord et elle est originaire d'Europe du Nord. (Guerin, 1993; Pauli and Metz-Favre, 2013).

#### *Le bouleau (Betula pendula)*

Les grains de pollen de bouleau sont transportés par le vent (mode anémophilie), ils sont présents dans l'atmosphère de toutes les régions d'Europe y compris en région méditerranéenne. Leur période de dissémination est de 5 à 8 semaines selon les années. Dans le nord de la France les émissions des pollens de bouleau apparaissent selon les années de fin mars à début avril pour se terminer vers la fin du mois de mai (RNSA, 2018). Les quantités de ces pollens produits dans l'atmosphère, et donc inhalés peuvent varier d'une année à une autre. Dans le nord de la France et en Belgique la masse de pollen inhalée varie entre 0,1 et 0,3 mg selon les années. Dans les régions où les bouleaux sont bien émis, leurs quantités maximales pouvant être inhalées pendant une semaine sont de l'ordre de 0,1 à 0,5 mg (Guerin, 1993).

## 2. La fraction lipidique du grain de pollen

*La fraction lipidique du grain de pollen mature se répartit entre plusieurs localisations : (i) les lipides externes du revêtement pollinique (ii) les lipides internes membranaires de type phospholipidique particulièrement ceux du réticulum endoplasmique et (iii) les lipides internes de stockage constitués principalement des triacylglycérols (TAG).*

*Les lipides internes sont aussi enrichis par des acides gras insaturés en particulière le C18:3 (acide  $\alpha$ -linoléique) et le C18:2 (acide linoléique) (Ischebeck, 2016; Piffanelli et al., 1997). La biogenèse de ces lipides se fait durant les différentes phases de développement du pollen qui se déroulent dans l'anthère (Piffanelli et al., 1997).*

*Les lipides du pollen jouent un rôle important durant la fonction reproductive ; les lipides externes interviennent durant la communication pollen-stigmate par contre les lipides internes aident à la formation du tube pollinique et à la germination (Ischebeck, 2016). D'un point de vue sanitaire, il a été démontré que les lipides du pollen sont libérés aussi après le contact du pollen avec la phase aqueuse de la muqueuse ; ils entrent ainsi en contact avec le système immunitaire et déclenchent le mécanisme de la réaction allergique (Bashir et al., 2013a; Traidl-Hoffmann et al., 2009, 2005, 2002).*

## 2.1 La biogenèse de la fraction lipidique

La biogenèse des lipides du pollen se déroule durant les différentes phases de développement pollinique. Elle a été largement étudiée chez les Brassicacées. Le tapetum de cette espèce contient des amyloplast (les oléoplastes et les tapetosomes) qui contribuent à compléter la maturation des grains de pollen par la mise en place de leurs parois extracellulaires : son exine et son revêtement pollinique (Ischebeck, 2016; Piffanelli et al., 1997; Piffanelli and Murphy, 1998; Quilichini et al., 2015, 2014) (figure I.4).

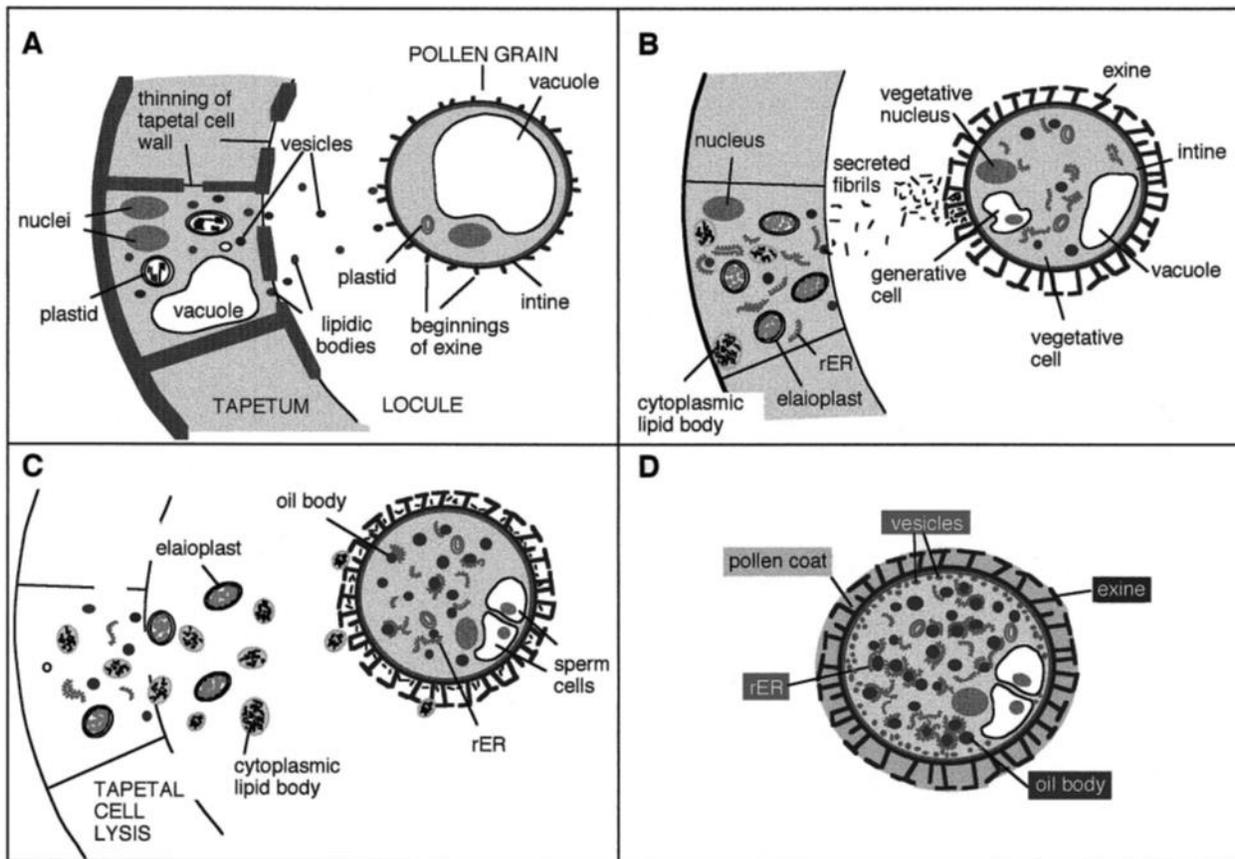


Figure I. 4: Représentation schématique des changements ultrastructuraux du grain de pollen des Brassicacées impliqués durant la synthèse des quatre principales familles lipidiques durant les différentes étapes de développement du pollen dans l'anthere (Piffanelli and Murphy, 1998) (réutilisation avec autorisation).

Chez les espèces angiospermes comme chez le bouleau et la fléole des prés, le développement des grains de pollen se déroule au sein de l'anthere, et plus précisément dans les sacs polliniques entourées par les cellules du tapetum ayant une fonction nutritive (Berger and Twell, 2011). Ce développement commence par plusieurs divisions mitotiques des microsporocytes (cellules mères diploïdes). Ces

cellules entrent ensuite en méiose et conduisent d'abord à une tétrade puis à quatre microspores haploïdes individuelles. Ces dernières subissent une division cellulaire asymétrique (mitose I) conduisant à la formation d'une petite cellule générative et une grande cellule végétative. La cellule générative se divise (mitose II) pour donner les deux cellules spermatiques alors que la cellule végétative formera plus tard le tube pollinique.

### **2.1.1 La biogenèse des lipides de l'exine**

Une des premières phases de développement du pollen est la sécrétion des précurseurs lipidiques par le tapetum qui viennent se disposer sur la surface du pollen pour former sa couche extracellulaire "exine" (figure I.4.A) (Piffanelli and Murphy, 1998). La synthèse de l'exine est complétée par la première division mitotique du pollen (Mitose I). L'amincissement de la paroi cellulaire du tapetum facilite la sécrétion des précurseurs de la sporopollénine dans une variété de vésicules et de corps lipidiques. Les orbicules sont aussi synthétisés dans les cellules de tapetum et viennent se disposer sur le dépôt de la sporopollénine après la libération du contenu cytoplasmique de ces cellules (Scott and Stead, 1994; Wiermann and Gubatz, 1992).

### **2.1.2 La biogenèse des lipides externes et internes**

Lors de la première division asymétrique, le grain de pollen se remplit du cytoplasme de la cellule végétative et commence une biosynthèse rapide des lipides (Evans et al., 1992; Piffanelli et al., 1997). Cela entraîne l'accumulation de deux principales familles de lipides internes dans les corps de stockage (storage oil bodies) et dans les membranes des vésicules et des organites intracellulaires (Aelst et al., 1993; Piffanelli et al., 1997; Wetzel and Jensen, 1992) (figure I.4 B).

Les cellules du tapetum continuent à sécréter des espèces organiques qui s'accumulent dans les cavités de l'exine pour former son revêtement pollinique. On observe aussi au sein de ces cellules une synthèse marquée des lipides par le réticulum endoplasmique (ER : Endoplasmic Reticulum). Cette étape sera suivie par une transformation des plastes en oléoplastes (elaioplast) et la formation des corps cytoplasmiques lipidiques (connues par les tapetosomes) possédant une matrice fibreuse interne de protéines de type oléosine (figure I.4 B).

Entre la première et la deuxième division mitotique du pollen, les cellules du tapetum se remplissent par les oléoplastes et par les corps cytoplasmiques lipidiques (cytoplasmic lipid bodies) qui finissent

de se développer (Hsieh and Huang, 2005). Durant cette étape on observe aussi une prolifération du réticulum endoplasmique et des corps de stockage des lipides dans la cellule végétative (figure I.4 C).

Vers la fin du développement des grains de pollen, les cellules du tapetum éclatent après avoir subi une mort programmée (Heslop-Harrison, 1968). Le contenu lipidique et protéique qui était précédemment accumulé dans les oléoplastes et les corps cytoplasmiques lipidiques recouvrent l'exine et forment le revêtement pollinique (Hsieh et al., 2003; Piffanelli and Murphy, 1998) (figure I.4 C).

### **2.1.3 Finalisation de la biogenèse et maturation du pollen**

Vers la fin de la phase de déshydratation, le grain de pollen sera rempli par des corps de stockage des lipides enveloppés dans un réseau de réticulum endoplasmique rugueux et des nombreuses vésicules accumulées sous sa couche interne (figure I.4 D). Après ces différentes étapes du développement décrites ci-dessus le grain de pollen devient mature et sera prêt à se libérer de l'anthère.

## **2.2 Les lipides externes**

Les grains de pollen matures chez les angiospermes sont porteurs d'un revêtement pollinique (Piffanelli et al., 1997). Les lipides externes constituent la fraction lipidique de ce revêtement. Ce dernier se trouve à la surface du grain de pollen, il remplit les cavités de sa couche extracellulaire l'exine (Piffanelli et al., 1997; Quilichini et al., 2015; Rejón et al., 2016) (figure I.5 a-c). Les lipides de cette couche pollinique peuvent être observés en microscopie après coloration du pollen par le Rouge de Nil (Evans et al., 1991; Rejón et al., 2016) (figure I.5 b).

Les lipides externes ont été largement étudiés chez plusieurs espèces végétales (Bashir et al., 2013a; Henricsson et al., 1996; Murphy, 2006; Piffanelli et al., 1997). Ils sont facilement extractibles après un lavage des grains de pollen par un solvant organique : hexane, cyclohexane, benzène, chloroforme, N,N-diméthylformamide, diméthylsulfoxyde, toluène, éther diéthylique, éther de pétrole, éthanol, méthanol, acétone et acétonitrile. Par ailleurs, le cyclohexane et le chloroforme sont parmi les solvants les plus utilisés pour extraire cette fraction lipidique sans affecter la morphologie ou la composition du contenu intracellulaire du grain de pollen (Bashir et al., 2013a; Doughty et al., 1993; Evans et al., 1991; Piffanelli et al., 1997; Rejón et al., 2016) (figure I.5 d).

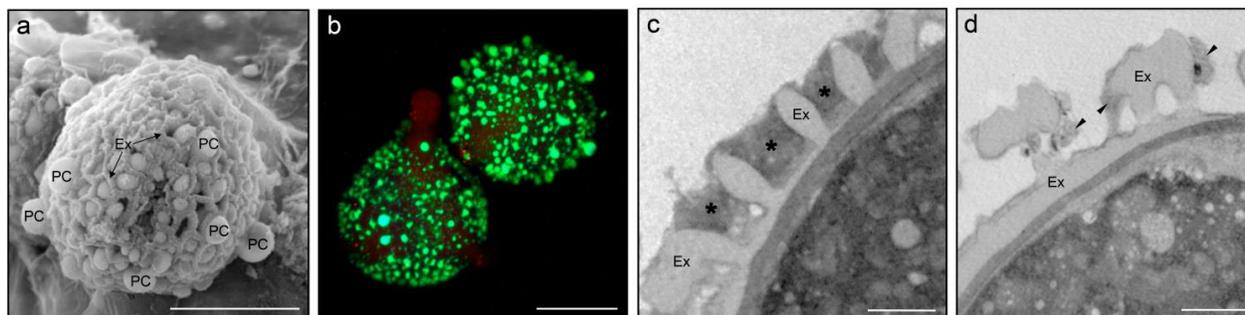


Figure I. 5: (a) Image en microscopie électronique à balayage d'un grain de pollen d'olive situé sur la surface stigmatique. Le revêtement pollinique (pollen coat PC) remplit les cavités de l'exine (Ex). (b) Les grains de pollen d'olive colorés avec le colorant de rouge du Nil permettent de montrer la nature lipidique du revêtement pollinique (fluorescence verte) ; (c et d) Image en microscopie électronique à transmission de la surface du pollen d'olive (c) avant et (d) après l'extraction du revêtement pollinique (représenté par des astérisques) avec du cyclohexane. Barres = 10  $\mu\text{m}$  (a, b), 1  $\mu\text{m}$  (c, d) (Rejón et al., 2016) (réutilisation avec autorisation).

L'étude réalisée par (Piffanelli et al., 1997) montre que la biogénèse des lipides externes du pollen est sous le contrôle des génomes sporophytiques. Environ plus de 75% des lipides externes du pollen de *Brassica napus* sont constituées des acides gras saturés C14:0, C16:0 et le C18:0 mais avec des taux très faibles des acides gras polyinsaturés (Piffanelli et al., 1997; Piffanelli and Murphy, 1998).

Les lipides externes extraits par les solvants organiques comprennent plusieurs familles de composés organiques (Abed El Azim, 2015; Bashir et al., 2013a; Henricsson et al., 1996; Human and Nicolson, 2006; Piffanelli et al., 1997). Les extraits organiques des pollens de bouleau et de la fléole des prés contiennent les familles d'espèces chimiques suivantes : acides gras dicarboxyliques, monocarboxyliques saturés et insaturés, alcanes, alcènes, alcools, aldéhydes stérols, terpènes et éthers (Bashir et al., 2013a; Henricsson et al., 1996; Traidl-Hoffmann et al., 2002; Zhu et al., 2018).

### 2.3 Les lipides internes

Les grains de pollen contiennent également deux principales familles de lipides internes à savoir les lipides de stockage et les lipides membranaires. Ces lipides sont synthétisés dans la cellule végétative durant la microsporogénèse sous le contrôle du génome gamétophytique (Piffanelli et al., 1997).

Les lipides internes interviennent lors de la germination du pollen en lui fournissant des précurseurs lipidiques nécessaires pour sa progression tout au long de l'organe reproducteur femelle (Charzynska et al., 1989; Evans et al., 1991).

Plusieurs méthodes ont été développées pour pouvoir extraire les lipides qui se trouvent à l'intérieur du pollen :

- i. (Dobson, 1988) a mis au point une méthode pour extraire les lipides extracellulaires par une double extraction, la première consiste à extraire le pollen par le benzène pendant 20 s puis avec du chloroforme: méthanol (2:1) pour une durée de 23-28h. La première extraction permet d'enlever les lipides extracellulaires par contre la deuxième favorise l'extraction des lipides intracellulaires ainsi que les lipides extracellulaires qui n'étaient pas complètement extraits par la première extraction.
- ii. Une autre méthode consiste à laver le pollen par un solvant organique (cyclohexane, hexane, chloroforme) pour éliminer ses lipides extracellulaires et ensuite extraire le reste du pollen après l'avoir broyé par la technique d'agitation mécanique (Evans et al., 1991, 1990, 1988a). Les extraits des grains de pollen de *Brassica napus* sous la forme broyée sont riches en acides gras insaturés l'acide  $\alpha$ -linoléique (C18:3) et l'acide linoléique (C18:2) (Evans et al., 1990).

### 2.3.1 Les lipides membranaires internes

Les grains de pollen contiennent le même système de membranes intracellulaires que dans la plupart des cellules. Après la deuxième division mitotique on observe une augmentation importante de la synthèse des lipides membranaires internes dans le cytoplasme de la cellule végétative (Piffanelli and Murphy, 1998). Le pollen mature contient alors des lipides internes membranaires recouvrant des nombreuses vésicules et organites y compris la mitochondrie, les dictyosomes et le réticulum endoplasmique. La membrane du réticulum endoplasmique forme le composant majeur des lipides membranaires internes (Piffanelli et al., 1997).

Les lipides membranaires internes sont constitués généralement des phospholipides comme la phosphatidyl-choline, -éthanolamine et -inositol (Evans et al., 1991; Ischebeck, 2016; Piffanelli and Murphy, 1998). Ils peuvent aussi contenir des acides gras saturés et insaturés : acide hexadénoïque (C16:0), acide hexadécatriénoïque (C16 :3), acide  $\alpha$ -linoléique (C18:3) et acide linoléique (C18:3) (Evans et al., 1990, 1988b; Piffanelli et al., 1997).

### 2.3.2 Les corps de stockage des lipides

Le grain de pollen accumule durant ses différentes phases du développement des réserves de lipides et de glucides. Les corps de stockage des lipides sont connus en littérature par les dénominations « storage oils bodies » (Piffanelli et al., 1997) ou « lipids droplets » (Ischebeck, 2016). Leur présence en grande quantité dans les grains de pollen a été démontrée par plusieurs études ultrastructurales (Hoekstra and Bruinsma, 1979; Wetzel and Jensen, 1992). Leur accumulation commence après la première mitose du développement des grains de pollen et elle est précédée par une accumulation des granules d'amidon (starch granules) (Hess, 1995).

Les grains de pollen matures provenant des anthères fraîchement déhiscentes contiennent des corps de stockage des lipides qui semblent être enveloppés par la membrane du réticulum (Wetzel and Jensen, 1992). Leur fraction lipidique est impliquée pour assurer la germination du pollen en contact avec le stigmat (Dorne et al., 1988).

Les corps de stockage des lipides sont délimités par une couche de phospholipides et de protéines de types oléosines (Piffanelli and Murphy, 1998; Ross, 1996; Tzen, 2012). La fraction TAG (triacylglycérols) contenue dans les corps de stockage des lipides du pollen mature est associée aussi aux acides gras C16:0 et C18:3.

Les deux lipides membranaires intracellulaires et de stockage contiennent des niveaux élevés des acides gras saturés et insaturés C16:0, C18:3 et C18:2. La similitude de cette composition lipidique peut refléter leur voie de biosynthèse commune pour les acides gras ainsi que leur régulation commune par le génome gamétophyte (Evans et al., 1992; Piffanelli et al., 1997).

### 3. Les allergies polliniques

*L'Organisation mondiale de la santé (OMS) classe les maladies allergiques au quatrième rang des maladies au niveau mondial et considère que ces pathologies représentent “un problème majeur de santé publique en terme de qualité de vie, de perte de jours de travail ou d'enseignement, de coût médicamenteux, voire de mortalité”.*

*D'après les estimations, la prévalence des pathologies allergiques respiratoires comme les rhinites saisonnières et l'asthme a pratiquement doublé ces vingt dernières années dans les pays industrialisés. En effet, le vieillissement du pollen dans l'atmosphère par les polluants atmosphériques pourrait moduler son caractère allergisant et le rendre plus allergisant (ANSES, 2014).*

*L'allergie, ou plutôt la réaction allergique de type immédiate, correspond à une réaction d'hypersensibilité initiée par une réaction immunitaire spécifique à une substance étrangère, en réalité inoffensive pour l'organisme humain, tel que le pollen.*

*Les grains de pollen impliqués dans l'induction et le déclenchement des maladies allergiques sont principalement ceux transportés par le vent. Les allergènes et les lipides du pollen sont libérés après un contact avec la phase aqueuse de la muqueuse. Les allergènes responsables de la réaction allergique sont localisés à l'intérieur du grain ainsi que dans ses parois. Les lipides du pollen possèdent des effets pro-inflammatoires ou adjuvants à la réaction allergique pouvant augmenter l'inflammation des voies aériennes induite par les protéines de pollen (Bashir et al., 2013a, 2013b; Behrendt et al., 2001a; Traidl-Hoffmann et al., 2002).*

### 3.1 Généralités

L'allergie, aussi appelée hypersensibilité de type I, est une réaction excessive du système immunitaire de l'organisme envers des substances généralement inoffensives, d'origine végétale, animale ou chimique appelées allergènes. Parmi ceux-ci figurent les protéines et les glycoprotéines contenues dans les grains de pollen. Les réactions d'hypersensibilité ont besoin d'un état (immunitaire) de l'hôte dit « pré-sensibilisé ». Dans le cas de l'allergie, la sensibilisation se fait via la production d'immunoglobulines de type E dirigées contre l'allergène.

Il existe plusieurs types d'allergies qui se diffèrent selon le mode d'exposition de la personne aux allergènes et/ou de l'organe qui entre en contact avec eux : (i) les allergies respiratoires suite à un contact avec les muqueuses oculaires et les voies respiratoires, (ii) les allergies alimentaires par réaction des aliments avec les muqueuses buccales et digestives et (iii) les allergies de contact lors des réactions cutanées. Parmi les allergies respiratoires on distingue les allergies perannuelles, induites par des allergènes présents tout au long de l'année comme les acariens, et les allergies saisonnières déclenchées suite à l'inhalation des allergènes de pollen (grains de pollen, granules cytoplasmiques du pollen, particules fines ...).

Les impacts sanitaires des allergies aux pollens constituent un problème de grande importance en raison de leur prévalence élevée et des coûts sanitaires engendrés. Environ 25% de la population globale est touchée par les allergies aux pollens et plus de 15 milliards de dollars sont dépensés annuellement pour le traitement des rhinites allergiques (Nathan, 2007). La saison pollinique des pollens des arbres est aussi un danger d'allergie en France à tel point que le mot « alerte aux pollens » est parfois employé notamment pour le pollen de bouleau (ANSES, 2014).

La majorité des patients qui souffrent des symptômes de pollinose ont des allergies IgE-dépendantes. Les symptômes se manifestent chez les sujets génétiquement prédisposés, dits individus atopiques, à produire des anticorps IgE en réponse à de faibles doses d'allergènes dans des conditions d'exposition particulière (Johansson et al., 2004).

## 3.2 Les acteurs de l'allergie

### 3.2.1 Les cellules effectrices de l'allergie

**Les mastocytes et les polynucléaires** basophiles sont les principales cellules qui produisent les médiateurs chimiques de l'hypersensibilité immédiate. La dégranulation mastocytaire se traduit par la libération rapide de médiateurs vaso-actifs et constricteurs des fibres musculaires lisses à l'origine des symptômes aigus. Les mastocytes libèrent aussi des cytokines permettant de réguler les fonctions des éosinophiles qui sont les cellules clés de l'inflammation allergique (Guilpain et al., 2006).

**Les polynucléaires éosinophiles (PNE)** sont probablement les principales cellules effectrices secondaires de la réaction allergique tardive. Le recrutement de ces cellules vers le site de l'inflammation est favorisé par des molécules chimiotactiques (Prussin and Metcalfe, 2006; Williams and Hellewell, 1995). Les PNE activés libèrent aussi des médiateurs divers tel que les leucotriènes et les prostaglandines (Broide, 2001). Il existe une corrélation entre la production de ces médiateurs par les PNE et la sévérité des symptômes, ainsi que le degré d'hyperréactivité bronchique, chez les personnes atteintes des rhinites allergiques et asthme (Aggarwal et al., 2010; Broide, 2001; Wardlaw, 1994). Il existe une corrélation aussi entre la fonction de ces médiateurs et certains lipides libérés par les grains de pollen (Traidl-Hoffmann et al., 2005, 2002).

**Les polynucléaires neutrophiles (PNN)** sont les cellules les plus nombreuses et les plus importantes dans les réponses immunitaires innées. Il s'agit du premier type cellulaire à pénétrer dans les poumons à la suite d'une provocation allergénique (Radermecker et al., 2018). Elles produisent de nombreux médiateurs pro-inflammatoires susceptibles de participer à la réaction allergique.

**Les lymphocytes T auxiliaires (ou helper : Th)** peuvent être divisés en plusieurs sous classes : les Th1, Th2, Th17 et Th22. Ces lymphocytes se régulent entre eux et contrôlent l'orientation de la réponse immunitaire (Lloyd and Saglani, 2013). Les cytokines produites par les Th2 favorisent la réaction allergique en agissant sur : (i) la croissance et la différenciation des éosinophiles et des mastocytes et (ii) la production de mucus et l'hyperréactivité bronchique (Mosmann and Coffman, 1989).

**Les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) :** ce sont les cellules qui jouent un rôle important dans la physiopathologie de la réaction allergique et notamment de l'asthme. Plusieurs types cellulaires sont impliqués : les macrophages alvéolaires, les cellules dendritiques (CD) et les lymphocytes B. Les lymphocytes B sont également un élément central de la réponse allergique car ce sont eux qui produisent les IgE spécifiques. Elles peuvent internaliser l'antigène et le présenter aux lymphocytes T.

### **3.2.2 Les médiateurs moléculaires de l'allergie**

Il existe deux types de médiateurs de l'allergie : les médiateurs dérivés des lipides dont font partie les leucotriènes et les prostaglandines et les médiateurs protéiques telles que les cytokines et les chimiokines.

#### **Les médiateurs lipidiques**

Ce sont essentiellement des dérivés de l'acide arachidonique : les leucotriènes (LT), les thromboxanes (TX) et les prostaglandines (PG). Le métabolisme de l'acide arachidonique de la membrane cellulaire aboutit à ces médiateurs lipidiques qui jouent un rôle essentiel dans la bronchoconstriction, la vasoconstriction, le recrutement des plaquettes et l'agrégation plaquettaire (Molina, 1997).

#### **Les cytokines**

Les cytokines sont des protéines sécrétées qui sont impliquées dans la croissance, la différenciation et l'activation cellulaire. Elles sont capables de réguler ou d'orienter la réponse immune et participent à quasi toute les étapes de la réaction inflammatoire. Dans la réaction allergique, les cytokines appelées interleukines IL-4, IL-5 et IL-13 sont impliquées dans l'activation et la polarisation des lymphocyte T de type Th2, mais également dans la production des IgE par les lymphocytes B (R. Naik and M. Wala, 2013).

#### **Chimiokines**

Dans la réaction allergique, elles favorisent le recrutement des cellules inflammatoires, notamment des basophiles, éosinophiles, et lymphocytes T au site de l'inflammation. Elles sont produites par de nombreux types cellulaires dont les cellules mononuclées, neutrophiles, éosinophiles, plaquettes, cellules endothéliales, mastocytes et cellules épithéliales (Humbert and Garcia, 2004).

### 3.3 Interaction du pollen avec le système immunitaire

Les tissus frontières de l'organisme (la peau et les muqueuses respiratoires ou digestives) constituent l'interface entre l'environnement et le système immunitaire. Ils possèdent donc une double fonction de défense anti-infectieuse et de maintien de la tolérance vis à vis des antigènes environnementaux.

Les voies respiratoires contiennent un certain nombre de types de cellules y compris les cellules épithéliales, les cellules dendritiques, les macrophages et les granulocytes tels que les neutrophiles et les éosinophiles. Toutes ces cellules sont capables d'interagir avec les particules inhalées tels que les grains de pollen (Siegel and Sherman, 1970). En effet, en raison de leur localisation anatomique, ces cellules ont un rôle important dans l'initiation de l'inflammation des voies respiratoires après contact avec le pollen allergénique (Traidl-Hoffmann et al., 2009).

Il a été démontré *in vitro* par plusieurs auteurs, que suite à un contact avec la phase aqueuse comme par exemple celle de la muqueuse, le pollen libère non seulement ses allergènes mais aussi ses lipides bioactifs qui pourraient activer les neutrophiles et les éosinophiles humains (Bashir et al., 2013a; Plötz et al., 2004; Traidl-Hoffmann et al., 2002). De plus, les grains de pollen intacts induisent l'activation et la maturation des cellules dendritiques *in vitro*, ce qui montre que le pollen peut agir non seulement comme un transporteur des allergènes mais aussi comme un initiateur dans la phase d'induction de la réponse immunitaire allergique (Allakhverdi et al., 2005). La figure I.6 résume l'intervention des allergènes et des lipides du grain de pollen lors d'une réaction allergique.

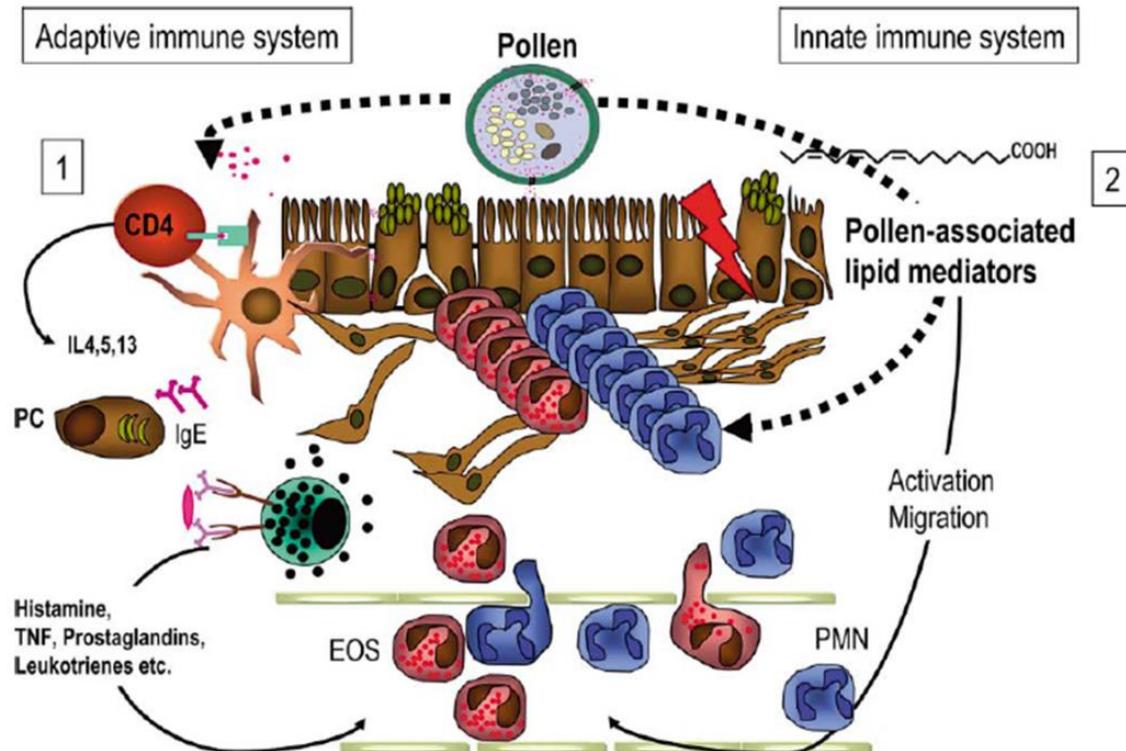


Figure I. 6: Intervention des allergènes et des lipides du pollen durant le mécanisme de réaction allergique. Au contact de la phase aqueuse de la muqueuse le pollen libère des allergènes et des médiateurs lipidiques bioactifs responsables simultanément des réponses immunitaires adaptatives et innées. Ces réponses conduisent ainsi à une cascade de réactions aboutissant au recrutement des cellules inflammatoires. Ces médiateurs lipidiques proviennent très probablement des acides  $\alpha$ -linoléique et linoléique qui sont présents dans les grains de pollen (Traidl-Hoffmann et al., 2003) (réutilisation avec autorisation).

### 3.3.1 Intervention des allergènes durant le mécanisme de la réaction allergique

Au début de phase de sensibilisation, les cellules dendritiques localisées juste au-dessous de la membrane basale de l'épithélium respiratoire captent l'allergène et induisent, chez le sujet prédisposé, une réponse immunitaire cellulaire de type Th2. Cette réponse est caractérisée par la production des cytokines Interleukines IL-4, IL-5 et IL-13 qui polarisent la réponse immune et conduisent à la production d'immunoglobulines d'isotype E (IgE) spécifiques de l'allergène (Ishizaka et al., 1966). Ces IgE sensibilisent alors les mastocytes tissulaires et les basophiles du sang circulant en se fixant sur leur récepteur de haute affinité pour les IgE (Lane et al., 1994). Lorsque l'allergène est réintroduit dans l'organisme "sensibilisé", il se fixe sur les IgE spécifiques liées à leur récepteur membranaire et aboutit ainsi à la désorganisation de la membrane mastocytaire et l'exocytose des granules contenant les médiateurs du système immunitaire et de l'inflammation. Ces médiateurs induisent une vasodilatation

et une augmentation de la perméabilité vasculaire ainsi qu'une infiltration des cellules inflammatoires (éosinophiles) dans la muqueuse bronchique favorisant ainsi les réponses allergiques. Cette phase dite effectrice est cliniquement symptomatique et s'accompagne des manifestations cliniques telles que la rhino-conjonctivite allergique et l'asthme (Valenta, 2002).

La nomenclature des allergènes est fondée sur les propositions de l'Organisation Mondiale de la Santé et de l'Union Internationale des Sociétés d'Immunologie (sous-comité pour la nomenclature des allergènes) (Chapman et al., 2007). Les allergènes sont nommés en utilisant les 3 premières lettres d'un genre, une seule lettre pour l'espèce et un nombre selon la priorité de la découverte de l'allergène et de sa purification. Par exemple, Phl p 1 est le groupe 1 des allergènes majeurs des pollens des graminées de *Phleum pratense* (Johansson et al., 2004; King et al., 1994).

La plupart des allergènes responsables de la réaction allergique se trouvent dans le cytoplasme du grain de pollen, soit sous une forme libre, soit associés aux organites tels que les mitochondries ou les granules cytoplasmiques de pollen. Certains allergènes se trouvent aussi dans les parois extracellulaires et intracellulaires du pollen (exine et intine) (Howlett et al., 1973). Par exemple l'allergène Phl p 5 a été trouvé dans le cytoplasme et aussi au niveau de l'exine alors que le Phl p 1 a été détecté dans l'intine (Behrendt et al., 1999).

#### *Allergènes libérés des granules cytoplasmiques (GCP)*

Les allergènes hydrosolubles internes (cytoplasmiques) sont libérés suite au contact du grain de pollen avec la muqueuse nasale, ensuite ils se diffusent dans le mucus épithélial où ils deviennent accessibles au système immunitaire pour déclencher une réaction chez les individus sensibilisés (Behrendt and Becker, 2001b).

L'augmentation des concentrations atmosphériques des granules cytoplasmiques est favorisée par l'exposition des grains de pollen aux polluants atmosphériques (Motta et al., 2006) (**Cf. partie 4.3.2**). Plusieurs études expérimentales ont été effectuées afin d'évaluer les caractères allergiques et inflammatoires des GCP. Motta et al. ont montré que les GCP peuvent induire des réactions allergiques humorales et cellulaires chez le rat Brown Norway, sensibilisé aux pollens de graminées (Motta et al., 2004).

Les GCP ont été mises en cause dans les épisodes épidémiques d'asthme associés aux orages ou « thunderstorm asthma » (Downs et al., 2001; Schäppi et al., 1999; Suphioglu, 1998). Les sujets asthmatiques exposés à de fortes concentrations de GCP en suspension dans l'air sont susceptibles de développer plus facilement des crises d'asthme. L'augmentation de ces crises est due à la forte libération des allergènes par les GCP lessivés par la pluie. Les grains de pollens ainsi que leurs sous-fractions GCP lessivées ou non peuvent induire une réponse allergique et inflammatoire, mais selon des mécanismes différents (Abou Chakra et al., 2011).

### *Allergènes contenus dans le revêtement pollinique*

Au moment de l'inhalation, le revêtement pollinique est la première structure du grain de pollen qui entre en contact avec l'épithélium des voies respiratoires (Bashir et al., 2013b; Traidl-Hoffmann et al., 2002). L'étude réalisée par Bashir et al. montre que les protéines localisées dans le revêtement pollinique représentent une nouvelle classe de protéines à double fonction : (i) une capacité de liaison aux IgE et (ii) une activité protéolytique. Les cystéines protéases, détectées dans le revêtement pollinique de certaines espèces, induisent une perturbation de l'intégrité de la barrière épithéliale des voies respiratoires en clivant les jonctions cellulaires (Bashir et al., 2013b). Cette altération de la barrière épithéliale facilite l'accès des allergènes au tissu et donc vers les cellules immunes.

### **3.3.2 Intervention des lipides durant le mécanisme de la réaction allergique**

Les grains de pollen contiennent des lipides possédant des homologues de structures avec les leucotriènes (LTB<sub>4</sub>) et les prostaglandines (PGE<sub>2</sub>) qui sont des métabolites de l'acide arachidonique (Mueller, 1998). Ces lipides sont nommés selon plusieurs auteurs par les médiateurs lipidiques associés aux pollens (Pollen-Associated Lipid Mediators (PALMs)) (Gilles et al., 2009; Smith et al., 1992; Traidl-Hoffmann et al., 2002). Les formules chimiques de certains de ces médiateurs sont représentées dans la figure I.7.

Ces médiateurs lipidiques sont rapidement libérés lors du contact des grains de pollen avec la phase aqueuse des muqueuses. Ils peuvent interagir dans la réaction allergique comme adjuvants (Behrendt et al., 2001a; Gilles et al., 2009; Plötz et al., 2004; Traidl-Hoffmann et al., 2005, 2002).

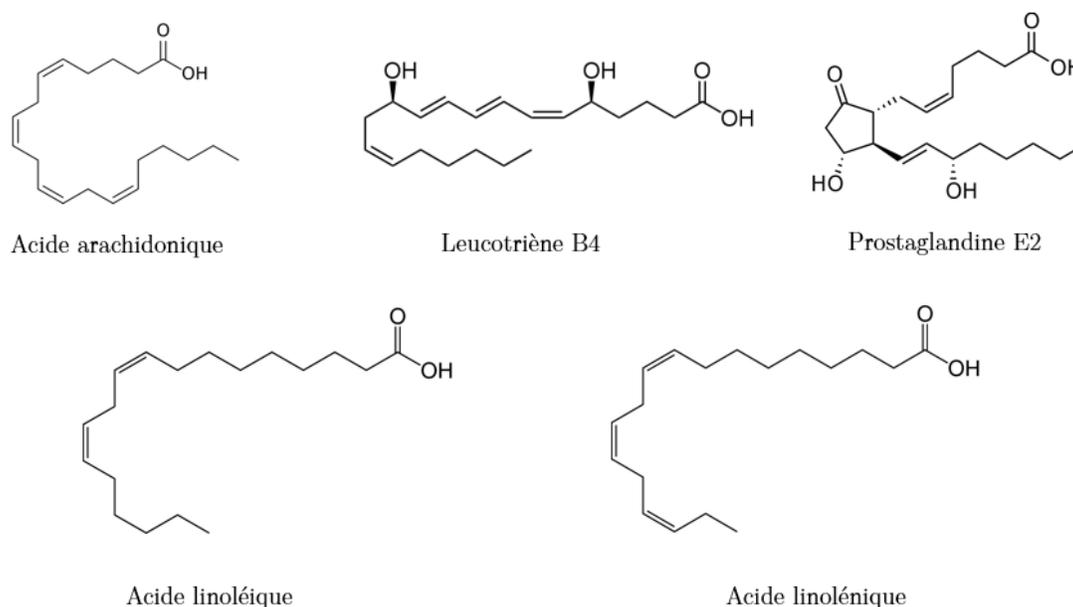


Figure I. 7: Formules chimiques de certains médiateurs lipidiques associés aux pollens.

Behrendt et al. ont montré que les pollens de la fléole des prés et de bouleau libèrent des quantités importantes de ces substances similaires aux « LTB<sub>4</sub> » et « PGE<sub>2</sub> » dans un milieu aqueux, tel que la solution de tampon de phosphate salin (Phosphate-Buffered Saline PBS) (Behrendt et al., 2001a). Les pics de libération de ces substances pro-inflammatoires ont été observés après un temps de 5 min à un pH de 7,4 et une température de 37°C.

Le PALM LTB<sub>4</sub> (Leukotriènes B<sub>4</sub>), l'un des médiateurs lipidiques associés au pollen, permet la chimioattraction (effet d'attraction qu'exerce une substance chimique sur une cellule vivante) des neutrophiles et des éosinophiles *in vitro* (Corhay et al., 2009). Il est également impliqué dans le recrutement des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et l'inflammation IL-13 dépendante (Gelfand and Dakhama, 2006). Le PALM PGE<sub>2</sub> (Prostaglandin E<sub>2</sub>), un autre médiateur lipidique associé au pollen, il module les fonctions des cellules dendritiques et conduit donc à un renforcement de l'induction d'une réponse Th<sub>2</sub>.

Selon plusieurs études (Plötz et al., 2004; Traidl-Hoffmann et al., 2002), les PALMs contenant des dérivés de l'acide  $\alpha$ -linoléique et linoléique stimulent et attirent les cellules du système immunitaire inné tels que les neutrophiles et les éosinophiles. Ceci pourrait donc contribuer à une augmentation ou un maintien de la réaction inflammatoire allergique.

Un étude récente (Bashir et al., 2013a) montre que les lipides du revêtement pollinique interviennent aussi durant la réaction allergique et possèdent les mêmes propriétés attribuées aux PALMs. Ces lipides contiennent plusieurs familles de composés organiques : les alcènes, les alcanes, les alcools, les éthers, les aldéhydes, les composés aromatiques et les acides gras dicarboxyliques et monocarboxyliques saturés et insaturés, (Abed El Azim, 2015; Bashir et al., 2013a; Henricsson et al., 1996; Human and Nicolson, 2006; Naas et al., 2016; Piffanelli et al., 1997; Zhu et al., 2018). En raison de leur emplacement à la surface du grain de pollen, les lipides externes peuvent interagir durant les réactions allergiques en combinaison avec les protéines antigéniques permettent aux grains de pollens d'avoir un effet adjuvant sur le système immunitaire (Bashir et al., 2013a).

Plusieurs stérols tel que le  $\beta$ -sitostérol et le stigmastérol présents dans la fraction lipidique externe des pollens ont été identifiés aussi comme étant des agents responsables dans l'apparition des crises d'asthme (Aceves et al., 1991; Pont et al., 1997).

### **3.4 Facteurs de risque de développer une allergie aux pollens**

Les pollens sont responsables de réactions allergiques appelées pollinoses au niveau des zones de contact : muqueuses respiratoires et oculaires. Plus rarement ils peuvent être responsables de réactions cutanées, telles que l'eczéma ou l'urticaire. L'allergie respiratoire se présente sous deux formes principales : la rhinite et la rhino-conjonctivite allergique et l'asthme allergique. Les allergies sont des manifestations multifactorielles modulées par des facteurs génétiques prédisposant et des facteurs environnementaux.

#### **3.4.1 La prédisposition génétique, le sexe et l'âge**

Certaines études semblent indiquer que 50 % des cas d'asthme dans la population générale sont attribuables à l'atopie (tendance héréditaire à présenter des réactions allergiques) (Pearce et al., 1999). Le risque d'être un sujet asthmatique est multiplié par deux si au moins un parent est asthmatique (Bousquet et al., 2002). Les études réalisées par (Holloway, 2001; Wiesch et al., 1999) montrent que les taux de concordance de l'asthme et de la rhinite allergique sont substantiellement plus élevés chez les vrais jumeaux que chez les faux jumeaux, suggérant ainsi une forte contribution génétique.

Les allergies dépendent des facteurs démographiques tels que l'âge et le sexe. La fréquence de l'asthme est au moins deux fois plus élevée chez les garçons que chez les filles. Cette différence n'était pas observée entre les deux sexes pour les rhinites (Sears et al., 2006). Les symptômes des allergies tendent à se réduire avec l'âge et de disparaître le plus souvent après le vieillissement du système immunitaire (Rancé et al., 2007).

### 3.4.2 Influence du changement climatique

Les observations et les modèles de prévision ont montré que le réchauffement climatique serait responsable d'une plus grande précocité de la date de début de pollinisation de nombreuses espèces végétales induisant à un allongement de la durée de leur saison pollinique (Emberlin et al., 2007; García-Mozo et al., 2006). Le changement climatique est responsable aussi de la modification de la répartition géographique des plantes (Gilmour et al., 2006; Shea et al., 2008). D'autres observations ont montré également que les quantités d'allergènes dans les pollens ont augmentées avec la température (Levetin and Water, 2008).

### 3.4.3 Les polluants atmosphériques

Dans les zones urbaines, les polluants gazeux tels que l'ozone ( $O_3$ ) et les oxydes d'azote ( $NO$ ,  $NO_2$ ) agissent soit d'une manière directe en fragilisant l'appareil respiratoire, soit sur les grains de pollen en modifiant leur allergénicité ou, encore, en altérant leur structure. Durant leur transport atmosphérique les grains de pollen peuvent être encombrés par des particules adhérentes à leur surface (Duque et al., 2013; Ribeiro et al., 2015, 2014).

Seuls les effets des deux polluants gazeux  $O_3$  et  $NO_2$  sur les voies respiratoires sont abordés dans cette partie alors que leurs effets directs sur les grains de pollen seront développés dans la partie suivante (**Cf. partie 4**). Les polluants gazeux sont considérés comme des facteurs aggravants la réaction allergique par l'irritation des voies respiratoires. La plupart des polluants accentue l'irritation des muqueuses nasales ou oculaires en abaissant le seuil de réactivité bronchique. Ces phénomènes irritatifs s'ajoutent alors aux effets de l'allergie pollinique (Obtulowicz, 1993).

Les valeurs réglementaires des concentrations des deux polluants atmosphériques (ozone et dioxyde d'azote) sont représentées dans le tableau I.2 (Légifrance, 2018).

Polluants atmosphériques	Source et saison principale concernée	Normes européennes
NO <sub>2</sub>	Durant toute l'année Oxydation du NO émise à une haute température Combustion des combustibles (centrale électrique et le réseau routière de transport)	40 µg/m <sup>3</sup> (moyenne annuelle) Niveau d'alerte: 400 µg/m <sup>3</sup> (en moyenne horaire sur 3 heures consécutives)
O <sub>3</sub>	Durant l'été Réaction secondaire entre les composés organiques volatils et les NO <sub>x</sub> sous rayonnement UV	120 µg/m <sup>3</sup> ( en moyenne sur 8 h) Niveau d'alerte: 180 µg/m <sup>3</sup>

Tableau I.2 Sources et normes européennes des polluants gazeux (NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>) (Légifrance, 2018).

Les effets de l'ozone sur les voies respiratoires ont été étudiés après des expositions *in vitro* ou *in vivo* (Castillejos et al., 1995; McConnell et al., 2002). Ce polluant altère aussi les muqueuses respiratoires dont il augmente la perméabilité (De Blay et al., 2000). L'ozone induit également une augmentation de la production intracellulaire de dérivés oxygénés qui pourraient favoriser la production de cytokines proinflammatoires (Li et al., 2006). Il a aussi été montré que l'ozone 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).

Les effets de l'ozone ont été aussi étudiés chez les sujets asthmatiques. L'un des effets les plus importants de ce polluant est probablement l'aggravation de l'inflammation chronique des voies aériennes (Vagaggini et al., 2002). D'autres auteurs suggèrent que les effets de l'ozone sur l'obstruction bronchique sont beaucoup plus importants chez les patients asthmatiques que chez les sujets sains (Ball et al., 1996; Vagaggini et al., 1999).

L'augmentation de la prévalence de l'asthme et de la rhinite allergique est aussi associée à l'exposition au dioxyde d'azote (Marco et al., 2002). L'exposition des souris au dioxyde d'azote a induit une augmentation de leur réponse inflammatoire de type allergique et de leur hyperréactivité bronchique (Poynter et al., 2006).

#### 4. Vieillissement atmosphérique du grain de pollen par les polluants atmosphériques

Lorsque le pollen entre en contact avec l'atmosphère, à savoir au moment de la débiscence des anthères, plusieurs changements (chimiques, biologiques et physiques) sont possibles sur cette particule atmosphérique (figure I.8). Le vieillissement du pollen par les polluants atmosphériques peut avoir des effets directs sur :

- (i) Ses caractéristiques chimiques : modification en particulier de sa composition lipidique.
- (ii) Ses caractéristiques biologiques : modification de son pouvoir de germination et de son potentiel allergisant (via notamment la modification des protéines).
- (iii) Ses caractéristiques morphologiques : fragilisation de sa structure induisant la libération des granules cytoplasmiques.

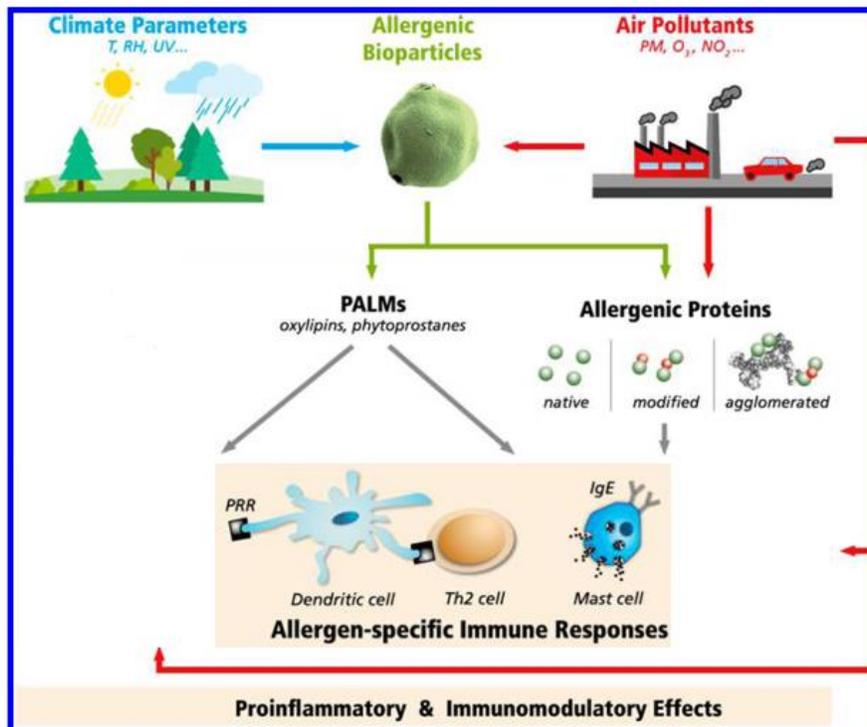


Figure I. 8: Voies à travers lesquelles les paramètres climatiques et les polluants atmosphériques peuvent modifier les médiateurs lipidiques et les allergènes du grain de pollen (Reinmuth-Selzle et al., 2017) (réutilisation avec autorisation).

*Pour étudier expérimentalement les effets du vieillissement atmosphérique décrits ci-dessus, les grains de pollen sont exposés à des polluants générés artificiellement ou soit directement à la pollution atmosphérique extérieure.*

*Les polluants atmosphériques peuvent agir sur les allergènes ainsi que sur les lipides du grain de pollen et induire une aggravation des manifestations allergiques. Cependant, on en sait peu sur la modification des lipides des pollens par les polluants atmosphériques. Une étude des effets de la pollution atmosphérique sur la composition chimique du pollen acquiert une grande importance car les altérations chimiques pourraient en retour induire une modification dans les interactions entre le pollen et le système immunitaire et donc des effets sur la réaction allergique.*

*L'ensemble des processus de vieillissement atmosphérique par les polluants atmosphériques peut fragiliser aussi la structure du grain et entraîner la libération de son contenu cytoplasmique. Les granules cytoplasmiques libérées peuvent augmenter l'inflammation des voies aériennes et induire à l'augmentation de l'incidence des réactions allergiques et asthmatiques.*

## 4.1 Modifications chimiques du pollen

De nombreuses études ont montré une modification chimique de la surface des grains de pollen suite à un épisode de pollution (artificiel ou atmosphérique). En effet, les polluants atmosphériques peuvent modifier chimiquement la surface du pollen par son enrichissement en différents éléments chimiques et par l'altération de la composition de sa fraction lipidique externe. Une autre modification chimique peut se faire également sur les lipides qui se trouvent dans le contenu cytoplasmique du pollen (lipides internes).

### 4.1.1 Enrichissement de la surface pollinique en différents éléments chimiques

Les grains de pollen peuvent être pollués par le dépôt sur leur surface de particules atmosphériques. Ce type d'interaction est relativement peu documenté dans la littérature. Les analyses élémentaires effectuées sur des grains de pollen prélevés en milieu urbain ont montré des enrichissements de leur surface par des particules atmosphériques (Amjad and Shafiqhi, 2012; Okuyama et al., 2007; Shahali et al., 2013). Ces grains de pollen pollués se sont avérés être plus dangereux pour les sujets allergiques car ils présentaient un potentiel fortement allergisant (Behrendt et al., 1997; Bellanger et al., 2012).

### 4.1.2 Modification de la fraction lipidique

Nous avons vu dans la **partie 3.3.2** que les grains de pollen, en dehors de leurs fonctions comme transporteurs des allergènes, contiennent également plusieurs familles de composés lipidiques qui contribuent à la génération de réponses inflammatoires locales (Bashir et al., 2013a; Gilles et al., 2009; Plötz et al., 2004; Traidl-Hoffmann et al., 2005, 2002) :

- (i) les lipides possédant des propriétés similaires à la famille des eicosanoïdes : les prostaglandines et les leucotriènes (Behrendt et al., 2001a; Gilles et al., 2009; Smith et al., 1992; Traidl-Hoffmann et al., 2002).
- (ii) les lipides externes contenant plusieurs familles de composés organiques telles que les alcènes, les aldéhydes, les acides carboxyliques insaturés et saturés, les alcanes et les composés aromatiques (Bashir et al., 2013a; Henricsson et al., 1996; Naas et al., 2016; Zhu et al., 2018).

Pour comprendre l'effet de la pollution atmosphérique sur l'allergie, il faut avoir une vision plus large que celle où les polluants atmosphériques agissent uniquement sur les allergènes car ils peuvent également avoir une action directe sur les lipides polliniques. Quelques travaux se sont intéressés à étudier les effets des polluants atmosphériques sur les lipides du pollen car leurs effets pourraient avoir des implications sur les réactions allergiques et asthmatiques.

Certaines publications ont montré l'effet des polluants atmosphériques sur les médiateurs lipidiques de type eicosanoïdes secrétés par le pollen (Beck et al., 2013; Behrendt et al., 2001a; Kanter et al., 2013) mais la modification des lipides extracellulaires n'est peu connue dans la littérature. L'étude réalisée par notre laboratoire a montré une modification des lipides extractibles d'un pollen non allergisant celui de *Pinus halepensis* après une exposition *in vitro* à l'ozone (Naas et al., 2016).

Les deux études réalisées par (Behrendt et al., 1999, 2001a) ont montré que les grains de pollen de la fléole des prés (*Pheleum pratense*) et de bouleau (*Betula alba*) libèrent des substances lipidiques similaires à la famille des eicosanoïdes : les prostaglandines (PGE2-like) et les leucotriènes (LTB4-like). Behrendt et al. ont exposé des grains de pollen de la fléole des prés *in vitro* à différents polluants atmosphériques (SO<sub>2</sub>, toluène, m-xylène) (Behrendt et al., 2001a). Ces polluants exercent des effets opposés sur la libération des substances lipidiques de type eicosanoïde : le SO<sub>2</sub> inhibe la libération de ces substances par contre les composés organiques volatils les activent. Ces résultats pourraient aider à comprendre la forte sensibilisation à l'allergie pollinique dans les zones polluées par les émissions d'échappement de l'automobile (Behrendt et al., 1996; Heinrich and Wichmann, 2004; Weiland et al., 1994). Il a été démontré aussi dans cette même étude, que les grains de pollen de la fléole des prés collectés des zones polluées par les circulations routières libèrent des quantités importantes des substances de type eicosanoïde : les LTB4 et les PGE2.

Une autre étude a été réalisée sur la modification des lipides de type eicosanoïde des grain de pollen de bouleau récoltés dans des zones polluées par le NO<sub>2</sub> et O<sub>3</sub> (Beck et al., 2013). Selon cette étude l'ozone est un facteur environnemental qui permet d'influencer l'allergénicité à ce type de pollen en induisant notamment des changements dans les quantités d'eicosanoïdes.

Deux études récentes, effectuées au sein de notre laboratoire, ont permis d'étudier l'effet d'une pollution artificielle par l'ozone sur les lipides extractibles des grains de pollen de *Pinus halepensis* récoltés en Algérie (Naas et al., 2016). La figure I.9 représente une comparaison entre le profil lipidique

extrait du pollen de pin exposé *in vitro* à 1100 ppb d'ozone et natif. Cette étude montre deux grandes voies de modification de ses lipides :

- L'ozonolyse d'acides gras insaturés présents dans la fraction lipidique : permet la formation d'acides dicarboxyliques, d'aldéhydes et d'acides oxo-monocarboxyliques.
- L'ozonolyse des doubles liaisons présentes dans la structure de la sporopollénine : ce type de réaction a favorisé la formation du 4-hydroxybenzaldéhyde, l'un des composés majoritairement formés lors de l'exposition du pollen de pin à l'ozone. La fragilisation de la paroi du pollen de pin après l'exposition artificielle à l'ozone pourrait être expliquée par la dégradation de la structure chimique de la sporopollénine.

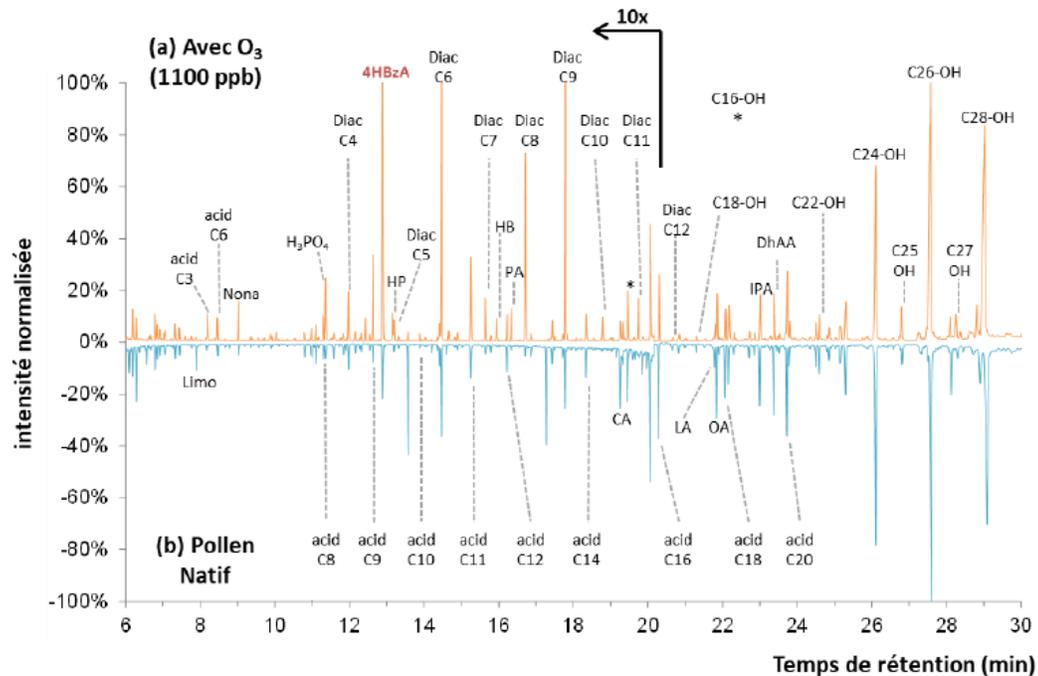


Figure I. 9: Chromatogrammes des espèces organiques extraites par le dichlorométhane des lipides externes du pollen de *Pinus halepensis* exposé à 1100 ppb d'ozone pendant 16 heures (en haut) et non exposé (en bas) (Naas et al., 2016).

## 4.2 Modification des caractéristiques biologiques du grain de pollen

Les effets de la pollution atmosphérique sur la fonction reproductive ainsi que sur le potentiel allergisant des grains de pollen ont été largement étudiés. La pollution atmosphérique a un effet remarquable sur la viabilité du grain de pollen avec une tendance à la diminution de sa germination

pour la majorité des espèces. Des études épidémiologiques et expérimentales montrent que les polluants atmosphériques sont considérés comme les principaux facteurs responsables de l'augmentation de la prévalence des maladies allergiques. L'exposition à ces polluants entraîne non seulement des effets aigus sur le système respiratoire mais aussi des actions directes sur les allergènes des grains de pollen (Sénéchal et al., 2015).

#### 4.2.1 Altération des protéines (dont les allergènes)

Les effets des polluants atmosphériques induisent une modification des potentiels allergisants des grains de pollen par l'altération des allergènes. Des variations de ces comportements existent entre les différentes familles de pollens et aussi en sein d'une même espèce.

L'exposition *in vitro* des pollens de *Phleum pratense* aux polluants atmosphériques (SO<sub>2</sub> et NO<sub>2</sub>) dans différentes conditions d'humidité a entraîné une réduction de la libération des allergènes après une exposition au SO<sub>2</sub> mais non au NO<sub>2</sub> (Behrendt et al., 1997).

Une autre travail plus récent (Rogerieux et al., 2007) a étudié les effets de l'ozone et de dioxyde d'azote sur les quantités de protéines totales et sur les allergènes du pollen de *Phleum pratense*: (i) aucune modification de la quantité des protéines totales n'a été observée dans les extraits solubles des pollens pollués, (ii) une diminution de la détection de certains allergènes est observée dans les extraits aqueux du pollen pollué et (iii) une modification des propriétés biochimiques de certains allergènes est aussi signalée. Cette modification biochimique a entraîné une diminution de la reconnaissance de certains allergènes par l'immunoglobine de type IgE.

L'exposition à l'O<sub>3</sub> *in vitro* induit également une réduction significative de la teneur de Phl p 5, l'un des principaux allergènes responsables des réactions allergiques au pollen de *Phleum pratense* (Albertine et al., 2014; Rogerieux et al., 2007).

Les études réalisées sur les pollens des différentes espèces de bétulacées montrent une diminution de leurs taux de protéines totales lorsqu'ils sont exposés *in vitro* à une atmosphère polluée (Cuinica et al., 2013; Darbah et al., 2008; Lhuissier et al., 2000; Sénéchal et al., 2015). Il a également été montré une diminution du taux de protéines totales et une augmentation de la reconnaissance des IgE lorsque le pollen de *Betula pendula* est exposé *in vitro* au NO<sub>2</sub> (34-67 ppb pour une durée de 6/48h) et à l'O<sub>3</sub> (61-192 ppb pour une durée de 6/12h) (Cuinica et al., 2014, 2013).

Une autre étude a signalé une modification biochimique, en particulier une nitration sur l'allergène majeur du pollen de bouleau le Bet v 1 après une exposition à un mélange de NO<sub>2</sub> (4,57 ppm) et d'O<sub>3</sub> (0,5 ppm) (Franze et al., 2005).

Les polluants atmosphériques agissent non seulement sur les protéines localisées dans le cytoplasme du pollen mais aussi il a été démontré que ces polluants agissent sur les protéines qui se trouvent dans son revêtement pollinique (Ruffin et al., 1983). Ces protéines externes jouent un rôle important durant la réaction allergique (Bashir et al., 2013b) et leur modification par les polluants atmosphériques pourraient avoir des conséquences sur les réponses allergiques.

#### 4.2.2 Altération de la fonction reproductive

La germination (ou la viabilité) des grains de pollen du *Betula pendula* est diminuée après une exposition *in vitro* au NO<sub>2</sub> (34-67 ppb pour une durée de 6/48h) et à l'O<sub>3</sub> (61-192 ppb pour une durée de 6/12h) (Cuinica et al., 2014, 2013).

Un grand nombre de travaux a également été effectué sur les interactions des pollens des graminées avec les polluants atmosphériques (Masuch et al., 1997; Rogerieux et al., 2007; Ruffin et al., 1983). Il semble que la germination (ou la viabilité) du pollen de *Phleum pratense* n'est pas modifiée lorsque son pollen est exposé *in vitro* à une atmosphère polluée (Albertine et al., 2014; Huss-Marp et al., 2008).

Il est difficile de tirer des conclusions quantitatives de l'effet des polluants atmosphériques sur la fonction reproductive des grains de pollen (Iannotti et al., 2000). Il semble que le pollen soit plus sensible à la pollution lorsqu'il est exposé *in vitro* aux polluants dans un milieu de germination (Wolters and Martens, 1987). Ce qui laisse penser que les anthères protègent les grains de pollen des effets de ces polluants. Mais il est possible aussi que les anthères favorisent la transmission des polluants présents dans le sol vers les grains de pollen pendant leur processus de développement (Sénéchal et al., 2015).

#### 4.3 Modifications physiques du grain de pollen et libération des granules

Dans la littérature, le mécanisme principal de rupture du grain de pollen dans l'environnement implique la présence d'eau. Cette rupture peut entraîner la dispersion des particules microniques

présentes à l'intérieur du grain de pollen. Il n'existe encore aucune nomenclature universelle pour désigner ces microparticules, les auteurs ont utilisé plusieurs termes tel que les : « granules d'amidon », « particules submicroniques », « subpolliniques » ou « paucimicroniques » (Abed El Azim, 2015; Bacsi et al., 2006; Currie et al., 2000; D'Amato et al., 2007; Grote et al., 2001; Suphioglu et al., 1992; Taylor et al., 2002; Motta, 2004). Dans mon travail, j'ai utilisé le terme « granules cytoplasmiques du pollen » ou GCP comme un terme générique pour désigner tous les débris dérivés du cytoplasme du grain de pollen.

Une fois libérés des grains de pollen, les GCP forment donc un aérosol biologique dans l'atmosphère. Leur taille micrométrique (entre 0,5 à 4,5  $\mu\text{m}$ ) leur permettent de pénétrer plus profondément dans le système respiratoire et déclencher des crises d'asthmes (Dankaart et al., 1991). À part leur taille de quelques micromètres, ils contiennent également des allergènes ce qui les rend potentiellement responsables de réactions allergiques ou asthmatiques (Schäppi et al., 1997; Suphioglu et al., 1992). Les granules d'amidon peuvent amener à une réponse immunitaire à médiation cellulaire ce qui laisse penser que ces granules possèdent un rôle majeur dans l'inflammation des voies aériennes inférieures (Abou Chakra et al., 2012; Motta et al., 2004).

Plusieurs études ont montré que les grains de pollen expulsent leur granule cytoplasmique après leur contact avec l'eau et/ou avec des polluants atmosphériques. Ces derniers peuvent faciliter la fragilisation de la paroi pollinique, permettant ainsi une libération plus facile des GCP dans un milieu aqueux (Motta et al., 2006).

#### **4.3.1 La libération des granules cytoplasmiques en milieu aqueux**

Selon les espèces végétales, deux mécanismes différents peuvent aboutir à la dispersion du contenu cytoplasmique des grains de pollen vers l'atmosphère après un contact avec un milieu aqueux (figure I.10):

- Graminées : rupture du grain de pollen dans l'eau de pluie suite à un choc osmotique (Grote et al., 2003; Suphioglu et al., 1992).
- Bouleau, aulne et noisetier : germination sans succès d'un grain de pollen sur une surface en présence d'eau, une feuille par exemple. La rupture du tube pollinique relâche ensuite des granules cytoplasmiques (Schäppi et al., 1997).

Cette rupture et la dispersion du contenu cytoplasmique par ces différents mécanismes est un enjeu important pour l'asthme allergique et la compréhension de l'asthme d'orage (Abou Chakra et al., 2011, 2012; Currie et al., 2000; Motta, 2004; Visez et al., 2015).

La question est donc pourquoi certaines espèces de pollen expulsent leur cytoplasme alors que d'autres ne le font pas. Une explication possible est que les grains de pollen des graminées ont une paroi plus mince que celle du pollen de bouleau, ce qui pourrait faciliter leur "éclatement" et la libération des GCP (Schäppi et al., 1997). Cependant, les grains de pollen des graminées ne se rompent pas tout au long de leur paroi pollinique pour favoriser la libération de leurs granules mais ils les expulsent plutôt via leur pore de germination. Il est supposé donc que les différences dans la composition chimique du contenu cytoplasmique des grains de pollen des graminées et de bouleau pourrait expliquer la différence dans le mécanisme de libération de leur GCP (Grote et al., 2001). Les amyloplastés trouvés dans le cytoplasme de pollen de bouleau et des graminées sont osmotiquement inactifs. Cependant, les grandes quantités de particules polysaccharidiques (particules P) sont généralement trouvés dans le cytoplasme des pollens des graminées et peuvent former des molécules osmotiquement actives permettant de développer ainsi des pressions osmotiques suffisantes pour l'expulsion du contenu cytoplasmique (Grote et al., 2001).

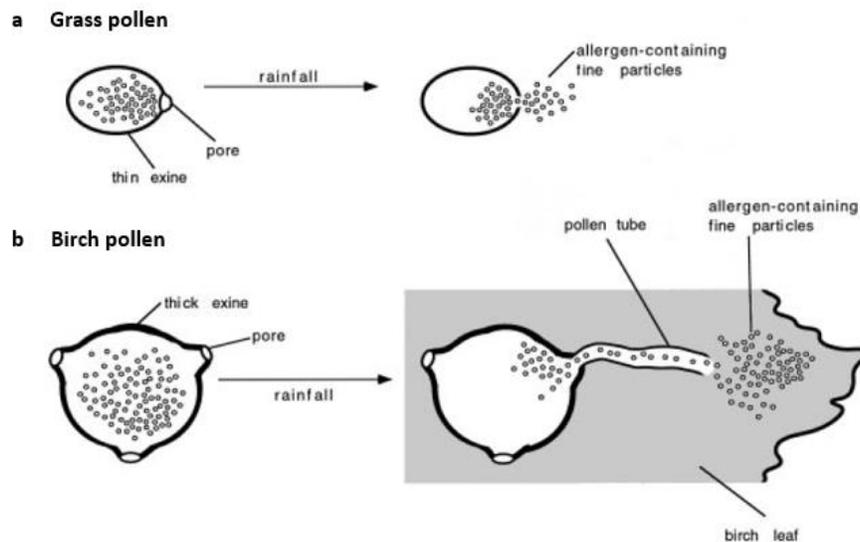


Figure I. 10: Schéma montrant les deux voies de libération des particules inhalables contenant des allergènes naturels de grains de pollen. **(a)** Une rupture de grains de pollen de graminées dans l'eau de pluie par choc osmotique et la libération des granules cytoplasmiques se fait par l'intermédiaire de son pore. **(b)** Un grain de pollen de bouleau germe sur une feuille; la rupture de son tube pollinique libère les granules cytoplasmiques (Schäppi et al., 1997) (réutilisation avec autorisation).

Les grains de pollen des graminées libèrent environ 700 granules d'amidon chargés d'allergène dans l'eau de pluie après un choc osmotique. Par contre après la germination du grain de pollen de bouleau sur une feuille, son tube pollinique se rompt et libère environ 400 granules d'amidon chargés d'allergènes (Schäppi et al., 1997). S'il est donc acquis que le pollen expulse son cytoplasme en milieu aqueux, le mécanisme physique par lequel les granules cytoplasmiques se retrouvent ensuite sous forme d'un aérosol respirable est très incertain.

Une fois libérés des grains de pollen, les microparticules ( $<5 \mu\text{m}$ ) pourraient donc créer des aérosols inhalables contenant des allergènes (Grote et al., 2001). Ce mécanisme de dispersion des granules d'amidon des pollens de graminées est essentiel pour expliquer l'asthme allergique, et notamment les épisodes, rares mais préoccupants, d'asthme d'orage (Marks et al., 2001; Suphioglu, 1998).

### **4.3.2 La libération des granules cytoplasmiques facilitée par les polluants atmosphériques**

La rupture des grains de pollen peut se faire aussi sous l'action des polluants atmosphériques mais sans ou en présence de l'eau. Les polluants atmosphériques peuvent rendre la rupture des grains de pollen plus facile. Cette réactivité des polluants atmosphériques sur les grains de pollen peut induire à des effets sur l'allergie pollinique. Donc la libération de ces GCP ne dépend pas seulement des facteurs intrinsèques, tels que la fraîcheur du pollen mais aussi des facteurs extrinsèques, tels que l'action des polluants atmosphériques, sur le grain de pollen lui-même.

Des nombreuses études décrivent des altérations physiques des grains de pollen lorsqu'ils sont exposés artificiellement ou collectés directement des zones urbaines en comparaison à des pollens sains. Ces modifications physiques induites par les polluants atmosphériques sont généralement : (i) des fissures voire une déchirure de l'exine (Peltre, 1998; Shahali et al., 2009b, 2009a) et (ii) des formes anormales des grains de pollen (Amjad and Shafiqhi, 2012; Guedes et al., 2009; Schoene et al., 2004; Tretyakova and Noskova, 2004).

En effet, Motta et al. ont observé une libération des granules cytoplasmiques du grain de pollen de fléole des prés commercial pollué *in vitro* par les deux polluants gazeux  $\text{NO}_2$  et  $\text{O}_3$  pour une durée de 4 heures (figure I.11). Cette même étude montre que la libération de ces GCP a été beaucoup plus importante lorsque les grains de pollen pollués entrent en contact avec l'eau (Motta et al., 2006).

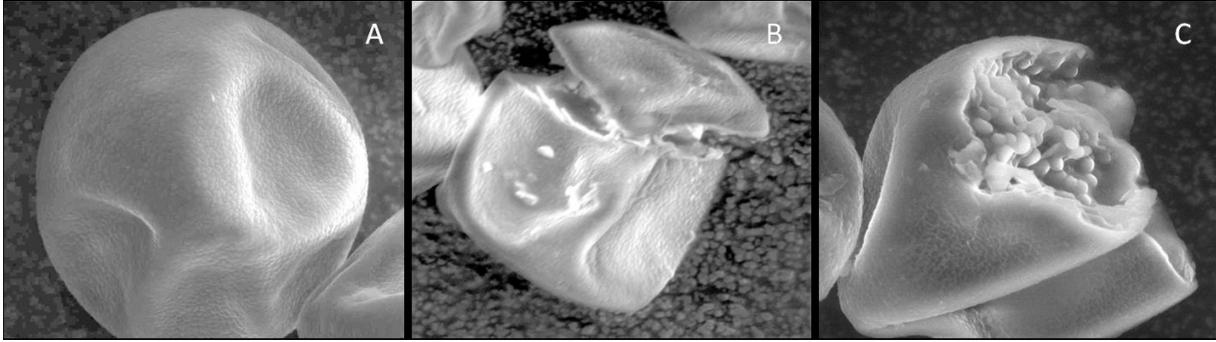


Figure I. 11: Images en microscopie électronique à balayage du pollen de fléole des prés (A) intact, (B) exposé pendant 4 heures à 2 ppm de dioxyde d'azote et (C) à 0,7 ppm d'ozone (Motta et al., 2006) (Réutilisation avec autorisation).

Il n'existe aussi pas beaucoup d'études sur la modification physique des grains de pollen de bouleau par les polluants atmosphériques. Des grains de pollen de bouleau récoltés des milieux urbains ont été observés vidés de leur contenu cytoplasmique (Puc et al., 2016). Ce mécanisme de rupture des grains pourrait également s'appliquer lors des épisodes d'asthme d'orage puisque l'augmentation de la vitesse des vents et les conditions d'humidité importante pourraient expliquer au moins en partie la création d'un aérosol d'allergènes respirables.

## 5. Conclusion

Dans ce premier chapitre nous avons réalisé une revue de la littérature sur la morphologie des grains de pollen, la pollinisation, la fraction lipidique pollinique, la réaction allergique ainsi que sur les modifications induites par les polluants atmosphériques et en particulier par l'ozone et le dioxyde d'azote. Le grain de pollen est une particule dont la fonction est d'assurer la reproduction chez les végétaux. Par-delà cette fonction vitale pour la vie sur terre, il est aussi une particule qui impacte la qualité de vie et la santé de millions de personnes à travers les réactions allergiques et asthmatiques.

Dans la littérature, nous avons identifié plusieurs travaux concernant les lipides du pollen : leur biogénèse, leur localisation externe ou interne (Ischebeck, 2016; Piffanelli et al., 1997; Piffanelli and Murphy, 1998) ainsi que leur rôle durant la réaction allergique (Bashir et al., 2013a; Traidl-Hoffmann et al., 2005, 2002). La libération de ces lipides est très abondante par les pollens de la fléole des prés et de bouleau après leur contact avec une solution aqueuse (Behrendt et al., 2001a). Une fois libérés ces lipides peuvent agir de concert avec les allergènes et augmenter la réponse allergique (Bashir et al., 2013a; Gilles et al., 2009; Traidl-Hoffmann et al., 2002).

Au moment de son contact avec l'atmosphère, plusieurs changements (chimiques, biologiques ou physiques) sont possibles sur le grain de pollen. Ce vieillissement atmosphérique peut aboutir à l'exacerbation de son potentiel allergisant (Sénéchal et al., 2015). Nous remarquons qu'il existe assez peu des études sur la modification des lipides des pollens allergisants par les polluants atmosphériques (Naas et al., 2016; Zhu et al., 2018). Leur modification chimique peut moduler la réaction allergique et moduler le potentiel allergisant du pollen (Beck et al., 2013; Behrendt et al., 1991).

Les grains de pollen de la fléole des prés et de bouleau sont une source de dispersion des granules cytoplasmiques après leur contact avec une solution aqueuse. Cette libération semble être plus importante lorsque les grains sont préalablement exposés aux polluants atmosphériques (Behrendt et al., 1991; Grote et al., 2003; Motta et al., 2006; Schäppi et al., 1997). La rupture des grains et la libération de leur contenu cytoplasmique est un enjeu important des réactions asthmatiques et en particulier de l'asthme d'orage (Abou Chakra et al., 2011, 2012; Currie et al., 2000; Motta, 2004).

## 6. Références bibliographiques

- Abed El Azim, M.H.M., 2015. Identification Phenolic and Biological Activities of Methanolic Extract of Date Palm Pollen (*Phoenix dactylifera*). *Journal of Microbial & Biochemical Technology* 07.
- Abou Chakra, O., Rogerieux, F., Poncet, P., Sutra, J.-P., Peltre, G., Sénéchal, H., Lacroix, G., 2011. Ability of Pollen Cytoplasmic Granules to Induce Biased Allergic Responses in a Rat Model. *International Archives of Allergy and Immunology* 154, 128–136.
- Abou Chakra, O.R., Sutra, J.-P., Demey Thomas, E., Vinh, J., Lacroix, G., Poncet, P., Sénéchal, H., 2012. Proteomic Analysis of Major and Minor Allergens from Isolated Pollen Cytoplasmic Granules. *Journal of Proteome Research* 11, 1208–1216.
- Aceves, M., Grimalt, J.O., Sunyer, J., Anto, J.M., Reed, C.E., 1991. Identification of Soybean Dust as an Epidemic Asthma Agent in Urban Areas by Molecular Marker and RAST Analysis of Aerosols. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 88, 124–134.
- Aelst, A.C.V., Pierson, E.S., Went, J.L.V., Cresti, M., 1993. Ultrastructural Changes of *Arabidopsis thaliana* Pollen During Final Maturation and Rehydration. *Zygote* 1, 173–179.
- Aggarwal, S., Moodley, Y.P., Thompson, P.J., Misso, N.L., 2010. Prostaglandin E2 and Cysteinyl Leukotriene Concentrations in Sputum: Association with Asthma Severity and Eosinophilic Inflammation. *Clinical & Experimental Allergy* 40, 85–93.
- 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.
- Allakhverdi, Z., Bouguermouh, S., Rubio, M., Delespesse, G., 2005. Adjuvant Activity of Pollen Grains. *Allergy* 60, 1157–1164.
- Amjad, L., Shafiqhi, M., 2012. The Effect of Air Pollution on *Chenopodium album* L. Pollen Structure. *Journal of Agricultural Science and Technology A* 2, 143–148.
- ANSES, 2014. Etat des connaissances sur l'impact sanitaire lié à l'exposition de la population générale aux pollens présents dans l'air ambiant.
- 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.
- 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.

## Chapitre I. Etat de l'art

- Bashir, M.E.H., Lui, J.H., Palnivalu, 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, e53337.
- 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., 2001b. Localization, Release and Bioavailability of Pollen Allergens: the Influence of Environmental Factors. *Current Opinion in Immunology* 13, 709–715.
- Behrendt, H., Becker, W.M., Fritzsche, C., Sliwa-Tomczok, W., Tomczok, J., Friedrichs, K.H., Ring, J., 1997. Air Pollution and Allergy: Experimental Studies on Modulation of Allergen Release from Pollen by Air Pollutants. *International Archives of Allergy and Immunology* 113, 69–74.
- Behrendt, H., Friedrich, K., Kainka-Stanicke, E., Darsow, U., Becker, W., Tomingas, R., 1991. Allergens and Pollutants in the Air-a Complex Interaction. *New trends in allergy* III 467.
- Behrendt, H., Friedrichs, K.H., Krämer, U., Hitzfeld, B., Becker, W.M., Ring, J., 1996. The Role of Indoor and Outdoor Air Pollution in Allergic Diseases xxx, in: Vos, J.G., Younes, M., Smith, E. (Eds.), *Allergic Hypersensitivities Induced by Chemicals*. CRC Press, pp. 173–82.
- Behrendt, H., Kasche, A., Ebner von Eschenbach, C., Risse, U., Huss-Marp, J., Ring, J., 2001a. 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., Ebner von Eschenbach, C., 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.
- Bellanger, A.P., Bosch-Cano, F., Millon, L., Ruffaldi, P., Franchi, M., Bernard, N., 2012. Reactions of Airway Epithelial Cells to Birch Pollen Grains Previously Exposed to In Situ Atmospheric Pb Concentrations: A Preliminary Assay of Allergenicity. *Biological Trace Element Research* 1–5.
- Berger, F., Twell, D., 2011. Germline Specification and Function in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62, 461–484.
- Bousquet, J., Demenais, F., Grimfeld, A., Neukirch, F., Scheinmann, P., 2002. Asthme : dépistage et prévention chez l'enfant (report). Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM).
- Broide, D.H., 2001. Molecular and cellular mechanisms of allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 108, S65–S71.

- Calleja, M., Rossignol-Strick, M., Duzer, D., 1993. Atmospheric Pollen Content off West Africa. Review of Palaeobotany and Palynology 79, 335–368.
- Castillejos, M., Gold, D.R., Damokosh, A.I., Serrano, P., Allen, G., McDonnell, W.F., Dockery, D., Ruiz Velasco, S., Hernández, M., Hayes, C., 1995. Acute Effects of Ozone on the Pulmonary Function of Exercising Schoolchildren from Mexico City. Am J Respir Crit Care Med 152, 1501–1507.
- Cecchi, L., Malaspina, T.T., Albertini, R., Zanca, M., Ridolo, E., Usberti, I., Morabito, M., Aglio, P.D., Orlandini, S., 2007. The contribution of Long-Distance Transport to the Presence of Ambrosia Pollen in Central Northern Italy. Aerobiologia 23, 145–151.
- Chapman, M.D., Pomés, A., Breiteneder, H., Ferreira, F., 2007. Nomenclature and Structural Biology of Allergens. Journal of Allergy and Clinical Immunology 119, 414–420.
- Charzynska, M., Murgia, M., Cresti, M., 1989. Ultrastructure of the Vegetative Cell of *Brassica napus* pollen with particular reference to microbodies. Protoplasma 152, 22–28.
- Corhay, J.-L., Henket, M., Nguyen, D., Duysinx, B., Sele, J., Louis, R., 2009. Leukotriene B4 Contributes to Exhaled Breath Condensate and Sputum Neutrophil Chemotaxis in COPD. CHEST 136, 1047–1054.
- Cuinica, L.G., Abreu, I., Esteves da Silva, J., 2014. Effect of Air Pollutant NO<sub>2</sub> on *Betula pendula*, *Ostrya carpinifolia* and *Carpinus betulus* Pollen Fertility and Human Allergenicity. Environmental Pollution 186, 50–55.
- Cuinica, L.G., Abreu, I., Silva, J.G.E., 2013. In Vitro Exposure of *Ostrya carpinifolia* and *Carpinus betulus* Pollen to Atmospheric Levels of CO, O<sub>3</sub> and SO<sub>2</sub>. Environmental Science and Pollution Research 1–7.
- Currie, A.J., Stewart, G.A., McWilliam, A.S., 2000. Alveolar Macrophages Bind and Phagocytose Allergen-Containing Pollen Starch Granules Via C-Type Lectin and Integrin Receptors: Implications for Airway Inflammatory Disease. The Journal of Immunology 164, 3878–3886.
- D'amato, G., Cecchi, L., Bonini, S., Nunes, C., Annesia-Maesano, I., Behrendt, H., Liccardi, G., Popov, T., Van Cauwenberge, P., 2007. Allergenic Pollen and Pollen Allergy in Europe. Allergy 62, 976–990.
- D'Amato, G., Liccardi, G., Frenguelli, G., 2007. Thunderstorm-asthma and pollen allergy. Allergy 62, 11–16.
- Dankaart, W.F.J.M., Smithuis, L.O.M.J., Blaauw, P.J., Spieksma, F.T.M., 1991. The appearance of pollen in the lower airways. Grana 30, 113–114. h
- Darbah, J.N.T., Kubiske, M.E., Nelson, N., Oksanen, E., Vapaavuori, E., Karnosky, D.F., 2008. Effects of Decadal Exposure to Interacting Elevated CO<sub>2</sub> and/or O<sub>3</sub> on paper birch (*Betula papyrifera*) reproduction. Environmental Pollution 155, 446–452.
- 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.

## Chapitre I. Etat de l'art

- Dickinson, H.G., Elleman, C.J., Doughty, J., 2000. Pollen coatings—chimaeric genetics and new functions. *Sexual Plant Reproduction* 12, 302–309.
- Dobson, H.E., 1988. Survey of Pollen and Pollenkitt Lipids--Chemical Cues to Flower Visitors? *American Journal of Botany* 170–182.
- Dobson, H.E.M., Bergström, G., 2000. The Ecology and Evolution of Pollen Odors. *Pl Syst Evol* 222, 63–87.
- Dominguez, E., Mercado, J.A., Quesada, M.A., Heredia, A., 1999. Pollen Sporopollenin: Degradation and Structural Elucidation. *Sexual Plant Reproduction* 12, 171–178.
- Dorne, A.-J., Kappler, R., Kristen, U., Heinz, E., 1988. Lipid Metabolism During Germination of Tobacco Pollen. *Phytochemistry* 27, 2027–2031.
- Doughty, J., Hedderson, F., McCubbin, A., Dickinson, H., 1993. Interaction Between a Coating-Borne Peptide of the Brassica Pollen Grain and Stigmatic S (self-incompatibility)-Locus-Specific Glycoproteins. *PNAS* 90, 467–471.
- Downs, S.H., Marks, G.B., Sporik, R., Belosouva, E.G., Car, N.G., Peat, J.K., 2001. Continued increase in the prevalence of asthma and atopy. *Archives of Disease in Childhood* 84, 20–23.
- Duque, L., Guimaraes, F., Ribeiro, H., Sousa, R., Abreu, I., 2013. Elemental characterization of the airborne pollen surface using Electron Probe Microanalysis (EPMA).
- 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., Laaidi, M., Detandt, M., Gehrig, R., Jaeger, S., Myszkowska, D., Nolard, N., Rantio-Lehtimäki, A., Stach, A., 2007. Climate Change and Evolution of the Pollen Content of the Air in Seven European Countries: the Example of Birch. *Revue Francaise d' Allergologie et d'Immunologie Clinique* 47, 57–63.
- Emilson, A., Berggren, B., Svensson, A., Takahashi, Y., Scheynius, A., 1996. Localization of the Major Allergen Bet v I in Birch Pollen by Confocal Laser Scanning Microscopy. *Grana* 35, 199–204.
- Evans, D.E., Rothnie, N.E., Sang, J.P., Palmer, M.V., Mulcahy, D.L., Singh, M.B., Knox, R.B., 1988a. Correlations Between Gametophytic (pollen) and Sporophytic (seed) Generations for Polyunsaturated Fatty Acids in Oilseed Rape *Brassica napus* L. *Theoret. Appl. Genetics* 76, 411–419.
- Evans, D.E., Rothnie, N.E., Sang, J.P., Palmer, M.V., Mulcahy, D.L., Singh, M.B., Knox, R.B., 1988b. Correlations Between Gametophytic (pollen) and Sporophytic (seed) Generations for polyunsaturated Fatty Acids in Oilseed Rape *Brassica napus* L. *Theoret. Appl. Genetics* 76, 411–419.
- Evans, D.E., Sang, J.P., Cominos, X., Rothnie, N.E., Knox, R.B., 1990. A Study of Phospholipids and Galactolipids in Pollen of Two Lines of *Brassica napus* L. (Rapeseed) with Different Ratios of Linoleic to Linolenic Acid. *Plant Physiol.* 93, 418–424.

- Evans, D.E., Taylor, P.E., Singh, M.B., Knox, R.B., 1992. The Interrelationship Between the Accumulation of Lipids, Protein and the Level of Acyl Carrier Protein During the Development of *Brassica napus* L. Pollen. *Planta* 186, 343–354.
- Evans, D.E., Taylor, P.E., Singh, M.B., Knox, R.B., 1991. Quantitative Analysis of Lipids and Protein from the Pollen of *Brassica napus* L. *Plant Science* 73, 117–126.
- Fernández, M.C., Rodríguez-García, M.I., 1989. Developmental Changes in the Aperture during Pollen Grain Ontogeny in *Olea europaea* L. *New Phytologist* 111, 717–723.
- Fernández-Llamazares, Á., Belmonte, J., Alarcón, M., López-Pacheco, M., 2012. Ambrosia L. in Catalonia (NE Spain): Expansion and Aerobiology of a New Bioinvader. *Aerobiologia* 28, 435–451.
- Franze, T., Weller, M.G., Niessner, R., Poschl, U., 2005. Protein Nitration by Polluted Air. *Environmental Science & Technology* 39, 1673–1678.
- García-Mozo, H., Galán, C., Jato, V., Belmonte, J., de la Guardia, C.D., Fernández, D., Gutiérrez, M., Aira, M.J., Roure, J.M., Ruiz, L., others, 2006. Quercus Pollen Season Dynamics in the Iberian Peninsula: Response to Meteorological Parameters and Possible Consequences of Climate Change. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 13, 209.
- Gelfand, E.W., Dakhama, A., 2006. CD8+ T lymphocytes and leukotriene B4: Novel Interactions in the Persistence and Progression of Asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117, 577–582.
- Gilles, S., Mariani, V., Bryce, M., Mueller, M., Ring, J., Behrendt, H., Jakob, T., Traidl-Hoffmann, C., 2009. Pollen Allergens do not Come Alone: Pollen Associated Lipid Mediators (PALMS) Shift the Human Immune Systems Towards a TH2-Dominated Response. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* 5, 3.
- Gilmour, M.I., Jaakkola, M.S., London, S.J., Nel, A.E., Rogers, C.A., 2006. How Exposure to Environmental Tobacco Smoke, Outdoor Air Pollutants, and Increased Pollen Burdens Influences the Incidence of Asthma. *Environmental Health Perspectives* 114, 627.
- 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.

## Chapitre I. Etat de l'art

- 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.
- Guerin, B., 1993. *Pollen et Allergies*. Edition Allerbio.
- Guilpain, P., Guillevin, L., Mouthon, L., 2006. Eosinophil Granule Cationic Proteins: Eosinophil Activation Markers. *Rev Med Interne* 27, 406–408.
- Heinrich, J., Wichmann, H.E., 2004. Traffic Related Pollutants in Europe and Their Effect on Allergic Disease. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 4, 341–348.
- Hejl, C., Wurtzen, P.A., Kleine-Tebbe, J., Johansen, N., Broge, L., Ipsen, H., 2009. *Phleum Pratense* Alone is Sufficient for Allergen-Specific Immunotherapy Against Allergy to Pooideae Grass Pollens. *Clinical & Experimental Allergy* 39, 752–759.
- 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., 1979. An Interpretation of the Hydrodynamics of Pollen. *American Journal of Botany* 66, 737–743.
- Heslop-Harrison, J., 1968. Tapetal origin of pollen-coat substances in *Lilium*. *New Phytologist* 67, 779–786.
- Hess, M.W., 1995. High-Pressure Freeze Fixation Reveals Novel Features During Ontogenesis of the Vegetative Cell in *Ledebouria* Pollen: an Ultrastructural and Cytochemical Study. *Biochem. Cell Biol.* 73, 1–10.
- Hoekstra, F.A., Bruinsma, J., 1979. Protein Synthesis of Binucleate and Trinucleate Pollen and its Relationship to Tube Emergence and growth. *Planta* 146, 559–566.
- Holloway, 2001. The Genetic Basis of Atopic asthma. *Clinical & Experimental Allergy* 29, 1023–1032.
- Honys, D., Twell, D., 2004. Transcriptome Analysis of Haploid Male Gametophyte development in *Arabidopsis*. *Genome Biology* 5, R85.
- 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.

- Hsieh, K., Huang, A.H.C., 2005. Lipid-Rich Tapetosomes in Brassica Tapetum are Composed of Oleosin-Coated Oil Droplets and Vesicles, Both Assembled in and then Detached from the Endoplasmic Reticulum. *The Plant Journal* 43, 889–899.
- Hsieh, K., Wu, S.S.H., Ratnayake, C., Huang, A.H.C., 2003. Tapetosomes and Elaioplasts in Brassica and Arabidopsis Floral Tapetum, in: Murata, N., Yamada, M., Nishida, I., Okuyama, H., Sekiya, J., Hajime, W. (Eds.), *Advanced Research on Plant Lipids*. Springer Netherlands, pp. 215–218.
- Human, H., Nicolson, S.W., 2006. Nutritional Content of Fresh, Bee-Collected and Stored Pollen of *Aloe Greatheadii* var. *Davyana* (Asphodelaceae). *Phytochemistry* 67, 1486–1492.
- Humbert, M., Garcia, G., 2004. Éotaxine, chimiokine de premier plan de l'allergie. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* 44, 62–64.
- Huss-Marp, J., Brockow, K., Darsow, U., Pfab, F., Kramer, U., Ring, J., Behrendt, H., 2008. Exposure of Grass Pollen to Volatile Organic Compounds Enhances Skin Prick Test Reactivity. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* 18, 408–409.
- Iannotti, O., Mincigrucci, G., Bricchi, E., Frenguelli, G., 2000. Pollen Viability as a Bio-Indicator of Air Quality. *Aerobiologia* 16, 361–365.
- Ischebeck, T., 2016. Lipids in pollen — They are different. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1861, 1315–1328.
- Ishizaka, K., Ishizaka, T., Hornbrook, M.M., 1966. Physicochemical Properties of Reaginic Antibody: V. Correlation of Reaginic Activity with  $\gamma$ E-Globulin Antibody. *The Journal of Immunology* 97, 840–853.
- Jaeger, S., 2008. Exposure to grass pollen in Europe. *Clinical & Experimental Allergy Reviews* 8, 2–6.
- Johansson, S.G.O., Bieber, T., Dahl, R., Friedmann, P.S., Lanier, B.Q., Lockey, R.F., Motala, C., Martell, J.A.O., Platts-Mills, T.A.E., Ring, J., Thien, F., Cauwenberge, P.V., Williams, H.C., 2004. Revised Nomenclature for Allergy for Global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113, 832–836.
- 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.
- King, T.P., Hoffman, D., Lowenstein, H., Marsh, D.G., Platts-Mills, T.A.E., Thomas, W., 1994. Allergen Nomenclature. *International Archives of Allergy and Immunology* 105, 224–233.
- Kuprianova, L.A., 1967. Apertures of pollen grains and their evolution in angiosperms. *Review of Palaeobotany and Palynology* 3, 73–80.

- Lane, S.J., Sousa, A.R., Lee, T.H., 1994. The Role of the Macrophage in Asthma. *Allergy* 49, 201–209.
- Légifrance, 2018. Accueil | Légifrance, le service public de la diffusion du droit. URL <https://www.legifrance.gouv.fr/> (accessed 6.21.18).
- Levetin, E., Water, P.V. de, 2008. Changing Pollen Types/Concentrations/Distribution in the United States: Fact or fiction? *Curr Allergy Asthma Rep* 8, 418–424.
- Lhuissier, F., Sénéchal, H., Mayer, C., Desvaux, F., Ripoll, C., Peltre, G., 2000. Gaseous Air Pollution on Allergenic Pollen: Effects of NO and CO Exposures. *Allergy* 55, 546.
- Li, Y.-F., Gauderman, W.J., Avol, E., Dubeau, L., Gilliland, F.D., 2006. Associations of Tumor Necrosis Factor G-308A with Childhood Asthma and Wheezing. *Am J Respir Crit Care Med* 173, 970–976.
- Lloyd, C.M., Saglani, S., 2013. T cells in asthma: Influences of genetics, environment, and T-cell plasticity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131, 1267–1274.
- Lord, E.M., Russell, S.D., 2002. The Mechanisms of Pollination and Fertilization in Plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 18, 81–105.
- Lunau, K., 1995. Notes on the Colour of Pollen. *Pl Syst Evol* 198, 235–252.
- Luu, D.T., Heizmann, P., Dumas, C., 1997. Pollen-Stigma Adhesion in Kale Is Not Dependent on the Self-(In)Compatibility Genotype. *Plant Physiol.* 115, 1221–1230.
- Marco, R.D., Poli, A., Ferrari, M., Accordini, S., Giammanco, G., Bugiani, M., Villani, S., Ponzio, M., Bono, R., Carrozzini, L., Cavallini, R., Cazzoletti, L., Dallari, R., Ginesu, F., Lauriola, P., Mandrioli, P., Perfetti, L., Pignato, S., Pirina, P., Struzzo, P., 2002. The Impact of Climate and Traffic-related NO<sub>2</sub> on the Prevalence of Asthma and Allergic Rhinitis in Italy. *Clinical & Experimental Allergy* 32, 1405–1412.
- 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.
- 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.
- McConnell, R., Berhane, K., Gilliland, F., London, S.J., Islam, T., Gauderman, W.J., Avol, E., Margolis, H.G., Peters, J.M., 2002. Asthma in Exercising Children Exposed to Ozone: a Cohort Study. *The Lancet* 359, 386–391.
- 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.

- Minero, F.J.G., Candau, P., Tomás, C., Morales, J., 1998. Airborne grass (Poaceae) Pollen in Southern Spain. Results of a 10-year study (1987–96). *Allergy* 53, 266–274.
- Molina, C., 1997. L'allergie à l'aube du troisième millénaire. John Libbey Eurotext.
- Mosmann, Coffman, and R.L., 1989. TH1 and TH2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Annual Review of Immunology* 7, 145–173.
- Motta, A., Marliere, M., Peltre, G., Sterenberg, P., 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.
- Motta, A., Peltre, G., Dormans, J., Withagen, C., Lacroix, G., Bois, F., Steerenberg, P., 2004. *Pbleum pratense* Pollen Starch Granules Induce Humoral and Cell-Mediated Immune Responses in a Rat Model of Allergy. *Clinical & Experimental Allergy* 34, 310–314.
- Motta, A.C., 2004. Effet de polluants atmosphériques gazeux sur l'allergénicité du pollen de phleum pratense et sur la réponse allergique respiratoire. Université Paris VII.
- Mueller, M.J., 1998. Radically Novel Prostaglandins in Animals and Plants: the Isoprostanes. *Chemistry & Biology* 5, R323–R333.
- Murphy, D.J., 2006. The extracellular Pollen Coat in Members of the Brassicaceae: Composition, Biosynthesis, and Functions in Pollination. *Protoplasma* 228, 31–39.
- 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.
- Nathan, R.A., 2007. The burden of allergic rhinitis. *Allergy and Asthma Proceedings* 28, 3–9.
- Nepi, M., Guarnieri, M., Pacini, E., 2003. “Real” and Feed Pollen of *Lagerstroemia indica*: Ecophysiological Differences. *Plant Biology* 5, 311–314.
- Obtulowicz, K., 1993. Air pollution and pollen allergy, in: *Folia Medica Cracoviensia*. p. 121.
- 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.
- Pacini, E., Franchi, G.G., Ripaccioli, M., 1999. Ripe Pollen Structure and Histochemistry of Some Gymnosperms. *Plant Systematics and Evolution* 217, 81–99.
- Pacini, E., Hesse, M., 2005. Pollenkitt - Its Composition, Forms and Functions. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 200, 399–415.
- Pauli, G., Metz-Favre, C., 2013. Allergies croisées pollens–aliments. *Revue des Maladies Respiratoires* 30, 328–337.

## Chapitre I. Etat de l'art

- Pearce, N., Pekkanen, J., Beasley, R., 1999. How Much Asthma is Really Attributable to Atopy? *Thorax* 54, 268–272.
- Peltre, G., 1998. Inter-relationship Between Allergenic Pollens and Air Pollution. *Allerg Immunol (Paris)* 30, 324–6.
- Piffanelli, P., Murphy, D.J., 1998. Novel Organelles and Targeting Mechanisms in the Anther tapetum. *Trends in Plant Science* 3, 250–252.
- 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*. *Plant J.* 11, 549–562.
- 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.
- Pont, F., Gispert, X., Cañete, C., Pinto, E., Dot, D., Monteis, J., 1997. Epidemia de Asma Por Soja en L'Hospitalet de Llobregat (Barcelona). *Archivos de Bronconeumología* 33, 453–456.
- Poynter, M.E., Persinger, R.L., Irvin, C.G., Butnor, K.J., van Hirtum, H., Blay, W., Heintz, N.H., Robbins, J., Hemenway, D., Taatjes, D.J., Janssen-Heininger, Y., 2006. Nitrogen Dioxide Enhances Allergic Airway Inflammation and Hyperresponsiveness in the Mouse. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 290, L144–L152.
- Prieu, C., 2015. Evolution et Developpement des grains de pollen chez les angiospermes (phdthesis). Université Paris-Saclay.
- Prussin, C., Metcalfe, D.D., 2006. 5. IgE, Mast cells, Basophils, and Eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117, S450–S456.
- Puc, M., Kotrych, D., Lipiec, A., Rapiejko, P., Siergiejko, G., 2016. Birch Pollen Grains Without Cytoplasmic Content in the Air of Szczecin and Bialystokcontent in the air of Szczecin and Bialystok 12, 6.
- Quilichini, T.D., Douglas, C.J., Samuels, A.L., 2014. New views of Tapetum Ultrastructure and Pollen Exine Development in *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot* mcu042.
- Quilichini, T.D., Grienberger, E., Douglas, C.J., 2015. The biosynthesis, Composition and Assembly of the Outer Pollen Wall: A Tough Case to Crack. *Phytochemistry, Special Issue in honor of Professor Vincenzo De Luca's 60th birthday* 113, 170–182.
- R. Naik, S., M. Wala, S., 2013. Inflammation, Allergy and Asthma, Complex Immune Origin Diseases: Mechanisms and Therapeutic Agents [WWW Document].
- Radermecker, C., Louis, R., Bureau, F., Marichal, T., 2018. Role of Neutrophils in Allergic Asthma. *Current Opinion in Immunology* 54, 28–34.

- Rancé, F., Navarro-Rouimi, R., Dutau, G., 2007. Les allergies polliniques. Expansion formation et éditions ; [Diff.] Institut UCB de l'allergie, Paris (15 rue Saint-Benoît, 75278 Cedex 6); Nanterre.
- Reinmuth-Selzle, K., Kampf, C.J., Lucas, K., Lang-Yona, N., Fröhlich-Nowoisky, J., Shiraiwa, M., Lakey, P.S.J., Lai, S., Liu, F., Kunert, A.T., Ziegler, K., Shen, F., Sgarbanti, R., Weber, B., Bellinghausen, I., Saloga, J., Weller, M.G., Duschl, A., Schuppan, D., Pöschl, U., 2017. Air Pollution and Climate Change Effects on Allergies in the Anthropocene: Abundance, Interaction, and Modification of Allergens and Adjuvants. *Environ. Sci. Technol.* 51, 4119–4141.
- Rejón, J., Delalande, F., Schaeffer-Reiss, C., Alché, J., Rodríguez-García, M., Van Dorsselaer, A., Castro, A., 2016. The Pollen Coat Proteome: At the Cutting Edge of Plant Reproduction. *Proteomes* 4, 5.
- 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 × acerifolia* and *Quercus robur* Pollen in Response to Ozone Treatment. *International Journal of Environmental Health Research* 1–13.
- Ribeiro, H., Guimarães, F., Duque, L., Noronha, F., Abreu, I., 2015. Characterisation of Particulate Matter on Airborne Pollen Grains. *Environmental Pollution* 206, 7–16.
- RNSA, 2018. Végétations en ville. Guide d'information.
- Rogerieux, F., Godfrin, D., Sénéchal, H., Motta, A.C., Marlière, M., Peltre, G., Lacroix, G., 2007. Modifications of *Phleum pratense* Grass Pollen Allergens Following Artificial Exposure to Gaseous Air Pollutants (O<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>). *International Archives of Allergy and Immunology* 143, 127–134.
- Ross, J.H.E., 1996. Oleosin-Like Genes and Proteins in the Tapetum and Pollen Coat of *Brassica napus*. (Ph.D.). University of East Anglia.
- Rousseau, D.-D., Schevin, P., Duzer, D., Cambon, G., Ferrier, J., Jolly, D., Poulsen, U., 2006. New Evidence of Long Distance Pollen Transport to Southern Greenland in Late Spring. *Review of Palaeobotany and Palynology* 141, 277–286.
- Ruffin, J., Williams, D., Banerjee, U., Pinnix, K., 1983. The Effects of Some Environmental Gaseous Pollutants on Pollen-Wall Proteins of Certain Airborne Pollen Grains: a Preliminary Study. *Grana* 22, 171–175.
- Schäppi, G.F., Taylor, P.E., Staff, I.A., Rolland, J.M., Suphioglu, C., 1999. Immunologic Significance of Respirable Atmospheric Starch Granules Containing Major Birch Allergen Bet v 1. *Allergy* 54, 478–483.
- Schäppi, G.F., Taylor, P.E., Suphioglu, C., Knox, R.B., 1997. A New Approach to the Investigation of Allergenic Respirable Particles Using a Modified Andersen Impactor. *Grana* 36, 373–375.
- Schoene, K., Franz, J.-T., Masuch, G., 2004. The Effect of Ozone on Pollen Development in *Lolium perenne* L. *Environmental Pollution* 131, 347–354.
- Scott, R.J., Spielman, M., Dickinson, H.G., 2004. Stamen Structure and Function. *Plant Cell* 16, S46–S60.

## Chapitre I. Etat de l'art

- Scott, R.J., Stead, A.D., 1994. *Molecular and Cellular Aspects of Plant Reproduction*. Cambridge University Press.
- Sears, Burrows B., Flannery E. M., Herbison G. P., Holdaway M. D., 2006. Atopy in Childhood. I. Gender and Allergen Related Risks for Development of Hay Fever and Asthma. *Clinical & Experimental Allergy* 23, 941–948.
- Sénéchal, H., Visez, N., Charpin, D., Shahali, Y., Peltre, G., Biolley, J.-P., Lhuissier, F., Couderc, R., Yamada, O., Malrat-Domenge, A., Pham-Thi, N., Poncet, P., Sutra, J.-P., 2015. A Review of the Effects of Major Atmospheric Pollutants on Pollen Grains, Pollen Content, and Allergenicity. *The Scientific World Journal* 2015, 1–29.
- Shahali, Y., Poncet, P., Sénéchal, H., 2013. Pollinose aux Cupressacées et pollution atmosphérique. *Revue Française d'Allergologie*.
- 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. *Journal of Physics: Conference Series* 151, 012027.
- Shea, K.M., Truckner, R.T., Weber, R.W., Peden, D.B., 2008. Climate Change and Allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 122, 443–453.
- Siegel, I., Sherman, W.B., 1970. Pollen-White Cell Interactions. *Journal of Allergy* 45, 133–145.
- Siljamo, P., Sofiev, M., Severova, E., Ranta, H., Kukkonen, J., Polevova, S., Kubin, E., Minin, A., 2008. Sources, Impact and Exchange of Early-Spring Birch Pollen in the Moscow Region and Finland. *Aerobiologia* 24, 211.
- Skjoth, C.A., Sommer, J., Stach, A., Smith, M., Brandt, J., 2007. The long-range transport of birch (*Betula*) pollen from Poland and Germany Causes Significant Pre-season Concentrations in Denmark. *Clinical And Experimental Allergy: Journal Of The British Society For Allergy And Clinical Immunology* 37, 1204–1212.
- Smith, H.R., Larsen, G.L., Cherniack, R.M., Wenzel, S.E., Voelkel, N.F., Westcott, J.Y., Bethel, R.A., 1992. Inflammatory Cells and Eicosanoid Mediators in Subjects with Late Asthmatic Responses and Increases in Airway Responsiveness. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 89, 1076–1084.
- Sofiev, M., Bergmann, K.-C., 2012. *Allergenic Pollen: A Review of the Production, Release, Distribution and Health Impacts*. Springer Netherlands.
- Staff, I.A., Schäppi, G., Taylor, P.E., 1999. Localisation of Allergens in Ryegrass Pollen and in Airborne Micronic Particles. *Protoplasma* 208, 47–57.

- Strand, V., Svartengren, M., Rak, S., Barck, C., Bylin, G., 1998. Repeated Exposure to an Ambient Level of NO<sub>2</sub> Enhances Asthmatic Response to a Nonsymptomatic Allergen Dose. *European Respiratory Journal* 12, 6–12.
- Suphioglu, C., 1998. Thunderstorm Asthma Due to Grass Pollen. *International Archives of Allergy and Immunology* 116, 253–260.
- Suphioglu, C., Singh, M.B., Taylor, P., Knox, R.B., Bellomo, R., Holmes, P., Puy, R., 1992. Mechanism of Grass-Pollen-Induced Asthma. *The Lancet* 339, 569–572.
- Swanson, R., Edlund, A.F., Preuss, D., 2004. Species Specificity in Pollen-Pistil Interactions. *Annual Review of Genetics* 38, 793–818.
- Tanaka, N., Uehara, K., Murata, J., 2004. Correlation Between Pollen Morphology and Pollination Mechanisms in the Hydrocharitaceae. *J Plant Res* 117, 265–276.
- 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.
- Taylor, P.E., Jacobson, K.W., House, J.M., Glovsky, M.M., 2007. Links Between Pollen, Atopy and the Asthma Epidemic. *International Archives of Allergy and Immunology* 144, 162–170.
- Thanikaimoni, G., 1986. Pollen Apertures: Form and Function. *Pollen and Spores, Form and Function. Linnean Soc Symp Ser* 12.
- 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.
- Traidl-Hoffmann, C., Mariani, V., Hochrein, H., Karg, K., Wagner, H., Ring, J., Mueller, M.J., Jakob, T., Behrendt, H., 2005. Pollen-Associated Phytoprostanes Inhibit Dendritic Cell Interleukin-12 Production and Augment T Helper type 2 Cell Polarization. *Journal of Experimental Medicine* 201, 627–636.
- Tretyakova, I., Noskova, N., 2004. Scotch Pine Pollen Under Conditions of Environmental Stress. *Russian Journal of ecology* 35, 20–26.
- Tzen, J.T.C., 2012. Integral Proteins in Plant Oil Bodies. *ISRN Botany* 2012, 1–16.

## Chapitre I. Etat de l'art

- Vagaggini, B., Carnevali, S., Macchioni, P., Taccola, M., Fornai, E., Bacci, E., Bartoli, M. I, Cianchetti, S., Dente, F. I, Franco, A.D., Giannini, D., Paggiaro, P. I, 1999. Airway Inflammatory Response to Ozone in Subjects with Different Asthma Severity. *European Respiratory Journal* 13, 274–280.
- 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. *Am J Respir Crit Care Med* 166, 1073–1077.
- Valenta, R., 2002. The Future of Antigen-Specific Immunotherapy of Allergy. *Nature Reviews Immunology* 2, 446–453.
- Vinckier, S., Cadot, P., Grote, M., Ceuppens, J.L., Smets, E., 2006. Orbicules Do Not Significantly Contribute to the Allergenic Micro-Aerosol Emitted from Birch Trees. *Allergy* 61, 1243–1244.
- Vinckier, S., Smets, E., 2002. Morphological and Ultrastructural Diversity of Orbicules in Relation to Evolutionary Tendencies in Apocynaceae s.l. *Ann Bot* 90, 647–662.
- Vinckier, Stefan, Smets, E., 2001. A Survey of the Presence and Morphology of Orbicules in European Allergenic Angiosperms. Background Information for Allergen Research. *Canadian Journal of Botany* 79, 757–766.
- Vinckier, S., Smets, E., 2001. The Potential Role of Orbicules as a Vector of Allergens. *Allergy* 56, 1129–1136.
- 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.
- Vrtala, S., Fischer, S., Grote, M., Vangelista, L., Pastore, A., Sperr, W.R., Valent, P., Reichelt, R., Kraft, D., Valenta, R., 1999. Molecular, Immunological, and Structural Characterization of Phl p 6, a Major Allergen and P-particle-Associated Protein from Timothy grass (*Phleum pratense*) pollen. *The Journal of Immunology* 163, 5489–5496.
- Wardlaw, A.J., 1994. Eosinophils in the 1990s: New Perspectives on their Role in Health and Disease. *Postgraduate Medical Journal* 70, 536–552.
- Wehling, K., Niester, C., Boon, J.J., Willemse, M.T.M., Wiermann, R., 1989. p-Coumaric acid—a Monomer in the Sporopollenin Skeleton. *Planta* 179, 376–380.
- Weiland, S.K., Mundt, K.A., Rückmann, A., Keil, U., 1994. Self-Reported Wheezing and Allergic Rhinitis in Children and Traffic Density on Street of Residence. *Annals of Epidemiology* 4, 243–247.
- Wetzel, C.L.R., Jensen, W.A., 1992. Studies of Pollen Maturation in Cotton: the Storage Reserve Accumulation Phase. *Sexual Plant Reprod* 5, 117–127.
- Wiermann, R., Gubatz, S., 1992. Pollen Wall and Sporopollenin, in: Dumas, S.D.R. and C. (Ed.), *International Review of Cytology*. Academic Press, pp. 35–72.

- Wiesch, D.G., Meyers, D.A., Bleecker, E.R., 1999. Genetics of Asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 104, 895–901.
- Williams, T.J., Hellewell, P.G., 1995. Mechanisms and Pharmacological Manipulation of Eosinophil Accumulation in *Vivo*. *Trends in Pharmacological Sciences* 16, 418–423.
- Wilson, A.F., Novey, H.S., Berke, R.A., Surprenant, E.L., 1973. Deposition of Inhaled Pollen and Pollen Extract in Human Airways. *N. Engl. J. Med.* 288, 1056–1058.
- Wolters, J., Martens, M., 1987. Effects of Air Pollutants on Pollen. *The Botanical Review* 53, 372–414.
- 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.
- Zinkl, G.M., Zwiebel, B.I., Grier, D.G., Preuss, D., 1999. Pollen-Stigma Adhesion in *Arabidopsis*: a species-Specific Interaction Mediated by Lipophilic Molecules in the Pollen Exine. *Development* 126, 5431–5440.



# Chapitre II

## Dispositif expérimental



<b>1. Introduction .....</b>	<b>80</b>
<b>2. Grains de pollen étudiés.....</b>	<b>80</b>
2.1 Le pollen de la fléole des prés.....	80
2.2 Le pollen de bouleau .....	81
<b>3. Exposition du pollen <i>in vitro</i> aux polluants gazeux .....</b>	<b>81</b>
3.1 Génération et suivi de l’ozone.....	82
3.2 Génération et suivi du dioxyde d’azote.....	83
3.3 Exposition à l’ozone et aux dioxydes d’azote .....	83
<b>4. Rupture artificielle du pollen .....</b>	<b>83</b>
<b>5. Extraction de la fraction lipidique pollinique .....</b>	<b>84</b>
5.1 Produits chimiques utilisés.....	84
5.2 Extraction en phase organique.....	85
5.3 Extraction en phase aqueuse .....	89
<b>6. Analyses chromatographiques .....</b>	<b>90</b>
<b>7. Dosage des protéines totales.....</b>	<b>91</b>
<b>8. Observation microscopique électronique à balayage et optique .....</b>	<b>92</b>
<b>9. Références bibliographiques.....</b>	<b>93</b>

## 1. Introduction

Il s'agit dans ce chapitre de présenter les différentes méthodes expérimentales mises au point au cours de la thèse. Dans un premier temps, la provenance des grains de pollen de la fléole des prés et de bouleau est décrite ainsi que les dispositifs expérimentaux mis en place pour réaliser leurs expositions aux polluants gazeux et leurs ruptures artificielles. Ensuite, les deux méthodes d'extraction organique et aqueuse utilisées pour étudier la composition de la fraction lipidique pollinique sont détaillées. Les méthodes chromatographiques pour réaliser les études quantitatives et qualitatives sont également décrites par la suite. Les travaux de dosage des quantités totales des protéines extraites des pollens et les observations en microscopie électronique à balayage et optique des pollens selon le traitement subi sont représentés à la fin de ce chapitre.

## 2. Grains de pollen étudiés

### 2.1 Le pollen de la fléole des prés

Les grains de pollen de la fléole des prés (*Phleum pratense*) ont été commandés chez plusieurs fournisseurs : Bonapol, Pharmallerga et Stallergenes Greer. Le tableau II.1 récapitule leurs différentes dates et lieux de récolte.

<b>Fournisseurs</b>	<b>Dates de récolte</b>	<b>Lieux de récolte</b>
Bonapol	22-25 Janvier 2007	Czech Republic, Southern Bohemia
Pharmallerga	7 Juillet 2016	Batelov, Jihlava, South Moravia
Stallergenes greer	7 Octobre 2014	Minnesota, États Unis

Tableau II 1: Dates et lieux de récolte des grains de pollen de la fléole des prés.

Les grains de pollen de la fléole des prés ont une couleur jaune pâle et une taille comprise entre 26 et 40  $\mu\text{m}$  selon les indications fournies par les fournisseurs. Ces grains n'ont pas subi de lavage préalable par un solvant organique (dénomination commerciale : non-defatted). Leur récolte a été effectuée dans des zones non polluées, ce qui a été certifié par les fournisseurs et par les observations en microscopie

électronique à balayage effectuées par notre collègue du Lasir Marie Choël. Les observations microscopiques ont montré que les échantillons étaient purs et ne contenaient que du pollen de fléole de prés intact (sans rupture) et sans particules présentes à leur surface pollinique.

Les grains de pollen de chez Bonapol ont été utilisés pour les études d'identification et de quantification de la fraction lipidique modifiée par l'exposition aux polluants gazeux et par la rupture artificielle. Pour les expériences réalisées par les collègues du Centre d'Infection et d'Immunologie de Lille, furent utilisées les grains de pollen fournis par Pharmallerga car leur date de récolte était plus récente que celle de Bonapol.

## 2.2 Le pollen de bouleau

Le bouleau (*Betula pendula*) a également été choisi en raison de son abondance dans la région Hauts-de-France et en particulier sur le campus de l'Université de Lille, Sciences et Technologies.

Les chatons du bouleau ont été récoltés juste avant leur déhiscence sur le campus de l'Université pendant leur période de pollinisation en mars 2017. Ensuite ils ont été séchés pendant 24 heures à l'air libre au laboratoire. Les grains de pollen tamisés à 40  $\mu\text{m}$  ont été placés dans une atmosphère sèche (gel de silice) pendant 24 heures et ensuite stockés dans des vials hermétiques à une température de 4°C jusqu'à leur utilisation.

## 3. Exposition du pollen *in vitro* aux polluants gazeux

La figure II.1 représente le schéma d'exposition des grains de pollen *in vitro* à l'ozone ( $\text{O}_3$ ), au dioxyde d'azote ( $\text{NO}_2$ ) et aussi à un mélange des deux polluants. Les concentrations des polluants gazeux ont été choisies afin de mieux s'approcher des conditions atmosphériques. L'exposition à l'ozone a été réalisée à des concentrations de 100 ppb pour les grains de pollen de fléole des prés et de 130 ppb pour le bouleau. Les grains de pollen ont été aussi exposés à une concentration de 100 ppb de  $\text{NO}_2$ . La durée d'exposition de 16 h fut choisie pour être effectuée durant la nuit et permettre l'utilisation du matériel d'exposition à d'autres fins pendant la journée. À titre d'exemple et de comparaison, la durée de transit du pollen dans l'atmosphère est de l'ordre de la dizaine d'heure.

Seuls les grains de pollen de fléole des prés ont été également exposés à une concentration élevée de 1000 ppb d’ozone afin de faciliter l’identification par la spectrométrie de masse des produits formés par l’exposition aux polluants gazeux. Nous allons détailler par la suite les différentes parties du montage d’exposition à l’ozone et au dioxyde d’azote.

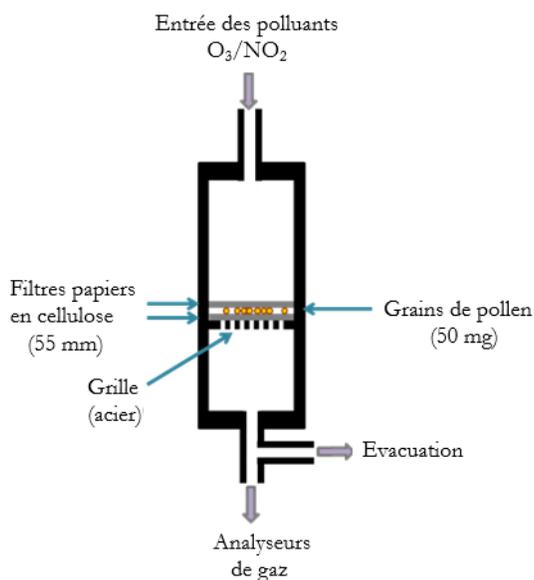


Figure II. 1: Schéma du dispositif d'exposition des grains de pollen aux polluants gazeux ( $O_3$  et  $NO_2$ ). Les grains de pollen sont placés entre les deux filtres en cellulose (diamètre 55 mm). Les concentrations des polluants se mesurent à la sortie du réacteur par deux analyseurs spécifiques.

### 3.1 Génération et suivi de l’ozone

La génération de l’ozone s’effectue *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). Le rayonnement UV est généré par une lampe à mercure parallèle à un tube en quartz dans lequel circule un flux d’air synthétique de débit de 1,35 L/min. Pour faire varier la quantité d’ozone générée, il est possible de changer la longueur de la lampe UV en déplaçant le cache ou de modifier le débit d’air synthétique.

Le flux d’ozone est introduit dans le réacteur en acier où le pollen de masse 50 mg est piégé entre deux filtres papiers en cellulose (GE Healthacare, Life Sciences Wathman<sup>TM</sup>, diamètre 55 mm). Les grains de pollen ont été exposés durant 16 heures à des concentrations de 100, 130 et 1000 ppb d’ozone.

La concentration en ozone est mesurée en sortie de réacteur par un analyseur d'ozone (Thermo Fisher Scientific, modèle Megatec 49i), ce dernier effectue une mesure de la concentration toutes les dix secondes avec une limite de détection de 1 ppb. L'analyseur nécessite un débit de fonctionnement de 1,35 L/min.

### 3.2 Génération et suivi du dioxyde d'azote

La génération du NO<sub>2</sub> *in vitro* se fait grâce à un générateur des NO<sub>x</sub> (Ansyco, SYCOS KT-GPTM) alimenté d'un débit de 2,5 L/min de monoxyde d'azote (NO). Le générateur contient une chambre de réaction dans laquelle est généré le NO<sub>2</sub> suite à une réaction du gaz étalon le monoxyde d'azote (NO) avec l'O<sub>3</sub> produit aussi par le même générateur.

Le dioxyde d'azote ainsi généré est mesuré en sortie de réacteur par un analyseur d'oxydes d'azote (Thermo Fisher Scientific, Modèle Megatec 42i) effectuant une mesure toutes les soixante secondes avec une limite de détection de 0,4 ppb. Ce modèle est un appareil à chimiluminescence pour la mesure en continu et en temps réel des oxydes d'azote de l'air ambiant.

### 3.3 Exposition à l'ozone et aux dioxydes d'azote

Les grains de pollen ont également été exposés à un mélange des deux polluants gazeux d'ozone et de dioxyde d'azote à des concentrations proches de celle des conditions atmosphériques. Les concentrations ont été fixées à 100 ppb avec un débit total de 2,5 L/min.

## 4. Rupture artificielle du pollen

Nous avons mis au point un protocole de rupture artificielle par un broyage mécanique des grains de pollen (figure II.2). Le principe de la rupture artificielle des grains de pollen utilisé dans cette thèse est le suivant : un flacon en verre contenant les grains de pollen et un barreau aimanté est disposé sur un agitateur magnétique. L'agitation mécanique à une vitesse de 1400 tours/min pendant 4h va alors permettre le broyage des grains de pollen. Cette technique de broyage mécanique a été utilisée dans la littérature afin d'étudier la composition lipidique interne des grains de pollen de *Brassica napus* (Cf. **partie 2.3. du chapitre I**) (Evans et al., 1991).

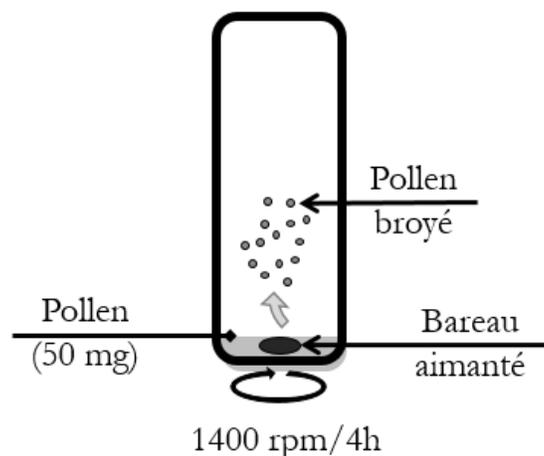


Figure II. 2: Schéma représentatif de la rupture des grains de pollen par la technique de broyage mécanique à une vitesse de 1400 rpm pendant une durée de 4h.

## 5. Extraction de la fraction lipidique pollinique

### 5.1 Produits chimiques utilisés

Les lipides externes des grains de pollen sont généralement extraits par des solvants organiques très différents tel que le : cyclohexane, hexane, benzène, chloroforme, N,N-diméthylformamide, diméthyle sulfoxyde, toluène, éther diéthylique, éther de pétrole, éthanol, méthanol, acétone, et acétonitrile (Bashir et al., 2013; Henricsson et al., 1996; Naas et al., 2016; Rejón et al., 2016) (**Cf. partie 2.2. du chapitre I**).

Dans ce travail, plusieurs solvants organiques, qui diffèrent selon leur polarité, ont été utilisés pour extraire la fraction lipidique externe des grains de pollen. Les solvants utilisés ont été commandés chez Sigma Aldrich : dichlorométhane (DCM) ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , pureté de 99,8 %), cyclohexane ( $\text{C}_6\text{H}_{12}$ , 99,5 %), hexane ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ , 99 %) et méthanol (MeOH) ( $\text{CH}_3\text{OH}$ , 99,9 %).

Le tampon phosphate salin provenant de chez Thermo Fisher (souvent abrégé PBS, de l'anglais Phosphate Buffered Saline) est le solvant aqueux utilisé dans ce travail. Il s'agit d'une solution tampon contenant du chlorure de sodium ( $\text{NaCl}$ ), du phosphate disodique ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), du phosphate monopotassique ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) et de chlorure de potassium ( $\text{KCl}$ ). Le PBS a déjà été utilisé dans la littérature pour extraire les protéines des grains de pollen de fléole des prés (Behrendt et al., 1999). Ce tampon aqueux est souvent utilisé pour les études biologiques avec les cellules humaines.

## 5.2 Extraction en phase organique

Au début de ce travail, nous avons utilisé la méthode d'extraction par ultrasons publiée dans l'article d'Oumsaad Naas (Naas et al., 2016) pour extraire les lipides externes des grains de pollen de la fléole des prés. Les agitations par ultrasons ont été utilisées afin de faciliter l'extraction des lipides par le solvant organique. Les étapes de l'extraction sont les suivantes : (i) ultrasonication (agitation à bain ultrasons) de 50 mg de pollen dans 1 mL de dichlorométhane pendant une durée de 15 min (ii) centrifugation à 1800 g pendant 2 min, (iii) filtration du surnageant sur du coton préalablement nettoyé par 5 mL de méthanol et 5 mL de dichlorométhane, (iv) réextraction une seconde fois du pollen dans les mêmes conditions, (v) addition des deux filtrats, (vi) évaporation de la solution à sec sous flux d'azote et finalement (vii) solubilisation du produit sec concentré dans 50  $\mu$ L de DCM et 50  $\mu$ L de BSTFA-TMCS ((N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacetamide), TMCS (triméthylchlorosilane)). Chaque échantillon est extrait et analysé trois fois afin de vérifier la répétabilité de l'extraction des lipides du pollen.

Les étapes de l'extraction de la fraction lipidique externe ont été ensuite optimisées : nature du solvant utilisé, durée d'extraction, avec ou sans ultrasons, centrifugation... Ces différentes étapes d'optimisation ont été testées sur les grains de pollen de fléole des prés.

Nous avons choisi premièrement de tester les effets de l'agitation par ultrasons sur l'extraction de la fraction lipidique. La nouvelle étape optimisée consiste à laver les grains de pollen par un volume de 5 mL de solvant organique sans utiliser d'assistance par sonication. La comparaison entre les deux analyses chromatographiques des lipides extraits des pollens sans et avec ultrasons nous a permis de conclure qu'elles possèdent le même profil de composés organiques extraits. On a donc choisi par la suite d'extraire la fraction lipidique externe par la méthode de lavage.

Différents solvants organiques ont été testés afin de choisir le solvant qui a le plus fort pouvoir d'extraction et une bonne répétabilité d'extraction. La figure II.3 représente les chromatogrammes obtenus en GC-FID des extraits des grains de pollen de fléole des prés par les trois solvants organiques : dichlorométhane, cyclohexane et hexane. Le dichlorométhane est un solvant moyennement polaire alors que les deux autres solvants sont apolaires. Les axes verticaux et horizontaux représentent respectivement les intensités en  $\mu$ V et les temps de rétention en minutes en GC-FID. Les pics représentés sur chacun des trois chromatogrammes représentent les espèces organiques extraites de la fraction lipidique externe. La concentration massique de chaque composé

est proportionnelle à l'aire de son pic correspondant. Les trois chromatogrammes représentés sur la figure II.3 montre la similarité des profils lipidiques. On observe donc que les trois solvants permettent l'extraction des mêmes composés mais à des concentrations massiques différentes.

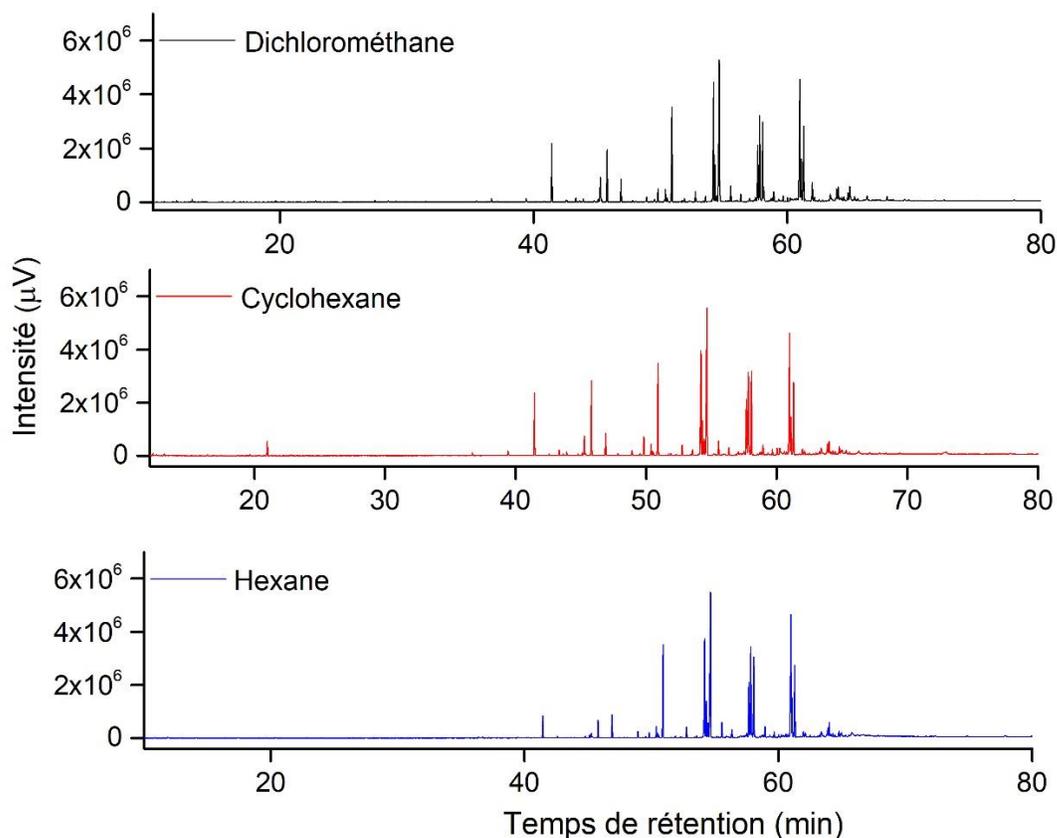


Figure II. 3: Chromatogrammes (GC-FID) des lipides extraits des grains de pollen de fléole des prés par les trois différents solvants organiques: dichlorométhane, cyclohexane et hexane.

Afin de choisir le solvant organique qui possède le meilleur pouvoir d'extraction, nous avons choisi de comparer la somme des aires des pics élués entre le temps 10 et 80 min sur les chromatogrammes représentés sur la figure II.3. Cette somme est donc proportionnelle à la masse des lipides totaux extraits d'une masse de 50 mg de pollen. Les sommes totales des aires des pics représentés sur chacun des trois chromatogrammes de la figure II.3 sont égales respectivement à 30401 mV.min, 28824 mV.min, et 2450 mV.min selon les données représentées sur la figure II.4. La comparaison de ces trois sommes montre que les lipides du pollen sont plus extractibles par le dichlorométhane que par le cyclohexane et l'hexane. Ceci est expliquée par le fait que la majorité des espèces organiques présentes dans la fraction lipidique externe sont moyennement polaires ce qui a rendu leur extraction plus importante par le dichlorométhane que par les deux autres solvants qui sont plus apolaires.

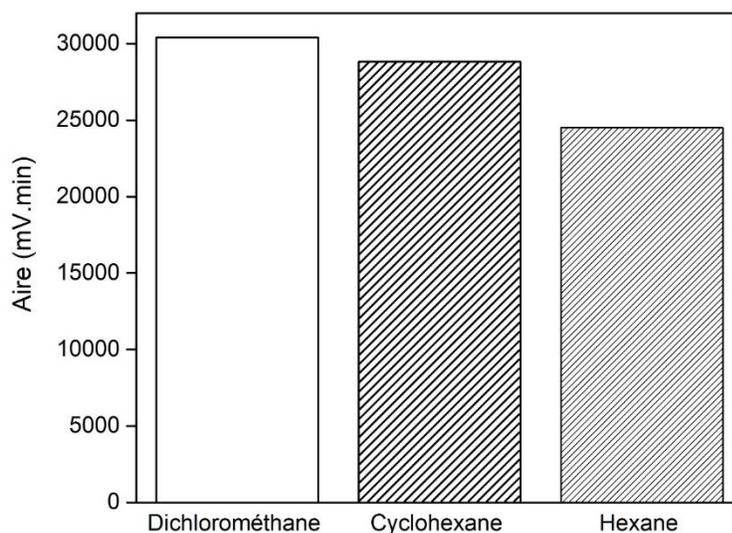


Figure II. 4: Sommes totales des aires des pics pour chacun des trois chromatogrammes représentés sur la figure II.3.

Les extractions de la fraction lipidique par chacun des trois solvants organiques ont été répétées trois fois afin de choisir celui qui permet d'obtenir une meilleure répétabilité. Parmi les trois solvants organiques utilisés, le dichlorométhane a favorisé la meilleure répétabilité.

Un dernier test a été effectué pour vérifier si la totalité des lipides du pollen a été extraite après un lavage par le dichlorométhane. La masse de 50 mg de pollen extraite par 5 mL de dichlorométhane a été séchée sous flux et ensuite réextraite deux fois par le même volume de solvant organique.

La figure II.5 représente respectivement les trois chromatogrammes des lipides du pollen de fléole des prés extraits successivement trois fois par le DCM. La comparaison de ces trois profils lipidiques nous a permis de supposer que :

- Le premier lavage des grains de pollen par le solvant organique a favorisé l'extraction des espèces organiques localisées dans la fraction lipidique du revêtement pollinique (**Cf. partie 2.2. du chapitre I**).
- Les deux autres lavages qui suivent ont favorisé l'extraction des espèces organiques qui sont plus en profondeur et qui n'ont pas été accessibles par le premier lavage.

Dans notre travail on a choisi d'étudier la composition des lipides qui sont extraits après le premier lavage par le solvant organique car ces lipides seront en contact avec les polluants gazeux durant le transport des grains de pollen dans l'atmosphère.

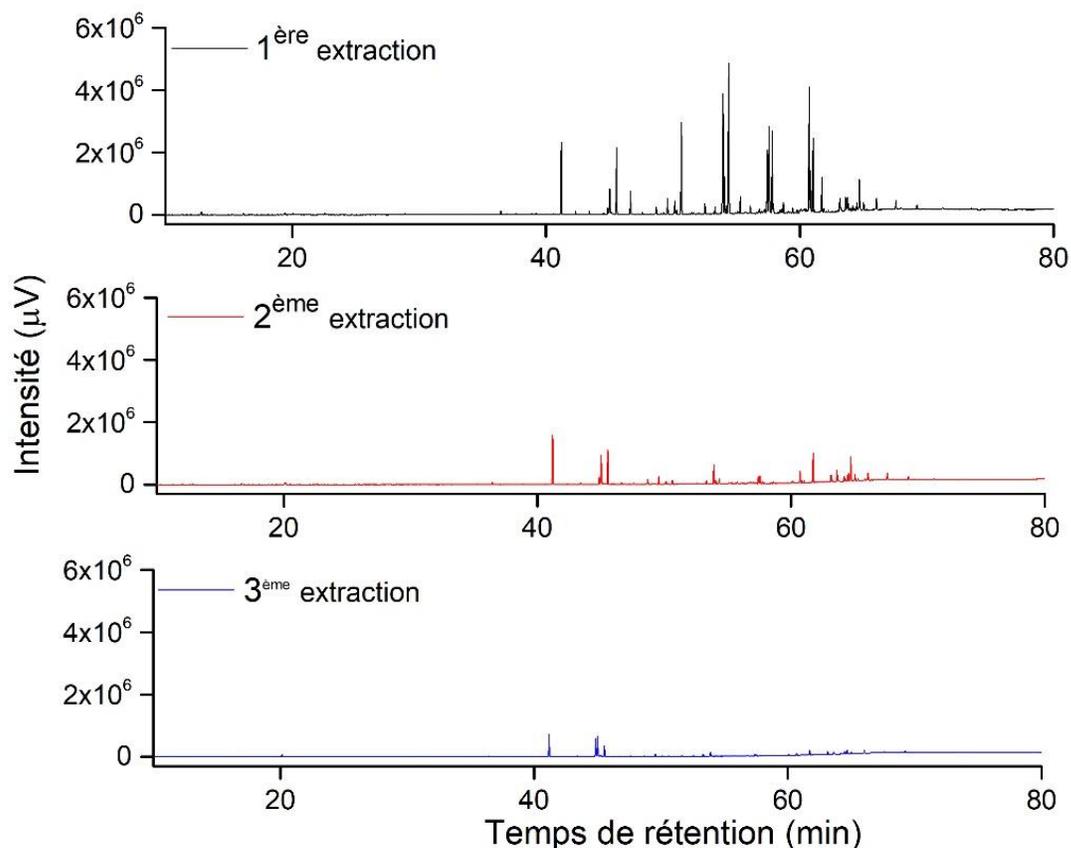


Figure II. 5: Chromatogrammes (GC-FID) représentant une comparaison du profil lipidique des pollens de fléole des prés lors de trois extractions successives par le dichlorométhane.

Finalement, la nouvelle méthode d'extraction mise au point consiste à extraire 50 mg de pollen par un volume de 5 mL de DCM et ensuite les filtrer sur du coton préalablement nettoyé par le MeOH et le DCM. Le temps de contact entre le pollen et le solvant est de cinq minutes. L'extrait organique est ensuite évaporé sous flux d'azote jusqu' à obtenir un résidu sec. L'étape finale consiste à solubiliser le résidu sec dans 50 µL de DCM et 50 µL de BSTFA-TMCS.

L'ajout de BSTFA (N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide) et de TMCS (triméthylchlorosilane) (99-1 %) a pour effet de remplacer les hydrogènes liés à un oxygène dans les familles des composés organiques (alcools, acides carboxyliques et des phénols) par un groupement de triméthylsilane (-

Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). Le but de cette silylation est de rendre ce type de composés plus volatils et thermiquement plus stables afin de d'améliorer leur détection en chromatographie.

### 5.3 Extraction en phase aqueuse

Pour mieux s'approcher des conditions physiologiques, les grains de pollen ont été extraits par une solution aqueuse : le tampon phosphate salin (souvent abrégé PBS, de l'anglais Phosphate Buffered Saline).

Les étapes de l'extraction des grains de pollen par le PBS ont été optimisées afin d'obtenir des extractions répétables. Tout d'abord les grains de pollen ont été mis en suspension avec le PBS : (i) en présence d'une agitation douce et (ii) sans aucune agitation pendant 22h. Les analyses en chromatographie de leurs extraits ont montré une très faible extraction des composés lipidiques.

Pour faciliter les extractions des espèces organiques en phase aqueuse, les grains de pollen ont été mis en suspension dans une solution de PBS en présence d'une agitation par barreau aimanté (agitation mécanique) à une vitesse de 1000 tours/min pendant 2 h.

Les étapes de l'extraction des grains de pollen par le PBS sont les suivants : (i) 50 mg des grains de pollen mis en suspension dans 2 mL de PBS en présence d'une agitation mécanique pendant 2h, (ii) centrifugation à 1800 g pendant 2 min, (iii) filtration du surnageant sur du coton préalablement nettoyé par 5 mL de méthanol et 5 mL de dichlorométhane , (iv) extraction liquide-liquide (PBS-DCM) par ajout de 2 mL de DCM dans le vial contenant la solution de PBS filtré et agitation manuelle pendant 2 min, (v) centrifugation à 1800 g pendant 2 min et ensuite récupération de la phase organique et filtration sur du coton.

L'étape de l'extraction liquide-liquide (iv) a été répétée trois fois afin de transférer au maximum les lipides extractibles par le PBS dans le dichlorométhane. Après cette étape, l'évaporation du solvant organique récupéré se fait sous flux d'azote avant de finalement solubiliser le produit sec concentré contenant les composés organiques dans 50 µL de DCM et 50 µL de BSTFA-TMCS.

## 6. Analyses chromatographiques

Dans cette étude, la chromatographie en phase gazeuse (GC) couplée à un détecteur à ionisation de flamme (FID) (Perkin Elmer Clarus 580) et à un spectromètre de masse (MS) (Perkin Elmer Clarus 680-600C) a été utilisée respectivement pour les analyses de quantification et d'identification de la fraction lipidique extraite des pollens de fléole des prés et de bouleau.

Les conditions de la chromatographie en phase gazeuse sont les suivantes : volume d'injection 1  $\mu\text{L}$  avec un split de (10 :1), colonne initialement à 50°C pendant 1 min ensuite chauffée à 4°C/min pour obtenir un palier à 310°C de 19 min à la fin de l'analyse, débit de gaz vecteur d'hélium 1 mL/min, température d'injecteur 250 °C, durée totale de l'analyse 85 min. La colonne utilisée est de type HP5 (Crossbond 5% diphenyl- 95% dimethyl polysiloxane) de longueur de 30 m, diamètre 250  $\mu\text{m}$  et épaisseur de la phase stationnaire de 0,25  $\mu\text{m}$ .

Pour les conditions du détecteur FID : température de 300 °C, débit d'hydrogène de 40 mL/min et celui de l'air de 400 mL/min.

Le spectromètre de masse de type quadripolaire est utilisé en mode SCAN permettant un balayage d'une gamme de masse  $m/z$  allant de 45 à 500 d'une durée de 0,2 s. L'ionisation se fait par un impact électronique de 70 eV.

L'identification des composés de la fraction lipidique extractible est basée sur la comparaison avec la base de données de spectres de masse NIST et / ou sur la comparaison des temps de rétention des standards utilisés et / ou sur la base de l'étude des spectres de masse.

### ***Quantification des composés***

Les composés organiques ont été quantifiés 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 ne nécessite que le calibrage du détecteur du chromatographe pour une série d'alcane. Dans notre étude, nous avons étalonné les alcanes de 8 à 40 atomes de carbone dans des gammes de concentrations massiques de 6 à 36  $\mu\text{g/g}$ .

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

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

Pour les acides insaturés ( $\alpha$ -linoléique et linoléique), leur concentration a été calculée à partir de droites d'étalonnages réalisées à partir de solutions diluées de ces deux composés.

Afin de quantifier par pesée la quantité des lipides totaux, nous avons choisi d'extraire 1 g de grains de pollen de fléole des prés et de bouleau par le DCM selon la même procédure décrite dans la **partie 5.2**. L'utilisation d'une masse aussi élevée a permis de peser le résidu sec après évaporation du solvant. Par cette méthode, nous avons déterminé les masses totales de lipides extraits par gramme de pollen.

Les blancs des expériences sont préparés suivant le même protocole d'extraction en phase organique et aqueuse mais sans pollen. La quantité totale extraite des espèces organiques détectées dans les blancs sont négligeables par rapport à celles du pollen. Leurs valeurs ont été soustraites des quantités extraites des grains de pollen.

## 7. Dosage des protéines totales

Ces études ainsi que celles sur le rôle des lipides durant la réponse inflammatoire ont impliqué des collaborations avec Patricia de Nadaï (Maître de conférences, Centre d'Infection et d'Immunologie de Lille, Université de Lille, Institut Pasteur de Lille, INSERM, CNRS).

Nous avons entamé durant ce travail des études sur la modification des taux des protéines totales extraits des grains de pollen de fléole des prés fournis par Pharmallerga (**Cf. partie 2.1**) en fonction de leur exposition aux polluants gazeux.

La méthode de dosage des taux de protéines totales a consisté à mettre en suspension une masse de 10 mg de pollen dans 1 ml de PBS sous agitation mécanique pour une durée de 2h. Les extraits ont ensuite été centrifugés à 1800 g. Les surnageants ont été récupérés après filtration sur des filtres à seringues de cellulose régénérées avec une taille de pores de 0,45  $\mu\text{m}$ . Le dosage des protéines a été fait par un dosage colorimétrique des protéines avec le kit BCA Protein Assay kit (Thermo, scientifique) selon les recommandations du fabricant.

### 8. Observation microscopique électronique à balayage et optique

Les images microscopiques des grains de pollen ont été effectuées par notre collègue du LASIR Marie Choël. Les grains de pollen de fléole des prés selon les différents traitements subis (intacts, extrait par le DCM, pollués *in vitro* à l'ozone et broyés mécaniquement) ont été observés en microscopie électronique à balayage (MEB). La méthode de préparation pour leur observation en MEB est la suivante : le pollen a été prélevé sur une pointe de spatule puis saupoudré sur pastille adhésive de carbone montée sur plot porte-objet de microscopie. Les échantillons ont ensuite été métallisés à l'or. Les observations ont été effectuées par MEB (Hitachi, modèle FlexSEM 1000) avec une tension d'accélération de 5 kV.

Seuls les grains de pollen de fléole des prés extraits par le PBS ont été observés en microscopie optique parce que l'observation des extraits aqueux n'était pas possible en microscopie électronique. Une masse de 50 mg de pollen de fléole des prés a été introduite dans 2 mL de solution de PBS et ensuite mélangée pendant 2 h par agitation mécanique (**CF. partie 5.3**). Un volume de 500  $\mu\text{L}$  de ce mélange a été transféré dans une cellule à liquide pour l'observation par microscopie optique.

## 9. Références bibliographiques

- Bashir, M.E.H., Lui, J.H., Palnivelevu, 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.
- Behrendt, H., Tomczok, J., Sliwa-Tomczok, W., Kasche, A., Ebner von Eschenbach, C., Becker, W.M., Ring, J., 1999. Timothy Grass (*Phleum pratense* L.) Pollen as Allergen Carriers and Initiators of an Allergic Response. *Int Arch Allergy Immunol* 118, 414–418.
- Evans, D.E., Taylor, P.E., Singh, M.B., Knox, R.B., 1991. Quantitative Analysis of Lipids and Protein from the Pollen of *Brassica napus* L. *Plant Science* 73, 117–126.
- 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.
- 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.
- Rejón, J., Delalande, F., Schaeffer-Reiss, C., Alché, J., Rodríguez-García, M., Van Dorsselaer, A., Castro, A., 2016. The Pollen Coat Proteome: At the Cutting Edge of Plant Reproduction. *Proteomes* 4, 5.
- Scanlon, J.T., Willis, D.E., 1985. Calculation of Flame Ionization Detector Relative Response Factors Using the Effective Carbon Number Concept. *J Chromatogr Sci* 23, 333–340.



*Nous avons vu dans la revue de la littérature présentée dans le premier chapitre, que non seulement les allergènes du pollen sont les facteurs qui agissent lors du mécanisme d'une réaction allergique mais qu'intervient également la fraction lipidique pollinique. Il est donc important de connaître la composition chimique de cette fraction lipidique et aussi la façon dont celle-ci peut être modifiée par des polluants atmosphériques gazeux. La connaissance du vieillissement atmosphérique du grain de pollen allergisant est cruciale afin de comprendre les impacts potentiels de la pollution atmosphérique sur la santé des sujets allergiques.*

*Dans un premier temps, nous avons réalisé des études d'identification et de quantification des espèces organiques extraites par des solvants organiques et aqueux de la fraction lipidique des grains de pollen de la fléole des prés et du bouleau (chapitre III). Ensuite, nous nous sommes intéressés à étudier leurs modifications chimiques induites par une exposition in vitro à l'ozone et au dioxyde d'azote (chapitre IV). Les études de vieillissement atmosphérique du pollen ont impliqué également des travaux préliminaires concernant le dosage de ses quantités de protéines totales (chapitre IV).*

*Dans un second temps, nous avons identifié et quantifié les lipides internes qui sont facilement libérés du contenu cytoplasmique du grain de pollen après sa cassure par la technique de broyage mécanique. Ce travail nous a permis d'identifier les espèces organiques qui pourraient jouer un rôle important dans l'aggravation des réactions allergiques et asthmatiques après la rupture des grains de pollen de fléole et de bouleau dans l'environnement (chapitre V). Enfin nous nous sommes intéressés à étudier la modification des espèces chimiques internes des grains de pollen de fléole des prés par une exposition in vitro à l'ozone (chapitre V).*



# Chapitre III

Étude de la fraction lipidique du pollen



<b>1. Identification des espèces organiques extraites de la fraction lipidique externe du pollen par le dichlorométhane .....</b>	<b>100</b>
1.1 Pollen de fléole des prés .....	100
1.1.1 Observation en microscopie électronique à balayage des grains de pollen intacts et extraits par le dichlorométhane .....	102
1.1.2 Identification et quantification des lipides externes.....	103
1.2 Pollen de bouleau .....	108
1.3 Discussion et conclusion.....	113
<b>2. Identification des espèces organiques extraites de la fraction lipidique du pollen par le PBS ..</b>	<b>116</b>
2.1 Pollen de fléole des prés .....	116
2.1.1 Identification et quantification des lipides.....	116
2.1.2 Observation en microscopie optique des extraits aqueux du pollen.....	120
2.2 Pollen de bouleau .....	121
2.3 Discussion.....	124
2.3.1 Comparaison des extraits aqueux et organique du pollen.....	124
2.3.2 Comparaison avec la littérature .....	126
2.4 Conclusion.....	128
<b>3. Références bibliographiques.....</b>	<b>131</b>

## 1. Identification des espèces organiques extraites de la fraction lipidique externe du pollen par le dichlorométhane

Dans cette partie, nous exposons les travaux qui ont conduit à l'identification et la quantification des espèces organiques extraites par un solvant organique le dichlorométhane (DCM) des lipides externes des pollens de fléole des prés et de bouleau.

### 1.1 Pollen de fléole des prés

Les grains de pollen de fléole des prés (*Pbleum pratense*) ont été commandés chez plusieurs fournisseurs. Dans un premier temps, la composition de leur fraction lipidique externe a été comparée selon le lieu et la date de récolte de ces différents fournisseurs. Les chromatogrammes de la figure III.1 représentent les analyses en GC-FID des lipides externes extraits par le DCM des grains de pollen récoltés en trois endroits différents (année de récolte notées entre parenthèses) : (a) République tchèque, Bohème du Sud (2007), (b) États-Unis, Minnesota, (2014) et (c) République tchèque, Moravie du Sud (2016). Les axes verticaux des chromatogrammes représentent les intensités des pics chromatographiques en  $\mu\text{V}$  et les axes horizontaux représentent les temps de rétention en minutes. Chacun des trois chromatogrammes comporte environ 330 pics élués entre les temps 10 et 80 min. Chaque pic sur le chromatogramme représente (au moins) un composé organique extrait de la fraction lipidique externe du pollen. Les pics des solvants 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 trois chromatogrammes de la figure III.1, les extraits organiques des grains de pollen de fléole des prés récoltés à plusieurs endroits et à différentes dates possèdent des profils lipidiques extractibles semblables.

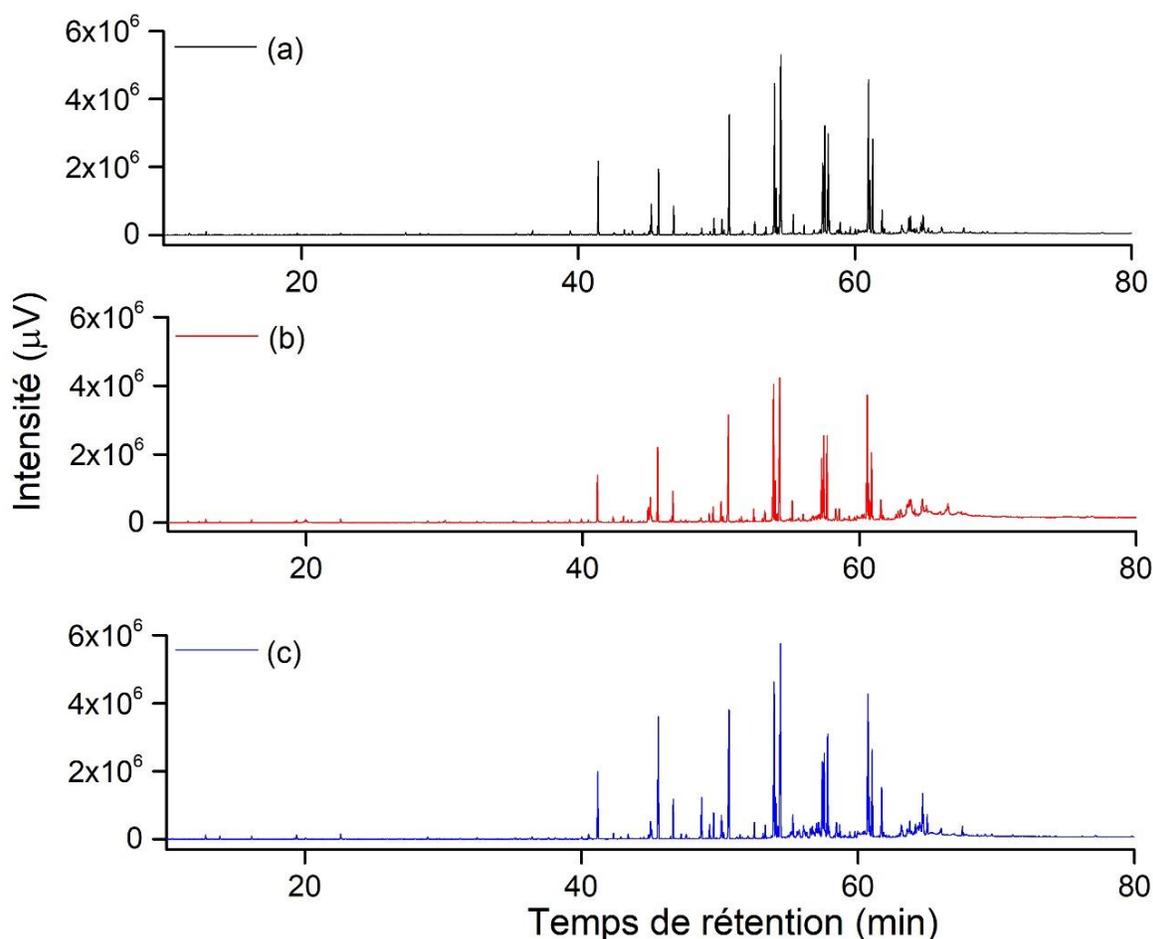


Figure III. 1: Chromatogrammes (GC-FID) des lipides externes extraits des grains de pollen de fléole des prés intacts récoltés à des dates et des endroits différents (a) République tchèque, Bohême du Sud (2007), (b) États-Unis, Minnesota, (2014) et (c) République tchèque, Moravie du Sud (2016).

Le tableau III.1 permet de comparer la somme des aires des pics des trois chromatogrammes entre les temps 10 et 80 min. Cette somme est proportionnelle à la concentration massique totale des lipides extraits de chacun des trois pollens. Les expériences d'extraction ont été répétées trois fois afin de vérifier la reproductibilité, l'écart entre les aires totales est de 16%. La moyenne des sommes des aires des pics représentés sur ces trois chromatogrammes est égale à  $28456 \pm 3673$  mV.min. La somme des aires des pics de chacun des trois chromatogrammes est donc sensiblement différente. Les pics sur le chromatogramme représentant les lipides extraits des pollens provenant de la Moravie de Sud (chromatogramme (c) sur la figure III.1) possèdent la somme des aires la plus importante. Cette comparaison nous a permis de supposer que les pollens de fléole des prés récoltés à plusieurs endroits et à différentes dates possèdent des espèces chimiques similaires mais à des concentrations massiques légèrement différentes.

Lieux et dates de récolte du pollen de Fléole des prés	Bohème du Sud (2007)	Minnesota (2014)	Moravie du Sud (2016)	Moyenne de la somme des aires
Somme des aires (mV.min)	27561	24783	33026	28456±3673

Tableau III. 1: Comparaison entre les sommes des aires des pics élués entre les temps 10 et 80 min sur les trois chromatogrammes représentant les lipides extraits des grains de pollen de fléole des prés récoltés à plusieurs endroits et à différentes dates (figure III.1).

### 1.1.1 Observation en microscopie électronique à balayage des grains de pollen intacts et extraits par le dichlorométhane

Dans la littérature, plusieurs auteurs ont fourni des images microscopiques des grains de pollen lavés par un solvant organique montrant une extraction de leurs revêtements polliniques (Bashir et al., 2013b; Rejón et al., 2016; Zinkl et al., 1999) (Cf. **figure I.5 du chapitre I**). Dans le but d'observer l'effet du solvant organique sur l'extraction de cette couche pollinique, les grains de pollen de fléole des prés extraits par le dichlorométhane ont été séchés sous flux d'azote et ensuite observés en microscopie électronique à balayage. Les deux images (a) et (b) sur la figure III.2 représentent respectivement le grain de pollen intact et celui extrait par le dichlorométhane. Le pollen intact est le pollen qui n'a subi aucun traitement dans le laboratoire. Les deux images du pollen sur la figure III.2 sont similaires. Les effets du solvant organique sur l'extraction du revêtement pollinique ne sont pas observables en microscopie électronique à balayage dans le cas de la fléole des prés. Cette conclusion a été vérifiée suite à l'observation d'un nombre important de grains de pollen.

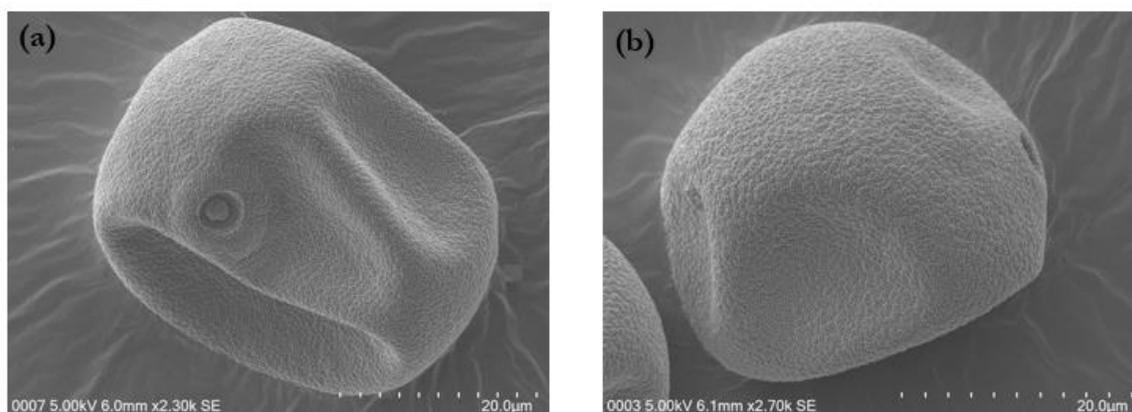


Figure III. 2: Images observées en microscopie électronique à balayage de grains de pollen de fléole des prés (a) intact et (b) extrait par le dichlorométhane.

### 1.1.2 Identification et quantification des lipides externes

Nous avons ensuite identifié et quantifié les espèces organiques extraites par le DCM des lipides externes. Les études de quantification et d'identification ont été faites sur les extraits organiques des grains de pollen provenant de la Bohême du Sud (pollen (a) sur la figure III.1). Ce lot de pollen fut historiquement acquis en premier au laboratoire. Les autres lots ont été acquis par la suite pour vérifier le caractère « universel » des extractions sur le pollen (a). Les espèces organiques identifiées dans sa fraction lipidique externe sont représentées sur la figure III.3. Seuls les pics qui ont des intensités importantes sur le chromatogramme ont été identifiés. Les stérols ont été également observés mais leur identification n'a pas été possible uniquement sur la base des spectres de masse (une injection de solutions étalons aurait été nécessaire pour obtenir les temps de rétention des stérols).

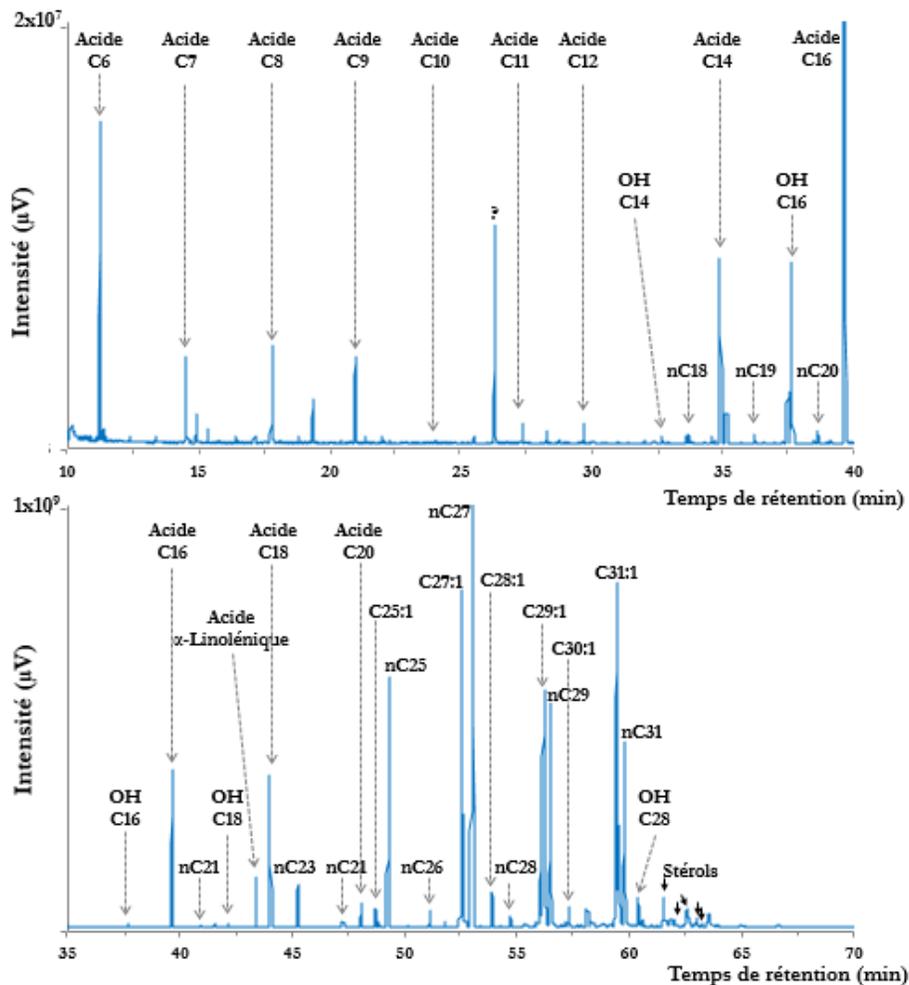


Figure III. 3: Chromatogramme (GC-FID) des espèces organiques identifiées dans les lipides externes extraits par le dichlorométhane du pollen de fléole des prés provenant de la Bohême du sud. Les espèces organiques sont représentées par les abréviations suivantes ( $x$  nombre d'atomes de carbone) : acides gras saturés (Acide  $C_x$ ), alcènes ( $C_x:1$ ), alcools (OH  $C_x$ ) et alcanes ( $nC_x$ ).

Les six familles de composés organiques identifiés et quantifiés dans la fraction lipidique externe de ce pollen sont les suivantes : les alcanes, les alcènes, les acides monocarboxyliques (saturés et insaturés), les aldéhydes et les alcools (stérols non quantifiés). La figure III.4 représente leurs concentrations massiques totales en  $\text{ng.mg}^{-1}$  de pollen selon leur abondance dans les lipides externes.

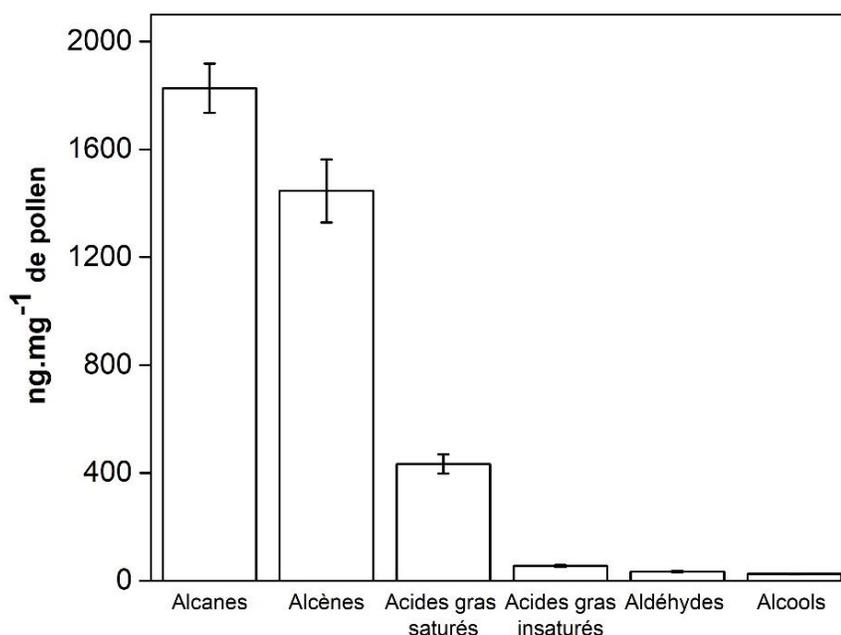


Figure III. 4: Concentrations massiques en  $\text{ng.mg}^{-1}$  de pollen des six familles organiques identifiées dans les lipides externes extraits par le dichlorométhane du pollen de fléole des prés.

Au total, 50 composés organiques ont été identifiés dans la fraction lipidique externe extraite par le DCM. Leurs concentrations massiques respectives sont représentées dans le tableau III.2. Chaque valeur de concentration massique a été calculée à partir de trois extractions distinctes. Les masses de lipides extraits lors des analyses de contrôle de contamination (extractions sans pollen) étaient négligeables par rapport à celles du pollen.

La masse totale de chaque famille organique extraite des lipides externes est la suivante :  $1828 \pm 105$   $\text{ng.mg}^{-1}$  pour les alcanes (13 composés),  $1445 \pm 118$   $\text{ng.mg}^{-1}$  pour les alcènes (7 composés),  $434 \pm 46$   $\text{ng.mg}^{-1}$  pour les acides gras saturés (19 composés),  $55 \pm 5$   $\text{ng.mg}^{-1}$  pour les acides gras insaturés (2 composés),  $33 \pm 6$   $\text{ng.mg}^{-1}$  pour les aldéhydes (6 composés) et  $26 \pm 3$   $\text{ng.mg}^{-1}$  pour les alcools (3 composés).

La somme des masses des composés identifiés dans le pollen de fléole des prés atteint une masse équivalente en alcanes de  $3,8 \pm 0,3$   $\text{mg.g}^{-1}$ . Afin d'estimer le pourcentage des lipides identifiés, 1 g de

pollen a été extrait et le résidu sec d'extraction a été pesé. La masse totale des lipides extraits a été déterminée de la sorte à  $21 \pm 1$  mg. L'ensemble des lipides identifiés et quantifiés dans notre travail représente donc environ 18% de la totalité des lipides extraits (3,8 mg quantifiés pour 21 mg extrait d'un gramme de pollen).

La fraction lipidique externe de ce pollen contient une masse importante d'alcane. L'identification est remarquable pour une série d'alcane de nombre impair de carbone C23, C25, C27, C29 et C31. Le C27 est l'alcane le majoritairement extrait avec une masse de  $656 \pm 3$  ng.mg<sup>-1</sup>. La deuxième famille organique la plus extraite en phase organique est celle des alcènes de masse totale de  $1445 \pm 118$  ng.mg<sup>-1</sup>. Les deux alcènes de nombre impair de carbone C27 et C31 sont les plus abondants.

Les acides gras saturés sont compris entre le C5 et le C28 avec une extraction importante des deux acides C16 et C18. Seulement deux acides insaturés ont été identifiés l'acide 9,12-octadécadiénoïque (linoléique, C18:2) et l'acide 9,12,15-octadécatriénoïque ( $\alpha$ -linoléique, C18:3). La fraction lipidique pollinique de la fléole des prés contient une masse plus importante de l'acide  $\alpha$ -linoléique ( $52 \pm 4$  ng.mg<sup>-1</sup>) que l'acide linoléique ( $3 \pm 1$  ng.mg<sup>-1</sup>). Les deux dernières familles qui sont présentes en faibles quantités sont celles des alcools et des aldéhydes. Au total trois alcools et six aldéhydes ont été identifiés dans les lipides externes.

Nos identifications des espèces organiques extraites du pollen de fléole de prés sont comparées dans la dernière colonne du tableau III.2 avec l'étude de Bashir et al. (Bashir et al., 2013a) qui est la seule étude disponible à notre connaissance dans la littérature portant sur l'identification de ces familles pour le pollen de fléole des prés. Il est à noter que dans l'étude de Bashir et al. les lipides ne sont pas quantifiés, seules sont fournies les aires chromatographiques relatives.

	T <sub>R</sub> GC/FID (min)	Masse (ng.mg <sup>-1</sup> de pollen)		
		Formules brute:	Intact	Référence
<b>ALCANES</b>				
Heptadécane	32,6	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	5 ±1	
Nonadécane	37,8	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub>	3 ±1	
Hénéicosane	42,5	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub>	9 ±14	
Docosane	44,8	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub>	5 ±1	
Tricosane	46,8	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub>	78 ±9	Bashir
Tétracosane	48,9	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub>	19 ±3	Bashir
Pentacosane	50,8	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub>	338 ±21	Bashir
Hexacosane	52,7	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub>	38 ±4	Bashir
Heptacosane	54,6	C <sub>27</sub> H <sub>56</sub>	656 ±3	Bashir
Octacosane	56,3	C <sub>28</sub> H <sub>58</sub>	28 ±3	Bashir
Nonacosane	58,3	C <sub>29</sub> H <sub>60</sub>	317 ±21	Bashir
Triacotane	59,6	C <sub>30</sub> H <sub>62</sub>	21 ±2	Bashir
Hentriacotane	61,2	C <sub>31</sub> H <sub>64</sub>	311 ±22	Bashir
Masse totale			1828 ±105	
<b>ALCÈNES</b>				
Décène	27,5	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub>	5 ±1	
Pentacosène	50,4	C <sub>25</sub> H <sub>50</sub>	41 ±6	Bashir
Heptacosène	54,2	C <sub>27</sub> H <sub>54</sub>	464 ±47	
Octacosène	56,2	C <sub>28</sub> H <sub>56</sub>	58 ±8	
Nonacosène	57,3	C <sub>29</sub> H <sub>58</sub>	297 ±18	Bashir
Triacotène	59,0	C <sub>30</sub> H <sub>60</sub>	39 ±7	
Hentriacotène	60,9	C <sub>31</sub> H <sub>62</sub>	541 ±31	
Masse totale			1445 ±118	
<b>ALDÉHYDES</b>				
Nonanal	14,1	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	1 ±1	
Octadécanal	40,8	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O	3 ±1	
Eicosanal	45,3	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	5 ±1	
Hénéicosanal	47,5	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O	5 ±1	
Docosanal	49,6	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O	10 ±1	
Tétracosanal	53,4	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O	9 ±1	
Masse totale			33 ±6	
<b>ALCOOLS</b>				
Hexadécanol	39,4	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O	12 ±1	
Octadécanol	43,8	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> O	6 ±1	
Docosanol	51,8	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> O	8 ±1	
Masse totale			26 ±3	

Tableau III. 2: Concentrations massiques des espèces organiques identifiées et quantifiées après extraction par le dichlorométhane du pollen de fléole des prés intact. Comparaison des identifications avec la littérature (Bashir et al., 2013a).

	T <sub>R</sub> GC/FID (min)	Masse (ng.mg <sup>-1</sup> de pollen)		
		Formules brutes	Intact	Référence
<b>ACIDES GRAS SATURÉS</b>				
Acide Pentanoïque	9,9	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	1 ±1	
Acide Hexanoïque	13,0	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	6 ±1	
Acide Heptanoïque	16,3	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	3 ±1	
Acide Octanoïque	19,7	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	3 ±1	
Acide Nonanoïque	22,8	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	4 ±1	
Acide Décanoïque	25,2	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	1 ±1	
Acide Undécanoïque	29,1	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	2 ±1	
Acide Dodécanoïque	31,5	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	2 ±1	
Acide Tétradécanoïque	36,5	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	10 ±1	Bashir
Acide Pentadécanoïque	38,9	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	1 ±1	Bashir
Acide Hexadécanoïque	41,4	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	160 ±13	Bashir
Acide Heptadécanoïque	43,6	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	3 ±1	Bashir
Acide Octadécanoïque	45,7	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	159 ±16	
Acide Nonadécanoïque	47,7	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	5 ±1	Bashir
Acide Eicosanoïque	49,8	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	41 ±1	Bashir
Acide Hénéicosanoïque	51,7	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	8 ±1	
Acide Docosanoïque	53,5	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	16 ±1	Bashir
Acide Tétracosanoïque	57,0	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	5 ±1	
Acide Octacosanoïque	64,3	C <sub>28</sub> H <sub>58</sub> O <sub>2</sub>	4 ±1	
<b>Masse totale</b>			<b>434 ±46</b>	
<b>ACIDES GRAS INSATURÉS</b>				
Acide α-Linoléique	44,7	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	3 ±1	Bashir
Acide Linoléinique	45,0	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	52 ±4	Bashir
<b>Masse totale</b>			<b>55 ±5</b>	

Tableau III. 3: Concentrations massiques des espèces organiques identifiées et quantifiées après extraction par le dichlorométhane du pollen de fléole des prés intact. Comparaison des identifications avec la littérature (Bashir et al., 2013a).

Bashir et al. ont identifié plusieurs familles de composés organiques dans les lipides externes du pollen de fléole des prés parmi lesquelles : des alcanes (10 composés), des alcènes (3 composés), des acides monocarboxyliques saturés (7 composés) et insaturés (5 composés), des acides dicarboxyliques (4 composés), les alcools saturés et insaturés (2 composés) (Bashir et al., 2013a). La comparaison des deux études montre que sur les 50 composés organiques identifiés dans les lipides externes, 20 au total ont été confirmés dans l'étude de Bashir et al. (ces espèces représentent environ 70 % de la masse identifiée dans notre étude et confirmée par Bashir). Nous avons trouvé 30 composés en plus des identifications réalisées par Bashir et al. pour les six familles d'espèces organiques représentées dans le tableau III.2. Par contre Bashir et al. ont identifié en plus 18 composés appartenant aux familles des alcanes, acides monocarboxyliques insaturés, acides dicarboxyliques, alcools, terpènes, stérols et autres (l'acide benzoïque, le glucitol, l'arabinitol et l'acide phosphorique). Ces espèces non confirmées dans

notre étude correspondent à environ 30% des aires totales de l'étude de Bashir. Parmi ces 18 composés, quatre d'entre eux (acide buténedioïque, acide propanetricarboxylique, heptacosanol et stigmastérol) représentent 29% des aires totales. Les spectres de masse de ces espèces ont été recherchés dans nos chromatogrammes. Pour les 14 espèces minoritaires, elles ont des concentrations trop faibles pour être confirmées dans notre analyse. Parmi les 4 majoritaires, l'acide buténedioïque et l'acide propanetricarboxylique ont des temps de rétention probablement inférieurs à 10 minutes dans nos conditions chromatographiques. Le stérol n'a pas pu être identifié. Quant à l'heptacosanol, il est surprenant de ne pas confirmer cette identification mais le résultat de la recherche de son spectre de masse dans nos données est clairement négatif.

Pour terminer la comparaison avec la littérature, notre étude présente : une série pour les alcènes continue dans notre étude (C25 à C31) et discontinue pour Bashir (C25, 26 et C29), une série pour les acides gras continue dans notre étude (C5 à C28) et discontinue pour Bashir (C14 à 17, C19-20 et C22), une série d'aldéhydes continue dans notre étude (C9 à C24) et pas d'identifications pour Bashir, une série d'alcools paire dans notre étude (C16, 18 et 22) non confirmée par Bashir (C17).

## 1.2 Pollen de bouleau

Le pollen de bouleau a été récolté sur le campus cité scientifique de l'université de Lille en 2017. Son protocole d'extraction par le dichlorométhane est le même que celui utilisé pour le pollen de fléole des prés. La figure III.5 représente le chromatogramme de ses lipides externes extraits par le DCM. Ce chromatogramme est caractérisé par la présence de huit grands pics qui ont une intensité de plus de  $2 \times 10^6$   $\mu\text{V}$  parmi les 197 pics représentés.

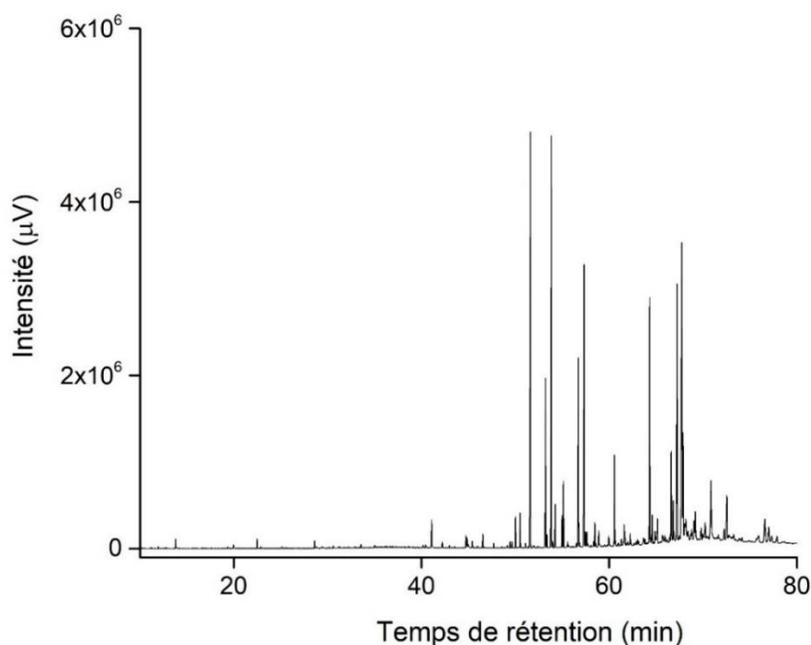


Figure III. 5: Chromatogramme (GC-FID) des lipides externes extraits par le dichlorométhane du pollen de bouleau intact.

La fraction lipidique externe du pollen de bouleau comporte les mêmes familles d'espèces chimiques que dans les lipides du pollen de fléole des prés (figure III.6). La fraction lipidique extractible du pollen de bouleau comporte une masse importante de  $1655 \pm 167$  ng.mg<sup>-1</sup> d'alcènes (5 composés) et de  $1052 \pm 123$  ng.mg<sup>-1</sup> d'alcools (9 composés). Les masses des autres familles identifiées sont les suivantes:  $671 \pm 81$  ng.mg<sup>-1</sup> pour les acides gras saturés (13 composés),  $164 \pm 19$  ng.mg<sup>-1</sup> pour les alcanes (4 composés),  $30 \pm 5$  ng.mg<sup>-1</sup> pour les aldéhydes (4 composés) et  $19 \pm 3$  ng.mg<sup>-1</sup> pour les acides gras insaturés (2 composés). Au total 37 composés organiques ont été identifiés dans ses lipides externes. Leurs concentrations massiques représentées dans le tableau III.3 ont été calculées à partir d'une moyenne de trois extractions.

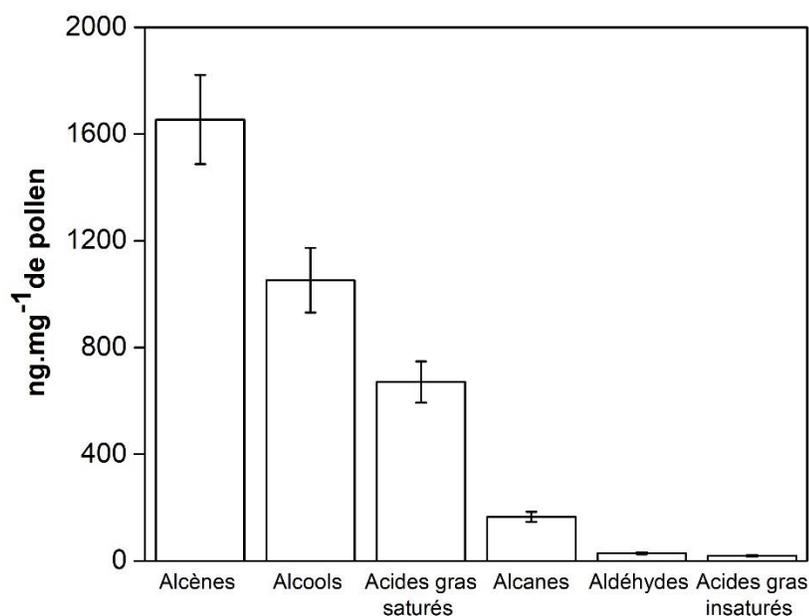


Figure III. 6: Concentrations massiques (ng.mg<sup>-1</sup>) de pollen des six familles organiques extraites par le dichlorométhane des lipides externes du pollen de bouleau.

La masse totale des composés identifiés dans le pollen de bouleau atteint une masse de  $3,6 \pm 0,4$  mg.g<sup>-1</sup>. La masse totale des lipides extraits d'un gramme de pollen est de  $27 \pm 1$  mg. L'ensemble des lipides identifiés et quantifiés dans notre travail représente donc environ 13% de la fraction extractible. À notre connaissance, deux études existent dans la littérature concernant l'identification de la fraction lipidique du pollen de bouleau (Bashir et al., 2013a; Henricsson et al., 1996). Les composés organiques identifiés dans ce travail sont comparés dans le tableau III.3 avec ceux identifiés dans la littérature.

Les alcènes de nombres de carbones impairs compris entre C23 et C31 ont été identifiés dans la fraction lipidique externe du pollen de bouleau. Les C27 ( $824 \pm 73$  mg.g<sup>-1</sup>) et C29 ( $596 \pm 62$  mg.g<sup>-1</sup>) sont les plus abondants parmi les alcènes extraits. L'abondance de ces alcènes et en particulier du C27 a déjà été confirmée par l'étude (Henricsson et al., 1996).

Les lipides externes extraits du pollen de bouleau sont aussi riches en alcools avec une masse totale de  $1052 \pm 123$  ng.mg<sup>-1</sup>. Neuf alcools saturés compris entre C16 et C28 ont été identifiés. L'abondance des alcools dans cette fraction lipidique externe est due à la présence du C22 en quantité importante de  $861 \pm 92$  ng.mg<sup>-1</sup>. L'extrait organique contient également des acides monocarboxyliques saturés

compris entre C6 et C26 parmi lesquels les C22 et C24 sont les plus abondants. Les acides monocarboxyliques insaturés le C18:2 ( $7\pm 1$  ng.mg<sup>-1</sup>) et C18:3 ( $12\pm 2$  ng.mg<sup>-1</sup>) ont été aussi détectés.

En comparant avec la littérature, au total sur les 37 composés organiques identifiés par notre étude, il y a 7 composés qui ont été confirmés par l'étude de Bashir et al. Une vingtaine de composés appartenant aux familles des acides gras saturés et insaturés, acides dicarboxyliques, alcanes, terpènes et stérols ont été identifiés dans l'étude de Bashir sans pouvoir être confirmé par nos données de spectrométrie de masse. La comparaison de nos identifications avec celles réalisées par Henricsson et al. montre que les cinq alcènes identifiés dans les lipides externes de nos pollens ont déjà été retrouvés par Henricsson et al. alors que sur les douze alcanes identifiés par Henricsson et al. il y a seulement quatre alcanes identifiés dans nos extraits organiques.

Les travaux d'identification des espèces chimiques extraites des pollens de bouleau récoltés en 2017 ont été comparés avec ceux publiés dans l'article Zhu et al. 2018 (Zhu et al., 2018). Ce travail est le résultat d'un encadrement d'un étudiant de master 2 qui a travaillé sur la modification par l'ozone de la fraction lipidique des grains de pollen de bouleau récoltés en 2016. Les deux pollens de bouleau, étudiés durant ces deux travaux, ont été récoltés de deux arbres différents sur le même campus. La masse totale des lipides extraits d'un gramme de ces deux pollens est égale à 27 mg. La masse des lipides identifiés après une extraction des 50 mg de pollens est respectivement égale à 3,5 mg.g<sup>-1</sup> pour le bouleau récolté en 2016 et de 3,6 mg.g<sup>-1</sup> pour celui récolté en 2017. La comparaison de leur composition chimique montre que les deux pollens possèdent des espèces chimiques similaires mais à des concentrations massiques légèrement différentes pour certains composés. Ces différences entre les deux pollens de bouleau récoltés en 2016 et 2017 sur deux arbres différents peuvent être expliquées par des facteurs climatiques et/ou atmosphériques.

Chapitre III. Etude de la fraction lipidique du pollen

T <sub>R</sub> GC/FID (min)	Masses (ng.mg <sup>-1</sup> de pollen)		
	Formules brutes	Intact	Références
<b>ALCÈNES</b>			
Décène	45,9	C <sub>23</sub> H <sub>46</sub>	4 ±1
Pentacosène	50,4	C <sub>25</sub> H <sub>50</sub>	52 ±4 Henricsson
Heptacosène	54,2	C <sub>27</sub> H <sub>54</sub>	824 ±73 Henricsson
Nonacosène	57,3	C <sub>29</sub> H <sub>58</sub>	596 ±62 Henricsson
Hentriacontène	60,9	C <sub>31</sub> H <sub>62</sub>	179 ±27 Henricsson
<b>Masse totale</b>			<b>1655 ±167</b>
<b>ALCOOLS</b>			
Hexadécanol	39,0	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O	1 ±1
Octadécanol	43,5	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O	2 ±1
Eicosanol	47,5	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> O	12 ±1
Hénécicosanol	49,6	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub> O	7 ±1
Docosanol	51,5	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> O	861 ±92
Tricosanol	53,3	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub> O	21 ±4
Tétracosanol	55,1	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> O	103 ±18
Hexacosanol	58,8	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> O	27 ±3
Octacosanol	61,6	C <sub>28</sub> H <sub>58</sub> O	18 ±2 Bashir
<b>Masse totale</b>			<b>1052 ±123</b>
<b>ACIDES GRAS SATURÉS</b>			
Acide Hexanoïque	13,0	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	2 ±1
Acide Heptanoïque	16,3	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	1 ±1
Acide Octanoïque	19,7	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	2 ±1
Acide Nonanoïque	22,8	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	13 ±2 Bashir
Acide Dodécanoïque	31,5	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	2 ±1
Acide Hexadécanoïque	41,4	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	16 ±3 Bashir
Acide Octadécanoïque	45,7	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	13 ±2 Bashir
Acide Eicosanoïque	49,8	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	8 ±1 Bashir
Acide Hénécicosanoïque	51,7	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	3 ±1
Acide Docosanoïque	53,5	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	238 ±25 Bashir
Acide Tricosanoïque	54,9	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	46 ±4
Acide Tétracosanoïque	57,0	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	308 ±36
Acide Octacosanoïque	64,3	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> O <sub>2</sub>	19 ±3
<b>Masse totale</b>			<b>671 ±81</b>
<b>ACIDES GRAS INSATURÉS</b>			
Acide Linoléique	44,7	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	7 ±1 Bashir
Acide α-Linolénique	45,0	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	12 ±2
<b>Masse totale</b>			<b>19 ±3</b>
<b>ALCANES</b>			
Hénécicosane	42,5	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub>	8 ±1 Henricsson
Tricosane	46,8	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub>	20 ±3 Henricsson
Pentacosane	50,8	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub>	58 ±5 Henricsson
Heptacosane	54,6	C <sub>27</sub> H <sub>56</sub>	78 ±10 Bashir et Henricsson
<b>Masse totale</b>			<b>164 ±19</b>
<b>ALDÉHYDES</b>			
Nonanal	14,1	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	14 ±2
Octadécanal	40,8	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O	6 ±1
Eicosanal	45,3	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	4 ±1
Docosanal	49,6	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O	6 ±1
<b>Masse totale</b>			<b>30 ±5</b>

Tableau III. 4: Concentrations massiques des espèces organiques identifiées et quantifiées dans la fraction lipidique externe extraite par le dichlorométhane du pollen de bouleau. Comparaison des identifications avec la littérature (Bashir et al., 2013a; Henricsson et al., 1996).

### 1.3 Discussion et conclusion

Les pollens de la fléole des prés et du bouleau contiennent les mêmes familles de composés chimiques. Les analyses quantitatives ont révélé des différences dans la distribution de leurs composants lipidiques. Les deux pollens contiennent un mélange complexe de composés aliphatiques et aromatiques appartenant aux classes des acides gras (saturés, insaturés), alcanes, alcènes, alcools, aldéhydes et stérols. Certains de ces composés ont déjà été identifiés dans la fraction lipidique de certains pollens (Bashir et al., 2013a; Ischebeck, 2016; Naas et al., 2016; Piffanelli and Murphy, 1998; Rejón et al., 2016).

En raison de leur rôle critique dans les interactions pollen-stigmate au cours de la reproduction sexuée, ces lipides se trouvent dans la couche la plus externe de la matrice extracellulaire du pollen (revêtement pollinique) (**cf. partie 2.2 du chapitre I**) (Wolters-Arts et al., 1998). Toutefois, l'observation en microscopie électronique à balayage du revêtement pollinique des grains de pollen de fléole des prés n'a pas été concluante. La localisation exacte des lipides sur la surface du pollen de fléole des prés est pour l'instant inconnue. Les hypothèses suivantes peuvent être formulées : (i) les lipides sont présents sous forme d'un film mince sur la surface du pollen, (ii) les lipides sont présents sous forme de gouttelettes en surface du pollen ou (iii) les lipides remplissent des anfractuosités en surface du pollen. Des recherches supplémentaires devront être effectuées éventuellement après coloration des lipides externes du pollen par le colorant de rouge de Nil (Evans et al., 1991; Rejón et al., 2016).

Dans cette étude, nous avons constaté que la fraction lipidique externe extraite en phase organique est riche en alcanes et en alcènes pour le pollen de fléole des prés et en alcènes et en alcools pour le pollen de bouleau. La masse totale des lipides extraits d'un gramme de ces deux pollens a été déterminé pour la première fois à notre connaissance : le pollen de bouleau contient une masse plus importante en lipides ( $27 \pm 1$  mg) que le pollen de fléole des prés ( $21 \pm 1$  mg). Seule une fraction des lipides totaux a été identifiée dans ce travail (18 % pour le pollen de la fléole des prés et 13 % pour le pollen de bouleau). Des travaux supplémentaires devront être effectués afin d'identifier la composition chimique restante de la fraction lipidique externe, notamment en utilisant d'autres colonnes pour la chromatographie en phase gazeuse, en utilisant d'autres techniques analytiques telles que la chromatographie en phase liquide ou la résonance magnétique nucléaire (Mueller et al., 2016).

Bashir et al. ont montré que les alcanes extraits des lipides externes des pollens de fléole des prés et de bouleau ont induit une activation des cellules NKT et une promotion des cellules CD/NKT pour

sécréter la cytokine pro-inflammatoire  $\text{TNF-}\alpha$  (Bashir et al., 2013a). La production en grande quantité de cette cytokine par ces cellules peut également exacerber le développement de l'inflammation des voies aériennes lors d'une crise d'asthme. Les pollens de fléole des prés ont montré la présence des alcanes C25, C27 et C29 en tant que des composés les plus abondants dans leur fraction lipidique externe. Les lipides extraits des différents types de pollens allergisants dans l'étude de Bashir et al. ont stimulé la production de  $\text{TNF-}\alpha$  (tumor necrosis factor) et sa fréquence la plus élevée a été observée pour l'acide gras saturé C24 suivi du 1-tétradécanol et de l'alcane C25. La richesse des lipides externes du pollen de fléole des prés en alcanes ( $1827 \pm 105 \text{ ng.mg}^{-1}$ ) pourrait donc accentuer sa réponse immuno-inflammatoire et pourrait être responsable au moins en partie de son important pouvoir allergisant (Bashir et al., 2013a).

Les acides gras saturés et insaturés ne se répartissent pas de la même façon dans la fraction lipidique externe des deux pollens. Cette fraction semble être plus riche en acides gras saturés qu'en acides gras insaturés. Les acides gras saturés les plus abondants sont respectivement les C16 et C18 pour le pollen de fléole des prés et les C22 et C24 pour le pollen de bouleau. Il a été montré que les C16 et C18 régulent *in vitro* la libération des cytokines des lymphocytes périphériques humains (Karsten et al., 1994; Lernhardt, 1990). Bashir et al. ont observé aussi que les acides gras saturés C20 et C22 ont induit une stimulation des CD/NKT (Bashir et al., 2013a). Le potentiel inflammatoire des acides gras saturés à longue chaîne présents dans les lipides externes de ces pollens allergisants pourrait être donc un facteur crucial dans l'inflammation des voies aériennes et la sensibilisation immunitaire allergique aux pollens (Bashir et al., 2013a).

En raison de leur emplacement sur la surface du pollen, les composants lipidiques peuvent donc jouer un rôle actif dans de nombreuses facettes de la réponse immunitaire au pollen, comme le recrutement actif des médiateurs inflammatoires. Le pollen est une source de lipides bioactifs qui pourraient jouer un rôle plus important dans la stimulation de l'hyperréactivité immunitaire (Bashir et al., 2013a).

Il s'agit dans ce travail d'une première étude de comparaison des lipides extraits des grains récoltés à plusieurs endroits et à des différentes dates. Cette comparaison nous a permis de montrer que les pollens de fléole des prés récoltés à plusieurs endroits et à des dates distinctes possèdent des espèces chimiques similaires mais à des concentrations massiques différentes. Des résultats similaires ont été obtenus pour les grains de pollen de bouleau récoltés sur deux arbres distinctes et à deux différentes dates. Ces différences peuvent être expliquées par le fait que la synthèse de la fraction lipidique se

diffère d'un spécimen à un autre et pourra être influencée par les facteurs climatiques et atmosphériques. Ces travaux ouvrent donc des possibilités intéressantes de réaliser des études supplémentaires de comparaison entre les masses des lipides extraits des grains de pollen récoltés (i) d'un même arbre mais à des dates différentes durant l'année, (ii) d'un même arbre mais à des années différentes et (iii) de plusieurs arbres dans des situations géographiques différentes (y compris à des situations de pollution locale différente).

Nous avons constaté que les deux pollens ne contiennent pas la même masse de lipides extraits. La masse totale des lipides extraits de 1 g du pollen de bouleau ( $27 \pm 1$  mg) est plus importante que celle de fléole des prés ( $21 \pm 1$  mg). Seulement un faible pourcentage de ces lipides a été identifié durant cette étude (18% pour le pollen de fléole des prés et 13 % pour celui de bouleau). La fraction lipidique restante non identifiée durant ce travail peut être dû à la présence de certains composés qui sont extraits par le solvant organique mais qui n'ont pas été élués ou identifiés comme par exemple les acides aminés qui se trouvent dans le revêtement pollinique (Rejón et al., 2016). Il s'agit de la première étude de quantification de la masse totale des lipides contenus dans le pollen. La différence de quantité des lipides observée entre les deux pollens pourrait un facteur supplémentaire pour expliquer leur pouvoir allergisant différent.

Les analyses chromatographiques des lipides externes des pollens de fléole des prés et de bouleau montrent qu'ils contiennent les mêmes familles d'espèces organiques : alcanes, alcènes, acides gras saturés et insaturés, alcools, aldéhydes. Quelques espèces organiques appartenant aux six familles organiques que nous avons identifiées ont déjà été confirmées par les identifications réalisées par les études de Bashir et al. et Henricson et al. (Bashir et al., 2013a; Henricsson et al., 1996). Certains composés identifiés n'ont pas été confirmés par nos données puisqu'elles sont à l'état de traces dans la fraction lipidique extraite.

Plusieurs études dans la littérature ont montré que ces lipides peuvent jouer un rôle dans les aspects inflammatoires de l'allergie et de l'asthme (Agea et al., 2005; Bashir et al., 2013a; Plötz et al., 2004; Traidl-Hoffmann et al., 2003, 2002). Dans ce travail nous avons montré que les espèces organiques extraites des grains de pollen de fléole des prés et de bouleau ne se répartissent pas de la même façon dans leurs lipides externes. Cette différence de répartition lipidique pourrait influencer le potentiel allergisant de chaque pollen et par conséquent la réponse immunitaire correspondante.

## 2. Identification des espèces organiques extraites de la fraction lipidique du pollen par le PBS

### 2.1 Pollen de fléole des prés

#### 2.1.1 Identification et quantification des lipides

Dans la première partie de ce chapitre nous avons identifié les lipides extraits du pollen par un solvant organique et afin de mieux s'approcher des conditions de contact avec les muqueuses des voies respiratoires supérieures, les pollens ont été ensuite extraits par un solvant aqueux: le PBS (Phosphate Buffered Saline). Plusieurs méthodes ont été testées afin d'optimiser l'extraction des lipides en phase aqueuse. Les trois chromatogrammes (a), (b) et (c) sur la figure III.7 représentent les lipides extraits du pollen de fléole des prés par le PBS (a) par action d'une agitation mécanique par barreau aimanté, (b) une agitation douce (rotation lente des vials autour d'un axe horizontal) et (c) sans aucune agitation. La durée d'extraction des lipides dans le PBS en présence d'une agitation mécanique ou douce est de 2 heures (**cf. partie 4.3 chapitre II**). L'extraction de la fraction lipidique dans le PBS a été effectuée pendant 22 heures pour les extractions sans agitation.

La différence des intensités des pics est très importante entre les trois chromatogrammes (a), (b) et (c). Les pics observés sur le chromatogramme (a) ont des intensités plus importantes que ceux observés sur les deux autres chromatogrammes (b) et (c). À partir de cette comparaison, on suppose que l'extraction des lipides du pollen de fléole des prés par le PBS est facilitée par l'action d'une agitation mécanique. L'agitation douce ne permet qu'une faible extraction des lipides par le PBS (chromatogramme (b)). Enfin, la fraction lipidique n'a quasiment pas été extraite si les grains de pollen ont été mis en suspension dans le PBS sans aucune agitation (chromatogramme (c)).

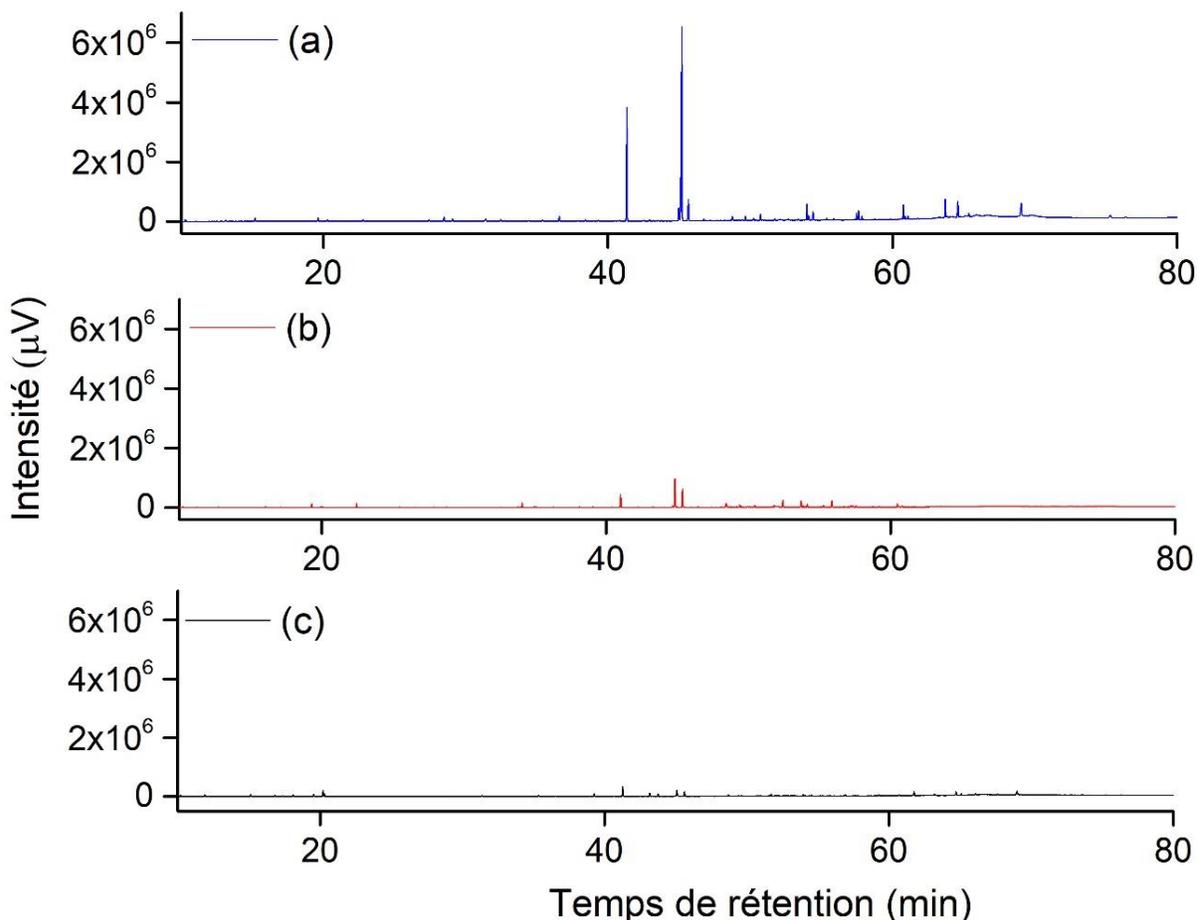


Figure III. 7: Chromatogrammes (GC-FID) des lipides extraits du pollen de fléole des prés par le PBS en présence (a) d'une agitation mécanique par barreau aimanté pendant 2h, (b) d'une agitation douce pendant 2h et (c) sans agitation pendant 22h.

La figure III.8 représente la masse totale des cinq familles de composés organiques extraits du pollen de fléole des prés par le PBS en présence d'une agitation mécanique. Les lipides identifiés atteignent une masse totale en équivalence d'alcane de  $0,9 \pm 0,2 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Les masses des espèces organiques extraites et identifiées dans cette fraction lipidique sont données dans le tableau III.4. L'extraction d'un gramme de pollen par le PBS afin d'obtenir la masse totale de lipides extractibles n'a pas été possible en raison de la formation d'un précipité important qui rendait impossible les opérations de filtration et de séparation de phases lors de l'étape d'extraction liquide-liquide. Les incertitudes sont importantes lors d'une extraction par le PBS et ceci est attribuée à l'extraction liquide-liquide (organique-aqueuse) qui est une étape délicate expérimentalement.

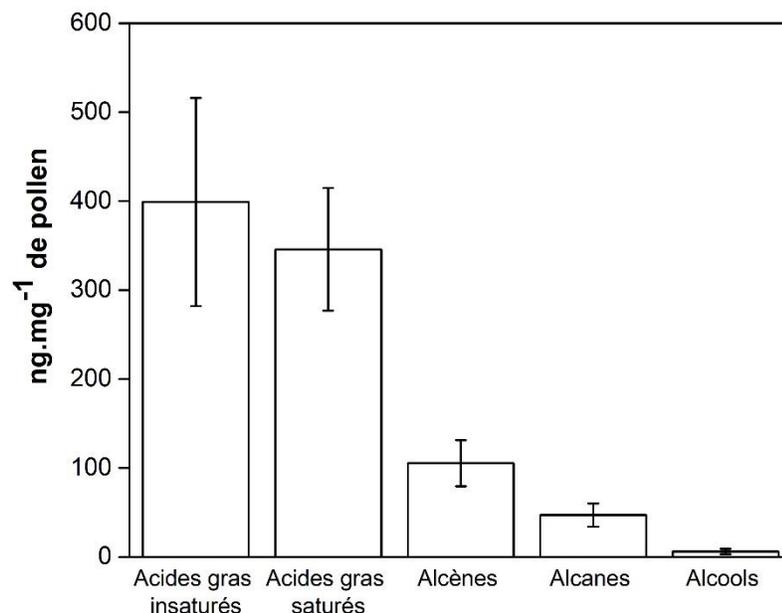


Figure III. 8: Concentrations massiques des cinq familles de composés organiques extraites par le PBS pendant 2h des grains de pollen de fléole des prés en présence d'une agitation mécanique.

L'extraction des acides gras insaturés a été importante par le PBS ( $399 \pm 117$  ng.mg<sup>-1</sup>). Deux acides gras insaturés sont extraits : l'acide  $\alpha$ -linoléinique (9,12,15-octadécatriénoïque, C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>) et l'acide linoléique (9,12-octadécadiénoïque, C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>). Les extraits aqueux contiennent une concentration massique importante de  $379 \pm 112$  ng.mg<sup>-1</sup> en acide  $\alpha$ -linoléinique. La famille des acides gras saturés est la deuxième famille la plus extraite par le PBS (masse totale de  $345 \pm 69$  ng.mg<sup>-1</sup>). Le solvant aqueux extrait au total 14 acides gras saturés dont le nombre de carbone total est compris entre 6 et 22. L'acide hexadécanoïque de masse  $258 \pm 50$  ng.mg<sup>-1</sup> a été extrait d'une façon importante par le PBS. La masse totale des alcènes extraits par le PBS est égale à  $105 \pm 26$  ng.mg<sup>-1</sup>. Cinq alcènes, dont le nombre total de carbone est compris entre 25 et 31, sont identifiés en phase aqueuse. L'heptacosène et l'hentriacontène, chacun de masse  $39 \pm 10$  ng.mg<sup>-1</sup>, sont les plus abondants. Les alcanes et les alcools de masse respectivement égale à  $47 \pm 13$  ng.mg<sup>-1</sup> et  $6 \pm 3$  ng.mg<sup>-1</sup>, sont les moins extraites du pollen par le solvant aqueux. La famille des aldéhydes n'a pas été identifiée dans les extraits aqueux de ce pollen.

	T <sub>R</sub> GC/FID (min)	Masse (ng.mg <sup>-1</sup> de pollen)	
		Formules brutes	Intact
<b>ACIDES GRAS SATURÉS</b>			
Acide Hexanoïque	13,0	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	3 ± 1
Acide Heptanoïque	16,3	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	1 ± 1
Acide Octanoïque	19,7	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	3 ± 1
Acide Nonanoïque	22,8	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	3 ± 1
Acide Décanoïque	25,2	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	1 ± 1
Acide Dodécanoïque	31,5	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	1 ± 1
Acide Tétradécanoïque	36,5	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	10 ± 2
Acide Pentadécanoïque	38,9	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	2 ± 1
Acide Hexadécanoïque	41,4	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	258 ± 50
Acide Heptadécanoïque	43,6	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	1 ± 1
Acide Octadécanoïque	45,7	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	51 ± 5
Acide Nonadécanoïque	47,7	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	1 ± 1
Acide Eicosanoïque	49,8	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	8 ± 2
Acide Docosanoïque	53,5	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	2 ± 1
<b>Masse totale</b>			<b>345 ± 69</b>
<b>ACIDES GRAS INSATURÉS</b>			
Acide linoléique	44,7	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	20 ± 5
Acide α-linolénique	45,0	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	379 ± 112
<b>Masse totale</b>			<b>399 ± 117</b>
<b>ALCÈNES</b>			
Pentacosène	50,4	C <sub>25</sub> H <sub>50</sub>	4 ± 1
Heptacosène	54,2	C <sub>27</sub> H <sub>54</sub>	39 ± 10
Octacosène	56,2	C <sub>28</sub> H <sub>56</sub>	4 ± 1
Nonacosène	57,3	C <sub>29</sub> H <sub>58</sub>	19 ± 5
Hentriacontène	60,9	C <sub>31</sub> H <sub>62</sub>	39 ± 9
<b>Masse totale</b>			<b>105 ± 26</b>
<b>ALCANES</b>			
Tricosane	46,8	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub>	1 ± 1
Pentacosane	50,8	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub>	13 ± 3
Heptacosane	54,6	C <sub>27</sub> H <sub>56</sub>	18 ± 5
Nonacosane	58,3	C <sub>29</sub> H <sub>60</sub>	7 ± 2
Hentriacontane	61,0	C <sub>31</sub> H <sub>64</sub>	8 ± 2
<b>Masse totale</b>			<b>47 ± 13</b>
<b>ALCOOLS</b>			
Dodécanol	29,04	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O	2 ± 1
Hexadécanol	39,4	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O	3 ± 1
Octadécanol	43,8	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> O	1 ± 1
<b>Masse totale</b>			<b>6 ± 3</b>

Tableau III. 5: Concentrations massiques des espèces organiques extraites par le PBS pendant 2h du pollen de fléole des prés en présence d'une agitation mécanique.

### 2.1.2 Observation en microscopie optique des extraits aqueux du pollen

Afin de comprendre l'effet de l'agitation mécanique sur l'extraction de la fraction lipidique pollinique en phase aqueuse, nous avons choisi à observer en microscopie optique les grains de pollen de fléole des prés extraits en phase aqueuse par action d'une agitation mécanique (figure III.9). Seules des études qualitatives de quelques grains de pollen ont été réalisées pour comprendre cet effet.

La figure III.9 montre que l'agitation mécanique en phase aqueuse a induit la libération importante du contenu cytoplasmique. La rupture du pollen facilite donc l'extraction de la fraction lipidique par le PBS et en particulier celle qui se trouve dans son cytoplasme. L'observation en microscopie optique des extraits aqueux du pollen de fléole de prés confirment donc la différence observée entre les trois profils lipidiques représentés sur la figure III.7. L'identification des espèces organiques extraites de la fraction lipidique interne fera l'objet du chapitre V.

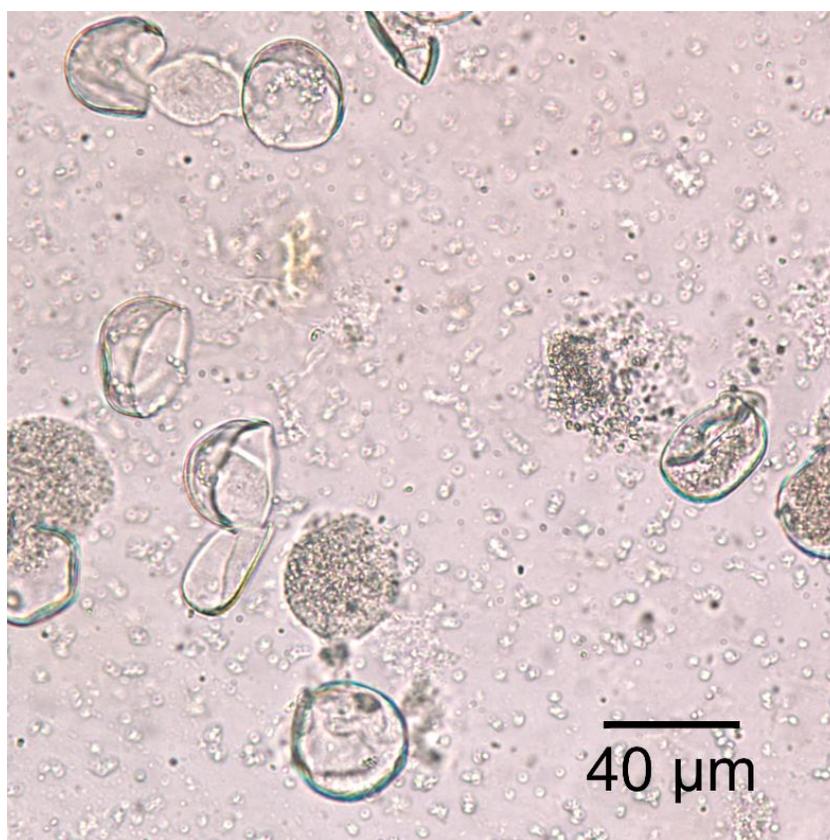


Figure III. 9: Observation en microscopie optique des grains de pollen de fléole des prés extraits par le PBS par action d'une agitation mécanique.

## 2.2 Pollen de bouleau

La figure III.10 représente une comparaison entre le profil lipidique extrait du pollen de bouleau en phase aqueuse en présence d'une agitation mécanique (chromatogramme (a)) et d'une agitation douce (chromatogramme (b)). Comme pour le pollen de fléole des prés, la fraction lipidique du pollen de bouleau n'est pas extraite par le PBS en présence d'une agitation douce et ceci est confirmée par les faibles valeurs des intensités des pics représentés sur le chromatogramme (b).

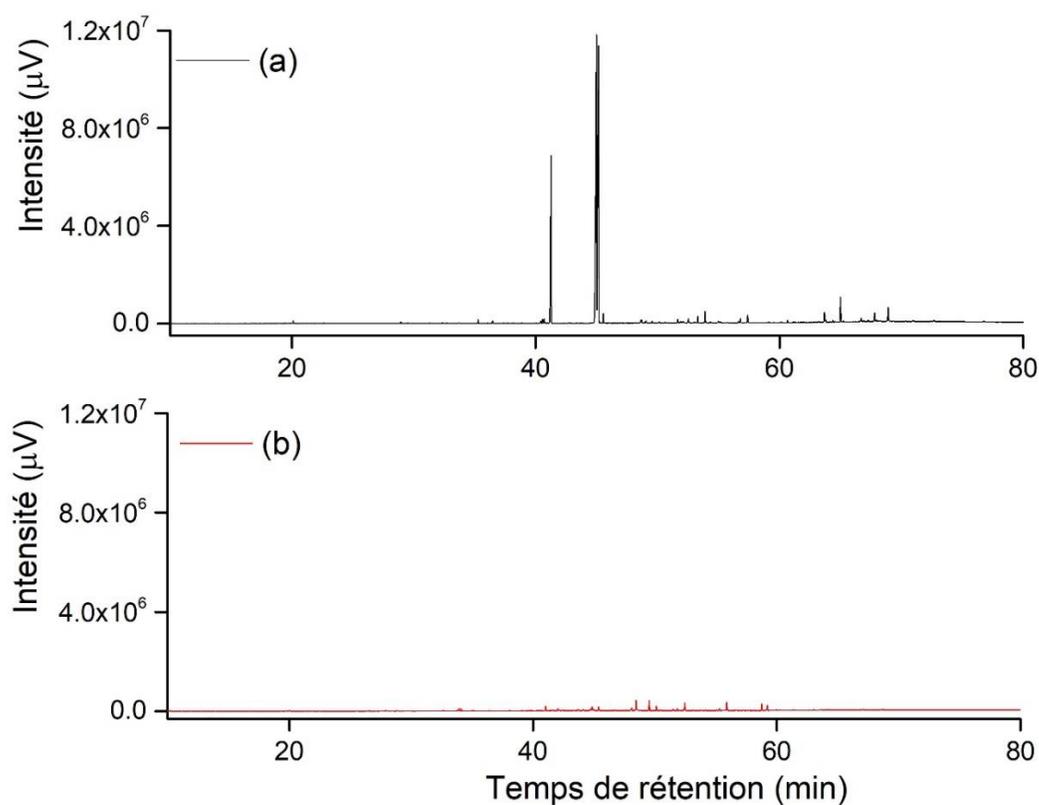


Figure III. 10: Chromatogrammes de l'extraction (deux heures) des lipides du pollen de bouleau par le PBS par action (a) d'une agitation mécanique et (b) d'une agitation douce.

Au total, quatre familles organiques ont été identifiées dans les extraits aqueux du pollen de bouleau: acides gras insaturés et saturés, alcènes et alcools. La masse totale des lipides extraits atteint une masse équivalente en alcanes de  $5,3 \pm 0,8 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Les extraits aqueux du pollen de bouleau comme pour le pollen de la fléole des prés sont riches en acides gras et en particulier les insaturés (figure III.11).

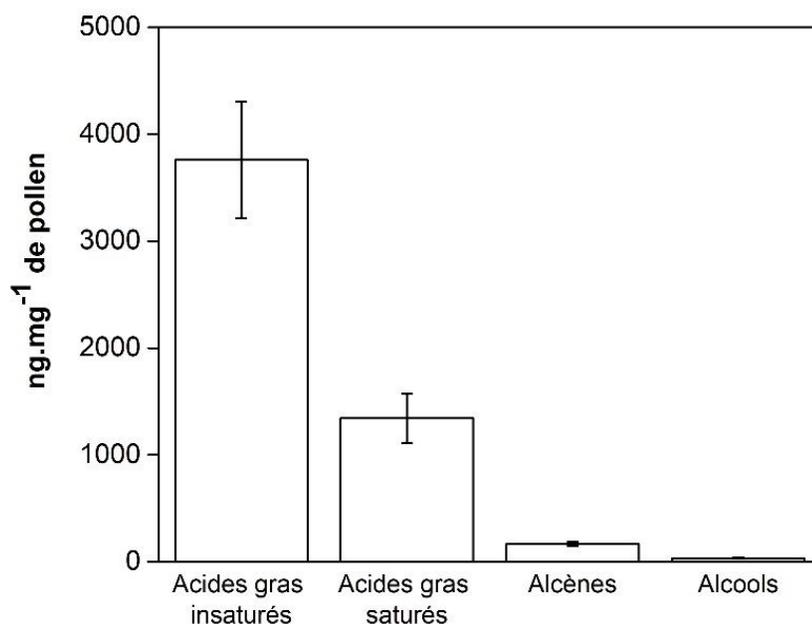


Figure III. 11: Concentrations massiques des quatre familles organiques extraites du pollen de bouleau par le PBS pendant 2h par action d'une agitation mécanique.

La fraction lipidique du pollen de bouleau contient une masse importante de  $3760 \pm 545$  ng.mg<sup>-1</sup> d'acides gras insaturés. Les extraits aqueux de ce pollen sont plus riches en acide linoléique ( $2181 \pm 313$  ng.mg<sup>-1</sup>) qu'en acide  $\alpha$ -linoléique ( $1579 \pm 232$  ng.mg<sup>-1</sup>). Les acides gras saturés sont moins extraits par le PBS que les insaturés. L'acide hexadécanoïque de masse  $1185 \pm 209$  ng.mg<sup>-1</sup> est l'acide le majoritairement extrait par le PBS. Au contraire les deux autres familles d'alcènes ( $166 \pm 20$  ng.mg<sup>-1</sup>) et d'alcools ( $33 \pm 5$  ng.mg<sup>-1</sup>) sont moins extraites que la famille des acides gras. Les masses des espèces organiques identifiées dans les extraits aqueux du pollen de bouleau sont représentées dans le tableau III.5.

	$T_R$ GC/FID (min)	Masse (ng.mg <sup>-1</sup> de pollen)	
		Formules brutes	Intact
<b>ACIDES GRAS SATURÉS</b>			
Acide Hexanoïque	13,0	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	1 ±1
Acide Heptanoïque	16,3	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	1 ±1
Acide Nonanoïque	22,8	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	3 ±1
Acide Tétradécanoïque	36,5	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	11 ±1
Acide Hexadécanoïque	41,4	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	1185 ±209
Acide Heptadécanoïque	43,6	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	5 ±1
Acide Octadécanoïque	45,7	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	47 ±7
Acide Nonadécanoïque	47,7	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	11 ±2
Acide Eicosanoïque	49,8	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	6 ±1
Acide Docosanoïque	53,5	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	40 ±7
Acide Tricosanoïque	55,3	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	2 ±1
Acide Tétracosanoïque	57,0	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	29 ±6
Acide Hexacosanoïque	58,8	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> O <sub>2</sub>	2 ±1
Masse totale			1343 ±239

**ACIDES GRAS INSATURÉS**

Acide Linoléique	44,7	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	2181 ±313
Acide α-Linolénique	45,0	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	1579 ±232
Masse totale			3760 ±545

**ALCÈNES**

Pentacosène	50,4	C <sub>25</sub> H <sub>50</sub>	11 ±1
Heptacosène	54,2	C <sub>27</sub> H <sub>54</sub>	83 ±10
Nonacosène	57,3	C <sub>29</sub> H <sub>58</sub>	55 ±7
Hentriacontène	60,9	C <sub>31</sub> H <sub>62</sub>	17 ±2
Masse totale			166 ±20

**ALCOOLS**

Docosanol	51,5	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> O	31 ±4
Tétracosanol	55,1	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> O	2 ±1
Masse totale			33 ±5

Tableau III. 6: Concentrations massiques des espèces organiques extraites par le PBS du pollen de bouleau en présence d'une agitation mécanique (2 heures).

## 2.3 Discussion

### 2.3.1 Comparaison des extraits aqueux et organique du pollen

Les diagrammes circulaires des figures III.12 et III.13 représentent respectivement les pourcentages d'extraction de la fraction lipidique des pollens de fléole des prés et de bouleau par le PBS et le DCM. Les mêmes familles organiques sont extraites par ces deux solvants mais dans des proportions très différentes. Le solvant organique a présenté un pourcentage d'extraction important pour les alcanes, les alcènes et les alcools alors que ces trois familles organiques ont été moins extraites par le solvant aqueux.

Les pourcentages d'extraction des acides gras par les deux solvants sont très différents. Le PBS a favorisé une extraction significative de ces acides insaturés (53,9 % extraits du pollen de fléole des prés et 70,9 % extraits du pollen de bouleau). L'extraction importante de ces acides en phase aqueuse a été déjà démontrée dans la littérature (Plötz et al., 2004; Traidl-Hoffmann et al., 2003, 2002). Les extraits aqueux des pollens de fléole des prés et de bouleau contiennent respectivement un pourcentage important en acides gras saturés égal à 31,7% et 25,3%. Au contraire il a été remarqué que la famille des acides gras est moins extraite par le solvant organique.

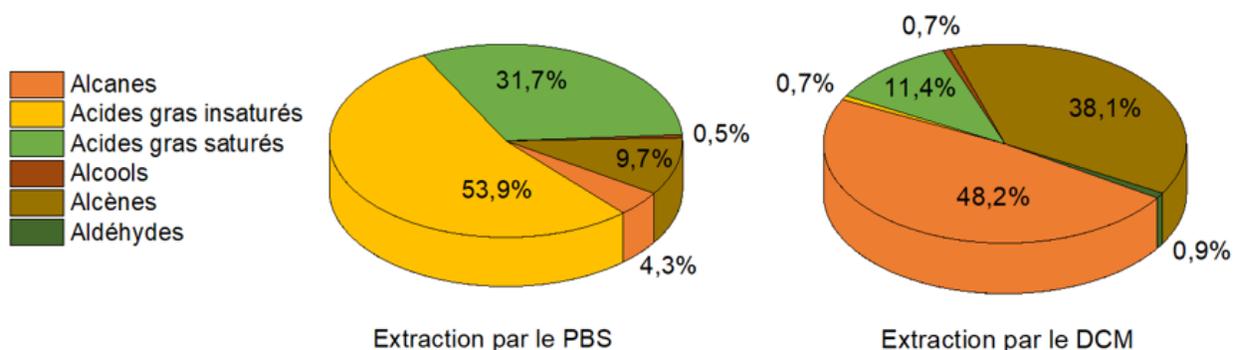


Figure III. 12: Pourcentages d'extraction des familles organiques extraites du pollen de fléole des prés par le PBS et par le DCM.

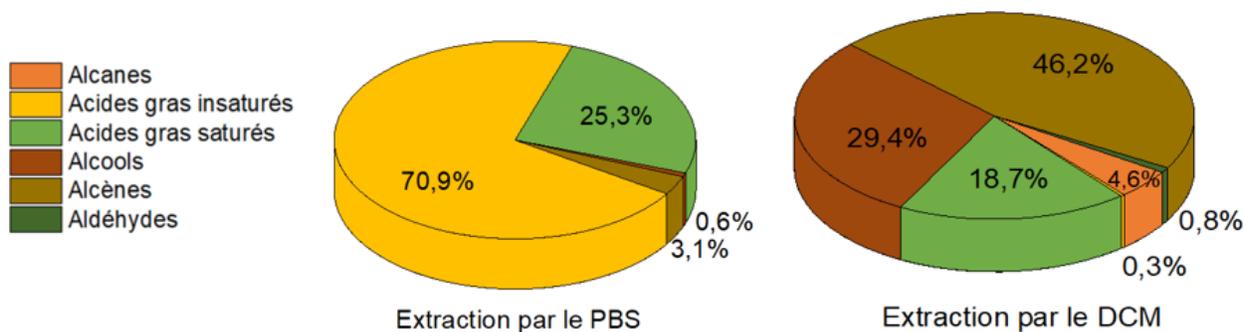


Figure III. 13: Pourcentages d'extraction des familles organiques extraites du pollen de bouleau par le PBS et par le DCM.

Le tableau III.6 permet de comparer les masses des familles organiques extraites de la fraction lipidique des pollens en phase aqueuse et organique. Selon nos connaissances, il s'agit d'une première étude de comparaison entre le pouvoir d'extraction des deux solvants organique et aqueux sur un même pollen.

La masse totale des lipides extraits des pollens de fléole des prés par le solvant organique ( $3821 \pm 283 \text{ ng.mg}^{-1}$ ) est plus importante que celle extraite par le solvant aqueux ( $903 \pm 228 \text{ ng.mg}^{-1}$ ). Ceci peut être expliqué par une extraction plus importante des alcènes et des alcanes par le DCM par rapport au PBS.

Au contraire la masse totale des lipides quantifiés dans les extraits aqueux du pollen de bouleau ( $5302 \pm 809 \text{ ng.mg}^{-1}$ ) est plus importante que celle dans ses extraits organiques ( $3591 \pm 398 \text{ ng.mg}^{-1}$ ). Cette différence est due à l'extraction importante des acides gras saturés et insaturés par le PBS.

Familles organiques	Masse (ng.mg <sup>-1</sup> de pollen)			
	Extraits aqueux		Extraits organiques	
	Fléole des prés	Bouleau	Fléole des prés	Bouleau
Acides gras saturés	345±69	1343±239	434±46	671±81
Acides gras insaturés	399±117	3760±545	55±5	19±3
Alcènes	105±26	166±20	1445±118	1655±167
Alcanes	47±13	33±5	1828±105	164±19
Alcools	6±3		26±3	1052±123
Aldéhydes			33±6	30±5
<b>Masse totale</b>	<b>902±228</b>	<b>5302±809</b>	<b>3821±283</b>	<b>3591±398</b>

Tableau III. 7: Concentrations massiques des espèces organiques extraites des grains de pollen de fléole des prés et de bouleau en phase aqueuse et organique.

Le lavage des grains de pollen par le dichlorométhane a favorisé une extraction des espèces organiques présentes dans la fraction lipidique externe, nous avons remarqué que les acides gras insaturés sont majoritairement extraits par le PBS. A l'inverse, ces acides sont identifiés à l'état de traces dans les extraits organiques des deux pollens. Leur extraction importante par le solvant aqueux peut être expliquée par ces deux hypothèses :

- (i) Les acides gras insaturés sont extraits de la fraction lipidique interne, l'agitation mécanique des grains de pollen en phase aqueuse a favorisé leur extraction.
- (ii) Le solvant aqueux est un meilleur solvant pour les acides gras insaturés qui sont plus extraits par le PBS que par le DCM.

Le pH n'a pas été mesuré durant les extractions de la fraction lipidique pollinique. Il n'est donc pas possible de statuer fermement sur l'équilibre acide/base des acides gras. Toutefois, de part leurs valeurs de pK<sub>A</sub> entre 8 et 11 pour les C18 selon l'insaturation (Kanicky and Shah, 2002), de part la valeur de pH du PBS est entre 7 et 8, les acides gras sont donc probablement majoritairement sous la forme acide. La dissociation des acides ne doit donc pas être un facteur important dans leur extraction.

### 2.3.2 Comparaison avec la littérature

L'extraction importante des acides gras insaturés en solution aqueuse a déjà été confirmée par les études de Plötz et al. et Traidl-Hoffmann et al.. Les étapes de l'extraction aqueuse de la fraction lipidique selon ces deux études sont les suivantes : (i) incubation dans un milieu de culture de Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (30 min, 37°C, pH 7,4), (ii) une centrifugation (500g) et (iii) une

filtration (Plötz et al., 2004; Traidl-Hoffmann et al., 2002). Le tableau III.7 montre une comparaison des concentrations massiques des acides  $\alpha$ -linoléique et linoléique obtenues dans ce travail et par les deux études de référence.

	Ce travail		Traidl -hoffman et al., 2002		Plötz et a 2004
<b>Solvants utilisés pour l'extraction</b>	PBS		RPMI		RPMI
Extraction mécanique	par barreau aimanté		-		-
Durée d'extraction	2h		30 min		30 min
Centrifugation	1800 g		500 g		500 g
<b>Acides gras insaturés (ng.mg<sup>-1</sup>)</b>					
<b>Grains de pollen</b>	<b>Fléole</b>	<b>Bouleau</b>	<b>Fléole</b>	<b>Bouleau</b>	<b>Fléole</b>
Acide $\alpha$ -linoléique	379	1579	1058	82	5012
Acide linoléique	20	2181	230	81	813
<b>Somme</b>	<b>399</b>	<b>3760</b>	<b>1288</b>	<b>163</b>	<b>5825</b>

Tableau III. 8 : Comparaison des concentrations massiques des acides  $\alpha$ -linoléique et linoléique extraits du pollen de fléole des prés et de bouleau en phase aqueuse avec la littérature (Plötz et al., 2004; Traidl-Hoffmann et al., 2002).

Selon nos travaux, les extraits aqueux des pollens de bouleau (3760 ng.mg<sup>-1</sup>) sont plus riches en acides insaturés que ceux du pollen de fléole des prés (399 ng.mg<sup>-1</sup>). Le tableau III.7 montre que les concentrations massiques des acides insaturés extraits d'un même type de pollen sont très différentes entre les trois études alors que Traidl-Hoffmann et al. et Plötz et al. ont utilisé le même protocole expérimental pour l'extraction des grains de pollen en phase aqueuse.

Nos travaux ont montré que l'extraction des lipides par le PBS n'était pas possible sans aucune agitation. Les observations microscopiques optiques des extraits aqueux des grains de pollen de fléole des prés ont montré que l'agitation mécanique a induit la libération de leur contenu cytoplasmique, ceci pourra favoriser une meilleure extraction de la fraction lipidique. Traidl-Hoffmann et al. et Plötz et al. n'ont pas extrait les lipides en phase aqueuse au moyen d'agitation mécanique et ils observent pourtant l'extraction de ces composés par le PBS. Pour résoudre cette contradiction nous supposons plusieurs hypothèses :

- Le PBS peut favoriser également l'extraction des allergènes contenus dans le cytoplasme du pollen (Aloisi et al., 2018; Behrendt et al., 1999; Vrtala et al., 1993). Certains parmi ces allergènes possèdent un domaine hydrophobe favorisant le transport de la fraction lipidique du pollen (Mogensen et al., 2002). Les extraits aqueux dans les travaux de Traidl-Hoffmann et

al. et Plötz et al. pourraient contenir des allergènes transportant certaines espèces organiques de la fraction lipidique et en particulier celles qui sont localisées à l'intérieur du pollen.

- L'état de fraîcheur des grains de pollen devrait précisée dans les travaux de Plötz et al., et Traidl-Hoffmann et al. : la date de récolte des grains de pollen n'est pas précisée. Ceci pourrait également expliquer la différence des concentrations massiques observées entre les travaux. En effet, un pollen fraîchement collecté pourrait se rompre plus facilement dans l'eau qu'un pollen stocké depuis plusieurs années (Behrendt et al., 1999; Grote et al., 2001).
- La centrifugation des extraits aqueux des pollens (500 g) pourrait permettre la libération de la fraction lipidique interne.

Les grains de pollen peuvent être rompus durant leur transport atmosphérique et ainsi libérer leur contenu cytoplasmique. L'influence de la rupture des grains de pollen sur les extractions des lipides a donc été étudiée en détail et fait l'objet d'un chapitre séparé (**cf. chapitre V**). Ce point est particulièrement important car les acides  $\alpha$ -linoléique et linoléique libérés en phase aqueuse peuvent agir en tant que facteurs proinflammatoires indépendants des allergènes contribuant ainsi à la manifestation ou l'aggravation de l'inflammation allergique (Plötz et al., 2004; Traidl-Hoffmann et al., 2002). Pour nuancer, il est toutefois possible que le PBS possède un pouvoir d'extraction des lipides inférieur à celui du fluide nasal. Une extraction avec un solvant plus proche des conditions physiologiques pourra être réalisée dans la poursuite de ces travaux de thèse.

## 2.4 Conclusion

Nos résultats nous ont permis de montrer que les lipides des pollens de fléole des prés et de bouleau ne sont extraits en phase aqueuse que si les grains de pollen ont subi une agitation mécanique qui engendre une rupture des grains et une extraction des lipides internes.

Les extractions des espèces chimiques par chacun des deux solvants organique et aqueux diffèrent d'un pollen à un autre. La fraction lipidique des pollens de bouleau semble être plus extraite par le solvant aqueux ( $5302 \pm 809 \text{ ng.mg}^{-1}$ ) que par le solvant organique ( $3589 \pm 398 \text{ ng.mg}^{-1}$ ). Au contraire la masse totale des lipides des pollens de fléole des prés est plus importante dans ses extraits organiques ( $3821 \pm 283 \text{ ng.mg}^{-1}$ ) que dans ses extraits aqueux ( $592 \pm 228 \text{ ng.mg}^{-1}$ ).

Il s'agit de la première étude de comparaison du pouvoir d'extraction des deux solvants sur un même pollen. Le solvant organique a favorisé une extraction de la fraction lipidique externe par contre

l'agitation mécanique au moment de l'extraction aqueuse a favorisé la libération de la fraction lipidique interne induite par le relâchement du contenu cytoplasmique du grain de pollen cassé. L'extraction du pollen en phase aqueuse ouvre des possibilités intéressantes pour identifier les espèces chimiques qui pourraient être libérées lors du contact des grains de pollen allergisants en particulièrement avec la phase aqueuse de nos muqueuses.

Nous avons montré que les extraits aqueux des pollens ne contiennent pas la même masse des acides gras insaturés. Les extraits aqueux du pollen de fléole des prés contiennent une masse importante de  $379 \pm 112 \text{ ng.mg}^{-1}$  d'acide  $\alpha$ -linoléique et une très faible masse de  $20 \pm 5 \text{ ng.mg}^{-1}$  d'acide linoléique. Les extraits aqueux de pollen de bouleau sont quant à eux plus riches en ces deux acides insaturés : le pollen de bouleau libère en phase aqueuse sous agitation mécanique plus d'acide linoléique ( $2181 \pm 313 \text{ ng.mg}^{-1}$ ) que d'acide  $\alpha$ -linoléique ( $1579 \pm 232 \text{ ng.mg}^{-1}$ ). Concernant les effets sanitaires, ces acides ont un rôle adjuvant dans les phases d'induction des réactions allergiques (Plötz et al., 2004; Traidl-Hoffmann et al., 2002). Plusieurs hypothèses ont été proposées afin d'expliquer la différence observée dans les quantités de ces acides insaturés obtenus par cette étude et par les autres travaux (Plötz et al., 2004; Traidl-Hoffmann et al., 2002) :

- (i) Les étapes de l'extraction aqueuse sont différentes entre notre étude et les deux études de références, une agitation douce est au moins nécessaire pour extraire la fraction lipidique.
- (ii) L'état de fraîcheur du pollen pourrait rendre le pollen plus extractible en phase aqueuse.

Le mécanisme de la libération de la fraction lipidique en contact de la phase aqueuse de nos muqueuses n'est absolument pas détaillé à l'heure actuelle. Il n'est pas connu si cette fraction pourrait être libérée en phase aqueuse plus facilement des grains de pollen cassés alors que les grains vides de leurs contenus cytoplasmiques sont observés en quantité importante dans l'atmosphère (Puc et al., 2016). Nos résultats nous ont permis de montrer que la cassure des grains de pollen de fléole des prés et de bouleau par action de l'agitation mécanique a induit une libération significative de leur contenu cytoplasmique et par conséquent à une extraction de leur fraction lipidique et en particulier celle qui est interne. Ces travaux d'extraction en phase aqueuse doivent être plus approfondies.

Afin de comprendre le mécanisme de contact pollen-muqueuse, des travaux supplémentaires sur l'extraction des lipides par le fluide nasal seraient à prévoir. Une étude par imagerie microscopique des pollens immergés dans ce fluide pourrait servir également pour comprendre si les grains de pollen peuvent être rompus en contact avec nos muqueuses sous l'effet d'un choc osmotique.

### Chapitre III. Etude de la fraction lipidique du pollen

La libération du contenu cytoplasmique des pollens dans l'environnement implique la présence d'eau. Il a été montré que les pollens de graminées peuvent se rompre par choc osmotique alors que les pollens de bouleau par une germination abortive (Schäppi et al., 1997; Suphioglu et al., 1992). Dans les deux cas le contenu cytoplasmique est répandu vers le milieu extérieur. Selon nos connaissances il n'a pas été détaillé dans la littérature si la fraction lipidique pourrait être libérée en phase aqueuse après ces deux cas.

Le mécanisme d'extraction des lipides en phase aqueuse par agitation mécanique mise en place dans ce travail est une nouvelle approche dans la littérature. Ce mécanisme pourrait donc nous permettre d'identifier les espèces chimiques libérées en phase aqueuse des pollens allergisants lorsqu'ils sont sous forme rompus ou cassés dans l'atmosphère. (Plötz et al., 2004; Traidl-Hoffmann et al., 2002) ont montré que les acides  $\alpha$ -linoléique et linoléique libérés de la fraction lipidique en phase aqueuse jouent un rôle important dans le recrutement et l'activation *in vitro* des éosinophiles. La libération de ces acides des grains de pollen rompus ou cassés en présence d'eau dans l'atmosphère pourrait donc être un facteur favorisant l'augmentation de leur pouvoir allergisant chez les sujets allergiques et asthmatiques.

### 3. Références bibliographiques

- Agea, E., Russano, A., Bistoni, O., Mannucci, R., Nicoletti, I., Corazzi, L., Postle, A.D., Libero, G.D., Porcelli, S.A., Spinozzi, F., 2005. Human CD1-Restricted T Cell Recognition of Lipids from Pollens. *J Exp Med* 202, 295–308.
- Aloisi, I., Del Duca, S., De Nuntis, P., Mandrioli, P., Fernández-González, D., 2018. Comparison of Extraction Methods for Poaceae Pollen Allergens. *Aerobiologia*.
- 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, e53337.
- Behrendt, H., Tomczok, J., Sliwa-Tomczok, W., Kasche, A., Ebner von Eschenbach, C., Becker, W.M., Ring, J., 1999. Timothy Grass (*Phleum pratense* L.) Pollen as Allergen Carriers and Initiators of an Allergic Response. *Int Arch Allergy Immunol* 118, 414–418.
- Evans, D.E., Taylor, P.E., Singh, M.B., Knox, R.B., 1991. Quantitative Analysis of Lipids and Protein from the Pollen of *Brassica napus* L. *Plant Science* 73, 117–126.
- 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.
- Ischebeck, T., 2016. Lipids in pollen — They are different. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1861, 1315–1328.
- Kanicky, J.R., Shah, D.O., 2002. Effect of Degree, Type, and Position of Unsaturation on the pKa of Long-Chain Fatty Acids. *Journal of Colloid and Interface Science* 256, 201–207.
- Karsten, S., Schäfer, G., Schauder, P., 1994. Cytokine Production and DNA Synthesis by Human Peripheral Lymphocytes in Response to Palmitic, Stearic, Oleic, and Linoleic acid. *Journal of Cellular Physiology* 161, 15–22.
- Lernhardt, W., 1990. Fatty Acid Requirement of B Lymphocytes Activated in Vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 166, 879–885.
- Mogensen, J.E., Wimmer, R., Larsen, J.N., Spangfort, M.D., Otzen, D.E., 2002. The Major Birch Allergen, Bet v 1, Shows Affinity for a Broad Spectrum of Physiological Ligands. *J. Biol. Chem.*
- Mueller, G.A., Thompson, P.M., DeRose, E.F., O'Connell, T.M., London, R.E., 2016. A Metabolomic, Geographic, and Seasonal Analysis of the Contribution of Pollen-Derived Adenosine to Allergic Sensitization. *Metabolomics* 12, 187.

### Chapitre III. Etude de la fraction lipidique du pollen

- 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.
- Piffanelli, P., Murphy, D.J., 1998. Novel Organelles and Targeting Mechanisms in the Anther Tapetum. *Trends in Plant Science* 3, 250–252.
- 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.
- Puc, M., Kotrych, D., Lipiec, A., Rapijko, P., Siergiejko, G., 2016. Birch Pollen Grains without Cytoplasmic Content in the Air of Szczecin and Bialystok content in the Air of Szczecin and Bialystok 12, 6.
- Rejón, J., Delalande, F., Schaeffer-Reiss, C., Alché, J., Rodríguez-García, M., Van Dorsselaer, A., Castro, A., 2016. The Pollen Coat Proteome: At the Cutting Edge of Plant Reproduction. *Proteomes* 4, 5.
- 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.
- Suphioglu, C., Singh, M.B., Taylor, P., Knox, R.B., Bellomo, R., Holmes, P., Puy, R., 1992. Mechanism of Grass-Pollen-Induced Asthma. *The Lancet* 339, 569–572.
- 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.
- Vrtala, S., Grote, M., Duchene, M., Vanree, R., 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.
- Wolters-Arts, M., Lush, W.M., Mariani, C., 1998. Lipids are Required for Directional Pollen-Tube Growth. *Nature* 392, 818–821.
- 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.
- Zinkl, G.M., Zwiebel, B.I., Grier, D.G., Preuss, D., 1999. Pollen-Stigma Adhesion in *Arabidopsis*: a Species-Specific Interaction Mediated by Lipophilic Molecules in the Pollen Exine. *Development* 126, 5431–5440.

# **Chapitre IV**

**Modification de la fraction lipidique du pollen par les polluants atmosphériques (ozone et dioxyde d'azote)**



<b>1. Introduction .....</b>	<b>136</b>
<b>2. Effets des polluants sur les fractions lipidiques des pollens de fléole des prés et de bouleau ...</b>	<b>137</b>
2.1 Profil lipidique des pollens exposés au dioxyde d'azote.....	137
2.2 Profil lipidique des pollens exposés à l'ozone.....	139
2.3 Profil lipidique des pollens exposés à un mélange d'ozone et de dioxyde d'azote .....	141
<b>3. Etude de la composition chimique du pollen pollué <i>in vitro</i> et extrait par le dichlorométhane</b>	<b>143</b>
3.1 Effets sur les alcanes et les alcools.....	143
3.2 Consommation des alcènes par ozonolyse.....	146
3.3 Modification des acides gras saturés et des aldéhydes.....	148
3.4 Réaction d'ozonolyse .....	152
<b>4. Etude de la composition chimique du pollen pollué <i>in vitro</i> et extrait par le PBS.....</b>	<b>154</b>
<b>5. Effets de l'exposition du pollen à la pollution sur la réponse inflammatoire .....</b>	<b>158</b>
<b>6. Discussion et conclusion.....</b>	<b>160</b>
<b>7. Références bibliographiques.....</b>	<b>164</b>

## 1. Introduction

Bien que la littérature regorge de publications sur les effets de la pollution atmosphérique sur le pollen, la modification de sa fraction lipidique par les polluants gazeux est peu détaillée à l'heure actuelle. À notre connaissance, deux études existent dans la littérature montrant une modification par les polluants atmosphériques de la distribution des lipides de type eicosanoïde (dérivés d'acides gras polyinsaturés) (Beck et al., 2013; Behrendt et al., 2001a) (**cf. partie 4.1.2. du chapitre I**).

L'altération de la composition chimique des lipides externes par les polluants atmosphériques est une nouvelle approche dans la littérature. Un travail a déjà été réalisé par notre équipe sur la modification de la fraction lipidique externe d'un pollen de faible pouvoir allergisant: le pollen de pin (*Pinus halepensis*) (Naas et al., 2016). Les effets potentiels de cette modification sur l'allergie et l'inflammation ne sont pas connus. Afin d'étudier cette possibilité, nous avons décidé d'approfondir nos travaux de modification chimique sur des pollens très allergisants : les pollens de fléole des prés et de bouleau.

Ce chapitre est consacré à l'étude des effets chimiques induites par une exposition du pollen expérimentalement aux polluants atmosphériques. Dans un premier temps nous présentons une comparaison entre les chromatogrammes représentant les lipides extraits des pollens sous forme intacte et polluée par (i) le dioxyde d'azote, (ii) par l'ozone et (iii) par un mélange de deux polluants gazeux (**cf. partie 2.**). Ensuite nous exposons les études d'identification et de quantification des espèces chimiques extraites du pollen pollué en phase organique (**cf. partie 3.**) et aqueuse (**cf. partie 4.**). Enfin les résultats préliminaires concernant l'altération de la quantité de protéines totales par une exposition *in vitro* à l'ozone seront également présentés dans la **partie 5**.

## 2. Effets des polluants sur les fractions lipidiques des pollens de fléole des prés et de bouleau

Le tableau IV.1 résume les concentrations des polluants gazeux auxquelles chacun des deux pollens a été exposé pendant une durée de 16h. Les grains de pollen de fléole des prés ont été exposés à une concentration importante de 1000 ppb d’ozone afin de faciliter l’identification des espèces chimiques modifiées.

Pollen	[O <sub>3</sub> ] ppb	[NO <sub>2</sub> ] ppb	[O <sub>3</sub> ] ppb + [NO <sub>2</sub> ] ppb
Fléole des prés	100 et 1000	100	[O <sub>3</sub> ]=100 + [NO <sub>2</sub> ]=100
Bouleau	130	100	[O <sub>3</sub> ]=130 + [NO <sub>2</sub> ]=100

*Tableau IV.1: Concentrations des polluants gazeux auxquelles les pollens ont été exposés durant ce travail.*

### 2.1 Profil lipidique des pollens exposés au dioxyde d’azote

Les chromatogrammes représentant les lipides extraits des pollens de fléole des prés et de bouleau sous la forme intacte (noir) et polluée par le NO<sub>2</sub> (rouge) sont représentés respectivement sur les figures IV.1 et IV.2. Les valeurs des aires des pics sur chacun des chromatogrammes du pollen intact et pollué sont similaires. Cette similarité entre les profils lipidiques extraits du pollen sous ces deux formes signifie donc que le dioxyde d’azote ne réagit pas avec les espèces organiques extractibles de la fraction lipidique externe.

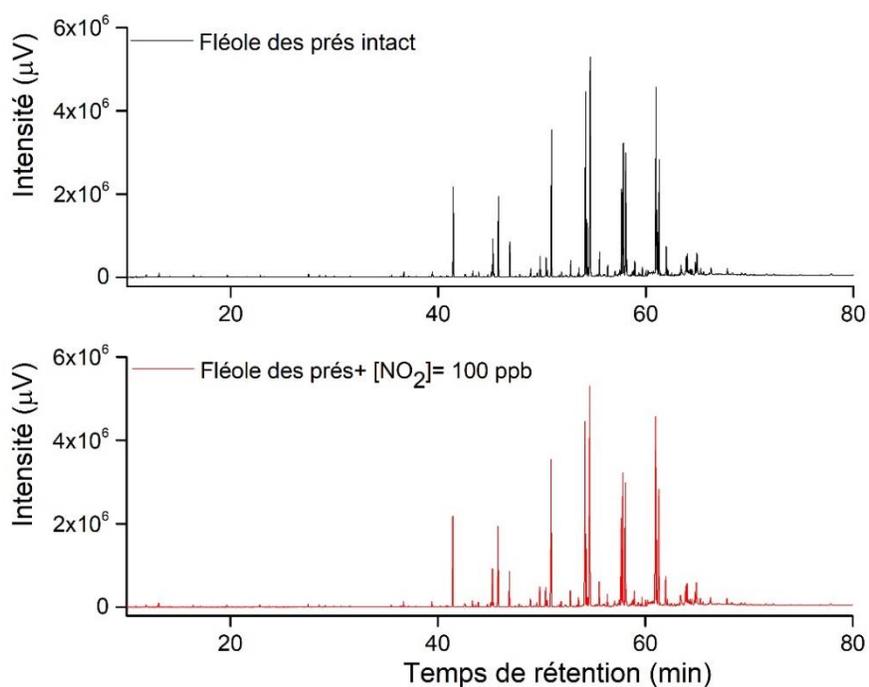


Figure IV. 1: Chromatogrammes (GC-FID) des lipides externes extraits du pollen de fléole des prés intact et exposé 16 heures à 100 ppb de NO<sub>2</sub>.

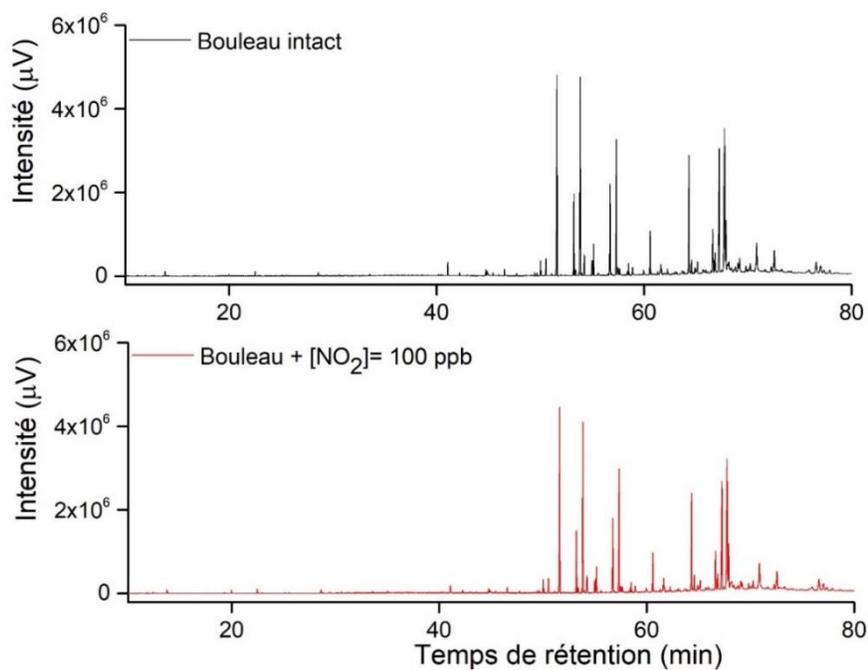


Figure IV. 2: Chromatogrammes (GC-FID) des lipides externes extraits du pollen de bouleau intact et exposé 16 heures à 100 ppb de NO<sub>2</sub>.

## 2.2 Profil lipidique des pollens exposés à l'ozone

Les figure IV.3 et IV.4 permettent de comparer les profils lipidiques extraits respectivement des pollens de bouleau et de fléole des prés selon le traitement subi : sous forme intact (noir), exposé à 100 et 130 ppb d'ozone (bleu) et à 1000 ppb d'ozone (vert). Cette exposition n'a pas induit la formation de nouvelles espèces et ceci est confirmée par l'absence de l'apparition de nouveaux pics sur les chromatogrammes du pollen pollué. La réactivité des lipides avec les molécules d'ozone est visualisée par la variation entre le ratio des intensités des pics représentés sur les chromatogrammes du pollen intact et pollué. Une diminution des valeurs des intensités est observée entre les temps 52 min et 68 min sur le chromatogramme du pollen de bouleau pollué (figure IV.3) et entre les temps 52 min et 62 min sur celui du pollen de fléole des prés pollué (figure IV.4). L'apparition des produits de cette exposition est confirmée par l'augmentation de l'intensité de certains pics sur ces chromatogrammes. La modification chimique du pollen de fléole des prés est plus importante à une exposition à 1000 ppb d'ozone ce qui a rendu plus facile l'identification des espèces organiques modifiées.

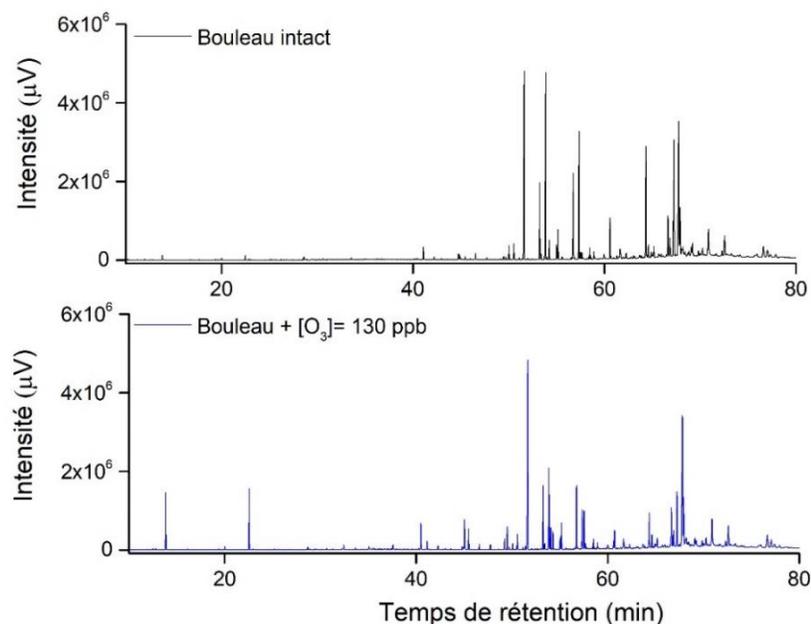


Figure IV. 3: Chromatogrammes (GC-FID) des lipides externes extraits du pollen de bouleau intact et exposé 16 heures à 130 ppb d'O<sub>3</sub>.

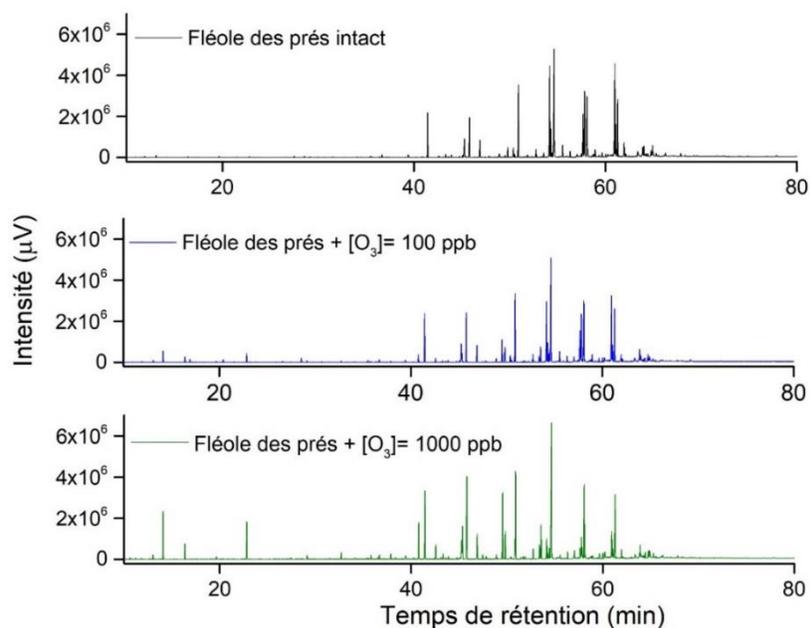


Figure IV. 4: Chromatogrammes (GC-FID) des lipides externes extraits du pollen de fléole des prés intact et exposé 16 heures à 100 et 1000 ppb d'O<sub>3</sub>.

Durant ce travail nous avons observé en microscopie électronique à balayage les grains de pollen de fléole des prés exposés à 100 et 1000 ppb d'ozone. Nous nous sommes basés sur l'analyse de quelques dizaines de grains de pollen afin d'observer les effets de ces expositions sur la modification de la paroi pollinique. Les images (a), (b) et (c) sur la figure IV.5 représentent respectivement le pollen sous forme intacte et polluée à 100 et 1000 ppb d'ozone.



Figure IV. 5: Images observées en microscopie électronique à balayage des grains de pollen de fléole des prés (a) intact, (b) exposé à 100 ppb d'O<sub>3</sub> et (c) à 1000 ppb d'O<sub>3</sub>.

Motta et al. ont observé la rupture du grain de pollen de fléole des près et la libération de ses granules cytoplasmiques après exposition *in vitro* à 700 ppb d'ozone (**cf. figure I.11**) (Motta et al., 2006). Pourtant nous n'avons pas observé de tel comportement. L'exposition à l'ozone n'a pas induit une modification physique du pollen même à une concentration importante de 1000 ppb d'ozone. Afin de pouvoir expliquer cette contradiction, nous formulons plusieurs hypothèses :

- (i) Les informations sur les grains de pollen de fléole des près (date de récolte, état de fraîcheur) ne sont pas mentionnées dans la publication de Motta et al. (Motta et al., 2006). En effet un grain de pollen « frais » (date de récolte récente) pourrait se fragiliser plus facilement sous l'effet d'une pollution atmosphérique qu'un grain de pollen intact plus ancien (Behrendt et al., 1999; Grote et al., 2001).
- (ii) Des cassures de grains de pollen sont possibles durant les manipulations des grains de pollen ou lors de leur exposition aux polluants (selon la géométrie du réacteur).
- (iii) Seules des études qualitatives ont été réalisées lors des travaux de Motta et al., ceci ne nous permet pas d'émettre des conclusions significatives sur la rupture des grains de pollen par les polluants gazeux par manque de données quantitatives (pas d'études statistiques sur un grand nombre de grains de pollen).

Des recherches plus approfondies doivent être menées afin de vérifier si l'état de fraîcheur pourrait influencer la cassure des grains de pollen par la pollution atmosphérique. Des observations microscopiques sur un plus grand nombre de grains de pollen fraîchement collectés et ensuite exposés *in vitro* aux polluants gazeux pourraient nous confirmer cette hypothèse et permettre ainsi de réaliser des études statistiques.

### **2.3 Profil lipidique des pollens exposés à un mélange d'ozone et de dioxyde d'azote**

La comparaison des profils lipidiques représentés sur les chromatogrammes du pollen exposé à l'ozone seul et aux deux polluants ensemble (figure IV.6 et IV.7) montre que la variation des intensités des pics est plus significative sur les chromatogrammes du pollen exposé uniquement à l'ozone. À partir de cette comparaison on suppose que l'exposition au NO<sub>2</sub> pourrait avoir un effet inhibiteur sur la réactivité de l'ozone sur les espèces organiques extractibles des lipides externes.

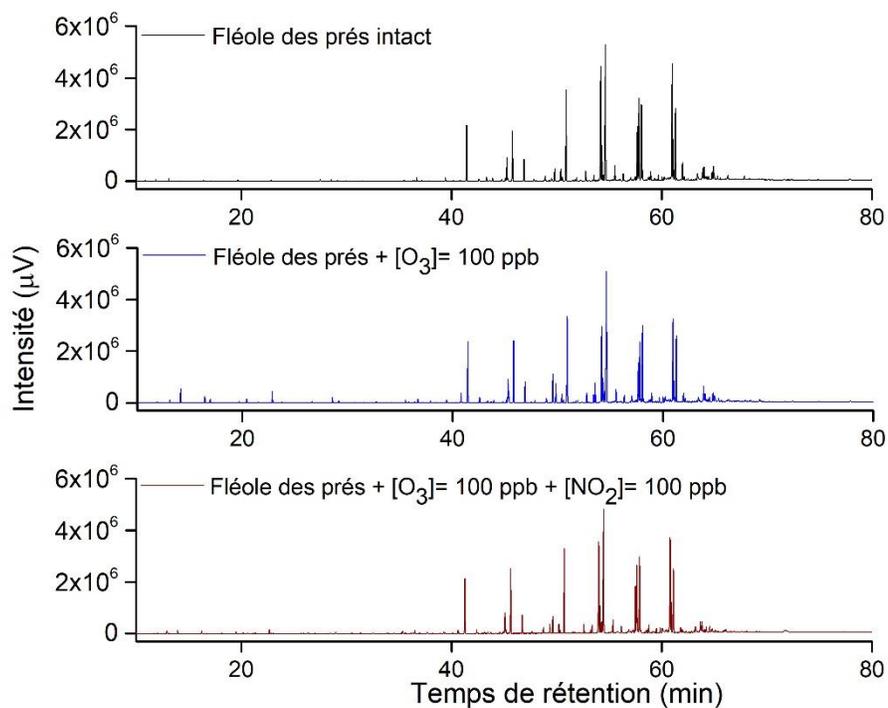


Figure IV. 6: Chromatogrammes (GC-FID) des lipides externes extraits du pollen de fléole des prés selon le traitement subi.

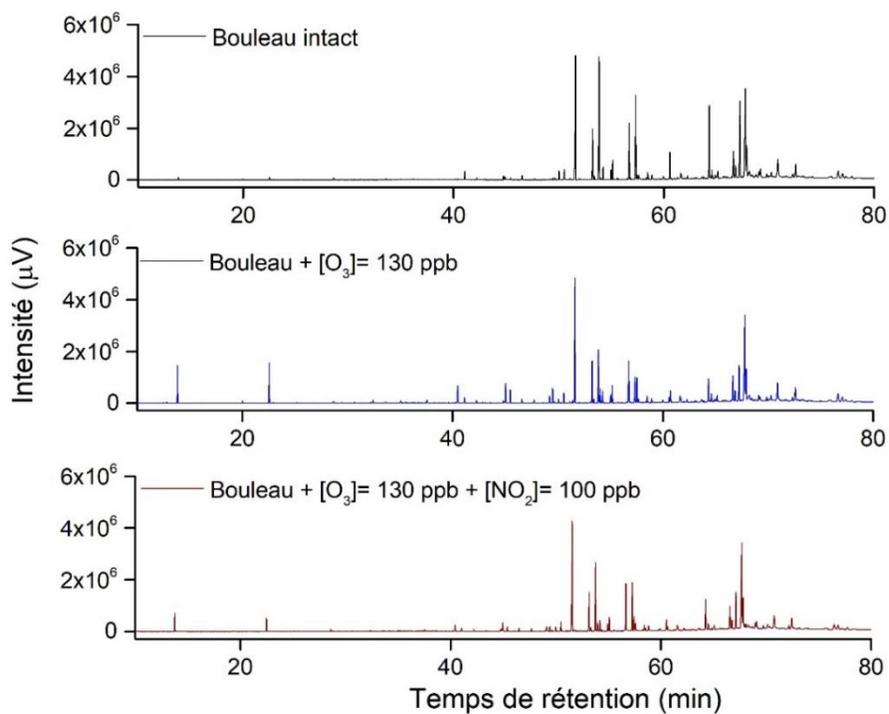


Figure IV. 7: Chromatogrammes (GC-FID) des lipides externes extraits du pollen de bouleau selon le traitement subi.

### **3. Etude de la composition chimique du pollen pollué *in vitro* et extrait par le dichlorométhane**

Dans cette partie, nous allons détailler la modification des fractions massiques des familles organiques (alcanes, alcools, alcènes, acides gras saturés et aldéhydes) extraites par le dichlorométhane du pollen pollué expérimentalement par les polluants gazeux selon le .

#### **3.1 Effets sur les alcanes et les alcools**

Les deux figures IV.8 et IV.9 représentent les concentrations massiques des alcanes et des alcools extraits des pollens de fléole des prés et de bouleau sous les formes intactes et polluées. Les axes horizontaux représentent les quatre types d'échantillons étudiés pour chacun des deux pollens. Le tableau IV.2 regroupe les alcanes et les alcools identifiés et quantifiés dans les extraits organiques des pollens intacts et exposés aux polluants gazeux.

L'ozone et le dioxyde d'azote ne possèdent pas une réactivité sur les alcanes et les alcools localisés dans les lipides externes. Les concentrations massiques moyennes des alcanes extraits des pollens intacts et pollués est de  $1801 \pm 105 \text{ ng.mg}^{-1}$  pour la fléole des prés et de  $167 \pm 29 \text{ ng.mg}^{-1}$  pour le bouleau. La famille des alcools atteint une concentration moyenne respectivement égale à  $26 \pm 4 \text{ ng.mg}^{-1}$  et  $1013 \pm 171 \text{ ng.mg}^{-1}$  dans les extraits organiques des pollens de fléole des prés et de bouleau intacts et pollués.

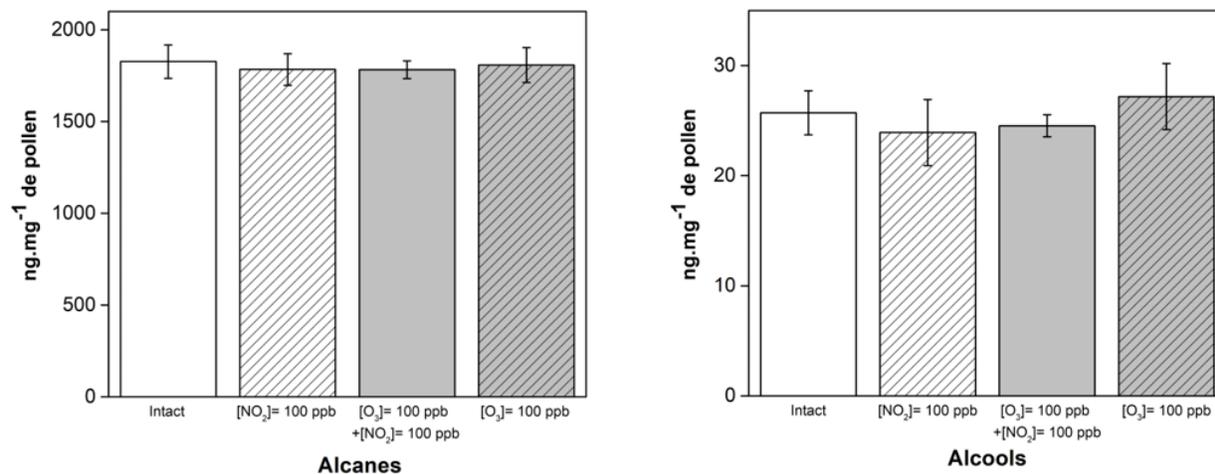


Figure IV. 8: Concentrations massiques des alcanes et des alcools extraits du pollen de fléole des prés selon le traitement subi.

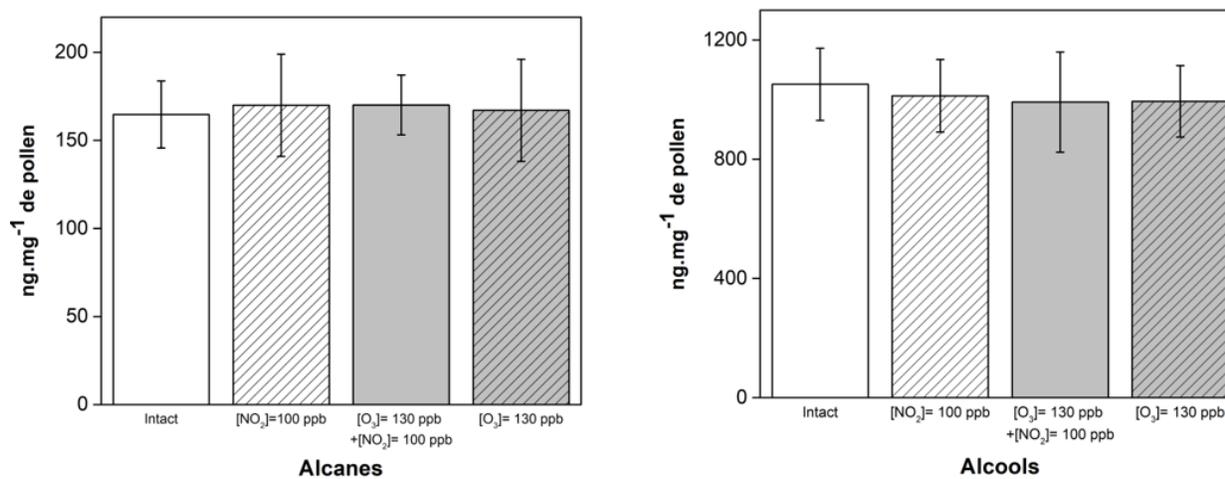


Figure IV. 9: Concentrations massiques des alcanes et des alcools extraits du pollen de bouleau selon le traitement subi.

T <sub>R</sub> GC/FID (min)	Masse (ng.mg <sup>-1</sup> de pollen)				
	Formules brutes	Intact	[NO <sub>2</sub> ]= 100 ppb	[O <sub>3</sub> ]= 100 ppb +[NO <sub>2</sub> ]= 100 ppb	[O <sub>3</sub> ]= 100 ppb

## ALCANES extraits du pollen de fléole des prés

Heptadécane	32,6	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	5 ±1	4 ±1	4 ±1	5 ±1
Nonadécane	37,8	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub>	3 ±1	3 ±1	5 ±1	5 ±1
Hénéicosane	42,5	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub>	9 ±14	7 ±1	10 ±1	11 ±1
Docosane	44,8	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub>	5 ±1	4 ±1	4 ±1	4 ±1
Tricosane	46,8	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub>	78 ±9	64 ±3	66 ±9	72 ±1
Tétracosane	48,9	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub>	19 ±3	16 ±3	15 ±1	17 ±3
Pentacosane	50,8	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub>	338 ±21	329 ±7	333 ±7	336 ±9
Hexacosane	52,7	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub>	38 ±4	38 ±4	34 ±1	33 ±5
Heptacosane	54,6	C <sub>27</sub> H <sub>56</sub>	656 ±3	653 ±52	646 ±10	649 ±19
Octacosane	56,3	C <sub>28</sub> H <sub>58</sub>	28 ±3	24 ±2	24 ±1	26 ±3
Nonacosane	58,3	C <sub>29</sub> H <sub>60</sub>	317 ±21	321 ±2	318 ±4	322 ±34
Triacotane	60,3	C <sub>30</sub> H <sub>62</sub>	21 ±2	18 ±2	18 ±2	19 ±2
Hentriacotane	61,0	C <sub>31</sub> H <sub>64</sub>	311 ±22	304 ±10	305 ±12	309 ±14
Masse totale			1828 ±105	1785 ±89	1782 ±50	1808 ±94

## ALCOOLS extraits du pollen de fléole des prés

Hexadécanol	39,4	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O	12 ±1	11 ±1	10 ±1	13 ±1
Octadécanol	43,8	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> O	6 ±1	5 ±1	6 ±1	6 ±1
Docosanol	51,8	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> O	8 ±1	8 ±2	8 ±1	9 ±2
Masse totale			26 ±3	24 ±4	24 ±3	28 ±4

T <sub>R</sub> GC/FID (min)	Masse (ng.mg <sup>-1</sup> de pollen)				
	Formules brutes	Intact	[NO <sub>2</sub> ]= 100 ppb	[O <sub>3</sub> ]= 130 ppb +[NO <sub>2</sub> ]= 100 ppb	[O <sub>3</sub> ]= 130 ppb

## ALCANES extraits du pollen de bouleau

Hénéicosane	42,5	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub>	8 ±1	10 ±2	10 ±1	11 ±2
Tricosane	46,8	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub>	20 ±3	18 ±4	17 ±3	20 ±3
Pentacosane	50,8	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub>	58 ±5	62 ±11	62 ±7	61 ±12
Heptacosane	54,6	C <sub>27</sub> H <sub>56</sub>	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 <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O	1 ±1	1 ±1	1 ±1	1 ±1
Octadécanol	43,5	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O	2 ±1	2 ±1	2 ±1	2 ±1
Eicosanol	47,5	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> O	12 ±1	12 ±1	14 ±1	14 ±2
Hénéicosanol	49,6	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub> O	7 ±1	7 ±1	8 ±2	8 ±1
Docosanol	51,5	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> O	861 ±92	826 ±101	787 ±144	821 ±84
Tricosanol	53,3	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub> O	21 ±4	22 ±4	21 ±3	19 ±2
Tétracosanol	55,1	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> O	103 ±18	99 ±9	115 ±13	86 ±25
Hexacosanol	58,8	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> O	27 ±3	26 ±2	27 ±4	25 ±2
Octacosanol	61,6	C <sub>28</sub> H <sub>58</sub> O	18 ±2	18 ±3	17 ±2	18 ±2
Masse totale			1052 ±123	1013 ±123	992 ±171	994 ±120

Tableau IV. 1: Concentrations massiques des alcanes et des alcools extraits des pollens de fléole de prés et de bouleau intacts et exposés à O<sub>3</sub> et NO<sub>2</sub>.

### 3.2 Consommation des alcènes par ozonolyse

La variation des fractions massiques totales des alcènes extraits des pollens de fléole de prés et de bouleau est représentée respectivement sur les deux figures IV.10 et IV.11. Les tableaux IV.3 et IV.4 regroupent l'ensemble des alcènes identifiés et quantifiés dans les extraits organiques des pollens intacts et pollués.

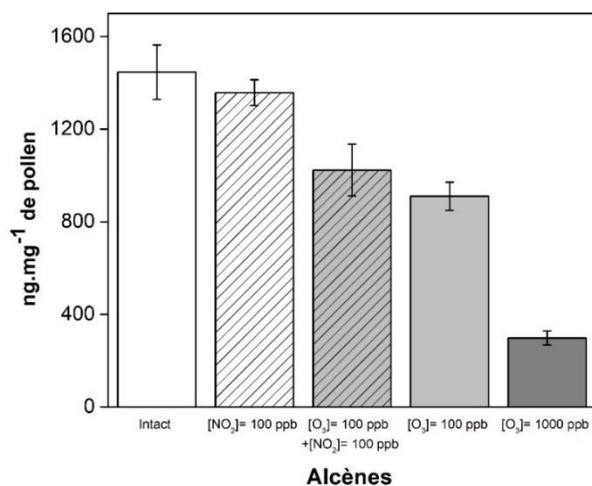


Figure IV. 10: Modification de la fraction massique totale des alcènes du pollen de fléole des prés sous l'effet de l'exposition *in vitro* aux polluants gazeux.

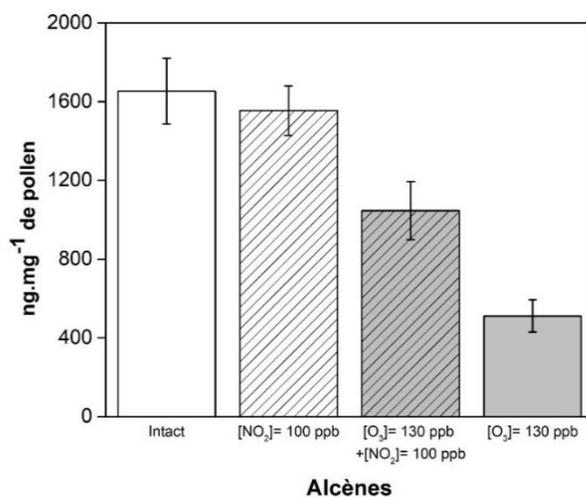


Figure IV. 11: Modification de la fraction massique totale des alcènes du pollen de bouleau sous l'effet de l'exposition *in vitro* aux polluants gazeux.

Chapitre IV. Modification de la fraction lipidique du pollen par les polluants atmosphériques

T <sub>R</sub> GC/FID (min)	Masse (ng.mg <sup>-1</sup> de pollen)						
	Formules brutes	Intact	[NO <sub>2</sub> ]= 100 ppb	[O <sub>3</sub> ]= 100 ppb +[NO <sub>2</sub> ]=100 ppb	[O <sub>3</sub> ]= 100 ppb	[O <sub>3</sub> ]= 1000 ppb	
ALCÈNES							
Décène	27,5	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub>	5 ±1	2 ±1	1 ±1	3 ±1	3 ±1
Pentacosène	50,4	C <sub>25</sub> H <sub>50</sub>	41 ±6	28 ±4	29 ±4	23 ±3	9 ±2
Heptacosène	54,2	C <sub>27</sub> H <sub>54</sub>	464 ±47	431 ±14	341 ±31	280 ±24	86 ±8
Octacosène	56,2	C <sub>28</sub> H <sub>56</sub>	58 ±8	49 ±7	47 ±5	43 ±3	16 ±2
Nonacosène	57,3	C <sub>29</sub> H <sub>58</sub>	297 ±18	282 ±11	200 ±29	193 ±11	51 ±4
Triacotène	59,0	C <sub>30</sub> H <sub>60</sub>	39 ±7	32 ±4	31 ±4	33 ±2	13 ±3
Hentriacontène	60,9	C <sub>31</sub> H <sub>62</sub>	541 ±31	533 ±16	372 ±40	335 ±18	119 ±12
Masse totale			1445 ±118	1357 ±57	1021 ±114	910 ±62	297 ±32

Tableau IV. 2: Les masses des alcènes quantifiés dans le pollen de fléole de prés intact et pollué.

T <sub>R</sub> GC/FID (min)	Masse (ng.mg <sup>-1</sup> de pollen)					
	Formules brutes	Intact	[NO <sub>2</sub> ]= 100 ppb	[O <sub>3</sub> ]= 130 ppb +[NO <sub>2</sub> ]=100 ppb	[O <sub>3</sub> ]= 130 ppb	
ALCÈNES						
Décène	27,5	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub>	4 ±1	4 ±1	2 ±1	1 ±1
Pentacosène	50,4	C <sub>25</sub> H <sub>50</sub>	52 ±4	51 ±6	31 ±4	22 ±3
Heptacosène	54,2	C <sub>27</sub> H <sub>54</sub>	824 ±73	817 ±70	560 ±81	316 ±53
Nonacosène	57,3	C <sub>29</sub> H <sub>58</sub>	596 ±62	527 ±44	368 ±53	145 ±22
Hentriacontène	60,9	C <sub>31</sub> H <sub>62</sub>	179 ±27	155 ±15	86 ±9	28 ±4
Masse totale			1655 ±167	1554 ±136	1047 ±148	512 ±83

Tableau IV. 3: Les masses des alcènes quantifiés dans le pollen de bouleau intact et pollué.

Les alcènes extraits des lipides externes ne sont pas modifiés après une exposition des pollens à 100 ppb de NO<sub>2</sub>. La concentration massique moyenne des alcènes extraits des pollens intacts et pollués par le NO<sub>2</sub> est de 1401±118 ng.mg<sup>-1</sup> pour la fléole des prés et de 1605±167 ng.mg<sup>-1</sup> pour le bouleau.

Contrairement aux alcools et aux alcanes, les alcènes sont consommés après une pollution *in vitro* par les polluants. En effet, les pics dont les intensités diminuent sur les chromatogrammes du pollen pollué correspondent à ces espèces (figures IV.3, IV.4, IV.6 et IV.7).

On constate que la perte des fractions massiques des alcènes est plus significative quand le pollen est exposé uniquement à l'ozone. Par exemple pour le pollen de bouleau la masse des alcènes consommés après exposition à l'ozone est égale à 1143±167 ng.mg<sup>-1</sup>. Celle-ci est plus importante que celle perdue par une exposition simultanée aux deux polluants (608±167 ng.mg<sup>-1</sup>).

Après une exposition respective à 100 ppb et 1000 ppb d'ozone, environ 30 % et 80 % de la totalité des alcènes extraits du pollen de fléole des prés intact ont réagi. On constate donc que la diminution de la masse des alcènes ne semble pas directement proportionnelle à la dose d'ozone reçue. Nous supposons donc que les doubles liaisons ne sont pas accessibles à l'ozone en milieu condensé. En effet la répartition des alcènes sur la paroi pollinique n'est pas connue.

Certains approfondissements sont nécessaires concernant nos études de vieillissement des grains de pollen dans l'atmosphère. Des expositions progressives à des concentrations réelles (50 ou 100 ppb) pendant une heure jusqu'à atteindre une durée finale de 16 h pourraient nous informer sur la vitesse à laquelle les lipides réagissent dans l'atmosphère lors du transport du grain de pollen.

### **3.3 Modification des acides gras saturés et des aldéhydes**

Les figures IV.12 et IV.13 représentent la variation des fractions massiques des acides gras saturés et des aldéhydes extraits des pollens selon le traitement subi. L'ensemble des espèces identifiées et quantifiées est représenté dans les tableaux IV.5 et IV.6.

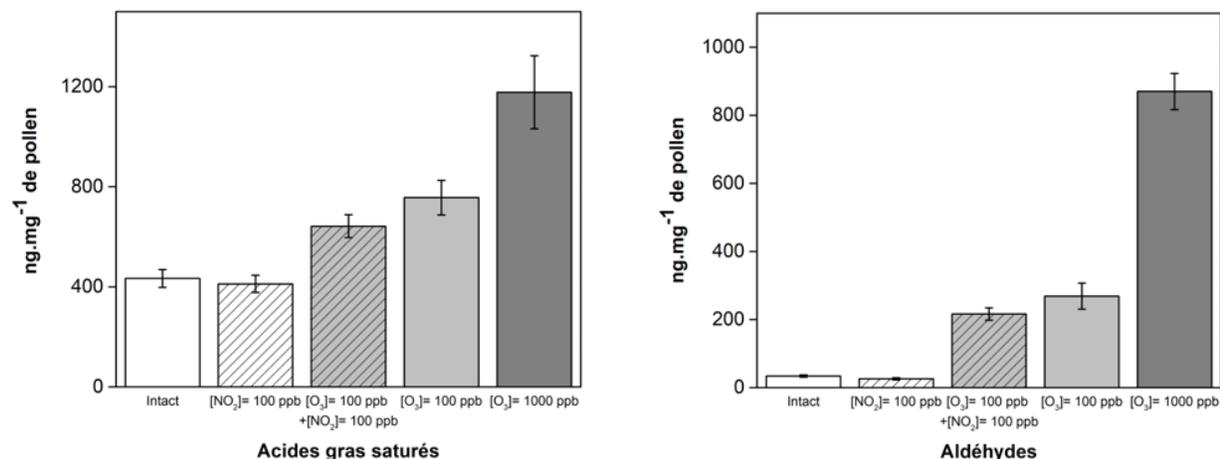


Figure IV. 12: Variation des concentrations massiques totales des acides gras saturés et des aldéhydes extraits du pollen de fléole des prés sous l'effet de l'exposition in vitro aux polluants gazeux.

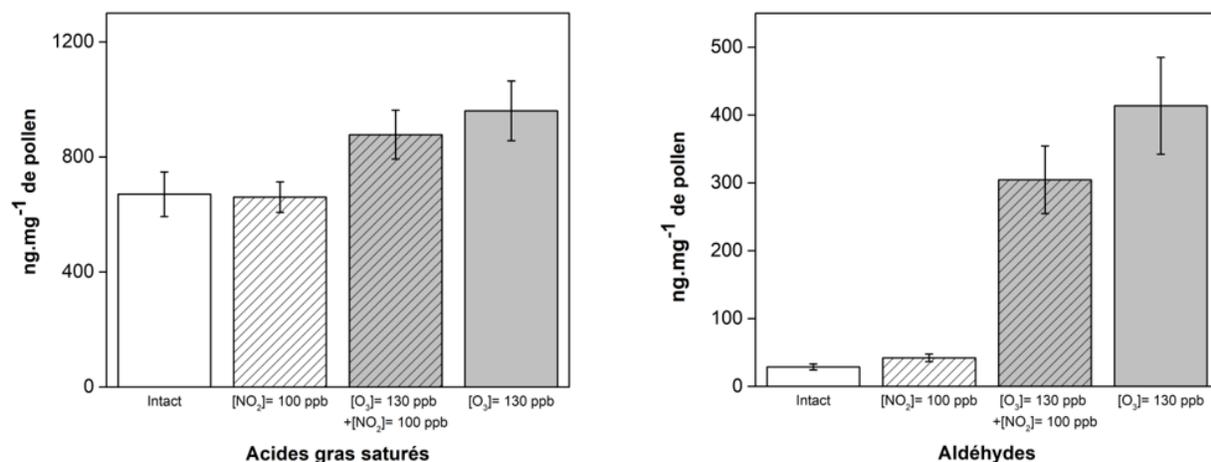


Figure IV. 13: Variation des concentrations massiques totales des acides gras saturés et des aldéhydes extraits du pollen de bouleau sous l'effet de l'exposition in vitro aux polluants gazeux.

Comme pour les autres espèces, les acides gras saturés et les aldéhydes n'ont pas été modifiés par l'exposition à 100 ppb de NO<sub>2</sub>. Ils atteignent respectivement une concentration massique moyenne de  $424 \pm 46$  ng.mg<sup>-1</sup> et de  $30 \pm 6$  ng.mg<sup>-1</sup> dans le pollen de fléole des prés et de  $666 \pm 82$  ng.mg<sup>-1</sup> et de  $36 \pm 6$  ng.mg<sup>-1</sup> dans le pollen de bouleau lorsqu'ils sont sous formes intacte et polluée par le NO<sub>2</sub>.

Toutes les masses des acides gras saturés et des aldéhydes sont augmentées consécutivement après une exposition aux polluants, alors que le comportement inverse a été observé pour tous les alcènes.

Une augmentation plus faible des acides gras saturés et des aldéhydes est remarquée lorsque le pollen est exposé aux deux polluants simultanément plutôt qu'à l'ozone seul. Par exemple la masse des acides gras saturés produites est de  $322 \pm 64$  ng.mg<sup>-1</sup> après l'exposition du pollen de fléole des prés à 100 ppb

d'ozone. Cette masse est plus importante que celle produite après l'exposition à l'O<sub>3</sub> et au NO<sub>2</sub> ensemble ( $208 \pm 50$  ng.mg<sup>-1</sup>). Ceci valide l'hypothèse que nous avons réalisée dans la **partie 2.3** sur le fait que le dioxyde d'azote pourrait avoir un effet inhibiteur sur la réactivité de l'ozone sur les espèces organiques extractibles du pollen lorsque les deux polluants sont exposés ensemble. Les fractions massiques des aldéhydes détectées à l'état de traces dans le pollen intact sont fortement augmentées par une pollution de 100 et de 130 ppb d'ozone. Leur masse produite est de  $235 \pm 38$  ng.mg<sup>-1</sup> pour le pollen de fléole des prés et de  $383 \pm 72$  ng.mg<sup>-1</sup> pour le bouleau.

La concentration plus élevée de 1000 ppb d'ozone a été choisie uniquement pour faciliter l'identification des produits de la réaction de l'ozone sur les lipides du pollen de fléole des prés et donc elle n'a pas été conçue pour être représentative de l'exposition atmosphérique. L'exposition à cette concentration a induit une production plus importante égale  $747 \pm 149$  ng.mg<sup>-1</sup> en acides gras saturés et  $836 \pm 53$  ng.mg<sup>-1</sup> en aldéhydes.

Le potentiel inflammatoire de certains acides gras saturés C16, C18, C20 et C22 est bien documenté dans la littérature (Bashir et al., 2013a). Après l'exposition du pollen de fléole des prés à 100 ppb d'ozone, les fractions massiques de ces acides augmentent d'un facteur de 0,62 pour le C18, de 2,43 pour le C20 et de 6,25 pour le C22. La pollution du pollen de bouleau induit également une augmentation remarquable d'un facteur de 8 pour le C18 et d'un facteur de 12,5 pour le C20. L'enrichissement des pollens pollués par ces acides saturés pourrait induire une libération accrue des cytokines et aussi stimulation importante des cellules CD/NKT durant la réaction allergique (Bashir et al., 2013a). Cette hypothèse pourra être considérée comme l'une des explications de l'amplification de l'inflammation des voies aériennes induite par le pollen dans une zone polluée.

Chapitre IV. Modification de la fraction lipidique du pollen par les polluants atmosphériques

T <sub>R</sub> GC/FID (min)	Formules brutes	Masse (ng.mg <sup>-1</sup> de pollen)					
		Intact	[NO <sub>2</sub> ]= 100 ppb	[O <sub>3</sub> ]= 100 ppb +[NO <sub>2</sub> ]=100 ppb	[O <sub>3</sub> ]= 100 ppb	[O <sub>3</sub> ]= 1000 ppb	
<b>ACIDES GRAS SATURÉS</b>							
Acide Pentanoïque	9,9	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	1 ±1	1 ±1	1 ±1	1 ±1	2 ±1
Acide Hexanoïque	13,0	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	6 ±1	4 ±1	7 ±1	8 ±1	15 ±1
Acide Heptanoïque	16,3	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	3 ±1	2 ±1	17 ±2	21 ±3	56 ±3
Acide Octanoïque	19,7	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	3 ±1	4 ±1	8 ±1	5 ±1	9 ±1
Acide Nonanoïque	22,8	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	4 ±1	3 ±1	27 ±4	31 ±4	133 ±12
Acide Décanoïque	25,2	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	1 ±1	1 ±1	2 ±1	2 ±1	5 ±1
Acide Undécanoïque	29,1	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	2 ±1	2 ±1	4 ±1	6 ±1	14 ±1
Acide Dodécanoïque	31,5	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	2 ±1	2 ±1	2 ±1	2 ±1	3 ±1
Acide Tetradécanoïque	36,5	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	10 ±1	9 ±1	10 ±1	10 ±1	15 ±3
Acide Pentadécanoïque	38,9	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	1 ±1	3 ±1	3 ±1	1 ±1	3 ±1
Acide Hexadécanoïque	41,4	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	160 ±13	157 ±10	180 ±9	185 ±16	232 ±50
Acide Heptadécanoïque	43,6	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	3 ±1	2 ±1	2 ±1	5 ±1	6 ±1
Acide Octadécanoïque	45,7	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	159 ±16	145 ±10	222 ±8	268 ±1	325 ±49
Acide Nonadécanoïque	47,7	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	5 ±1	5 ±1	5 ±1	8 ±1	12 ±1
Acide Eicosanoïque	49,8	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	41 ±1	38 ±3	55 ±7	77 ±9	116 ±8
Acide Hénécésanoïque	51,7	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	8 ±1	4 ±1	3 ±1	11 ±1	8 ±1
Acide Docosanoïque	53,5	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	16 ±1	17 ±3	54 ±5	63 ±9	154 ±8
Acide Tétracosanoïque	57,0	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	5 ±1	6 ±1	22 ±2	28 ±7	40 ±3
Acide Octacosanoïque	64,3	C <sub>28</sub> H <sub>58</sub> O <sub>2</sub>	4 ±1	8 ±1	18 ±2	24 ±4	33 ±4
Masse totale			434 ±46	413 ±41	642 ±50	756 ±64	1181 ±150
<b>ALDÉHYDES</b>							
Nonanal	14,1	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	1 ±1	1 ±1	35 ±3	51 ±6	194 ±13
Octadécanal	40,8	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O	3 ±1	2 ±1	29 ±3	41 ±10	158 ±13
Eicosanal	45,3	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	5 ±1	3 ±1	22 ±1	30 ±4	109 ±5
Hénécésanal	47,5	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O	5 ±1	4 ±1	3 ±1	9 ±1	19 ±1
Docosanal	49,6	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O	10 ±1	8 ±1	100 ±6	103 ±13	318 ±16
Tétracosanal	53,4	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O	9 ±1	7 ±1	27 ±3	35 ±4	72 ±5
Masse totale			34 ±6	25 ±6	216 ±17	269 ±38	870 ±53

Tableau IV. 4: Les masses des acides gras saturés et aldéhydes quantifiés dans le pollen de fléole de prés intact et pollué par l'O<sub>3</sub> et le NO<sub>2</sub>.

T <sub>R</sub> GC/FID (min)	Formules brutes	Masse (ng.mg <sup>-1</sup> )				
		Intact	[NO <sub>2</sub> ]= 100 ppb	[O <sub>3</sub> ]= 130ppb +[NO <sub>2</sub> ]=100 ppb	[O <sub>3</sub> ]= 130 ppb	
<b>ACIDES GRAS SATURÉS</b>						
Acide Hexanoïque	13,0	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	2 ±2	2 ±1	3 ±1	4 ±1
Acide Heptanoïque	16,3	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	1 ±1	1 ±1	2 ±1	2 ±1
Acide Octanoïque	19,7	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	2 ±1	3 ±1	3 ±1	3 ±1
Acide Nonanoïque	22,8	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	13 ±2	15 ±1	118 ±14	148 ±19
Acide Dodécanoïque	31,5	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	2 ±1	1 ±1	2 ±2	4 ±1
Acide Hexadécanoïque	41,4	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	16 ±3	15 ±2	14 ±1	18 ±3
Acide Octadécanoïque	45,7	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	13 ±2	20 ±2	36 ±9	58 ±6
Acide Eicosanoïque	49,8	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	8 ±1	8 ±1	48 ±9	68 ±11
Acide Hénécésanoïque	51,7	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	3 ±1	2 ±1	7 ±1	10 ±1
Acide Docosanoïque	53,5	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	238 ±25	228 ±16	268 ±19	254 ±20
Acide Tricosanoïque	55,3	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	46 ±4	42 ±4	48 ±4	45 ±5
Acide Tétracosanoïque	57,0	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	308 ±36	303 ±25	307 ±23	326 ±35
Acide Hexacosanoïque	58,8	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> O <sub>2</sub>	19 ±3	20 ±1	21 ±2	20 ±3
Masse totale			671 ±82	660 ±57	877 ±87	960 ±107
<b>ALDÉHYDES</b>						
Nonanal	14,1	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	14 ±2	21 ±3	139 ±25	181 ±32
Octadécanal	40,8	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O	6 ±1	9 ±1	66 ±11	97 ±16
Eicosanal	45,3	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	4 ±1	7 ±1	71 ±11	97 ±18
Docosanal	49,6	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O	6 ±1	5 ±1	28 ±3	38 ±6
Masse totale			30 ±5	42 ±6	304 ±50	413 ±72

Tableau IV. 5: Les masses des acides gras saturés et aldéhydes quantifiés dans le pollen de bouleau intact et pollué par l'O<sub>3</sub> et le NO<sub>2</sub>.

### 3.4 Réaction d'ozonolyse

La modification de la fraction lipidique externe des pollens provient uniquement de la réactivité de l'ozone sur les nombreux alcènes extractibles de cette fraction. Cette modification est plus importante lorsque les pollens sont exposés uniquement à l'ozone que plutôt aux deux polluants. La diminution de cette réactivité pourrait être expliquée par le fait que les molécules de dioxyde d'azote viennent s'adsorber sur la paroi pollinique externe et empêchent par conséquent la réactivité des molécules d'ozone avec les espèces organiques des lipides externes. Les masses totales des alcènes ont diminué consécutivement après une pollution *in vitro* par l'ozone alors qu'un comportement opposé a été observé pour les familles des acides gras saturés et des aldéhydes. Ceci est expliquée par le mécanisme d'ozonolyse.

L'acide nonanoïque et le nonanal ont été identifiés comme étant les produits majoritaires des réactions d'ozonolyse. Ceci nous confirme que la double liaison est située entre le neuvième et le dixième atome de carbone de la molécule d'alcène. Chaque attaque alcène par l'ozone peut conduire à deux schémas réactionnels produisant chacun un couple de produits (acide gras saturé et aldéhyde) (figure IV.14).

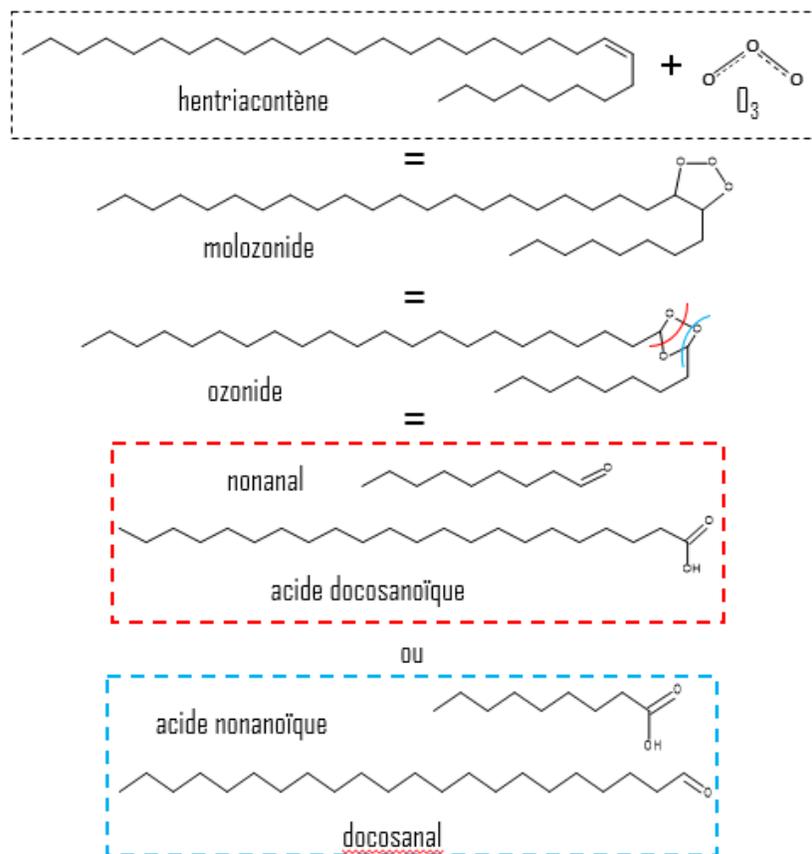
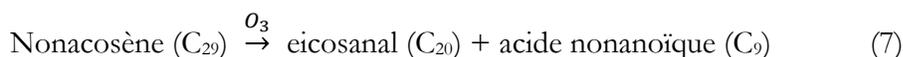
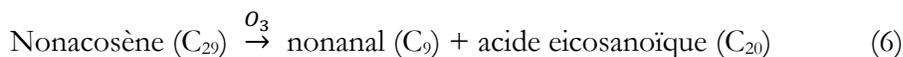
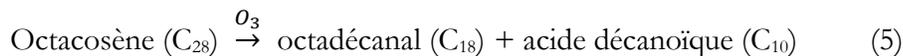
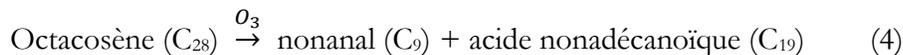
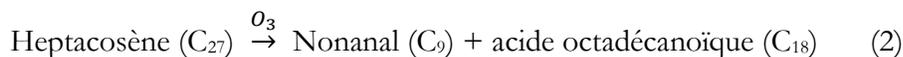
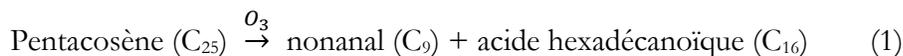
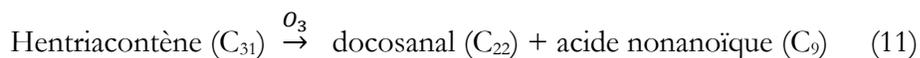
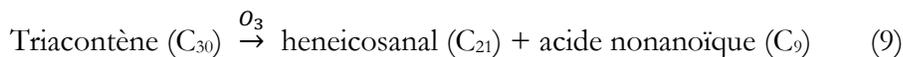
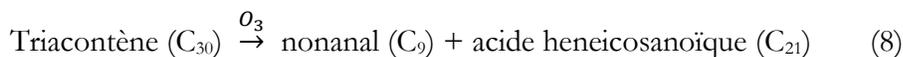


Figure IV. 14: Mécanisme de réaction d'ozonolyse de l'hentriacontène.

Les réactions (1) à (11) résument les réactions d'ozonolyse des alcènes identifiés dans les pollens de fléole des prés et de bouleau. Une seule réaction d'ozonolyse est représentée pour le pentacosène car l'hexadécanal l'un des produits de sa deuxième réaction d'ozonolyse n'est pas identifié dans les extraits du pollen pollué.





Certains alcènes (pentacosène, heptacosène, nonacosène et hentriacontène) extractibles des deux pollens semblent être facilement accessibles à l'ozone. Une exposition de 100 ppb d'ozone induit une élimination entre 35% et 43 % de la fraction massique totale des alcènes extraits du pollen de fléole des prés. Le pentacosène a présenté la réactivité la plus importante, environ 43% de sa masse est consommée. En ce qui concerne le pollen de bouleau on a observé une perte de masse plus importante de ses alcènes entre 59% et 85%. On suppose que les alcènes pourraient être (i) soit différemment positionnés sur la paroi pollinique ce qui les rendraient plus ou moins accessibles à la réaction avec l'ozone ou (ii) soit présents (enrobés) dans un environnement lipidique différent dans lequel la diffusion de l'ozone est défavorisée dans le cas du pollen de fléole.

#### **4. Etude de la composition chimique du pollen pollué *in vitro* et extrait par le PBS**

Ce travail a été effectué afin de s'approcher des conditions physiologiques d'extraction de la fraction lipidique des pollens allergisants soumis à une exposition aux polluants atmosphériques. Les chromatogrammes des lipides extraits par le PBS des pollens de fléole des prés et de bouleau sous la forme intacte et polluée sont représentés respectivement sur la figure IV.15 et IV.16.

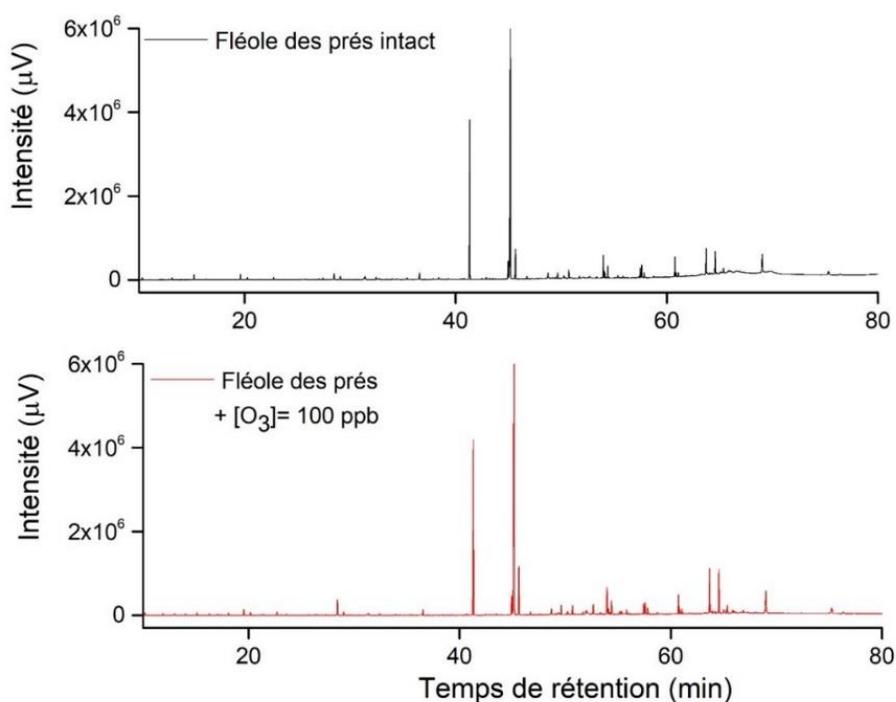


Figure IV. 15 : Chromatogrammes des lipides extraits par le PBS après une durée de 2h du pollen de fléole des prés intact et pollué par 100 ppb d'ozone.

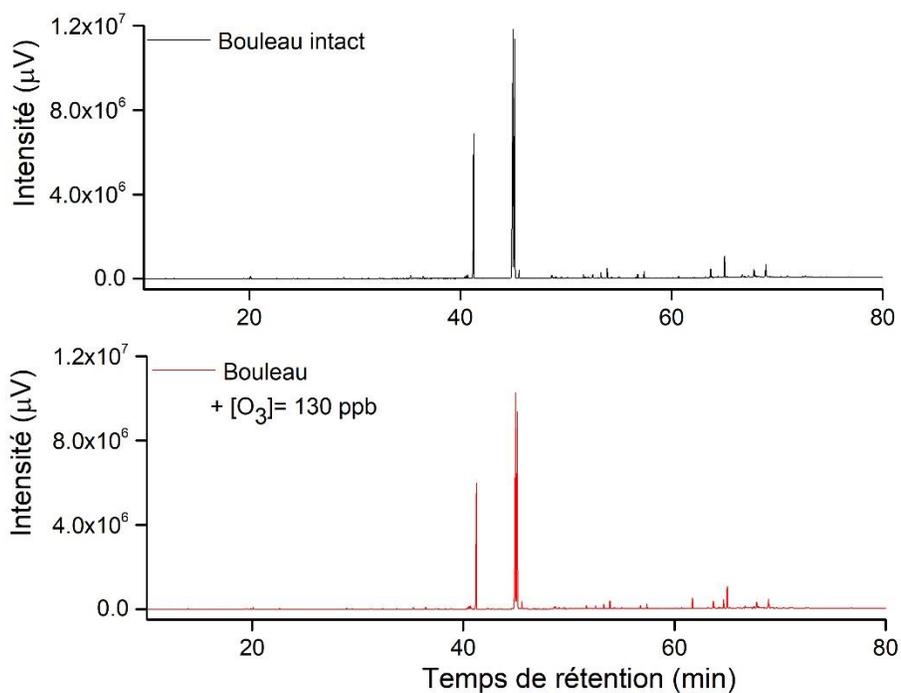


Figure IV. 16 : Chromatogrammes des lipides extraits par le PBS après une durée de 2h du pollen de bouleau intact et pollué par 130 ppb d'ozone.

Trois pics en total ont des intensités élevées sur les chromatogrammes. Ces pics correspondent à l'acide hexadécanoïque (C16:0, 41,4 min), l'acide linoléique (C18:2, 44,7 min) et l'acide  $\alpha$ -linoléique (C18:3, 45,0 min). Les grains de pollen de fléole des prés ont été donc exposés à une concentration de 1000 ppb afin de pouvoir faciliter l'identification des produits formés (chromatogramme non-représenté dans ce manuscrit). La différence entre les intensités des pics représentés sur les deux chromatogrammes des pollens exposés à 100 ppb et à 1000 ppb n'était pas significative. La similarité observée entre les chromatogrammes du pollen intact et pollué montre donc que la fraction lipidique extractible en phase aqueuse des pollens de fléole des prés et de bouleau n'a pas été modifiée par une pollution *in vitro* à l'ozone.

Les fractions massiques des espèces organiques extractibles en phase aqueuse ne semblent donc pas être modifiées par une pollution *in vitro* à l'ozone. Les masses totales des lipides extraits des pollens intacts et pollués sont similaires. Les lipides représentés sur les figures IV.17 atteignent une masse moyenne de  $513 \pm 113 \text{ ng.mg}^{-1}$  dans les extraits du pollen de fléole des prés et de  $1527 \pm 269 \text{ ng.mg}^{-1}$  dans ceux du pollen de bouleau. Les tableaux IV.7 et IV.8 récapitulent les valeurs des espèces organiques extraites par le PBS des pollens de fléole des prés et de bouleau sous forme intacte et polluée.

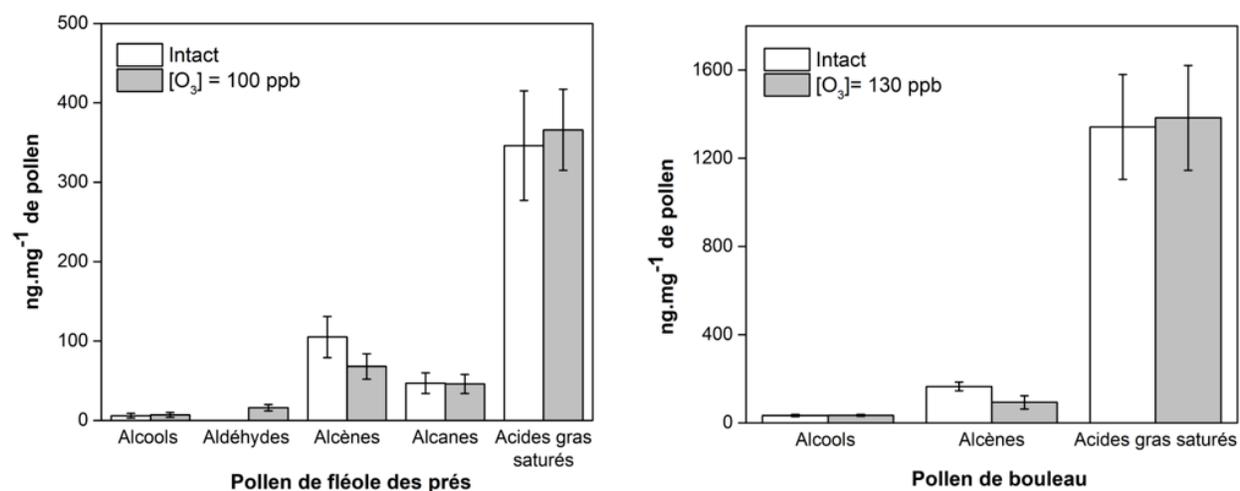


Figure IV. 17: Masse totale de lipides extraits par le PBS des pollens de fléole des prés et bouleau intacts et exposés à l'ozone.

	T <sub>R</sub> GC/FID (min)	Masse (ng.mg <sup>-1</sup> de pollen)		
		Formules brutes	Intact	[O <sub>3</sub> ]=100 ppb
<b>ALCOOLS</b>				
Dodécanol	29,0	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O	2 ±1	3 ±1
Hexadécanol	39,4	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O	3 ±1	3 ±1
Octadécanol	43,8	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> O	1 ±1	1 ±1
Masse totale			6 ±3	7 ±3
<b>ALÉDHYDES</b>				
Nonanal	14,1	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	--	4 ±1
Octadécanal	40,8	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O	--	6 ±1
Docosanal	49,6	C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O	--	6 ±1
Masse totale				16 ±3
<b>ALCÈNES</b>				
Pentacosène	50,4	C <sub>25</sub> H <sub>50</sub>	4 ±1	4 ±2
Heptacosène	54,2	C <sub>27</sub> H <sub>54</sub>	39 ±10	25 ±4
Octacosène	56,2	C <sub>28</sub> H <sub>56</sub>	4 ±1	2 ±1
Nonacosène	57,3	C <sub>29</sub> H <sub>58</sub>	19 ±5	11 ±1
Hentriacontène	60,9	C <sub>31</sub> H <sub>62</sub>	39 ±9	26 ±8
Masse totale			105 ±26	68 ±16
<b>ALCANES</b>				
Tricosane	46,8	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub>	1 ±1	1 ±1
Pentacosane	50,8	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub>	13 ±3	9 ±1
Heptacosane	54,6	C <sub>27</sub> H <sub>56</sub>	18 ±5	18 ±2
Nonacosane	58,3	C <sub>29</sub> H <sub>60</sub>	7 ±2	10 ±3
Hentriacontane	61,2	C <sub>31</sub> H <sub>64</sub>	8 ±2	8 ±5
Masse totale			47 ±13	46 ±12
<b>ACIDES GRAS SATURÉS</b>				
Acide Hexanoïque	13,0	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	3 ±1	2 ±1
Acide Heptanoïque	16,3	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	1 ±1	2 ±1
Acide Octanoïque	19,7	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	3 ±1	5 ±2
Acide Nonanoïque	22,8	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	3 ±1	4 ±1
Acide Décanoïque	25,2	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	1 ±1	1 ±1
Acide Dodécanoïque	31,5	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	1 ±1	3 ±2
Acide Tétradécanoïque	36,5	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	10 ±2	7 ±3
Acide Pentadécanoïque	38,9	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	2 ±1	1 ±1
Acide Hexadécanoïque	41,4	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	258 ±50	278 ±26
Acide Heptadécanoïque	43,6	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	1 ±1	1 ±1
Acide Octadécanoïque	45,7	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	51 ±5	51 ±7
Acide Nonadécanoïque	47,7	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	1 ±1	1 ±1
Acide Eicosanoïque	49,8	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	8 ±2	7 ±1
Acide Docosanoïque	53,5	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	2 ±1	3 ±1
Masse totale			345 ±69	366 ±49

Tableau IV. 6: Concentrations massiques des espèces organiques extraites par le PBS du pollen de fléole des prés intact et exposé à l'ozone.

	T <sub>R</sub> GC/FID (min)	Masse (ng.mg <sup>-1</sup> de pollen)		
		Formules brutes	Intact	[O <sub>3</sub> ]=130 ppb
<b>ALCOOLS</b>				
Docosanol	51,5	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> O	31 ±4	30 ±3
Tétracosanol	55,1	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> O	2 ±1	4 ±1
Masse totale			33 ±5	34 ±4
<b>ALCÈNES</b>				
Pentacosène	50,4	C <sub>25</sub> H <sub>50</sub>	11 ±1	4 ±1
Heptacosène	54,2	C <sub>27</sub> H <sub>54</sub>	83 ±10	53 ±16
Nonacosène	57,3	C <sub>29</sub> H <sub>58</sub>	55 ±7	30 ±10
Hentriacontène	60,9	C <sub>31</sub> H <sub>62</sub>	17 ±2	7 ±3
Masse totale			166 ±20	94 ±30
<b>ACIDES GRAS SATURÉS</b>				
Acide Hexanoïque	13,0	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	1 ±1	1 ±1
Acide Heptanoïque	16,3	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	1 ±1	1 ±1
Acide Nonanoïque	22,8	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	3 ±1	6 ±2
Acide Tétradécanoïque	36,5	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	11 ±1	11 ±2
Acide Hexadécanoïque	41,4	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	1185 ±209	1221 ±196
Acide Heptadécanoïque	43,6	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	5 ±1	4 ±1
Acide Octadécanoïque	45,7	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	47 ±7	46 ±9
Acide Eicosanoïque	49,8	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	11 ±2	12 ±2
Acide Hénéicosanoïque	51,7	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	6 ±1	6 ±3
Acide Docosanoïque	53,5	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	40 ±7	39 ±9
Acide Tricosanoïque	55,3	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	2 ±1	2 ±1
Acide Tétracosanoïque	57,0	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	29 ±5	29 ±10
Acide Hexacosanoïque	58,8	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> O <sub>2</sub>	2 ±1	5 ±1
Masse totale			1343 ±239	1383 ±238

Tableau IV. 7: Concentrations massiques des espèces organiques extraites par le PBS du pollen de bouleau intact et exposé à l'ozone.

## 5. Effets de l'exposition du pollen à la pollution sur la réponse inflammatoire

L'effet de modification de la fraction lipidique externe par la pollution sur la réponse immunitaire et inflammatoire n'est pas détaillé dans la littérature. Il s'agit d'un travail en cours avec Patricia de Nadaï (Maître de conférences, Centre d'Infection et d'Immunologie de Lille, Université de Lille, Institut Pasteur de Lille, INSERM, CNRS). L'objectif est d'étudier la polarisation Th2 de la réponse immunitaire, les effets sur l'inflammation et le remodelage bronchique tout en détaillant en particulier

le rôle que peuvent jouer les lipides séparément du grain de pollen. Pour ce faire, les lipides sont extraits des pollens intacts et pollués (O<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub> et mélange O<sub>3</sub>/NO<sub>2</sub>) et utilisés par la suite pour la stimulation de cellules immunes. L'expression de cytokines Th1 (IFN- $\gamma$ ), Th2 (IL-4, IL-5, IL-13), Th1721 (IL-17, IL-22) et Treg22 (IL-10) et de chimiokines CCL17 et CCL2223 est évaluée par RT-PCR quantitative et par dosage ELISA. Ce travail est en cours de réalisation sur du pollen de fléole des prés et de bouleau; nous résolvons notamment des problèmes liés à la solubilisation des protéines après extraction dans des solvants compatibles avec l'utilisation de cellules.

En parallèle, nous avons également réalisé une étude sur les protéines des pollens dont les premiers résultats préliminaires pour le pollen de *Phleum pratense* sont présentés dans le tableau IV.9. Ce travail est comparé avec certaines études issues de la littérature (Behrendt et al., 1999; Rogerieux et al., 2007; Vrtala et al., 1993). Nous confirmons que la quantité de protéines extraites n'est pas modifiée par une pollution à l'ozone. Ce qui a été déjà montré dans la littérature par l'étude de Rogerieux et al. L'exposition à une concentration plus importante de 2000 ppb de NO<sub>2</sub> et SO<sub>2</sub> ne semble pas également avoir des effets sur la quantité totale des protéines extraites de ce pollen.

Références	Pollen de <i>Phleum pratense</i>	Protéines totales µg protéines / mg de pollen	Méthode incubation/extraction
Ce travail	intact	32 ± 1	10 mg pollen dans 1 mL PBS / 2h agitation mécanique / centrifugation 4000 RPM (1,800g) / filtration 0,45 µm / Pierce BCA protein assay kit
	[O <sub>3</sub> ]= 0,1 ppm	27 ± 1	
2007-Rogerieux	exposé à de l'air	51 ± 4	50 mg de pollen dans 500 µL d'eau distillée / incubation avec mouvement rotatif pendant 1h / centrifugation 10 min. à 10000g / Bradford and Lowry BSA standard
	[O <sub>3</sub> ]= 0,1 ppm	52 ± 4	
	[NO <sub>2</sub> ]= 2 ppm	49 ± 8	
	[SO <sub>2</sub> ]= 2 ppm	52 ± 4	
1993-Vrtala	intact	10	1 g de pollen mélangé dans 30 mL d'eau distillée ou de tampon phosphate pendant 2 h à 40°C / Centrifugation 1 h à 40000g / Bradford
1999-Behrendt	intact pH= 6,0	13	incubation in vitro dans du PBS (30min à 37°C, pH 6.0, 7.4 and 9.0)
	intact pH= 7,4	17	
	intact pH= 9,0	17	

Tableau IV. 8: Etude des quantités des protéines totales extraites du pollen de fléole des prés intact et pollué. Comparaison des protéines quantifiées avec la littérature.

## 6. Discussion et conclusion

L'étude de l'influence des polluants environnementaux sur les réactions inflammatoires allergiques revêt une importance au cours de ces dernières décennies. Il existe aujourd'hui des preuves que la pollution de l'air pourrait être responsable de l'augmentation des allergies aux pollens et de crise d'asthme dans les zones hautement polluées (ANSES, 2014). Les modifications chimiques, biologiques et physiques des grains de pollen induites par l'exposition aux polluants atmosphériques pourraient altérer par conséquent leur potentiel allergisant (Annesi-Maesano et al., 2012; Bartra et al., 2007; Beck et al., 2013; Behrendt et al., 2001a; Kanter et al., 2013; Motta et al., 2006).

Le mécanisme de rupture des grains de pollen par les polluants gazeux durant leur transport atmosphérique est peu connu. L'équipe de Motta et al. a observé une rupture significative des pollens de fléole des prés exposés expérimentalement à 700 ppb d'ozone (Motta et al., 2006). Au contraire, nous avons constaté que ce pollen n'a montré ni fissures ni cassures après son exposition à une concentration plus importante de 1000 ppb d'ozone. Afin de mieux comprendre cette contradiction, des travaux supplémentaires pourront être réalisés sur l'observation microscopique des pollens fraîchement collectés et ensuite exposés aux polluants gazeux dans le laboratoire. Cette étude pourra être réalisée sur plusieurs types de pollens allergisants afin de pouvoir comparer leur modification physique par les polluants atmosphériques dans les conditions réelles. On suppose que les polluants gazeux pourraient favoriser la cassure du pollen soit après son contact avec une phase aqueuse soit après un choc mécanique durant son transport atmosphérique. Ce dernier point fera l'objet du **chapitre V**. La rupture du pollen par les polluants atmosphériques pourrait être considérée comme un facteur aggravant de l'augmentation de la prévalence des réactions allergiques dans les milieux urbains.

Pour expliquer l'augmentation de la prévalence de l'allergie il faut non seulement s'intéresser à l'étude de la modification des allergènes du pollen par la pollution atmosphérique mais également se renseigner sur la modification de sa composition chimique pouvant jouer un rôle adjuvant durant la réaction allergique. Pour ce faire, nous avons étudié dans ce chapitre l'altération de la matière organique extractible de deux pollens allergisants sous l'effet d'une pollution *in vitro* à l'ozone et au dioxyde d'azote. Les modifications chimiques des pollens par les polluants gazeux s'expliquent par l'ozonolyse des alcènes. Environ 37 % de la masse totale des alcènes est consommée après l'exposition des grains de pollen de fléole des prés à 100 ppb d'ozone au contraire une perte plus importante de

69 % des fractions massiques totales des alcènes est observée pour le pollen de bouleau exposé à 130 ppb d'ozone. Deux hypothèses sont émises afin d'expliquer cette différence : (i) l'exposition des pollens de bouleau à 30 ppb d'ozone de plus que les pollens de fléole des prés et (ii) les alcènes du bouleau pourraient être plus accessibles à la réactivité avec l'ozone que ceux du pollen de fléole des prés.

La perte des alcènes a été plus significative avec une exposition importante à 1000 ppb d'ozone. Environ 80% de la fraction massique totale des alcènes du pollen de fléole des prés est perdue sous l'effet de cette exposition. Cette concentration qui n'est pas représentative de l'exposition atmosphérique, elle a été choisie uniquement dans ce travail pour faciliter l'identification des produits de la réaction de l'ozone sur la fraction lipidique pollinique.

La consommation des alcènes de la fraction lipidique externe du pollen par une exposition *in vitro* à l'ozone est expliquée par la réactivité des molécules d'ozone avec la double liaison de cette famille. L'identification de l'acide nonanoïque et le nonanal comme étant produits majoritaires de la réaction d'ozonolyse de la majorité des alcènes confirme que la double liaison est entre le neuvième et le dixième atome de carbone d'alcène. La formation de ces produits de réaction pourra être l'une des hypothèses pour expliquer l'augmentation de la prévalence de l'allergie aux pollens allergisants dans les milieux urbains.

Au contraire les lipides extractibles par le PBS des pollens de fléole des prés et de bouleau n'ont pas présenté une modification chimique par l'ozone. Nous avons constaté des difficultés dans l'identification des espèces chimiques extraites par ce solvant à cause de leur faible masse quantifiée en milieu aqueux.

L'exposition simultanée des grains de pollens à l'ozone et au dioxyde d'azote a été choisie afin de s'approcher des conditions urbaines réelles. Nous avons montré dans ce travail que l'altération de la fraction lipidique est plus faible lorsque les grains de pollen sont exposés aux deux polluants ensemble ; le pourcentage d'alcènes perdu est de 29 % pour le pollen de fléole des prés et de 37 % pour le pollen de bouleau. Pour expliquer ces résultats nous supposons que les molécules de dioxyde d'azote peuvent s'adsorber sur la paroi pollinique externe et par conséquent empêcher la réactivité de l'ozone avec les alcènes localisés sur cette paroi. Ces résultats montrent que les effets de plusieurs polluants gazeux sur l'altération de la composition chimique de la paroi pollinique externe est une étude très complexe. Les

effets adjuvants ou inhibiteurs des polluants gazeux sur la modification chimique du pollen dans l'atmosphère sont finalement mal connus et complexes à étudier expérimentalement.

Les alcènes présents en surface du pollen sont consommés par l'ozone. Nous faisons la supposition que les alcènes agissent alors de la sorte en tant qu'antioxydants vis-à-vis des oxydants troposphériques, tels que l'ozone, protégeant les molécules importantes pour la reproduction des plantes des altérations atmosphériques. Les grains de pollen de fléole des prés et de bouleau sont exposés à l'ozone pendant 16 h. La durée d'exposition des grains de pollen aux polluants gazeux dans une atmosphère polluée est peu connue à l'heure actuelle ce qui rend donc difficile de comparer nos résultats avec l'exposition dans les conditions atmosphériques.

En général, l'exposition aux polluants atmosphériques se fait durant le transport atmosphérique des grains de pollen. Elle est également possible avant leur dissémination dans l'atmosphère. Les polluants atmosphériques peuvent affecter le pollen indirectement via un stress sur la croissance de la plante ou directement par contamination des anthères (Amjad and Shafiqhi, 2012). Les anomalies des couches de l'anthère et de développement du pollen pourraient induire des modifications au niveau de la concentration de sa composition chimique et protéique. Une autre étude montre que les pollens pourraient bénéficier probablement de la protection des chatons contre les polluants atmosphériques (Wolters and Martens, 1987). Le pollen peut également lors de la pollinisation se déposer directement sous les arbres ou après une période de transport, ce pollen remis en suspension pourrait être plus pollué car la durée de son exposition augmente par rapport à celle d'un transport aérien direct sans resuspension. Sur nos sites d'échantillonnage de pollen, nous avons observé pendant la saison de pollinisation de bouleau une grande quantité de pollen se déposant sur les voitures, les feuilles et les terrains à proximité des arbres bouleaux. Dans la littérature, le pollen de bouleau a déjà été observé sur les feuilles d'arbres (Schäppi et al., 1997).

La durée de transport dans l'air du pollen de bouleau et de fléole des prés a été estimée à plusieurs jours en cas de transport à longue distance (Sofiev et al., 2006; Sofiev and Bergmann, 2012). La durée d'exposition sur les chatons ainsi que le moment d'une éventuelle remise en suspension ne sont pas connus. Des futures recherches sont nécessaires pour développer une méthodologie analytique permettant de quantifier les traceurs d'exposition à l'ozone à l'échelle du grain de pollen individuel (alcènes ou aldéhydes par exemple) ; cela pourrait renseigner l'exposition totale réelle du grain de pollen après le transport.

Dans ce chapitre nous avons montré que les lipides des pollens de fléole des prés et de bouleau ont été modifiés respectivement *in vitro* par une concentration d'ozone de 100 et de 130 ppb pendant 16 heures. Cette durée a été choisie pour des raisons expérimentales pratiques et également afin d'être suffisamment importante pour permettre des identifications des produits de la réaction en spectrométrie de masse. Des expositions progressives à des concentrations plus faibles (50 ou 100 ppb) pendant une heure jusqu'à atteindre une durée finale de 16 h pourraient nous expliquer à quelle vitesse le pollen vieillira lors de son transport dans l'atmosphère.

Il est bien établi que le pollen libère des composés bioactifs ayant un effet potentiellement adjuvant sur l'allergie (Bashir et al., 2013a; Behrendt et al., 2001a; Plötz et al., 2004; Traidl-Hoffmann et al., 2002). Les expérimentations sur l'influence des lipides sur le système immunitaire doivent prendre en compte les modifications du lipidome du pollen induites par les polluants atmosphériques. Nous ne respirons pas seulement le pollen frais directement issu des plantes, mais aussi le pollen qui a subi une altération induite par l'exposition aux polluants atmosphériques. Cependant, la biodisponibilité des lipides modifiés par l'ozone dans nos conditions expérimentales n'est pas connue, ainsi que leurs adjuvants potentiels sur la réaction allergénique.

Il existe de nombreuses preuves que l'ozone modifie plusieurs propriétés biologiques et chimiques des pollens de fléole des prés et de bouleau (Bashir et al., 2013a; Beck et al., 2013; Behrendt et al., 1999; Cuinica et al., 2013; Darbah et al., 2008; Rogerieux et al., 2007). Avec ce travail, nous avons montré un effet supplémentaire de l'ozone sur ces pollens qui est la modification de leur fraction lipidique extractible. Enfin, il est important de continuer à développer nos travaux sur les effets potentiels sur l'allergie et la réaction inflammatoire des lipides modifiés par les polluants gazeux et en particulier les acides gras saturés générés par la réaction d'ozonolyse.

## 7. Références bibliographiques.

- Amjad, L., Shafiqhi, M., 2012. The Effect of Air Pollution on *Chenopodium album* L. Pollen Structure. *Journal of Agricultural Science and Technology A* 2, 143–148.
- 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. Etat des connaissances sur l'impact sanitaire lié à l'exposition de la population générale aux pollens présents dans l'air ambiant.
- Bartra, J., Mullol, J., del Cuvillo, A., Dávila, F., 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.
- 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., Kasche, A., Ebner von Eschenbach, C., Risse, U., Huss-Marp, J., Ring, J., 2001a. 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., Ebner von Eschenbach, C., Becker, W.M., Ring, J., 1999. Timothy Grass (*Phleum pratense* L.) Pollen as Allergen Carriers and Initiators of an Allergic Response. *Int Arch Allergy Immunol* 118, 414–418.
- Cuinica, L.G., Abreu, I., Gomes, C.R., Esteves da Silva, J.C.G., 2013. Exposure of *Betula pendula* Roth pollen to atmospheric pollutants CO, O<sub>3</sub> and SO<sub>2</sub>. *Grana* 1–6.
- Darbah, J.N.T., Kubiske, M.E., Nelson, N., Oksanen, E., Vapaavuori, E., Karnosky, D.F., 2008. Effects of Decadal Exposure to Interacting Elevated CO<sub>2</sub> and/or O<sub>3</sub> on Paper Birch (*Betula papyrifera*) Reproduction. *Environmental Pollution* 155, 446–452.
- 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.
- 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.

#### Chapitre IV. Modification de la fraction lipidique du pollen par les polluants atmosphériques

- Motta, A., Marliere, M., Peltre, G., Sterenberg, P., 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.
- 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.
- 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.
- Rogerieux, F., Godfrin, D., Sénéchal, H., Motta, A.C., Marlière, M., Peltre, G., Lacroix, G., 2007. Modifications of *Phleum pratense* Grass Pollen Allergens following Artificial Exposure to Gaseous Air Pollutants (O<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>). *International Archives of Allergy and Immunology* 143, 127–134.
- 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.
- Sofiev, M., Bergmann, K.-C., 2012. Allergenic Pollen: A Review of the Production, Release, Distribution and Health Impacts. Springer Netherlands.
- 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. *Int J Biometeorol* 50, 392–402.
- 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.
- Vrtala, S., Grote, M., Duchene, M., Vanree, R., 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.
- Wolters, J., Martens, M., 1987. Effects of Air Pollutants on Pollen. *The Botanical Review* 53, 372–414.



# Chapitre V

**Etude de la fraction lipidique interne du pollen et de ses modifications causées par une exposition *in vitro* à l'ozone**



<b>1. Introduction .....</b>	<b>170</b>
<b>2. Observation en microscopie électronique des grains de pollen ayant subi une rupture artificielle .....</b>	<b>170</b>
<b>3. Comparaison du profil lipidique extrait des pollens intacts et broyés.....</b>	<b>172</b>
<b>4. Identification et quantification des lipides internes extraits du pollen par le dichlorométhane</b>	<b>173</b>
4.1 Répartition des alcanes, alcènes, aldéhydes et alcools dans les lipides externes et internes des pollens	175
4.2 Répartition des acides gras saturés et insaturés dans les lipides internes et externes des pollens....	179
<b>5. Modification des lipides internes du pollen de fléole des prés par l'ozone .....</b>	<b>183</b>
<b>6. Discussion et conclusion.....</b>	<b>190</b>
<b>7. Références bibliographiques.....</b>	<b>194</b>

## 1. Introduction

Nous avons montré dans la première partie du chapitre III que les lipides externes extraits par le dichlorométhane des pollens intacts comportent plusieurs familles de composés organiques : alcanes, alcools, alcènes, aldéhydes, acides gras saturés et insaturés et stérols. Selon nos connaissances l'identification des espèces chimiques extraites en phase organique du contenu cytoplasmique des pollens de fléole des prés et de bouleau n'est absolument pas documentée à l'heure actuelle. Pour ce faire nous avons mis au point un protocole de rupture artificielle de grains de pollen qui a permis de libérer la fraction lipidique totale (externe + interne). Nous détaillons par la suite une étude de comparaison entre la composition chimique externe et interne des pollens ainsi que les résultats préliminaires concernant la modification des lipides internes du pollen de fléole des prés par une exposition *in vitro* à l'ozone. Les termes intact et broyé sont employés respectivement pour désigner le pollen n'ayant subi aucun traitement et celui qui a subi une rupture artificielle.

## 2. Observation en microscopie électronique des grains de pollen ayant subi une rupture artificielle

La rupture artificielle des grains de pollen a été réalisée par agitation mécanique à l'aide des barreaux aimantés dans un flacon en verre (**Cf. partie 4 du chapitre II**). Les deux figures V.1 et V.2 représentent les images en microscopie électronique à balayage des grains de pollen de fléole des prés broyés par cette technique. Seules des études qualitatives ont été réalisées dans ce travail. La majorité des grains de pollen observés sur la figure V.1 présente une rupture importante sous l'action des barreaux aimantés. Le contenu cytoplasmique est fortement déversé à l'extérieur du pollen broyé et ceci est visualisé par les granules cytoplasmiques qui sont disposés en surface des grains (ces granules sont indiqués par les flèches noires sur la figure V.2).

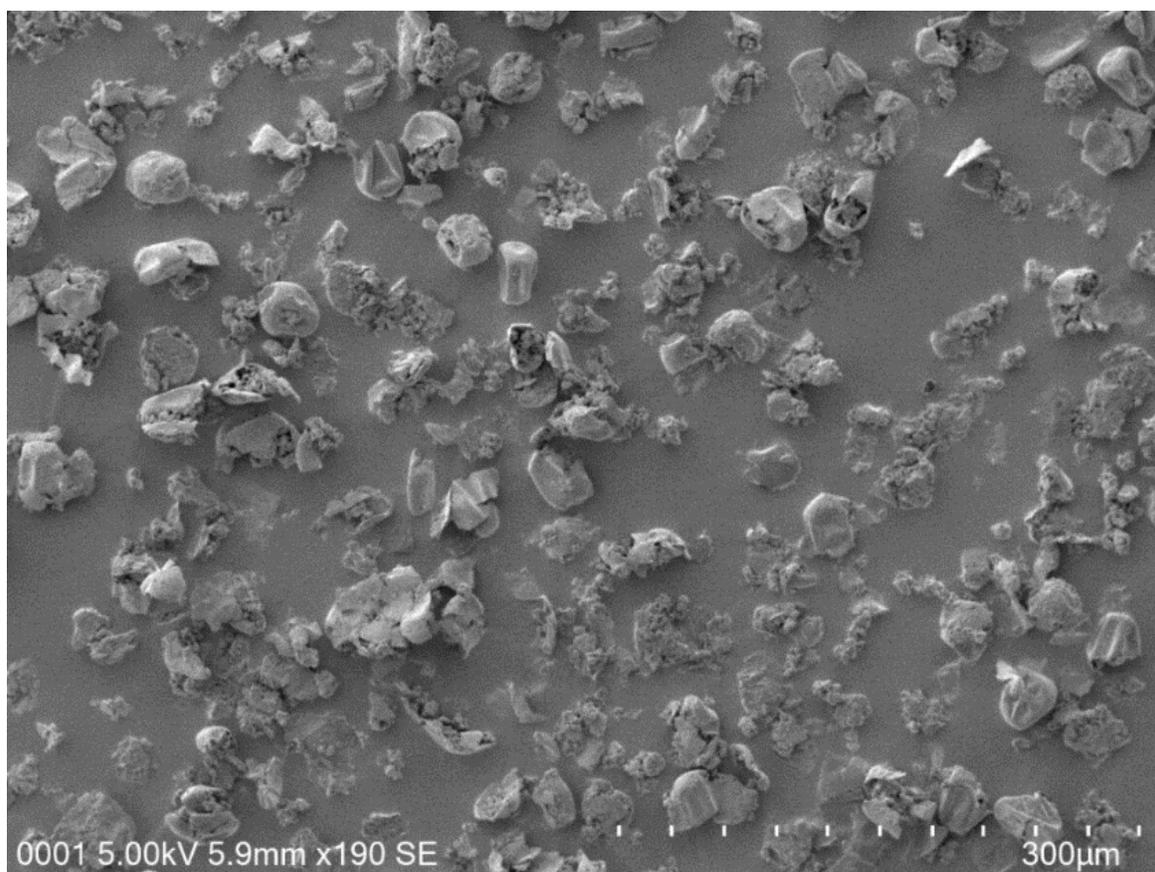


Figure V. 1: Image en microscopie électronique à balayage des grains de pollen de fléole des prés broyés par agitation mécanique.

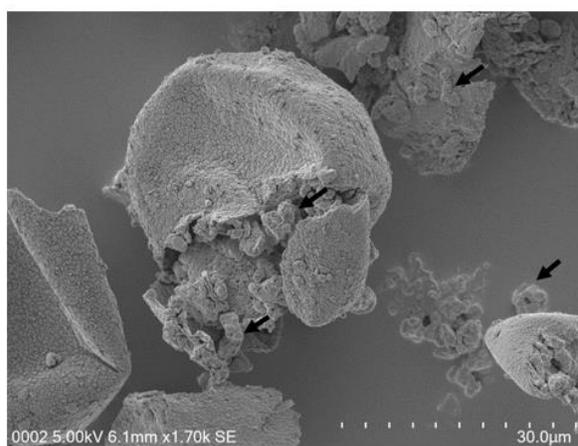
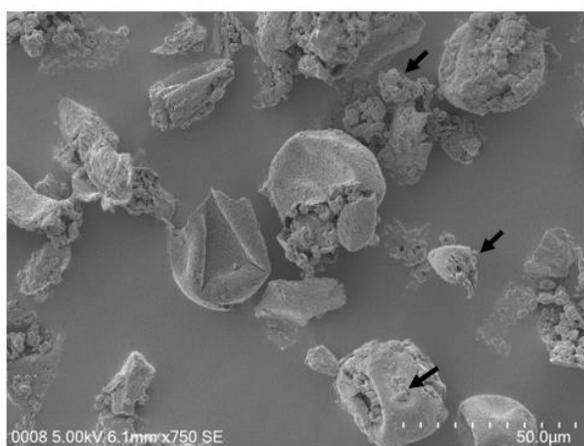


Figure V. 2: Observation en microscopie électronique à balayage des granules cytoplasmiques déversés à l'extérieur des grains de pollen de fléole des prés (les flèches noires indiquent la disposition de granules cytoplasmiques).

### 3. Comparaison du profil lipidique extrait des pollens intacts et broyés

Les chromatogrammes (GC-FID) sur les figures V.3 et V.4 représentent les lipides extraits par le dichlorométhane respectivement des pollens de fléole des prés et de bouleau sous la forme intacte (noir) et broyée (rouge). Les composés lipidiques externes sont représentés sur les chromatogrammes du pollen intact. Au contraire l'ensemble des espèces chimiques sur les chromatogrammes du pollen broyé correspond à celles qui sont extraites de la fraction lipidique totale (externe et interne). La comparaison entre les deux chromatogrammes du pollen intact et broyé montre une similarité d'extraction pour certains pics (correspondant notamment à la fraction lipidique externe). En effet, la libération du contenu cytoplasmique par la technique de rupture artificielle favorise l'extraction des lipides internes ceci est visualisé par l'apparition de nouveaux pics sur les chromatogrammes du pollen broyé. L'augmentation importante des intensités des pics élués entre les temps 41,0-45,0 min et 62-65 min sur les chromatogrammes du pollen broyé signifie que ces composés sont fortement libérés de la composition chimique interne des deux pollens. La variation entre les ratios des intensités des pics entre les chromatogrammes du pollen de bouleau intact et broyé est remarquable.

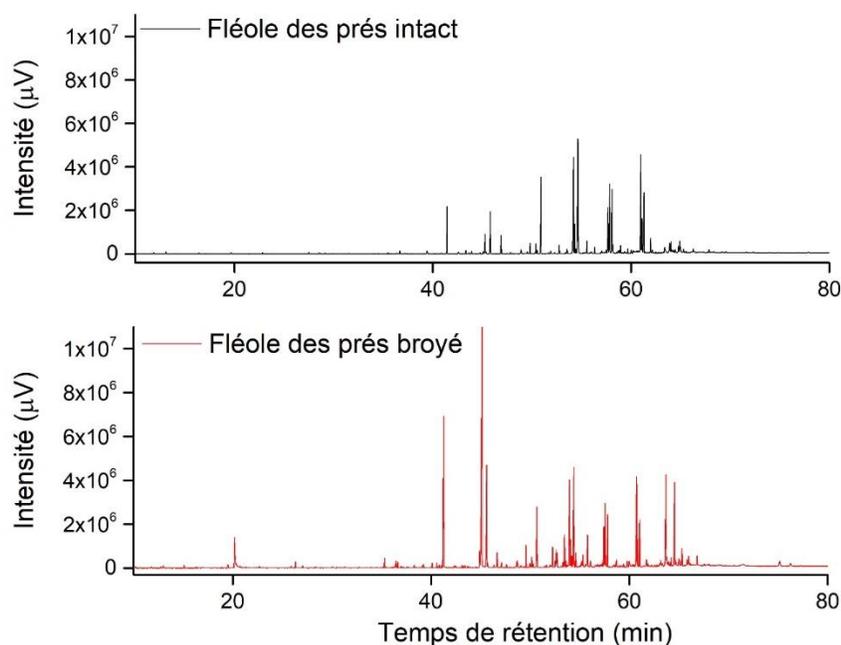


Figure V. 3 : Comparaison entre les chromatogrammes (GC-FID) des lipides extraits par le DCM du pollen de fléole des prés sous la forme intacte et broyée.

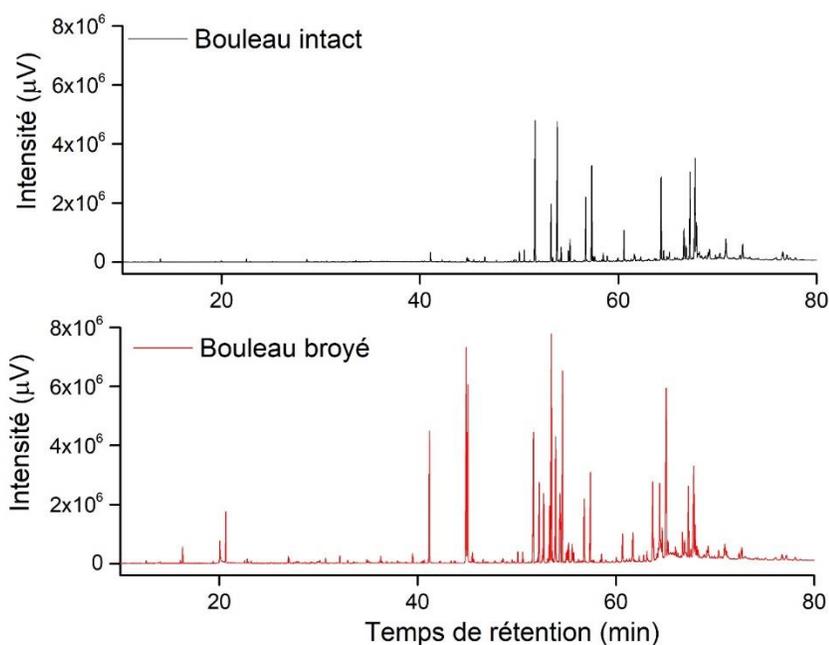


Figure V. 4: Comparaison entre les chromatogrammes (GC-FID) des lipides extraits par le DCM du pollen de bouleau sous la forme intacte et broyée.

#### 4. Identification et quantification des lipides internes extraits du pollen par le dichlorométhane

La technique de broyage mécanique a déjà été utilisée pour l'identification de la fraction lipidique totale (interne et externe) du pollen de *Brassica napus* (Evans et al., 1991). Peu de travaux ont été réalisés dans la littérature concernant l'étude de la composition chimique interne des grains de pollen et en particulier ceux qui sont allergisants. À notre connaissance, il s'agit du premier travail d'identification et de quantification des lipides internes des pollens de fléole des prés et bouleau. Le tableau V.1 récapitule les masses des lipides externes et internes extraits respectivement des pollens intacts et broyés. Les masses des lipides internes ont été obtenues par différence entre l'extraction du pollen intact et l'extraction du pollen broyé (masse des lipides totaux - masse des lipides externes = masse des lipides internes). La masse totale des lipides extraits du pollen de bouleau (externe+interne) est égale à  $7676 \pm 877 \text{ ng.mg}^{-1}$  alors qu'une masse plus faible de  $6231 \pm 875 \text{ ng.mg}^{-1}$  est extraite du pollen de fléole des prés (tableau V.1).

Types de pollens	Méthodes d'extraction	Masses totales des lipides extraits
<b>Fléole des prés</b>		
Lipides externes	Lavage	3821±283 ng.mg <sup>-1</sup>
Lipides internes	Broyage mécanique + Lavage	2241±501 ng.mg <sup>-1</sup>
Lipides totaux	Broyage mécanique + Lavage	6231±875 ng.mg <sup>-1</sup>
<b>Bouleau</b>		
Lipides externes	Lavage	3591±394 ng.mg <sup>-1</sup>
Lipides internes	Broyage mécanique + Lavage	4131±668 ng.mg <sup>-1</sup>
Lipides totaux	Broyage mécanique + Lavage	7676±877 ng.mg <sup>-1</sup>

Tableau V. 1: Concentrations massiques des lipides externes et internes extraits des pollens de fléole des prés et de bouleau selon les deux méthodes appliquées : le lavage par solvant organique (DCM) et le broyage mécanique.

La répartition des lipides externes et internes dans les pollens de fléole des prés et de bouleau est représentée sur la figure V.5. Les pollens de fléole des prés contiennent une fraction massique plus importante en lipides externes (3821±283 ng.mg<sup>-1</sup>) qu'en lipides internes (2241 ±501 ng.mg<sup>-1</sup>). Au contraire la masse totale des espèces organiques extraites du pollen de bouleau est répartie environ pour moitié entre sa fraction lipidique externe (3591±394 ng.mg<sup>-1</sup>) et interne (4131 ±668 ng.mg<sup>-1</sup>).

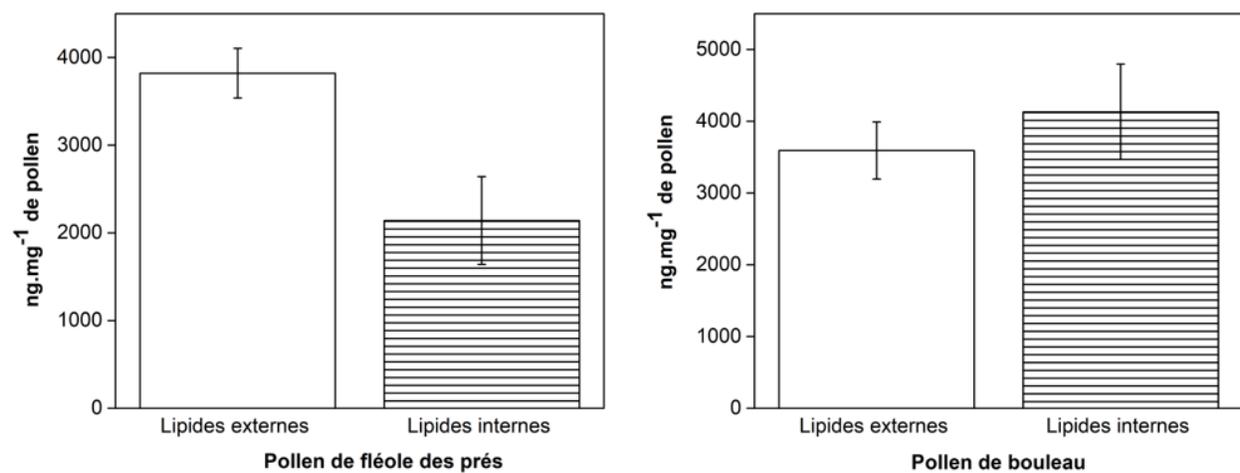


Figure V. 5: Répartition de la concentration massique totale de la fraction lipidique externe et interne dans les pollens de fléole des prés et de bouleau.

#### 4.1 Répartition des alcanes, alcènes, aldéhydes et alcools dans les lipides externes et internes des pollens

L'analyse des extraits organiques du pollen de fléole des prés broyé montre que les familles d'alcènes et d'aldéhydes ne sont présentes que dans sa fraction lipidique externe (figure V.6). Des faibles fractions massiques de  $49 \pm 5 \text{ ng.mg}^{-1}$  d'alcènes et de  $34 \pm 7 \text{ ng.mg}^{-1}$  d'alcools sont extraites de ses lipides internes. La répartition de ces familles organiques dans le pollen de bouleau n'est pas similaire à celle du pollen de fléole des prés (figure V.7). Les alcènes sont fortement extraits des lipides externes du pollen de bouleau alors qu'une faible masse égale à  $317 \pm 121 \text{ ng.mg}^{-1}$  est présente dans son contenu cytoplasmique. Les concentrations massiques des alcools, alcanes et aldéhydes sont réparties pour moitié entre sa composition chimique interne et externe. Le pollen de bouleau contient une fraction massique totale égale à  $2140 \pm 99 \text{ ng.mg}^{-1}$  d'alcools,  $347 \pm 61 \text{ ng.mg}^{-1}$  d'alcènes et de  $26 \pm 4 \text{ ng.mg}^{-1}$  d'aldéhydes. Ses lipides internes extractibles contiennent une masse importante de tricosanol ( $1136 \pm 12 \text{ ng.mg}^{-1}$ ), d'heptacosène ( $304 \pm 113 \text{ ng.mg}^{-1}$ ) et d'heptacosane ( $183 \pm 49 \text{ ng.mg}^{-1}$ ). L'identification et la quantification de la composition externe et interne des pollens est représentée dans les tableaux V.2 et V.3.

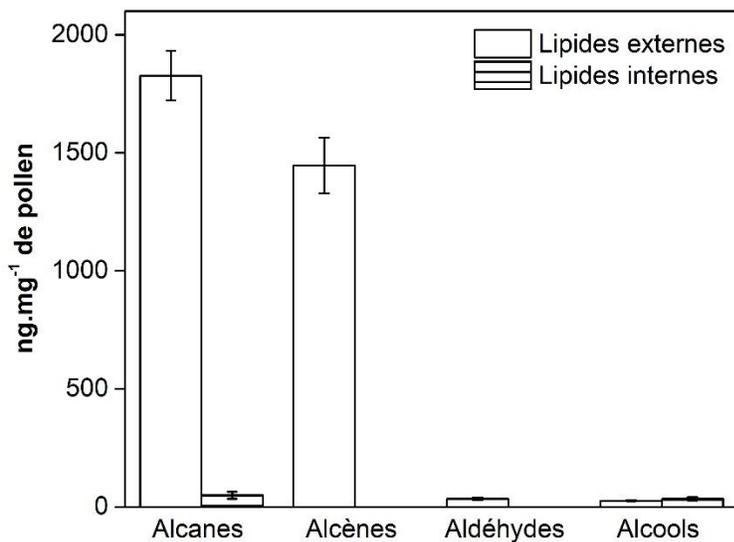


Figure V. 6: Répartition des concentrations massiques des alcanes, alcènes, aldéhydes et alcools dans les deux fractions lipidiques externe et interne du pollen de fléole des prés (extraction par le DCM).

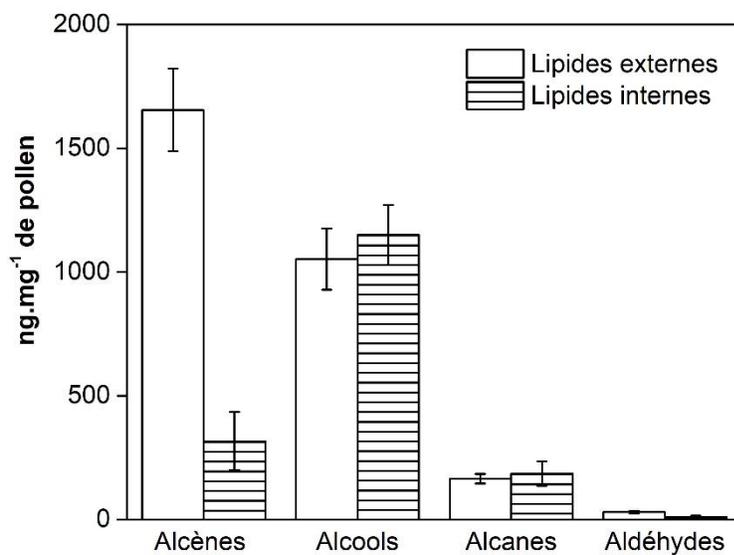


Figure V. 7: Répartition des concentrations massiques des alcènes, alcools, alcanes et aldéhydes dans les deux fractions lipidiques externe et interne du pollen de bouleau (extraction par le DCM).

Chapitre V. Etude de la fraction lipidique interne du pollen et de ses modifications causées par une exposition *in vitro* à l'ozone

T <sub>R</sub> GC/FID (min)	Masse (ng.mg <sup>-1</sup> de pollen)				
	Formules brutes	Lipides externes Pollen intact	Lipides internes	Lipides totaux Pollen broyé	
<b>ALCANES</b>					
Heptadécane	32,6	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	5 ±1	2 ±1	3 ±1
Nonadécane	37,8	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub>	3 ±1	--	3 ±1
Hénéicosane	42,5	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub>	9 ±14	--	4 ±1
Docosane	44,8	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub>	5 ±1	1 ±1	4 ±1
Tricosane	46,8	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub>	78 ±9	--	74 ±8
Tétracosane	48,9	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub>	19 ±3	36 ±6	55 ±6
Pentacosane	50,8	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub>	338 ±21	--	339 ±7
Hexacosane	52,7	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub>	38 ±4	10 ±7	48 ±7
Heptacosane	54,6	C <sub>27</sub> H <sub>56</sub>	656 ±3	--	673 ±54
Octacosane	56,3	C <sub>28</sub> H <sub>58</sub>	28 ±3	--	30 ±4
Nonacosane	58,3	C <sub>29</sub> H <sub>60</sub>	317 ±21	--	339 ±32
Triacotane	59,64	C <sub>30</sub> H <sub>62</sub>	21 ±2	--	17 ±4
Hentriacotane	61,23	C <sub>31</sub> H <sub>64</sub>	311 ±22	--	309 ±10
Masse totale			1828 ±105	49 ±15	1897 ±136
<b>ALCÈNES</b>					
Décène	27,5	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub>	5 ±1	--	4 ±1
Pentacosène	50,4	C <sub>25</sub> H <sub>50</sub>	41 ±6	--	46 ±5
Heptacosène	54,2	C <sub>27</sub> H <sub>54</sub>	464 ±47	--	526 ±81
Octacosène	56,2	C <sub>28</sub> H <sub>56</sub>	58 ±8	--	53 ±13
Nonacosène	57,3	C <sub>29</sub> H <sub>58</sub>	297 ±18	--	351 ±65
Triacotène	59,0	C <sub>30</sub> H <sub>60</sub>	39 ±7	--	40 ±8
Hentriacotène	60,9	C <sub>31</sub> H <sub>62</sub>	541 ±31	--	585 ±72
Masse totale			1445 ±118	--	1605 ±245
<b>ALDÉHYDES</b>					
Nonanal	14,1	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	1 ±1	--	1 ±1
Octadécanal	40,8	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O	3 ±1	--	3 ±1
Eicosanal	45,3	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	5 ±1	--	--
Hénéicosanal	47,5	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O	5 ±1	--	5 ±1
Docosanal	49,6	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O	10 ±1	--	10 ±1
Tétracosanal	53,4	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O	9 ±1	--	9 ±1
Masse totale			33 ±6	--	28 ±5
<b>ALCOOLS</b>					
Hexadécanol	39,4	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O	12 ±1	14 ±3	26 ±3
Octadécanol	43,8	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> O	6 ±1	18 ±3	24 ±3
Docosanol	51,8	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> O	8 ±1	2 ±1	10 ±1
Masse totale			26 ±3	34 ±7	60 ±7

Tableau V. 2 : Familles des espèces chimiques identifiées et quantifiées dans les lipides externes et internes extraits par le dichlorométhane du pollen de fléole des prés.

Chapitre V. Etude de la fraction lipidique interne du pollen et de ses modifications causées par une exposition *in vitro* à l'ozone

	T <sub>R</sub> GC/FID (min)	Formules brutes	Masse (ng.mg <sup>-1</sup> de pollen)		
			Lipides externes Pollen intact	Lipides internes	Lipides totaux Pollen broyé
<b>ALCÈNES</b>					
Décène	27,5	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub>	4 ±1	- -	4 ±1
Pentacosène	50,4	C <sub>25</sub> H <sub>50</sub>	52 ±4	13 ±8	65 ±8
Heptacosène	54,2	C <sub>27</sub> H <sub>54</sub>	824 ±73	304 ±113	1128 ±113
Nonacosène	57,3	C <sub>29</sub> H <sub>58</sub>	596 ±62	- -	622 ±87
Hentriacontène	60,9	C <sub>31</sub> H <sub>62</sub>	179 ±27	- -	183 ±27
Masse totale			1655 ±167	317 ±121	2002 ±236
<b>ALCOOLS</b>					
Hexadécanol	39,0	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O	1 ±1	1 ±1	2 ±1
Octadécanol	43,5	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O	2 ±1	5 ±1	7 ±1
Eicosanol	47,5	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> O	12 ±1	2 ±2	10 ±2
Hénéicosanol	49,6	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub> O	7 ±1	- -	7 ±1
Docosanol	51,5	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> O	861 ±92	- -	816 ±66
Tricosanol	53,3	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub> O	21 ±4	1136 ±12	1157 ±12
Tétracosanol	55,1	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> O	103 ±18	-	102 ±11
Hexacosanol	58,8	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> O	27 ±3	3 ±3	24 ±3
Octacosanol	61,6	C <sub>28</sub> H <sub>58</sub> O	18 ±2	3 ±2	15 ±2
Masse totale			1052 ±123	1150 ±21	2140 ±99
<b>ALCANES</b>					
Hénéicosane	42,5	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub>	8 ±1	2 ±1	6 ±1
Tricosane	46,8	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub>	20 ±3	- -	21 ±3
Pentacosane	50,8	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub>	58 ±5	- -	59 ±8
Heptacosane	54,6	C <sub>27</sub> H <sub>56</sub>	78 ±10	183 ±49	261 ±49
Masse totale			165 ±19	185 ±50	347 ±61
<b>ALDÉHYDES</b>					
Nonanal	14,1	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	14 ±2	5 ±2	9 ±1
Octadécanal	40,8	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O	6 ±1	6 ±2	12 ±2
Eicosanal	45,3	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	4 ±1	- -	- -
Docosanal	49,6	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O	6 ±1	1 ±1	5 ±1
Masse totale			30 ±5	11 ±5	26 ±4

Tableau V. 3: Familles des espèces chimiques identifiées et quantifiées dans les lipides externes et internes extraits par le dichlorométhane du pollen de bouleau.

## 4.2 Répartition des acides gras saturés et insaturés dans les lipides internes et externes des pollens

Contrairement aux autres familles organiques, le broyage mécanique a favorisé une libération importante des acides gras saturés présents dans le contenu cytoplasmique des pollens (figure V.8 et figure V.9). Les lipides internes du pollen de fléole des prés contiennent une masse importante en acides gras saturés égale à  $970 \pm 192 \text{ ng.mg}^{-1}$ , alors que seulement  $434 \pm 46 \text{ ng.mg}^{-1}$  est extraite de ses lipides externes. La comparaison entre des deux images sur la figure V.8 montre que la répartition des acides gras saturés dans les deux pollens n'est pas similaire. Contrairement aux pollens de fléole des prés, la masse totale des acides gras saturés de  $1519 \pm 186 \text{ ng.mg}^{-1}$  est répartie pour moitié entre les lipides externes et internes du pollen de bouleau.

Au total, 16 et 11 acides gras saturés sont identifiés respectivement dans la fraction lipidique interne des pollens de fléole des prés et de bouleau. Les acides gras saturés les plus extraits de leurs lipides internes sont représentés sur la figure V.9. Environ 54 % et 71% des acides gras saturés internes extraits respectivement des pollens de fléole des prés et de bouleau contiennent de l'acide hexadécanoïque. La richesse du contenu cytoplasmique en acides gras saturés a déjà été confirmée dans la littérature pour le pollen de *Brassica napus* (Evans et al., 1991; Piffanelli et al., 1997). Le deuxième acide le plus extrait des lipides internes est l'acide octadécanoïque pour le pollen de fléole des prés et l'acide tétracosanoïque pour le pollen de bouleau. Le tableau V.4 regroupe l'ensemble des acides gras saturés extraits par le solvant organique des lipides externes et internes des pollens.

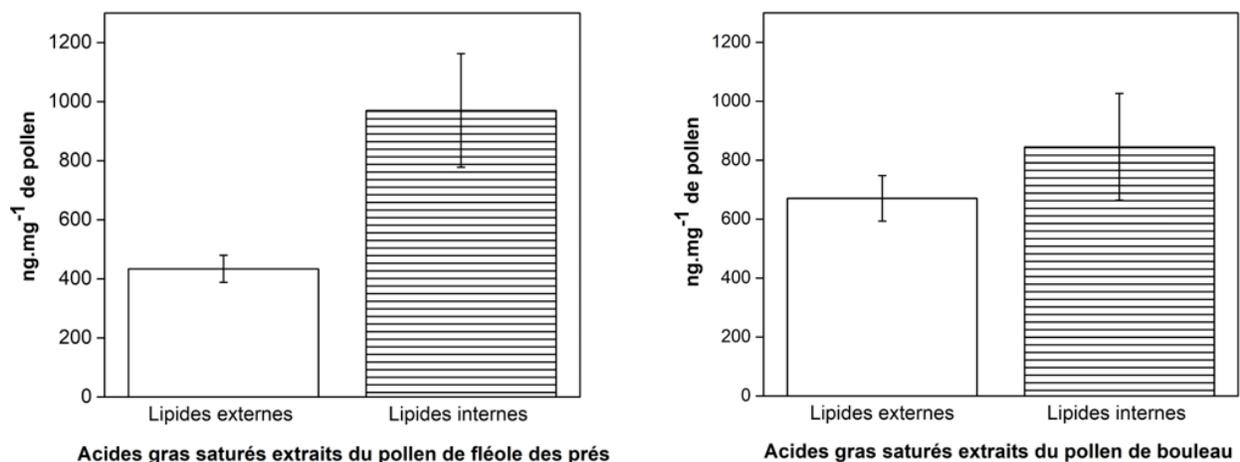


Figure V. 8: Répartition des acides gras saturés dans la fraction lipidique externe et interne des pollens (extraction par le dichlorométhane).

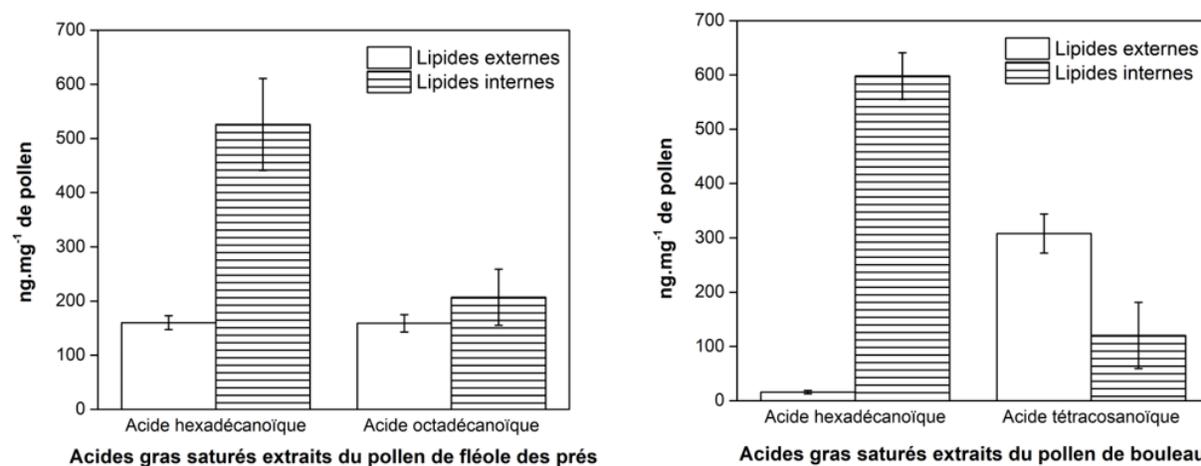


Figure V. 9: Répartition des acides gras saturés extraits majoritairement de la fraction lipidique interne des pollens (extraction par le dichlorométhane).

T <sub>R</sub> GC/FID (min)	Masse (ng.mg <sup>-1</sup> de pollen)				
	Formules brutes	Lipides externes Pollen intact	Lipides internes	Lipides totaux Pollen broyé	
<b>ACIDES GRAS SATURÉS extraits du pollen de fléole des prés</b>					
Acide Pentanoïque	9,9	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	1 ±1	1 ±1	2 ±1
Acide Hexanoïque	13,0	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	6 ±1	5 ±2	11 ±2
Acide Heptanoïque	16,3	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	3 ±1	1 ±1	4 ±1
Acide Octanoïque	19,7	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	3 ±1	9 ±2	12 ±2
Acide Nonanoïque	22,8	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	4 ±1	2 ±1	6 ±1
Acide Décanoïque	25,2	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	1 ±1	- -	1 ±1
Acide Undécanoïque	29,1	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	2 ±1	- -	2 ±1
Acide Dodécanoïque	31,5	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	2 ±1	3 ±1	5 ±1
Acide Tetradécanoïque	36,5	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	10 ±1	25 ±11	35 ±11
Acide Pentadécanoïque	38,9	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	1 ±1	2 ±1	3 ±1
Acide Hexadécanoïque	41,4	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	160 ±13	526 ±85	686 ±85
Acide Heptadécanoïque	43,6	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	3 ±1	6 ±1	9 ±1
Acide Octadécanoïque	45,7	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	159 ±16	207 ±52	367 ±52
Acide Nonadécanoïque	47,7	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	5 ±1	6 ±1	11 ±1
Acide Eicosanoïque	49,8	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	41 ±1	41 ±6	82 ±6
Acide Hénéicosanoïque	51,7	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	8 ±1	- -	8 ±1
Acide Docosanoïque	53,5	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	16 ±1	133 ±25	149 ±25
Acide Tétracosanoïque	57,0	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	5 ±1	2 ±1	3 ±1
Acide Octacosanoïque	64,3	C <sub>28</sub> H <sub>58</sub> O <sub>2</sub>	4 ±1	1 ±1	3 ±1
Masse totale			434 ±46	970 ±192	1399 ±195
<b>ACIDES GRAS SATURÉS extraits du pollen de bouleau</b>					
Acide Hexanoïque	13,0	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	2 ±1	- -	2 ±1
Acide Heptanoïque	16,3	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	1 ±1	2 ±1	3 ±1
Acide Octanoïque	19,7	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	2 ±1	10 ±2	12 ±2
Acide Nonanoïque	22,8	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	13 ±2	5 ±3	18 ±3
Acide Dodécanoïque	31,5	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	2 ±1	5 ±2	7 ±2
Acide Hexadécanoïque	41,4	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	16 ±3	598 ±43	614 ±43
Acide Octadécanoïque	45,7	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	13 ±2	26 ±11	39 ±11
Acide Eicosanoïque	49,8	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	8 ±1	9 ±3	17 ±3
Acide Hénéicosanoïque	51,7	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	3 ±1	2 ±1	5 ±1
Acide Docosanoïque	53,5	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	238 ±25	54 ±43	292 ±43
Acide Tricosanoïque	53,5	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	46 ±4	14 ±11	60 ±11
Acide Tétracosanoïque	57,0	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	308 ±36	120 ±61	428 ±61
Acide Octacosanoïque	64,3	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> O <sub>2</sub>	19 ±3	- -	22 ±4
Masse totale			671 ±81	845 ±181	1519 ±186

Tableau V. 4 : Fractions massiques des acides saturés extraits par le DCM des lipides externes et internes des pollens de fléole des prés et de bouleau.

Chapitre V. Etude de la fraction lipidique interne du pollen et de ses modifications causées par une exposition *in vitro* à l'ozone

Les acides gras insaturés sont majoritairement répartis dans la fraction lipidique interne des pollens (figure V.10). La rupture des grains de pollen par la technique de broyage mécanique a favorisé une libération importante des acides insaturés du contenu cytoplasmique. Les lipides internes des pollens de bouleau contiennent une fraction massique de  $1623 \pm 290$  ng.mg<sup>-1</sup> plus importante que celle extraite des pollens de fléole des prés ( $1188 \pm 287$  ng.mg<sup>-1</sup>).

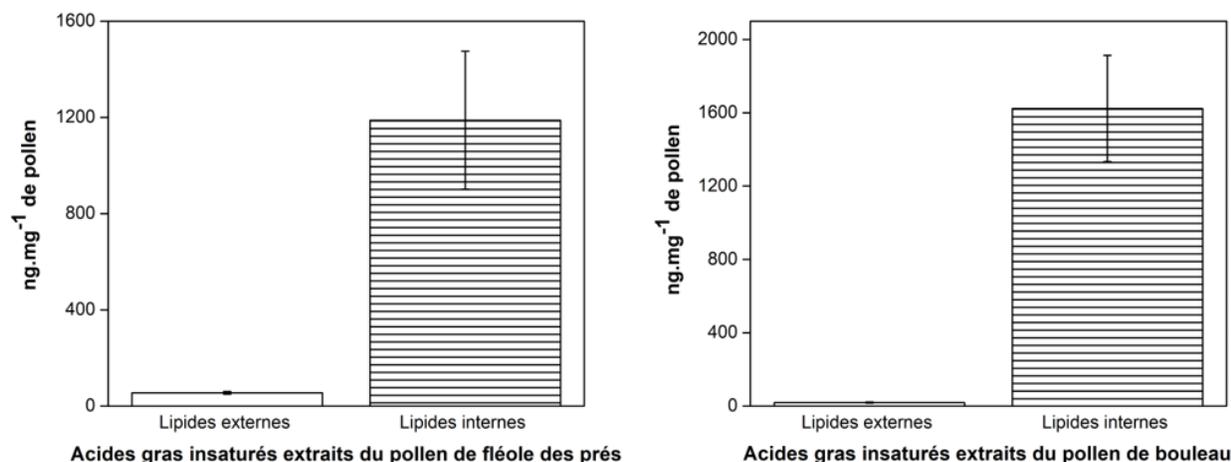


Figure V. 10: Répartition des acides gras insaturés dans les lipides externes et internes des pollens (extraction par le dichlorométhane).

Une faible fraction massique en acides linoléique (C18:2) et  $\alpha$ -linoléique (C18:3) est extraite des lipides externes des deux pollens. La répartition de ces deux acides dans la fraction lipidique interne extractible n'est pas similaire pour les deux pollens. L'acide  $\alpha$ -linoléique de masse importante de  $1139 \pm 274$  ng.mg<sup>-1</sup> est majoritairement extrait des lipides internes du pollen de fléole des prés. Au contraire, ceux du pollen de bouleau contiennent des masses importantes en acide linoléique ( $938 \pm 173$  ng.mg<sup>-1</sup>) et en acide  $\alpha$ -linoléique ( $685 \pm 117$  ng.mg<sup>-1</sup>) (figure V.11). L'extraction en phase organique des acides C18:2 et C18:3 du contenu cytoplasmique a été rapportée dans la littérature selon nos connaissances uniquement pour les pollens de *Brassica napus* (Evans et al., 1991; Piffanelli et al., 1997). Les tableaux V.5 regroupe l'ensemble des acides gras insaturés extraits par le solvant organique de la fraction lipidique externe et interne des pollens.

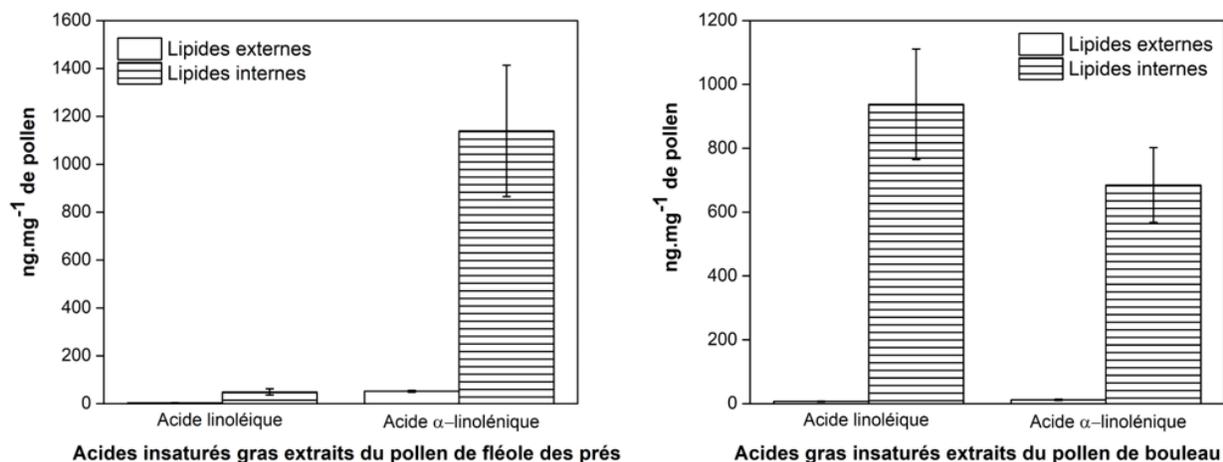


Figure V. 11: Répartition des acides linoléique et α-linolénique dans les lipides externes et internes des pollens (extraction DCM).

T <sub>R</sub> GC/FID (min)	Masse (ng.mg <sup>-1</sup> de pollen)				
	Formules brutes	Lipides externes Pollen intact	Lipides internes Pollen broyé	Lipides totaux Pollen broyé	
<b>ACIDES GRAS INSATURÉS extraits du pollen de fléole des prés</b>					
Acide Linoléique	44,7	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	3 ±1	49 ±13	52 ±13
Acide α-Linolénique	45,0	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	52 ±4	1139 ±274	1191 ±274
Masse totale			55 ±5	1188 ±287	1242 ±287
<b>ACIDES GRAS INSATURÉS extraits du pollen de bouleau</b>					
Acide Linoléique	44,7	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	7 ±1	938 ±173	945 ±174
Acide α-Linolénique	45,0	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	12 ±2	685 ±117	697 ±117
Masse totale			19 ±3	1623 ±290	1642 ±291

Tableau V. 5: Fractions massiques des acides insaturés extraits par le DCM des lipides externes et internes des pollens de bouleau.

## 5. Modification des lipides internes du pollen de fléole des prés par l'ozone

La modification de la fraction lipidique par les polluants atmosphériques est une forme d'altération du pollen qui n'avait pas encore été décrite dans la littérature. La modification chimique des lipides externes par une exposition *in vitro* à l'ozone et au dioxyde d'azote a fait l'objet du **chapitre IV**. Nous avons choisi par la suite d'utiliser les travaux de la rupture artificielle du pollen pour étudier l'effet des polluants atmosphériques sur les espèces chimiques extraites de son contenu cytoplasmique. Ce type d'altération chimique n'est pas connu à l'heure actuelle. Les polluants gazeux pourraient agir sur le pollen entier ou sur ses granules cytoplasmiques et par conséquent induire une modification chimique

Chapitre V. Etude de la fraction lipidique interne du pollen et de ses modifications causées par une exposition *in vitro* à l'ozone

des lipides internes. Pour comprendre ceci, nous avons choisi d'exposer les grains de pollen à l'ozone après leur rupture artificielle. Ces expériences ont été faites uniquement sur le pollen de fléole des prés.

Les intensités des pics ont été faiblement modifiées sur le chromatogramme du pollen ayant subi un broyage préalable à l'ozonolyse (figure V.12). La similarité entre le profil lipidique de ce pollen et celui qui est seulement broyé montre que la fraction lipidique interne n'est pas modifiée par l'ozone si l'exposition se fait sur les grains de pollen broyés.

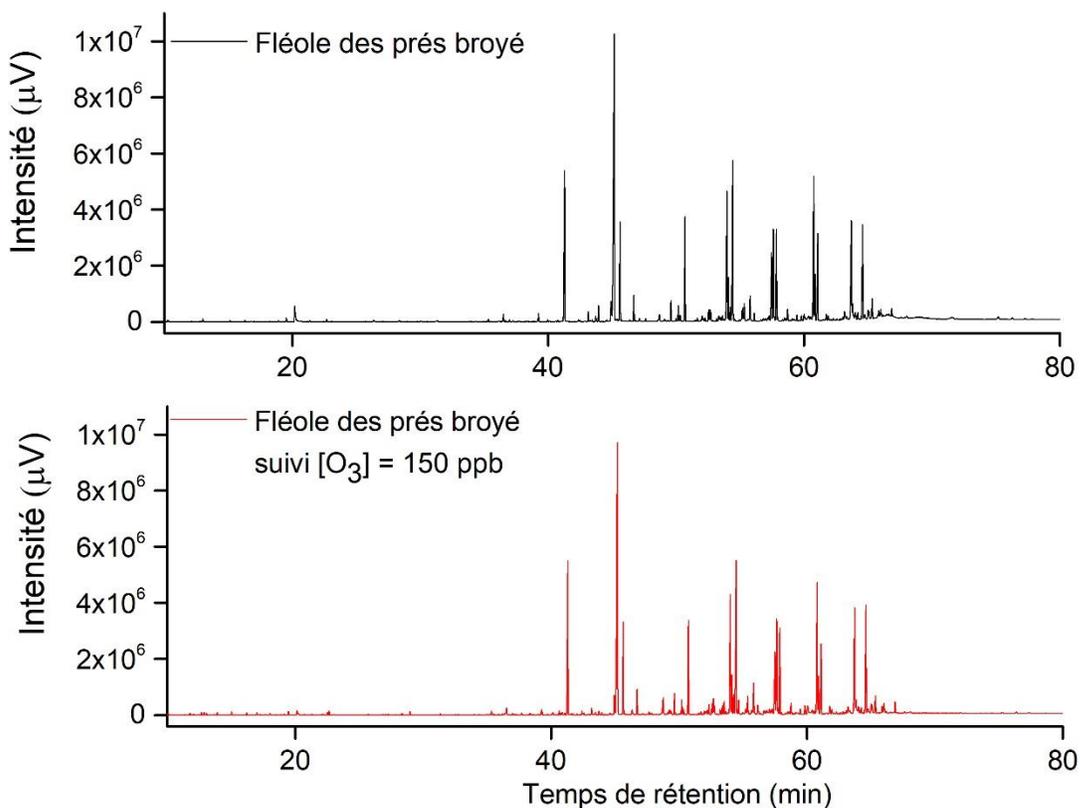


Figure V. 12: Comparaison du profil lipidique extrait des pollens de fléole des prés broyés et exposés à l'ozone durant 16h après leur broyage (chromatogrammes (GC-FID)).

### Alcanes et alcools

Comme déjà vu lors de l'étude de grains de pollen intacts, une exposition à l'ozone ne modifie pas les fractions massiques des alcanes et des alcools (figure V.13). La valeur moyenne de masse extraite des pollens broyés et de ceux qui sont broyés puis exposés à la pollution est de  $1893 \pm 136 \text{ ng.mg}^{-1}$  pour les alcanes et de  $61 \pm 7 \text{ ng.mg}^{-1}$  pour les alcools. Les fractions massiques des alcanes et alcools extraites du pollen selon les traitements subis sont représentées dans le tableau V.6.

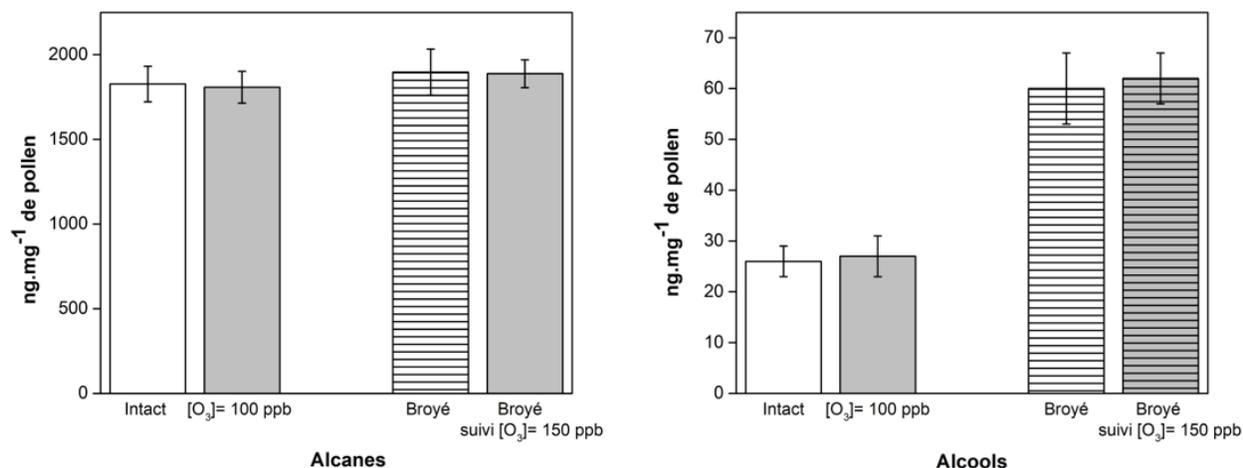


Figure V. 13: Représentation des fractions massiques des alcanes et des alcools extraits par le DCM du pollen de fléoles des prés selon le traitement subi.

T <sub>R</sub> GC/FID (min)	Masse (ng.mg <sup>-1</sup> de pollen)			
	Pollen intact	[O <sub>3</sub> ]=100 ppb	Pollen broyé	Pollen broyé suivi [O <sub>3</sub> ]=150 ppb
<b>ALCANES</b>				
Heptadécane	32,6	5 ±1	5 ±1	3 ±1
Nonadécane	37,8	3 ±1	5 ±1	3 ±1
Hénéicosane	42,5	9 ±14	11 ±1	4 ±1
Docosane	44,8	5 ±1	4 ±1	4 ±1
Tricosane	46,8	78 ±9	72 ±1	74 ±8
Tétracosane	48,9	19 ±3	17 ±3	55 ±6
Pentacosane	50,8	338 ±21	336 ±9	339 ±7
Hexacosane	52,7	38 ±4	33 ±5	48 ±7
Heptacosane	54,6	656 ±3	649 ±19	673 ±54
Octacosane	56,3	28 ±3	26 ±3	30 ±4
Nonacosane	58,3	317 ±21	322 ±34	339 ±32
Triacontane	59,64	21 ±2	19 ±2	17 ±4
Hentriacontane	61,23	311 ±22	309 ±14	309 ±10
Masse totale		1828 ±105	1808 ±94	1897 ±136
<b>ALCOOLS</b>				
Hexadécanol	39,4	12 ±1	13 ±1	26 ±3
Octadécanol	43,8	6 ±1	6 ±1	24 ±3
Docosanol	51,8	8 ±1	9 ±2	10 ±1
Masse totale		26 ±3	28 ±4	60 ±7

Tableau V. 6: Concentrations massiques des alcanes et des alcools extraits par le DCM du pollen de fléole des prés selon le traitement subi.

### Alcènes

La comparaison de la décroissance des alcènes du pollen intact et broyé sous l’effet de l’exposition à l’ozone est représentée sur la figure V.14. Lors de l’étude du pollen de fléole des prés broyé nous avons démontré que la famille des alcènes n’est pas présente dans sa fraction lipidique interne. La diminution de la masse totale des alcènes lors de l’ozonolyse est plus importante lorsque le pollen est sous la forme intacte plutôt que sous la forme broyée. La décroissance de la fraction massique totale des alcènes d’une valeur de  $535 \pm 118 \text{ ng.mg}^{-1}$  dans le pollen exposé à l’ozone est dûe à l’ozonolyse des molécules de la fraction lipidique externe (tableau V.7). Au contraire, les alcènes extraits des pollens broyés sont plus faiblement consommés par l’ozone.

Cette plus faible réactivité des alcènes après le broyage est difficile à expliquer. L’hypothèse que nous formulons est que les lipides sont présents en surface du pollen sous forme de gouttelettes microscopiques. Ces gouttelettes seraient recouvertes de débris issus du broyage du pollen et seraient donc moins réactives lors de l’ozonolyse (ces gouttelettes de lipides pourraient présenter un caractère adhésif) (Lin et al., 2013; Zinkl et al., 1999). Cette hypothèse est purement spéculative.

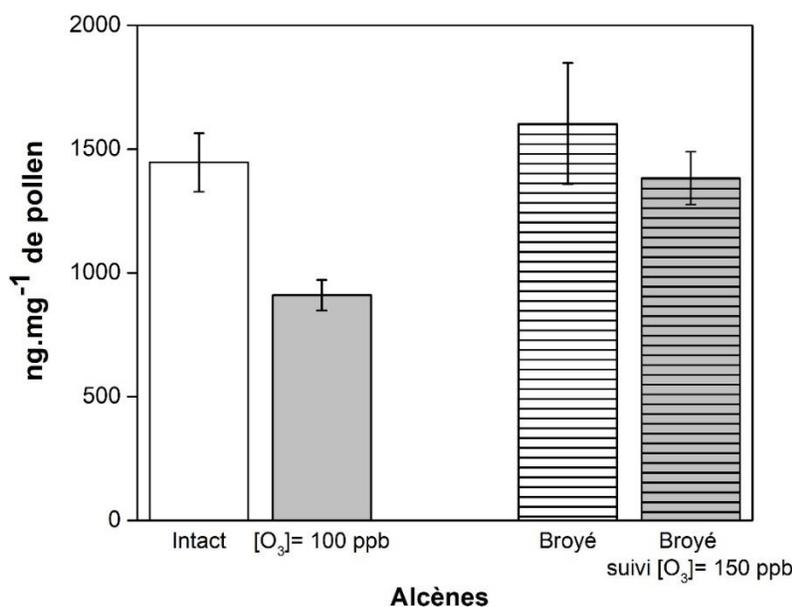


Figure V. 14: Variation de la fraction massique totale des alcènes sous l’effet d’une exposition *in vitro* à l’ozone du pollen de fléole des prés intact et broyé.

T <sub>R</sub> GC/FID (min)	Masse (ng.mg <sup>-1</sup> de pollen)				
	Pollen intact	[O <sub>3</sub> ]= 100 ppb	Pollen broyé	Pollen broyé suivi [O <sub>3</sub> ]= 150 ppb	
<b>ALCÈNES</b>					
Decène	27,5	5 ±1	3 ±1	4 ±1	3 ±1
Pentacosène	50,4	41 ±6	23 ±3	46 ±5	42 ±5
Heptacosène	54,2	464 ±47	280 ±24	526 ±81	451 ±39
Octacosène	56,2	58 ±8	43 ±3	53 ±13	50 ±5
Nonacosène	57,3	297 ±18	193 ±11	351 ±65	295 ±23
Triacotène	59,0	39 ±7	33 ±2	40 ±8	36 ±4
Hentriacotène	60,9	541 ±31	335 ±18	585 ±72	507 ±30
<b>Masse totale</b>		<b>1445 ±118</b>	<b>910 ±62</b>	<b>1605 ±245</b>	<b>1384 ±107</b>

Tableau V. 7: Concentration massique des différents alcènes extraits par le dichlorométhane du pollen de fléole des prés selon les différents traitements subis.

### Acides gras saturés

L'augmentation des acides gras saturés d'une masse de  $322 \pm 64$  ng.mg<sup>-1</sup> dans le pollen exposé à l'ozone est induite par l'ozonolyse des alcènes présents parmi les lipides externes du pollen intact. Une diminution remarquable de leur fraction massique totale est observée lorsque le pollen est broyé puis exposé à l'ozone (figure V.15). Vu l'absence de réactivité des alcènes lorsque le pollen a subi ce broyage, on ne devait pas observer une modification des acides gras saturés. Nous avons suspecté une difficulté à extraire l'acide hexadécanoïque des lipides du pollen broyé et pollué ce qui a induit la diminution de la masse totale des acides dans ce pollen (tableau V.8). La masse de l'acide hexadécanoïque de  $487 \pm 48$  ng.mg<sup>-1</sup> extrait du pollen broyé et pollué est plus faible que celle de  $686 \pm 85$  ng.mg<sup>-1</sup> extraite du pollen broyé.

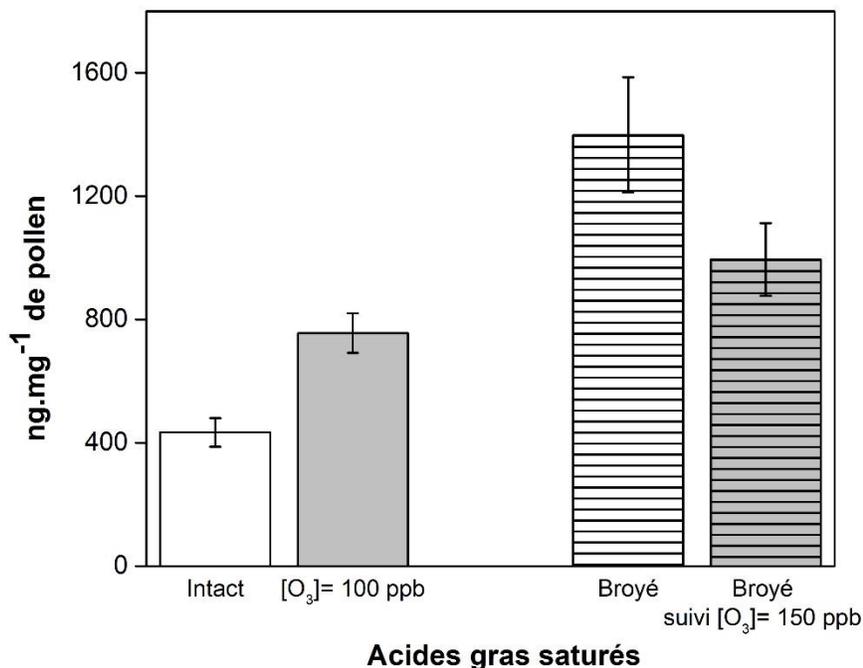


Figure V. 15: Variation de la fraction massique totale des acides gras saturés sous l'effet d'une exposition *in vitro* à l'ozone du pollen de fléole des prés intact et broyé.

T <sub>R</sub> GC/FID (min)	Masse (ng.mg <sup>-1</sup> de pollen)			
	Pollen intact	[O <sub>3</sub> ]= 100 ppb	Pollen broyé	Pollen broyé suivi [O <sub>3</sub> ]= 150 ppb
<b>ACIDES GRAS SATURÉS</b>				
Acide Pentanoïque	9,9	1 ±1	1 ±1	2 ±1
Acide Hexanoïque	13,0	6 ±1	8 ±1	11 ±2
Acide Heptanoïque	16,3	3 ±1	21 ±3	4 ±1
Acide Octanoïque	19,7	3 ±1	5 ±1	12 ±2
Acide Nonanoïque	22,8	4 ±1	31 ±4	6 ±1
Acide Décanoïque	25,2	1 ±1	2 ±1	1 ±1
Acide Undécanoïque	29,1	2 ±1	6 ±1	2 ±1
Acide Dodécanoïque	31,5	2 ±1	2 ±1	5 ±1
Acide Tétradécanoïque	36,5	10 ±1	10 ±1	35 ±11
Acide Pentadécanoïque	38,9	1 ±1	1 ±1	3 ±1
Acide Hexadécanoïque	41,4	160 ±13	185 ±16	686 ±85
Acide Heptadécanoïque	43,6	3 ±1	5 ±1	9 ±1
Acide Octadécanoïque	45,7	159 ±16	268 ±1	367 ±52
Acide Nonadécanoïque	47,7	5 ±1	8 ±1	11 ±1
Acide Eicosanoïque	49,8	41 ±1	77 ±9	82 ±6
Acide Hénicosanoïque	51,7	8 ±1	11 ±1	8 ±1
Acide Docosanoïque	53,5	16 ±1	63 ±9	149 ±25
Acide Tétracosanoïque	57,0	5 ±1	28 ±7	3 ±1
Acide Octacosanoïque	64,3	4 ±1	24 ±4	3 ±1
<b>Masse totale</b>		<b>434 ±46</b>	<b>756 ±64</b>	<b>1399 ±195</b>
				<b>989 ±129</b>

Tableau V. 8: Concentration massique des acides gras saturés extraits par le DCM des pollens de fléole des prés selon les différents traitements subis.

## Aldéhydes

La figure V.16 montre une augmentation importante de la concentration massique totale des aldéhydes lorsque le pollen intact est exposé à l'ozone. L'absence de réactivité des alcènes avec l'ozone dans le pollen broyé ensuite ozonolysé est confirmée ici par la non-modification des aldéhydes. La masse totale des aldéhydes extraits des trois pollens intact, broyé et broyé préalablement à la pollution est assez similaire (tableau V.9).

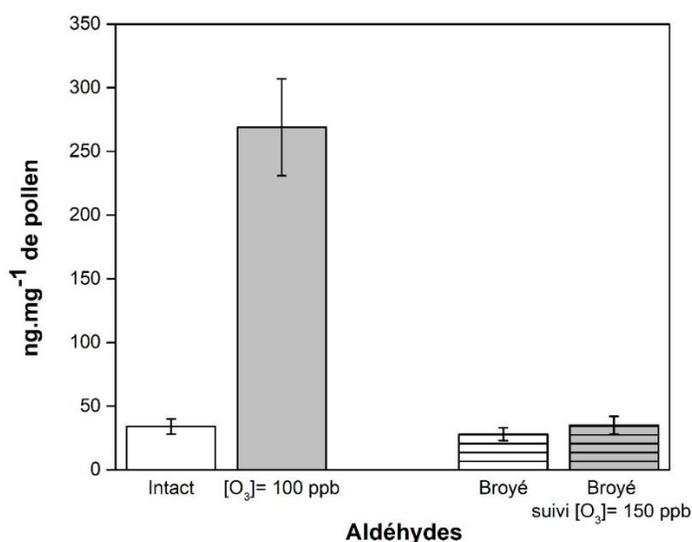


Figure V. 16: Variation de la fraction massique totale des aldéhydes sous l'effet d'une exposition *in vitro* à l'ozone du pollen de fléole des prés intact et broyé.

Aldéhydes	T <sub>R</sub> GC/FID (min)	Masse (ng.mg <sup>-1</sup> de pollen)			
		Pollen intact	[O <sub>3</sub> ] = 100 ppb	Pollen broyé	Pollen broyé suivi [O <sub>3</sub> ] = 150 ppb
Nonanal	10,1	1 ± 1	51 ± 6	1 ± 1	3 ± 1
Octadécanal	40,8	3 ± 1	41 ± 10	3 ± 1	9 ± 3
Eicosanal	45,3	5 ± 1	30 ± 4	- -	- -
Hénéicosanal	47,5	5 ± 1	9 ± 1	5 ± 1	2 ± 1
Docosanal	49,6	10 ± 1	103 ± 13	9 ± 1	8 ± 1
Tétracosanal	53,4	9 ± 1	35 ± 4	9 ± 1	13 ± 1
<b>Masse totale</b>		<b>34 ± 6</b>	<b>269 ± 38</b>	<b>28 ± 5</b>	<b>35 ± 7</b>

Tableau V. 9: Concentration massique des aldéhydes extraits par le DCM du pollen de fléole des prés selon les différents traitements subi.

## 6. Discussion et conclusion

La libération ou la diffusion des allergènes et des lipides présents dans ou sur les grains de pollen est nécessaire pour que se déclenche une réaction chez les individus sensibilisés. Le vieillissement atmosphérique du pollen peut induire sa rupture et la dispersion de son contenu cytoplasmique qui en résulte est une problématique importante pour l'asthme allergique. Lorsque le pollen entre en contact avec la muqueuse nasale, les allergènes ainsi que les lipides diffusent dans le mucus épithélial où ils deviennent disponibles pour le système immunitaire (Bashir et al., 2013a; Behrendt et al., 2001a; Plötz et al., 2004; Traidl-Hoffmann et al., 2002). Le contact du pollen avec la phase aqueuse de nos muqueuses est peu détaillé dans la littérature. Le contenu cytoplasmique du pollen allergisant peut contenir des espèces chimiques différentes que celle identifiées dans sa fraction lipidique externe, celles-ci pourraient aggraver sa réaction allergique lorsqu'il est sous forme cassée dans l'atmosphère plutôt qu'intacte. Aucun travail n'avait été réalisé permettant de mettre en évidence l'identification de la composition chimique interne des grains de pollen allergisants. Dans ce chapitre, nous avons exposé une étude d'identification et de quantification des lipides internes des pollens ainsi que des travaux préliminaires sur la modification des espèces chimiques internes du pollen de fléole des prés par l'ozone.

Dans la littérature, les différents mécanismes de rupture du pollen dans l'atmosphère peuvent induire la libération de son contenu cytoplasmique vers le milieu extérieur. Le mécanisme principal de rupture du pollen dans l'atmosphère et la dispersion de son contenu cytoplasmique impliquent la présence d'eau. L'ensemble des processus de vieillissement atmosphérique peut fragiliser la structure du grain de pollen et entraîner sa rupture (Motta et al., 2006). La pollution atmosphérique pourrait être un facteur adjuvant de la rupture du pollen dans l'atmosphère soit après son contact avec une phase aqueuse soit après un choc mécanique. La dispersion de son contenu cytoplasmique qui en résulte est une problématique importante pour l'asthme allergique. Cette modification induit non seulement la libération des allergènes qui sont majoritairement stockés dans le cytoplasme (Grote, 1999) mais également la libération des granules cytoplasmiques ayant une taille comprise entre 0,5 à 4,5  $\mu\text{m}$  contre 15 à 50  $\mu\text{m}$  en moyenne pour la plupart des grains de pollen allergisants (Schäppi et al., 1997). Les granules cytoplasmiques présentent un potentiel allergisant doublement dangereux (taille micrométrique) pour la santé humaine d'où l'importance d'identifier leurs espèces chimiques internes qui pourraient aggraver leur potentiel allergisant.

Il s'agit ici d'une première étude d'identification de la composition chimique interne des pollens allergisants. Les images microscopiques des pollens de fléole des prés ayant subi une rupture artificielle montrent que leur contenu cytoplasmique est fortement déversé à l'extérieur. Le broyage mécanique favorise donc l'accessibilité de la fraction lipidique totale du pollen. Cette technique a déjà été utilisée dans la littérature pour étudier la composition chimique interne du pollen de *Brassica napus* (Evans et al., 1991). Les masses des lipides externes ont été obtenues par extraction du pollen intact avec du dichlorométhane. Les lipides internes ont été obtenus par extraction de pollens ayant subi au préalable une rupture mécanique artificielle.

L'analyse des extraits organiques des pollens broyés (lipides internes et externes) montre que le pollen de bouleau contient plus de composés organiques extractibles que le pollen de fléole des prés. La répartition de ces composés dans le revêtement pollinique et dans le contenu cytoplasmique n'est pas similaire pour les deux pollens. La masse totale des lipides extractibles du pollen de bouleau est répartie pour moitié entre sa fraction lipidique externe et interne alors que la majorité des espèces organiques du pollen de fléole des prés est extraite après le lavage du pollen intact par le solvant organique. Contrairement aux pollens de fléole des prés, les lipides internes du pollen de bouleau contiennent des masses plus importantes en alcènes, alcools et alcanes.

Le broyage mécanique a favorisé une libération importante des acides gras saturés contenus à l'intérieur des pollens de fléole des prés et de bouleau. Parmi les acides gras saturés internes, l'acide hexadécanoïque (C16:0) présente le pourcentage d'extraction le plus important. Plusieurs auteurs ont travaillé sur l'identification de la composition chimique interne de pollens (Evans et al., 1992, 1991; Piffanelli et al., 1997; Piffanelli and Murphy, 1998). Ces recherches ont montré des différences significatives entre la composition d'acides gras saturés et insaturés extraits des lipides externes et internes du pollen *Brassica napus*. L'acide hexadécanoïque est majoritairement extrait de ses lipides internes (Piffanelli et al., 1997). En effet il a été montré que cet acide régule *in vitro* la libération des cytokines des lymphocytes périphériques humains (Karsten et al., 1994; Lernhardt, 1990). La richesse du contenu cytoplasmique des pollens de fléole des prés et de bouleau en acide C16:0 pourrait être considérée comme une nouvelle hypothèse dans la littérature pour expliquer l'augmentation de leur pouvoir allergisant lorsqu'ils sont rompus dans l'environnement (Bashir et al., 2013a). Nous supposons que les granules cytoplasmiques des pollens de fléole des prés et de bouleau peuvent libérer des masses importantes d'acide hexadécanoïque lorsqu'ils sont en contact avec les muqueuses respiratoires et par

Chapitre V. Etude de la fraction lipidique interne du pollen et de ses modifications causées par une exposition *in vitro* à l'ozone

conséquence induire l'augmentation de l'inflammation des voies aériennes (Bashir et al., 2013a; Traidl-Hoffmann et al., 2003).

La rupture artificielle des grains de pollen a favorisé une libération importante des acides gras insaturés présents dans leur contenu cytoplasmique. La répartition de ces acides dans les fractions lipidiques externes et internes n'est pas similaire pour les deux pollens étudiés. Les acides  $\alpha$ -linoléique et linoléique sont majoritairement extraits des lipides internes du pollen de bouleau par contre seul l'acide  $\alpha$ -linoléique est plus extrait du contenu cytoplasmique du pollen de fléole des prés. Selon notre connaissance, l'identification des acides insaturés extraits en phase organique des lipides internes n'a été réalisée que pour les pollens de *Brassica napus* (Evans et al., 1992, 1991; Piffanelli and Murphy, 1998, 1998). Les études s'intéressent plutôt à l'identification de la composition chimique des lipides externes du pollen (Abed El Azim, 2015; Bashir et al., 2013a; Henricsson et al., 1996; Naas et al., 2016; Zhu et al., 2018). Les rôles des acides  $\alpha$ -linoléique et linoléique dans la réaction allergique sont de plus en plus détaillés dans la littérature scientifique. Les dérivés de ces acides stimulent et attirent les cellules du système immunitaire inné ceci pourrait donc contribuer à une augmentation ou un maintien de la réaction inflammatoire allergique (Gilles et al., 2009; Plötz et al., 2004; Traidl-Hoffmann et al., 2005, 2002). Ces acides pourraient être facilement libérées en contact avec la phase aqueuse de nos muqueuses des grains de pollen cassé ou rompus plutôt des grains de pollen intact. Cette hypothèse confère un rôle particulier pour la réaction allergique des grains de pollens ayant subi une rupture.

La fraction organique extractible du pollen est répartie dans : (i) les lipides externes du revêtement pollinique, (ii) les lipides internes membranaires des vésicules intracellulaires et (iii) les lipides internes contenus dans les corps de stockage des lipides (**Cf. partie 2 du chapitre I**). Dans cette étude nous avons extraits des domaines intracellulaires des pollens des masses importantes en acides gras saturés en particulier l'acide hexadécanoïque (C16:0) et en acides gras insaturés  $\alpha$ -linoléique (C18:3) et linoléique (C18:2). Les lipides internes membranaires et de stockage du pollen de *Brassica napus* contiennent des niveaux élevés en acides C16:0 et C18:3 (Evans et al., 1991). Le broyage mécanique des grains de pollen de fléole des prés et de bouleau favorise la libération de leurs vésicules membranaires intracellulaires et aussi de leurs corps de stockage. Cette libération facilite donc l'extraction importante des acides C16:0, C18:2 et C18:3 présents dans leur contenu cytoplasmique.

Les acides insaturés ( $\alpha$ -linoléique et linoléique) peuvent se retrouver sur les granules mais également dans le pollen cassé. Il s'agit d'une nouvelle approche dans la recherche qui pourrait expliquer

l'aggravation de symptômes allergiques des pollens allergisants lorsque ceux-ci sont rompus ou cassés dans l'atmosphère. Concernant l'identification de la fraction lipidique interne nos travaux doivent être étendus sur autres types de pollens allergisants afin de vérifier s'ils sont porteurs de lipides adjuvants. Il serait intéressant de broyer les grains de pollen pour pouvoir libérer leur granule cytoplasmique et ensuite les extraire avec une solution aqueuse (par exemple par le fluide nasal) en présence ou non d'une agitation douce. Ces travaux permettraient de vérifier si les lipides sont extraits des granules cytoplasmiques ou du pollen cassé lorsque ceux-ci sont en contact avec la phase aqueuse de nos muqueuses.

## 7. Références bibliographiques

- Abed El Azim, M.H.M., 2015. Identification Phenolic and Biological Activities of Methanolic Extract of Date Palm Pollen (*Phoenix dactylifera*). *Journal of Microbial & Biochemical Technology* 07.
- Bashir, M.E.H., Lui, J.H., Palnivalu, 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.
- Behrendt, H., Kasche, A., Ebner von Eschenbach, C., Risse, U., Huss-Marp, J., Ring, J., 2001a. 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.
- Evans, D.E., Taylor, P.E., Singh, M.B., Knox, R.B., 1992. The interrelationship Between the Accumulation of Lipids, Protein and the Level of Acyl Carrier Protein During the Development of *Brassica napus* L. Pollen. *Planta* 186, 343–354.
- Evans, D.E., Taylor, P.E., Singh, M.B., Knox, R.B., 1991. Quantitative Analysis of Lipids and Protein from the Pollen of *Brassica napus* L. *Plant Science* 73, 117–126.
- Gilles, S., Mariani, V., Bryce, M., Mueller, M., Ring, J., Behrendt, H., Jakob, T., Traidl-Hoffmann, C., 2009. Pollen Allergens do not Come Alone: Pollen Associated Lipid Mediators (PALMS) Shift the Human Immune Systems Towards a TH2-Dominated Response. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* 5, 3.
- 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.
- 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.
- Karsten, S., Schäfer, G., Schauder, P., 1994. Cytokine production and DNA synthesis by Human peripheral Lymphocytes in response to Palmitic, Stearic, Oleic, and Linoleic acid. *Journal of Cellular Physiology* 161, 15–22.
- Lernhardt, W., 1990. Fatty Acid Requirement of B lymphocytes Activated in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 166, 879–885.
- Lin, H., Gomez, I., Meredith, J.C., 2013. Pollenkitt Wetting Mechanism Enables Species-Specific Tunable Pollen Adhesion. *Langmuir* 29, 3012–3023.
- Motta, A., Marliere, M., Peltre, G., Sterenberg, P., 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.

Chapitre V. Etude de la fraction lipidique interne du pollen et de ses modifications causées par une exposition *in vitro* à l'ozone

- 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.
- Piffanelli, P., Murphy, D.J., 1998. Novel Organelles and Targeting Mechanisms in the Anther Tapetum. *Trends in Plant Science* 3, 250–252.
- 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*. *Plant J.* 11, 549–562.
- 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.
- Schäppi, G.F., Taylor, P.E., Suphioglu, C., Knox, R.B., 1997. A new Approach to the Investigation of Allergenic Respirable Particles using a Modified Andersen Impactor. *Grana* 36, 373–375.
- 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 Ggranulocytes. *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.
- Traidl-Hoffmann, C., Mariani, V., Hochrein, H., Karg, K., Wagner, H., Ring, J., Mueller, M.J., Jakob, T., Behrendt, H., 2005. Pollen-Associated Phytoprostanes Inhibit Dendritic Cell Interleukin-12 Production and Augment T Helper Type 2 cell Polarization. *Journal of Experimental Medicine* 201, 627–636.
- 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.
- Zinkl, G.M., Zwiebel, B.I., Grier, D.G., Preuss, D., 1999. Pollen-Stigma Adhesion in *Arabidopsis*: a Species-Specific Interaction Mediated by Lipophilic Molecules in the Pollen Exine. *Development* 126, 5431–5440.



# Conclusions générales et perspectives



Le transport aérien du pollen, particule porteuse du matériel génétique, est nécessaire pour la reproduction des végétaux. Les effets de la dispersion des grains de pollen anémophiles sur la santé des sujets allergiques et asthmatiques sont une question majeure de santé publique. Le pollen en suspension dans l'air ne fonctionne pas seulement comme un transporteur d'allergènes, mais plutôt comme un vecteur des médiateurs lipidiques bioactifs. Ceci rend le grain de pollen doublement dangereux à la santé des sujets allergiques. La fraction lipidique externe et interne du pollen est localisée respectivement dans son revêtement pollinique et dans son contenu cytoplasmique. Étant donné que les lipides sont des acteurs essentiels dans de nombreuses facettes de la réponse immunitaire, il est concevable que le pollen forme une source de molécules immunostimulantes pouvant jouer un rôle potentiel dans la régulation immunitaire et le contrôle des réponses allergiques. La recherche des effets du pollen sur la santé humaine doit prendre en compte la composition de son profil lipidique.

Ces dernières décennies, la compréhension des effets du vieillissement atmosphérique du pollen sur l'augmentation des réactions allergiques et asthmatiques a reçu beaucoup d'attention pour répondre à la question : « À quel point la pollution transforme le pollen et le rend plus allergisant ? ». En effet, les pollens exposés à une pollution expérimentale dans des conditions contrôlées ainsi que les pollens récoltés des zones polluées ont clairement montré plusieurs modifications. La pollution atmosphérique a des effets directs sur les propriétés biologiques, physiques et chimique du pollen. Les principaux polluants atmosphériques urbains, l'ozone et le dioxyde d'azote, peuvent réduire le pouvoir de germination et la viabilité du pollen. Les protéines, et en particulier les allergènes, sont également modifiées suite à une exposition directe à ces gaz. L'exposition à ces polluants peut rendre plus facile la rupture du pollen et la libération de son contenu cytoplasmique. La modification chimique du pollen et en particulier de sa fraction lipidique externe par l'ozone et le dioxyde d'azote n'est pas encore documentée dans la littérature. La connaissance de la modification des lipides des pollens allergisants est cruciale afin de comprendre les impacts potentiels de cette altération sur la santé des sujets allergiques.

Nos recherches ont été effectuées sur deux pollens de pertinence allergologique particulière sur le territoire français : la fléole des prés et le bouleau. Dans ce travail nous avons apporté des nouvelles approches comblant des manques dans la littérature, à savoir : (i) la comparaison des profils lipidiques extraits des pollens récoltés à plusieurs endroits et à des dates distinctes, (ii) l'étude de la fraction lipidique extractibles en phase organique et en particulier sa quantification, (iii) la compréhension du pouvoir d'extraction de la fraction lipidique par une phase aqueuse, (iv) la modification de la fraction

## Conclusion

lipidique externe par l'exposition *in vitro* aux polluants atmosphériques et (v) l'étude d'identification et de quantification des lipides internes des pollens extraits en phase organique. Les analyses des extraits organiques des pollens en GC-MS/FID nous ont permis de réaliser respectivement des études d'identification et de quantification des lipides extraits en phase organique et aqueuse des pollens selon les différents traitements subis : intact, pollué et broyé.

La comparaison des extraits organiques des pollens de fléole des prés récoltés à plusieurs endroits et à des différentes dates montre que leurs profils lipidiques possèdent des espèces chimiques similaires mais à des concentrations massiques différentes. Ces différences peuvent être expliquées par le fait que la synthèse de la fraction lipidique diffère d'un spécimen à un autre et pourra être influencée par les facteurs climatiques et atmosphériques.

L'un des principaux apports de nos recherches est l'identification et la quantification des espèces chimiques extraites de la fraction lipidique externe des pollens allergisants. Les travaux de quantification des lipides ne sont pas disponibles dans la littérature, seules sont fournies les aires chromatographiques relatives. Les mêmes familles de composés chimiques sont extraites en phase organique des pollens de fléole des prés et de bouleau mais à des concentrations massiques différentes. La fraction lipidique externe est riche en alcanes et en alcènes pour le pollen de fléole des prés et en alcènes et en alcools pour le pollen de bouleau. Cette différence de répartition lipidique pourrait influencer le potentiel allergisant de chaque pollen et par conséquent la réponse immunitaire correspondante. Le potentiel inflammatoire des acides gras saturés à longue chaîne identifiés dans les lipides externes de ces deux pollens pourrait être un facteur dans l'inflammation des voies aériennes et la sensibilisation immunitaire allergique aux pollens. La masse totale des lipides extraits d'un gramme de pollen a été déterminée pour la première fois à notre connaissance pour des pollens allergisants : le pollen de bouleau contient une masse plus importante en lipides extractibles ( $27 \pm 1$  mg) que le pollen de fléole des prés ( $21 \pm 1$  mg). Seule une fraction des lipides totaux a été identifiée dans ce travail (18 % pour le pollen de la fléole des prés et 13 % pour le pollen de bouleau). La fraction lipidique restante non identifiée durant ce travail peut être due à la présence de certains composés qui sont extraits par le solvant organique mais qui n'ont pas été élués ou identifiés comme par exemple des sucres ou des acides aminés qui se trouvent dans le revêtement pollinique. Des travaux supplémentaires devront être effectués afin d'identifier la composition chimique restante de la fraction lipidique externe. La différence de quantité des lipides observée entre les deux pollens pourrait être un facteur supplémentaire pour expliquer leurs pouvoirs allergisants différents.

Concernant l'extraction des pollens en phase aqueuse, nos résultats nous ont permis de montrer qu'une agitation douce est au moins nécessaire pour extraire la fraction lipidique des pollens, il s'agit d'un fait particulièrement remarquable. Le solvant organique a favorisé une extraction de la fraction lipidique externe, par contre, l'agitation mécanique au moment de l'extraction aqueuse a favorisé la libération de la fraction lipidique interne induite par le déversement du contenu cytoplasmique du grain de pollen cassé. Ces résultats sont en contradiction avec certains travaux de la littérature concernant l'extraction des pollens par le PBS. Cette contradiction peut être reliée (i) aux différentes étapes expérimentales de ce type d'extraction et (ii) à l'état de fraîcheur du pollen qui pourrait rendre le pollen plus extractible en phase aqueuse (notamment en favorisant sa rupture). Les extraits aqueux du pollen de fléole des prés contiennent une masse importante d'acide  $\alpha$ -linoléique et une très faible masse d'acide linoléique. Les extraits aqueux de pollen de bouleau sont quant à eux riches en ces deux acides insaturés. Concernant les effets sanitaires, ces acides ont un rôle adjuvant dans les phases d'induction des réactions allergiques. Toutefois, le mécanisme de la libération de la fraction lipidique en contact de la phase aqueuse de nos muqueuses est peu détaillé à l'heure actuelle. Afin de comprendre le mécanisme de contact pollen-muqueuse, des travaux supplémentaires sur l'extraction des lipides par le fluide nasal seraient à prévoir. Une étude par imagerie microscopique des pollens immergés dans ce fluide pourrait servir également pour comprendre si les grains de pollen peuvent être rompus en contact avec nos muqueuses sous l'effet d'un choc osmotique.

Pour expliquer l'augmentation de la prévalence de l'allergie il faut non seulement s'intéresser à l'étude de la modification des allergènes du pollen par la pollution atmosphérique mais également se renseigner sur la modification de sa composition chimique pouvant jouer un rôle adjuvant aux réactions allergiques. Le second apport de nos recherches est l'étude de la modification de la fraction lipidique des pollens par une exposition *in vitro* aux polluants gazeux. Les pollens ont été pollués expérimentalement avec des doses de l'ordre de 100 ppb d'ozone et de dioxyde d'azote pendant 16h. L'exposition des pollens aux deux polluants a induit une diminution des alcènes. La consommation de ces composés extraits des lipides externes du pollen par une exposition *in vitro* à l'ozone est expliquée par la réactivité des molécules d'ozone avec leur double liaison. La réaction d'ozonolyse des alcènes contribue à la production des acides gras saturés et des aldéhydes. Les modifications chimiques des pollens sont plus importantes par une exposition à l'ozone uniquement que plutôt aux deux polluants ensemble. Pour expliquer ces résultats nous supposons que les molécules de dioxyde d'azote peuvent s'adsorber sur la paroi pollinique externe et par conséquent empêcher la réactivité de l'ozone

## Conclusion

avec les alcènes localisés dans la fraction lipidique externe. Ces résultats montrent que les effets de plusieurs polluants gazeux sur l'altération de la composition chimique de la paroi pollinique externe est une étude très complexe. Les effets adjuvants ou inhibiteurs des polluants gazeux sur la modification chimique du pollen dans l'atmosphère sont peu connus et complexe à étudier expérimentalement. Au contraire les lipides extractibles en phase aqueuse des pollens de fléole des prés et de bouleau n'ont pas présenté une modification chimique par l'ozone. Les quantités des espèces chimiques extraites par le PBS sont faibles et ceci a rendu difficile les identifications. Concernant la quantité de protéines totale extraites des pollens de fléole des prés pollués à 100 ppb d'ozone, elle n'a pas présenté une modification par cette exposition et ceci a été déjà montrée dans la littérature. La présence importante de doubles liaisons dans la fraction lipidique a également un rôle d'antioxydant propre à protéger le contenu cytoplasmique qui est le plus sensible du pollen contre les agressions induites par le vieillissement atmosphérique.

Les expérimentations sur l'influence du pollen par la pollution atmosphérique sur le système immunitaire doivent prendre en compte non seulement les modifications de ses allergènes mais également celles de sa fraction lipidique. Il est donc important de continuer à développer nos travaux sur les effets potentiels sur l'allergie et la réaction inflammatoire des lipides modifiés par les polluants gazeux et en particulier les acides gras saturés générés par la réaction d'ozonolyse.

La rupture artificielle des grains de pollen nous a permis de montrer que la répartition des acides gras insaturés dans les fractions lipidiques internes n'est pas similaire pour les deux pollens étudiés. Les acides  $\alpha$ -linoléique et linoléique sont majoritairement extraits des lipides internes du pollen de bouleau par contre seul l'acide  $\alpha$ -linoléique est extrait du contenu cytoplasmique du pollen de fléole des prés. Nos travaux doivent être étendus sur autres types de pollens allergisants afin de vérifier s'ils sont porteurs de lipides adjuvants. Il serait intéressant de broyer les grains de pollen pour pouvoir libérer leurs granules cytoplasmiques et ensuite les extraire avec une solution aqueuse (par exemple par le fluide nasal) en présence ou non d'une agitation douce. Ces travaux permettraient de vérifier si les lipides sont extraits des granules cytoplasmiques lorsqu'ils sont en contact avec la phase aqueuse de nos muqueuses.

En effet des phénomènes atmosphériques peuvent induire la rupture mécanique des grains de pollen et par conséquent la présence du pollen cassé ou des granules cytoplasmiques dans la fraction fine de l'aérosol. En effet le vent avec une vitesse de quelques mètres par seconde, pourrait induire la rupture de quelques grains de pollen. Par ailleurs le choc d'un grain sur une surface rigide (sur une voiture, sur

un sol bétonné ou goudronné) pourrait engendrer sa cassure. Enfin l'écrasement des grains de pollen par les pieds ou par les roues pourrait conduire également leur modification physique et le déversement de leur contenu cytoplasmique. Le pollen renferme dans son contenu cytoplasmique des médiateurs lipidiques qui peuvent interagir dans la réaction allergique comme adjuvants. Après la cassure des grains de pollen, ces lipides peuvent se retrouver sur les granules cytoplasmiques mais également dans le pollen cassé. Nous avons trouvé que le contenu cytoplasmique des pollens de fléole des prés et de bouleau contiennent des masses importantes des médiateurs lipidiques ( $\alpha$ -linoléique et linoléique). Au moment de l'inhalation des pollens ces acides sont libérés dans la phase aqueuse de nos muqueuses ce qui pourrait par conséquent induire une augmentation de la réaction inflammatoire allergique des granules cytoplasmiques ou des pollens cassés. La rupture des grains de pollens est importante pour la dispersion des allergènes dans la fraction respirable de l'aérosol atmosphérique mais par ces travaux, nous montrons que la rupture du grain permet également une biodisponibilité facilitée de lipides adjuvants à la réaction allergique. Il me semble important de ne pas se limiter uniquement à l'effet sanitaire des pollens intacts, mais d'avoir une vue complète sur la composition des adjuvants de la réaction allergique libérés des grains de pollen ayant subi une cassure dans l'atmosphère.



# Résumé

La fraction lipidique pollinique a un effet adjuvant sur la réaction allergique et elle est impliquée dans les processus de germination. L'altération de cette fraction par les polluants atmosphériques est peu documentée dans la littérature bien que des effets délétères soient possibles sur la santé des sujets allergiques.

Notre travail a été effectué sur deux pollens parmi les plus allergisants : la fléole des prés (*phleum pratense*) et le bouleau (*betula pendula*). La fraction lipidique des pollens intacts a été identifiée et quantifiée par chromatographie en phase gazeuse équipée d'un détecteur à ionisation de flamme ou couplée à la spectrométrie de masse. Les principales familles chimiques identifiées sont les suivantes : alcanes, alcools, alcènes, acides gras saturés et insaturés, aldéhydes et stérols. Une exposition *in vitro* des pollens à l'ozone a mis en évidence une réactivité des alcènes et une production d'acides gras saturés et d'aldéhydes. Le dioxyde d'azote a montré quant à lui un rôle protecteur vis-à-vis de la réactivité de l'ozone. La biodisponibilité des lipides des pollens intacts semble faible comme l'ont montré les extractions du pollen en milieu aqueux sans agitation. Par ailleurs, nos résultats semblent donner un nouveau rôle à la rupture des pollens dans l'atmosphère. En effet, nous avons observé une extraction facilitée des lipides pour les pollens broyés et notamment d'espèces immunostimulantes telles que les acides linoléique et  $\alpha$ -linoléinique. Le rôle d'adjuvants à la réaction allergique de ces lipides extraits du pollen cassé ou pollué devra être précisé dans une étude ultérieure.

# Abstract

The pollen lipidic fraction has an adjuvant effect on the allergic reaction and it is involved in germination processes. The alteration of pollen lipids by atmospheric pollutants is poorly documented in the literature although negative health effects are suspected.

Our work was carried out on two highly allergenic pollens: timothy grass (*phleum pratense*) and birch tree (*betula pendula*). The lipid fraction of intact pollen was identified and quantified by gas chromatography equipped with a flame ionization detector or coupled to mass spectrometry. The main chemical families identified are: alkanes, alcohols, alkenes, saturated and unsaturated fatty acids, aldehydes and sterols. *In vitro* exposure of pollen to ozone has exhibited the reactivity of alkenes and the production of saturated fatty acids and aldehydes. Nitrogen dioxide has shown a protective role toward the reactivity of ozone. Furthermore, the bioavailability of lipids from intact pollen appears to be low as shown by pollen extractions with aqueous solvent without agitation. Moreover, our results give a new role to the rupture of pollen in the atmosphere. In fact, we observed a facilitated extraction of lipids for crushed pollen and in particular the release of immunostimulatory species such as linoleic and  $\alpha$ -linolenic acids. The adjuvancy effects of the lipids extracted from broken or polluted pollen grains to the allergic reaction should be unraveled in a future work.