

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
المدرسة الوطنية العليا للفلاحة - الحراش الجزائر
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE EL-HARRACH – ALGER

THÈSE

Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de
Docteur en sciences agronomiques

option : phytotechnie

**Le grain de pollen de pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.)
comme bio-indicateur de la pollution atmosphérique :
variabilité structurale et morphologique**

Présentée et soutenue par :
Oumsaad NAAS épouse BENMELOUKA

Soutenue le 19 Décembre 2017

jury :

<i>Président</i>	Mr ABDELKERIM H.	Professeur (I.N.A.) Alger
<i>Directeur de thèse</i>	Mr CHOUKRI A.	Professeur (U.Z.A.D.) Djelfa
<i>Codirecteur de thèse</i>	Mr KHELIFI L.	Professeur (I.N.A.) Alger
<i>Examinatrice</i>	Mme BELHADJ S.	Professeur (U.Z.A.D.) Djelfa
<i>Examineur</i>	Mr BOUDJENIBA M.	Professeur (E.N.S.) Kouba

année universitaire 2016-2017

Résumé

Le pollen du pin d'Alep, *Pinus halepensis* Mill., est testé pour sa capacité à servir de bio-indicateur de la pollution atmosphérique. Les polluants atmosphériques peuvent en effet perturber physiologiquement le pollen. Ces perturbations atteignent soit la composition biochimique du pollen, soit la morphologie du grain comme sa taille et sa forme, soit également la fonction de reproduction du pollen : sa fertilité.

Le pollen a été prélevé sur quatre sites en Algérie : Djelfa ville, pollution urbaine moyenne ; Djelfa forêt (forêt de Senalba) ; Ben Aknoun ville (Alger), pollution urbaine importante ; et la forêt de Bouchaoui à Alger. Après le prélèvement, le pollen a subi une déshydratation pendant 4h à l'étuve à 37°C puis a été conservé au froid à 4°C.

Le pollen rural issu des deux forêts de Bouchaoui et de Djelfa, a été exposé au laboratoire à des concentrations d'ozone allant de 87, 180, 305 et 1350ppb pour différentes durées d'exposition de quelques minutes à plusieurs heures. Une exposition au NO_2 a été réalisée sur le même pollen rural avec la concentration de 150ppb pendant les durées de 4 ; 8 et 24 heures.

Les perturbations engendrées par la pollution sur le pollen ont été recherchées par :

- Mesures biométriques effectuées sur les grains de pollen ;
- Des tests de fertilité effectués par un test colorimétrique avec le réactif d'Alexander ;
- Essais de germination in vitro sur un pollen congelé et d'autre lyophilisé ;
- Des mesures de l'acidification (pH) des grains de pollen ;
- Dosage des protéines hydrosolubles et analyses d'électrophorèse en SDS-PAGE ; 1D 2D et IEF ;
- Analyse en GC/MS et détection des HAPs ;
- Analyses de surface par TOF-SIMS ;
- Analyses d'imagerie par MEB.

L'influence du lieu de prélèvements sur ces différents tests a été discutée et une comparaison avec la pollution artificielle à l'ozone et au NO_2 en laboratoire est effectuée.

Mots clefs : Bio-indication ; pollen ; *Pinus halepensis* Mill. ; Ozonolyse ; fertilité ; SDS-PAGE .

الملخص:

حبوب اللقاح من الصنوبر الحلبي. *Pinus halepensis* MILL. يتم اختبار قدرتها كمؤشرات بيولوجية لتلوث الهواء .

ملوثات الهواء يُمكن في الواقع أن تُحدث اضطرابات فيزيولوجية لحبوب اللقاح ، هذه الاضطرابات تمس التركيبة الكيميائية الحيوية لحبوب اللقاح ، أو الشكل الظاهري لذات الحبوب ، نقصد هنا الشكل والحجم ، كما أنها قد تمس الوظيفة التكاثرية لحبوب اللقاح.

تم جمع حبوب اللقاح من أربع مواقع في الجزائر من مدينة الجلفة ذات التلوث الحضري المتوسط ، من غابة الجلفة (غابة سن الباء) ، من مدينة بن عكنون بالجزائر العاصمة ذات التلوث الحضري الكبير ومن غابة بوشاوي بالجزائر العاصمة.

بعد أخذ العينات، تم تجفيف حبوب اللقاح لمدة أربع ساعات في فرن المخبر على 37 درجة مئوية، ثم تم تخزينها في درجة برودة تساوي 04 درجات مئوية.

حبوب اللقاح المنتقاة من المناطق الغابية (غابة بوشاوي وغابة سن الباء) تم تعريضها في المختبر إلى غازي الأوزون وأكسيد الأزوت بالتراكيز التالية : 87 و 180 و 305 و 1350 ppb لفترات مختلفة من عدة دقائق إلى عدة ساعات بالنسبة لغاز الأوزون. أما بالنسبة لأكسيد الأزوت فبتراكيز 150ppb لفترات ممتدة من 04 و 08 و 24 ساعة.

الاضطرابات الناتجة عن تلوث حبوب اللقاح تم البحث عنها بواسطة :

- القياسات البيومترية التي أجريت على حبوب اللقاح.
- كشف الخصوبة بواسطة الكاشف اللوني - كاشف الكسندر
- إجراء اختبارات الإنبات على حبوب اللقاح المجمدة وغيرها من تجميد المجفف
- قياس درجة التحميض (الرقم الهيدروجيني) لحبوب اللقاح.
- جرعة من البروتينات للذوبان في الماء والكهربائي في تحليل SDS-PAGE و 1D و 2D و IEF .
- تحاليل بواسطة GC/MS والكشف عن HAPs.
- تحليل السطح بتقنية TOF-SIMS.
- تحليل صوري بتقنية MEB.

تأثير مكان أخذ العينات على الاختبارات تم مناقشتها ، كما أنه تم مقارنة التلوث الإصناعي بالأوزون و بأكسيد الأزوت في المختبر.

كلمات مفتاح : مؤشرات بيولوجية ، حبوب اللقاح ، الصنوبر الحلبي . *Pinus halepensis* MILL ، التعرض للأوزون ، الحيوية ، SDS-PAGE.

Abstract

The pollen of the Aleppo pine, *Pinus halepensis* Mill., Is tested for its ability to be used as bio-indicators of air pollution. Air pollutants can indeed physiologically disrupt pollen. These disturbances reached either the biochemical composition of pollen or the morphology of the grain such as size and shape, and also the pollen reproductive function : its viability.

The pollen was collected from four sites in Algeria Djelfa city average urban pollution ; Djelfa forest (Senalba forest); Ben Aknoun city (Algiers), significant urban pollution; and forest Bouchaoui in Algiers. After collection, the pollen has been dehydrated for 4 hours in an oven at 37°C and then kept cold at 4°C. Rural pollen from two forests Bouchaoui and Djelfa, was exposed in the laboratory to ozone concentrations of 87, 305, 180 and 1350ppb for different exposure times from several minutes to several hours. NO_2 's exposure was performed on the same rural pollen with the concentration of 150ppb for durations of 4; 8 and 24 hours.

The disruption caused by the pollution on pollen were searched by :

- Biometric measurements performed on the pollen grains ;
- Fertility tests performed by a colorimetric test with Alexander reagent ;
- In vitro germination tests on a frozen pollen and other freeze-dried ;
- Steps of acidification (pH) of the pollen grains ;
- Dosage of water-soluble proteins and electrophoresis in SDS-PAGE analysis ; 1D and 2D IEF.
- Analysis by GC / MS and detection of PAH ;
- Surface analysis : TOF-SIMS ;
- Imaging analyzes by SEM.

The influence of the place of withdrawals from these tests was discussed and a comparison with the artificial ozone pollution and laboratory NO_2 is performed.

Keywords : Bio-indication ; pollen ; *Pinus halepensis* Mill. ; Ozonolyse ; viability ; SDS-PAGE

Remerciements

Louange à ALLAH, maître de l'univers pour toutes ses bontés et pour sa miséricorde ; paix et salut à mon premier éducateur, le prophète MOHAMMED (Salutations et Bénédiction de Dieu sur Lui).

Je tiens en termes de ce présent travail de recherche de présenter :

Mes sincères et vifs remerciements s'adressent au Professeur Ali CHOUKRI recteur de l'université Ziane Achour de Djelfa et directeur du laboratoire de Chimie Organique et Substances Naturelles, chef de l'équipe « étude et exploitation des propriétés technofonctionnelles des produits alimentaires » de l'honneur qu'il m'a fait d'être directeur de thèse ; pour ses suggestions, sa patience et sa disponibilité ainsi que ses précieuses orientations.

Mes profonds remerciements vont à Mr. KHELIFI L. professeur à l'E.N.S.A. de l'honneur qu'il m'a fait d'être le co-directeur de thèse ; pour ses conseils et ses bonnes orientations. Mes remerciements sont aux noms de Mr. ABDELKRIM H. professeur à l'E.N.S.A. pour avoir accepté de présider le jury de ma soutenance. A Mde. BELHADJ S. Professeur à l'U.Z.A.D. et Mr. BOUDJENIBA M. Professeur à l'E.N.E.S., pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes gratitude et une reconnaissance profonde vont également au Dr. Nicolas VISEZ, enseignant chercheur au laboratoire de Processus physico-chimique et de combustion de l'air PC2A à l'université des sciences et des technologies Lille 1, de l'honneur qu'il m'a fait d'être le Co-encadreur de thèse à l'étranger ; C'est toujours la personne qui ne cesse jamais de faire le mieux de son possible pour présenter le bon travail. Je le remercie également pour ses suggestions, sa patience, ses critiques et sa disponibilité et ses précieux conseils qu'il m'a prodigué dans le cadre de ce travail. Aussi, de m'avoir mis en contact avec des scientifiques connaisseurs et de haute expertise dans le domaine.

Un grand merci aux nombreuses personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail ; à leurs têtes, je cite :

L'ancien directeur du laboratoire Processus physico-chimique et de combustion de l'air PC2A , Professeur Jean-François PAUWELS ainsi que le directeur actuel, Dr. Laurent GASNOT pour m'y avoir accueillies.

Toute l'équipe du laboratoire PC2A représentée par : Sylvie GOSSELIN ; Denis PETITPREZ ; Jean-Jacques LEDEE sans oublier les doctorants : Najiha AZERKAN et Ahmad ALMASRI et le stagiaire Florent CARON pour leur collaboration dans la réalisation des manipulations.

Dr. Caroline RAMBAUD et son équipe de l'Unité de Stress Abiotique et Différenciation des Végétaux Cultivés. SADV. UMR 1281 INRA/Lille 1. Dans la réalisation des germinations.

Dr. Anne-Sophie VERCOUTTER et son équipe de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle. UMR 8576 INSERM/CNRS/Lille 1. Dans la réalisation des premiers essais sur les analyses d'électrophorèse.

D'autre part, je remercie bien sincèrement le directeur de l'unité de biochimie de l'hôpital Armand Trousseau de Paris, Dr. Rémy COUDERC de m'avoir accueillie au sein de son équipe. Une grande reconnaissance est aux noms de Dr. Pascal PONCET ; Hélène SCHENECHAL et Jean-Pierre SATURA, membres de l'équipe « Allergie et Environnement » avec qui et durant mes séjours scientifiques à Paris, j'ai pu apprécier leurs nombreuses qualités humaines ainsi que leur optimisme.

Je leur remercie de m'avoir fait confiance, de m'avoir permis de faire évoluer ma recherche mais aussi pour l'autonomie qu'ils m'ont accordée ; pour leur rigueur scientifique ; pour leur exigence en termes de rédaction notamment et qui ont permis indéniablement d'améliorer la qualité de ce travail.

Un grand remerciement est adressé à Mr. AZOUZI B. professeur à l'U.Z.A.D. pour ses précieux conseils et sa grande contribution dans la réalisation de l'analyse statistique ; je remercie bien aussi mon collègue Mr. RABOUH pour son aide malgré ses occupations.

Il m'est très agréable de rendre un grand hommage et toute ma considération aux membres des familles : LATEF et BELAHRECH à Lille et ADDA et MEZATI à Paris et la famille KERFAH à Grenoble ; qui n'ont pas cessé de m'apporter : affection ; encouragements et soutien durant mon séjour en France, sans oublier mon professeur et parrain Dr. Abdelrazak DJENIDI, enseignant chercheur à l'université de Djelfa.

Enfin, je remercie mes proches. Merci à mes parents ; surtout à ma chère maman, sans qui tout cela n'aurait été possible. Merci de m'avoir permis d'aller aussi loin dans mes études et de m'avoir soutenu et supporté tout au long de ces années.

Merci aussi à mes deux chères sœurs : KATI pour sa grande contribution et son aide ; à ZINEB et ses trois enfants pour leurs encouragements et affection.

A mes frères : AHMAD pour sa disponibilité et son aide ; ABDELKADER ; MOHAMMED et AMAR ; merci pour leur soutien et leur affection.

Un remerciement bien distingué est au nom de mon époux Abdelkader, pour avoir partagé des moments sensibles durant la rédaction de ma thèse, pour son soutien ; sa disponibilité et surtout son aide.

Un remerciement du fond de mon cœur est au nom de la joie de ma vie ma fille KAOUTHAR, sa présence m'a illuminé les confins de mon chemin. Merci à tous les membres de ma belle famille pour leurs encouragements et leur soutien moral.

Liste des Abréviations

$\mu\text{g}/\text{m}^3$ 10^{-6} g par m^3 d'air (microgramme).

μl microlitre, unité de mesure de volume, valant 10^{-6} litre.

μm 1 micromètre = 0,001 millimètre.

$^{\circ}\text{C}$ Degré Celsius : unité de l'échelle de température Celsius.

AgNO_3 Le nitrate d'argent.

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ Le nitrate de calcium

CaCl_2 Le chlorure de calcium

H_3BO_3 L'acide borique

NH_4 Ammonium

NO_2 Le dioxyde d'azote

NO_3 Nitrate

NO_x Les oxydes d'azote.

O_3 L'ozone

SO_2 Le dioxyde de soufre.

SO_4 Sulfate

(CO et CO_2) Les oxydes de carbones.

1D Une dimension

2D Deux dimension

AR Alger Rural.

AU Alger Urbain.

BBP spatule de bleu de bromophénol.

BCA Anhydrase carbonique bovine

BCIP bromo-chloro-indolyl-phosphate

BSA L'albumine de sérum bovin

BSTFA N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide.

C1 Concentration 1

C2 Concentration 2

CG chromatographie en phase gazeuse.

D1 Durée 1

D2 Durée 2

DCM Dichloromethane

ddl Degré de liberté

DE1 Diamètre Équatorial Ballonnet.

DE2 Diamètre Équatorial Grain.

DE3 Diamètre Équatorial Ballonnet.

Deg. Degré

DP1 Diamètre Polaire Ballonnet.

DP2 Diamètre Polaire Grain.

DP3 Diamètre Polaire Ballonnet.

DR Djelfa Rural.

DU Djelfa Urbain.

EDAX Energy Dispersive XRay.

ESCA Electron Spectroscopy for Chemical Analysis.

Germ. Germination

HAPs hydrocarbures aromatiques polycycliques.

HPLC high pressure liquid chromatography - La chromatographie en phase liquide à haute performance

HR Humidité relative

IEF isoelectric focusing ou electrofocusing, La focalisation isoélectrique.

IEF 1D First-Dimension Isoelectric Focusing.

KDa Kilodalton

LSD Le test de Différence Significative Minimale

MEB Microscopie électronique à balayage.

MOE Matière organique extractible

Mr Un marqueur de poids moléculaire

MS spectrométrie de masse.

NBT nitro-blue-tétrazolium

PBS phosphate buffered saline - Le tampon phosphate salin

PC2A Physicochimie des processus de combustion et de l'atmosphère

pH Le potentiel hydrogène

pI Point Isoélectrique

Ppb ou ppbv Partie par milliard (billion en anglais) en volume (10^{-9}) soit = $1\text{mm}^3/\text{m}^3$.

ppm La partie par million

Prog. Programme.

qsp quantité suffisante pour

Qte Quantité

SDS-PAGE sigle anglophone de sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

Sig. Signification

SIMS Secondary Ion Mass Spectrometry.

Sta. Station

Tab. Tableau

TCA Trichloroacetic

TE Tris-acétate

TMCS Trimethylchlorosilane.

TOF-SIMS La spectrométrie de masse à ionisation secondaire temps de vol

TUC Un mélange de thiourée, d'urée et de CHAPS

u.a. Unité de l'atmosphère

UC Urée-CHAPS

Uma Unité de masse atomique

VM Valeur moyenne

XPS X-Ray Photoelectron Spectroscopie.

Liste des tableaux

I.1	Estimation de la quantité des grains de pollen dans 1mg de l'espèce : <i>J. ashei</i> , <i>J. virginiana</i> , et <i>P. echinata</i> (Pettyjohn et Levetin, 1997)	10
I.2	Conditions optimales de conservation du pollen de quelques espèces du genre <i>Pinus</i> (Agashe, 2009)	11
II.3	Caractéristiques climatiques et édaphiques des sites de l'étude	26
II.4	Conditions climatiques des sites d'échantillonnage pendant le mois d'Avril 2014	27
II.5	Poids des Eppendorfs avant et après lyophilisation	29
II.6	Durées et concentrations du traitement du pollen étudié	32
II.7	Répartition des extraits de nos échantillons.	37
II.8	Répartition des extraits	39
II.9	Répartition des échantillons.	43
II.10	Préparation des deux tampons d'électrodes.	45
II.11	Préparation des extraits traités	47
II.12	Conditions des deux appareils lors de l'analyse	53
II.13	Durées et concentrations d'exposition à l'ozone du pollen du <i>Pinus halepensis</i> Mill.	53
II.14	Quantité d'eau perdue lors de la conservation du pollen lyophilisé.	57
III.15	Analyse de la variance à un facteur (ANOVA à un facteur) des mesures biométriques des grains de pollen de <i>Pinus halepensis</i> Mill.	61
III.16	Variabilité des mesures biométriques des grains de pollen de <i>Pinus halepensis</i> Mill.	62
III.17	Détermination de la forme des grains de pollen du <i>Pinus halepensis</i> Mill.	63
III.18	Corrélations des mesures biométriques réalisées.	64
III.19	Analyse de la variance à un facteur de la fertilité du pollen de <i>Pinus halepensis</i> Mill.	66

III.20 Variabilité de la fertilité du pollen de <i>Pinus halepensis</i> Mill.	66
III.21 Quantité d'eau perdue lors de la lyophilisation	73
III.22 Taux de germination du pollen non traité avant et après lyophilisation.	73
III.23 Analyse de la variance à un facteur.. . . .	73
III.24 Comparaisons multiples du taux de germination du pollen non traité à l'ozone . . .	74
III.25 Taux de germination du pollen rural lyophilisé traité à l'ozone.	75
III.26 Tests des contrastes intra sujets pour la station Alger Rural (pollen lyophilisé et pollué à l'ozone à 150ppb) comparaison entre 4h et 16h	76
III.27 Tests des contrastes intra sujets Djelfa rural (pollen lyophilisé et pollué à l'ozone à 150ppb) comparaison entre 4h et 16h	76
III.28 Tests des contrastes intra sujets Djelfa rural (pollen lyophilisé et pollué à l'ozone à 1350ppb) comparaison entre 4 et 16 heures.	77
III.29 Tests des contrastes intra sujets Alger rural (pollen lyophilisé et pollué à l'ozone pendant 4 heures) comparaison entre les concentrations de 150 et 1350 ppb.	77
III.30 Tests des contrastes intra sujets Alger rural (pollen lyophilisé et pollué à l'ozone pendant 16heures) comparaison entre les concentrations de 150 et 1350 ppb.	77
III.31 Tests des contrastes intra sujets Djelfa rural (pollen lyophilisé et pollué à l'ozone pendant 16 heures) comparaison entre les concentrations de 150 et 1350 ppb.. . . .	78
III.32 Étude corrélative des facteurs : station - durée du traitement- concentration du polluant et taux de germination du pollen de <i>Pinus halepensis</i> Mill.	78
III.33 Mesure du pH des grains de pollen de <i>Pinus halepensis</i> Mill. étudiés	81
III.34 Séparations bidimensionnelles d'extraits MP-Bio/PBS du pollen rural provenant d'Alger et de Djelfa.	94
III.35 Quelques molécules identifiées de l'extrait exinique du pollen non ozonolysé de <i>Pinus halepensis</i> Mill.	106
III.36 molécules identifiées extraites de l'exine du pollen de <i>Pinus halepensis</i> Mill. après ozonolyse	109
III.37 Identification des molécules composantes de la matière organique extractible de l'exine du pollen à l'aide du BSTFA-TMCS	115

Table des figures

I.1	Schéma de grain de pollen bi-ailé en vue équatoriale (Reille, 1990)..	5
I.2	Coupe théorique à travers le sporoderme d'un grain de pollen (Renault-Miskovsky et Petzold, 1992)	6
I.3	Orientation du grain de pollen dans la tétrade (Renault-Miskovsky et Petzold, 1989)..	7
I.4	Différent types d'ouvertures des grains de pollen	8
I.5	Les trois classes de forme des grains de pollen (Renault-Miskovsky et Petzold, 1989)	9
I.6	Coupes transversale et longitudinale d'un cône mâle de <i>Pinus halepensis</i> Mill.. . . .	12
I.7	Coupe longitudinale d'un écaille staminale d'un cône mâle de <i>Pinus halepensis</i> Mill.	12
I.8	Grain de Pollen de <i>Pinus halepensis</i> Mill.	12
I.9	Principaux effets des polluants chez les végétaux ; interférence de divers paramètres (Yunus et Iqbal, 1996 in Khaldi, 2013)	20
II.10	Carte de localisation des sites de Djelfa (Carte DJELFA Feuille N° 342 Ech. 1/50) . . .	25
II.11	Cartes de localisation des sites d'Alger NJ 31-14 et NJ 31-15 (Ech. 1/250 000) . . .	26
II.12	La récolte des cônes mâles sur l'arbre (direction nord-sud et est-ouest du bas de l'arbre)	28
II.13	Mécanisme général de l'ozonolyse d'un alcène	30
II.14	Pollen mis entre deux filtres avant d'être pollué à l' O_3 et au NO_2	31
II.15	Schéma simplifié du montage de l'ozonolyse.	31
II.16	Schéma expérimental de l'étude	34
II.17	Mesures des diamètres (polaire et équatorial) (réalisées par le logiciel Motic image) deux Ballonnets (DP1=L1, DE1=L2 / : DP3=L3, DE3=L4) Grain : DP2=L5, DE2=L6	35
II.18	Schémas des plaques à 6 rigoles et des différents bains d'équilibration des bandettes d'IEF pour migration 2D	40

II.19	Pollen de <i>Pinus halepensis</i> Mill. Avant et après broyage (Microscopie optique, G x 200)	42
II.20	Test d'Alexander réalisé sur le pollen de <i>Pinus halepensis</i> Mill. (Pollen fertile : couleur rouge ; pollen stérile : couleur verte)	55
III.21	Diamètres polaires et équatoriaux des deux ballonnets et du grain seul des grains de pollen du <i>Pinus halepensis</i> Mill.	60
III.22	Pollen de <i>Pinus halepensis</i> Mill. : fertile coloré en rouge et pollen stérile coloré en vert (Gx 40).	65
III.23	Taux de fertilité du pollen déshydraté de <i>Pinus halepensis</i> Mill.	65
III.24	Taux de germination du pollen de <i>Pinus halepensis</i> Mill. (avant et après exposition à l'Ozone).	67
III.25	Taux de germination du pollen Alger rural de <i>Pinus halepensis</i> Mill. (avant et après exposition à l'Ozone et à l'air sec).	68
III.26	Pollen de pin germé observé au microscope optique après 24 heures d'incubation (Alger rural) (3 heures d'exposition à l'air) (Gx60).	69
III.27	Pollen de pin germé observé au microscope optique après 24 heures d'incubation (Alger rural) (traité à O_3 :302ppb/5 mn) (Gx60)..	69
III.28	Pollen de pin germé observé au microscope optique après 24 heures d'incubation (Alger rural) (6 heures d'exposition à l'air) (Gx60).	69
III.29	Pollen de pin germé observé au microscope optique après 24 heures d'incubation (Alger rural) (traité à O_3 :87ppb/6h) (Gx60)..	69
III.30	Pollen de pin germé observé au microscope optique après 24 heures d'incubation (Alger rural) (traité à O_3 :87ppb/3h)(Gx60).	69
III.31	Pollen de pin non traité observé au microscope optique après 24 heures d'incubation (Alger rural) germé (Gx40).	70
III.32	Pollen de pin non traité observé au microscope optique après 24 heures d'incubation (Alger urbain) germé (Gx40).	70
III.33	Pollen de pin non traité observé au microscope optique après 24 heures d'incubation (Djelfa urbain) germé (Gx40).	70
III.34	Pollen de pin non traité observé au microscope optique après 24 heures d'incubation (Djelfa rural) germé (Gx40)..	70
III.35	Evolution du taux de germination du pollen de <i>Pinus halepensis</i> Mill. Traité avec de l'ozone	71

III.36 Taux de germination du pollen lyophilisé de <i>Pinus halepensis</i> Mill. (avant et après exposition à l'Ozone à différentes durées et concentrations)	72
III.37 Comparaison faite sur l'effet « station »; « durée de traitement » et « concentration du polluant » sur le taux de germination du pollen de <i>Pinus halepensis</i> Mill. 75	
III.38 Résultats du dosage des protéines hydrosolubles du pollen de <i>Pinus halepensis</i> Mill.	82
III.39 Résultats du dosage des protéines hydrosolubles du pollen de <i>Pinus halepensis</i> Mill. Pollué et non pollué ($\mu\text{g/ml}$) pour différents extraits	83
III.40 Résultats du dosage des protéines hydrosolubles du pollen de <i>Pinus halepensis</i> Mill. Des différents sites pollué avec de l'ozone et de NO_2 et non pollué	84
III.41 Séparation en SDS-PAGE des protéines des différents extraits de pollen de <i>Pinus halepensis</i> Mill. des sites de l'étude	86
III.42 Séparation en IEF des protéines des différents extraits H_2O et PBS de pollen de pin provenant de sites ruraux et urbains de Djelfa et d'Alger.	87
III.43 Séparation en IEF des protéines des différents extraits TUC de pollen de pin provenant de sites ruraux et urbains de Djelfa et d'Alger	88
III.44 Séparation en IEF des protéines des différents extraits TUC de pollen de pin de pollen non traités et traités O_3	89
III.45 Séparation en IEF des protéines des différents extraits TUC de pollen de pin non traités + 2 extraits traités (Djelfa et Alger 16h)	90
III.46 (A-B) Séparations en 2D des protéines des différents extraits TUC de pollen de pin non traités d'Alger et de Djelfa	91
III.47 Séparation en IEF des protéines des différents extraits TUC de pollen de pin non traités et traités à l'ozone	92
III.48 IEF pour la 2D des pollens TUC (traité à O_3)	93
III.49 Comparaison du traitement à l'ozone (150 ppb) pendant des temps différents des pollens provenant de Djelfa et Alger rural (IEF dépôts anode)	94
III.50 Pollen de pin provenant de Djelfa rural non traité ou traité NO_2 (extraits PBS MP Bio)	95
III.51 Analyses 2D - Alger et Djelfa rural et urbain non traités Extrait MP-Bio avec PBS .	96
III.52 montage 2D Djelfa NO_2 bis.	97
III.53 montage 2D Alger NO_2 bis	98

III.54 Comparaison des chromatogrammes du pollen d'Alger rural (bleu) et urbain (rouge)	102
III.55 Comparaison des chromatogrammes du pollen d'Alger rural (bleu) et urbain (rouge) dans la zone comprise entre 4 et 15 minutes	103
III.56 Comparaison de chromatogrammes du pollen d'Alger rural (bleu) et de Djelfa rural (rouge).	104
III.57 Comparaison pollen d'Alger rural ozonolysé (bleu) et non ozonolysé (rouge).	107
III.58 Mise en évidence de quelques molécules modifiées suite à une ozonolyse, compa- raison du pollen ozonolysé (en bleu) et non ozonolysé (en rouge)	108
III.59 Evolution de l'aire du pic du 4-hydroxy Benzaldéhyde en fonction de la concen- tration de l'exposition à l'ozone pour une durée d'exposition de 16h	110
III.60 Courbe d'étalonnage du 4-hydroxybenzaldéhyde.	110
III.61 Mécanisme général de l'ozonolyse du précurseur du 4-hydroxybenzaldéhyde.	111
III.62 Formule topologique de l'acide para-coumarique	111
III.63 Evolution de l'aire du pic du nonanal en fonction de la concentration de l'exposi- tion à l'ozone	112
III.64 Courbe d'étalonnage du nonanal	112
III.65 Evolution de l'aire du pic de la vanilline en fonction de la concentration de l'ex- position à l'ozone	113
III.66 Mécanisme général de l'ozonolyse du précurseur de la vanilline.	113
III.67 Formule topologique du Phénol,4-(3-hydroxy-1-propenyl)-2-méthox	114
III.68 Chromatogramme du pollen rural d'Alger traité au BSTFA-TMCS	114
III.69 Formule topologique de l'acide oléique	116
III.70 Mécanisme réactionnel de l'ozonolyse de l'acide oléique faisant interagir les in- termédiaires de Crigee (Ziemann, 2005)	116
III.71 Pollen urbain d'Alger (<i>Pinus halepensis</i> Mill.).	121
III.72 Pollen rural d'Alger (<i>Pinus halepensis</i> Mill.).	121

Table des matières

Remerciements	V
Introduction générale	1
I. CHAPITRE I :Synthèse bibliographique	4
I.1 Pollen : morphologie, fertilité et bio-indication	5
I.1.1 Définition	5
I.1.2 Morphologie	6
I.1.2.1 La sporopollénine	7
I.1.3 Classification et identification des pollens	7
I.1.3.1 Apertures	8
I.1.3.2 Ornementation de l'exine	9
I.1.3.3 Taille	9
I.1.3.4 Symétrie et forme	9
I.1.4 Poids du grain de pollen	10
I.1.5 Longévité et fertilité du pollen	10
I.1.6 Conservation du pollen	10
I.1.7 Pollen des conifères.	11
I.1.8 Les interactions pollen et pollution atmosphérique	13
I.1.8.1 Effet de la pollution sur les allergènes du pollen	14
I.1.8.2 Acidification du pollen sous l'effet de la pollution atmosphérique	14
I.1.8.3 Effet de la pollution sur la fertilité du pollen	15
I.1.8.4 Effet de la pollution sur la morphologie du pollen.	15
I.2 Pollution atmosphérique	16
I.2.1 Définition	16
I.2.2 Les particules atmosphériques	16
I.2.3 La composition chimique des particules	17
I.2.4 Effet de la pollution sur les végétaux	17

I.3	La bio-surveillance de la pollution atmosphérique.	18
I.3.1	La bio-surveillance	18
I.3.2	La bio-surveillance végétale	19
I.3.3	Mesure de la bio-indication des végétaux.	21
I.3.3.1	Mesure de la bio-indication des grains de pollen	21
I.3.4	Bio-indication du genre <i>Pinus</i>	22
I.3.5	Bioindication de l'espèce <i>Pinus halepensis</i> Mill.	22
II. CHAPITRE II :Matériel et méthodes		24
II.1	Objectif	25
II.2	Choix et localisation des sites de l'étude.	25
II.2.1	Présentation des sites de l'étude	26
II.3	Données climatiques	27
II.4	Matériel et méthodes	27
II.4.1	Matériel végétal.	27
II.4.2	Méthodes	27
II.4.2.1	Préparation du pollen	27
II.4.2.1.1	collecte	27
II.4.2.1.2	Séchage et extraction	28
II.4.2.1.3	Conservation : Congélation et Lyophilisation	28
II.4.2.2	Traitements	29
II.4.2.2.1	Exposition à l'ozone (O_3)	29
II.4.2.2.2	Exposition au(NO_2)	32
II.4.2.2.3	Réhydratation	33
II.4.3	Schéma expérimental	34
II.4.4	Analyse	35
II.4.4.1	Caractères quantitatifs	35
II.4.4.2	Mesure du pH	36
II.4.4.3	Analyses de 1D (SDS-PAGE et IEF) et 2D	36
II.4.4.3.1	Test préliminaire	36
II.4.4.3.2	Préparation des échantillons non traités à l'ozone	37
II.4.4.3.3	Préparation des échantillons traités à l'ozone	39
II.4.4.3.4	Préparation des échantillons traités au NO_2	42
II.4.4.4	Dosage protéique	50

II.4.4.5	Analyses des polluants par GC/MS ; MEB et par TOF-SIMS	51
II.4.4.5.1	Analyse en chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse (GC/MS)	51
II.4.4.5.2	Analyse en microscopie à balayage (MEB)	54
II.4.4.5.3	Analyse aux TOF-SIMS	54
II.4.4.6	Analyse de la fertilité et la germination in vitro	54
II.4.4.6.1	Pollen congelé	54
II.4.4.6.2	Pollen lyophilisé	57
II.4.4.7	Analyse statistique	58
III.	CHAPITRE III :Résultats et discussion	59
III.1	Étude morphologique	60
III.1.1	Caractères quantitatifs	60
III.1.2	Forme des grains de pollen	63
III.2	Etude de la fertilité et la germination in vitro du pollen	64
III.2.1	Pollen conservé à 4°C.	64
III.2.1.1	Fertilité des grains de pollen.	64
III.2.1.2	Germination in vitro des grains de pollen	67
III.2.1.2.1	Résultats	67
III.2.1.2.2	Germination du pollen de <i>Pinus halepensis</i> Mill. avec et sans ozonolyse	67
III.2.1.2.3	Germination du pollen Alger rural après exposition à l' O_3 et à l'air sec	68
III.2.1.2.4	Evolution du taux de germination en fonction de l'ozonolyse	71
III.2.2	Pollen lyophilisé	72
III.2.3	Discussion	79
III.3	Mesure du pH	81
III.4	Dosage des protéines hydrosolubles du pollen de <i>Pinus halepensis</i> Mill.	82
III.4.1	Résultats	82
III.4.1.1	Résultats préliminaires.	82
III.4.1.2	Pollen non broyé traité à l'ozone : Concentrations pour différents extraits	83
III.4.1.3	Pollen broyé traité à l'ozone et au NO_2	84

III.5	Analyses de 1D (SDS-PAGE et IEF) et 2D	86
III.5.1	Séparation par isoélectrofocalisation (IEF) 1D de pollen non traité, des différents sites, extraits en H_2O ou en PBS	87
III.5.2	Séparation par IEF-1D des extraits TUC de pollen non traités, provenant des différents sites.	88
III.5.3	Séparation par IEF-1D de pollens traités par l’ozone (O_3), des différents sites, extraits en TUC	89
III.5.4	Séparation en IEF pour 2D d’extraits TUC de pollen non traités provenant d’Alger et de Djelfa	90
III.5.5	Séparation en SDS-PAGE pour la 2 ^e dimension d’extraits TUC de pollen non traités des sites de l’étude.	91
III.5.6	Séparation en IEF d’extraits TUC de pollen non traité et traité à O_3 des sites de l’étude. Comparaison dépôts anode/cathode	92
	III.5.6.1 Séparations bidimensionnelles d’extraits MP-Bio/PBS :	93
III.6	Pollen broyé traité au NO_2	95
III.6.1	Séparation comparative par isoélectrofocalisation (IEF) 1D des extraits MP-Bio en PBS	95
III.6.2	Séparation en SDS-PAGE pour la 2 ^{ème} dimension d’extraits MP-Bio/PBS de pollen non traités et traités provenant de Djelfa rural	97
III.6.3	Analyses 2D - Alger rural : Extraits MP-Bio avec PBS	98
III.7	Discussions	99
III.7.1	Dosage des protéines hydrosolubles	99
III.7.2	Analyse 1D (IEF, SDS-PAGE) et 2D	101
III.8	Modification de la matière organique extractible du pollen de pin par la pollution atmosphérique	102
III.8.1	Comparaison des pollens issus de différentes zones	102
III.8.2	Comparaison du pollen rural d’Alger et de Djelfa	104
III.8.3	Identification des molécules de la matière organique extractible de l’exine	105
III.8.4	Effet de l’ozone sur les extraits de l’exine du pollen rural de <i>Pinus halepensis</i> Mill.	107
	III.8.4.1 Cas du 4-hydroxybenzaldéhyde	110
	III.8.4.1.1 Étalonnage	110
	III.8.4.1.2 Voie de formation	111

III.8.4.2	Cas du nonanal	112
III.8.4.2.1	Étalonnage	112
III.8.4.3	Cas de la vanilline	113
III.8.4.3.1	Voie de formation de la vanilline	113
III.8.4.4	Identification des molécules au BSTFA-TMCS	114
III.8.4.5	Cas de l'acide oléique	116
III.8.4.5.1	Mécanisme réactionnel	116
III.9	Discussion	118
III.10	Analyse de surface par Microscopie électronique à balayage (MEB)	120
III.11	Analyse de surface par TOF-SIMS	120
	CONCLUSION GENERALE	122
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	125
	ANNEXES	174

Introduction générale

La qualité de l'air est un enjeu d'actualité* qui ne cesse de prendre de l'ampleur chaque année; elle traduit l'impact des activités de l'homme; qu'il y introduit directement ou indirectement, de substances ou des composés ayant des impacts nocifs sur sa santé et qui sont à l'origine des perturbations et des changements que connaissent la biodiversité des écosystèmes et le climat sur le globe terrestre.

Par ailleurs la pollution atmosphérique contribue en grande partie au déséquilibre du fonctionnement des systèmes biologiques à différents niveaux de perception (Ramade, 1992).

Des études menées sur l'état de l'air montrent avec précision que la qualité et la pureté de l'air peut être altérée et dégradée par des substances chimiques, des bio-contaminants ou des particules et fibres pouvant nuire à la santé publique et à la biodiversité des écosystèmes. Ces polluants peuvent être d'origine naturelle (pollens, émissions des volcans), ou être liés à l'activité humaine (particules issues des activités industrielles, de l'agriculture ou du transport routier, composés organiques volatils émis par les matériaux de construction, . . .) (Calzoni et al. , 2007 ; Pernelet-Joly, 2008 ; González et al., 2012 et Shiraiwa et al., 2012).

Conscient de l'urgence et de l'importance du problème, les pouvoirs publics ont mis en place un certain nombre de lois et de programmes de recherche visant à améliorer et à mieux maîtriser les connaissances en matière de pollution atmosphérique.

La problématique de la qualité de l'air en Algérie et par son ampleur, a fait depuis des décennies, une thématique de recherche des études de caractérisation et de mesure des polluants atmosphériques de plusieurs chercheurs.

L'élévation du taux des polluants organiques dans les particules de l'atmosphère PM10 (n-alkane et acide n-alkanoïque) a été signalée par Yassaa et al. (2005) ainsi que Ladji et al. (2009); Khedidji et al. (2011) et Khedidji et al. (2013).

Le traitement des déchets par combustion constitue aussi une importante source de pollution urbaine (Nejjari et al., 2003 et Ladji et al., 2007). Les mêmes auteurs, Ladji et al. (2014) ajoutent que les PAHs analysées étaient en forte adhésion avec la fraction ultrafines ($D_p \leq 0.49 \mu\text{m}$) des particules PM.

Selon Boughedaoui et al. (2004), les teneurs en plomb atmosphériques s'élèvent en moyenne à plus de $0,6 \mu\text{g.m}^{-3}$ avec des maximums de l'ordre de $1 \mu\text{g.m}^{-3}$ dépassant largement les recommandations de l'O.M.S. (Organisation Mondiale de Santé).

Dans l'étude de Belamri et Benrachedi (2010) sur le contrôle de la pollution de l'air à Alger ; les éléments toxiques tels que : Na, Mg, Cl, Sc, Cr, Tl, V, Fe, Co, Cu, Zn, Se, Br, Ag, Sb, Ce, La, Hf, Ta et Hg ont été mesurés et les concentrations élevées pour certains éléments toxiques trouvés sont dus principalement aux conditions météorologiques (température, vitesse du vent, humidité de l'air et l'ensoleillement) et à l'intensité de la circulation routière autour des sites de collecte.

La bio-surveillance s'inscrit comme un outil important dans la mesure et le suivi de la pollution atmosphérique (Stroebel, 1995 ; Garrec, 1996 ; Lhuissier, 1998 ; Gottardini et *al.*, 2004 ; Remy et Montana, 2011 et Bosch-Cano, 2012). L'utilisation des espèces bio-indicatrices (Lichens et arbres urbains) en Algérie a été réalisée dans les grandes villes telles que Annaba , Alger et Tiaret via des études ponctuelles. Le jumelage des mesures physico-chimiques et le diagnostic de bio-accumulateurs, a montré une efficacité et une grande fiabilité de mesure (Semadi, 1993 ; Rahali, 2003 ; Maatoug, 2007 et 2010 in Maatoug et *al.*, 2011 et Maizi et *al.*, 2012).

Dans le cas du pollen (Dany, 1983 ; Wang bsp et *al.*, 1994 ; Marchanel, 1994 ; Gorenflot ; 1997 et Agashe, 2009), et particulièrement le pollen anémophile, une très grande quantité de processus physiologiques est touchée (Garrec et Van Haluwyn, 2002). La sensibilité du pollen est en fonction de la concentration et la nature du polluant (Comtois et Schemenauer, 1991 ; Cerceau-Larrival et *al.*, 1991 ; Behrendt et *al.*, 1997 ; Lhuissier, 1998 et Bosch-Cano, 2012).

Les perturbations qu'on peut étudier sont innombrables car elles vont du niveau structurale (composition biochimique) et morphologique (taille et dimensions) jusqu'au fonctionnement du pollen (fertilité et germination) (Iannotti et *al.*, 2000 ; Risse et *al.*, 2000 ; Roshchina et Mel'nikova, 2001 ; Bist et *al.*, 2004 ; De Ridder et *al.*, 2007 et Lu et *al.*, 2014).

L'intérêt de la communauté scientifique porté sur la bio-indication des pollens des différentes espèces végétales vient dans le but d'étendre à moindre coût les réseaux de mesures existants et de retracer l'impact des polluants atmosphériques sur des organismes vivants dans différents écosystèmes en mettant l'accent sur la nécessité d'améliorer les connaissances sur la susceptibilité des différents pollens vis-à-vis des principaux polluants atmosphériques (Ozone, NO_2 , particules), ainsi sur l'exposition des plantes productrices et du pollen à des polluants (A.N.S.E.S., 2013).

Dans l'objectif d'étudier l'effet de quelques polluants atmosphériques sur la fertilité et la structure du pollen du *Pinus halepensis* Mill., l'étude de l'effet de l'ozone, sur cette catégorie de pollen, nous paraît importante du fait que ce gaz (l'un des polluants gazeux majeurs de l'atmosphère) affecte significativement la croissance et le développement des végétaux (Paoletti et *al.*, 2007 et Leisner et Ainsworth, 2012) et particulièrement le pollen (Higgins et *al.*, 2000) ; il peut modifier la nature des nitrates des protéines des particules biologiques primaires de l'aérosol (pollen, spores fongiques

(Franze et *al.*, 2005 ; Yang et *al.*, 2010 in Shiraiwa et *al.*, 2011); comme il peut diminuer sa fertilité et augmente son pouvoir allergénique (Pasqualini et *al.*, 2011). D'autre part, notre intérêt a été porté sur l'étude de l'effet de l'oxyde d'azote NO_2 sur le même type de pollen.

La pollution azotée est à l'origine de perturbation de la biodiversité, en entraînant une eutrophisation des milieux et un déséquilibre minéral (acidification des sols et des eaux par réactions d'oxydation). Par réactions photochimiques, le NO_2 peut être à l'origine de nouveaux polluants comme l'ozone (Remy et Montana, 2011).

C'est dans ce contexte général que s'inscrit le présent travail de recherche qui vise à analyser :

- Variabilité morphologique et biométrique du pollen urbain et rural de *Pinus halepensis* Mill. de quatre sites d'Alger et de Djelfa ;
- Analyse d'électrophorèse de SDS-PAGE (1D et 2D) ; IEF et dosage des protéines hydrosolubles de : pollen rural ; pollen urbain et pollen rural traité à l'ozone (O_3) et à l'oxyde d'azote (NO_2) ;
- fertilité et germination du pollen conservé à (4°C) et pollen lyophilisé (-20°C) de *Pinus halepensis* Mill., traité et non traité à l'ozone (O_3) ;
- Analyses de surface et caractérisation des particules polluantes d'aérosols adhérentes à la surface du pollen traité et non traité par chromatographie GC/MS ; TOF-SIMS et MEB.

Un ensemble de techniques et une méthodologie convenable à ces fins de recherche ont été déployées. Ce travail est présenté dans une thèse constituée de :

1. Une synthèse bibliographique ;
2. Une partie expérimentale ;
3. Une conclusion générale.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

I.1 Pollen : morphologie, fertilité et bio-indication

I.1.1 Définition

Le mot « Pollen » qui vient du latin signifie "farine de fleur" et désigne, l'ensemble de la poussière fécondante d'une fleur. Le grain de pollen est l'élément reproducteur microscopique ou gamétophyte mâle produit par les organes mâles des plantes (anthère des étamines). Au moment de sa dispersion, le grain de pollen contient deux ou trois cellules (Dany, 1983 ; Wang bsp *et al.*, 1994 ; Marchanel, 1994 ; Gorenflot, 1997 et Agashe, 2009).

Il est entouré d'une double paroi (exine et intine) formé de matériaux le plus résistant du monde vivant : la sporopollénine qui le rend fossilissable (Till *et al.*, 1989 ; Reille et Pons, 1990 et Piffanelli *et al.*, 1998).

Chaque grain de pollen représente une cellule qui contient l'élément sexuel mâle, nécessaire pour la fécondation. Il correspond comme véhicule de conservation génétique (Dany, 1983 ; Charrier, 1990 et Agashe, 2009) (Figure I.1).

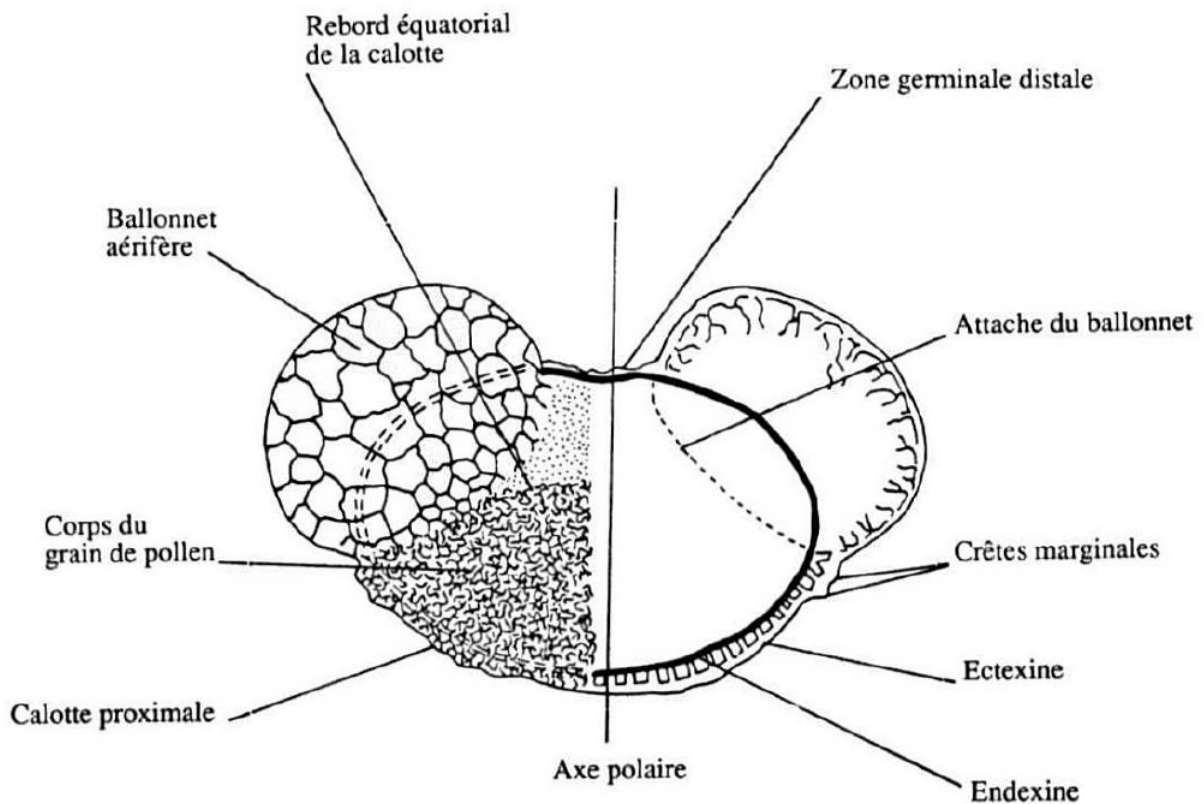


FIGURE I.1 – Schéma de grain de pollen bi-ailé en vue équatoriale (Reille, 1990).

I.1.2 Morphologie

La caractérisation morphologique d'un grain de pollen est la clé d'une bonne identification ; de ce fait un ensemble de critères sont mesurés tels que : symétrie , taille , forme , paroi , stratification de l'exine ; ornementation , sillons et apertures. Les plus importants sont les trois derniers pour une identification basique et une classification du pollen (Agashe, 2009).

Un grain de pollen est entouré par deux parois qui sont (Figure I.2) :

1. Exine : L'exine est elle-même double : à la couche interne non structurée, on donne le nom d'endexine, (Reille et Pons, 1990). C'est la couche inférieure lisse et homogène. Alors que l'ectexine désigne la couche la plus externe. Cette ectexine est très structurée, c'est elle qui porte la particularité pollinique. (Till et *al.*, 1989 et Reille et Pons, 1990).

2. Intine : L'intine, comme son nom l'indique est la couche interne du sporoderme. Celle-ci entoure la partie centrale constituée par le cytoplasme qui contient les noyaux, c'est la partie vivante du grain de pollen.

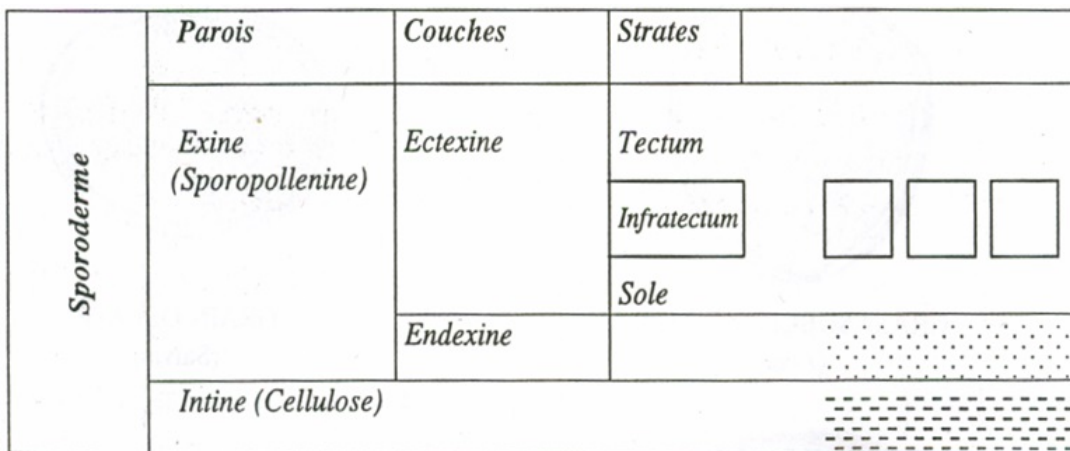


FIGURE I.2 – Coupe théorique à travers le sporoderme d'un grain de pollen (Renault-Miskovsky et Petzold, 1992)

I.1.2.1 La sporopollénine

La couche externe du grain de pollen, l'exine (Figure I.2) est composée d'une substance appelée sporopollénine (Till et *al.*, 1989; Reille et Pons, 1990; Jéanne, 1983; Piffanelli et *al.*, 1998; Ahlers et *al.*, 1999; Bubert et *al.*, 2002 et Bohne et *al.*, 2005). Cette substance fut observée pour la première fois et nommée « sporonin » par John (1814); tandis que sa caractérisation fut réalisée par Berzelius en 1830; elle caractérise les plantes à fleurs non aquatiques, cependant, elle est totalement absente chez les fleurs des plantes aquatiques. Chimiquement, il a été suggéré qu'elle est un copolymère du bêta-carotène; un xanthophyl comme l'antheraxanthin et acides gras (Agashe, 2009). Cette substance confère à l'exine une résistance vis-à-vis des conditions environnementales (agressions mécaniques et chimiques tels que les oxydations et la dessiccation) (Peltre et *al.*, 1991; Nilsson et Berggren, 1991; Agashe, 2009 et Wallace et *al.*, 2011); elle se conserve bien au cours du temps et elle garde une bonne structuration biochimique (Till et *al.*, 1989 et Agashe, 2009). La couleur naturelle de la sporopollénine est du jaune pâle mais elle peut varier avec la maturation thermique du jaune sombre à l'orange, marron rougeâtre ou plutôt le noir. Sa gravité spécifique est de 1,4 (Agashe, 2009).

I.1.3 Classification et identification des pollens

Le pollen a des caractéristiques très spécifiques pouvant être utilisés comme des critères de classification; sa forme et les ornements de son exine sont caractéristiques de la plante qui l'a produit et permettent ainsi de l'identifier (Dany, 1983; Renault-Miskovsky et Petzold, 1989; Reille et Pons, 1990; Jéanne, 1983 et Leroyer et Allenet, 2004). La caractérisation se base principalement sur l'estimation dimensionnelle des deux diamètres polaire (DP) et équatorial (DE)) (Figure I.3) (Pons, 1958; Bonnefille et Riollot, 1980; Jenne, 1983; Renault-Miskovsky et Petzold, 1989; Guerin et *al.*, 1993 et Leroyer et Allenet, 2004).

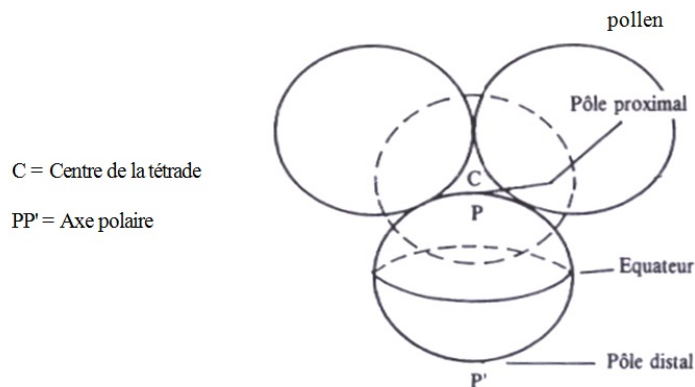


FIGURE I.3 – Orientation du grain de pollen dans la tétrade (Renault-Miskovsky et Petzold, 1989).

I.1.3.1 Apertures

D'une façon générale, les grains de pollen présentent des zones d'amincissement du sporoderme qui correspondent aux points de sortie possibles du tube pollinique, ce sont les apertures. Selon leur forme, on distingue des pores (porus) et des sillons (colpus). Le nombre et la disposition des apertures sont variables ; les formes tricolpées, tricolporées et stéphanocolpées sont les plus fréquentes dans les pollens (Louveaux et *al.*, 2005)(Figure I.4).

En absence d'aperture, le pollen est dit inaperturé. On appelle pores, les apertures de forme arrondie et sillons celles de forme allongée. Pores et sillons peuvent être combinés sur un même pollen (pollens colporés) (Pons, 1958).

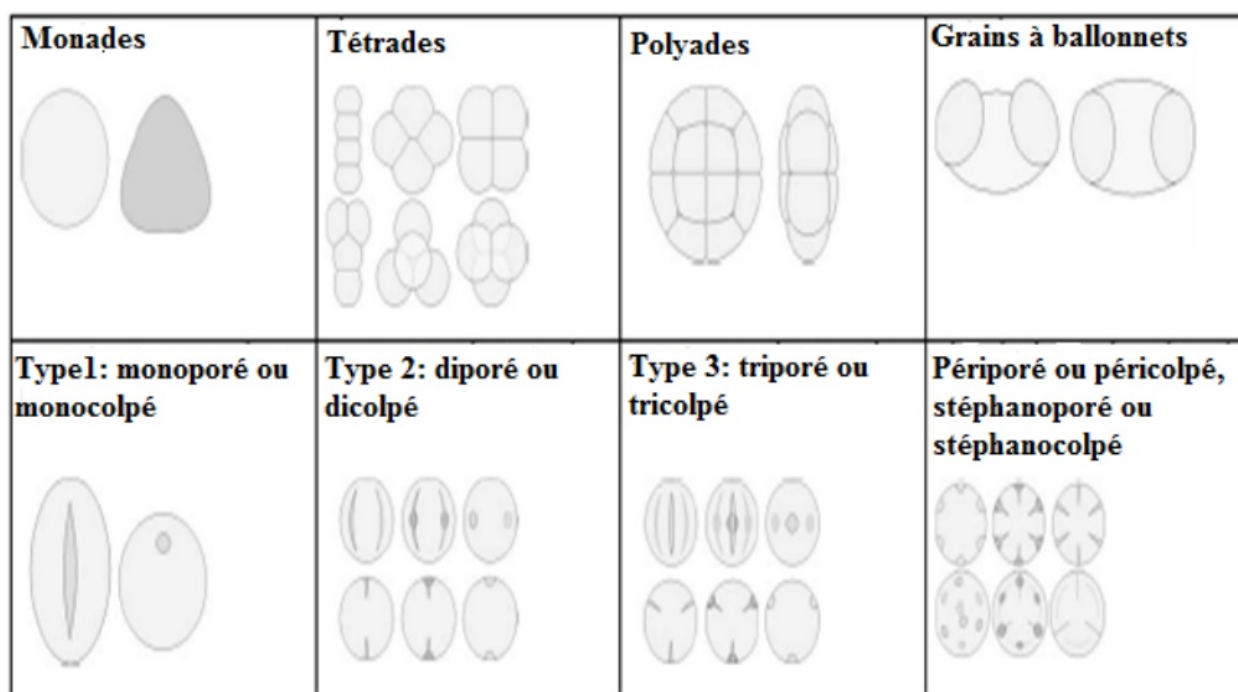


FIGURE I.4 – Différent types d'apertures des grains de pollen

I.1.3.2 Ornementation de l'exine

Correspond aux éléments en relief observables à sa surface. Elle peut être lisse, psilée (petits points irrégulièrement répartis), scabrée (légères ondulations inférieures à 1 micron), échinulée (épines supérieures à 1 micron), genumulée, verruquée, clavulée, baculée, réticulée (avec un réseau) (Leroyer et Allenet, 2004).

I.1.3.3 Taille

La taille d'un grain de pollen peut varier avec l'âge et les conditions de végétation de la plante, mais les rapports P/E restent pratiquement constants pour une même espèce et s'expriment toujours en microns (Pons, 1958). A l'exception de la taille des grains, tous les caractères étudiés (forme, relief tectal, stratification du sporoderme) montrent une grande homogénéité au sein du genre. De plus, la structure de l'exine liée à la souplesse exinique, à la minceur de l'endexine et au type apertural, permettrait d'expliquer les transformations réversibles de la forme des grains selon leur état d'hydratation (Misset *et al.*, 1982). Elle varie de 5 μm pour le *Myosotis* à 200/250 μm pour les pollens des Conifères à ballonnets (Renault-Miskovsky et Petzold, 1989).

I.1.3.4 Symétrie et forme

La forme du grain de pollen est définie par le rapport qui existe entre les dimensions des deux axes ; le grain est dit sphéroïdal quand les deux axes sont égaux, prolé quand P' est $>$ à E, oblée quand P' est $<$ à E (Figure I.5). La tétrade initiale permet de reconnaître un pôle proximal, proche du centre et un pôle distal diamétralement opposé qui permettent de construire un axe polaire PP' et un axe équatorial, EE'. De forme sphérique ou ovoïde plus ou moins déformée, un grain de pollen mesure de 2.5 à 220 microns (millième de millimètre) selon les espèces de fleur dont il est issu.

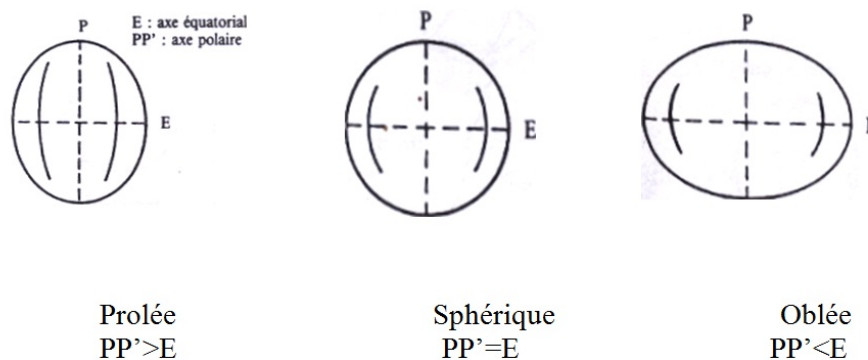


FIGURE I.5 – Les trois classes de forme des grains de pollen (Renault-Miskovsky et Petzold, 1989)

I.1.4 Poids du grain de pollen

Des branches de 10ans qui portent les cônes mâles du *Pinus sylvestris* peuvent en effet produire 350 millions de grain de pollen (Agashe, 2009).

La quantité des grains de pollen produite par chaque arbre de l'espèce *Pinus pinaster* est estimée entre 20.9×10^6 et 32.3×10^6 (Torro et al., 1996 in Jato et al., 2000).

Peu de travaux qui ont traités un comptage des grains de pollen des différentes espèces du genre *Pinus* (Tab.I.1) :

TABLE I.1 – Estimation de la quantité des grains de pollen dans 1mg de l'espèce : *J. ashei*, *J. virginiana*, et *P. echinata* (Pettyjohn et Levetin, 1997)

Pollen	Grains de pollen/mg	Estimation du poids de chaque grain de pollen (mg)
<i>Juniperus ashei</i>	$2.18 \times 10^5 \pm 1.0 \times 10^4$	4.6×10^{-6}
<i>Juniperus virginiana</i>	$3.63 \times 10^5 \pm 1.3 \times 10^4$	2.8×10^{-6}
<i>Pinus echinata</i>	$4.50 \times 10^4 \pm 3.0 \times 10^3$	2.2×10^{-5}

I.1.5 Longévité et fertilité du pollen

La longévité du pollen est le temps pendant lequel il peut germer après sa libération, il varie, en effet, approximativement de quelques heures pour le seigle, un jour pour les graminées et une centaine de jours pour les rosacées (Heller et al., 1995 et Gorenfloot, 1997). Tandis que sa fertilité, c'est à dire sa capacité de germer une fois arrivé sur le stigmate, varie selon les conditions climatiques extérieures lors de la libération des grains (Jarosz, 2003). L'évaluation de ce paramètre se fait en testant la capacité de germination du pollen, son activité métabolique (enzymatique) ou la présence du cytoplasme.

I.1.6 Conservation du pollen

Les grains de pollen ont une durabilité physique remarquable et sont biochimiquement inertes. Cette très grande résistance est due à la sporopollénine qui est le composé principal de l'exine (Pons, 1958 ; Agashe, 2009 et Wallace et al., 2011). Le stockage du pollen au congélateur entre -10°C et -30°C après déshydratation à l'air sec permet de conserver pendant une à trois années de nombreuses espèces. Cependant les taux de survie varient largement avec les génotypes et les procédures.

Dans des conditions de basses températures et de faibles taux d'humidité (0°-8°C et 0-50 HR), la durée de vie de pollen de différentes espèces est assurée (Johari et Vasil, 1961 ; King, 1965 et Holman et Brubaker, 1926 in Agashe, 2009). On cite dans le tableau ci-dessous, des exemples sur des espèces du genre *Pinus*.

TABLE I.2 – Conditions optimales de conservation du pollen de quelques espèces du genre *Pinus* (Agashe, 2009)

Espèce	Température de stockage (°C)	Humidité relative (HR)	Durée de stockage	Référence
<i>Pinus nigra</i>	5	0 (vacum)	2,5 ans	Jensen, 1964
<i>P. strobes</i>	18	25	14 mois	Duffield et Snow, 1941
<i>P. resinosa</i>	0-4	25-50	14 mois	Duffield et Snow, 1941
<i>P. sylvestris</i>	2	25-75	1 ans	Johnson, 1943
<i>P. banksiana</i>	2	25-75	1 ans	Johnson, 1943

Le maintien d'un très bon pourcentage de germination du pollen paraît assuré après un ou deux ans de stockage à des températures cryogéniques, en-dessous de -80°C (Charrier, 1990).

Bien que les pollens des arbres feuillus et des arbres résineux appartiennent au même type bicellulaire, leur résistance aux manipulations et à la conservation est très différente.

Le pollen des arbres feuillus est très fragile et ne tolère pas les séchages (Colas et Mercier, 1994). De ce fait l'optimisation des conditions de conservations est plus complexe.

Le pollen des arbres résineux a une résistance bien supérieure, il tolère beaucoup plus facilement des traitements à des températures élevées (Bramlett et Matthews, 1991 in Colas et Mercier, 1994).

I.1.7 Pollen des conifères

Les gymnospermes produisent cinq types de pollen, dont le type bi-ailé et le type polypliqué sont absolument caractéristiques, tous présentent une originalité et marquent bien la singularité de ce groupe végétal (Kormuták et al., 2008).

Les pollens bi-ailés caractérisent les Conifères (Figures I.6;I.7 et I.8); à qui appartient notre espèce d'étude ; leur structure, si particulière, appelle une description sommaire (Pons, 1958).

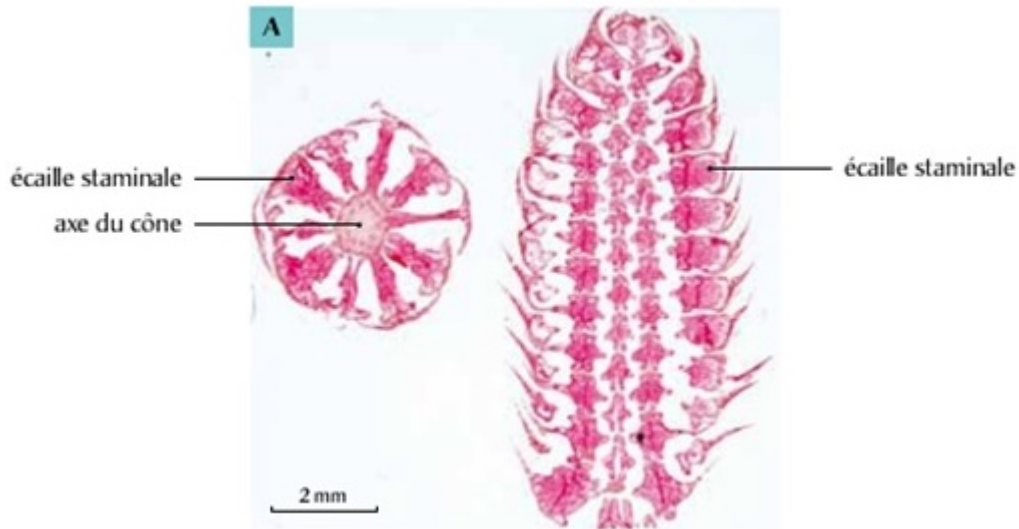


FIGURE I.6 – Coupes transversale et longitudinale d'un cône mâle de *Pinus halepensis* Mill.



FIGURE I.7 – Coupe longitudinale d'un écale staminale d'un cône mâle de *Pinus halepensis* Mill.

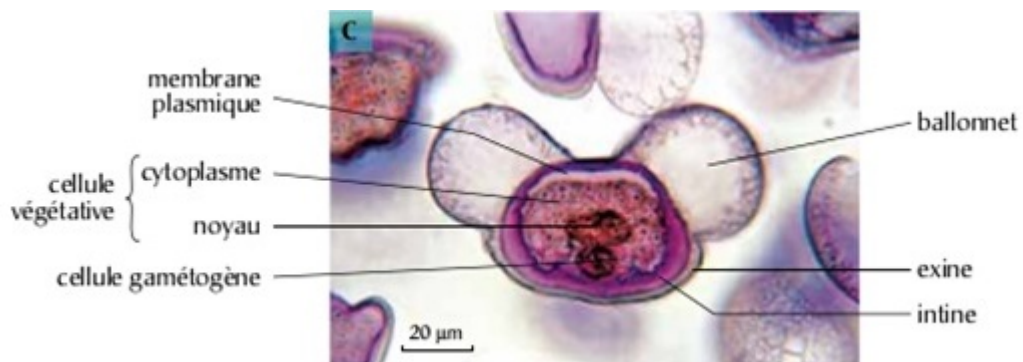


FIGURE I.8 – Grain de Pollen de *Pinus halepensis* Mill.

I.1.8 Les interactions pollen et pollution atmosphérique

Sur la thématique de l'influence de la pollution atmosphérique sur le pollen, des études ont été réalisées par de nombreux chercheurs tels que : Wolters et Martens (1987); Nilsson et Berggren (1991); Comtois et Schemenauer (1991); Goschnick et Schuricht (1995); Garrec (1996); Cerceau-Larrival et *al.* (1996); Lhuissier (1998); Behrendt et *al.* (1999); Lhuissier et *al.* (2000); Wayne et *al.* (2002); Bist et *al.* (2004); Okuyama et *al.* (2007); Shahali et *al.* (2009); Tlili et *al.* (2007); Guedes et *al.* (2009); Wang et *al.* (2010); Carneiro et *al.* (2011); Pasqualini et *al.* (2011); Bosch-Cano (2012) et Greguskova et Mičičeta (2013). Ils ont montré l'intérêt de l'utilisation du pollen en tant que bio-accumulateur aussi en tant que bio-indicateur, cette utilisation apparaît comme une méthode de bio-surveillance de la qualité de l'air intéressante en permettant d'étudier la dynamique de la pollution atmosphérique.

Les polluants atmosphériques sont captés et fixés à ce niveau du végétal (Lhuissier et *al.*, 2000).

Selon Comtois et Schemenauer (1991), la captivité des polluants par le pollen est dû probablement à son hygroscopie et à la solubilité de ces polluants dans les gouttelettes d'eau présentes dans l'atmosphère (Wolters et Martens , 1987; Nilsson, 1988; Risse et *al.*, 2000; Comtois et Schemenauer, 1991; Cerceau-Larrival et *al.*, 1991; Gottardini et *al.*, 2004; Kalbande et *al.*, 2008 et Guedes et *al.*, 2009).

L'influence de la pollution atmosphérique sur le pollen se manifeste par (Ruffin et *al.*, 1983; Cerceau-Larrival, 1996; Rezanejad et *al.*, 2003; Bist et *al.*, 2004; Rezanejad, 2007; Chichiriccò et Picozzi, 2007; Okuyama et *al.*, 2007; Shahali et *al.*, 2010 et Pasqualini et *al.*, 2011) :

- - La modification de sa morphologie ;
- - La dégradation de sa structure ;
- - La modification de la composition ionique de l'exine ;
- - Le chargement et l'adhésion de particules polluantes à l'exine ;
- - La perturbation ou l'inhibition de la germination.

I.1.8.1 Effet de la pollution sur les allergènes du pollen

Les modifications que subit un grain de pollen ainsi que ses allergènes sous l'effet de la pollution atmosphérique ont été étudiées par Ruffin et *al.* (1986), en montrant que le contenu d'extraits de pollen traités au NO_2 , SO_2 et CO contenait plus d'acides aminés libres (indicateur de l'allergénécité à l'époque). Ainsi, les conditions météorologiques contribuent en présence des polluants atmosphériques à modifier la biodisponibilité des allergènes du pollen (Kopferschmitt-Kubler et Pauli, 1999). Les polluants atmosphériques tels que NO_2 , SO_2 et CO induisent la libération ainsi que l'accroissement de la biodisponibilité des allergènes du pollen (Armentia et *al.*, 1990; Fountain et Cornford (1991); Peltre et *al.*, 1991; Risse et *al.*, 2000; Motta, 2004; Rogerieux et *al.*, 2005; Thibaudon et Sindt (2008) et Wang et Lu et *al.*, 2014).

Une nitration des protéines du pollen (Franze et *al.*, 2003; et Guedes et *al.*, 2009) sous l'effet des polluants atmosphériques (NO_2 et O_3) a été significativement remarquée. Behrendt et *al.* (1999), ont signalé une différence significative dans la concentration en protéines totales et des allergènes libérés des espèces : *Betula alba* L.; *P. pratense* L. et *P. silvestris* L. entre un pollen fraîchement collecté d'un site rural; un site à proximité de circulation d'automobile et un pollen commercial.

I.1.8.2 Acidification du pollen sous l'effet de la pollution atmosphérique

Sur l'espèce du Cèdre du Japon (*C. japonica* : Conifères), Okuyama et *al.* (2007) avaient remarqué une forte adhésion des gaz polluants ainsi que la présence de différentes particules atmosphériques sur le pollen prélevé d'un site pollué; d'autre part une acidification par l'acide nitrique a été observée sur la surface du grain de pollen étudié. Goschnick et Schuricht (1995), et en utilisant la technique d'analyse TOF-SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry), ont étudié l'effet négatif de NO_2 à un niveau moléculaire sur la surface du pollen de *Artemisia tridentata* et *Betula alba*, selon leurs résultats, l'azote a été intégré dans la composition de la surface du pollen, probablement comme nitro-group. Les mêmes auteurs et en 1996, ont confirmé l'effet de NO_2 et O_3 par la détection et la localisation de leurs conversions chimiques en profondeur de la paroi du pollen de *Artemisia tridentata*; *Pleum pratense* et *Betula alba* ceci a été réalisé par l'utilisation de deux méthodes d'analyses : XPS (X-Ray Photoelectron Spectroscopie) et TOF-SIMS.

I.1.8.3 Effet de la pollution sur la fertilité du pollen

L'effet négatif et dégradant de la pollution sur le pollen de *Pinus sylvestris* a été étudié par Pukacki et Chalupka (2003), en montrant que cette dernière affecte significativement le pouvoir germinatif des grains de pollen de cette espèce. Gottardini et al. (2004) en étudiant la fertilité du pollen comme paramètre bio-indicateur de deux espèces *Corylus avellana* L. (*Bétulacées*) et *Pinus nigra* L. (Conifères) ont montré que la fertilité, la germination, ainsi que la croissance du tube pollinique ont été négativement et significativement affectés par les polluants étudiés NO_2 ; SO_2 ; O_3 ; NO_x . Les résultats de ce travail confirment la conclusion d'Iannotti et al. (2000) qui avaient étudiés un tel paramètre sur le pollen de *Hedera helix* L., *Convolvulus sepium* L., *Cynodon dactylon*(L.) Pers., *Quercus ilex* L., *Dactylis glomerata* L., *Parietaria diffusa* M. et K., *Daucus carota* L. et *Tilia cordata* Miller. Une diminution de la fertilité du pollen a été observée sur le pollen des espèces *Betula papyrifera*, *Betula alleghaniensis* et *Acer saccharum* Marsh. . sous l'effet individuel ou combiné du faible pH du brouillard (dû à la présence des ions majeurs : NH_4 , NO_3 , SO_4) et de la haute concentration de l'ozone dans l'air (Comtois et Schemenauer, 1991); et de même sur le pollen de l'espèce *Ambrosia artemisiifolia*(Pasqualini et al.,2011) sous l'effet de l'ozone.

I.1.8.4 Effet de la pollution sur la morphologie du pollen

La morphologie des grains de pollen des différentes espèces végétales est affectée par l'effet majeur des polluants atmosphériques, particulièrement les polluants résultants du trafic automobile (Greguskova et Mičičeta, 2013). Un effet d'altération sur la couche d'exine du pollen apparait suite à une exposition aux gaz polluants (NO_x et CO) (Lhuissier, 1998). Des avortements et des fissures ont été observés sur des grains de pollen exposés aux polluants atmosphériques (Mičičeta et Murin, 1998; Pasqualini et al., 2011; Carneiro et al., 2011 et Greguskova et Mičičeta, 2013). Selon Motta (2004), l'exposition à des concentrations des polluants (NO_2 : 6,4% à 2 ppm jusqu'à 19,1% à 1000 ppm, O_3 : 19,5% à 5 ppm), endommage les grains de pollen; ces derniers ont été considérés endommagés dès l'apparition des fissures ou des ouvertures au niveau de l'exine. La présence d'agrégats particuliers à la surface des grains de pollen indique de l'état de pollution atmosphérique du site dont il a été prélevé (Kopferschmitt-Kubler et Pauli, 1999).

I.2 Pollution atmosphérique

I.2.1 Définition

La pollution atmosphérique est un phénomène très complexe compte tenu de la diversité des polluants susceptibles d'être présents dans l'atmosphère.

Une définition a été attribuée par la loi n° 83-03 du 05 Février 1983 du journal officiel relative à la protection de l'environnement en Algérie : « On entend par pollution de l'atmosphère, l'émission dans l'atmosphère des gaz, des fumées ou de particules solides ou liquides, corrosifs, toxiques ou odorantes de nature à incommoder la population, à compromettre la santé ou la sécurité publique ou à nuire aux végétations, la production agricole et aux produits agro-alimentaires, à la conservation des constructions et monuments ou au caractères des sites ».

Les niveaux de pollution au sol dépendent de la nature et des conditions de rejets polluants ainsi que des conditions atmosphériques qui déterminent le transport, la diffusion et les retombées de ces mêmes polluants. Ces phénomènes ont lieu dans la troposphère (la plus basse couche de l'atmosphère) (Martin et Maystre, 1988 et Bernard, 2004).

I.2.2 Les particules atmosphériques

L'atmosphère renferme, une quantité variable de substances naturelles provenant de sources très diverses qui, dépassant un seuil, créent une source de pollution. Elles sont constituées d'une part de particules "primaires directement émises par des sources naturelles ou anthropiques, et d'autre part de particules dites "secondaires", formées dans l'air par des processus chimiques complexes à partir de précurseurs gazeux présents dans l'atmosphère (oxydes de soufre et d'azote, ammoniac, composés organiques volatiles, etc.). La concentration de ces polluants dans l'air dépend fortement des conditions météorologiques dont principalement la température et l'ensoleillement. La vitesse et la direction du vent jouent également un rôle important dans la dilution de ces polluants dans l'air et dans leur dispersion (Defranceschi, 2006 et Pernelet-Joly, 2008).

I.2.3 La composition chimique des particules

Les particules atmosphériques présentent une large diversité de taille et de composition; les principaux composés sont les suivants (Georgakopoulos et *al.*, 2008 in Pernelet-Joly, 2008 ; Desprès et *al.*, 2012 et Shiraiwa et *al.*, 2012) :

- - des composés carbonés ou aérosols carbonés ;
- - des composés minéraux et des sels (carbonate de calcium, chlorure de sodium, etc.) ;
- - des composés inorganiques : les sulfates et les nitrates ;
- - des métaux issus d'émissions industrielles ; de phénomènes abrasifs et de la combustion ;
- - des composés d'origine biogène : les grains de pollen, les spores et divers micro-organismes.

I.2.4 Effet de la pollution sur les végétaux

Les végétaux sont exposés de manière durable à la pollution atmosphérique. Cette exposition est à la fois à l'action des polluants en suspension dans l'atmosphère, aux retombées sèches de poussières et de métaux et aux dépôts acides (Martin et Maystre, 1988). Ils sont d'ailleurs utilisés comme bio-indicateur.

En forêt, l'action des retombées est fortement augmentée par l'effet de filtre qui retient les polluants et provoque ainsi une accumulation de produits toxiques dans le feuillage et dans le sol. L'eau de pluie ruisselant à l'intérieur des forêts présente un pH inférieur à celui des pluies en terrain découvert. La base du tronc est ainsi fortement atteinte (Martin et Maystre, 1988).

L'effet négatif de la pollution de l'air sur la croissance des arbres est confirmé ; car elle affecte une multitude de processus physiologiques et biochimiques : la croissance et le développement des graines, des feuilles, des jeunes pousses et des arbres adultes (Biggs et Davis, 1981 ; Thompson, 1981 ; Burton et Morgan, 1983 ; Kozlowski et *al.*, 1991 in Dmuchowski et *al.*, 1998 ; Bytnerowicz et Grulke, 1993 .

I.3 La bio-surveillance de la pollution atmosphérique

I.3.1 La bio-surveillance

Elle représente un vaste domaine utilisant plusieurs concepts dont ceux de la bio-indication qui se résume en «L'utilisation d'organismes sensibles à un polluant donné dont la présence ou l'état renseigne sur la qualité écologique (physicochimique, micro-climatique, biologique et fonctionnelle) de l'environnement.»(Tachet, 2006 et Khaldi, 2013); et ceux des biomarqueurs constitués par une espèce végétale, fongique ou animale ou par un groupe d'espèces (groupe éco-sociologique) ou groupement végétal dont la présence (ou l'état) renseigne sur certaines caractéristiques écologiques (c'est-à-dire physico-chimiques, microclimatique, biologiques et fonctionnelle) de l'environnement, ou sur l'incidence de certaines pratiques.

Au concept de la bio-surveillance, Garrec et Van Haluwyn (2002) ajoutent que celle-ci est :«L'utilisation à tous les niveaux d'organisation biologique (moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique, histologique, morphologique, écologique) d'un organisme ou d'un ensemble d'organismes pour prévoir et/ou révéler une altération de l'environnement et pour en suivre l'évolution ».

Selon Lagadic et *al.* (1997) in Van Haluwyn et *al.* (2011) « Un biomarqueur est un changement observable et /ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant ».

L'observation d'organismes bio-indicateurs complète généralement les dispositifs de mesures automatiques. En comparaison avec les analyses physico-chimiques, les principaux intérêts de la bio-indication sont les suivants (Stroebel, 1995, Garrec, 1996, Lhuissier, 1998; Pucket, 1988 in Dmuchowski et *al.*, 2011 et Bosch-Cano, 2012) :

- Méthodes relativement faciles à mettre en œuvre, rapides, de coût plus limité que celui d'une approche chimique, et dont on peut multiplier le nombre de stations d'observation ;
- Permet de détecter des polluants nouveaux ou accidentels non dosés par les capteurs traditionnels ;
- Elle donne une vision globale des perturbations fonctionnelles des écosystèmes ;
- La bio-surveillance à l'aide de grains de pollen permet d'établir un modèle géographique qui est en lui-même un nouvel outil sensible, pourrait indiquer les évolutions spatiales et temporelles (concentrations et distribution des éléments testés).

I.3.2 La bio-surveillance végétale

Dans la bio-surveillance végétale, les végétaux exercent à l'égard de l'air une action de dépollution particulièrement efficace (Belot et *al.*, 1976; Mičieta et Murin, 1998; Wagh et *al.*, 2006); cette action se fait par l'accumulation des différents polluants sur les différentes parties de la plante (racines, mycorhizes, tiges, feuilles, pollens) (Tausz et *al.*, 2005, Dogan et *al.*, 2007; De Ridder et *al.*, 2007; Petrova et *al.*, 2014). L'effet de la pollution n'est pas visible mais s'accumule dans les organismes (Kurczyńska et *al.*, 1997); Chez un même organisme, cette accumulation peut fortement varier selon l'âge et l'état de santé, ou selon des facteurs externes (saison, teneur du milieu en nutriments ou co-facteurs) (Helander et *al.*, 1997).

Les bio-accumulateurs sont caractérisés par leurs résistances vis-à-vis de la pollution, ils peuvent néanmoins accumuler des polluants (métaux lourds, pesticides, etc.) sans qu'il y ait de dommages causés sur leur physiologie et leur morphologie.

La figure (I.9) synthétise le mécanisme de l'impact de la pollution atmosphérique sur les végétaux.

Dans le travail de Wagh et *al.* (2006) mené dans ce domaine, il a été montré l'efficacité de la bioindication des espèces végétales cultivées dans des endroits pollués ou à proximité d'une source de pollution (polluants gazeux ou métalliques) par la réduction significative du taux de la chlorophylle ainsi que celui des protéines sur des feuilles des espèces suivantes : *Azadirachta indica*, *Ficus religiosa*, *Ficus benghalensis*, *Terminalia catappa*. De même la superficie florale a diminuée considérablement en corrélation avec le taux de la pollution.

Selon le même auteur, les plantes bioindicatrices ont un potentiel majeur d'être un indice qualitatif et quantitatif du taux de la pollution atmosphérique.

Desalme (2011) et dans sa conclusion des études menées sur la caractérisation des effets biologiques et physiologiques des HAPs (hydrocarbures aromatiques polycycliques) atmosphériques sur les végétaux (les feuilles de trèfle ou de ray-grass), a proposé également l'utilisation du potentiel mycorhizien comme indicateur de pollution diffuse des sols.

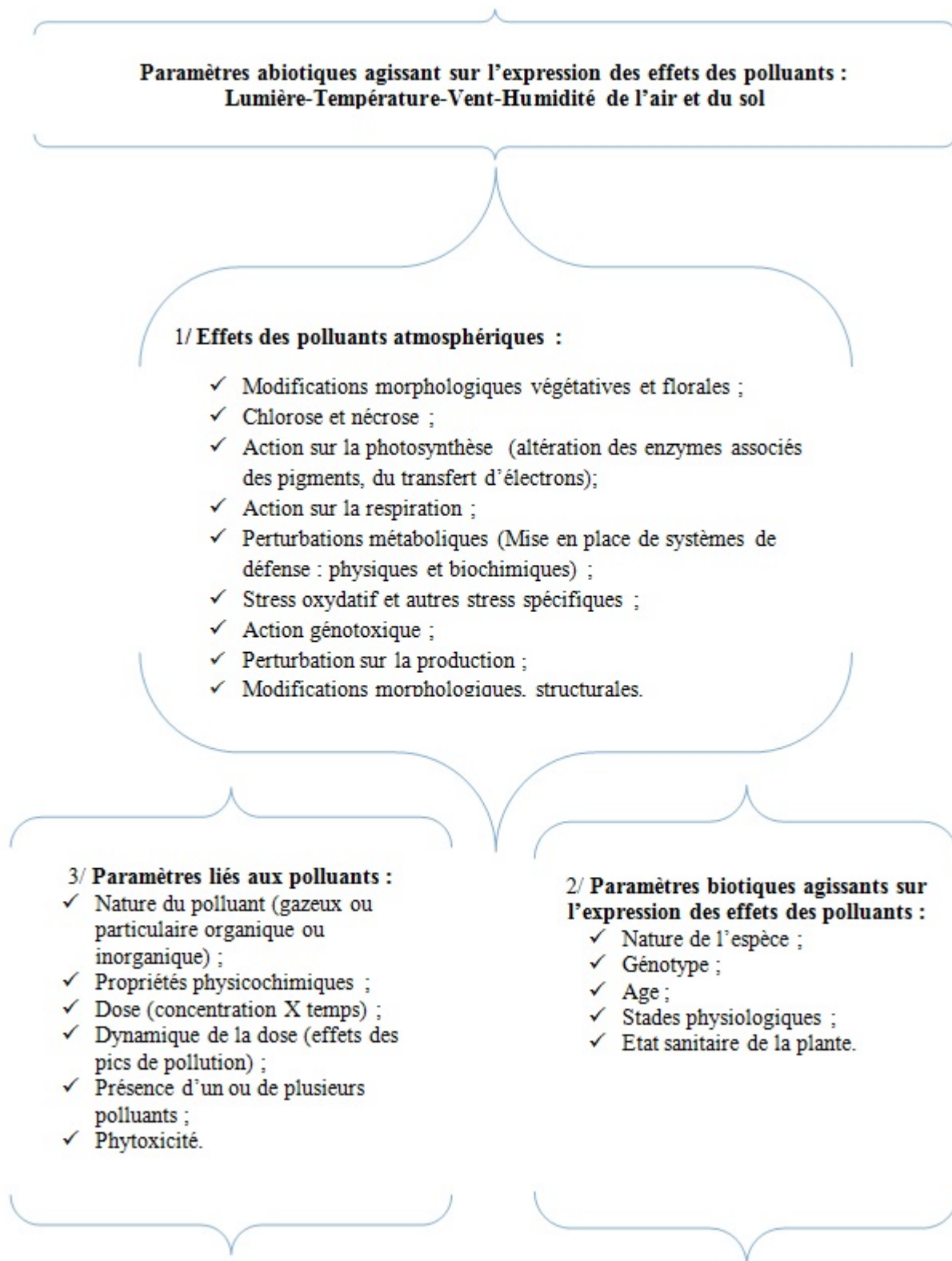


FIGURE I.9 – Principaux effets des polluants chez les végétaux ; interférence de divers paramètres (Yunus et Iqbal, 1996 in Khaldi, 2013)

I.3.3 Mesure de la bio-indication des végétaux

Dans la détermination et la mesure du niveau cumulé de polluants métalliques ; la durée d'exposition des bio-indicateurs aux polluants est un facteur primaire (Dmuchowski et *al.*, 2011). Ainsi, la méthode de mesure adoptée, la source de pollution (sol, air) et les caractéristiques morphologiques, anatomiques et structurales de l'espèce indicatrice, influent sensiblement sur la mesure de l'effet des différents polluants (Dmuchowski et *al.*, 2011).

L'analyse de la végétation bio-indicatrice permet de quantifier et d'identifier les polluants accumulés (Agnan, 2013 et Petrova et *al.*, 2014). Le désavantage de la technique réside alors dans le coût des analyses.

I.3.3.1 Mesure de la bio-indication des grains de pollen

Afin de mesurer l'effet d'exposition des grains de pollen aux polluants atmosphériques gazeux (durée et dose) les plus présents en masse dans l'air : NO_2 , SO_2 et CO (Ruffin et *al.*, 1983); ou leur interaction avec les polluants atmosphériques de types éléments traces métalliques (ETMs) (durée et fréquence) : Pb, Cd, Zn et en faibles concentrations (Kalbande et *al.*, 2008; Bosch-Cano, 2012); deux méthodes coexistent : une comparaison est effectuée entre du pollen prélevé en zone polluée et en milieu rural ou alors du pollen collecté en milieu peu pollué est artificiellement exposé au laboratoire.

Les comparaisons faites touchent l'ensemble des caractéristiques morphologiques (taille, forme, dimensions, couleur) et les activités physiologiques, métaboliques et biochimique (respiration, germination) avant et après l'exposition (Ruffin et *al.*, 1983; Cerceau-Larrival et *al.*, 1991; Goschnick et Schuricht, 1996; Roshchina et Mel'nikova, 2001; Gottardini et *al.*, 2004; Majd et *al.*, 2004; Rogerieux et *al.*, 2005; Shahali et *al.*, 2008; Guedes et *al.*, 2009; Wang et *al.*, 2010; Sousa et *al.*, 2012 et A.N.S.E.S., 2013).

Nilsson et Berggren (1991) et dans leur travail comparatif des méthodes de détermination des polluants sur la surface du grain de pollen de *Betula sp.* Telles que : EDAX (Energy Dispersive XRay); ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis) et SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry), ont trouvé qu'avec EDAX quelques particules ont été détectées à savoir : Si et S, ou Al, Ca et Fe. La même technique permet d'analyser d'autres composants appartenant au grain de pollen.

Avec le SIMS, les éléments inorganiques : P; K; Si; Ca; Mg; Al; Na; Rb; Ba; Zn; Sr et B, ont été bien décelés. Par contre la méthode ESCA paraît plus appropriée pour l'analyse des composés organiques et uniquement : C; Si et N.

I.3.4 Bio-indication du genre *Pinus*

La bio-indication de quelques espèces du genre *Pinus* tels que : *Pinus brutia*; *Pinus sylvestris*; *Pinus canariensis* L. et *Pinus taeda* a fait l'objectif des recherches de : Ruffin et al. (1983); Mičieta et Murin (1998); Kurczyńska et al. (1997); Pukacki et Chalupka (2003); Tausz, et al. (2005); Dogan et al. (2007); Adekola et al. (2002) et Dmuchowski et al. (2011); l'effet négatif des polluants métalliques sur les racines, l'écorce, les feuilles et les graines a été significatif.

Mičieta et Murin (1998), ont confirmé l'aptitude des trois espèces (*Pinus sylvestris*, *Pinus nigra* et *Pinus mugo*) du genre *Pinus* dans la bioindication; les mêmes espèces ont montré une bonne adaptation sous un stress sévère d'une pollution chronique (concentrations élevées en : Pb et Cu fluorides, SO_2 , NO_2). L'impact de la pollution a été visible au niveau de la morphologie des grains de pollen, des aiguilles et des cellules méristématiques.

Dogan et al. (2007) suggèrent l'utilisation du *Pinus brutia* comme un bioindicateur d'efficacité d'après les résultats des analyses chimiques obtenus du taux de : Cd, Pb, Cr, Fe, Ni et Cu ($\mu g\ g^{-1}$, poids sec) qui confirment le pouvoir d'accumulation des métaux lourds de cette espèce au niveau de son écorce.

Sur l'espèce *Pinus sylvestris* L., Pukacki et Chalupka (2003) ont signalé une forte dégradation de la membrane cytoplasmique (fraction des lipides et des antioxydants) de pollens prélevés des sites pollués.

I.3.5 Bioindication de l'espèce *Pinus halepensis* Mill.

L'espèce *Pinus halepensis* Mill., est une des essences résineuses les plus tolérantes à la sécheresse; son aire de répartition est circumméditerranéenne, essentiellement de la Grèce au Maghreb (Nahal, 1962 et Quezel, 1986). Elle est omniprésente dans le pourtour méditerranéen. Cette essence forestière occupe un vaste domaine dans le cortège floristique en Algérie (Kadik, 1983); elle traduit sa capacité bio-indicatrice par une réduction de sa capacité de fixer le CO_2 sous l'effet combiné de l'air sec et de l'exposition à l'ozone (O_3) (Wellburn et al., 1996).

La bio-indication de cette espèce pour les gaz polluants d' O_3 et de SO_2 , a été testé par le paramètre de la mesure des flavonoïdes totaux. D'autres paramètres tels que : la dendrochronologie et la dendrochimie, ont montré que la croissance radiale de cet arbre a été affectée par les polluants atmosphériques (Projet du Ministère Algérien de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement, 2003). L'espèce *Pinus halepensis* Mill. engendre une réduction de sa capacité de fixer le CO_2 sous l'effet combiné de l'air sec et de l'exposition au O_3 (Wellburn et al., 1996).

Robles (2003) suggère un autre paramètre de bioindication du *Pinus halepensis* Mill., de la pollution en O_3 et SO_2 ; celui de la mesure des flavonoïdes totaux.

En présence de fortes concentrations en CO_2 , le *Pinus sylvestris* engendre une croissance remarquable (Janssens et al., 2005); le même effet a été enregistré pour une espèce voisine *Pinus halepensis* Mill. en France (Rathgeber, 2002).

Chapitre II

Matériel et méthodes

II.1 Objectif

La bio-indication du pollen du pin d'Alep, *Pinus halepensis* Mill. vis à vis de la pollution atmosphérique était l'objectif pivot de ce travail de recherche. Un ensemble d'analyses et de mesures est porté sur le pollen pollué et non pollué; en étudiant : la composition biochimique du pollen, la morphologie du grain comme sa taille et sa forme, et également sa fertilité (Figure II-16).

II.2 Choix et localisation des sites de l'étude

Notre choix s'est porté sur quatre sites en Algérie (Figure II.10 et II.11); deux sites forestiers qui représentent au mieux une provenance rurale dite indemne de toutes pollutions atmosphériques d'origine automobile (source majeure de pollution atmosphérique en Algérie) : la forêt de Bouchaoui à Alger (latitude : N 36°45'21.8" et longitude : E 2°54'22.9") et la forêt de Senalba à Djelfa (latitude : N 34°39'14.8" et longitude : E 3°9'1.8").

Deux sites urbains, dont l'un d'eux, celui de l'agglomération de Benaknoun à Alger (latitude : N 36°45'08.4 et longitude : E 2°59'60.0" E) est réputé par sa forte pollution d'origine automobile; l'autre site, la ville de Djelfa (latitude : N 34°20 et longitude : E 03°23).), est moyennement pollué.

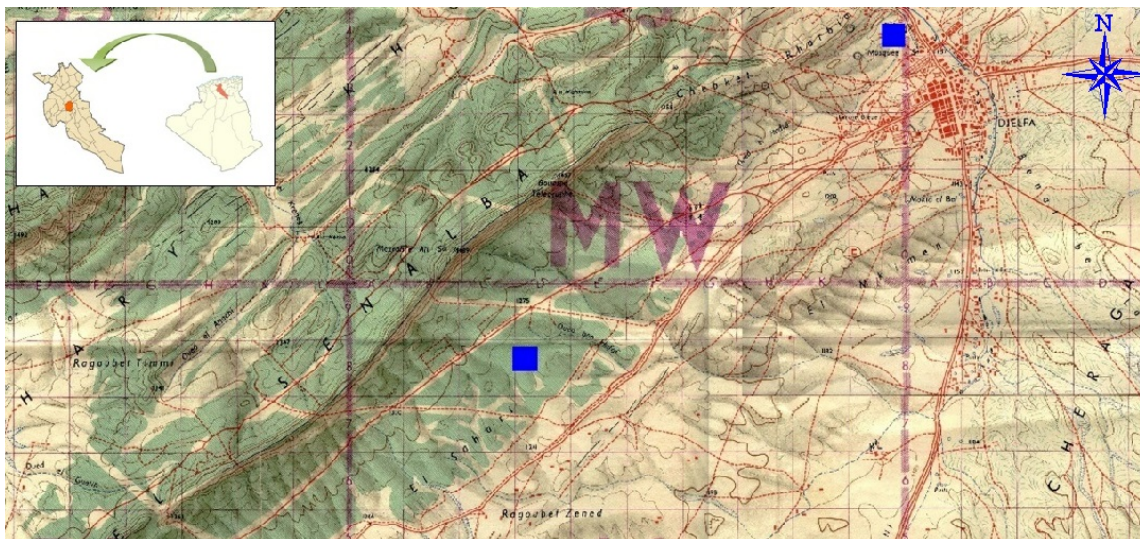


FIGURE II.10 – Carte de localisation des sites de Djelfa (Carte DJELFA Feuille N° 342 Ech. 1/50)



FIGURE II.11 – Cartes de localisation des sites d’Alger NJ 31-14 et NJ 31-15 (Ech. 1/250 000)

II.2.1 Présentation des sites de l’étude

Les sites choisis pour le prélèvement du pollen de cette étude présentent les caractéristiques citées dans le tableau ci-dessous :

TABLE II.3 – Caractéristiques climatiques et édaphiques des sites de l’étude

Paramètre	Alger urbain	Alger rural	Djelfa urbain	Djelfa rural
Altitude	258m	98m	950-1000 m	950-1000 m
Type physionomique	Pinède	Pinède	Pinède	Pinède
sol	calci- magnésique	calci- magnésique	calci- magnésique	calci- magnésique
Hauteur approximative des arbres	15m	20m	20m	20m
Etage bioclimatique	Subhumide	Subhumide	Semi-aride	Semi-aride

II.3 Données climatiques

Dans notre étude de la bio indication du pollen de *Pinus halepensis* Mill., les données climatiques prises en considération sont les moyennes des températures et de l'humidité relative du mois d'Avril; du fait que la collecte de nos échantillons a eu lieu pendant ce mois de la saison 2014 (période de la pollinisation de cette espèce) (Tab.II.4).

TABLE II.4 – Conditions climatiques des sites d'échantillonnage pendant le mois d'Avril 2014

Site	Températures			Humidité relative		
	Min	Max	Moy	Min	Max	Moy
Alger	7.14	21.07	14.11	29.00	80.10	54.55
Djelfa	9.85	24.42	17.14	43.90	95.07	69.48

Source : Office National Météorologique (2014).

II.4 Matériel et méthodes

Le matériel et les méthodes sous citées concernent chaque type d'analyse.

II.4.1 Matériel végétal

La collecte du pollen a été faite pendant le mois d'Avril 2014 sur quatre sites en Algérie : Djelfa urbain (ville de Djelfa), pollution urbaine moyenne; Djelfa rural (forêt de Senalba); Alger urbain (ville de Benaknoun), pollution urbaine importante et Alger rural (forêt de Bouchaoui).

II.4.2 Méthodes

II.4.2.1 Préparation du pollen

II.4.2.1.1 collecte

L'échantillonnage du pollen a été réalisé en choisissant une vingtaine d'arbre de chaque site étudié. Les pieds sont choisis selon le paramètre d'homogénéité de taille, de chaque pieds une vingtaine de cône mâle ont été prélevé des quatre faces de l'arbre (direction nord-sud et est-ouest du bas de l'arbre).

Après cette sélection le nombre de cônes atteint est 400 (Figure II.12).

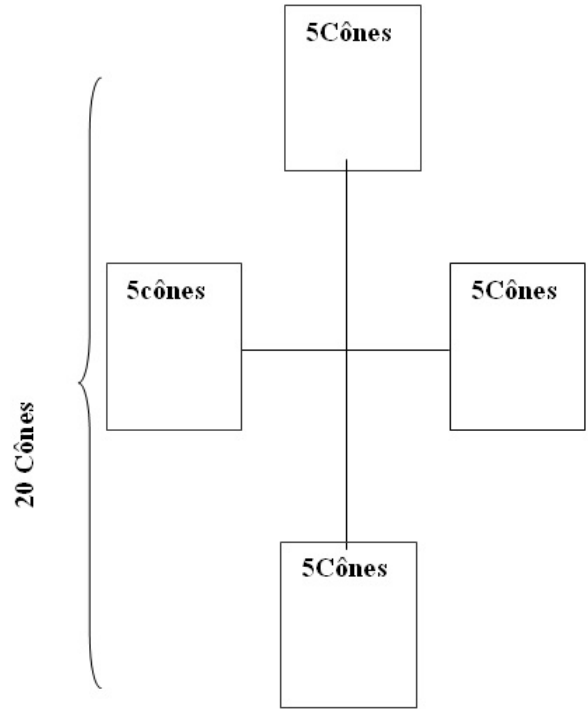


FIGURE II.12 – La récolte des cônes mâles sur l’arbre (direction nord-sud et est-ouest du bas de l’arbre)

II.4.2.1.2 Séchage et extraction

Un séchage préalable à température du laboratoire a été appliqué sur les cônes collectés (de 2 à 4 jours); puis un brassage de ces cônes avait eu lieu dans un tamis de diamètre de $90 \mu\text{m}$ afin d’obtenir uniquement les grains de pollen et les conserver dans les meilleures conditions; cette opération d’extraction a été effectuée selon des conditions de températures ($25\text{-}30^\circ\text{C}$) et d’humidité relative (40%) les plus favorables préconisées par Webber (1996) in Colas et Mercier (2000). Une déshydratation à l’étuve à 37°C et pendant 4heures, a été effectuée sur le pollen récolté selon le protocole de Colas et Mercier (2000).

II.4.2.1.3 Conservation : Congélation et Lyophilisation

Une partie du pollen déshydraté a été mise en conservation au froid à 4°C jusqu’à utilisation, l’autre partie a été destinée à la lyophilisation, en procédant à la pesée des Eppendorfs remplis de pollen des quatre stations avec trois répétitions (Tab.II.5); elle a pour objectif de déterminer la quantité d’eau perdue au cours de la lyophilisation :

TABLE II.5 – Poids des Eppendorfs avant et après lyophilisation

pollen	Eppendorf 1	Eppendorf 2	Eppendorf 3
Alger rural	1.770 g	1.788 g	1.872 g
Alger urbain	1.911 g	1.792 g	1.885 g
Djelfa urbain	1.776 g	1.865 g	1.869 g
Djelfa rural	1.765 g	1.732 g	1.788 g
Après lyophilisation (10 mois de conservation)			
Alger rural	1.757 g	1.760 g	1.843 g
Alger urbain	1.891 g	1.777 g	1.859 g
Djelfa urbain	1.756 g	1.846g	1.861 g
Djelfa rural	1.724 g	1.712 g	1.768g

Ensuite, les eppendorfs ont été recouverts de parafilm en double couches perforé à deux emplacements distants afin de les aérer et pour permettre à l'eau de s'évacuer ; une fois fermés, ils ont été mis en lyophilisation pendant 48h puis conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

II.4.2.2 Traitements

II.4.2.2.1 Exposition à l'ozone (O_3)

L'exposition à l'ozone ou l'Ozonolyse est une méthode de coupure de la double liaison qui a été employée pour localiser les doubles liaisons dans les squelettes moléculaires ; elle a lieu quand l'Ozone O_3 réagit fortement dans une première étape en une addition électrophile de l'ozone (O_3) sur la liaison double des alcènes (un clivage) pour former un cycle à cinq atomes (intermédiaire très instable), appelé molozonide possédant plusieurs liaisons O–O qui sont réactives. Le molozonide se décompose en deux produits distincts : un oxyde de carbonyle et un composé carbonylé. Ce dernier va se réarranger pour former un cycle ozonide. Il est ensuite hydrolysé, selon le milieu dans lequel il se trouve, la molécule va subir une coupure appelée coupure oxydante et former un aldéhyde et une cétone en milieu basique ou un acide carboxylique et une cétone en milieu acide (Figure II.13) (Schyns, 2006 ; Gillet, 2010).

A. Mécanisme

La molécule d'ozone possède plusieurs formes de résonance.



Quand l'ozone est ajouté sur un alcène, il se forme un molozonide qui se réarrange en ozonide.

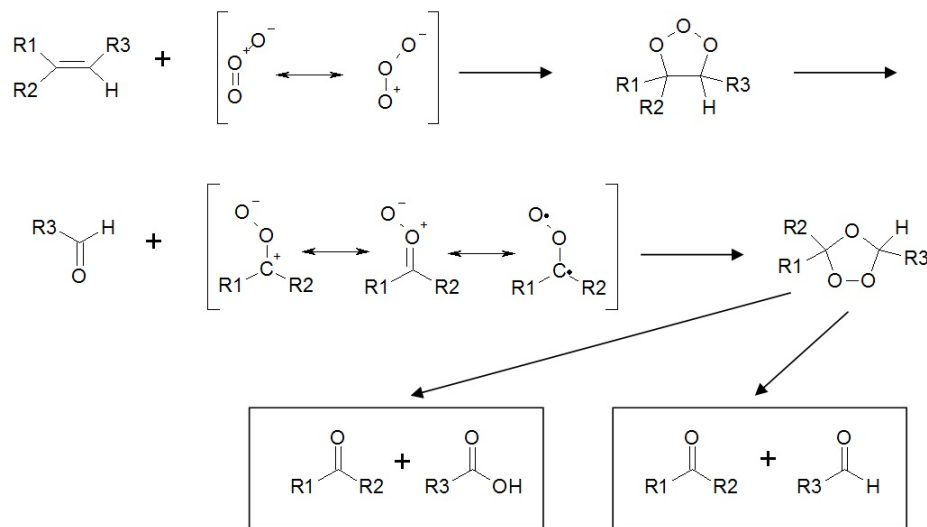


FIGURE II.13 – Mécanisme général de l'ozonolyse d'un alcène

B. Méthodologie

Lors de nos expériences, l'ozonolyse a été effectuée en utilisant de l'ozone artificiel. La génération de ce gaz se fait par photolyse du dioxygène sous l'action d'une lampe UV émettant à la longueur d'onde de 185 nm.

Le rayonnement UV est généré par une lampe à mercure parallèle à un tube en quartz dans lequel circule un flux d'air synthétique. Une partie du dioxygène est décomposé pour former des radicaux qui vont eux mêmes réagir avec le dioxygène pour ainsi former l'ozone.

Pour faire varier la quantité d'ozone générée, il est possible de changer la distance d'exposition aux UV ou modifier le débit d'air synthétique. Plus le débit est grand, plus le temps d'exposition aux UV est faible et moins on génère d'ozone.

Le flux d'ozone est amené au travers d'un réacteur cylindrique conçu en inox, il mesure 3 cm de diamètre et 16 cm de hauteur. Il comporte à ses extrémités deux connections permettant de faire circuler un flux gazeux à l'intérieur dans le sens ascendant.

C'est à l'intérieur de ce réacteur qu'on avait mis notre pollen piégé entre deux filtres ((MAGNA, NYLON, Supported, Plain 0.22Micron, 47mm, 100 IPK , Material N°1213769 Batch N°319657), de diamètre des pores équivalant à $5 \mu\text{m}$ puis jusqu'à un analyseur d'ozone Megatec 49i, ce dernier mesure toutes les dix secondes la quantité d'ozone à la sortie du réacteur (Figure II.14 et II.15).



FIGURE II.14 – Pollen mis entre deux filtres avant d'être pollué à l' O_3 et au NO_2

Pour ce traitement, on avait utilisé le pollen rural collecté aux forêts naturelles de Bouchaoui à Alger et de Senalba à Djelfa, dites sites non pollués, à différentes concentrations allant de 87 ; 180 ; 305 ; 500 ; 800, 1100 et 1350 ppb et à différentes durées, de quelques minutes à plusieurs heures. Une exposition à l'air sec a été effectuée sur le pollen rural d'Alger.

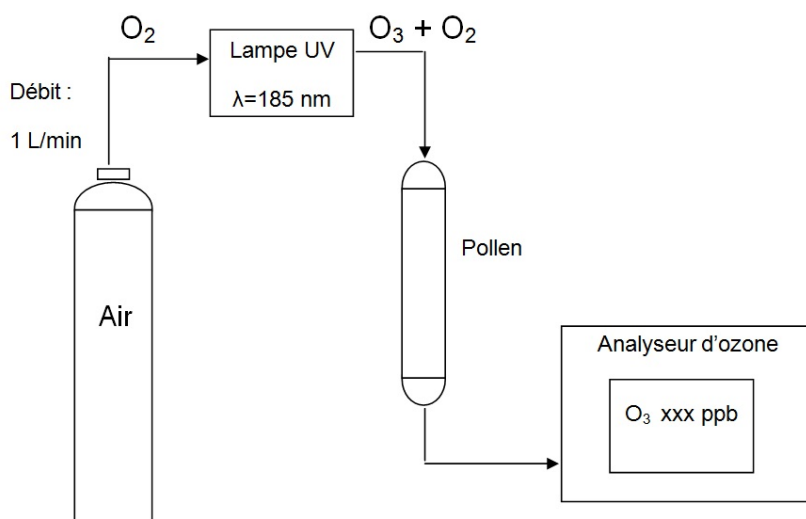


FIGURE II.15 – Schéma simplifié du montage de l'ozonolyse

C. Test préliminaire

Une exposition préliminaire à l’ozone et à l’air sec, a été effectuée sur le pollen Alger rural, à différentes concentrations et durées (Tab.II.6).

TABLE II.6 – Durées et concentrations du traitement du pollen étudié

Traitement	Durée	Concentration
O_3	6min	305 ± 15
O_3	6h	87 ± 3
O_3	3h	87 ± 3
Air sec	6h	/
Air sec	3h	/

Le pollen traité dans ce test a fait l’objectif d’un travail intitulé « Le Pollen de Pin d’Alep Bio-Indicateur de la Pollution Atmosphérique » *O.NAAS*¹; *A.S.VERCOUTTER – EDOUART*²; *C.RAMBAUD*³ et *N.VISEZ*⁴.

Il a été présenté dans un workshop tenu en Octobre 2014 à Lille en France, ensuite publié sur internet : www.biosurveillance2014.com/doc/articles/10Naas.pdf

II.4.2.2.2 Exposition au(NO_2)

Une exposition à l’oxyde d’azote (NO_2) a été effectuée sur le pollen rural collecté aux forêts naturelles de Bouchaoui à Alger et de Senalba à Djelfa, dites sites non pollués à une concentration de 150ppb pendant les durées suivantes : 4; 8 et 24 heures.

A. Méthodologie

Lors de nos expériences, la pollution au NO_2 a été effectuée avec de l’oxyde d’azote stocké dans des bombonnes calibrées en concentration. Le flux de ce gaz est amené au travers du réacteur (le même utilisé lors de l’ozonolyse), où est contenu le pollen piégé entre deux filtres ((MAGNA, NYLON, Supported, Plain 0.22Micron, 47mm, 100 IPK , Material N°1213769 Batch N°319657), de diamètre des pores équivalant à $5 \mu m$ puis jusqu’à un analyseur ; ce dernier mesure toutes les dix secondes la quantité d’oxyde d’azote à la sortie du réacteur ; lors de la mise en contact de pollen et de NO_2 , une disparition définitive de NO_2 de la phase gazeuse (Figure II.14).

II.4.2.2.3 Réhydratation

Dans notre étude de la fertilité du pollen de *Pinus halepensis* Mill., une réhydratation pendant 16h a été effectuée (le pollen a été mis dans des boîtes de Pétri laissées ouvertes dans une atmosphère saturée), avant d'être mis en culture; cette étape nous a paru essentielle dans l'étude de la germination du pollen du fait que les résultats préliminaires de la germination du pollen non réhydraté n'ont pas été satisfaisants (quasiment non germé); ainsi, un ensemble d'études déjà réalisées dans lesquelles, les auteurs ont recommandé la réhydratation à différentes durées (15 mn pour le pollen de *Beta vulgaris*L. (Hecker et McClintock (1988) et une heure pour le pollen de *Betula verrucosa*(Bocquel, 1995).

La durée de 16 heures à 100% RH (humidité relative) est plutôt convenable selon Webber et Bonnet-Masimbert (1993) et Dumont-BéBoux et *al.* (1999) pour le pollen de *Pseudotsuga menziesii*. La même durée de réhydratation a été adoptée comme un prétraitement effectué pour la germination du pollen du Pin (Colas et Mercier, 2000).

D'après Jett et Frampton (1990) in Colas et Mercier (2000), la teneur en eau du pollen augmente rapidement après 2 heures de réhydratation à 20°C en atmosphère saturée, pour atteindre environ 20%. Un taux élevé de germination *in vitro* a été engendré après une durée de réhydratation de 1 et 3 heures.

Dans un deuxième essai de germination sur du pollen réhydraté pendant 16 heures, nous avons engendré un pourcentage de germination élevé. Alors, nous avons décidé d'adopter cette durée de réhydratation pour le pollen du pin d'Alep.

II.4.3 Schéma expérimental

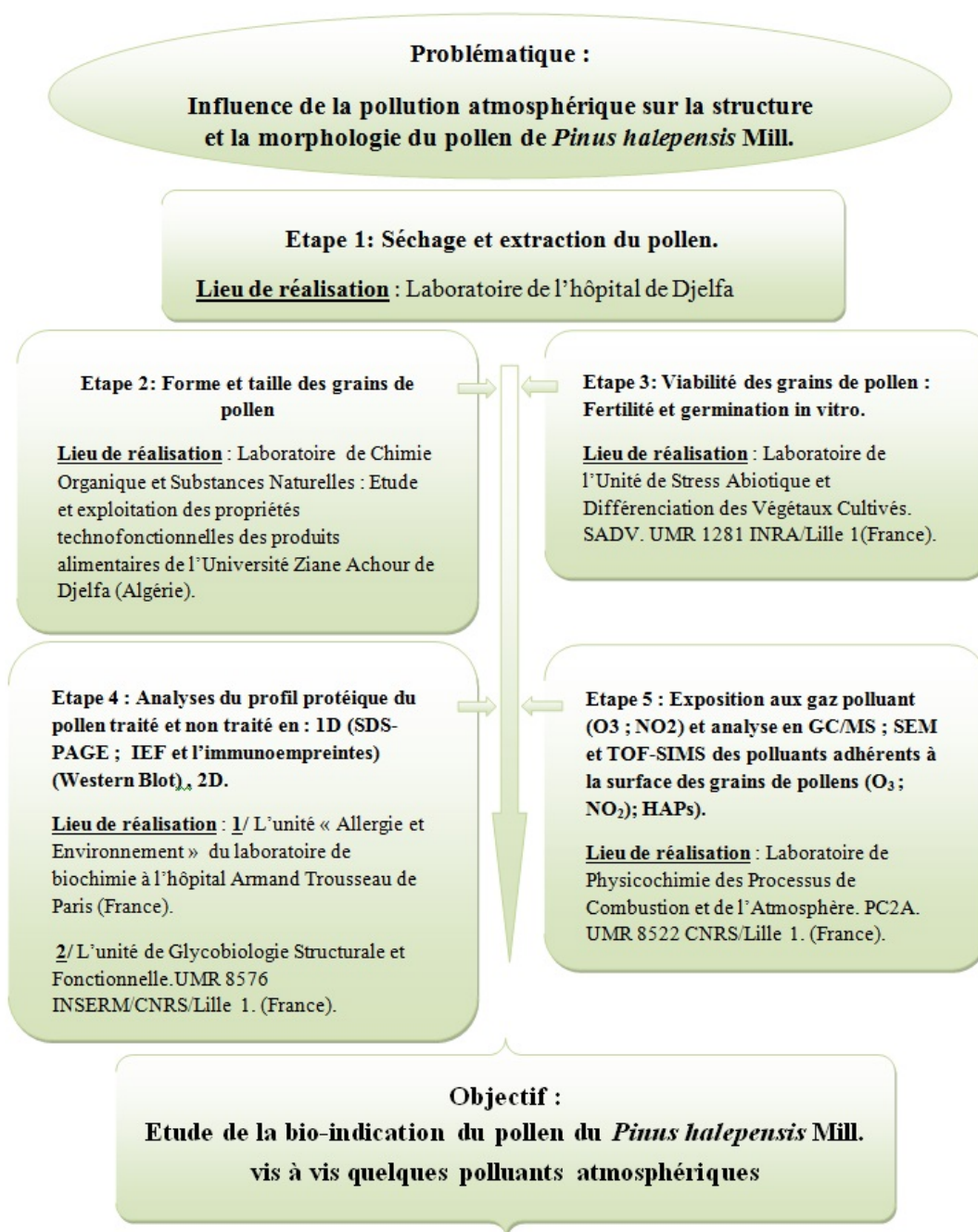


FIGURE II.16 – Schéma expérimental de l'étude

II.4.4 Analyse

II.4.4.1 Caractères quantitatifs

Dans l'objectif d'une caractérisation morphologique du pollen de notre espèce, des mesures biométriques portées sur les deux diamètres (polaire et équatorial) ont été réalisées sur chaque grain (ballonnets + grain) de pollen de nos échantillons, ceci a été par une préparation simple qui consiste à mettre une petite quantité de pollen entre la lame et la lamelle microscopique avec quelques gouttes d'alcool (95%) sans inclure d'air avec 10 de répétition. A l'aide d'un logiciel Motic Images Plus 2.0. Nous avons fait les mesures des deux diamètres : polaire et équatorial des deux ballonnets et ceux du grain du pollen de *Pinus halepensis* Mill. 30 pollen par la microscopique (Figure II.17).

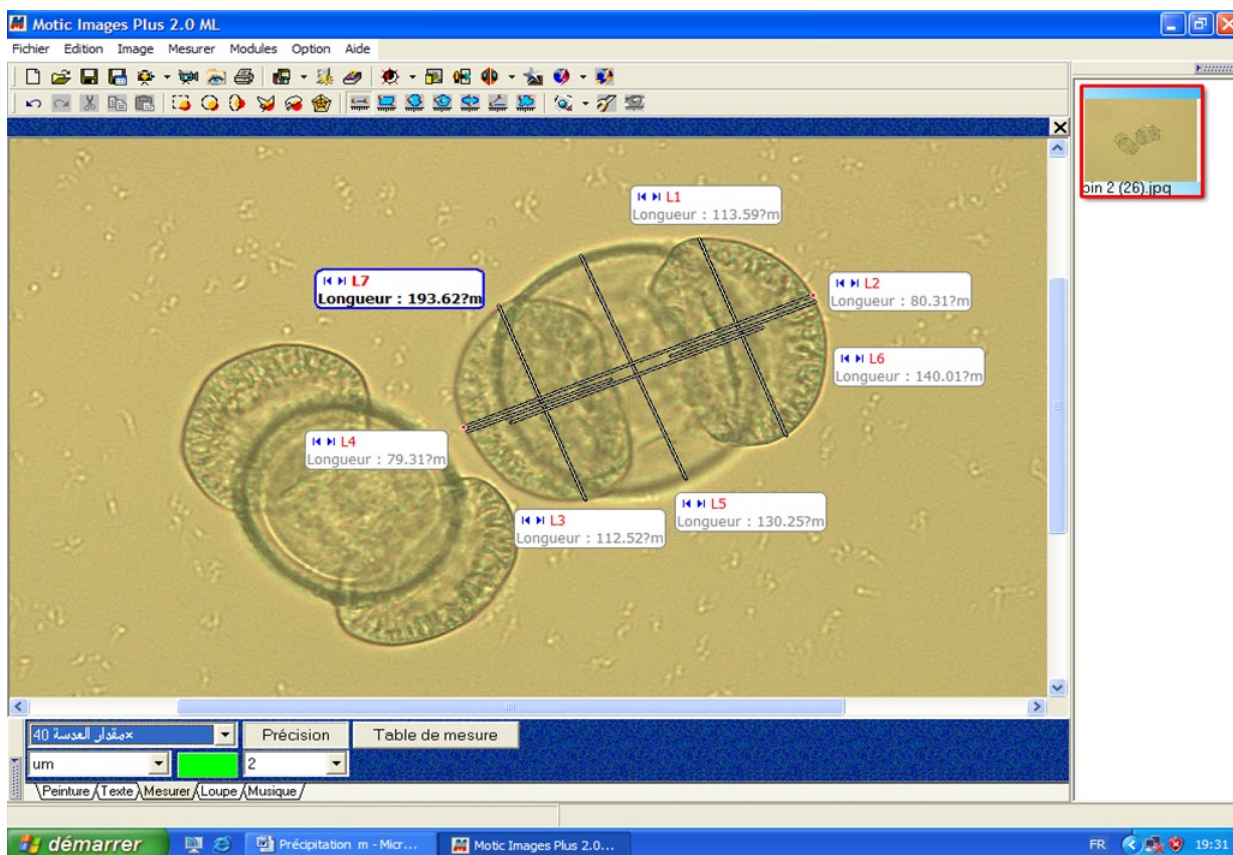


FIGURE II.17 – Mesures des diamètres (polaire et équatorial) (réalisées par le logiciel Motic image) deux Ballonnets (DP1=L1, DE1=L2 / : DP3=L3, DE3=L4) Grain : DP2=L5, DE2=L6

II.4.4.2 Mesure du pH

La mesure du pH a été réalisée sur 60mg du pollen de chaque station par l'ajout de 20ml d'eau distillée dans des Béchers recouverts avec de la paraffine, puis mis sous agitation ultra-sons (agitateur Fisher Scientific FB 156046) pendant 10mn, à l'aide d'un pH-mètre (PHM210 STANDARD Ph METER MeterLab). Un Bécher témoin contenant de l'eau distillée a subi les mêmes étapes.

La prise des mesures a été effectuée après une heure et après 24heures (en gardant les Béchers clos) à une température de 21°C.

II.4.4.3 Analyses de 1D (SDS-PAGE et IEF) et 2D

II.4.4.3.1 Test préliminaire

A. Extraction des protéines

Une extraction a été faite sur 30mg du pollen de chaque site (urbains et ruraux choisis pour cette étude), non exposé à l'ozone ; la même quantité a été prise pour le pollen Alger rural pollué avec l'ozone avec la concentration de 150ppb pendant 4 et 16 heures. Le Tampon d'extraction utilisé est constitué de : 20 μ l (NP40) + 2 ml (PBS) à 1%. Après deux heures d'agitation à 4°C, les échantillons ont été récupérés et mis en centrifugation à V=14800 RPM (19000g) pendant T=30mn .

B. SDS-PAGE

Par l'utilisation du système Mini protean III de chez BioRad., on ajoute 15 μ l de Tampon Laemmli 5X (1X : 250 mM Tris pH 6.8 (0.06 g x5) + 5% SDS (0.5g) + 5% beta-mercaptoéthanol (500 μ l) + 40% Glycérol (4ml) + Eau milli-Q) (qsp 10m) aux 60 μ l des échantillons (extrait du pollen), puis on agite et on chauffe le mélange à 95°C pendant 10mn ; à l'aide d'une seringue, on dépose dans les puits du gel en deux séries de dépôt les volumes : 35 μ l et 17 μ l, enfin la migration s'effectue à 20 mA/gel dans un tampon de migration (25 mM Tris base ; 192 Mm Glycine ; 0.1 % SDS ; eau distillée).

C. Coloration du gel

Lorsque la migration des protéines dans le gel est terminée, le gel est démoulé puis soumis à la coloration.

D. Dosage protéique

Pour cette analyse, on utilise de kit micro-BCA de chez Thermo Scientific. Une préparation de la BCA selon le nombre de puits (25) de la plaque utilisée . De ce fait , on prévoit de diluer notre échantillon à doser de 1/7ème [5 μ L de l'échantillon+30 μ l de l'eau], puis on passe au dosage 10 μ l (échantillons gamme BSA) + 100 μ l (BCA).

II.4.4.3.2 Préparation des échantillons non traités à l’ozone

Sur des pollens non traités à l’ozone des quatre sites de l’étude, nous avons procédé à une extraction avec : H_2O ; PBS 1%*x*; TUC (Thiourée 2M+Urée 7M+Chaps 5%); SDS (12%) (Tab.II.7).

TABLE II.7 – Répartition des extraits de nos échantillons

	T a m p o n			
pollen	<i>H</i> ₂ O stérile	PBS 1%<i>x</i>	TUC	SDS 12%
Djelfa urbain	1 extrait	6 extrait	11 extrait	16 extrait
Djelfa rural	2 extrait	7 extrait	12 extrait	17 extrait
Alger urbain	3 extrait	8 extrait	13 extrait	18 extrait
Alger rural	4 extrait	9 extrait	14 extrait	19 extrait

A. Extractions des protéines

L’extraction a été faite sur une quantité de 50mg de pollen dans un volume de 500 μ L du tampon; la solution a été mise en agitation en vortex pendant quelques minutes afin d’homogénéiser le mélange. Ensuite, les échantillons ont été mis en agitation sur roue à 4°C pendant une nuit dans une chambre froide. Une première centrifugation a été faite sur les échantillons à 4°C et à une vitesse de 18000g pendant 20mn (Sigma 2 K15); puis une deuxième centrifugation du surnageant dans les mêmes conditions de température et de vitesse.

B. Récupération du surnageant

En travaillant sur un bloc froid (afin de ne pas altérer la nature des protéines), on presse le culot de la première centrifugation sur une double grille (Toile de Bronze Meunerie, Tripette et Renaud) en évitant de récupérer les fonds noirs des culots (pollutions diverses : feu ; circulation; fumées de toutes sortes; carbone de toutes sortes; résidus de combustion; sables; résidus de bois (observation au microscope) ou de fragments des pins dont est issu le pollen même.

C. Séparation des protéines en SDS-PAGE

C.1. Préparation des extraits

20 μ l des extraits des différents échantillons + 10 μ l de tampon tris-acétate 114 mM, pH 6,8 contenant 12% de SDS (TE x3) + une pointe de spatule de bleu de bromophénol (BBP, Sigma, qui permet de suivre le front de la migration). Le mélange est bouilli pendant 5mn avant dépôt.

C.2. Mise en route de SDS-PAGE

Méthodologie

Le gel de SDS-PAGE a été coloré au nitrate d'argent (Protocole détaillé dans l'annexe I) après la coloration au bleu de Coomassie et décoloration du bleu, car très peu de protéines étaient visibles après la première coloration.

C.3. Séparation par isoélectrofocalisation (IEF) 1D pour les extraits en H_2O ou en PBS

Pour les analyses de l'IEF, un gel à 4% de polyacrylamide, stocké déshydraté à -20°C avant utilisation, (18-1035-32 : CleanGel GE Healthcare) a été réhydraté avec une solution H_2O stérile contenant des ampholines (ou ampholytes) (Servalyt gradient pH=3-10) (molécules de charges différentes) qui formeront le gradient de pH large sous l'impulsion du champ électrique afin de séparer suivant leur charge nette toutes les protéines présentes dans l'extrait du pollen.

Le GelBond (support plastique portant le gel et donc, côté opposé du gel d'acrylamide) est nettoyé légèrement avec de l'alcool (95%) pour enlever l'éventuelle pellicule grasseuse associée au GelBond.

C.4. Réhydratation du gel

Une solution de réhydratation est versée dans une « piscine » (GelPool) et le gel est déposé dans cette solution. Le contact se fait par la face du gel encore sec avec le liquide. L'ensemble est mis en agitation douce et tournante pendant une nuit à température ambiante.

- Ce protocole est identique pour toutes les IEF faites par la suite.
- Il est à rappeler qu'il faut travailler avec des réactifs mis en température ambiante du laboratoire (20 et 22°C) afin d'accélérer les réactions.

C.5. Mise en route de l'IEF 1D des extraits H_2O et PBS de pollen de pin

Méthodologie

- Protocole détaillé voir Annexe I

C.6. Séparation par IEF-1D des extraits TUC

Pour les analyses des IEF sur les extraits TUC (N° 11, 12, 13, 14), le gel a été réhydraté en utilisant une solution d'Urée-CHAPS (UC) : Pour un 1/2 gel : 12,5 mL de solution d'urée 4M (4,804 g) + CHAPS 2% (0,3 g) dans de l'eau stérile puis ajout de 625 μ L d'ampholines (Servalyt analytical grade) gradient de pH 3 -10 (Serva).

Cette solution UC est versée dans la « piscine » (GelPool) et le gel est déposé dans cette solution. Le contact se fait par la face du gel encore sec avec le liquide. L'ensemble est mis en agitation douce et tournante horizontalement pendant une nuit à température ambiante. La suite du protocole est identique à celui utilisé pour l'IEF des extraits de pollen de pin H_2O et PBS.

II.4.4.3.3 Préparation des échantillons traités à l'ozone

A. Extraction

Utilisation de pollen de provenance Djelfa rural et Alger rural pollués à l' O_3 au laboratoire PC2A (Lille) à une concentration de 150ppb pendant 4h ou pendant 16h (concentrations et durées d'exposition en fonction des premiers résultats de SDS-PAGE obtenus du test préliminaire effectué à Lille 1 au niveau du laboratoire de Glycobiologie).

On avait ajouté sur une quantité de 50 mg de pollen, un volume de 500 μ L de TUC ; puis l'ensemble a été mis en agitation au vortex pour un bon moment afin d'homogénéiser le mélange (l'apparition d'un dépôt plutôt brun (pas vraiment noir) sur les échantillons d'Alger rural (N°14 a et b) a été notée). Une agitation sur roue à 4°C (chambre froide) pendant une nuit a été effectuée.

TABLE II.8 – Répartition des extraits

pollen	150ppb/4h	150 ppb /16 h	Tampon
Djelfa rural	Extrait 12 a	Extrait 12 b	TUC
Alger rural	Extrait 14 a	Extrait 14 b	TUC

B. Récupération du surnageant

Une série de quatre centrifugations successives à 4°C et à 18000g de 20mn puis 20mn puis 5mn et finalement de 15mn (Sigma 2 K 15) ont été nécessaires pour obtenir des surnageant « clairs » ; Après chaque centrifugation la récupération de l'extrait a été faite sur un bloc froid et les culots ont été ensuite pressés (Tab.II.8). Les culots sont conservés à -20°C.

C. Mise en route de l'IEF-1D des extraits TUC de pollen non traité et traité en O_3

Méthodologie

- Protocole détaillé voir Annexe I

D. Séparation en IEF pour 2D d'extraits TUC non traités provenant d'Alger et de Djelfa

Méthodologie

Protocole détaillé voir Annexe I

E. Séparation en SDS-PAGE pour la 2^e dimension d'extraits TUC de pollen non traités des quatre sites

E.1. Équilibrage des bandelettes d'IEF en TE contenant du SDS

- Préparation de la solution TE (SDS 12%) :

24 ml de TE (Tris-acétate 114 mM + SDS 12%) + 1,15 g d'Iodoacetamide ($\geq 99\%$ HPLC cristalline, Sigma-Aldrich), agitation pour quelques minutes.

- Une fois sorties du congélateur, les bandelettes sont mises à équilibrer dans 2ml de la solution TE+iodo en les changeant 3 fois successivement de bain de 2mL dans cette solution, préalablement mise dans un récipient à 6 rigoles; chaque bain dure 10 min (3x10min) (afin d'assurer un bon recouvrement des protéines avec le SDS), voir le schéma suivant :

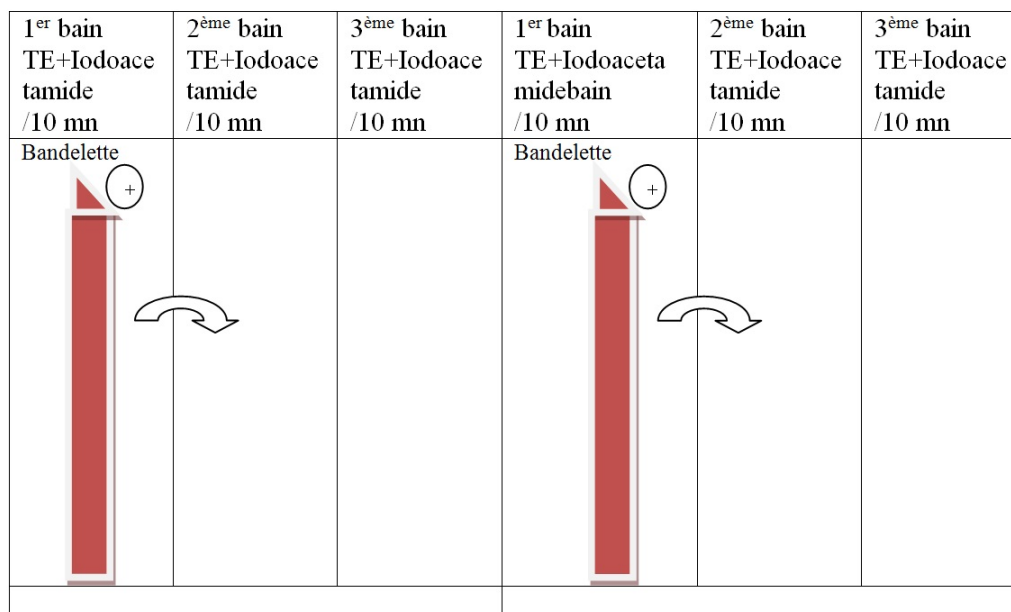


FIGURE II.18 – Schémas des plaques à 6 rigoles et des différents bains d'équilibrage des bandelettes d'IEF pour migration 2D

E.2. Lancement de SDS-PAGE pour une 2^e dimension

Méthodologie

Protocole détaillé voir Annexe I.

F. Séparation en IEF d'extraits TUC de pollen non traités et traités à O₃ provenant d'Alger et de Djelfa

Méthodologie

- Réhydratation en UC du gel d'IEF : même protocole que celui décrit en Annexe I;
- Mise en route de l'IEF : même protocole que précédemment. Cependant, dans cette expérience des dépôts à l'anode sont réalisés.

G. IEF N°6 pour la 2D des pollens TUC (traité à O₃)

G.1. Réhydratation du gel IEF

même protocole

La réhydratation d'un gel IEF complet se fait en agitation et pendant une nuit, en utilisant la solution suivante :

6g d'Urée 4 M (molaire) + 0,5g de CHAPS 2% + (25ml – 1,25 = 23,75 ml) + 1,25 Ampholines SERVA (3-10)

G.2. Mise en route de l'IEF N°6 pour 2D

Méthodologie

Protocole détaillé voir Annexe I

H. Séparation en SDS-PAGE pour la 2^e dimension d'extraits TUC (pollen rural Alger et Djelfa traité à O₃ : 150ppb/16h et 150ppb/4h

- Equilibration des bandelettes d'IEF en TE contenant du SDS (voir schéma et protocole détaillés déjà utilisé);
- Mise en route de la séparation en SDS-PAGE pour la 2^e dimension : voir le protocole détaillé auparavant en Annexe I.

II.4.4.3.4 Préparation des échantillons traités au NO_2

Du pollen rural de *Pinus halepensis* Mill., provenant de deux sites forestiers en Algérie, a été traité à l'oxyde d'azote à 150 ppb pendant différentes durées de 4 ; 8 et 24 heures. Il a été traité dans le broyeur Fast-Prep 24-5G (MP-Biomedical) à froid (avec carboglace) en présence de PBS et en utilisant des billes D (Lysing matrix D : sphères en céramique de 1,4 mm de diamètre, tube bouchon vert) afin de concasser ou broyer notre pollen pendant 40 secondes à 6m/sec avec le programme « CoolPrep ». (figure II.19).

Avant broyage



Après broyage

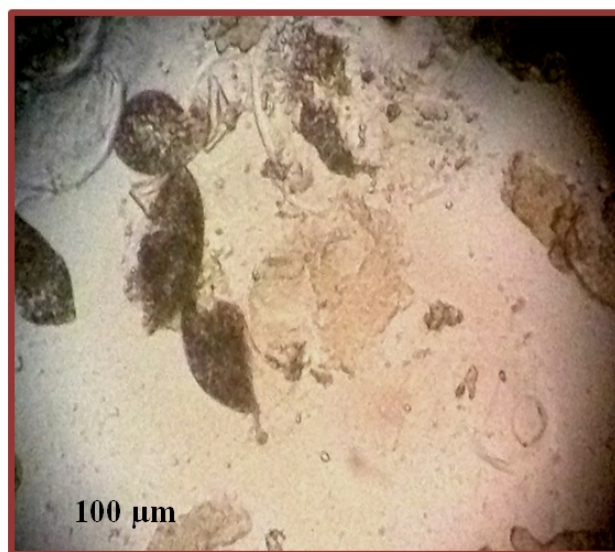


FIGURE II.19 – Pollen de *Pinus halepensis* Mill. Avant et après broyage (Microscopie optique, G x 200)

Dans le but d'obtenir un extrait assez limpide et clair, plusieurs centrifugation (18000g /15 mn et à 4°C) (Sigma 2 K15) ont été faites ; après chaque centrifugation, nous avons pipeté le surnageant, remis du tampon sur le culot et repasser les deux : culot et surnageant récupéré en centrifugation à 18000g à 4°C pendant 15 à 20 min (Tab.II.9).

TABLE II.9 – Répartition des échantillons

N°	Pollen traité au NO_2	Masse du pollen	Tampon PBS avant MP-BIO	Après MP-Bio : ajout de PBS, centrifugations et récupération des extraits	
				1 ^{er} ajout	2 ^{ème} ajout avant la centrifugation
01	Djelfa rural Blanc	50mg	450 μ L	200 μ L	300 μ L
02	Djelfa rural 150ppb /4h	50mg	450 μ L	200 μ L	300 μ L
03	Djelfa rural 150ppb /8h	50mg	450 μ L	200 μ L	300 μ L
04	Djelfa rural 150ppb /24 h	50mg	450 μ L	200 μ L	300 μ L
05	Alger rural blanc	50mg	450 μ L	200 μ L	300 μ L
06	Alger rural 150ppb /4h	50mg	450 μ L	200 μ L	250 μ L
07	Alger rural 150ppb /8h	50mg	450 μ L	200 μ L	250 μ L
08	Alger rural 150ppb /24h	50mg	450 μ L	200 μ L	250 μ L

A. Séparation par isoélectrofocalisation (IEF) 1D des extraits MP-Bio en PBS

Pour les analyses de l'IEF, un gel à T=5%, C=3% de polyacrylamide, stocké déshydraté à -20°C avant utilisation, (18-1035-32 : CleanGel GE Healthcare) a été réhydraté, durant la nuit, avec une solution H_2O stérile contenant des Ampholines (ou Ampholytes) (Servalyt gradient pH=2-11) (molécules de charges différentes) qui formeront le gradient de pH large sous l'impulsion du champ électrique afin d'analyser les protéines, dont les basiques, présentes dans l'extrait de pollen du pin.

Le GelBond (support plastique portant le gel et donc, côté opposé du gel d'acrylamide) est nettoyé légèrement avec de l'alcool (95%) pour enlever l'éventuelle pellicule grasseuse associée au GelBond, ce qui permet de dessiner au feutre les marques des dépôts.

A.1. Préparation de la solution de réhydratation du gel

- Solution de réhydratation : 1.25 ml de Servalyt analytical grade 2-11 (Serva) + 23.75 ml d' H_2O , agitation pour favoriser le mélange ;
- Cette solution est versée dans une « piscine » (GelPool) et le gel est déposé dans cette solution. Le contact se fait par la face du gel encore sec avec le liquide. L'ensemble est mis en agitation douce et tournante pendant une nuit à température ambiante.

A.2. Mise en route de l'IEF 1D des extraits PBS

Méthodologie

Protocole détaillé voir Annexe I

B. Séparation en SDS-PAGE pour la 2^e dimension d'extraits MP-Bio/PBS de pollen non traités et traités (NO_2 à 150ppb/24h) provenant d'Alger rural

B.1. Equilibration des bandelettes d'IEF en TE contenant 12% SDS

- Préparation de la solution TE (SDS 12%) : 48 ml de TE (Tris-acétate 114 mM + SDS 12%) + 2.30 g d'Iodoacetamide ($\geq 99\%$ HPLC cristalline, Sigma-Aldrich), agitation pour quelques minutes.
- Une fois sorties du congélateur, les bandelettes sont mises à équilibrer dans 4 ml de la solution TE+iodo en les changeant 3 fois successivement de bain dans 4 mL de cette solution, préalablement mise dans un récipient à 6 rigoles ; chaque bain dure 10 min (3x10min) (afin d'assurer un bon recouvrement des protéines avec le SDS),
- Equilibration des bandelettes d'IEF en TE contenant du SDS (Figure II.18) ;

B.2. Lancement de SDS-PAGE pour une 2^e dimension

Méthodologie

Protocole détaillé voir Annexe I

C. Séparation en SDS-PAGE pour la 2^e dimension d'extraits MP-Bio/PBS de pollen traité à NO_2 (150ppb /4h et 150 ppb/8h) provenant d'Alger

C.1. Equilibration des bandelettes d'IEF en TE contenant 12% SDS

- Préparation de la solution TE (SDS 12%) :
48 ml de TE (Tris-acétate 114 mM + SDS 12%) + 2.30 g d'Iodoacetamide ($\geq 99\%$ HPLC cristalline, Sigma-Aldrich), agitation pour quelques minutes.

- Une fois sorties du congélateur, les bandelettes sont mises à équilibrer dans 4 ml de la solution TE+iodo en les changeant 3 fois successivement de bain dans 4 mL de cette solution, préalablement mise dans un récipient à 6 rigoles ; chaque bain dure 10 min (3x10min) (afin d’assurer un bon recouvrement des protéines avec le SDS), voir le schéma su-cité.

C.2. Lancement de SDS-PAGE pour une 2^e dimension

- Mettre des gouttelettes du Kérosène sur la plaque avant de déposer le gel sur la plaque du banc préalablement réfrigérée à 12°C de l’appareil d’électrophorèse (Multiphor II, GE Healthcare), afin d’améliorer la conductivité thermique et l’adhésion du gel ;

- Utilisation du Multiphor II de gauche et du générateur de courant, manuel, ECPS 3000/150 (Pharmacia) pour les IEF des extraits de pollen d’Alger

- Thermostater préalablement les plaques des appareils d’électrophorèse à 12°C

- Traçage au feutre permanent des zones de dépôts sur le GelBond des 2 gels pour SDS-PAGE 8-18% (ExcelGel, GE Healthcare)

- Mise en place des 2 mèches, en acrylamide, servant de contact entre les électrodes + et - et le gel.

NB : pour la migration des bandelettes d’Alger, suite un manque des mèches, on avait préparé un tampon (anode et cathode)(Tab.II.10), avec lequel on avait imbibé deux bandes en papier.

TABLE II.10 – Préparation des deux tampons d’électrodes

	Anode : 0.3 M Tris, 0.3 Acétate, 4 g/L SDS, pH 6.4)	Cathode : 0.08M Tris, 0.8 MGlycine à la place de Tricine, 4 g/L SDS, pH 7.1
Tris	7.27 g	12 g
Ac. Acétique	3.45Ml	4.5mL
SDS	0.80 g	0.80 g
Eau	Qsp 200 mL + quelques grains d’Orange G.	Qsp 200 mL

- Dépôt des bandelettes équilibrées en SDS (2 bandelettes pour le pollen d’Alger rural : traité et non traité ;

- Dépôt des 3 bouts de papier (un au milieu et deux sur les deux côtés des bandelettes), et y mettre un volume de 1.5µL de marquer de masse ;

- Lancement de la migration du SDS-PAGE 2D ;

- Prise des mesures chaque 30mn (v ; mA ; w) ;

- Lavage des gels en PBS, la fixation et la coloration des 2 gels entiers. La migration a ratée.

D. Séparation en SDS-PAGE pour la 2^e dimension d'extraits MP-Bio/PBS de pollen non traités et traités (NO_2 à 150ppb/24h) provenant de Djelfa rural

D.1. Equilibration des bandelettes d'IEF en TE contenant 12% SDS

- Préparation de la solution TE (SDS 12%) :

48 ml de TE (Tris-acétate 114 mM + SDS 12%) + 2.30 g d'Iodoacetamide ($\geq 99\%$ HPLC cristalline, Sigma-Aldrich), agitation pour quelques minutes ;

- Une fois sorties du congélateur, les bandelettes sont mises à équilibrer dans 4 ml de la solution TE+iodo en les changeant 3 fois successivement de bain dans 4 mL de cette solution, préalablement mise dans un récipient à 6 rigoles ; chaque bain dure 10 min (3x10min) (afin d'assurer un bon recouvrement des protéines avec le SDS).

D.2. Lancement de SDS-PAGE pour une 2^e dimension

Méthodologie

Protocole détaillé voir Annexe I

E. Séparation en SDS-PAGE pour la 2^e dimension d'extraits PBS de pollen traité à NO_2 (150ppb /4h et 150 ppb/8h) provenant de Djelfa rural

E.1. Equilibration des bandelettes d'IEF (du 18 février 15) en TE contenant du SDS

- Préparation de la solution TE (SDS 12%) voir Annexe I : 48 ml de TE (Tris-acétate 114 mM + SDS 12%) + 2.30 g d'Iodoacetamide ($\geq 99\%$ HPLC cristalline, Sigma-Aldrich), agitation pour quelques minutes.

- Une fois sorties du congélateur, les bandelettes sont mises à équilibrer dans 2ml de la solution TE+iodo en les changeant 3 fois successivement de bain de 4mL dans cette solution, préalablement mise dans un récipient à 6 rigoles ; chaque bain dure 10 min (3x10min) (afin d'assurer un bon recouvrement des protéines avec le SDS)(Figure II.18).

E.2. Lancement de SDS-PAGE pour une 2^e dimension

Méthodologie

Protocole détaillé voir Annexe I

TABLE II.11 – Préparation des extraits traités

pollen	Qte	Tampon PBS 1%	Broyage	1 ^{er} ajout	Centri 1 : Des tubes avec billes	Centri 2 : Des surnageants en tubes eppendorf	Volumes Des extraits MP- Bio/PBS (environ)
Djelfa urbain	50mg	450 μ L	MC Bio Billes D 40 s Vi- tesse 60m/s Adapter : CoolPrep	200 μ L (Tam- pon PBS)	18000g; T=4°C; Temps : 20mn Récupération des surna- geants	18000g; T=4°C; Temps : 20mn Récupération des surnageants mis en tubes eppendorf	250 μ L
Alger urbain							
Djelfa rural traité O ₃ 150ppb /4h							
Djelfa rural traité O ₃ 150ppb /16h							
Alger rural traité O ₃ 150ppb /4h							
Alger rural traité O ₃ 150ppb /16h							

Même traitement pour les deux types de pollen urbains non traités provenant d'Alger et de Djelfa. Les extraits sont conservés à -20°C (Tab.II.11).

Réhydratation de deux gels IEF, un premier pour l'immuno-détection et le second pour une étude comparative des différents extraits de notre pollen.

Pour les analyses de l'IEF, un gel à T=5%, C=3% de polyacrylamide, stocké déshydraté à -20°C avant utilisation, (18-1035-32 : CleanGel GE Healthcare) a été réhydraté, durant la nuit, avec une solution H_2O stérile contenant des Ampholines (ou Ampholytes) (Servalyt gradient pH=2-11) (molécules de charges différentes) qui formeront le gradient de pH large sous l'impulsion du champ électrique afin d'analyser les protéines, (dont les basiques) présentes dans l'extrait de pollen du pin.

Le GelBond (support plastique portant le gel et donc, côté opposé du gel d'acrylamide) est nettoyé légèrement avec de l'alcool (95%) pour enlever l'éventuelle pellicule grasseuse associée au GelBond, ce qui permet de dessiner au feutre les marques des dépôts.

Préparation de la solution de réhydratation du gel

E.3. Préparation de la solution de réhydratation du gel

- Préparation d'une solution de réhydratation avec agitation manuelle pour favoriser le mélange.

Elle est constituée de :

2,5 ml de Servalyt analytical grade 2-11 (Serva) + 47.5 ml d' H_2O

NB : Cette solution est répartie en 2 dans 2 « piscines » (GelPool) dans lesquelles chaque gel est déposé dans cette solution. Le contact se fait par la face du gel encore sec avec le liquide. L'ensemble est mis en agitation douce et tournante pendant une nuit à température ambiante.

C. Préparation de la solution de réhydratation du gel

- Solution de réhydratation : 2,5 ml de Servalyt analytical grade 2-11 (Serva) + 47.5 ml d' H_2O ;
- Cette solution est répartie en 2 dans 2 « piscines » (GelPool) dans lesquelles chaque gel est déposé dans cette solution. Le contact se fait par la face du gel encore sec avec le liquide. L'ensemble est mis en agitation douce et tournante pendant une nuit à température ambiante.

C.1. Mise en route de l'IEF comparative analytique des extraits MP Bio de pollen de pin rural traité (O_3 et NO_2), rural non traité et le pollen urbain

A. Méthodologie

Protocole détaillé voir Annexe I.

C.2. Séparation par isoélectrofocalisation (IEF) 1D comparative : pollen urbain non traité en extraits PBS non passés au MP-Bio et rural des deux sites traité à l’ozone (150 ppb) en différentes durées d’exposition (4h et 16h), extraits en MP Bio-PBS

Le même protocole (réhydratation du gel; préparation de la solution d’hydratation; mise en route de l’IEF), utilisé auparavant lors des autres IEF.

- Découpage et conservation en congélation des bandelettes jusqu’à utilisation pour 2D;
- Rinçage du gel au PBS puis fixation avec la solution TCA+acide sulfo-salicylique;
- Coloration au bleu de Coomassie;
- Décoloration puis fixation avec le fixateur Blum et la suite de la coloration à l’ AgNO_3 , le scan du gel (encore humide), son séchage et sa conservation est identique à la procédure utilisée auparavant.

II.4.4.4 Dosage protéique

A. Dosage protéique sur les extraits non broyés par le MP Bio-PBS 1% x

Méthodologie

Pour le dosage protéique de nos extraits de pollen du *Pinus halepensis* Mill. (H_2O ; PBS; TUC et SDS 12%), nous avons utilisé la méthode de Bradford (Coomassie Assay Reagents de Pierce).

Pour ce dosage, nous avons utilisé des plaques 96 puits simples (à rappeler que sur chaque boîte il faut noter pour « dosage protéique : type d'extraction ; type de pollen et date »).

- Faire chaque point en duplicate (volume final $100\mu L$) de gamme ou d'échantillon ;
- $100\mu L$ gamme ou échantillon + $100\mu L$ du réactif de Pierce ;
- Laisser 10 mn au moins à l'obscurité, puis la lecture à 595nm sur le lecteur de plaques Elisa.

A.1. Préparations des extraits au dosage

A.1.1. Extraits H_2O et PBS

Dosage protéique : extraits H_2O et PBS du pollen du *Pinus halepensis* Mill. $100\mu L$ d' H_2O + $50\mu L$ de réactif (Coomassie Protein Assay Reagent . Thermo Scientific Réactif de Pierce.

A.1.2. Extraits TUC

$50\mu L$ /puits en duplicate $100\mu L$; préparer $120\mu L$ Dilution en 5ème de 2 en 2 $\Rightarrow 240\mu L$ pour la première dilution ($24\mu L + 216\mu L$ d'eau) Les dilutions se feront dans du TUC 1/10 :



A.1.3. Extraits SDS 1%

- $50\mu L$ / puits.
- En duplicate $\Rightarrow 100\mu L$ / dilution.
- Préparer $150\mu L$ de chaque.
- dilution (2 en 2) $\Rightarrow 300\mu L$ pour la 1^{ère} dilution au 1/10, soit $30\mu L$ d'échantillon + $270\mu L$ d'eau ; ensuite les dilutions se font dans du SDS 1%.

B. Dosage protéique sur les extraits MP Bio-PBS 1%*x* du pollen du Pin

Méthodologie

Pour le dosage protéique de nos extraits MP Bio-PBS de pollen du *Pinus halepensis* Mill., nous avons utilisé la méthode de Bradford (Coomassie Assay Reagents de Pierce). Pour ce dosage, nous avons utilisé des plaques 96 puits simples (à rappeler que sur chaque boîte il faut noter pour «dosage protéique : type d'extraction ; type de pollen et date »).

- Faire chaque point en duplicate (volume final 100 μ L) de gamme ou d'échantillon ;
- 100 μ L gamme ou échantillon +100 μ L du réactif de Pierce ;
- Laisser 10 mn au moins à l'obscurité, puis la lecture à 595nm sur le lecteur de plaques Elisa.

II.4.4.5 Analyses des polluants par GC/MS ; MEB et par TOF-SIMS

II.4.4.5.1 Analyse en chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse (GC/MS)

La chromatographie en phase gazeuse - Spectrométrie de masse est une technique d'analyse et de quantification des composés organiques volatiles et semi-volatiles. La chromatographie en phase gazeuse (CG) sert à scinder les mélanges pour en faire des composants individuels au moyen d'une colonne capillaire à température contrôlée. Les petites molécules, qui ont des stades d'ébullition bas, descendent le long de la colonne plus rapidement que les grandes molécules, qui ont des stades d'ébullition hauts. La spectrométrie de masse (MS) sert à identifier les diverses composantes dans leur spectre de masse. Chaque composant a un spectre de masse unique, ou quasi unique, que l'on peut comparer avec des bases de données de spectres de masse, ce qui permet de les identifier. Grâce à l'utilisation de normes, il est également possible de procéder à la quantification.

A. Optimisation des conditions expérimentales

Une série de tests (6 tests) a été effectuée sur une masse de 100,00mg (une extraction a été effectuée sur 10,00mg de ce pollen, mais les résultats n'ont été pas significatifs) du pollen Djelfa rural afin d'optimiser les conditions expérimentales de l'extraction et de l'analyse au GC/MS (Spectrométrie de masse couplée à la Chromatographie en phase gazeuse). Trois solvants ont été choisis, Méthanol; DCM et Hexane, mélangés et individuellement (un volume de $350\mu\text{L}\times 3$) ou encore au Blanc (sans pollen), pour l'extraction.

1. D'après les chromatogrammes obtenus, les meilleures extractions ont été celles au Dichlorométhane ou DCMSigma-Aldrich Chromasoly® for HPLC $\geq 99.8\%$;
2. Une agitation ultrasonique pendant 15 mn (Bandelin Sonopuls 20Khz (HF power : 100W max) (cycle : 4s pulse, 2s off, energy : 29.7kJ) et en deux reprises a été choisie pour ce type d'extraction ;
3. Des centrifugations (VWR CompactStar CS4) à différentes durées et puissances ont été testées : 2mn à 5000g ; 4mn à 4000g ; 5mn à 5000g et 6mn à 4000g. La meilleure centrifugation est celle à une vitesse de 5000 g pendant une durée de 2mn, une première juste après l'agitation ultrasonique et une deuxième sur le surnageant avant la filtration au coton ;
4. La filtration du surnageant a été effectué en premier avec un filtre (Syringe filters : UptiDisc™-RC 0,20 μm) ; mais par la suite on avait préféré utiliser le coton pré-rincé au DCM et séché au N_2 (Azote) (efficacité et pureté) ;
5. Une évaporation au N_2 (Azote), a été effectuée sur les extraits obtenus ;
6. Une solubilisation au DCM à $50\mu\text{L}$ et à $100\mu\text{L}$ en une seule fois sans passer par l'agitation ; puis à $90\mu\text{L}$ en trois reprises ont été effectuées, à chaque fois un ajout de $30\mu\text{L}$ de DCM, on agite manuellement et puis on passe à une agitation ultrasonique pendant une minute (Bandelin Sonopuls 20Khz (HF power : 20 W max) ; cette dernière technique a montré son efficacité ;
7. Le volume final des extraits a été ajusté en ajoutant du DCM avant injection au GC/MS ;
8. Injection au GC/MS ("Perkin Elmer precisely "(Clarus 680 Gas Chromatograph /600 C Mass Spectrometer (Tab.II.12) ;
9. Lecture et identification des chromatogrammes on se basant sur la banque de données NIST (Mass Spectra Data), par la comparaison des temps de rétention de leurs spectres UV (210 – 400 nm) avec ceux des standards commerciaux.

TABLE II.12 – Conditions des deux appareils lors de l'analyse

Chromatographie gazeuse :	Spectromètre de masse :
<p>Pour une colonne de 30 m, diamètre 250 μm, épaisseur de la phase stationnaire 0.25 μm</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gaz vecteur : Hélium ; • Débit colonne : 1 mL/min ; • Volume d'injection : 1 μL avec un split 1/10 ; • Température injecteur : 250°C ; • Durée totale de l'analyse : 39 min ; • Température du four (DB-5 MS UI (Agilent technologies) : 40°C pendant 1 min, 40°C à 320°C à 10°C/min, 320°C pendant 10 min. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ion mode : EI+ (Ionization Energy : 70eV) ; • Masse de départ : 45 uma ; • Masse de fin : 500 uma ; • Délai de solvant : de 0 à 5,41 min ; • Scan : de 5,41 à 39 min.

B. Manipulation finale

Lors de la manipulation finale, les conditions et la technique de l'expérience ont été celles optimisées durant les tests préliminaires. L'extraction a été faite sur une masse égale de pollen de chaque site : Alger urbain, Alger rural (traité et non traité à l'ozone), Djelfa urbain et Djelfa rural (traité et non traité à l'ozone en duplicate).

Le tableau ci-dessous résume le traitement d'exposition qu'a subi le pollen de notre étude.

TABLE II.13 – Durées et concentrations d'exposition à l'ozone du pollen du *Pinus halepensis* Mill.

pollen	Masse (mg)	Polluant	Durée d'exposition	Concentration
Alger urbain	100.00	/	/	/
Alger rural traité	100.00	O_3	16 heures	traité sans O_3 , 180, 500, 800, 1100, 1350ppb
Alger rural	100.00	/	/	/
Djelfa urbain	100.00	/	/	/
Djelfa rural traité	100.00	O_3	16 heures	traité sans O_3 , 180, 700, 1000, 1350ppb
Djelfa rural traité	100.00	/	/	/

II.4.4.5.2 Analyse en microscopie à balayage (MEB)

Cette partie d'analyse a été effectuée sur le pollen provenant d'Alger (rural et urbain); la prise des images a été réalisée sur nos échantillons sans traitement préalable (aucune pollution artificielle n'a été appliquée); ceci afin de voir s'il y a une différence entre le pollen rural et celui urbain.

II.4.4.5.3 Analyse aux TOF-SIMS

Notre pollen (échantillon biologique), est compatible avec l'ultravide a été analysé par cette technique. Le mode d'analyse utilisé est celui d'analyse par spectrométrie en visant par l'étude des spectres de masse la détection et l'identification moléculaire de surface :

des additifs, surfactants, contaminants des surfaces, ainsi la détermination de la nature des oxydes et complexes métalliques, l'évaluation des taux de transformation ou de dégradation. Les spectres constituent l'empreinte digitale de la surface et sont sensibles à de nombreux facteurs : la nature chimique, la composition, les phases physico-chimiques, le vieillissement, la cristallinité, l'oxydation etc. . .

Au début on avait procédé à l'analyse du pollen non broyé mais ce n'était pas possible du fait que notre pollen est de taille importante ($250 \mu\text{m}$), par rapport à la résolution de l'imagerie de cette technique ; un deuxième essai a été fait sur le pollen broyé (broyage manuel au mortier en porcelaine).

II.4.4.6 Analyse de la fertilité et la germination in vitro

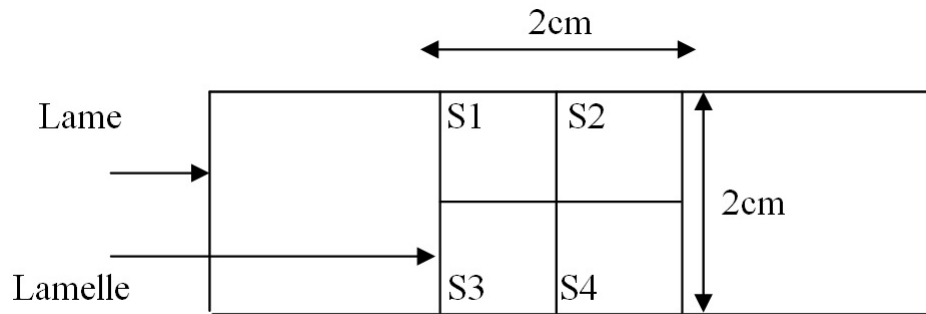
II.4.4.6.1 Pollen congelé

A. Test de fertilité

La fertilité est la capacité des pollens à germer et à féconder; celle-ci est testée par le réactif d'Alexander (1969). Pour cela quelques mg de pollen ont été mis au centre de la lame microscopique sur une goutte du réactif, ensuite on le recouvre par une lamelle et on passe à l'observation microscopique, le comptage et la prise des photos (Figure II.20).

A.1. Le calcul du taux de fertilité

Nous avons dénombré les grains de pollen fertiles et stériles comme suit :



Nombre des grains fertiles et stériles de chaque surface :

Additionner les grains de pollen fertiles et stériles des quatre surfaces afin de calculer le taux à partir de la formule suivante :

$$\text{Le taux de fertilité (\%)} = \frac{n}{N} \times 100$$

n : nombre de grains de pollen fertile ; **N** : nombre de grains de pollen total.

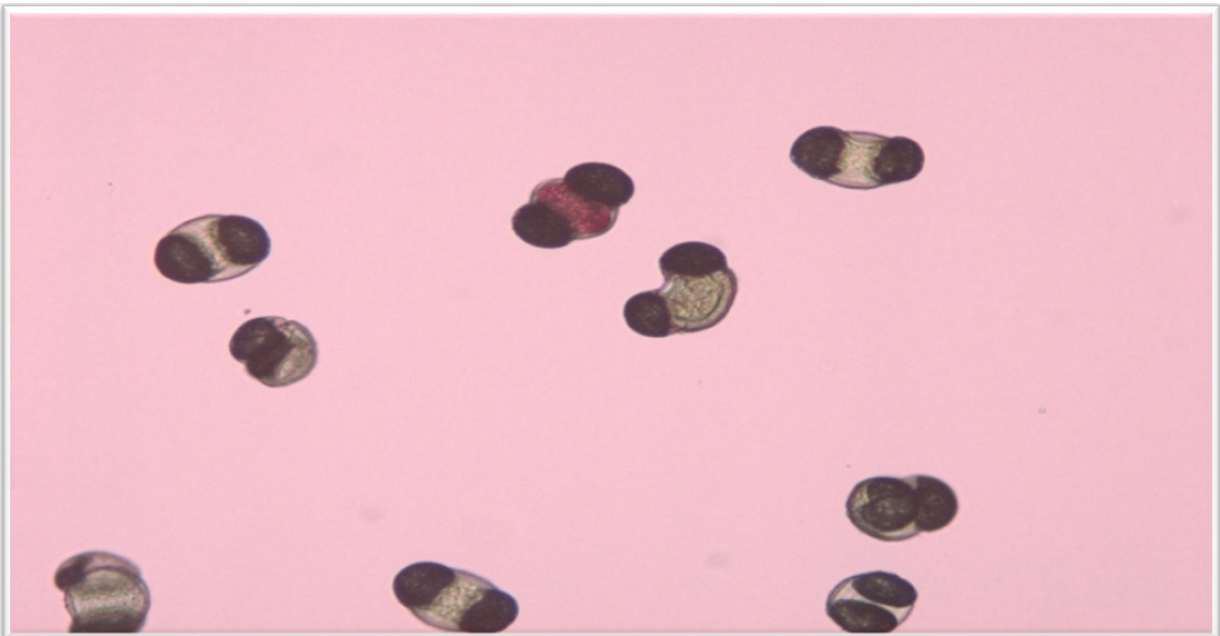


FIGURE II.20 – Test d'Alexander réalisé sur le pollen de *Pinus halepensis* Mill. (Pollen fertile : couleur rouge ; pollen stérile : couleur verte)

B. Test de germination in Vitro

Ce test est bien adapté dans l'évaluation de la fertilité du pollen de la majorité des espèces ; il est facile à réaliser et plus précis (Moody et Jett, 1990 in Colas et Mercier, 2000). Quelques inconvénients sont à citer pour ce type de méthode : la germination n'est pas toujours facile pour toutes les espèces ; une variabilité des milieux de culture selon les espèces ou encore, le taux de germination pourrait être moins de celui in vivo (Bots et Mariani, 2005) ; Ceci affirme le résultat de Foster et Bridgwater (1979) in Colas et Mercier (2000) qui confirment une valeur de germination in vitro bien supérieure à celle mesurée in vivo.

B.1. Préparation des milieux de culture

Un milieu M1 de pH=6,10 (10% saccharose + 200 mg/L H_3BO_3 + 200 mg/L $Ca(NO_3)_2$) a été préparé en s'inspirant du travail de Bao et *al.* (2009).

D'après le test préliminaire qu'on avait réalisé sur le pollen de notre espèce d'étude *Pinus halepensis* Mill. avec ce milieu et un autre milieu M2 (2g de PEG 4000 (Serva)+ 100mg/100ml H_3BO_3 + 300mg/100ml $CaCl_2$) de pH=5,9 ; à une température d'incubation de 27°C ; le milieu M1 a donné de bons résultats du taux de germination.

Ce même milieu de culture a été utilisé dans le test de germination in vitro réalisé sur le pollen lyophilisé.

C. Composition des milieux

C.1. Milieu N°1 (M1)

- 10% saccharose + 200 mg/L H_3BO_3 + 200 mg/L $Ca(NO_3)_2$.
- pH=6,10 ;
- Peser 5 g de saccharose ;
- Ajouter 10 ml de H_3BO_3 (200 mg/L) ;
- Ajouter 10 ml de $Ca(NO_3)_2$ (200 mg/L) ;
- Ajouter 4ml d'eau distillée progressivement (1ml par 1ml) en agitant le Becher ;
- Transvaser la solution préparée dans une éprouvette graduée et ajuster jusqu'à 50ml en ajoutant de l'eau distillée ;
- La préparation est prête à être utilisée ;
- La température de germination est de 27°C ;
- Mise en germination pour une durée de 24h à l'obscurité.

C.2. Milieu N°2 (M2)

- 2g de PEG 4000 (Serva)+ 100mg/100ml H_3BO_3 + 300mg/100ml $CaCl_2$
- pH=5,93 ;
- Peser 10g de PEG 4000 (Serva) ;
- Ajouter 5ml de H_3BO_3 (100mg/100ml) ;
- Ajouter 5ml de $CaCl_2$ (300mg/100ml) ;
- Ajouter 6ml d'eau distillée progressivement (1ml par 1ml) en agitant le Becher ;
- Transvaser la solution préparée dans une éprouvette graduée et ajuster jusqu'à 50ml en ajoutant de l'eau distillée ;
- La préparation est prête à être utilisée ;
- La température de germination est de 27°C ;
- Mise en germination pour une durée de 24h à l'obscurité.

II.4.4.6.2 Pollen lyophilisé

Une acclimatation progressive est recommandée dans le cas du pollen lyophilisé, du fait que ce dernier est très sensible aux variations brusques des conditions environnementales telles que : la température ; la teneur en eau et la pression osmotique (Mellerowicz, 1983 et Bajaj, 1987 in Colas et Mercier, 2000).

A. Acclimatation thermique

Notre pollen lyophilisé a été conservé à une température de -20°C et avant de l'exploiter dans les tests suivants (expositions aux gaz polluants et germination in vitro) à température ambiante de 20°C, on l'avait mis à +4°C pendant 16 heures.

B. Réhydratation

La réhydratation contrôlée de notre pollen lyophilisé était progressive ; comme elle a été appliquée sur le pollen non lyophilisé.

C. Mesure du pourcentage d'eau perdu

Une pesée des eppendorfs lors de la mise en culture a été faite afin de quantifier la quantité d'eau perdue au cours de la lyophilisation (Tab.II.14).

TABLE II.14 – Quantité d'eau perdue lors de la conservation du pollen lyophilisé

pollen	Avant lyophilisation (g)	Au moment de la culture (g)	Quantité d'eau perdue
Alger rural	1.788	1,760	0.028
Alger urbain	1.911	1,901	0.010
Djelfa rural	1.869	1,861	0.008
Djelfa urbain	1.788	1,742	0.046

D. Test de germination

Une mise en culture in vitro du pollen lyophilisé (quelques milligrammes) traité et non traité à l'ozone (O_3 = 150 et 1350 ppb pour des durées d'exposition de 4 et 16 heures), avait eu lieu en 6 répétitions dans le milieu M1 (10% saccharose + 200 mg/L H_3BO_3 + 200 mg/L $Ca(NO_3)_2$) et dans les mêmes conditions.

II.4.4.7 Analyse statistique

Les résultats obtenus lors de l'étude morphologique et l'étude de la fertilité et la germination du pollen de *Pinus halepensis* Mill. ont fait l'objet d'une analyse factorielle ANOVA ; une analyse de la variabilité et comparaison des moyennes. L'analyse statistique a été réalisée par le logiciel STATISTICA (version 6) et le logiciel SPSS.

Chapitre III

Résultats et discussion

III.1 Étude morphologique

III.1.1 Caractères quantitatifs

La figure ci-dessous représente les mesures réalisées sur les deux diamètres : polaire et équatorial des deux ballonnets du grain de pollen de *Pinus halepensis* Mill. ainsi que ceux du grain seul.

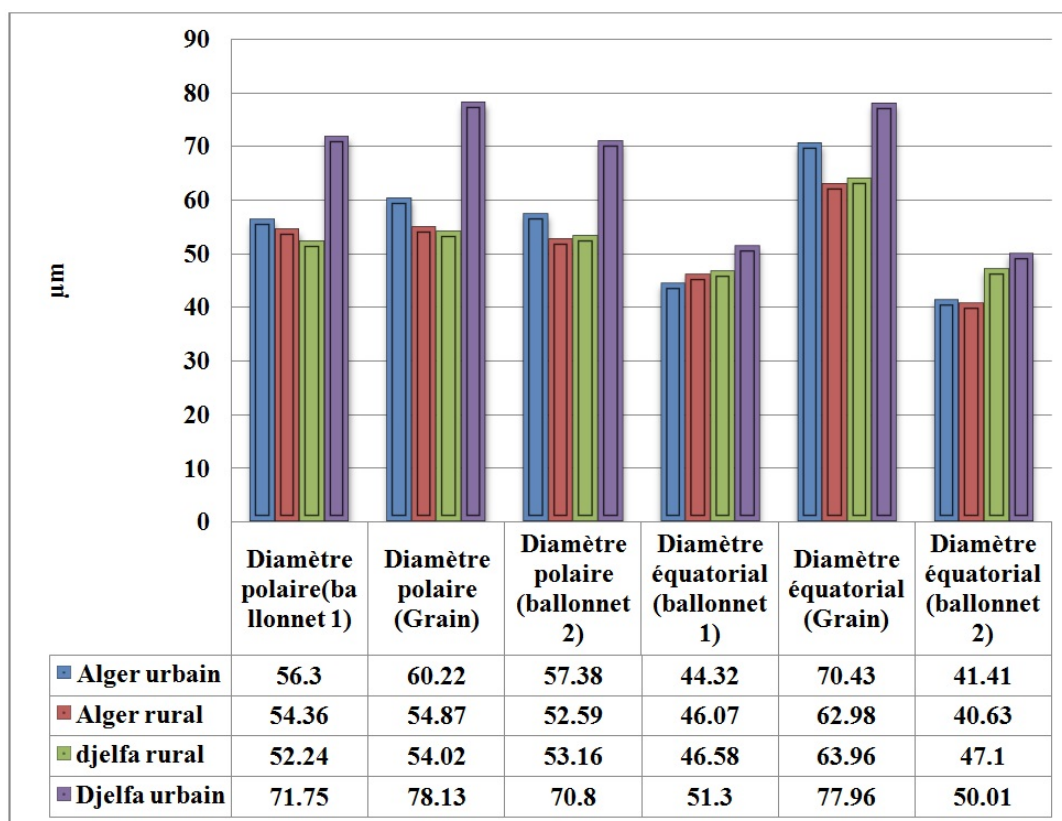


FIGURE III.21 – Diamètres polaires et équatoriaux des deux ballonnets et du grain seul des grains de pollen du *Pinus halepensis* Mill.

D’après cette figure, les moyennes les plus élevées des deux diamètres, que soit pour les deux ballonnets ou pour le grain seul, ont été engendrées par le pollen Djelfa urbain. Le pollen Djelfa rural a enregistré une moyenne minimale pour les diamètres polaires du ballonnet (DP1) et du grain seul (DP2). Le pollen Alger urbain, a engendré la moyenne minimale du diamètre équatorial du ballonnet DE1 ; celui d’Alger rural, a enregistré les valeurs minimales du diamètre polaire du ballonnet DP3 ; les deux diamètres équatoriaux du grain seul (DE2) et du ballonnet DE3.

L’analyse factorielle de l’effet « station » ou provenance sur la variabilité des caractères quantitatifs des grains de pollen de *Pinus halepensis* Mill. a été réalisée par l’analyse statistique ANOVA à un facteur. Les résultats de cette analyse montrent un effet hautement significatif sur les différents paramètres mesurés (Tab.III.15).

TABLE III.15 – Analyse de la variance à un facteur (ANOVA à un facteur) des mesures biométriques des grains de pollen de *Pinus halepensis* Mill.

	EFFET	SC	Degr. De Liberté	MC	F	P
DP1	Station	7099,	3	2366,	15,74	,000*
DP2	Station	113 E2	3	3778,	18,18	,000*
DP3	Station	6483,	3	2161,	14,49	,000*
DE1	Station	799,1	3	266,4	5,118	,002*
DE2	Station	4314,	3	1438,	12,73	,000*
DE3	Station	1840,	3	613,5	12,39	,000*

La variabilité des sites pour les caractères quantitatifs ou mesures biométriques réalisées sur les grains de pollen de *Pinus halepensis* Mill. est présentée dans le tableau (III.16) ; on constate en effet une homogénéité (signalée par le groupe 4) au niveau des sites : Alger rural ; Alger urbain et Djelfa rural marquée pour les mesures de : DP1 ; DP2 ; DP3 et DE1.

Une grande homogénéité est signalée pour le paramètre de DE2, le groupe 2 qui rassemble les sites de : Alger rural ; Djelfa rural et Djelfa urbain ; un deuxième groupe qui regroupe les sites de : Alger rural ; Alger urbain et Djelfa rural.

Pour le paramètre DE3 ; on constate qu'une homogénéité existe entre les sites rapprochés ceux de la forêt et de la ville d'Alger ou de Djelfa et une hétérogénéité est signalée entre les sites d'Alger et de Djelfa.

TABLE III.16 – Variabilité des mesures biométriques des grains de pollen de *Pinus halepensis* Mill.

Test de Duncan ; variable DP1 (analyse.sta) Probabilités Approximatives des Tests Post Hoc Erreur : MC Inter = 150,38, ddl = 116,00					Test de Duncan ; variable DE1 (analyse.sta)Probabilités Approximatives des Tests Post Hoc Erreur : MC Inter = 52,044, ddl = 116,00						
	Sta.	1	2	3	4		Sta.	1	2	3	4
1	AR		0,540243	0,504900	0,000057	1	AR		0,349116	0,785125	0,008203
2	AU	0,540243		0,230182	0,000106	2	AU	0,349116		0,256728	0,000565
3	DR	0,504900	0,230182		0,000046	3	DR	0,785125	0,256728		0,012844
4	DU	0,000057	0,000106	0,000046		4	DU	0,008203	0,000565	0,012844	
Test de Duncan ; variable DP2 (analyse.sta) Probabilités Approximatives des Tests Post Hoc Erreur : MC Inter = 207,78, ddl = 116,00					Test de Duncan ; variable DE2 (analyse.sta) Probabilités Approximatives des Tests Post Hoc Erreur : MC Inter = 113,00, ddl = 116,00						
	Sta.	1	2	3	4		Sta.	1	2	3	4
1	AR		0,153692	0,819173	0,000057	1	AR		0,010537	0,723363	0,000046
2	AU	0,153692		0,118475	0,000107	2	AU	0,010537		0,020165	0,007154
3	DR	0,819173	0,118475		0,000046	3	DR	0,723363	0,020165		0,000058
4	DU	0,000057	0,000107	0,000046		4	DU	0,000046	0,007154	0,000058	
Test de Duncan ; variable DP3 (analyse.sta) Probabilités Approximatives des Tests Post Hoc Erreur : MC Inter = 149,12, ddl = 116,00					Test de Duncan ; variable DE3 (analyse.sta) Probabilités Approximatives des Tests Post Hoc Erreur : MC Inter = 49,521, ddl = 116,00						
	Sta.	1	2	3	4		Sta.	1	2	3	4
1	AR		0,154500	0,857303	0,000046	1	AR		0,668472	0,000823	0,000047
2	AU	0,154500		0,182865	0,000143	2	AU	0,668472		0,002337	0,000065
3	DR	0,857303	0,182865		0,000057	3	DR	0,000823	0,002337		0,111731
4	DU	0,000046	0,000143	0,000057		4	DU	0,000047	0,000065	0,111731	

Il est à signaler qu'un ensemble de facteurs d'ordre extrinsèque (climat, ouverture du peuplement... etc) et intrinsèque liés aux individus (l'organisation génétique, effort reproductif... etc) seraient susceptibles de se conjuguer pour conférer à chaque site une particularité.

La variabilité biométrique des grains de pollen résulte essentiellement du type de leur genèse dans les anthères; pour les facteurs climatiques, notamment des températures variables ont une influence sur cette genèse (Pons, 1958) du fait de leur importance lors de toutes les réactions biochimiques déroulées dans le compartiment floral des différentes espèces.

Une relation entre la taille du pollen et le climat est prouvée par l'étude faite par Usinger (1980) in Naas (2006), il a observé une légère augmentation de la taille du pollen des espèces européennes de bouleaux en fonction de la latitude sud-nord et de l'altitude croissante, l'attribuant à des changements climatiques. Pour le facteur sol, la composition chimique et la texture du sol influent directement sur les réserves accumulées lors de l'anthèse (Pons, 1958).

III.1.2 Forme des grains de pollen

La caractérisation morphologique des grains de pollen se base notamment sur l'évaluation des deux diamètres polaire (DP) et équatorial (DE) (Agashe, 2009).

Le rapport existant entre les dimensions des deux axes définit la forme du grain de pollen (Pons, 1958 et Leroyer et Allenet, 2004).

TABLE III.17 – Détermination de la forme des grains de pollen du *Pinus halepensis* Mill.

Station	DP1	DE1	DP1/PE1	Forme	DP3	DE3	DP3/PE3	Forme	DP2	DE2	DP2/DE2	Forme
Alger urbain	56	44	> 1	Prolée	57	41	> 1	Prolée	60	70	< 1	Oblée
Alger rural	54	46	> 1	Prolée	53	41	> 1	Prolée	55	63	< 1	Oblée
Djelfa rural	52	47	> 1	Prolée	53	47	> 1	Prolée	54	64	< 1	Oblée
Djelfa urbain	72	51	> 1	Prolée	71	50	> 1	Prolée	78	78	> 1	Prolée

Les valeurs de ce rapport, que se soient pour le corps ou pour les deux ballonnets, indiquées dans le tableau III.17, montrent que la forme des deux ballonnets et pour l'ensemble des sites étudiés de type Prolé, c'est-à-dire ils sont plus longs que large ; ce qui présente une forme homogène.

Pour la forme du corps du grain de pollen, une homogénéité morphologique caractérise le pollen Alger urbain ; Alger rural et Djelfa rural, en présentant un aspect Oblé (DP ;DE) ; par contre, le pollen Djelfa urbain, est caractérisé par l'aspect Prolé.

L'étude de la matrice de corrélation, voir le tableau ci-dessous, montre des corrélations significatives entre les mesures biométriques réalisées sur les grains de pollen. Une corrélation significative positive entre : DP1-DE2 ; DP2 avec DE1,DE2 et DE3 ; et une corrélation significative négative entre DP3 et DE1.

TABLE III.18 – Corrélations des mesures biométriques réalisées.

	DP1	DP2	DP3	DE1	DE2	DE3
DP1	1.00					
DP2	0.90	1.00				
DP3	0.90	0.87	1.00			
DE1	0.09	0.03	-0.01	1.00		
DE2	0.03	0.04	0.08	0.32	1.00	
DE3	0.07	0.02	0.08	0.42	0.38	1.00

- Corrélations (analyse.sta)
- Corrélations significatives marquées à $p < ,05000$ (Brifaux, 1987)
- N=120 (Observations à VM ignorées)

III.2 Etude de la fertilité et la germination in vitro du pollen

III.2.1 Pollen conservé à 4°C

III.2.1.1 Fertilité des grains de pollen

La préparation microscopique que nous avons effectuée sur le pollen déshydraté et conservé au froid, en utilisant le réactif d'Alexander (1969), nous a permis d'obtenir une coloration qui estime le taux de fertilité en considérant les grains de pollen fertiles ceux bien colorés en rouge et ceux qui sont colorés en vert, comme stériles (Colas et Mercier, 2000)(Figure III.23).

L'observation de la figure 22, montre que le pollen rural à Alger a engendré le taux le plus faible de 48% des sites étudiés ; et pour celui urbain, la fertilité est d'un pourcentage important

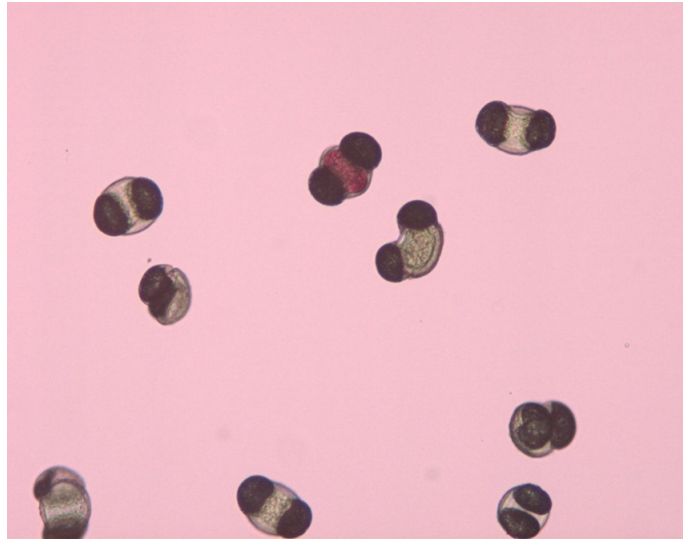


FIGURE III.22 – Pollen de *Pinus halepensis* Mill. : fertile coloré en rouge et pollen stérile coloré en vert (Gx 40).

55%. D'après cette lecture, il semble que la fertilité du pollen prélevé du site de forte pollution atmosphérique, n'a pas été affectée par ce paramètre. Ce site est pourtant considéré parmi les endroits les plus pollués à Alger ((Yassaa et *al.*, 2005 ; Ladjji et *al.*, 2007 ; 2009a ; 2009b ; 2010 et 2014).

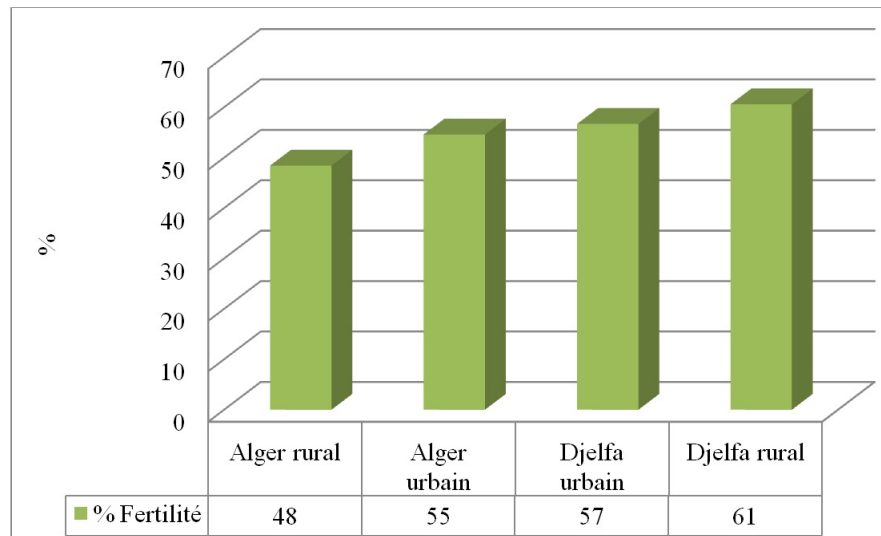


FIGURE III.23 – Taux de fertilité du pollen déshydraté de *Pinus halepensis* Mill.

Par contre, le pollen Djelfa rural, enregistre le taux le plus élevé en dépassant la valeur engendrée chez le pollen urbain prélevé d'un site de faible pollution atmosphérique. Il paraît que la fertilité du pollen a été affectée par la faible pollution atmosphérique présente dans cet endroit.

Au niveau de ce site on ne se dispose pas d'équipements de mesures ; mais d'après des observations, la région de Djelfa reste encore moins polluée par rapport aux grandes villes en Algérie.

Il faut rappeler ici que le test a été effectué sur un pollen déshydraté à 37°C pendant 4heures et conservé pendant un mois à 4°C. Les taux de fertilité que nous avons obtenus sont plus faibles que ceux enregistrés sur un pollen frais et pour les mêmes sites (entre 64 et 89%) (Kecir et Hadjari, 2011), ce qui montre l'abaissement de la fertilité du pollen après un mois de conservation. Les grains de pollen ont une résistance physique remarquable et ils sont biochimiquement inertes ; ce qui est due à la sporopollénine, le principal composant de l'exine (Pons, 1958 ; Reille et Pons, 1990 ; Jeanne, 1983 et Agashe, 2009) ; donc, et selon Wang (1975) in Colas et Mercier (2000), toute détérioration est d'ordre physiologique ; elle serait due à des lésions survenues durant la phase de dessiccation : ce qui peut expliquer notre résultat. La qualité du pollen est également affectée par les conditions de la conservation, tels que : le mode de déshydratation ; le type de contenant utilisé ; la température de conservation ; le mode d'acclimatation du pollen après la conservation et le mode de réhydratation après la conservation (Bajaj, 1987 in Colas et Mercier, 2000 et Agashe, 2009).

L'étude de l'effet station ou provenance sur la fertilité des grains de pollen de *Pinus halepensis* Mill. a été faite par l'analyse statistique ANOVA à un facteur. Les résultats obtenus ont montré un effet très significatif (voir tableau ci-dessous).

TABLE III.19 – Analyse de la variance à un facteur de la fertilité du pollen de *Pinus halepensis* Mill.

EFFET	SC	Degr. De Liberté	MC	F	P
Station	386.7	3	128.9	11.44	,000*

L'analyse de la variabilité de ce paramètre pour l'ensemble des sites de l'étude a révélé une homogénéité entre les sites de : Alger urbain ; Djelfa rural et Djelfa urbain, en formant le groupe 1 dit homogène ; une homogénéité est signalée pour les deux sites ruraux d'Alger et de Djelfa (groupe 2) ; et d'autre part entre le site rural et le site urbain d'Alger (groupe 3) (Tab.III.20)

TABLE III.20 – Variabilité de la fertilité du pollen de *Pinus halepensis* Mill.

STA	1	2	3	4
AR		0,010508	0,000113	0,001813
AU	0,010508		0,015825	0,338841
DR	0,000113	0,015825		0,085459
DU	0,001813	0,338841	0,085459	

- Test de Duncan ; variable fertilité (Fertilité.sta)
- Probabilités Approximatives des Tests Post Hoc
- Erreur : MC Inter = 11,270, ddl = 16,000

III.2.1.2 Germination in vitro des grains de pollen

III.2.1.2.1 Résultats

Dans la mise au point de la durée de réhydratation et d'incubation idéale, pour obtenir un taux de germination de pollen important; la réhydratation pendant 16heures et l'incubation pendant 24heures, ont été choisies pour notre protocole. (le choix est justifié dans la partie matériel et méthodes).

III.2.1.2.2 Germination du pollen de *Pinus halepensis* Mill. avec et sans ozonolyse

Les résultats représentés dans la figure ci-dessous, montrent que l'ozonolyse prolongée à faible concentration affecte négativement la germination du pollen Alger rural en enregistrant le taux le plus faible.

Le pollen Alger urbain non traité enregistre une valeur maximale, et celui de Djelfa rural non traité enregistre un taux moyen.

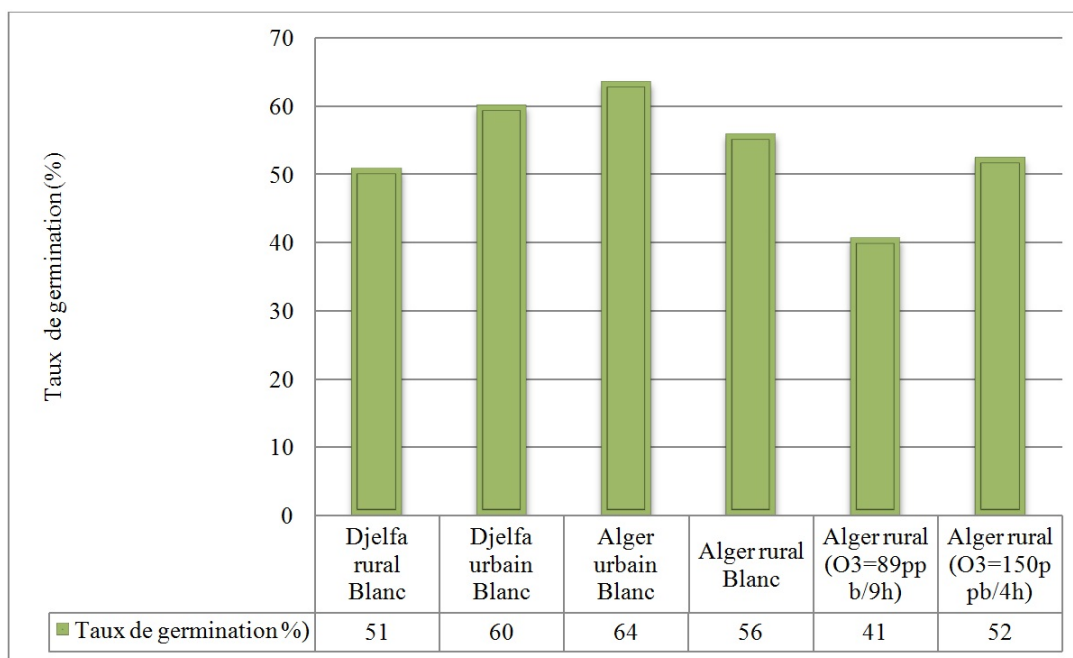


FIGURE III.24 – Taux de germination du pollen de *Pinus halepensis* Mill. (avant et après exposition à l'Ozone).

III.2.1.2.3 Germination du pollen Alger rural après exposition à l'O₃ et à l'air sec

Dans notre travail sur la mesure de la bio-indication du pollen de *Pinus halepensis* Mill., nous avons pris le paramètre du taux de germination comme paramètre de mesure.

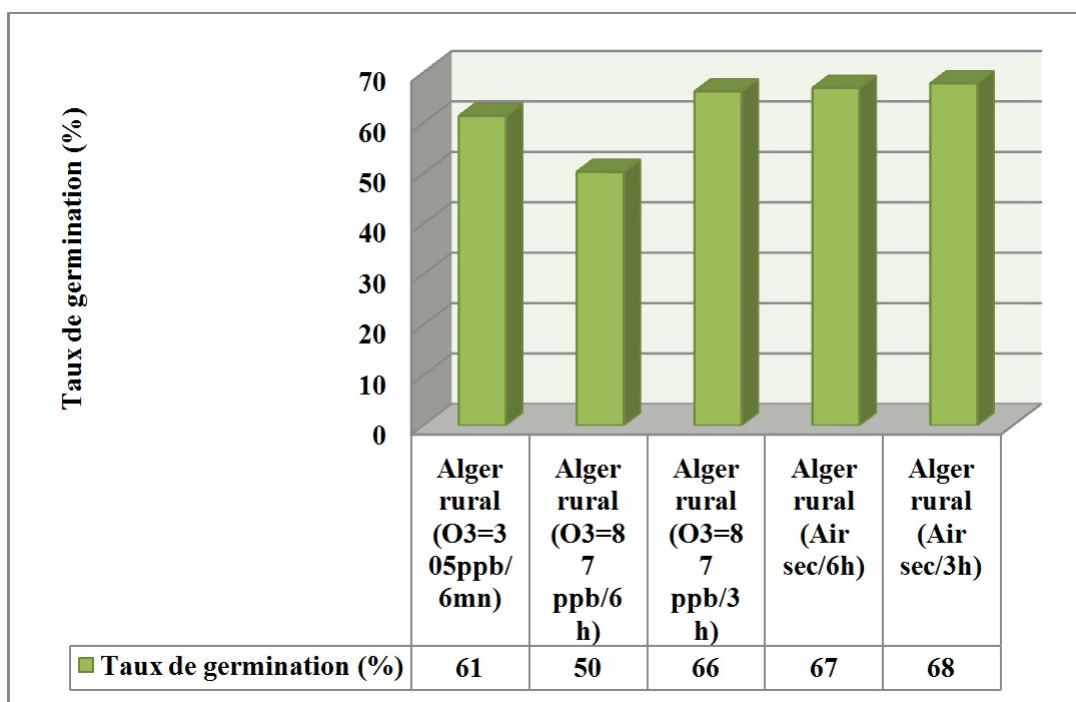


FIGURE III.25 – Taux de germination du pollen Alger rural de *Pinus halepensis* Mill. (avant et après exposition à l'Ozone et à l'air sec).

L'analyse de la figure (III.25) montre qu'une exposition à l'ozone et à forte concentration pendant une courte durée (6mn), n'a pas affectée significativement le pouvoir germinatif du pollen de *Pinus halepensis* Mill. Par contre, une exposition prolongée (6heures) au même gaz et à une concentration faible (87ppb), diminue significativement le taux de germination. Cette même faible concentration et à mi-durée (3heures) ne semble pas affecter le taux de germination (66%) (Figure III.26; III.27; III.28; III.29; III.30; III.31; III.32; III.33 et III.34).

L'exposition à l'air sec à des durées courtes et prolongées, semble être sans effet négatif sur le pouvoir germinatif des grains de pollen.

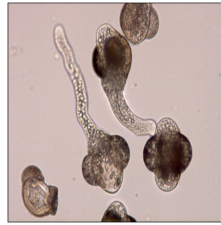


FIGURE III.26 – Pollen de pin germé observé au microscope optique après 24 heures d'incubation (Alger rural) (3 heures d'exposition à l'air) (Gx60).

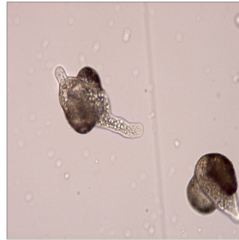


FIGURE III.27 – Pollen de pin germé observé au microscope optique après 24 heures d'incubation (Alger rural) (traité à O_3 :302ppb/5 mn) (Gx60).



FIGURE III.28 – Pollen de pin germé observé au microscope optique après 24 heures d'incubation (Alger rural) (6 heures d'exposition à l'air) (Gx60).

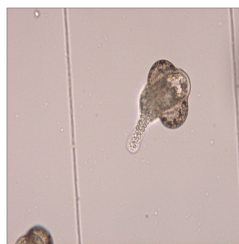


FIGURE III.29 – Pollen de pin germé observé au microscope optique après 24 heures d'incubation (Alger rural) (traité à O_3 :87ppb/6h) (Gx60).

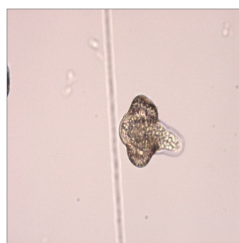


FIGURE III.30 – Pollen de pin germé observé au microscope optique après 24 heures d'incubation (Alger rural) (traité à O_3 :87ppb/3h)(Gx60).

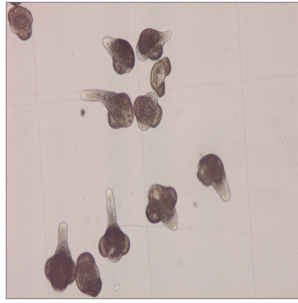


FIGURE III.31 – Pollen de pin non traité observé au microscope optique après 24 heures d'incubation (Alger rural) germé (Gx40).

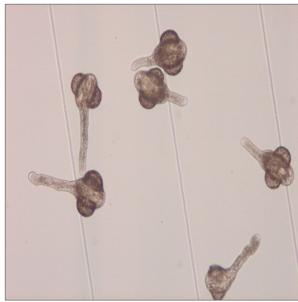


FIGURE III.32 – Pollen de pin non traité observé au microscope optique après 24 heures d'incubation (Alger urbain) germé (Gx40).

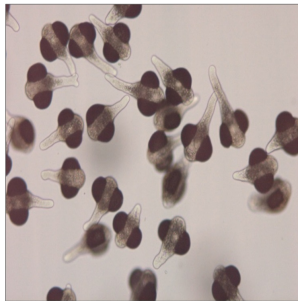


FIGURE III.33 – Pollen de pin non traité observé au microscope optique après 24 heures d'incubation (Djelfa urbain) germé (Gx40).

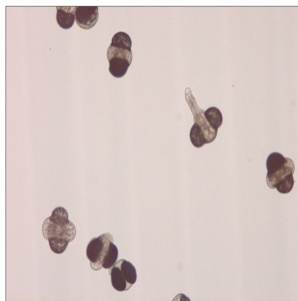


FIGURE III.34 – Pollen de pin non traité observé au microscope optique après 24 heures d'incubation (Djelfa rural) germé (Gx40).

III.2.1.2.4 Evolution du taux de germination en fonction de l'ozonolyse

Afin d'étudier l'effet de l'ozone sur la fertilité du pollen de *Pinus halepensis* Mil. Notre intérêt a été porté sur la mesure du taux de germination sur un pollen exposé à l'ozone à une concentration de 150ppb pendant 4 heures ; ce dernier a été remis en congélation juste après le traitement en O_3 ; la mise en culture a eu lieu à différentes durées après l'ozonolyse de 2 ; 9 et 15 jours. Par cette mesure, il était possible de suivre l'évolution de la germination en fonction du contact du pollen avec l'ozone.

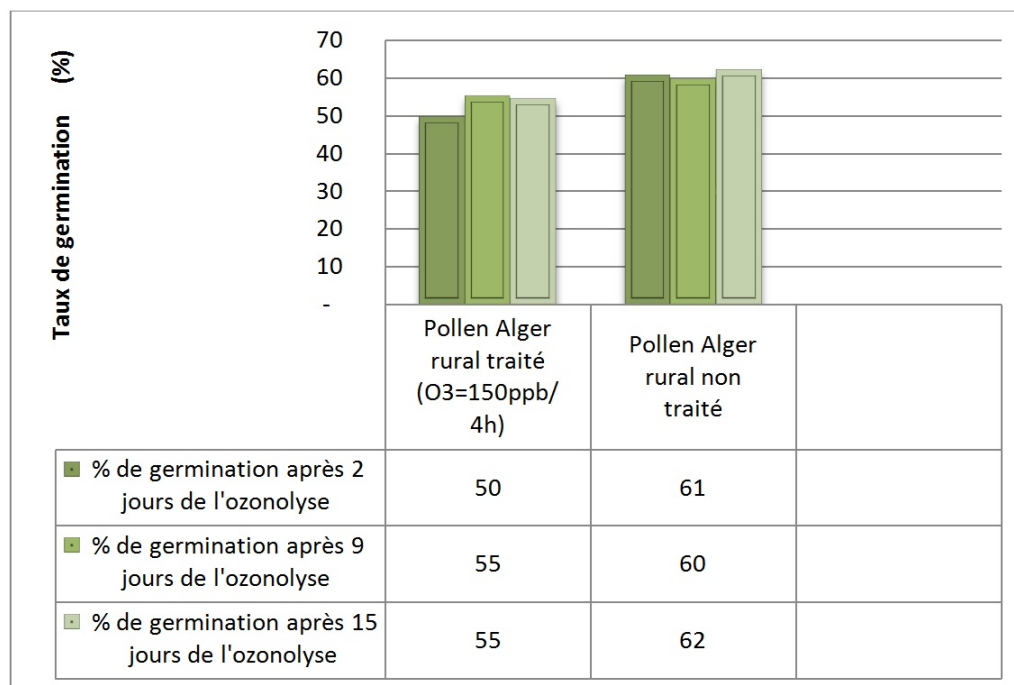


FIGURE III.35 – Evolution du taux de germination du pollen de *Pinus halepensis* Mill. Traité avec de l'ozone

La figure ci-dessus montre que le pollen rural non traité marque une stabilité de sa fertilité ; une légère augmentation (de 1%) a eu lieu après 15 jours de la première mise en culture ; mais les valeurs restent quand même très proches 61 ; 60 et 62%. Pour les mêmes conditions de mise en culture, le pollen rural de la même provenance, traité à l'ozone a engendré une valeur faible de 50% ; ensuite une augmentation a eu lieu après 9 jours ; ensuite notre pollen traité a gardé le même taux de germination après 15 jours du traitement à l'ozone ; D'après les valeurs enregistrées pour ce pollen, le fait que les grains de pollen de notre espèce traités ont été remis en congélation et puis mis en culture, a favorisé leur germination. Le taux de germination entre les deux types de pollen est différent, le traitement en ozone à une concentration de 150ppb pendant 4 heures, a affecté négativement le pouvoir germinatif du pollen rural.

III.2.2 Pollen lyophilisé

Sur le pollen lyophilisé, une mise en culture in vitro a été réalisée dans les mêmes conditions de réhydratation et d'incubation ; une acclimatation a été appliquée afin d'assurer tous les paramètres de culture.

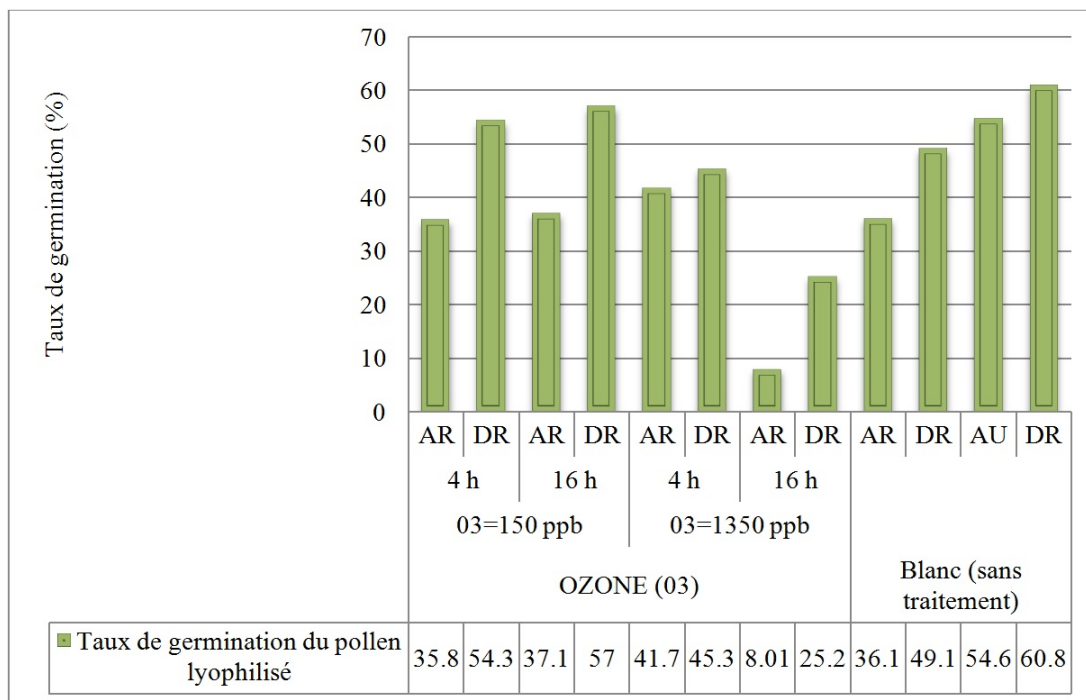


FIGURE III.36 – Taux de germination du pollen lyophilisé de *Pinus halepensis* Mill. (avant et après exposition à l’Ozone à différentes durées et concentrations)

D’après la figure ci-dessus, le taux de germination pour le pollen lyophilisé non traité à l’ozone et par rapport à celui conservé à 4°C, le pollen rural pour les deux sites d’étude a enregistré une diminution du pourcentage de germination (Alger rural : 36.11% par rapport à 56%) (Djelfa rural : 49.11 par rapport à 51%). Pareil pour le pollen Alger urbain : 54.67% par rapport à 64% ; Ce résultat pourrait être expliqué par l’état d’hydratation du pollen conservé qui a perdu une partie de ses réserves en eau lors de la lyophilisation (Tab.III.21 et III.22).

Par contre le pollen Djelfa urbain enregistre un taux constant de germination (60% par rapport à 60.84%), ce pollen lyophilisé a gardé sa fertilité ; ce qui pourrait être expliqué par la faible quantité d’eau perdue lors de sa lyophilisation (0.008g).

TABLE III.21 – Quantité d'eau perdue lors de la lyophilisation

Pollen lyophilisé (sans traitement)	Quantité d'eau perdue (g)
Alger rural	0.028
Alger urbain	0.010
Djelfa rural	0.046
Djelfa urbain	0.008

TABLE III.22 – Taux de germination du pollen non traité avant et après lyophilisation

Pollen (sans traitement)	Non lyophilisé (%)	lyophilisé (%)
Alger rural	56.00	36.11
Alger urbain	64.00	54.67
Djelfa rural	51.00	49.11
Djelfa urbain	60.48	60.00

Une analyse statistique détaillée a été réalisée sur les résultats obtenus pour cette partie de notre travail. L'objectif visé par cette analyse est de faire ressortir l'effet de : station ; la durée du traitement et la concentration du polluant. Pour le pollen lyophilisé non traité à l'ozone provenant des différentes stations de l'étude ; la comparaison entre les stations faite par l'analyse factorielle ANOVA a permis de conclure qu'il y a une différence significative entre les stations.

D'après les tableaux, celui des comparaisons multiples et celui d'ANOVA, ci-dessous, on constate une différence significative entre les stations suivantes : Alger Urbain et Alger rural avec $p=0.000 < 0,05$; entre Djelfa urbain et Alger rural avec $p=0.000 < 0,05$ et entre Alger rural et Djelfa rural avec $p=0.001 < 0,05$.

TABLE III.23 – Analyse de la variance à un facteur.

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Intergroupes	3883.533	3	1294.511	8.659	.000
Intragroupes	17341.267	116	149.494		
Total	21224.800	119			

- Le facteur de station $p=0.000 < 0,05$

TABLE III.24 – Comparaisons multiples du taux de germination du pollen non traité à l’ozone

	(I) Sta.	(J) Sta.	Différence moyenne (I-J)	Erreur Standard	Sig.	Intervalle de confiance à 95 %	
						Borne inférieure	Borne Supérieure
LSD	Sta. AU	Sta. DU	-2.63333-	3.15694	.406	-8.8860-	3.6194
		Sta. AR	12.36667*	3.15694	.000	6.1140	18.6194
		Sta. DR	2.00000	3.15694	.528	-4.2527-	8.2527
	Sta. DU	Sta. AU	2.63333	3.15694	.406	-3.6194-	8.8860
		Sta. AR	15.00000*	3.15694	.000	8.7473	21.2527
		Sta. DR	4.63333	3.15694	.145	-1.6194-	10.8860
	Sta. AR	Sta. AU	-12.36667-*	3.15694	.000	-18.6194-	-6.1140-
		Sta. DU	-15.00000-*	3.15694	.000	-21.2527-	-8.7473-
		Sta. DR	-10.36667-*	3.15694	.001	-16.6194-	-4.1140-
	Sta. DR	Sta. AU	-2.00000-	3.15694	.528	-8.2527-	4.2527
		Sta. DU	-4.63333-	3.15694	.145	-10.8860-	1.6194
		Sta. AR	10.36667*	3.15694	.001	4.1140	16.6194

- La différence moyenne est significative au niveau 0.05.

L’exposition à l’ozone a été appliquée sur le pollen rural des deux sites d’étude pour deux concentrations égales à 150 et 1350 ppb pour deux durées d’exposition de 4 et 16 heures; les résultats représentés dans la figure (III.36), ainsi que le tableau (III.25), montrent que pour le pollen Alger rural une diminution du taux de germination a eu lieu pour la concentration 150 ppb pendant 4 heures sur un pollen lyophilisé 35.85%; pour la même concentration d’ozone et la même durée d’exposition, le pollen non lyophilisé a enregistré un taux plus élevé 52% (Figure III.24).

D’après la lecture des résultats (Figure III.37), le pollen Alger rural et pour la concentration d’ozone de 150ppb, une exposition prolongée de 16 heures favorise la germination de ce dernier; par contre l’exposition prolongée (16h) à une forte concentration en ozone de 1350ppb est néfaste pour sa germination; la durée de 4 heures paraît plus favorable même à la concentration faible de l’ozone 150ppb avec un taux de germination de 41.74%.

Le même comportement vis-à-vis la concentration et la durée du traitement a été observé pour le pollen Djelfa rural, sauf que la concentration en ozone de 150ppb et pour les deux durées d'exposition sont favorables pour la germination de ce pollen.

Le taux de germination du pollen lyophilisé Djelfa rural traité à l'ozone, a été bien supérieur à celui d'Alger rural.

TABLE III.25 – Taux de germination du pollen rural lyophilisé traité à l'ozone

Pollen traité	Alger rural (%)	Djelfa rural (%)
150ppb/4h	35.85	54.35
150ppb/16h	37.10	57.00
1350ppb/4h	41.74	45.34
1350ppb/16h	8.01	25.27

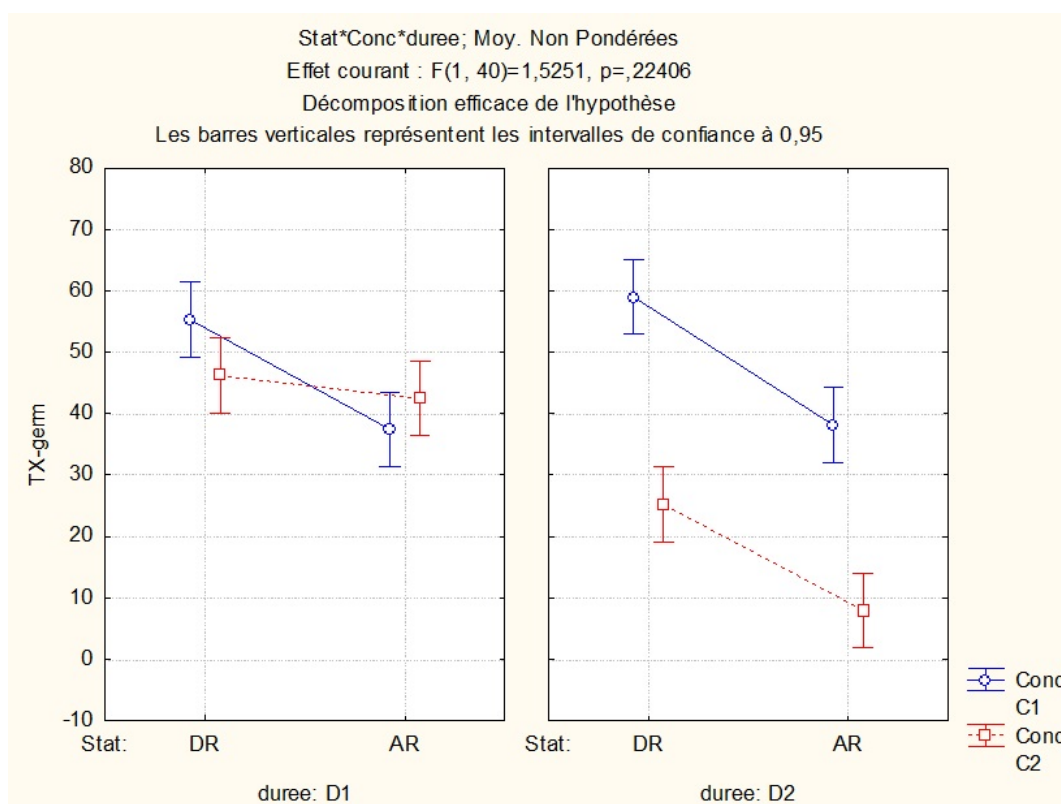


FIGURE III.37 – Comparaison faite sur l'effet « station » ; « durée de traitement » et « concentration du polluant » sur le taux de germination du pollen de *Pinus halepensis* Mill.

Sur le pollen pollué provenant d'Alger rural, la comparaison appariée des moyennes montre une différence significative entre les mesures répétées des deux durées de traitement : 4 heures et 16 heures pour la concentration de polluant (ozone) de 150 ppb.

Pour cette série de mesures, l'analyse statistique nous laisse conclure que le taux de germination des deux séries de mesures pour la station Alger rural diffère significativement avec un seuil de signification $p=0.016 < 0,05$ (risque d'erreur) de 5 % (voir tableau ci-dessous).

TABLE III.26 – Tests des contrastes intra sujets pour la station Alger Rural (pollen lyophilisé et pollué à l'ozone à 150ppb) comparaison entre 4h et 16h

Source	Germ AR	Somme des carrés de type III	ddl	Carré moyen	F	Sig.	Eta-carré partiel
Germ AR	Linéaire	114.817	1	114.817	6.546	.016	.184
Erreur (germ AR)	Linéaire	508.683	29	17.541			

TABLE III.27 – Tests des contrastes intra sujets Djelfa rural (pollen lyophilisé et pollué à l'ozone à 150ppb) comparaison entre 4h et 16h

Source	Germ DR	Somme des carrés de type III	ddl	Carré moyen	F	Sign.	Eta-carré partiel
Germ DR	Linéaire	13.067	1	13.067	.190	.666	.007
Erreur (germ DR)	Linéaire	1995.933	29	68.825			

D'après le tableau ci-dessus aucune différence significative ($p=0.666 > 0,05$) à signaler entre les mesures répétées du taux de germination du pollen provenant de la forêt de Djelfa pour les durées d'exposition à l'ozone à 150 ppb de 4 et 16 heures.

TABLE III.28 – Tests des contrastes intra sujets Djelfa rural (pollen lyophilisé et pollué à l’ozone à 1350ppb) comparaison entre 4 et 16 heures

Source	Germ DR	Somme des carrés de type III	ddl	Carré moyen	F	Sign.	Eta-carré partiel
Germ DR	Linéaire	6000.000	1	6000.000	7.653E+17	.000	
Erreur (germ DR)	Linéaire	2.274E-13	29	7.840E-15			

D’après le tableau ci-dessus, l’étude comparative entre les deux durées d’exposition de 4 et 16 heures au polluant pour la même concentration en ozone (1350 ppb), montre que le taux de germination des deux séries de mesures diffère significativement avec un seuil de signification $p=0.000 < 0,05$ (risque d’erreur) de 5 %.

TABLE III.29 – Tests des contrastes intra sujets Alger rural (pollen lyophilisé et pollué à l’ozone pendant 4 heures) comparaison entre les concentrations de 150 et 1350 ppb.

Source	Germ AR	Somme des carrés de type III	ddl	Carré moyen	F	Sign.	Eta-carré partiel
Germ AR	Linéaire	52.267	1	52.267	2.694	.112	.085
Erreur (germ AR)	Linéaire	562.733	29	19.405			

Les résultats présentés dans le tableau ci-dessus montrent qu’il n’y a pas de différence significative entre les mesures répétées pour les deux concentrations en polluant avec un seuil de signification $p=0.112 > 0,05$

TABLE III.30 – Tests des contrastes intra sujets Alger rural (pollen lyophilisé et pollué à l’ozone pendant 16heures) comparaison entre les concentrations de 150 et 1350 ppb.

Source	Germ AR	Somme des carrés de type III	ddl	Carré moyen	F	Sign.	Eta-carré partiel
Germ AR	Linéaire	5472.150	1	5472.150	1581.389	.000	.982
Erreur (germ AR)	Linéaire	100.350	29	3.460			

La comparaison faite entre les deux concentrations de polluant utilisées lors des expositions du pollen de *Pinus halepensis* Mill. fait sortir une différence significative entre les mesures répétées (150 et 1350 ppb), avec un seuil de signification $p=0.000 < 0,05$ (voir tableau III.30).

TABLE III.31 – Tests des contrastes intra sujets Djelfa rural (pollen lyophilisé et pollué à l’ozone pendant 16 heures) comparaison entre les concentrations de 150 et 1350 ppb.

Source	Germ DR	Somme des carrés de type III	ddl	Carré moyen	F	Sign.	Eta-carré partiel
Germ DR	Linéaire	6427.350	1	6427.350	107.052	.000	
Erreur (germ DR)	Linéaire	1741.150	29	60.040			

La comparaison faite entre les deux concentrations en polluant, sur le taux de germination du pollen exposé à l’ozone montre une différence significative entre les mesures répétées de 150 et 1350 ppb, avec un seuil de signification $p=0.000 < 0,05$ (Tab.III.34).

D’après le tableau ci-dessous, l’étude corrélative des facteurs « station » ; « durée du traitement » ; « concentration du polluant » et « taux de germination », montre une corrélation significative entre facteur « station » avec les deux autres facteurs étudiés : durée du traitement- concentration du polluant. Une corrélation est marquée entre le facteur « durée du traitement » et le facteur « concentration du polluant ».

TABLE III.32 – Étude corrélative des facteurs : station - durée du traitement- concentration du polluant et taux de germination du pollen de *Pinus halepensis* Mill.

	Sta.	Conc	durée	TX-germ
Sta.	1,00			
Conc	0,00	1,00		
durée	0,00	-0,00	1,00	-
TX-germ	-0,44	-0,51	-0,38	1,00

- Corrélations (analyse25.sta)
- Corrélations significatives marquées à $p < ,05000$
- N=48 (Observations à VM ignorées)

III.2.3 Discussion

L'étude de la fertilité et de la germination du pollen est considérée comme un paramètre fiable de mesure de la bio-indication des végétaux supérieurs. Ceci a été prouvé par les travaux de Chichiricco et Picozzi (2007), sur le pollen de *Crocus vernussub* sp. *vernus* (*Iridaceae*) et les polluants suivants : O_3 , NO_2 et CO avec les concentrations suivantes respectivement : 0,3 ppm, 0,2ppm, et 0,5ppm pendant une durée de 2 heures.

Gottardini et al. (2008) sur deux espèces *Corylus avellana* L. (*Bétulacées*) et *Pinus nigra* L. (conifères); ont montré que la fertilité, la germination, ainsi la croissance du tube pollinique ont été négativement et significativement affectés par les polluants étudiés NO_2 ; SO_2 ; O_3 et NO_x . Cela confirme la conclusion d'Iannotti et al. (2000) qui avaient étudiés un tel paramètre sur le pollen de *Hedera helix* L., *Convolvulus sepium* L., *Cynodondactylon*(L.) Pers., *Quercus ilex* L., *Dactylis glomerata* L., *Parietaria diffusa* M. et K., *Daucus carota* L. et *Tilia cordata* Miller.

Roshchina et Mel'nikova (2001), confirment que l'ozone influe directement par oxydation sur les constituants de la paroi du grain de pollen; il change aussi la composition et la structure chimique des pigments du pollen; comme il affecte son taux de germination. A faible concentration, les peroxydes n'ont aucun effet néfaste sur la surface du pollen, mais ils stimulent la germination. Fréquemment, ils ont un effet réversible sur l'état redox des constituants de la paroi du pollen.

Il est à noter que nos tests de germination *in vitro*, sont déroulés selon des conditions préconisées par un nombre d'auteurs, telles : une température d'incubation voisine de 25°C, elle est égale à 27°C (Klaehn et Neu, 1960; Stanley et Linskens, 1974 et Shivanna et Johri, 1985 in Colas et Mercier, 2000 et Agashe, 2009); l'obscurité (Shivanna et Johri, 1985 in Colas et Mercier, 2000 et Agashe, 2009); un pH voisin de 6 (Shivanna et Johri, 1985 in Colas et Mercier, 2000 et Agashe, 2009), et la densité importante du pollen sur le milieu de culture (Brewbaker et Kwack, 1963 in Colas et Mercier, 2000).

La variabilité de nos résultats de germination peut être liée aux différentes étapes subies par notre échantillon après avoir été traité et conservé (Polito et Luza in Colas et Mercier, 2000). Par ailleurs, la corrélation entre la durée d'exposition du pollen rural du *Pinus halepensis* Mill. et la concentration de l'ozone utilisée, a été visible. A chaque test, une exposition prolongée à une faible concentration d'ozone, affecte significativement la fertilité des grains de pollen; ce qui peut être expliqué par l'effet accumulateur de l'ozone sur la fertilité du pollen du *Pinus halepensis* Mill.. ce résultat, a été vérifié en mesurant l'évolution de la germination en fonction du contact des grains de pollen avec l'ozone. Le taux de germination entre les deux types de pollen (traité et non traité) est différent; le traitement à l'ozone à une concentration de 150ppb pendant 4 heures a affecté

négativement le pouvoir germinatif du pollen rural ce qui confirme les résultats sus-cités. Par contre, une remise en conservation à 4 °C du pollen rural traité à l'ozone a favorisé sa germination. L'effet de l'air sec sur la fertilité du pollen a été testé ; il n'a aucun effet à signaler, par contre, dans son effet combiné avec une exposition à l' O_3 ; l'espèce *Pinus halepensis* Mill. engendre une réduction de sa capacité de fixer le CO_2 (Wellburn et al., 1996), ce qui favorise une perturbation d'ordre physiologique vu le rôle majeur que joue le CO_2 dans les réactions de la photosynthèse.

Il est à noter que la valeur du taux de germination initial est peu importante mais elle doit tout de même être supérieure à 60% (Colas et Mercier, 1994). Pour l'influence des paramètres climatiques sur le taux de fertilité : On peut dire que chaque peuplement forestier a une composition génétique unique dans son genre, car il est le résultat d'adaptation à une série de conditions environnementales propres à son emplacement. Ce fait s'applique notamment aux essences forestières présentes dans des environnements hétérogènes.

L'espèce de notre étude, *Pinus halepensis* Mill. s'accommode d'une température moyenne du mois le plus froid (Janvier) comprise entre 2,8 et 7,7°C (Kadik, 1987), comme il supporte des froids exceptionnels de (-15°C) à (-18°C) (Bedel, 1986) ; des pluviosités allant de 250 mm à 800 mm/an et plus lui sont favorables (Kadik, 1983). En Algérie *Pinus halepensis* Mill. offre son meilleur développement sur le littoral entre 2°C et 5°C ; sur les massifs de l'Atlas Saharien elle se développe entre - 0.1 et + 2°C.

III.3 Mesure du pH

La mesure de l'acidification de la surface des grains de pollen semble être un paramètre fiable dans la mesure de la bio-indication du pollen.

Dans le tableau ci-dessous, il est clair que l'effet de l'exposition à l'ozone n'a pas affecté le pH du pollen Alger rural : 6,2 après exposition contre 6,1 avant exposition. Ce dernier comparé au pollen Alger urbain, ne présente qu'une différence moyenne. Par contre, la différence en valeur de ce paramètre est assez importante entre le pollen Djelfa urbain avec 6,3 et celui Djelfa rural avec 5 ; ce dernier est clairement le plus 'acide'.

TABLE III.33 – Mesure du pH des grains de pollen de *Pinus halepensis* Mill. étudiés

Pollen	pH après 24 heures
Blanc (eau distillée)	7,3
Alger rural Blanc	6,1
Alger rural ($O_3=89\text{ppb}$ pendant 9h)	6,2
Alger urbain Blanc	5,6
Djelfa urbain Blanc	6,3
Djelfa rural Blanc	5,0

Le pollen Alger urbain marque une tendance acide sous l'effet de la pollution atmosphérique, par contre, chez le pollen Djelfa urbain une augmentation du pH, la plus élevée des mesures, a été enregistrée. Ceci peut être accordé à un autre facteur que celui de la pollution atmosphérique ou celui de la présence de l'ozone.

Dans l'étude de l'effet de l'ozone sur le pollen, Roshchina et Mel'nikova (2001), confirment son influence directe par oxydation sur les constituants de la paroi du grain de pollen.

La mesure du pH des grains de pollen peut nous renseigner sur le degré de sensibilité de la surface de la paroi externe du grain de pollen soumis à une atmosphère polluée ou chargée de polluants de différentes natures. Des travaux ont été entrepris sur ce sujet ; un effet néfaste a été signalé par Hughes et Cox (1993) in Colas et Mercier (2000), sur la germination du pollen des deux espèces : *Betula papyrifera* et *Betula cordifolia*, présents dans des endroits où une acidité à un niveau élevé caractérise le brouillard.

III.4 Dosage des protéines hydrosolubles du pollen de *Pinus halepensis* Mill.

III.4.1 Résultats

III.4.1.1 Résultats préliminaires

La figure ci-dessous montre une concentration de 1960 $\mu\text{g/ml}$ de protéines hydrosolubles chez le pollen Alger rural non exposé à l' O_3 contre une concentration plus élevée de 2678 $\mu\text{g/ml}$ chez le même pollen exposé.

Une forte concentration a été également mesurée sur le pollen Alger urbain par rapport au pollen Alger rural, ce qui rajoute l'effet de la pollution atmosphérique sur la structure biochimique du pollen anémophile.

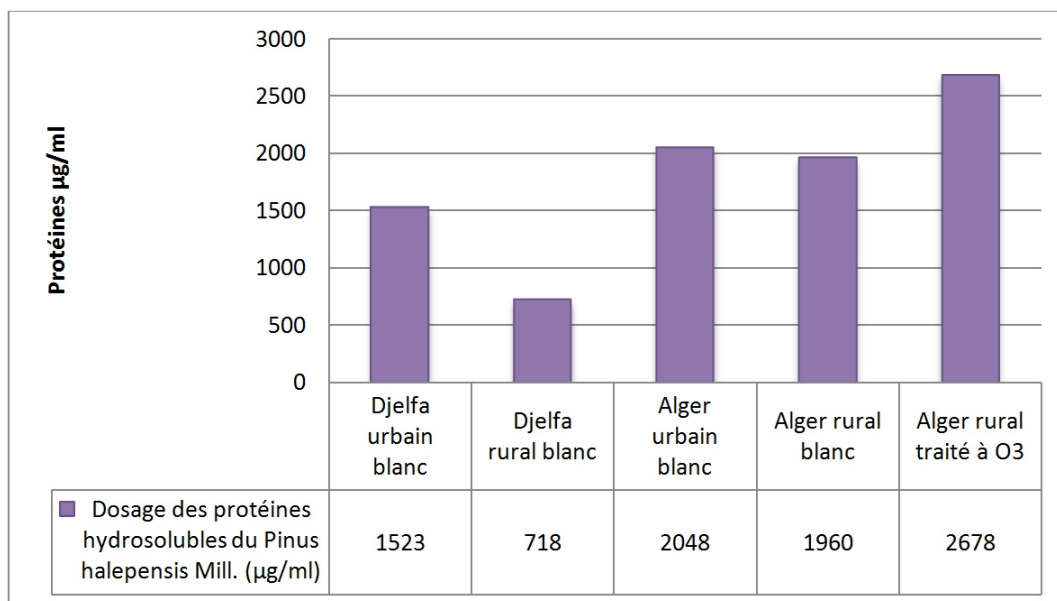


FIGURE III.38 – Résultats du dosage des protéines hydrosolubles du pollen de *Pinus halepensis* Mill.

Avec le pollen Djelfa rural et Djelfa urbain, le dosage de la fraction protéique a donné le même résultat.

Des analyses des extraits de pollen traités au NO_2 ; SO_2 et CO par SDS-PAGE montrèrent l'apparition de nouvelles bandes, montrant que le traitement altérait les allergènes (Ruffin et al., 1986). Ceci a été confirmé avec le pollen de *Chenopodium alba* dans le travail de Guedes et al. (2009), qui ont signalé un changement significatif dans la concentration des protéines solubles totales et une augmentation du taux de la fraction protéique du pollen prélevé d'un milieu urbain.

Behrendt et *al.* (1999), signalent une différence significative dans la concentration en protéines totales et des allergènes libérés des espèces : *Betula alba* L. ; *P. pratense* L. et *P. silvestris* L. entre des grains de pollen fraîchement collectés d'un site rural ; un site à proximité de circulation d'automobile et un pollen commercial.

Le résultat que nous avons obtenu confirme un tel effet des polluants atmosphériques sur l'augmentation de la fraction protéique hydrosoluble.

III.4.1.2 Pollen non broyé traité à l'ozone : Concentrations pour différents extraits

La lecture des valeurs représentées dans la figure suivante, montre une différence entre les sites d'Alger et ceux de Djelfa. Le pollen provenant de la forêt de Djelfa engendre une valeur maximale en extrait PBS (116 μ g/ml), par contre celui de la forêt d'Alger et pour le même type d'extraction, une faible valeur a été enregistrée. De même pour les extraits en H₂O, le pollen rural de Djelfa enregistre une valeur maximale de 96 μ g/ml ; et une valeur faible de 25 μ g/ml, enregistrée pour le pollen rural d'Alger. Il est à noter que nos résultats sont en accord avec les travaux de Berendt et *al.* (1999).

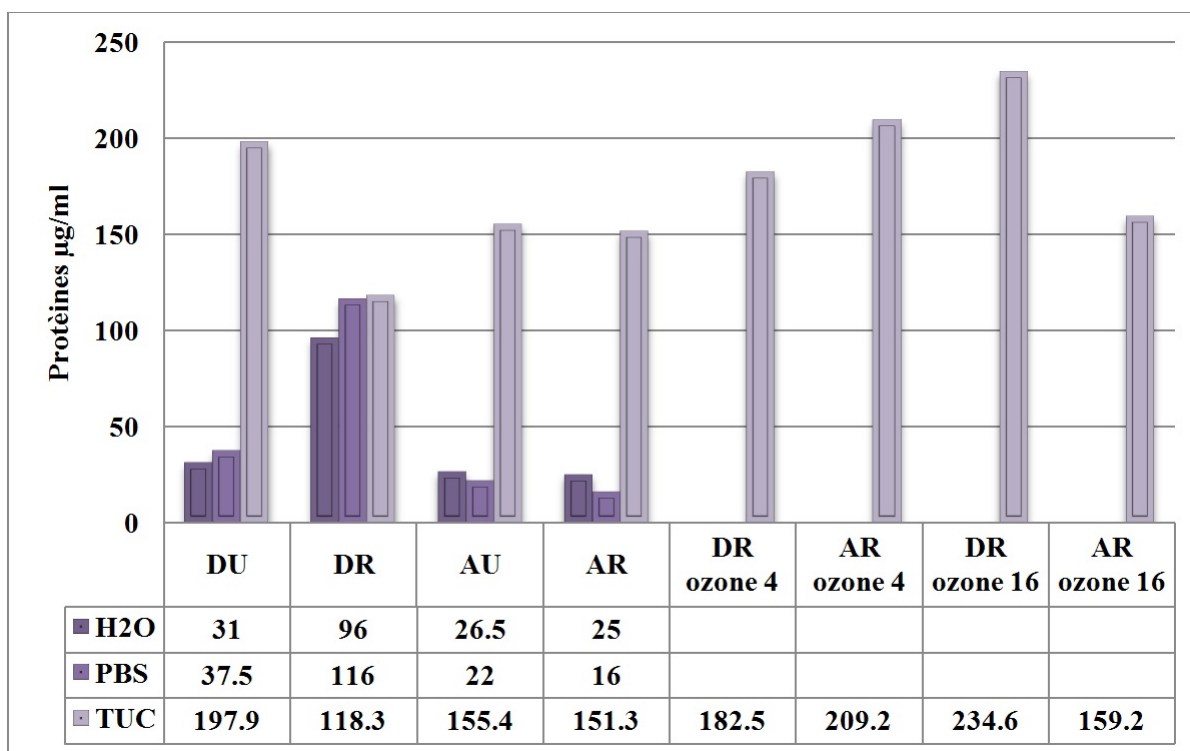


FIGURE III.39 – Résultats du dosage des protéines hydrosolubles du pollen de *Pinus halepensis* Mill. Pollué et non pollué (μ g/ml) pour différents extraits

Le dosage protéique fait avec les extraits TUC du pollen : rural (traité et non traité à l’ozone), ainsi que l’urbain, fait sortir les résultats présentés dans la figure III.39.

Une augmentation remarquable de la fraction protéique a été enregistrée pour le pollen Djelfa urbain avec 197,92 $\mu\text{g/ml}$ par rapport à son homologue rural avec 118,33 $\mu\text{g/ml}$; par contre la différence est peu importante entre les deux pollens urbain et rural provenant d’Alger.

Le traitement à l’ozone avec 150ppb pendant quatre et seize heures effectué sur le pollen rural des deux sites de l’étude montre une augmentation graduelle et importante de 118,33, puis 182,5 et enfin 234,58 $\mu\text{g/ml}$ de protéines dans les extraits TUC du pollen de la forêt de Djelfa.

Par contre pour le pollen rural d’Alger, une rechute de la fraction protéique (159,17 $\mu\text{g/ml}$), pour atteindre une valeur voisine à celle du témoin 151,25 $\mu\text{g/ml}$, a été enregistrée après une exposition prolongée à l’ozone (16heures); par contre l’exposition pour la même concentration 150ppb et pendant quatre heures augmente sensiblement la valeur de cette fraction de 151,25 pour le témoin à 209,17 $\mu\text{g/ml}$ après exposition.

En comparaison avec les extraits faits en H_2O et PBS, l’extraction en TUC, semble bien être efficace. Enfin, les dosages réalisés sur les extraits en SDS ne sont pas fiables.

III.4.1.3 Pollen broyé traité à l’ozone et au NO_2

Le dosage des protéines hydrosolubles pour le pollen traité à l’ozone et au NO_2 et broyé a été réalisé selon la méthode de Bradford (Coomassie Assay Reagents de Pierce).

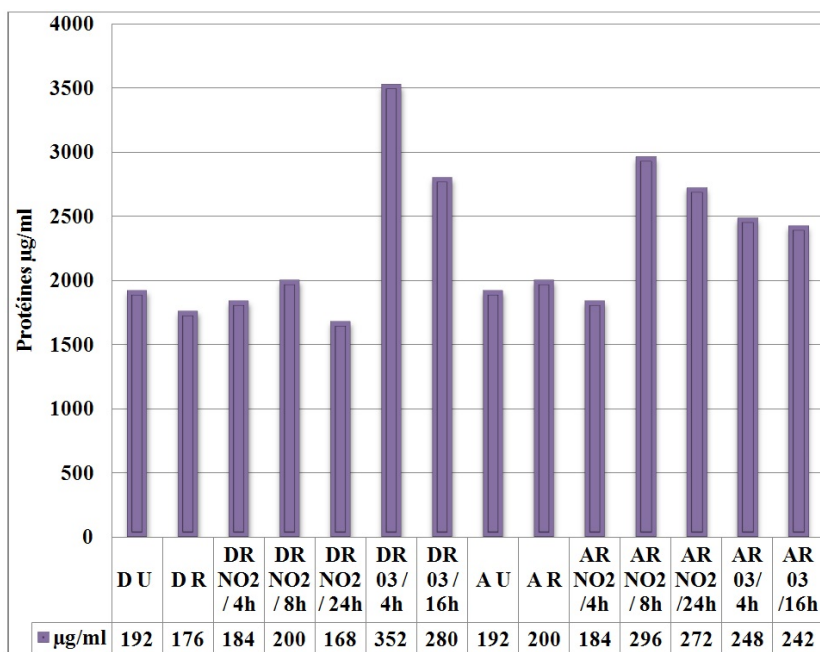


FIGURE III.40 – Résultats du dosage des protéines hydrosolubles du pollen de *Pinus halepensis* Mill. Des différents sites pollué avec de l’ozone et de NO_2 et non pollué

Les dosages effectués sont présentés dans la figure (III.40); d'après cette dernière, sur un pollen non traité des deux sites urbain et rural de Djelfa et ceux d'Alger; une extraction égale a été engendrée pour le pollen urbain des deux sites de l'étude (192 $\mu\text{g/ml}$). Le pollen rural d'Alger enregistre une valeur supérieure à celle du pollen rural de Djelfa (200 $\mu\text{g/ml}$).

Une extraction bien efficace a eu lieu sur le pollen Djelfa rural traité à l'ozone (150ppb/4 heures), avec une quantité de protéines égale à 352 $\mu\text{g/ml}$, succédée par celle du pollen traité avec le même polluant pour une durée plus longues (16heures d'exposition), du même site (280 $\mu\text{g/ml}$). En comparaison avec le pollen rural d'Alger traité avec le même polluant dans les mêmes conditions de concentration et de durée; ce dernier, engendre des valeurs inférieures (242 et 248). L'exposition à l'ozone paraît bien efficace d'augmenter la quantité de protéines hydrosolubles extraites en comparaison avec le pollen non traité des deux sites de l'étude.

D'après la même figure, un traitement du pollen de la même espèce au NO_2 avec la concentration 150 ppb et pendant les durées 4; 8 et 24heures; un comportement similaire a été observé sur le pollen rural des deux sites d'étude vis-à-vis des durées et la concentration choisies pour ces analyses. Une valeur égale de 184 $\mu\text{g/ml}$ de protéines a été enregistrée pour la durée d'exposition pendant 4 heures à une concentration de 150ppb. Ensuite, une exposition prolongée de 8 heures a permis d'extraire une quantité importante de 200 et 296 $\mu\text{g/ml}$ sur le pollen Alger et Djelfa rural respectivement. Une rechute de ces valeurs a été engendrée sur le même pollen pour une durée d'exposition de 24 heures : 272 et 168 $\mu\text{g/ml}$ pour les deux sites Alger et Djelfa respectivement.

III.5 Analyses de 1D (SDS-PAGE et IEF) et 2D

La séparation en SDS-PAGE montre que les extractions en solutions aqueuses ou extraits rotation (H_2O et PBS) ne permettent pas d'extraire beaucoup de protéines. Djelfa rural est le plus riche. L'extraction en PBS ne présentent pas de différences significatives du nombre de bandes. Les extraits en détergents (CHAPS, détergent non ionique et SDS, détergent anionique) sont quantitativement plus riches en protéines mais ne semblent pas différents qualitativement des pollens extraits en H_2O ou PBS (Figure III.41).

Une différence notable entre Djelfa et Alger est la présence d'une bande vers 14kDa pour Djelfa qui n'existe pas dans les pollens d'Alger. Les raisons de cette différence pourraient être attribuées à des différences de cultivar (variants génétiques) ou des conditions environnementales favorisant l'expression de cette (ou ces) protéine(s).

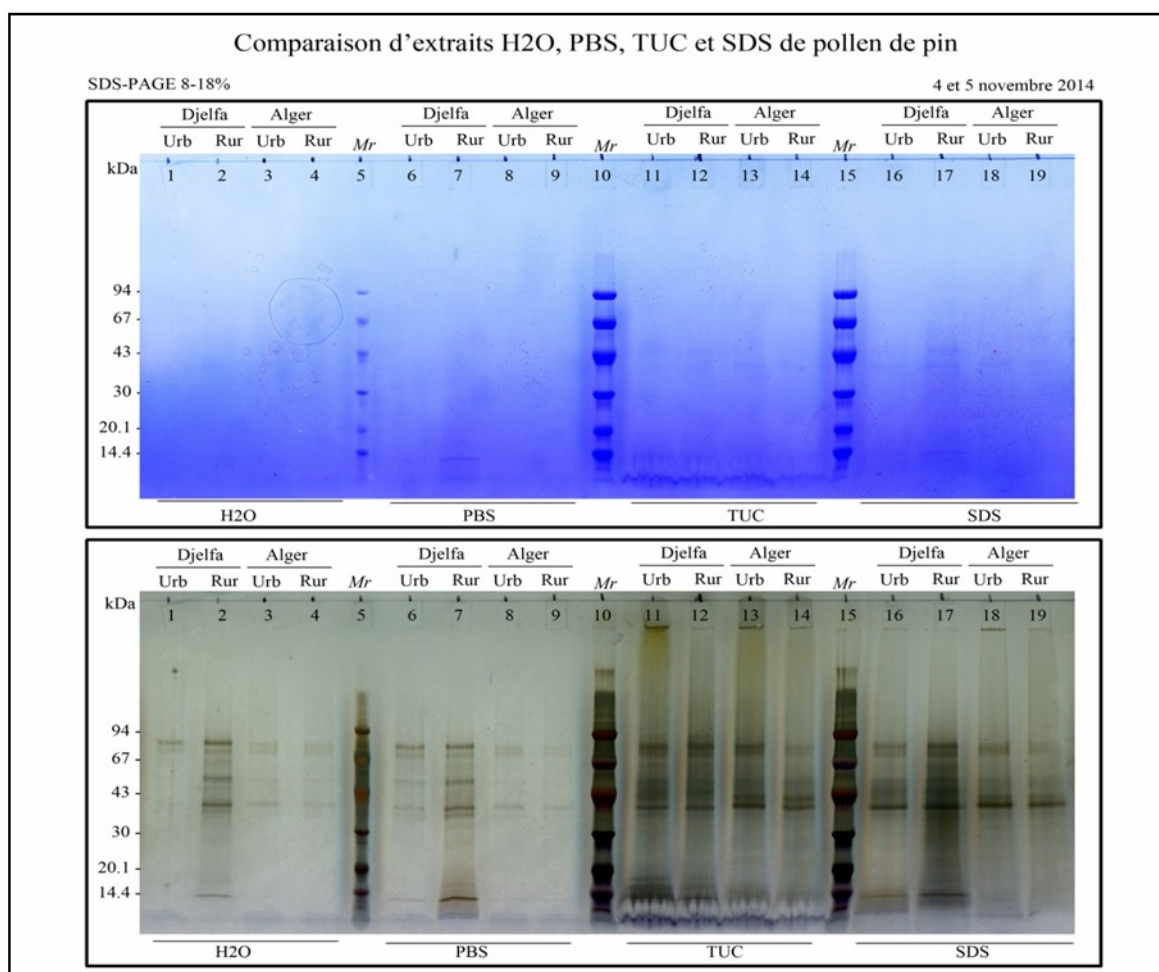


FIGURE III.41 – Séparation en SDS-PAGE des protéines des différents extraits de pollen de *Pinus halepensis* Mill. des sites de l'étude

III.5.1 Séparation par isoélectrofocalisation (IEF) 1D de pollen non traité, des différents sites, extraits en H_2O ou en PBS

Les migrations sont très semblables les unes des autres. On note de nombreuses protéines acides et neutres. Un léger nuage très basique est observé pour les extraits de Djelfa. Les mêmes différences quantitatives observées dans l'analyse en SDS-PAGE sont observées en IEF, l'extrait Djelfa rural étant le plus riche (Figure III.42).

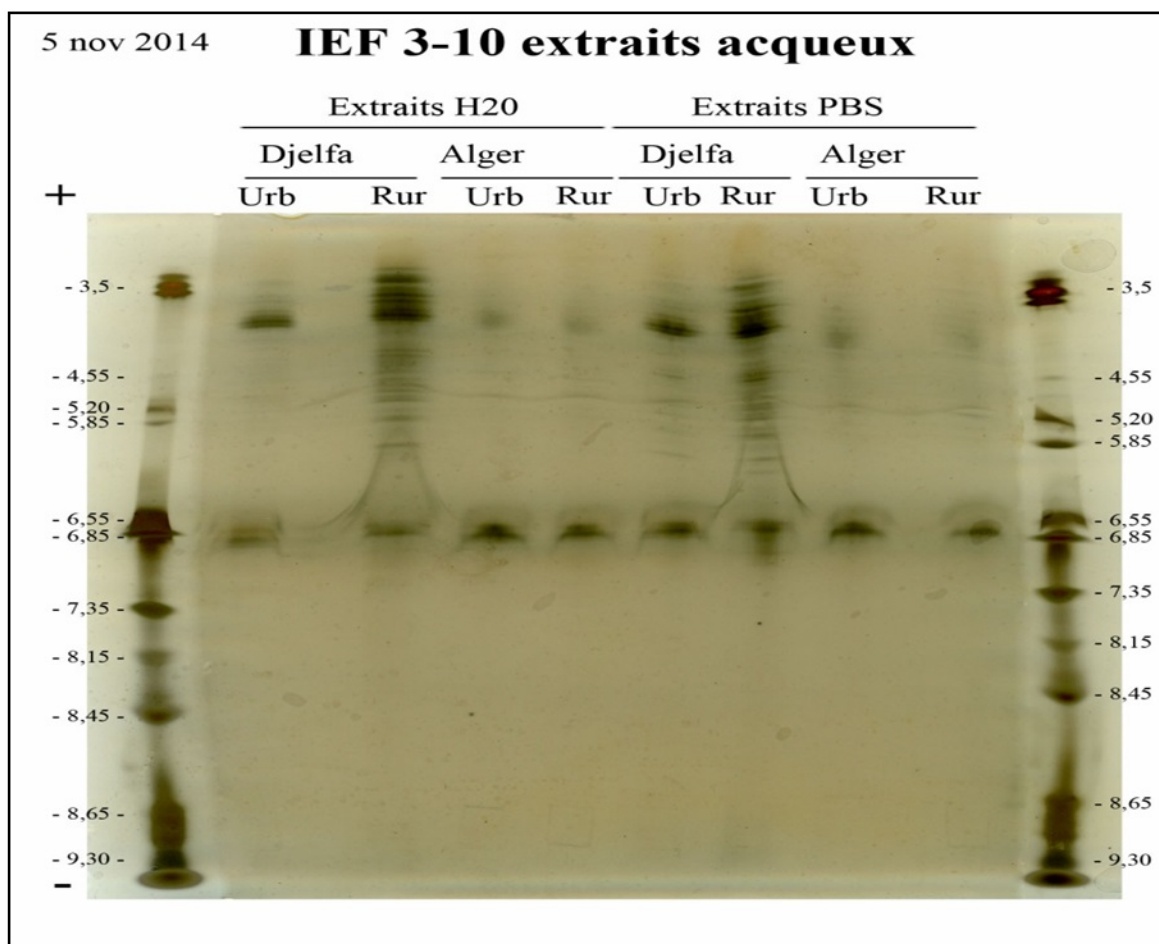


FIGURE III.42 – Séparation en IEF des protéines des différents extraits H_2O et PBS de pollen de pin provenant de sites ruraux et urbains de Djelfa et d'Alger

III.5.2 Séparation par IEF-1D des extraits TUC de pollen non traités, provenant des différents sites

Comme pour les IEF d'extraits aqueux, les extraits TUC sont très semblables au niveau des protéines acides et neutres. Une bande basique inexistante pour les extraits d'Alger est très clairement visible pour les pollen de Djelfa (Figure III.43).

Les résultats des différentes extractions et séparations électrophorétiques complémentaires (SDS-PAGE selon la Mr et IEF selon les pI) ont montrés que les extraits des pollens obtenus en présence de TUC étaient plus riches en protéines et incluait la totalité des profils observés dans les extraits aqueux. Ce type d'extraction en présence d'agents chaotropes (Urée et Thiourée) et de détergents (CHAPS) a été donc utilisé pour la suite de l'étude présentée ici, en particulier les pollen ruraux traités à l'ozone.

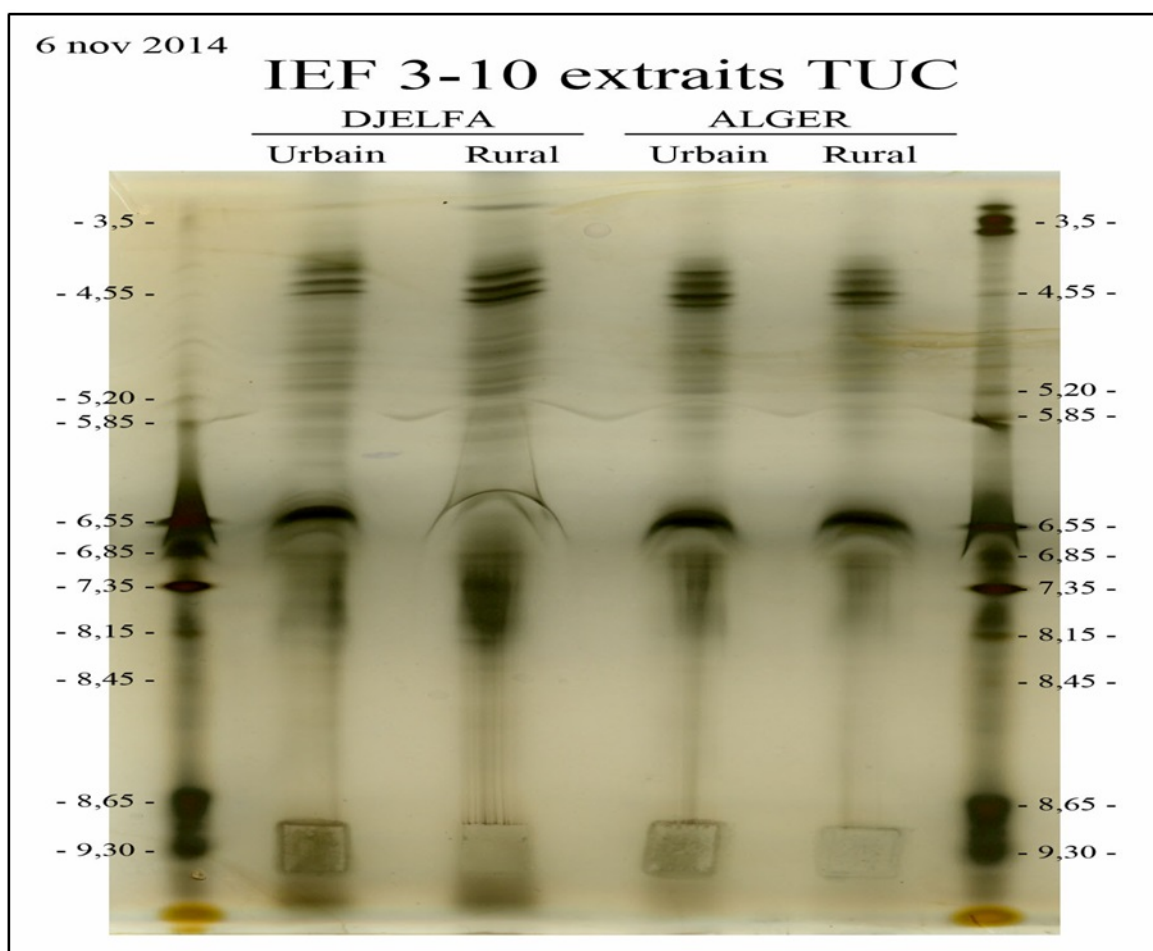


FIGURE III.43 – Séparation en IEF des protéines des différents extraits TUC de pollen de pin provenant de sites ruraux et urbains de Djelfa et d'Alger

III.5.3 Séparation par IEF-1D de pollens traités par l'ozone (O_3), des différents sites, extraits en TUC

Il y a eu un problème dans la migration des protéines qui sont restées aux dépôts ou ont très peu migrées. Ceci a été accordé à l'état des mèches des électrodes utilisées ; soit n'ont pas été bien imbibées avec les solutions soit elles n'étaient pas bien disposées sur le gel (Figure III.44).

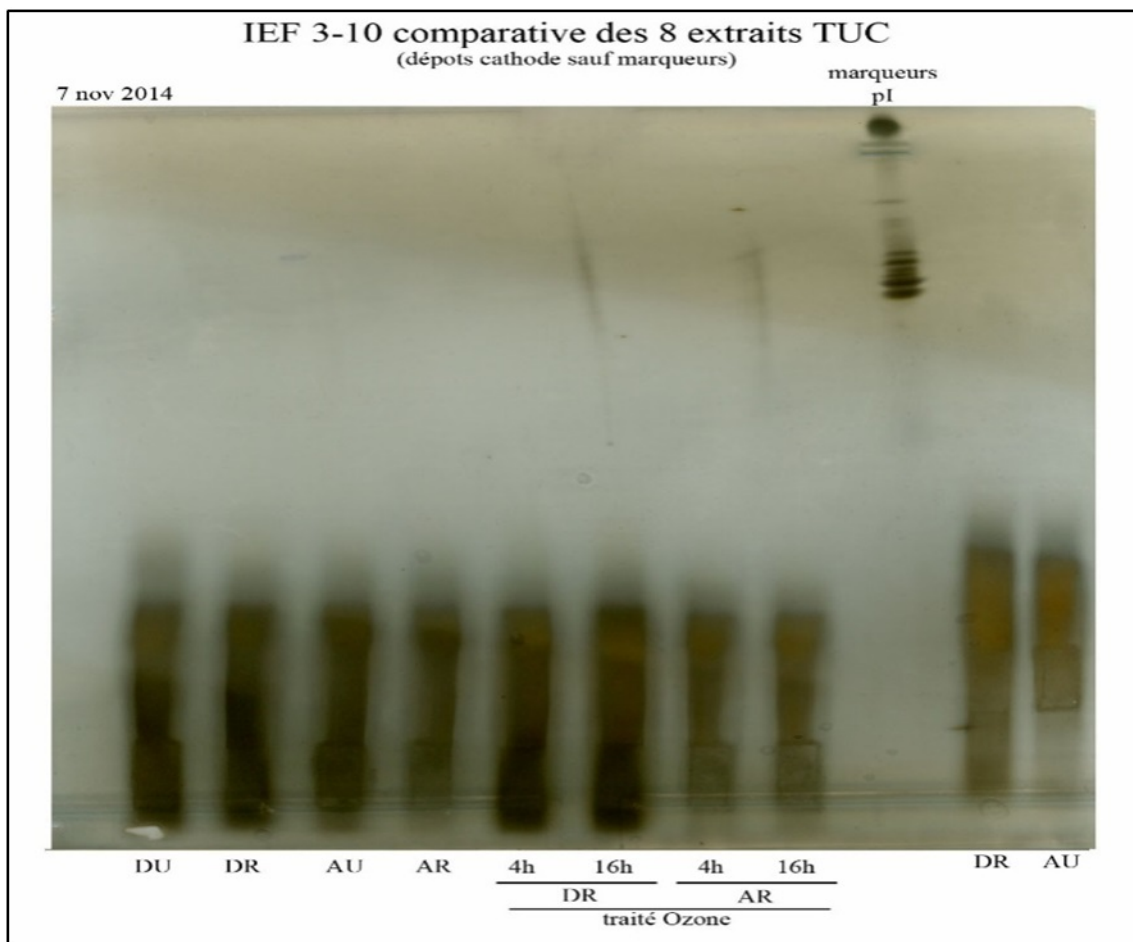


FIGURE III.44 – Séparation en IEF des protéines des différents extraits TUC de pollen de pin de pollen non traités et traités O_3

III.5.4 Séparation en IEF pour 2D d'extraits TUC de pollen non traités provenant d'Alger et de Djelfa

Les profils sont semblables à ceux observés dans les expériences précédentes (Figure III.45).

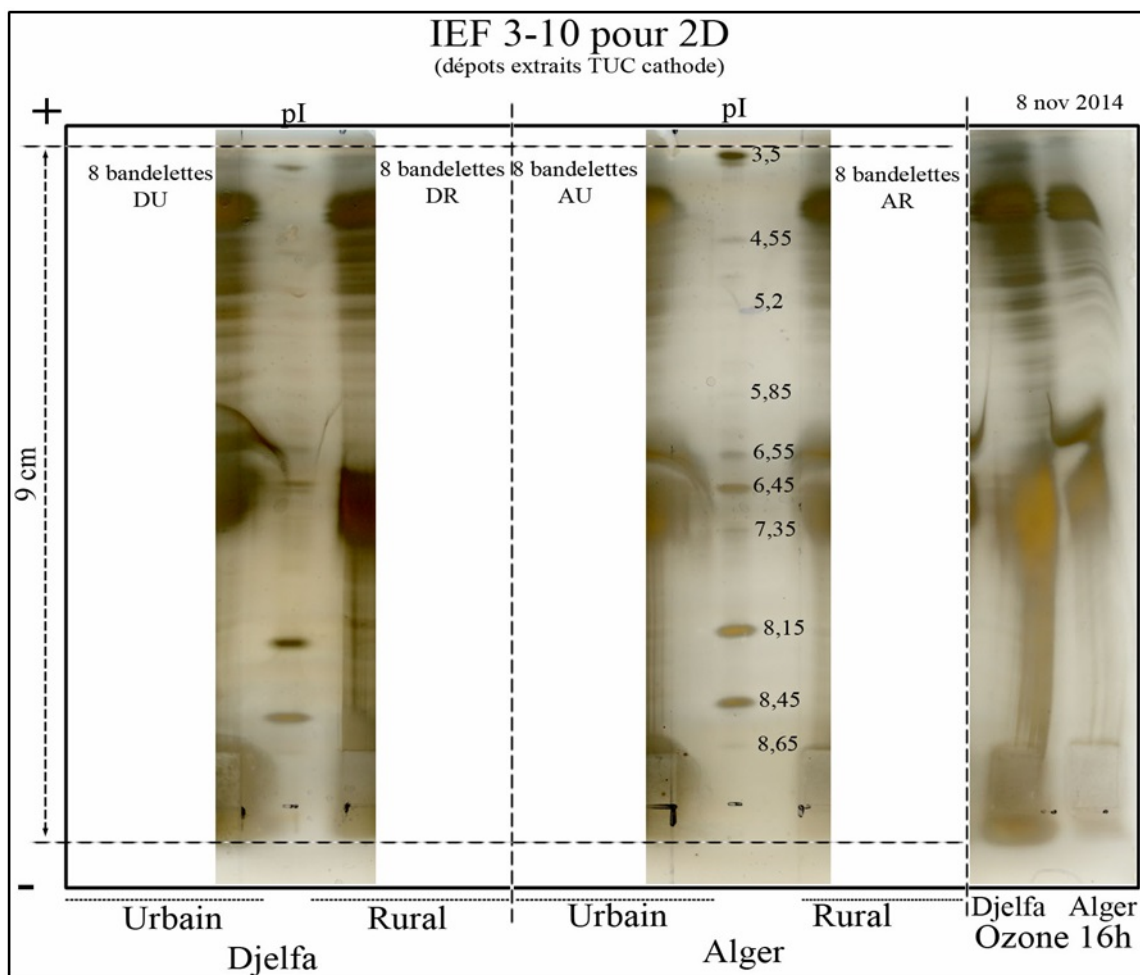


FIGURE III.45 – Séparation en IEF des protéines des différents extraits TUC de pollen de pin non traités + 2 extraits traités (Djelfa et Alger 16h)

III.5.5 Séparation en SDS-PAGE pour la 2^e dimension d'extraits TUC de pollen non traités des sites de l'étude

Suite à l'ajout du développeur, les spots protéiques n'ont pas tardé à apparaître clairement sur le gel des bandelettes du pollen de Djelfa ; les protéines acides (40 kDa), sont apparues les premières. Les protéines acides de 20 kDa sont apparues en dernier.

Par contre, le développement des spots sur les gels 2D du pollen d'Alger, a été plus lent que pour le gel du pollen de Djelfa (Figure III.46(A et B)).

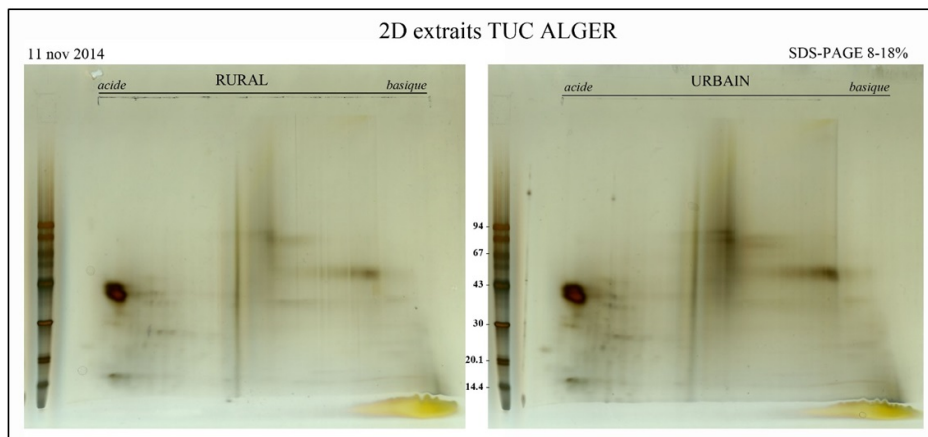


Figure A. Séparations en 2D des protéines des extraits TUC de pollen de pin non traités provenant de sites d'Alger (rural et urbain)

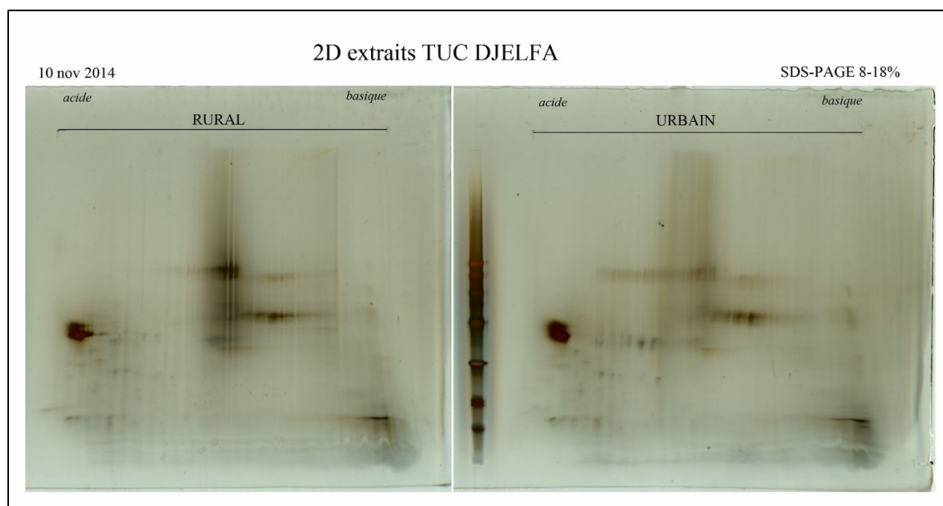


Figure B. Séparations en 2D des protéines des extraits TUC de pollen de pin non traités provenant de sites de Djelfa (rural et urbain)

FIGURE III.46 – (A-B) Séparations en 2D des protéines des différents extraits TUC de pollen de pin non traités d'Alger et de Djelfa

Les profils protéiques AU (Alger urbain) et AR (Alger rural) sont très semblables et confirment les résultats observés en 1D. Les protéines acides sont principalement de taille 40kDa avec un ensemble de 3 à 4 spots vers 14kDa correspondant vraisemblablement à une protéine de la famille des profilines. Les deux profils DR (Djelfa rural) et DU (Djelfa urbain) sont très semblables. On note qu'à 14 kDa il existe des protéines acides et aussi une protéine basique, présente sous 2 à 3 isoformes, qui n'existent pas dans le pollen d'Alger.

III.5.6 Séparation en IEF d'extraits TUC de pollen non traité et traité à O_3 des sites de l'étude. Comparaison dépôts anode/cathode

L'expérience permet de conclure que pour ce pollen un dépôt à l'anode donne une meilleure résolution au niveau des protéines neutres et basiques. Les 2D suivantes ont donc été réalisées à partir d'IEF avec dépôts anodiques.

D'autre part on n'observe pas de différences significatives de profils protéiques entre les extraits traités et non traités à l'ozone (Figure III.47 et III.48).

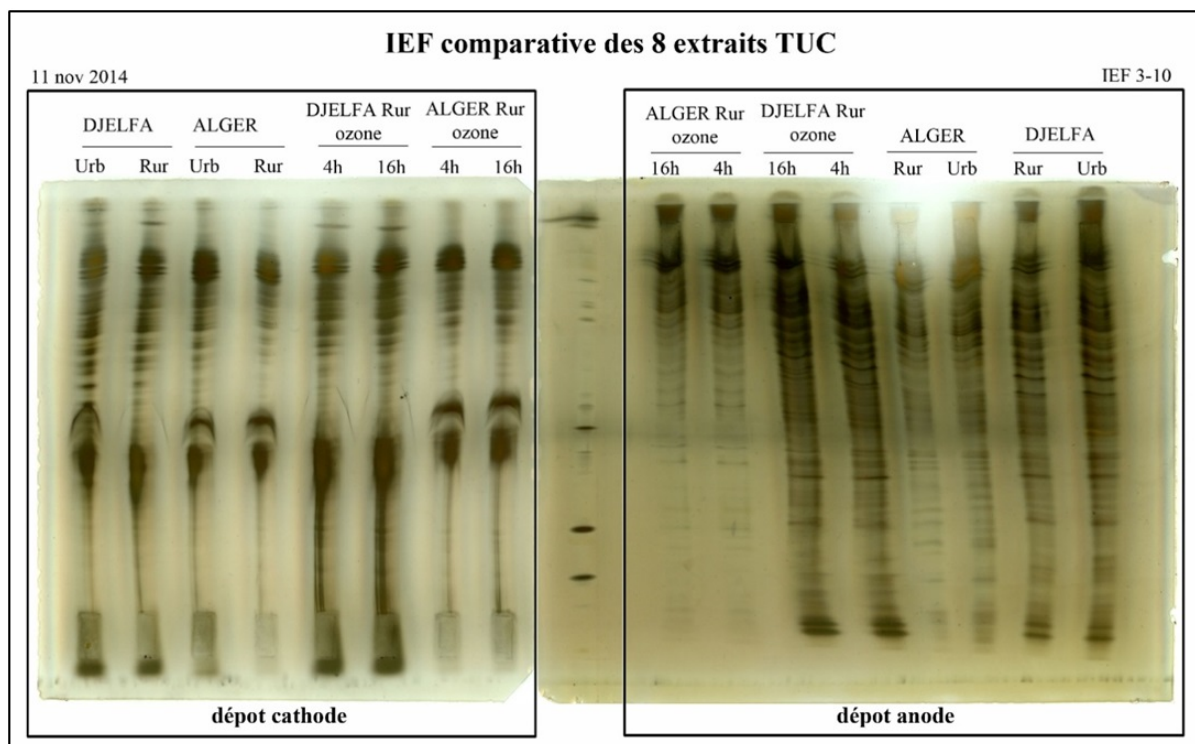


FIGURE III.47 – Séparation en IEF des protéines des différents extraits TUC de pollen de pin non traités et traités à l'ozone

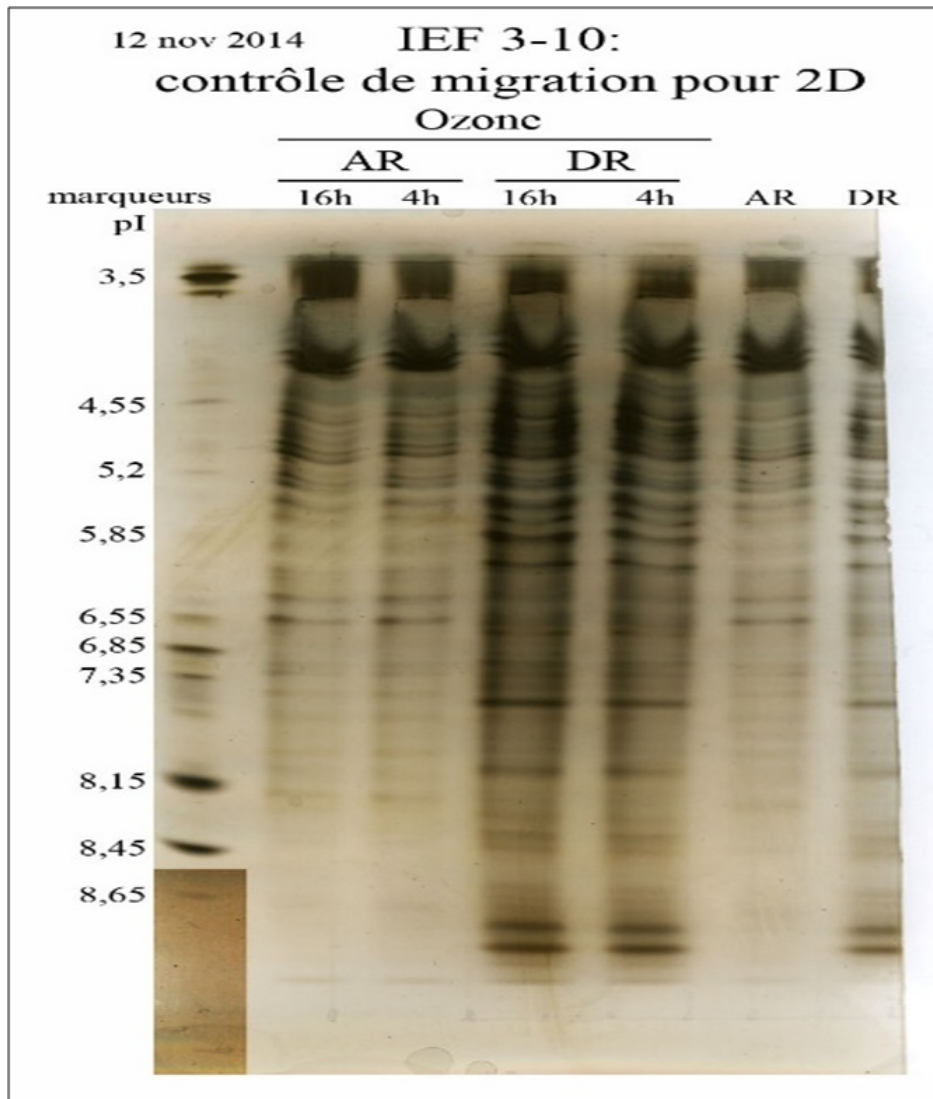


FIGURE III.48 – IEF pour la 2D des pollens TUC (traité à O_3)

III.5.6.1 Séparations bidimensionnelles d'extraits MP-Bio/PBS :

L'analyse ne permet pas de visualiser un effet majeur du traitement à l'ozone sur les protéines, ni au niveau masses moléculaires ni au niveau point isoélectrique. Les différences entre les deux sites Alger et Djelfa sont bien visibles. En particulier pour les protéines des boîtes (Figure III.49 et Tab.III.34).

TABLE III.34 – Séparations bidimensionnelles d’extraits MP-Bio/PBS du pollen rural provenant d’Alger et de Djelfa.

	Mr	pI
n° 2	60 – 90	6 - 7
n° 4	35 – 50	5 - 7
n° 7	32 – 40	7
n° 9	32 – 40	8 - 9
n°11	14 - 20	<4
n°14	14 – 20	9,5

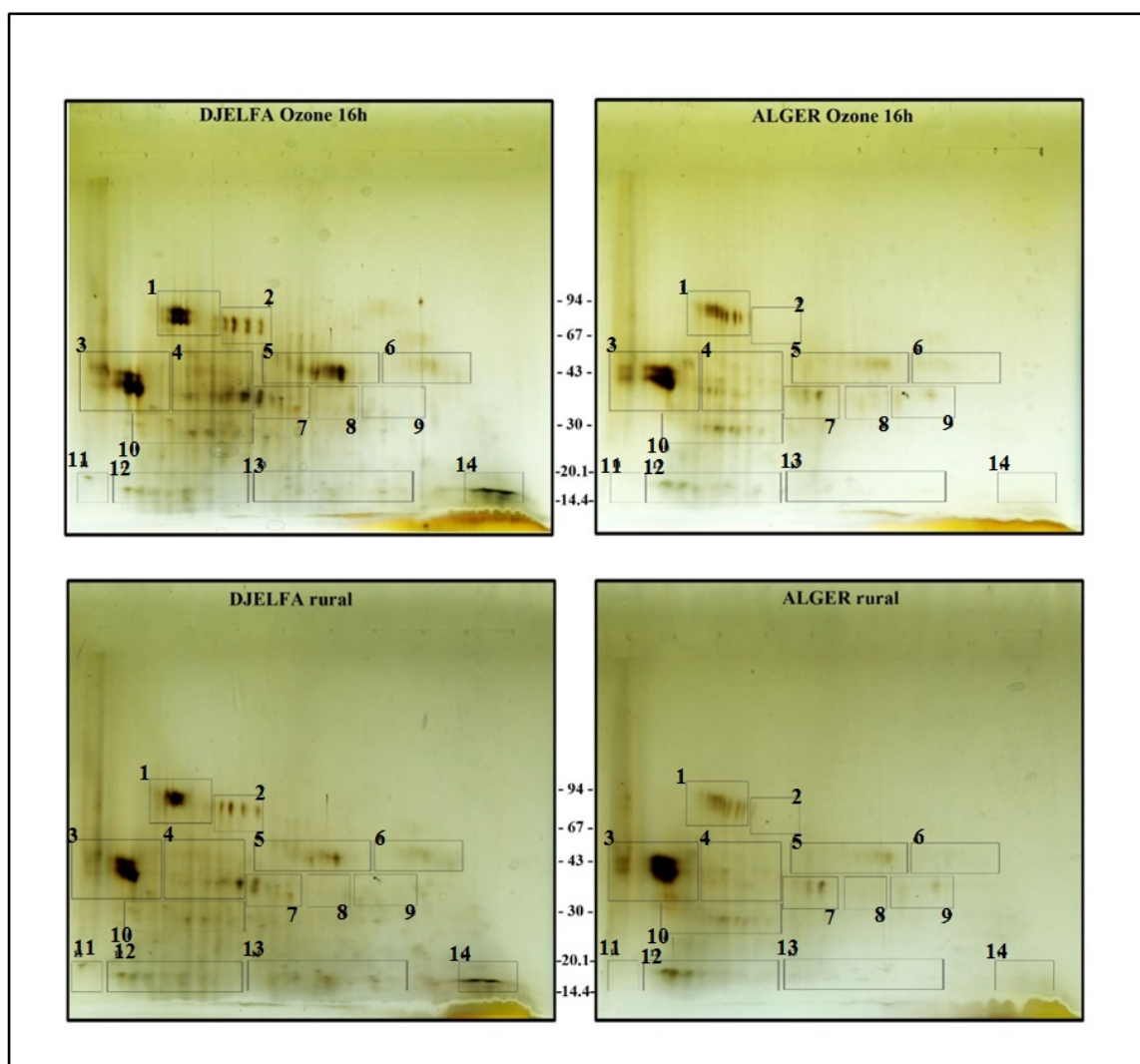


FIGURE III.49 – Comparaison du traitement à l’ozone (150 ppb) pendant des temps différents des pollens provenant de Djelfa et Alger rural (IEF dépôts anode)

III.6 Pollen broyé traité au NO_2

III.6.1 Séparation comparative par isoélectrofocalisation (IEF) 1D des extraits MP-Bio en PBS

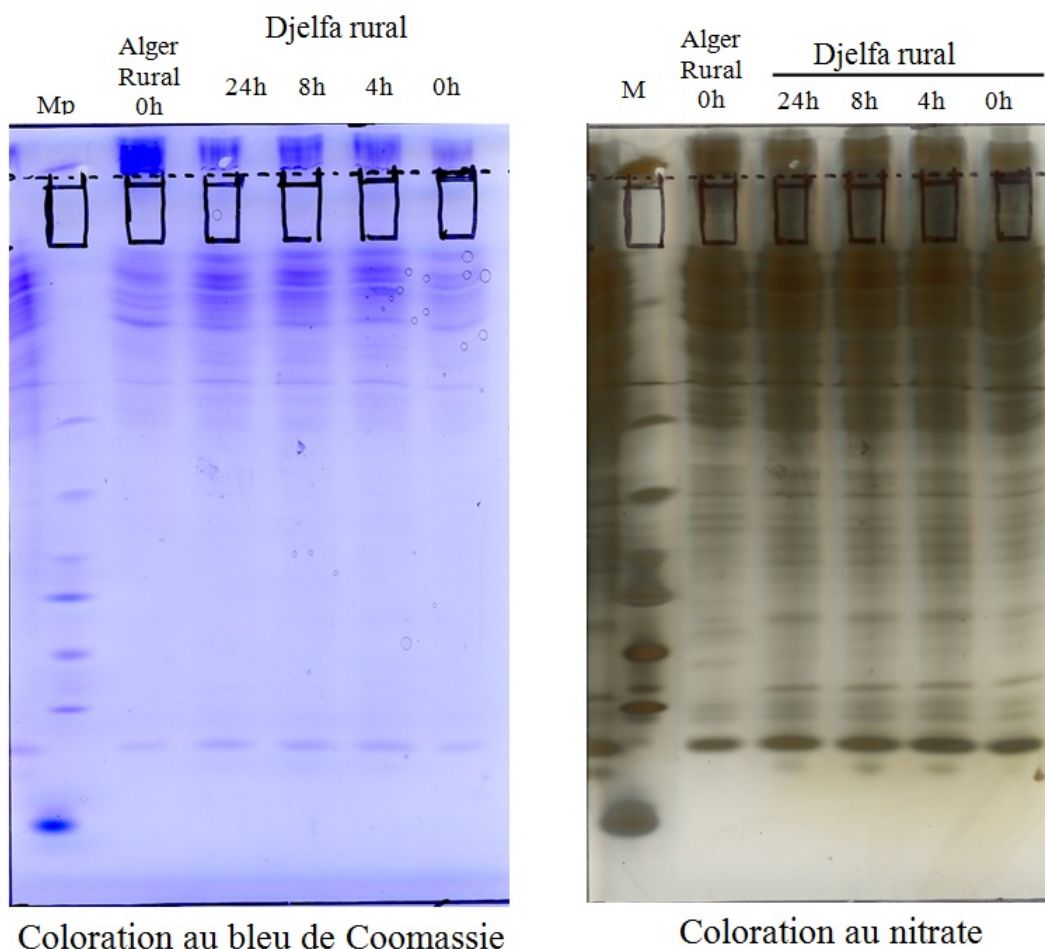


FIGURE III.50 – Pollen de pin provenant de Djelfa rural non traité ou traité NO_2 (extraits PBS MP Bio)

Des différences entre les extraits de pollen non traité et traités au NO_2 sont visibles en intensité de coloration mais très peu significatives (Figure 50)

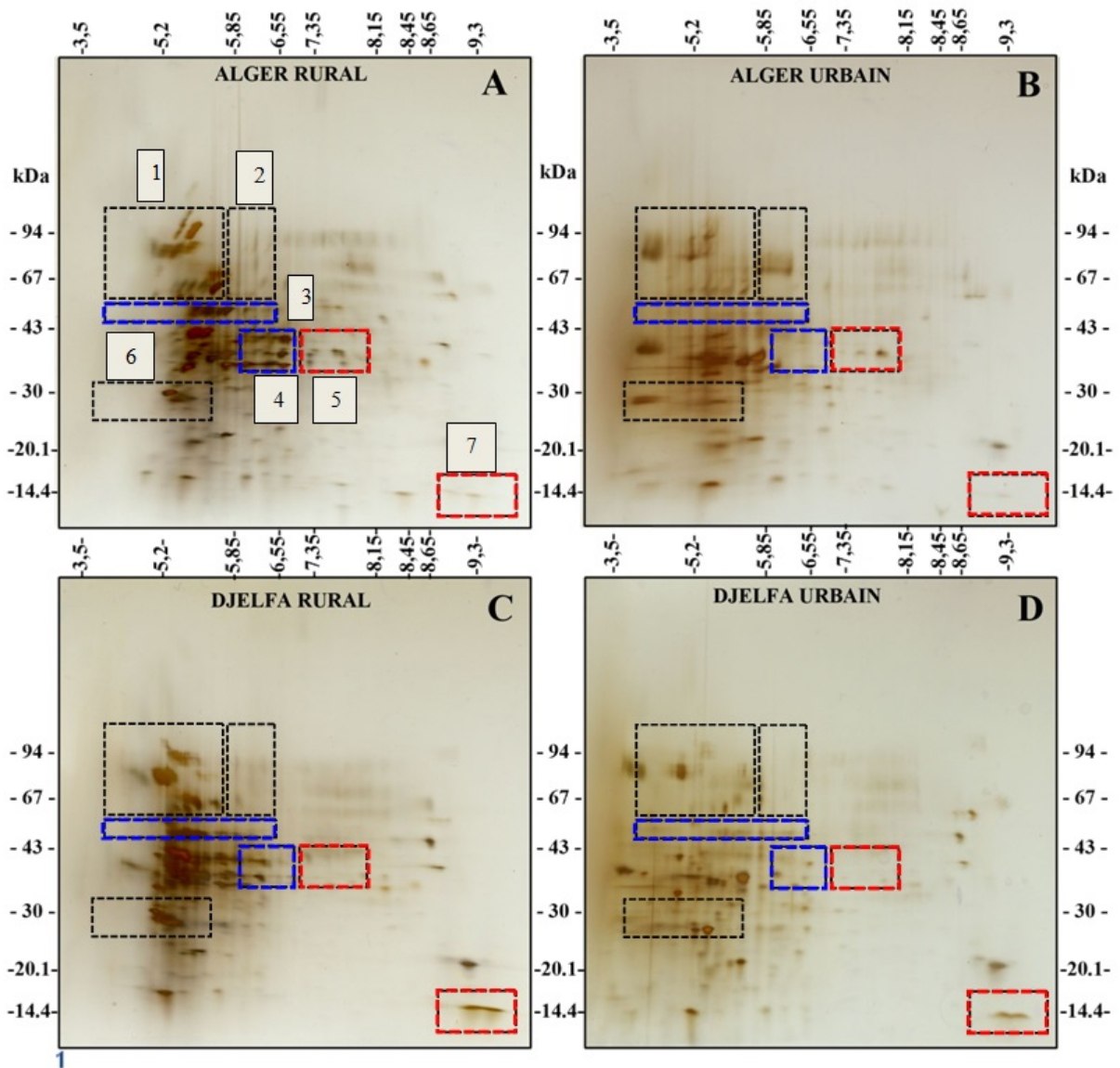


FIGURE III.51 – Analyses 2D - Alger et Djelfa rural et urbain non traités Extrait MP-Bio avec PBS

L'observation de la figure (III.51), montre qu'il y a probablement un polymorphisme de protéines extraites de la même espèce en fonction de la localisation des sites du prélèvement Alger /Djelfa (zones 5, 7, ...), et Urbain/rural : Alger (zones 2, 3, 4) et Djelfa (zones 3, 4). Pour l'observation des boîtes 3 et 4 de la même figure, l'absence de protéines (différences rural/urbain) pourrait correspondre à la libération de ces protéines dans l'air ambiant à cause des polluants et de l'humidité plus importants à Alger qu'à Djelfa.

III.6.2 Séparation en SDS-PAGE pour la 2^{ème} dimension d'extraits MP-Bio/PBS de pollen non traités et traités provenant de Djelfa rural

La séparation en SDS-PAGE réalisée sur des extraits de pollen broyé traité et non traité au NO_2 , montre que les extractions en solutions aqueuse PBS permettent d'importante extraction de protéines.

Suite à l'ajout du développeur, les spots protéiques n'ont pas tardé à apparaitre clairement et d'une façon chevauchée sur le gel du pollen de Djelfa, vu l'énorme bande apparue (Figure III.52); les protéines acides (40 kDa), sont apparues les premières. Les protéines acides de 20 kDa sont apparues en dernier.

L'extraction en PBS ne présentent pas de différences significatives du nombre de bandes pour l'ensemble des durées (4 ;8 et 24 heures) d'exposition au NO_2 (Figure III.52)

L'analyse en 2D ne permet pas de mettre en évidence de différences majeures notables entre pollen non traité et pollen traité au NO_2 .

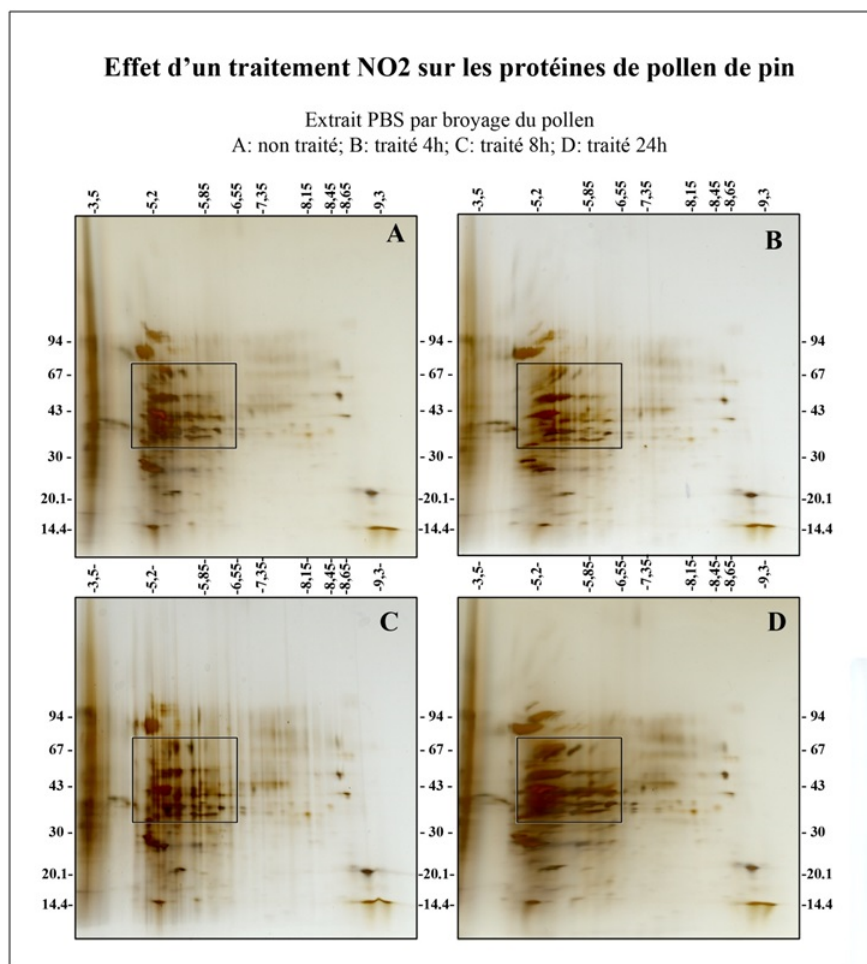


FIGURE III.52 – montage 2D Djelfa NO_2 bis

III.6.3 Analyses 2D - Alger rural : Extraits MP-Bio avec PBS

D'après la figure (III.53), et dans les mêmes conditions d'analyse utilisées, aucune différence à signaler pour les différentes durées de traitement au NO_2 .

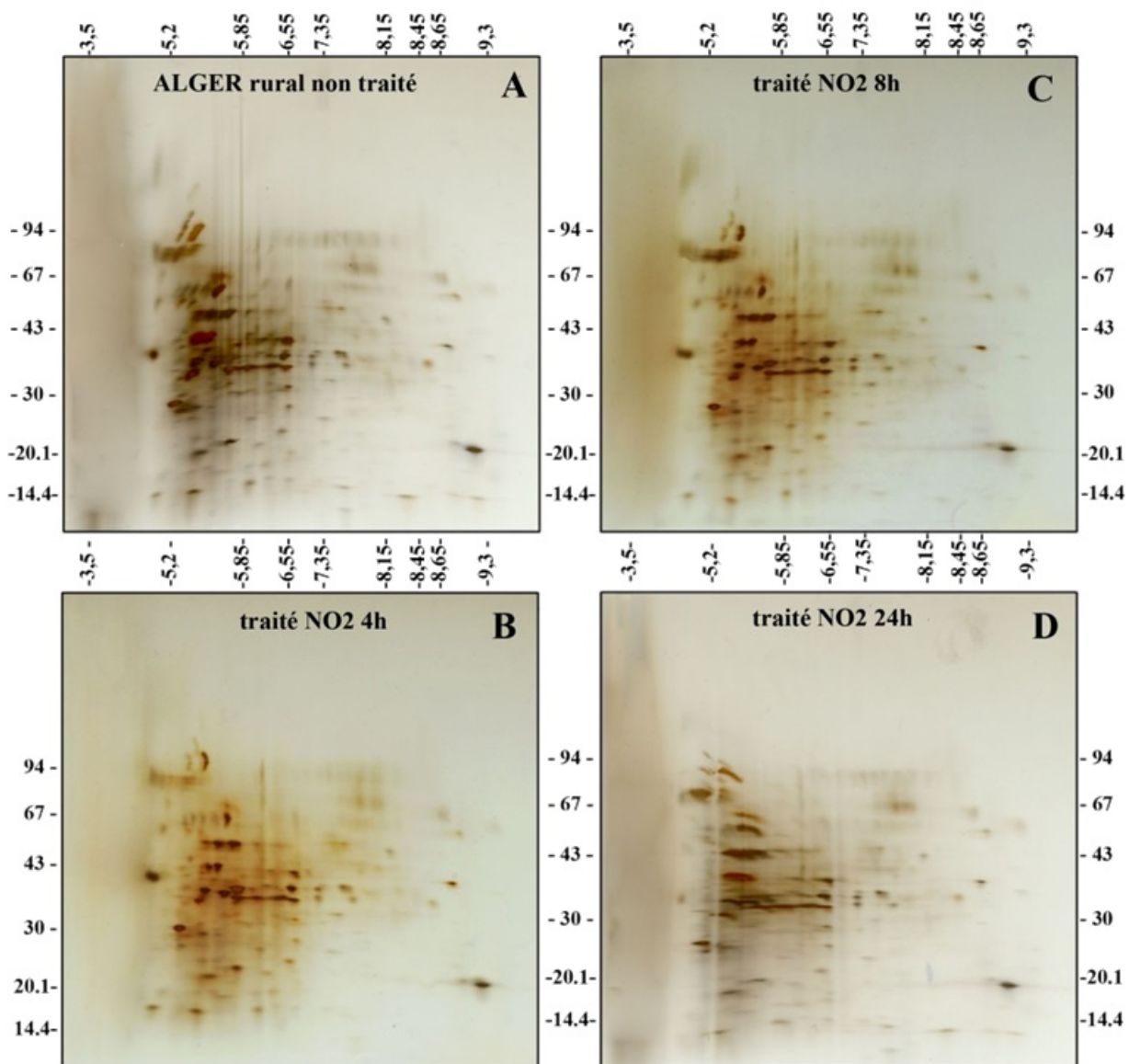


FIGURE III.53 – montage 2D Alger NO_2 bis

III.7 Discussions

III.7.1 Dosage des protéines hydrosolubles

Il apparait très clairement à partir des résultats obtenus pour cette partie, un comportement particulier du pollen de Djelfa rural alors que les grains pollen urbain des deux sites ainsi que le pollen rural d'Alger se comportent de façon identique lors des différentes extractions. En effet, pour le pollen de Djelfa rural, les extractions en conditions aqueuses (H_2O et PBS) permettent d'obtenir une concentration protéique semblable à celle obtenue avec l'extraction en TUC alors que pour les autres pollens l'extraction aqueuse donne une très faible concentration en protéines largement augmentée en présence de détergent (TUC).

Cette différence pourrait être liée à la structure même du grain de pollen moins « résistants » à l'extraction protéique dans un environnement moins pollué sur le site rural de Djelfa. Cette « résistance » observée sur les autres sites est levée par les détergents. Il pourrait donc s'agir d'une couche de type hydrophobe liée à la pollution atmosphérique probablement, recouvrant les pollens en milieu urbain ou proche d'une grande agglomération (Alger dit rural) limitant ainsi l'extraction aqueuse.

Les résultats d'évaluation de la concentration en protéines dans les extraits SDS ne sont pas interprétables car la technique de Bradford n'est pas utilisable en présence de la trop forte concentration de SDS dans les échantillons qui donne un très fort bruit de fond. D'après la lecture des résultats sur le pollen broyé et traité à l'ozone et le NO_2 , une pollution à l'ozone pendant 4 heures augmente la fraction protéique hydrosoluble extraite du pollen rural. La durée de 8 heures d'exposition est bien efficace pour une pollution au NO_2 pour la même concentration des deux polluants.

Les modifications que subit un grain de pollen ainsi que ses allergènes sous l'effet de la pollution atmosphérique ont été étudiées pour la première fois en 1986 par les travaux de Ruffin et *al.* en montrant que le contenu d'extraits de pollen traités au NO_2 , SO_2 et CO contenait plus d'acides aminés libres (indicateur de l'allergénécité à l'époque).

Ceci a été confirmé avec le pollen de *Chenopodium alba* dans le travail de Guedes et *al.* (2009), qui ont signalé un changement significatif dans la concentration des protéines solubles totales et une augmentation du taux de la fraction protéiques du pollen prélevé d'un milieu urbain. Une nitration des protéines du pollen de *Betula alba* L. sous l'effet des polluants atmosphériques (NO_2 et O_3) a été significativement remarquée par Franze et *al.* (2003); ce qui est accordées avec nos résultats.

Enfin, le fait de concasser le pollen de nos échantillons (pollen de taille importante), a augmenté considérablement l'extraction des protéines. Selon Pettyjohn et Levetin (1997), des analyses

au SDS-PAGE montrent que les grains de pollen de *P. echinata* contiennent individuellement une énorme quantité de protéines par rapport aux *J. ashei* et *J. virginiana* vu leur grande taille ; ce qui diminue la proportion protéique présente dans 1 mg de ce type de pollen.

III.7.2 Analyse 1D (IEF, SDS-PAGE) et 2D

Les séparations en SDS-PAGE et en IEF présentent les mêmes différences quantitatives en montrant que l'extrait Djelfa rural étant le plus riche ; la présence d'une bande basique est très clairement visible ; elle est absente pour les extraits d'Alger.

Sur le gel des bandelettes du pollen rural de Djelfa ; l'apparition rapide des protéines acides de 40 kDa et de 20 kDa a été signalée, à l'encontre du pollen rural d'Alger Les protéines acides sont principalement de taille 40kDa avec un ensemble de 3 à 4 spots vers 14kDa correspondant vraisemblablement à une protéine de la famille des profilines.

Les deux profils DR (Djelfa rural) et DU (Djelfa urbain) sont très semblables. On note qu'à 14 kDa ; il existe des protéines acides et aussi une protéine basique, présente sous 2 à 3 isoformes, qui n'existent pas dans le pollen d'Alger (différences entre les deux provenances).

Les 2D suivantes ont donc été réalisées à partir d'IEF avec dépôts anodiques. D'autre part on n'observe pas de différences significatives de profils protéiques entre les extraits traités et non traités à l'ozone De plus, des analyses de ces extraits par SDS-PAGE montrèrent l'apparition de nouvelles bandes, montrant que le traitement altérait les allergènes (Ruffin et *al.*, 1986).

L'extraction en PBS ne présentent pas de différences significatives du nombre de bandes pour l'ensemble des extraits du pollen traité au NO_2 pour des durées de 4;8 et 24 heures).

Selon Ruffin et *al.* (1983), l'exposition du pollen de *Pinus taeda* aux polluants atmosphériques tels : SO_2 , NO_2 , et CO a changé considérablement la couleur tant dis que la concentration en protéines de la paroi n'a pas été affectée mais l'apparition de 4 bandes hétérogènes sur le gel Polyacrylamide d'électrophorèse a été signalée.

Lu et *al.* (2014), ont montré par l'analyse en SDS-PAGE, que chez le Platanus , l'exposition aux polluants atmosphérique (NO_2 , SO_2 , NH_3) a permis l'apparition des protéines de : 17–19 ; 34 ; 61 ; 82 et 144 kDa

III.8 Modification de la matière organique extractible du pollen de pin par la pollution atmosphérique

III.8.1 Comparaison des pollens issus de différentes zones

L'analyse en GC/MS effectuée sur les extractions de l'exine qui est constitué essentiellement de sporopollénine, du pollen d'Alger rural et urbain, a permis d'obtenir les chromatogrammes représentés dans la figure ci-dessous. Leur lecture permet de montrer les probables différences de la MOE (matière organique extractible) entre le pollen issu de ces deux zones. Chaque pic correspond à une molécule extraite de l'exine du pollen, et est caractérisé par un temps de rétention et une intensité. Cette intensité est proportionnelle à la concentration de la molécule identifiée dans l'extrait.

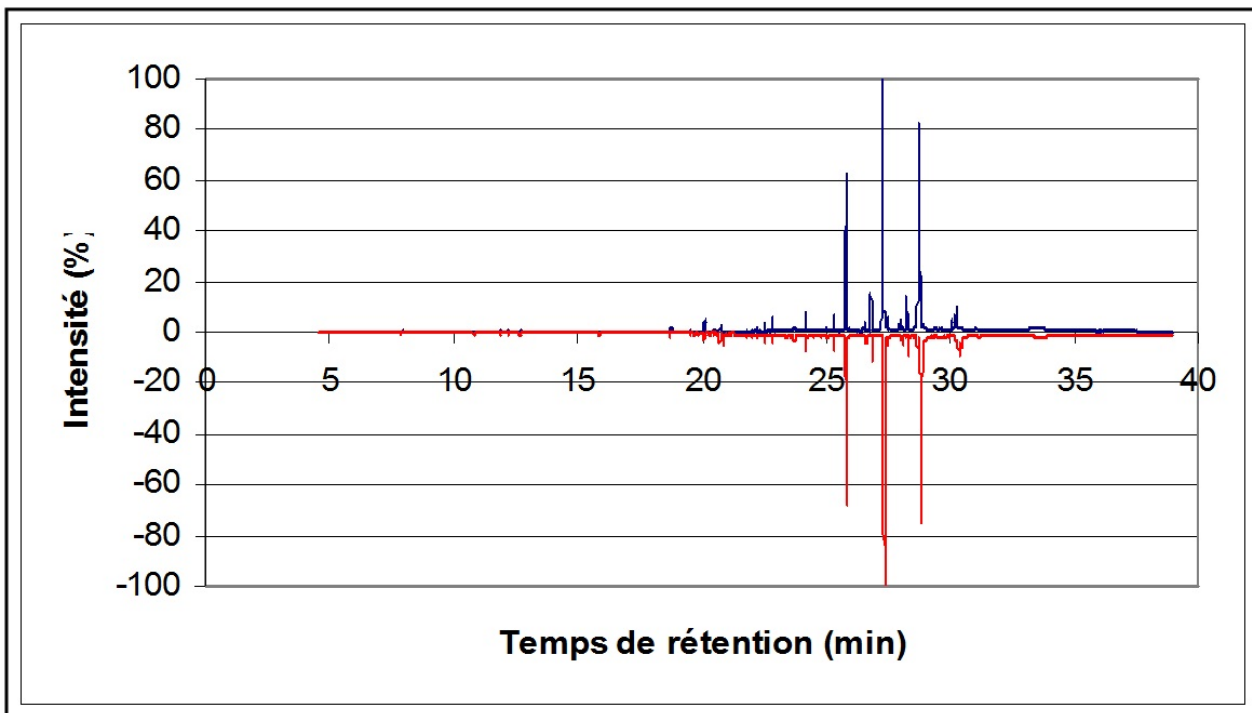


FIGURE III.54 – Comparaison des chromatogrammes du pollen d'Alger rural (bleu) et urbain (rouge)

La comparaison des chromatogrammes nous indique que le pollen rural et urbain d'Alger contient les mêmes molécules provenant de la matière organique extractible dans des proportions similaires.

La figure (III.55) montre un agrandissement d'une partie de la figure (III.54) comprise entre 4,5 et 15 minutes. Cette partie est intéressante car elle nous montre de nombreuses molécules importantes présentes dans la M.O.E. bien qu'elles soient en minorité.

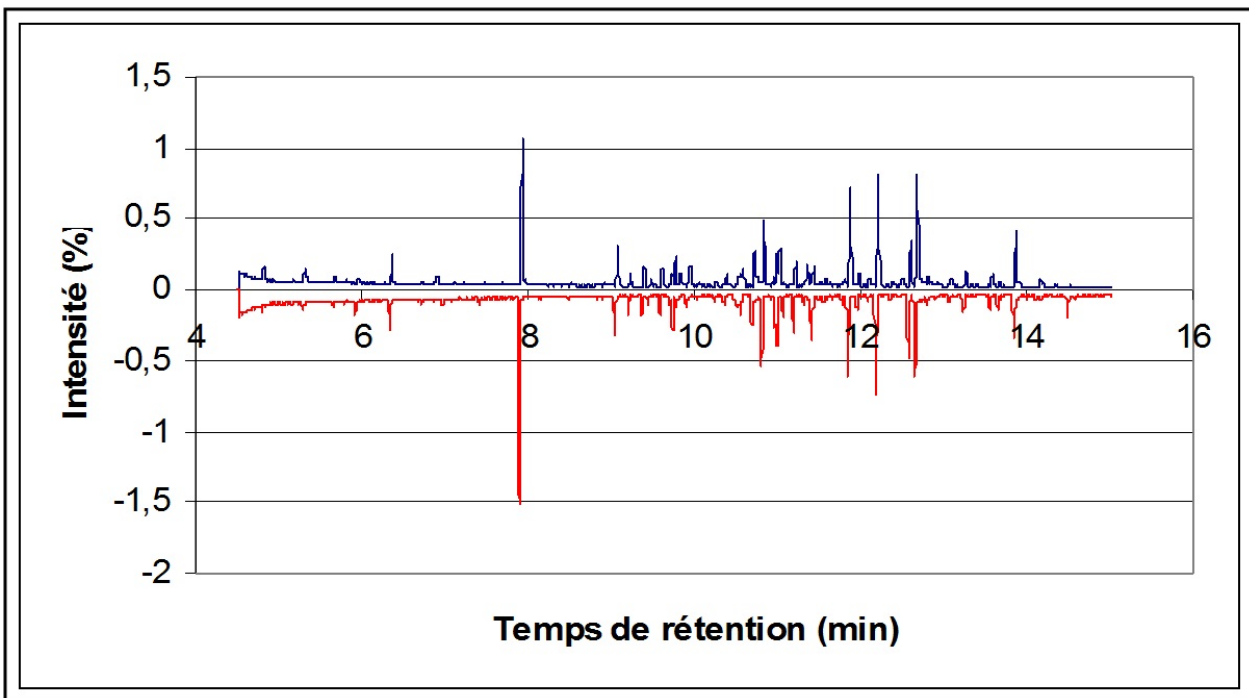


FIGURE III.55 – Comparaison des chromatogrammes du pollen d'Alger rural (bleu) et urbain (rouge) dans la zone comprise entre 4 et 15 minutes

La figure (III.55) confirme les résultats précédents, les mêmes molécules de la matière organique extractible sont retrouvées avec la même intensité. La seule différence observable est la plus grande intensité du pic à 7.93 minutes pour le pollen urbain. Le pic à 7,93 minutes a été identifié comme étant le limonène.

III.8.2 Comparaison du pollen rural d'Alger et de Djelfa

La figure (III.56) représente les chromatogrammes du pollen rural d'Alger et de Djelfa, cette comparaison nous permet de voir s'il y a de différences entre les deux provenances aux situations géo-climatiques différentes.

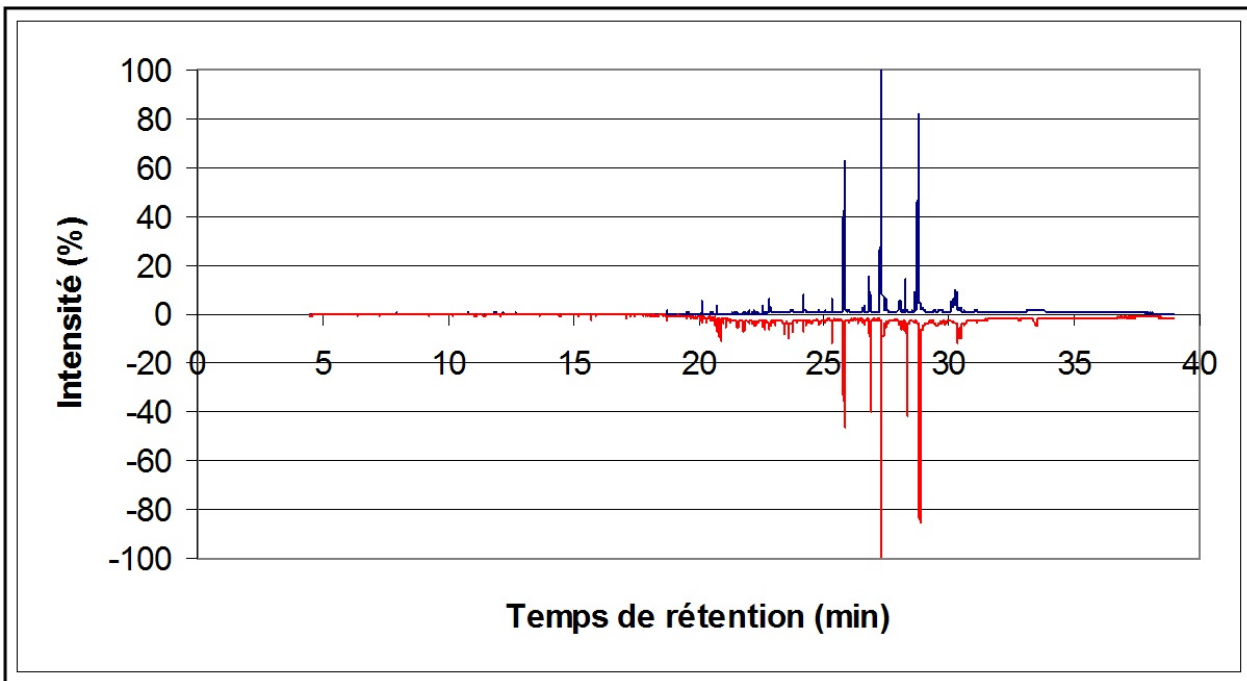


FIGURE III.56 – Comparaison de chromatogrammes du pollen d'Alger rural (bleu) et de Djelfa rural (rouge)

L'observation des chromatogrammes du pollen rural d'Alger et de Djelfa a mis en évidence beaucoup de similitudes, les molécules provenant de la matière extractible de l'exine du pollen sont identiques entre le pollen d'Alger et celui de Djelfa. La principale différence se trouve au niveau de l'intensité des pics présents à 26,78 et 28,22 minutes, on retrouve une concentration plus importante de ces deux molécules dans le grain de pollen provenant de Djelfa. Cela peut s'expliquer par les conditions dans lesquelles se trouvait le pollen avant récolte, la différence de climat ou l'altitude pourraient être à l'origine de ces différences. Cependant nous n'avons pas réussi à déterminer la nature de ces deux molécules.

III.8.3 Identification des molécules de la matière organique extractible de l'exine

Après ozonolyse on constate peu de modifications dans les chromatogrammes obtenus ; il est nécessaire d'observer les différents pics.

L'identification de quelques molécules présentes dans nos extraits a été réalisée selon l'intensité des pics de chacune ; le tableau ci-dessous (Tab.III.35), regroupe l'ensemble des molécules identifiées avec leurs temps de rétention et leurs formules brutes selon la banque de données NIST (Mass Spectra Data), par la comparaison des temps de rétention de leurs spectres UV (210 – 400 nm) avec ceux des standards commerciaux.

TABLE III.35 – Quelques molécules identifiées de l'extrait exinique du pollen non ozonolysé de *Pinus halepensis* Mill.

Nom de la molécule	Temps de rétention (min)	Formule brute
Benzoquinone	6.18	$C_6H_4O_2$
α -pinène	6.37	$C_{10}H_{16}$
Limonène	7.39	$C_{10}H_{16}$
Nonanal	9.06	$C_9H_{18}O$
Alcool phényléthyl	9.21	$C_8H_{10}O$
Alcool salicylique	11.38	$C_7H_8O_2$
4-hydroxyBenzaldéhyde	12.69	$C_7H_6O_2$
Vanilline	13.26	$C_8H_8O_3$
Acide 9-oxononanoïque méthyl ester	13.67	$C_{10}H_{18}O_3$
Benzènepropanol	15.29	$C_9H_{12}O$
Phénol phényléthyl	17.13	$C_{14}H_{14}O$
Phénol,4-(3-hydroxy-1-propenyl)-2-méthoxy	17.27	$C_{10}H_{12}O_3$
Héxadécanol	18.76	$C_{16}H_{34}O$
Octadécanol	20.73	$C_{18}H_{38}O$
Docosanol méthyl ester	24.22	$C_{23}H_{48}O$
Tétracosanol	25.81	$C_{24}H_{50}O$
Héxacosanol	27.26	$C_{26}H_{54}O$
Octacosanol	28.77	$C_{28}H_{58}O$
Campésterol	29.59	$C_{28}H_{48}O$
Sitostérol	30.27	$C_{29}H_{50}O$

III.8.4 Effet de l’ozone sur les extraits de l’exine du pollen rural de *Pinus halepensis* Mill.

La figure (III.57) représente les chromatogrammes du pollen rural d’Alger non ozonolysé et ozonolysé à 1350 ppb pendant 16 heures, cette comparaison est afin de déterminer l’effet de l’exposition exhaustive à une forte concentration de l’ozone sur la structure de l’exine ; une modification de la nature ou la composition de ce dernier est probable.

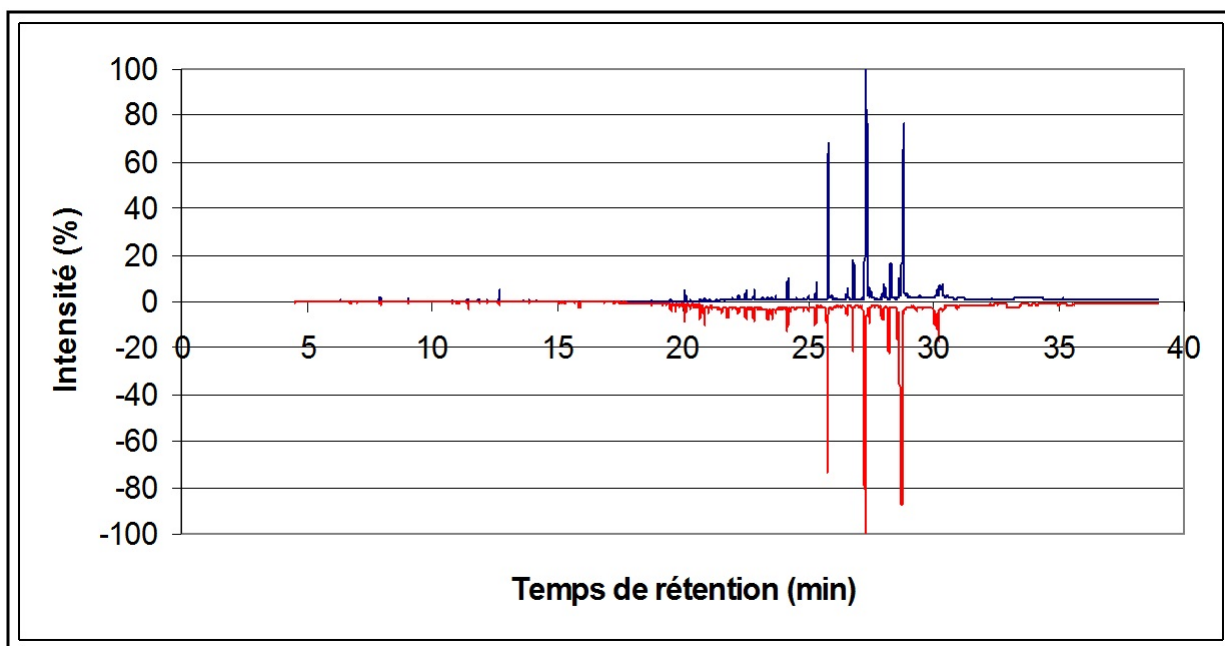


FIGURE III.57 – Comparaison pollen d’Alger rural ozonolysé (bleu) et non ozonolysé (rouge)

Après ozonolyse, on peut constater peu de différences pour les pics majeurs.

Il est nécessaire d’observer les chromatogrammes plus en détail afin de déterminer des différences.

La figure (III.58) représente un agrandissement d’une partie de la figure (III.57). Cette partie est intéressante car elle montre des différences caractéristiques entre un pollen ozonolysé et non ozonolysé.

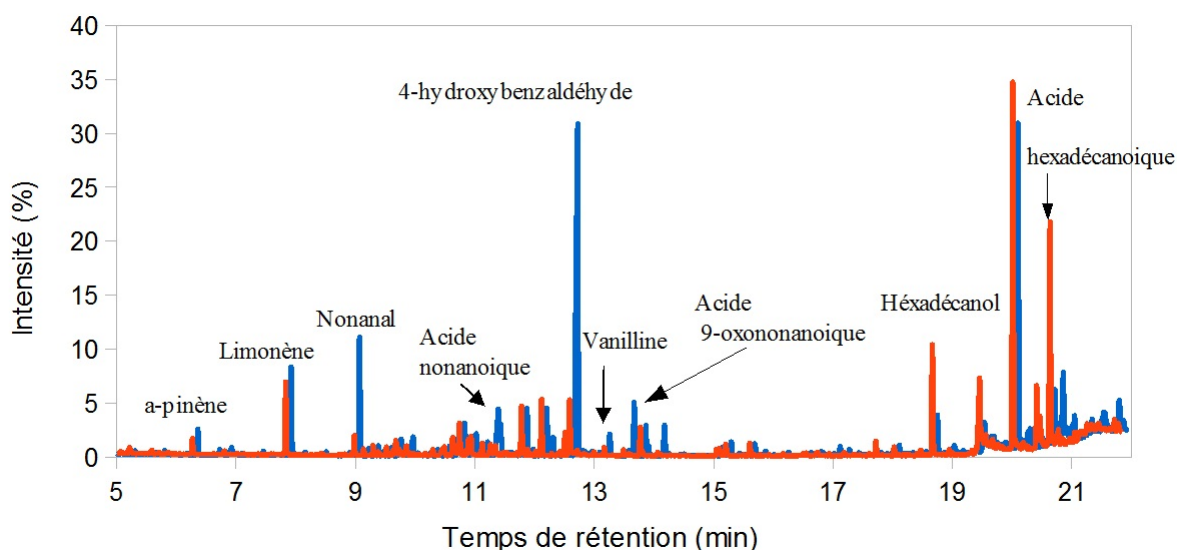


FIGURE III.58 – Mise en évidence de quelques molécules modifiées suite à une ozonolyse, comparaison du pollen ozonolysé (en bleu) et non ozonolysé (en rouge)

Les chromatogrammes du pollen ozonolysé et non ozonolysé sont comparés, on peut observer des augmentations ou diminutions et même une stabilité des quantités de certaines molécules issues de la MOE de l'exine du pollen suite à une pollution à l'ozone (Tab.III.36). Quelques molécules principales identifiées sont présentées dans la figure (III.58).

Le comportement des molécules identifiées suite à l'ozonolyse a été observé par catégorie : une première catégorie d'acides Insaturés carboxyliques qui regroupe : l'acide coumarique ; le limonène et l'acide 9-octadecenoïque ; leur concentration dans l'extrait de l'exine diminue suite à l'ozonolyse appliquée sur le pollen. Tandis que, une augmentation en concentration a été observée pour les molécules suivantes : Acide hydroxy-benzoïque : le nonanal ; Acide phosphorique ; 4-hydroxybenzaldehyde et hydroxyphenol.

Ce résultat nous laisse supposer qu'une telle augmentation de ces composés est liée à la diminution des autres. Ceci nous a orientés dans la recherche des précurseurs chimiques des molécules identifiées liées à l'ozonolyse.

Parmi ces molécules influencées par la pollution à l'ozone, il a été possible de mettre en évidence l'évolution de la concentration de la molécule en fonction de la concentration de l'exposition à l'ozone pour les molécules suivantes : le nonanal (9,06), le 4-hydroxybenzaldehyde (12,69) et la vanilline (13,26).

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication internationale intitulée : Chemical modification of coating of *Pinus halepensis* pollen by ozone exposure » dans la revue « Environmental Pollution » (juillet- 2016).

TABLE III.36 – molécules identifiées extraites de l'exine du pollen de *Pinus halepensis* Mill. après ozonolyse

Temps de rétention (min)	Formule brute	Nom de la molécule	Apparition après exposition à l'ozone O ₃
Acides Dicarboxyliques			
12.5			=
22.1	C18 acid	Acide octadecanoïque	=
23.8	C20 acid	Acide eicosanoïque	=
Acides Insaturés carboxyliques			
19.3	CA	Acide coumarique	↘
21.8	LA	Acide linoléique	=
21.9	OA	Acide 9-octadecénoïque	↘
Alcools Linéaires			
19.5	C16-OH	hexadecanol	=
21.3	C18-OH	octadecanol	=
24.6	C22-OH	docosanol	=
26.1	C24-OH	Tétracosanol	=
26.9	C25-OH	pentacosanol	=
27.6	C26-OH	hexacosanol	=
28.5	C27-OH	heptacosanol	=
29.0	C28-OH	octacosanol	=
Autres composés			
7.9	Limo	limonène	↘
9.0	Nona	nonanal	↗
11.4	H3PO4	Acide phosphorique	↗
12.9	4HBzA	4-hydroxybenzaldehyde	↗
13.2	HP	hydroxy-phenol	↗
15.9	HB	Acide hydroxy-benzoïque	↗
16.3	PA	Acide dihydroxyphenyl acétique	↗
23.0	IPA	Acide isopimarique	=
23.4	DhAA	Acide dehydroabietique	=

III.8.4.1 Cas du 4-hydroxybenzaldéhyde

La figure (III.59) représente l'évolution de l'aire du pic en fonction de la concentration de l'exposition à l'ozone pour le 4-hydroxybenzaldéhyde.

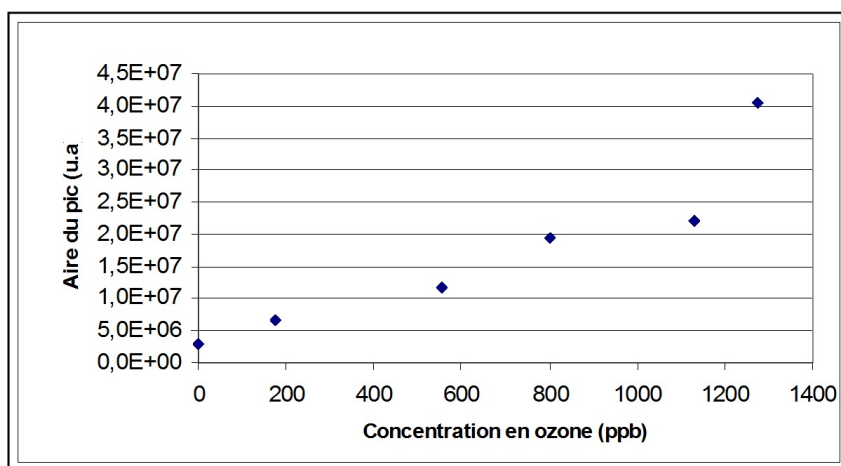


FIGURE III.59 – Evolution de l'aire du pic du 4-hydroxy Benzaldéhyde en fonction de la concentration de l'exposition à l'ozone pour une durée d'exposition de 16h

On observe une forte augmentation de la quantité de 4-hydroxybenzaldéhyde en fonction de la concentration en ozone.

La figure (III.59) montre une augmentation d'un rapport dix de la quantité de 4-hydroxybenzaldéhyde pour le pollen ozonolysé à 1350 ppb pendant 16 heures.

III.8.4.1.1 Étalonnage

La figure (III.60) représente la courbe d'étalonnage du 4-hydroxybenzaldéhyde, l'évolution de la concentration en $\mu\text{g/g}$ de solution en fonction de l'aire.

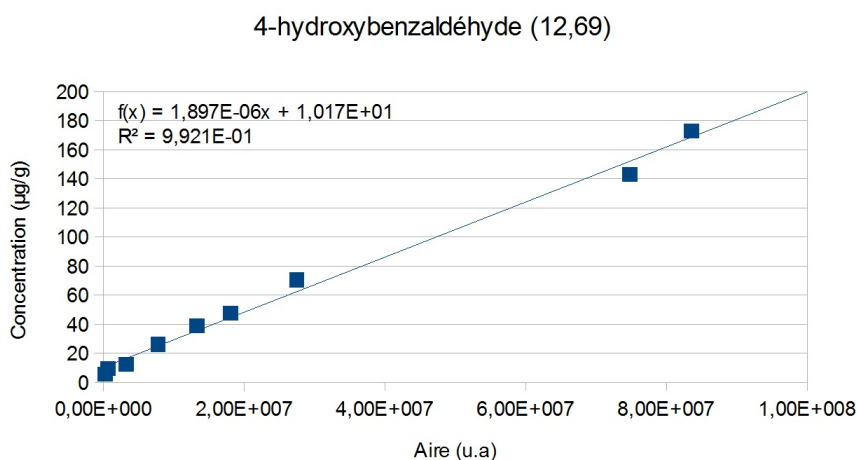


FIGURE III.60 – Courbe d'étalonnage du 4-hydroxybenzaldéhyde

La quantité de 4-hydroxybenzaldéhyde présent dans la MOE du pollen est déterminée à l'aide d'une solution étalon de 4-hydroxybenzaldéhyde. Après avoir étalonné le 4-hydroxybenzaldéhyde à l'aide de solutions étalons de 4-hydroxybenzaldéhyde, nous avons pu déterminer la quantité de 4-hydroxybenzaldéhyde. La concentration en 4-hydroxybenzaldéhyde varie de 14,16 à 101,51 $\mu\text{g/g}$ de solution.

III.8.4.1.2 Voie de formation

La figure (III.61) représente le mécanisme d'ozonolyse général du précurseur du 4-hydroxybenzaldéhyde.

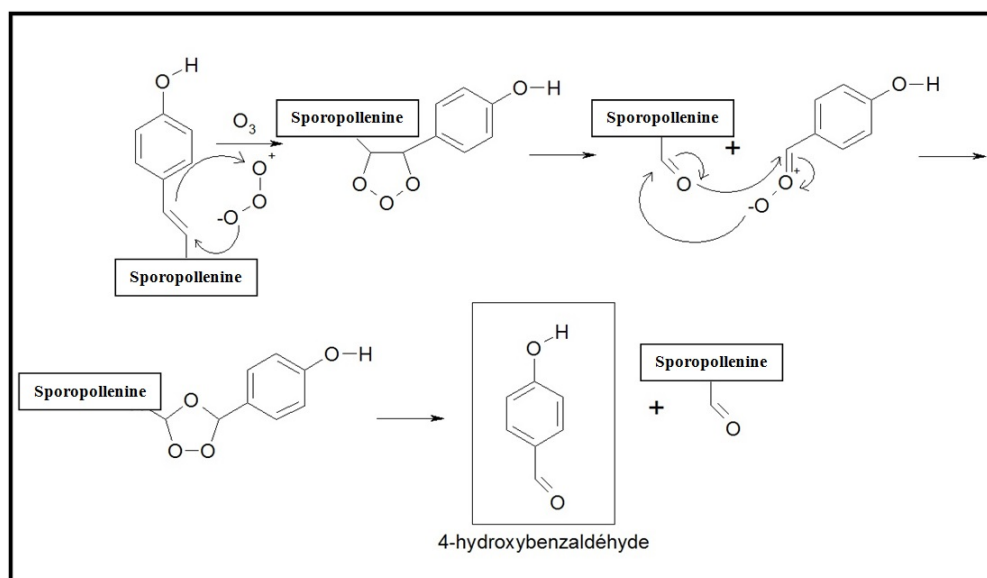


FIGURE III.61 – Mécanisme général de l'ozonolyse du précurseur du 4-hydroxybenzaldéhyde

D'après le mécanisme général d'ozonolyse ci-dessus, nous avons recherché la molécule à l'origine de la formation du 4-hydroxybenzaldéhyde. Dans notre cas le groupement R est remplacé par la sporopollénine.

L'acide para-coumarique est susceptible d'être le précurseur de la formation du 4-hydroxybenzaldéhyde, il a été identifié dans un échantillon traité au BSTFA-TMCS à un temps de rétention de 19.27 (Figure III.62).

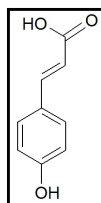


FIGURE III.62 – Formule topologique de l'acide para-coumarique

Chez l'être humain, le 4-hydroxybenzaldéhyde peut être irritant pour la peau, les yeux et les voies respiratoires ; cette molécule est difficilement biodégradable.

III.8.4.2 Cas du nonanal

La figure(III.63) représente l'évolution de l'aire du pic du nonanal en fonction de la concentration de l'exposition à l'ozone.

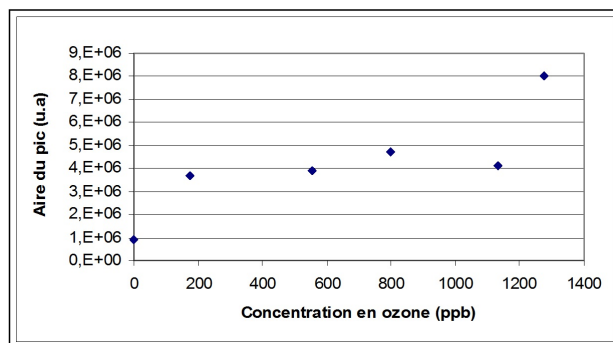


FIGURE III.63 – Evolution de l'aire du pic du nonanal en fonction de la concentration de l'exposition à l'ozone

La même figure nous permet de constater une augmentation d'un facteur huit de la quantité de nonanal entre le pollen non ozonolysé et ozonolysé à 1350 ppb pendant 16 heures.

III.8.4.2.1 Étalonnage

Après l'étalonnage du nonanal, nous avons pu estimer la quantité de nonanal extrait de la MOE. La quantité de nonanal varie entre 1,27 et 23,16 $\mu\text{g/g}$ de solution.

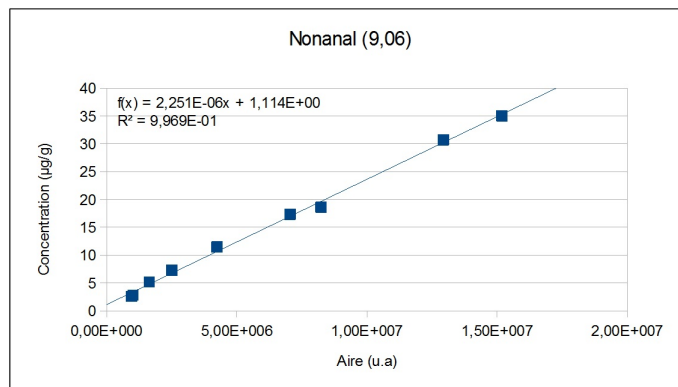


FIGURE III.64 – Courbe d'étalonnage du nonanal

Le nonanal est un produit de dégradation de l'ozonolyse de l'acide oléique. Cette molécule est classée comme toxique pour l'environnement aquatique et les effets sont néfastes à long terme. Chez l'être humain, l'ingestion ou l'inhalation entraîne nausées, vertiges et complications respiratoires. À forte dose, le nonanal va agir sur le système respiratoire, les principaux risques sont l'œdème et l'irritation pulmonaire.

III.8.4.3 Cas de la vanilline

La figure (III.65) représente l'évolution de l'aire sous le pic en fonction de la concentration de l'exposition à l'ozone pour la vanilline.

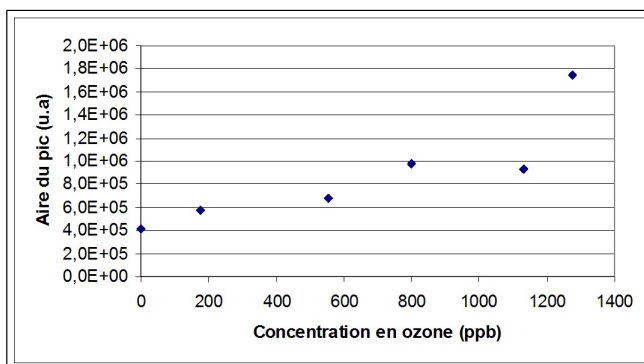


FIGURE III.65 – Evolution de l'aire du pic de la vanilline en fonction de la concentration de l'exposition à l'ozone

On observe une forte augmentation de la quantité de vanilline en fonction de la concentration en ozone. Cette figure montre une augmentation d'un rapport quatre pour le pollen ozonolysé à 1350 ppb pendant 16 heures.

III.8.4.3.1 Voie de formation de la vanilline

La figure (III.66) représente le mécanisme d'ozonolyse général du précurseur de la vanilline.

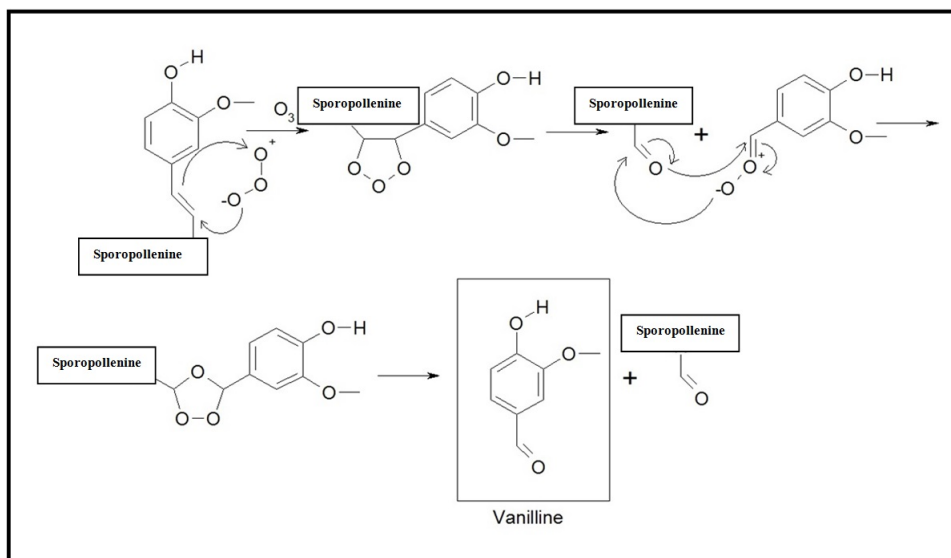


FIGURE III.66 – Mécanisme général de l'ozonolyse du précurseur de la vanilline

D'après le mécanisme d'ozonolyse ci-dessus, nous avons recherchés la molécule à l'origine de la formation de la vanilline.

Le phénol,4-(3-hydroxy-1-propenyl)-2-méthox est susceptible d'être le précurseur de la formation de la vanilline, il a été identifié dans un échantillon traité au BSTFA-TMCS à un temps de rétention de 17.27.

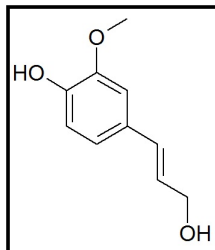


FIGURE III.67 – Formule topologique du Phénol,4-(3-hydroxy-1-propenyl)-2-méthox

III.8.4.4 Identification des molécules au BSTFA-TMCS

La figure (III.68) représente le chromatogramme d'un échantillon du pollen rural d'Alger traité au BSTFA-TMCS. Pour les mêmes conditions d'analyse du GC-MS, les molécules silylés ont un temps de rétention plus élevé que la même molécule non silylé (Tab.III.37).

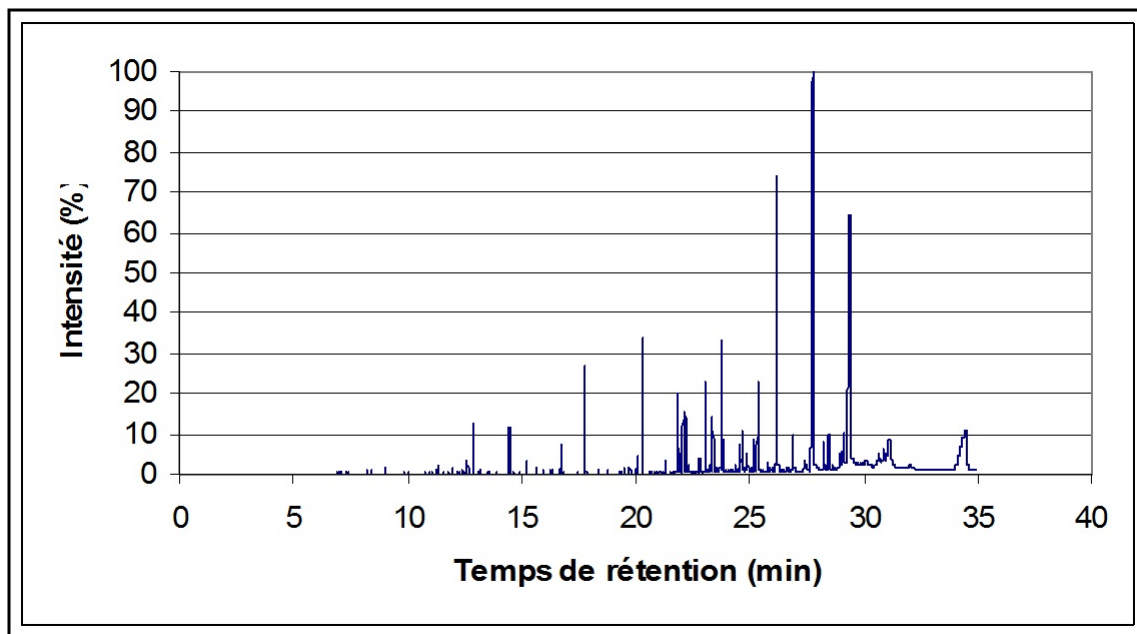


FIGURE III.68 – Chromatogramme du pollen rural d'Alger traité au BSTFA-TMCS

TABLE III.37 – Identification des molécules composantes de la matière organique extractible de l'exine du pollen à l'aide du BSTFA-TMCS

Nom de la molécule	Temps de rétention (min)	Formule brute
Acide hexanoïque	8.49	$C_6H_{12}O_2$
Diéthylèneglycol	11.01	$C_4H_{10}O_3$
Acide benzoïque	11.13	$C_7H_6O_2$
Acide octanoïque	11.34	$C_8H_{16}O_2$
Acide butanedioïque	12.00	$C_4H_6O_4$
Acide nonanoïque	12.65	$C_9H_{18}O_2$
Alcool salicylique	13.59	$C_7H_8O_2$
Acide hexanedioïque	14.50	$C_6H_{10}O_4$
Acide décanoïque	15.27	$C_{10}H_{20}O_2$
Acide dodécanoïque	16.27	$C_{12}H_{24}O_2$
Acide octanedioïque	16.73	$C_8H_{14}O_4$
Acide azélaïque	17.79	$C_9H_{16}O_4$
Acide tétradécanoïque	18.35	$C_{14}H_{28}O_2$
Acide p-coumarique	19.27	$C_9H_8O_3$
Acide pentadécanoïque	19.31	$C_{15}H_{30}O_2$
Héxadécanol	19.46	$C_{16}H_{34}O$
Acide undécanedioïque	19.74	$C_{11}H_{20}O_4$
Acide hexadécanoïque	20.29	$C_{16}H_{32}O_2$
Octadécanol	21.29	$C_{18}H_{38}O$
Acide octadécanedioïque	21.79	$C_{18}H_{34}O_4$
Acide oléique	21.84	$C_{18}H_{34}O_2$
Acide octadécanoïque	22.06	$C_{18}H_{36}O_2$
Acide eicosanoïque	23.72	$C_{20}H_{40}O_2$
Docosanol	24.57	$C_{22}H_{46}O$
Tétracosanol	26.06	$C_{24}H_{50}O$
Héxacosanol	27.50	$C_{26}H_{54}O$
Octacosanol	28.90	$C_{28}H_{58}O$

III.8.4.5 Cas de l'acide oléique

L'acide oléique est un acide carboxylique comprenant une insaturation en C9 comme le montre la figure (III.69). Il fait partie de la famille des acides gras insaturés que l'on retrouve dans de nombreuses huiles végétales.

Selon une étude sur les acides gras, l'acide oléique est l'un des acides gras les plus présents dans l'atmosphère. (Ziemann, 2005 et Zahardis et Petrucci, 2007).

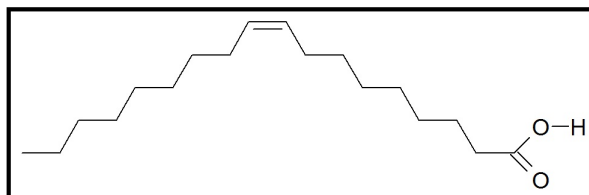


FIGURE III.69 – Formule topologique de l'acide oléique

L'acide oléique a été identifié avec le BSTFA-TMCS pour un temps de rétention de 21,84. D'après la littérature les produits de l'ozonolyse de l'acide oléique sont connus et son mécanisme est décrit dans la figure (III.70).

III.8.4.5.1 Mécanisme réactionnel

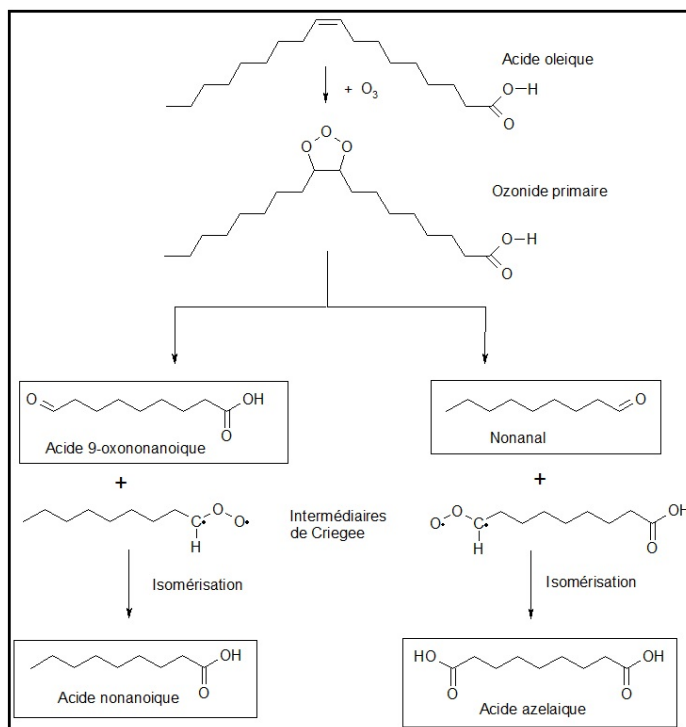


FIGURE III.70 – Mécanisme réactionnel de l'ozonolyse de l'acide oléique faisant interagir les intermédiaires de Crigee (Ziemann, 2005)

La plupart des produits de l'ozonolyse de l'acide oléique ont été identifiés dans la MOE. Les pics à 12,65 ; 17,79 et 21,84 ont été identifiés comme étant respectivement l'acide nonanoïque, l'acide azélaïque et l'acide oléique. Leur présence est confirmée par l'injection et l'analyse de solutions commerciales de ces acides. L'identification de l'acide 9-oxononanoïque n'a pas été possible à partir d'un échantillon traité au BSTFA-TMCS à cause de l'absence de son spectre de masse dans la bibliothèque NIST.

Lors de l'ozonolyse de l'acide oléique des réactions secondaires ont lieu en parallèle mettant en jeu les intermédiaires ou bi-radicaux de Criegee ; qui sont de faible durée de vie. Ils réagissent rapidement avec d'autres molécules (Mendez, 2012). Les pollens de Djelfa ont suivis la même procédure expérimentale que les pollens d'Alger. Les résultats du pollen d'Alger plus concluant ont été préférés à ceux de Djelfa.

III.9 Discussion

La couche externe du grain de pollen, l'exine est composée d'une substance appelée sporopollénine (Till et *al.*, 1989; Reille et Pons, 1990; Jeanne, 1983; Piffanelli et *al.*, 1998; Ahlers et *al.*, 1999 et Bubert et *al.*, 2002). C'est un copolymère de bêta-carotène; un xanthophyl comme l'antheraxanthin et acides gras (Agashe, 2009). Sous l'effet des conditions d'une pollution atmosphérique, cet exine subit une dégradation de sa structure et une modification de sa composition ionique (Dickinson, 1982; Ruffin et *al.*, 1983; Cerceau-Larrival, 1996; Rezanejad et *al.*, 2003; Bist et *al.*, 2004; Rezanejad, 2007; Chichiriccò et Picozzi, 2007; Okuyama et *al.*, 2007; Shahali et *al.*, 2010 et Pasqualini et *al.*, 2011). En profondeur de cette couche de la paroi du pollen d'*Artemisia tridentata*; *Pleum pratense* et *Betula alba*, on pouvait détecter et localiser les conversions chimiques des deux polluants O_3 et NO_2 (Goschnick et Schuricht, 1995).

La matière organique extractible de l'exine du pollen ou M.O.E. est considérée un bon indicateur de la pollution atmosphérique. Celle-ci a été analysée sur le pollen de *Pinus halepensis* Mill. provenant de quatre sites urbains et ruraux de Djelfa et d'Alger; Les analyses effectuées sur cette catégorie de pollen montrent que les molécules issues de la M.O.E. sont présentes et identiques pour le pollen des quatre sites étudiés, on peut cependant observer des quantités supérieures de certaines molécules pour le pollen de Djelfa qui pourraient être expliquées par la situation géographique. Comme on retrouve les molécules caractéristiques de la pollution à l'ozone également pour le pollen urbain. Une exposition à une forte ozonolyse pendant une durée assez longue, modifie considérablement la proportion par diminution ou augmentation de quelques molécules de structure de l'exine de ce pollen comme elle favorise l'apparition par conversion, des molécules liées à la pollution atmosphérique.

Ces résultats ont permis l'identification de nombreuses molécules qui sont caractéristiques de la pollution atmosphérique, ces molécules potentiellement toxiques sont formées, ce qui nous laisse supposer que le pollen de *Pinus halepensis* Mill. , connu par son faible pouvoir allergisant, pourrait être plus allergisant ou plus inflammatoire Cette mise en évidence d'une modification de la M.O.E. du pollen de *Pinus halepensis* Mill. en fonction de la pollution à l'ozone à 1350ppb pendant 16 heures; confirme les résultats de Dominguez et *al.* (1999), qui sont arrivés à conclure qu'une dégradation complète de la sporopollénine a eu lieu après une ozonolyse exhaustive pendant 24h à une température ambiante; les composés obtenus ont été analysés par GC/MS. Des acides dicarboxyliques de nombre réduit d'atome de carbone ont été identifiés comme composants majeurs chez *P. pinaster*, *A. elatior* et *C. annuum* (28.8%, 63.2% et 88.5%, respectivement), du total des composants obtenus. Des acides gras et des n-alkanes, ont été identifiés dans la sporopollénine de *P. pinaster*, *A. elatior* et *B. alba*. Ce résultat de la modification de l'exine du pollen de *Pinus halepen-*

sis Mill. sous l'effet de l'ozone ajoute une explication confirmative de nos résultats obtenus pour les germinations et le profile protéique ; cette modification chimique pourrait conférer un pouvoir allergisant au pollen de notre espèce.

III.10 Analyse de surface par Microscopie électronique à balayage (MEB)

On ne pouvait pas réaliser cette analyse sur le pollen pollué artificiellement vu le coût et le planning des manipulations du laboratoire d'accueil. Il était possible de faire quelques prises d'images sur un pollen blanc (rural et urbain) du site d'Alger. L'observation de l'image prise du pollen urbain montre clairement des agrégats adhérents sur le ballonnet du grain de pollen (Figure III.71).

Quelques particules ont été observées sur le grain de pollen ; en comparaison avec celui pris du site rural et qui ne présente pas la même apparition de ces formes (Figure III.72) ; Ceci est justifié par la provenance urbaine dont ce pollen a été prélevé, elle est réputée par sa grande pollution atmosphérique d'origine automobile.

L'observation microscopique des grains de pollen en milieu pollué a montré la présence d'agrégats particulières à leur surface (Kopferschmitt-Kubler et Pauli, 1999).

Un résultat similaire a été signalé sur l'espèce *C. japonica* par Okuyama et al. (2007), qu'avaient remarqué une forte adhésion des gaz polluants ainsi la présence de différentes particules atmosphériques sur le pollen prélevé d'un site pollué ; d'autre part une acidification par l'acide nitrique a été observée sur la surface du grain de pollen étudié.

III.11 Analyse de surface par TOF-SIMS

Notre objectif dans cette partie de l'étude est bien de détecter et d'identifier l'adhésion d'espèces polluantes : des additifs, surfactants, contaminants des surfaces ou de dégradation de la surface de notre pollen ; mais puisque on avait travaillé sur un pollen concassé il était difficile de faire une interprétation fiable.

Comme il a été avec les analyses au MEB, cette partie a été réalisée sur le pollen non traité provenant d'Alger rural et urbain, afin de voir l'état de nos échantillons.

Plusieurs spectres de masse ont été obtenus, ils ne présentent pas de différences significatives entre le rural et l'urbain (Annexes).

Nous voulions faire le même type d'analyse sur le pollen de la provenance de Djelfa et le pollen traité à l'ozone et au NO_2 , ce n'était pas possible vu le planning trop chargé du laboratoire qui se dispose de l'équipement ; il a fallu attendre des mois pour que nous puissions passer nos échantillons.

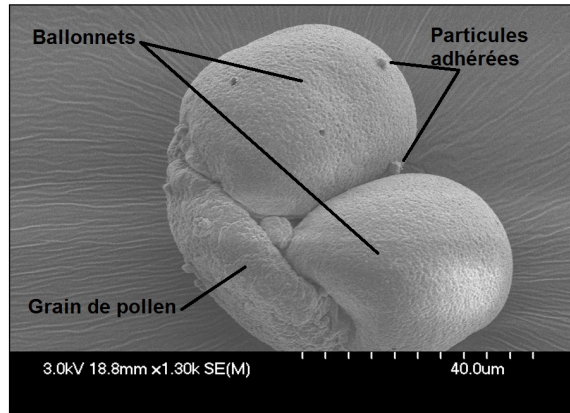
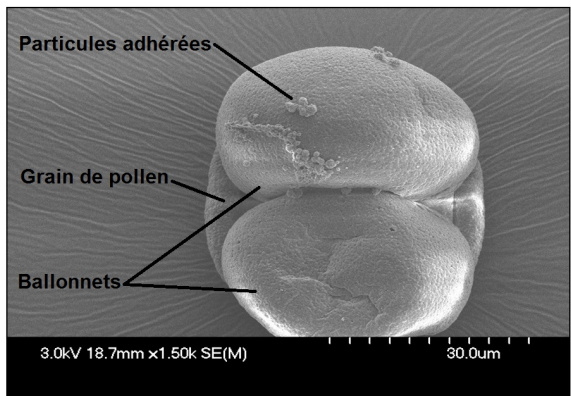


FIGURE III.71 – Pollen urbain d'Alger (*Pinus halepensis* Mill.)

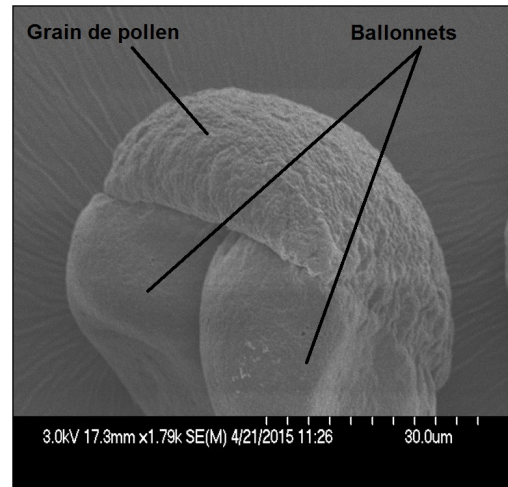
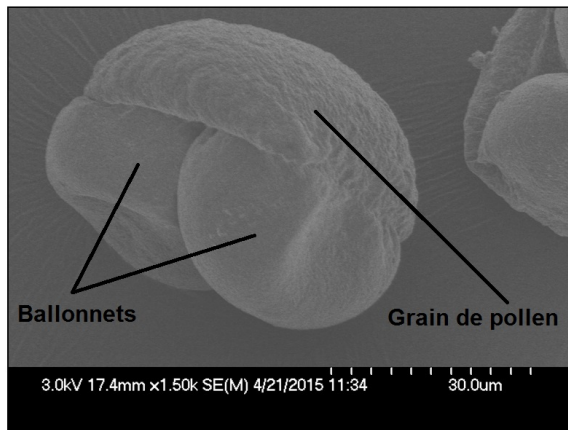


FIGURE III.72 – Pollen rural d'Alger (*Pinus halepensis* Mill.)

CONCLUSION GENERALE

Au terme de ce travail, nous nous proposons de faire le bilan de nos différentes expérimentations et surtout de faire sortir les perspectives de cette recherche. L'intérêt pivot de notre recherche est de mettre en évidence la sensibilité bioindicateur du pollen de *Pinus halepensis* Mill. vis-à-vis deux polluants atmosphériques majeurs qui sont l'ozone (O_3) et le dioxyde d'azote (NO_2). Le choix de cette essence forestière s'est basé essentiellement sur sa réputation écologique, telle que : son aire de répartition en Algérie où elle occupe en dominance le cortège floristique.

L'utilisation de son pollen comme étant un bio-indicateur pour la détection (bio-indication) et la compréhension (mécanismes d'action) des effets de ces deux polluants atmosphériques dans l'environnement et sur le pollen lui-même, est un acquis non négligeable.

Dans la mesure de la bioindication, le pollen indique en excellence toute trace d'éventuelles accumulations ou contaminations en éléments polluants. Une caractérisation de la forme des grains de pollen nous a paru essentielle dans la maîtrise de ce dernier avant de procéder aux analyses suivantes ; les mesures réalisées montrent une homogénéité morphologique du pollen des différents sites choisis à l'exception de celui provenant de Djelfa urbain. L'importance de ce résultat, réside dans l'interprétation des résultats obtenus par la suite ; le fait de travailler sur un échantillon ou des échantillons homogènes confère à cette étude une fiabilité.

L'analyse factorielle fait sortir un effet hautement significatif du facteur « station » ou « provenance » sur les différents paramètres mesurés. Des corrélations significatives entre les mesures biométriques réalisées sur les grains de pollen ont été signalées.

Les résultats obtenus pour les différentes analyses réalisées ont permis de voir que :

Dans l'étude de l'effet : station ; la durée du traitement et la concentration du polluant ; l'analyse statistique fait sortir que : le taux de germination du pollen lyophilisé non traité à l'ozone ; engendre une différence significative entre les stations. Pour la concentration 150ppb et dans l'analyse de l'effet des deux durées de 4 et de 16 heures de traitement ou d'exposition à l'ozone : le pollen pollué provenant d'Alger rural enregistre une différence significative à l'encontre du pollen rural provenant de Djelfa rural, pour ce dernier, aucune différence significative n'a été enregistrée pour les mêmes conditions de concentration et de durée d'exposition. Dans la même analyse d'effet et pour la concentration de 1350ppb ; le taux de germination du pollen rural de Djelfa et d'Alger enregistre une différence significative. L'analyse de l'effet de la concentration du polluant (150 et 1350ppb) utilisé a révélé une différence significative que soit pour le pollen d'Alger rural ou celui de Djelfa rural, pour la durée du traitement de 16heures ; d'après la même analyse, la durée de 4 heures reste moins efficace, aucune signification à signaler pour les deux types de pollen. L'étude

corrélative des facteurs « station »; « durée du traitement »; « concentration du polluant » et « taux de germination », montre une corrélation significative entre facteur « station » avec les deux autres facteurs étudiés : durée du traitement et concentration du polluant, qui eux-mêmes sont bien corrélés.

Dans l'étude de la germination in vitro du pollen, la variabilité de nos résultats pourrait être liée au comportement de notre pollen durant les différentes étapes de préparation pour ce type d'analyse (Déshydratation; Réhydratation; lyophilisation; acclimatation et Ozonolyse). Le taux d'humidité ainsi que la température comptent parmi les principaux facteurs de la réussite d'une mise en culture.

La sensibilité de chaque grain de pollen ou bien sa réaction vis-à-vis l'ozone, s'ajoute comme étant un point précis dans l'explication des résultats obtenus. Par ailleurs, la corrélation entre la durée d'exposition du pollen rural et la concentration de l'ozone utilisée, a été visible; Par contre, et en étudiant l'évolution de la fertilité du pollen en fonction de son ozonolyse; une remise en conservation à 4 C° du pollen rural traité à l'ozone a favorisé sa germination.

L'effet de la lyophilisation seule ainsi que son effet combinée au traitement à l'ozone, influe négativement sur la fertilité du pollen rural; ce qui nous laisse supposer que l'état d'hydratation du pollen le fragilise vis-à-vis de ce polluant.

Le facteur « station » marque son effet significatif sur le paramètre du taux de fertilité des grains de pollen de *Pinus halepensis* Mill. de nos échantillons, l'analyse de la variabilité du même paramètre pour l'ensemble des stations de l'étude a révélé une homogénéité.

La mesure de l'acidification de la surface des grains de pollen de notre espèce montre bien que l'effet de l'exposition à l'ozone n'a pas affecté significativement le pH du pollen rural, on a pu observer une légère fluctuation. Le pollen urbain marque une tendance acide ce qui prouve l'effet acidifiant de la pollution atmosphérique sur la paroi du pollen dans les conditions de l'environnement;

Les résultats du dosage des protéines hydrosolubles du pollen de notre étude dans des extraits réalisés en H₂O, PBS et en TUC montre que la fraction protéique est faible. Les différences enregistrées de concentration de ces protéines sont liées aux différentes extractions; l'extraction en TUC est plus efficace. Ces différences sont liées aussi aux sites de récolte. Le fait de concasser les grains de pollen a augmenté considérablement la fraction protéique extraite. Les contenus qualitatifs (1D et 2D) en protéine sont différents entre Djelfa et Alger; aucune modification a signalée du profil protéique par traitement à l'ozone; pour le traitement en NO₂, l'extraction en PBS ne présente pas de différence significative du nombre de bandes pour l'ensemble des durées du traitement : 4; 8 et 24 heures.

Dans l'étude de la bio indication du pollen de *Pinus halepensis* Mill. en fonction de l'état de

son exine soumis à une ozonolyse exhaustive prolongée, une première mise en évidence d'une modification de cette dernière en fonction de la pollution artificielle à l'ozone a été observée. Les espèces identifiées sont potentiellement toxiques ce qui pourrait rendre notre pollen plus allergisant ; L'analyse faite par le MEB sur le pollen urbain et le pollen rural a permis de voir des agrégats et des particules adhérents sur le ballonnet et le grain de pollen provenant du site urbain réputé pour sa grande pollution atmosphérique d'origine automobile.

L'analyse de surface par TOF-SIMS a permis d'obtenir plusieurs spectres de masse, ils ne présentent pas de différences significatives entre le rural et l'urbain.

Perspectives :

L'utilisation du pollen de *Pinus halepensis* Mill. comme outil biologique dans la bio-surveillance végétale, ajoute un appui sur l'exploitation des potentiels naturels dont dispose notre pays ; ceci afin d'apporter des solutions aux grands enjeux environnementaux de notre époque.

Afin que cette étude soit plus confirmée, il aurait fallu aussi prendre des mesures de la pollution réelles sur les différents sites de nos échantillons pour une meilleure comparaison et compréhension de l'influence de la pollution atmosphérique sur cette catégorie de pollen.

Dans la perspective de notre travail, des études ultérieures sont recommandées sur :

1. Les mesures du pH sur des quantités plus petites en pollen ;
2. Une caractérisation morphologique du pollen après son exposition aux polluants au laboratoire ;
3. Tester la fertilité du pollen pollué ;
4. Analyses aux MEB sur du pollen traité à l'ozone et au NO_2 ;
5. Mesure de fertilité sur un pollen traité ;
6. Analyses au TOF-SIMS sur ce type volumineux de pollen ;
7. Essai de germination sur du pollen traité au NO_2 .

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Adekola, F. A., Salami, N., and Lawai, K. A. (2002). Assessment of the Bioaccumulation Capacity of Scots Pine (*Pinus Sylvestris* L) Needles for zinc, cadmium and sulphur in Ilorin and Ibadan Cities (Nigeria), Nig. J. Pure and Appl. Sci, 17, 1297-1301.
2. Agashe, S. N., and Caulton, E. (2009). Pollen and spores. Applications with special emphasis on aerobiology and allergy, 167-224.
3. Agnan, Y. (2013). Bioaccumulation et bioindication par les lichens de la pollution atmosphérique actuelle et passée en métaux et en azote en France : sources, mécanismes et facteurs d'influence, 306.
4. Ahlers, F., Lambert, J., and Wiermann, R. (1999). Structural elements of sporopollenin from the pollen of *Torreya californica* Torr.(Gymnospermae) : Using the ¹H-NMR technique. Zeitschrift für Naturforschung C, 54(7-8), 492-495.
5. Alexander, M. P. (1969). Differential staining of aborted and nonaborted pollen. Stain technology, 44(3), 117-122.
6. A.N.S.E.S. (Agence Nationale de Sécurité et de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail), 2013 : Evaluation des risques liés aux milieux aériens. Rapport d'Expertise Collective. Session »Pollens » pour la saison Octobre 2013. P.174.
7. Armentia, A., Quintero, A., Fernandez-Garcia, A., Salvador, J., and Martin-Santos, J. M. (1990). Allergy to pine pollen and pinon nuts : a review of three cases. Annals of allergy, 64(1), 49-53.
8. Bao, L., ZhiGang, Z., Wei, C., JunJie, G., JiaYe, L., and Jie, Z. (2009). Tests on in vitro germination of *Betula luminifera* pollens. Guangxi Zhiwu/Guihaia, 29(2), 264-268.
9. BEDEL, J. (1986). Aménagement et gestion des peuplements de pin d'Alep dans la zone méditerranéenne française. Options Méditerranéennes. Serie Etude CIHEAM, 86(1), 109-125.

10. Behrendt, H., Becker, W. M., Fritzsche, C., Sliwa-Tomczok, W., Tomczok, J., Friedrichs, K. H., and 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(1-3), 69-74.

11. Behrendt, H., Tomczok, J., Sliwa-Tomczok, W., Kasche, A., Ebner von Eschenbach, C., Becker, W. M., and 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(2-4), 414-418.

12. Belamri, M., et Benrachedi, K. (2010). Utilisation de l'Analyse par Activation Neutronique pour le contrôle de la pollution de l'air d'Alger. *Pollution atmosphérique*, 52(207), 291-296.

13. Belot, Y. (1976). Etude de la captation des polluants atmosphériques par les végétaux. Centre d'Etudes Nucleaires de Fontenay-aux-Roses.

14. Bernard, J. M. (2004). Simulation expérimentale de la chimie atmosphérique de Titan : Suivi des espèces produites et comparaison à un modèle cinétique (Doctoral dissertation, Université Paris-Diderot-Paris VII).

15. Biggs, A. R., and Davis, D. D. (1981). Foliar response of ten tree species exposed to SO air pollution.

16. Bist, A., Pandit, T., Bhatnagar, A. K., and Singh, A. B. (2004). Variability in protein content of pollen of Castor bean (*Ricinus communis*) before and after exposure to the air pollutants SO and NO. *Grana*, 43(2), 94-100.

17. Bocquel, C. (1995). Technologie de conservation et de stockage du pollen de Bouleau (*Betula verrucosa*) Germination in vitro de pollen frais et pollue : action des facteurs environnementaux. *Grana*, 34(6), 413-420.

18. Bohne, G., Woehlecke, H., and Ehwald, R. (2005). Water relations of the pine exine. *Annals of botany*, 96(2), 201-208.

- 19.** Bonnefille, R., et Riollet, G. (1980). Pollens de savanes d'Afrique orientale. Paris : Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, 129 p.
- 20.** Bosch-Cano F., (2012) : Comparaison des flux polliniques allergisants selon un degré d'urbanisation et association entre grains de pollen et polluants atmosphériques de type éléments traces métalliques (ETMs). Thèse de Doctorat. UFR des sciences et techniques de l'université de Franche-Comte. Laboratoire chrono-Environnement (UMR CNRS/UFC 6249, Usc INRA),166.
- 21.** Bots, M. and Mariani, C. (2005). Pollen viability in the field. Research Reports No. CGM, 5.
- 22.** Boughedaoui, M., Kerbachi, R., Kessali, D., et Joumard, R. (2004). Mesure de la pollution plombifère dans l'air ambiant d'Alger.N°181, 2268-3798.
- 23.** Brifoux G., (1987) : La démarche expérimentale de l'écriture du protocole à l'exploitation des résultats.I.T.C.F., F.E.R.T., I.T.G.C. P.124
- 24.** Bubert, H., Lambert, J., Steuernagel, S., Ahlers, F., and Wiermann, R. (2002). Continuous decomposition of sporopollenin from pollen of *Typha angustifolia* L. by acidic methanolysis. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(11-12), 1035-1041.
- 25.** Burton, K. W., and Morgan, E. (1983). The influence of heavy metals upon the growth of Sitka spruce in South Wales forest. I. Upper critical and foliar concentrations. *Plant and Soil*, 73, 327-336.
- 26.** Bytnerowicz, A., and Grulke, N. E. (1993). Physiological effects of air pollutants on western trees. *ECOLOGICAL STUDIES*, 1(97), 183-183.
- 27.** Calzoni, G. L., Antognoni, F., Pari, E., Fonti, P., Gnes, A., and Speranza, A. (2007). Active biomonitoring of heavy metal pollution using *Rosa rugosa* plants. *Environmental Pollution*, 149(2), 239-245.

28. Carneiro, M. F. H., Ribeiro, F. Q., Fernandes-Filho, F. N., Lobo, D. J. A., Barbosa, F., Rhoden, C. R., and Carvalho-Oliveira, R. (2011). Pollen abortion rates, nitrogen dioxide by passive diffusive tubes and bioaccumulation in tree barks are effective in the characterization of air pollution. *Environmental and Experimental Botany*, 72(2), 272-277.

29. Cartes de localisation des sites d'Alger NJ 31-14 et NJ 31-15 (Ech. 1/250 000).

30. Carte de localisation des sites de Djelfa (Carte DJELFA Feuille N° 342 Ech. 1/50).

31. Cerceau-Larrival, M. T., Nilsson, S., Cauneau-Pigot, A., Berggren, B., Derouet, L., Verhille, A. M., and Carbonnier-Jarreau, M. C. (1991). The influence of the environment (natural and experimental) on the composition of the exine of allergenic pollen with respect to the deposition of pollutant mineral particles. *Grana*, 30(2), 532-545.

32. Cerceau-Larrival, M. T., Bocquel, C., Carbonnier-Jarreau, M. C., and Verhille, A. M. (1996). Pollen : bio-indicator of pollution. *Journal of Aerosol Science*, 27, S227-S228.

33. Charrier, A. (1990). Pollen et ressources génétiques. *Bulletin de la Société Botanique de France. Actualités Botaniques*, 137(2), 101-104.

34. Chichiriccò, G., and Picozzi, P. (2007). Reversible inhibition of the pollen germination and the stigma penetration in *Crocus vernus* ssp. *vernus* (Iridaceae) following fumigations with NO_2 , CO , and O_3 gases. *Plant Biology*, 9(06), 730-735.

35. Colas, F., et Mercier, S. (1994). Établissement d'une gamme de viabilité du pollen de pin gris. Note de recherche forestière N° 58, 8.

36. Colas, F., et Mercier, S. (2000). Évaluation et maintien de la viabilité des pollens utilisés dans le programme d'amélioration des arbres. Mémoire de recherche forestière N° 135. Projet de recherche n° 3420-0205-212S :« Biologie et conservation du pollen d'arbres forestiers ».

37. Comtois, P., and Schemenauer, R. S. (1991). Tree pollen viability in areas subject to high pollutant deposition. *Aerobiologia*, 7(2), 144-151.

- 38.** Dany B. (1983). la récolte moderne du pollen . Ed européennes apicoles Bruxelles . 140p.
- 39.** De Ridder, M., Haneca, K., Beeckman, H., Samson, R., and Van Acker, J. (2007). Dendrochronological monitoring of air pollution in the Ghent canal area (Belgium). In TRACE 2006 : Tree Rings in Archaeology, Climatology and Ecology (Dendrosymposium 2006) (Vol. 5). Forschungszentrums Jülich.
- 40.** Defranceschi, M. (2006). La chimie au quotidien. Ellipses Edition Marketing S.A.,239.
- 41.** Desalme, D. (2011). Contamination atmosphérique par les hydrocarbures aromatiques polycycliques : toxicité et devenir du phénanthrene dans des systemes sol-plante-microorganismes.Thèse. U.F.R. Sciences, Techniques et Gestion de l'Industrie. Ecole doctorale « Homme, Environnement, Société ».Laboratoire Chrono-environnement (UMR CNRS/UFC 6249, Usc INRA),125.
- 42.** Després, V. R., Huffman, J. A., Burrows, S. M., Hoose, C., Safatov, A. S., Buryak, G., and Jaenicke, R. (2012). Primary biological aerosol particles in the atmosphere : a review. Tellus B, 64.
- 43.** Dmuchowski, W., Gozdowski, D., Baczewska, A. H., and Bragoszewska, P. (2011). The comparison bioindication methods in the assessment of environmental pollution with heavy metals. Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych, (50).
- 44.** Dmuchowski, W., Kurczynska, E. U., and Wloch, W. (1998). Chemical composition of needles and cambial activity of stems of Scots pine trees affected by air pollutants in Polish forests.
- 45.** Dogan, Y., Durkan, N., and Baslar, S. (2007). Trace element pollution biomonitoring using the bark of *Pinus brutia* (Turkish red pine) in the Western Anatolian part of Turkey. Trace elements and Electrolytes, 24(3), 146.
- 46.** Domínguez, E., Mercado, J. A., Quesada, M. A., and Heredia, A. (1999). Pollen sporopollenin : degradation and structural elucidation. Sexual Plant Reproduction, 12(3), 171-178.

- 47.** Dumont-BéBoux, N., Anholt, B., and Von Aderkas, P. (1999). In vitro Douglas fir pollen germination : influence of hydration, sucrose and polyethylene glycol. *Annals of forest science*, 56(1), 11-18.
- 48.** Fountain, D. W., and Cornford, C. A. (1991). Aerobiology and allergenicity of *Pinus radiata* pollen in New Zealand. *Grana*, 30(1), 71-75.
- 49.** Franze, T., Weller, M. G., Niessner, R., and Pöschl, U. (2003). Enzyme immunoassays for the investigation of protein nitration by air pollutants. *Analyst*, 128(7), 824-831.
- 50.** Garrec, J. P. (1996). La pollution des forets méditerranéennes, exemple de pollution locale par les embruns et de pollution globale par l'ozone, forêt Bletliter, neennet.XVII, n° 2.
- 51.** Garrec, J. P., et Van Haluwyn, C. (2002). Biosurveillance végétale de la qualité de l'air e Concepts, méthodes et applications (Air Quality Biomonitoring with Plants e Concepts, Methods and Applications). Lavoisier, Paris, 117.
- 52.** Georgakopoulos, D. G., Després, V., Fröhlich-Nowoisky, J., Psenner, R., Ariya, P. A., Pósfai, M., and Hill, T. C. J. (2008). Microbiology and atmospheric processes : biological, physical and chemical characterization of aerosol particles. *Biogeosciences Discussions*, 5(2), 1469-1510.
- 53.** Gillet S., (2010) : Chimie Organique. Catégorie paramédicale. Formation de bachelier en Biologie Médicale 1ère année. Haute Ecole. Charlemagne, 234.
- 54.** González, M. Á., Vivanco, M. G., Palomino, I., Garrido, J. L., Santiago, M., and Bessagnet, B. (2012). Modelling some heavy metals air concentration in Europe. *Water, Air, and Soil Pollution*, 223(8), 5227-5242.
- 55.** Gorenflot, R. (1997). Biologie vegetale : plantes superieures, Appareil Vegetatif 6^{eme} Ed. de l'abrégé. Enseignement des sciences de la vie. Masson édition .286p.
- 56.** Goschnick, J., and Schuricht, J. (1995). The influence of NO₂ on allergenic pollen studied by secondary ion mass spectrometry. *Journal of Aerosol Science*, 26, S885-S886.

57. Goschnick, J., and Schuricht, J. (1996). Surface and depth analysis of pollen treated with atmospheric trace gases. *Journal of Aerosol Science*, 27, S229-S230.
58. Gottardini, E., Cristofolini, F., Paoletti, E., Lazzeri, P., and Pepponi, G. (2004). Pollen viability for air pollution bio-monitoring. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 49(1-3), 149-159.
59. Gottardini, E., Cristofori, A., Cristofolini, F., Maccherini, S., and Ferretti, M. (2008). Ambient levels of nitrogen dioxide (NO₂) may reduce pollen viability in Austrian pine (*Pinus nigra* Arnold) trees—correlative evidence from a field study. *Science of the total environment*, 402(2), 299-305.
60. Gregušková, E., and Mičieta, K. (2013). Phytoindication of the ecogenotoxic effects of vehicle emissions using pollen abortion test with native flora. *Pol J Environ Stud*, 22(4), 1069-1076.
61. Guedes, A., Ribeiro, N., Ribeiro, H., Oliveira, M., Noronha, F., and Abreu, I. (2009). Comparison between urban and rural pollen of *Chenopodium alba* and characterization of adhered pollutant aerosol particles. *Journal of Aerosol Science*, 40(1), 81-86.
62. Guerin, B., Bousquet, Evard J., Guerin F., Nolard N., Peltre G., et sell Y (1993). Pollen et allergies. Ed. Allerbio . 279 p.
63. Hecker, R. J., and McClintock, M. (1988). Sugarbeet pollen germination in vitro. *Journal of sugar beet research*. Vol. 25 N° 1.
64. Helander, M. L., Savolainen, J., and Ahlholm, J. (1997). Effects of air pollution and other environmental factors on birch pollen allergens. *Allergy*, 52(12), 1207-1214.
65. Heller R., Esnault R. et Lance C. (1995). *Physiologie végétale.2.Développement. 5^{eme} Edition* Masson. Pp 240-251.
66. Higgins, B. G., Francis, H. C., Yates, C., Warburton, C. J., Fletcher, A. M., Pickering, C. C., and Woodcock, A. A. (2000). Environmental exposure to air pollution and allergens and peak flow changes. *European Respiratory Journal*, 16(1), 61-66.

- 67.** Iannotti, O., Mincigrucci, G., Bricchi, E., and Frenguelli, G. (2000). Pollen viability as a bio-indicator of air quality. *Aerobiologia*, 16(3-4), 361-365.
- 68.** Lu, S., Ren, J., Hao, X., Liu, D., Zhang, R., Wu, M., and Wang, Q. (2014). Characterization of protein expression of *Platanus* pollen following exposure to gaseous pollutants and vehicle exhaust particles. *Aerobiologia*, 30(3), 281.
- 69.** Janssens, I. A., Medlyn, B., Gielen, B., Laureysens, I., Jach, M. E., Van Hove, D., and Ceulemans, R. (2005). Carbon budget of *Pinus sylvestris* saplings after four years of exposure to elevated atmospheric carbon dioxide concentration. *Tree Physiology*, 25(3), 325-337.
- 70.** Jarosz, N. S. M. (2003). Etude de la dispersion atmosphérique du pollen de maïs : contribution à la maîtrise des risques de pollinisation croisée (Doctoral dissertation, Paris, Institut national agronomique Paris-Grignon).
- 71.** Jato, M. V., Rodríguez, F. J., and Seijo, M. C. (2000). *Pinus* pollen in the atmosphere of Vigo and its relationship to meteorological factors. *International journal of biometeorology*, 43(4), 147-153.
- 72.** Kadik, B. (1983). Contribution à l'étude du Pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) en Algérie Ecologie, Dendrométrie et Morphologie. Thèse Doc. Ès Science Univ.Aix-Marseille,313.
- 73.** Kadik, B. (1987). Contribution à l'étude du Pin d'Alep(*Pinus halepensis* Mill.) en Algérie : écologie, dendrométrie, morphologie (Doctoral dissertation).
- 74.** Kalbande, D. M., Dhadse, S. N., Chaudhari, P. R., and Wate, S. R. (2008). Biomonitoring of heavy metals by pollen in urban environment. *Environmental monitoring and assessment*, 138(1-3), 233-238.
- 75.** Kecir S.E. et Hadjari A.K. (2011). Contribution à l'étude de la variabilité morphologique et de la viabilité des grains de pollen de *Pinus halepensis* Mill. de trois provenances forestières algériennes : effet des variations thermiques et de la pollution atmosphérique –Thèse, Djelfa (Algérie).
- 76.** Khaldi F. (2013). Mécanismes d'action des polluants chimiques industriels (engrais et NOx) sur des bio-indicateurs de pollution (Mousses et Lichens). Thèse de Doctorat. Badji Mokhtar-Annaba University,155.

77. Khedidji, S., Ladj, R., and Yassaa, N. (2013). A wintertime study of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in indoor and outdoor air in a big student residence in Algiers, Algeria. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(7), 4906-4919.
78. Khedidji, S., Ladj, R., and Yassaa, N. , (2011) . Monitoring of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Atmospheric Aerosols of Algiers City Area : Occurrence and Size Distribution. *International Conference on Biology, Environment and Chemistry IPCBEE vol.24*.
79. Knapp, D. R. (1979). *Handbook of analytical derivatization reactions*. John Wiley and Sons.
80. Kopferschmitt-Kubler M.C. et Pauli G. (1999). Pollens et pollution. *Rev. ft. Allergol.* 39(4), 283-288.
81. Kormuták, A., Vooková, B., Cemek, V., Bolecek, P., and Gömöry, D. (2008). Pollen size and viability in hybrid swarm populations of *Pinus mugo Turra* and *Pinus sylvestris* L. *Thaiszia J Bot, Košice*, 18, 93-100.
82. Kurczyńska, E. U., Dmuchowski, W., Włoch, W., and Bytnerowicz, A. (1997). The influence of air pollutants on needles and stems of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) trees. *Environmental Pollution*, 98(3), 325-334.
83. Ladj, R., Yassaa, N., Balducci, C., and Cecinato, A. (2010). Organic components of Algerian desert dusts. *Chemosphere*, 81(7), 925-931.
84. Ladj, R., Yassaa, N., Balducci, C., and Cecinato, A. (2014). Particle size distribution of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) in urban and industrial aerosol of Algiers, Algeria. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(3), 1819-1832.
85. Ladj, R., Yassaa, N., Balducci, C., Cecinato, A., and Meklati, B. Y. (2009a). Annual variation of particulate organic compounds in PM 10 in the urban atmosphere of Algiers. *Atmospheric Research*, 92(2), 258-269.

86. Ladji, R., Yassaa, N., Balducci, C., Cecinato, A., and Meklati, B. Y. (2009b). Distribution of the solvent-extractable organic compounds in fine (PM 1) and coarse (PM 1–10) particles in urban, industrial and forest atmospheres of Northern Algeria. *Science of the total environment*, 408(2), 415-424.

87. Ladji, R., Yassaa, N., Cecinato, A., and Meklati, B. Y. (2007). Seasonal variation of particulate organic compounds in atmospheric PM 10 in the biggest municipal waste landfill of Algeria. *Atmospheric Research*, 86(3), 249-260.

88. Leisner, C. P., and Ainsworth, E. A. (2012). Quantifying the effects of ozone on plant reproductive growth and development. *Global Change Biology*, 18(2), 606-616.

89. Leroyer C. et Allenet G. (2004). *La palynologie*. Centre National de Préhistoire, Périgieux. Association d'Aéropalynologie, perigourdine.

90. LEZINE A.M., 2011 - *Introduction à la Palynologie*. Edit, Société Géologie Nancy, France .

91. Lhuissier, F. (1998). *Les pollens biomarqueurs de la pollution atmosphérique? Approche microscopique et biochimique (Doctoral dissertation)*. Université de Rouen Normandie.France

92. Lhuissier, F., Lefebvre, F., Gibouin, D., Demarty, M., Thellier, M., and Ripoll, C. (2000). Secondary ion mass spectrometry imaging of the Δ exation of ^{15}N -labelled NO in pollen grains. *Journal of microscopy*, 198(Pt 2), 108-115.

93. Louveaux J., Maurizio A., et Vorwohl G. (2005). *Les méthodes de la méliisso-palynologie*. Commission Internationale de Botanique Apicole de l'U.L.S.B., Institut National de la Recherche Agronomique, mailto :cetam@club-internet.fr

94. Maatoug, M., Ait Hammou, M., et Sarmoum, M. (2011). Intérêt de Biosurveillance végétale de la pollution atmosphérique pour les pays en émergence. Exemple de l'Algérie. *Pollution Atmosphérique*, 3, 71.

- 95.** Maizi, N., Alioua, A., et Tahar, A. (2012). Jumelage des bio-indicateurs et d'un réseau de surveillance de la qualité de l'air pour la détection de la pollution par le SO_2 dans la région de Annaba (Algérie). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 16(2), 149.
- 96.** Majd, A., Chehregani, A., Moin, M., Gholami, M., Kohno, S., Nabe, T., and Shariatzade, M. A. (2004). The effects of air pollution on structures, proteins and allergenicity of pollen grains. *Aerobiologia*, 20(2), 111-118.
- 97.** Marchanel P. (1994) L'homme et l'abeille. Ed. Sud, Paris Pp. 37-40.
- 98.** Martin, J., and Maystre, L. Y. (1988). Santé et pollution de l'air. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes.
- 99.** Mendez, M. (2012). Étude expérimentale de la réactivité hétérogène de particules ultrafines d'acides gras et modélisation de la composition chimique des aérosols à l'échelle régionale. Thèse de doctorat. Université Lille 1 Sciences et technologies. P. 261
- 100.** Mičieta, K., and Murín, G. (1998). Three species of genus *Pinus* suitable as bioindicators of polluted environment. *Water, Air, and Soil Pollution*, 104(3-4), 413-422.
- 101.** Misset, M. T., Gourret, J. P., et Huon, A. (1982). Le pollen d'*Ulex* L.(Papilionoideae) : morphologie des grains et structure de l'exine. *Pollen Spores*, 24(3-4), 369-395.
- 102.** Motta, A. (2004). Effet de polluants atmosphériques gazeux sur l'allergénicité du pollen de *Phleum pratense* et sur la réponse allergique respiratoire (Doctoral dissertation, Paris VII). Spécialité : Toxicologie. P.122
- 103.** NAAS O.(2006). Analyse des grains de pollen de quelques espèces steppiques par microscopie électronique à balayage.thèse de magistère (Djelfa-ALGERIE) p.128.
- 104.** Nahal, I. (1962). Le Pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.). Étude taxonomique, phytogéographique, écologique et sylvicole.Thèse Ing. Univ. Montpellier, 206.

105. Nejari, C., Filleul, L., Zidouni, N., Laid, Y., Atek, M., El Meziane, A., et Tessier, J. F. (2003). La pollution atmosphérique un nouveau risque respiratoire pour les villes du sud. INT J TUBERC LUNG DIS, 7(3), 223-231.

106. Nilsson, J. (1988). Critical loads for sulphur and nitrogen. In Air pollution and Ecosystems (pp. 85-91). Springer Netherlands.

107. Nilsson, S., and Berggren, B. (1991). Various methods to determine air pollutants on pollen grains. Grana, 30(2), 553-556.

108. Okuyama, Y., Matsumoto, K., Okochi, H., and Igawa, M. (2007). Adsorption of air pollutants on the grain surface of Japanese cedar pollen. Atmospheric Environment, 41(2), 253-260.

109. O.N.M. , 2014 : Office National Météorologique, Alger.

110. Paoletti, E., De Marco, A., and Racalbutto, S. (2007). Why should we calculate complex indices of ozone exposure ? Results from Mediterranean background sites. Environmental Monitoring and Assessment, 128(1-3), 19-30.

111. Pasqualini, S., Tedeschini, E., Frenguelli, G., Wopfner, N., Ferreira, F., D'Amato, G., and Ederli, L. (2011). Ozone affects pollen viability and NAD (P) H oxidase release from *Ambrosia artemisiifolia* pollen. Environmental Pollution, 159(10), 2823-2830.

112. Peltre, G., Derouet, L., and Cerceau-Larrival, M. T. (1991). Model treatments simulating environmental action on allergenic *Dactylis glomerata* pollen. Grana, 30(1), 59-61.

113. Pernelet-Joly, V. (2008). La composition chimique des particules atmosphériques : quels composants participent à la nocivité des particules ? Extrapol n° 35 . Pollution atmosphérique, Pp. 198-199.

114. Petrova, S., Yurukova, L., and Velcheva, I. (2014). Possibilities of using deciduous tree species in trace element biomonitoring in an urban area (Plovdiv, Bulgaria). Atmospheric Pollution Research, 5(2), 196-202.

- 115.** Pettyjohn, M. E., and Levetin, E. (1997). A comparative biochemical study of conifer pollen allergens. *Aerobiologia*, 13(4), 259-267.
- 116.** Piffanelli, P., Ross, J. H., and Murphy, D. J. (1998). Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains. *Sexual plant reproduction*, 11(2), 65-80.
- 117.** Pons, A. (1958). *Le pollen. Que sais-je ? Le point des connaissances actuelles.* N°783. Paris. 125 p.
- 118.** Projet du ministère algérien de l'aménagement du territoire et de l'environnement, 2003.
- 119.** Pukacki, P. M., and Chalupka, W. (2003). Environmental pollution changes in membrane lipids, antioxidants and vitality of Scots pine [*Pinus sylvestris* L.] pollen. *Acta societatis botanico-rum Poloniae*, Vol. 72 N°2, 99-104.
- 120.** Quezel, P. (1986). Les pins du groupe *Halepensis*, écologie, végétation, ecophysiologie. *Ciheam*, 1, 11-23.
- 121.** Ramade F., (1992). *Précis d'écotoxicologie.* Masson, Paris, France, P 300.
- 122.** Rathgeber, C. (2002). Impact des changements climatiques et de l'augmentation du taux de CO_2 atmosphérique sur la productivité des écosystèmes forestiers : exemple du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) en Provence calcaire (France). Institut Méditerranéen d'Ecologie et de Paléoécologie. Marseille, Université d'Aix-Marseille III, 276.
- 123.** Reille, M., (1990). *Leçons de palynologie et d'analyse pollinique.* Ed. du centre national de la recherche scientifique. Paris Pp.1-59 et 199-201.
- 124.** Reille, M., et Pons, A. (1990). *Leçons de palynologie et d'analyse pollinique.* Ed. du centre national de la recherche scientifique. Paris Pp.1-59 et 199-201.
- 125.** Remy, C., et Montana, A. (2011). Utilisation de la modification de la biodiversité lichénique sur résineux pour détecter la pollution azotée d'origine routière. *Pollution Atmosphérique*, 3, 31.

- 126.** Renault-Miskovsky, J., et Petzold, M. (1989). Spores et pollen Editions La Duraulié,360p.
- 127.** Renault-Miskovsky, J., et Petzold, M. (1992). Pollens et spores. Delachaux et Niestlé.
- 128.** Rezanejad, F. (2007). The effect of air pollution on microsporogenesis, pollen development and soluble pollen proteins in *Spartium junceum* L.(Fabaceae). Turkish Journal of Botany, 31(3), 183-191.
- 129.** Rezanejad, F., Majd, A., Shariatzadeh, S. M. A., Moein, M., Aminzadeh, M., and Mirzaeian, M. (2003). Effect of air pollution on soluble proteins, structure and cellular material release in pollen of *Lagerstroemia indica* L.[Lytraceae]. Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica, 45(1),129-132.
- 130.** Risse, U., Tomczok, J., Huss-Marp, J., Darsow, U., and Behrendt, H. (2000). Health-relevant interaction between airborne particulate matter and aeroallergens (pollen). Journal of Aerosol Science, 31, 27-28.
- 131.** Robles, C., Greff, S., Pasqualini, V., Garzino, S., Bousquet-Mélou, A., Fernandez, C., and Bonin, G. (2003). Phenols and flavonoids in Aleppo pine needles as bioindicators of air pollution. Journal of environmental quality, 32(6), 2265-2271.
- 132.** Rogerieux, F., Motta, A., Senechal, H., Marliere, M., Peltre, G., and Lacroix, G. (2005). Modification of grass pollen allergens following artificial exposure to gaseous air pollutants. In 19. World Allergy Congress.
- 133.** Rogerieux, F., Godfrin, D., Senechal, H., Motta, A. C., Marliere, M., Peltre, G., and Lacroix, G. (2007). Modifications of *Phleum pratense* grass pollen allergens following artificial exposure to gaseous air pollutants (O₃, NO₂, SO₂). International Archives of Allergy and Immunology, 143(2), 127-134.
- 134.** Roshchina, V. V., and Mel'nikova, E. V. (2001). Pollen chemosensitivity to ozone and peroxides. Russian Journal of Plant Physiology, 48(1), 74-83.

135. Ruffin, J., Williams, D., Banerjee, U., and Pinnix, K. (1983). The effects of some environmental gaseous pollutants on pollen-wall proteins of certain airborne pollen grains : a preliminary study. *Grana*, 22(3), 171-175.

136. Ruffin, J., Liu, M. Y., Sessoms, R., Banerjee, S., and Banerjee, U. C. (1986). Effects of certain atmospheric pollutants (SO_2 , NO_2 and CO) on the soluble amino acids, molecular weight and antigenicity of some airborne pollen grains. *Cytobios*, 46(185), 119-129.

137. Schyns H. (2006). *Cours de chimie organique- Les Alcènes*.

138. Shahali, Y., Pourpak, Z., Majd, A., Shokouhi, R., Moin, M., and Mari, A. (2008). A novel 35 kda allergenic protein for a better diagnosis of the allergy to the Arizona cypress pollen. *Allergy : European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 63(88), 497.

139. Shahali, Y., Pourpak, Z., Moin, M., Zare, A., and Majd, A. (2009). Impacts of air pollution exposure on the allergenic properties of Arizona cypress pollens. In *Journal of Physics : Conference Series* (Vol. 151, No. 1, p. 012027). IOP Publishing.

140. Shahali, Y., Sutra, J. P., Peltre, G., Charpin, D., Sénéchal, H., and Poncet, P. (2010). IgE reactivity to common cypress (*C. sempervirens*) pollen extracts : evidence for novel allergens. *World Allergy Organization Journal*, 3(8), 1.

141. Shiraiwa, M., Selzle, K., and Pöschl, U. (2012). Hazardous components and health effects of atmospheric aerosol particles : reactive oxygen species, soot, polycyclic aromatic compounds and allergenic proteins. *Free radical research*, 46(8), 927-939.

142. Shiraiwa, M., Sosedova, Y., Rouvière, A., Yang, H., Zhang, Y., Abbatt, J. P., and Pöschl, U. (2011). The role of long-lived reactive oxygen intermediates in the reaction of ozone with aerosol particles. *Nature chemistry*, 3(4), 291-295.

143. Sousa R. ; Laura Duque L. ; Duarte A.J. ; Gomes C.R. ; Ribeiro H. ; Joaquim A.C. da Silva E. and Abreu I. (2012). In Vitro Exposure of *Acer negundo* Pollen to Atmospheric Levels of SO_2 and NO_2 : Effects on Allergenicity and Germination. Grupo do Ambiente do Centro de Geologia, Universidade do Porto, Portugal. *Requimte ; Environ. Sci. Technol.* 2012, 4624062412.

- 144.** Stroebel, R. (1995). Air quality in urban, industrial and rural areas of France. In PAPERS FROM THE WORLD CLEAN AIR CONGRESS (Vol. 3, pp. 520-520). AIR AND WASTE MANAGEMENT ASSOCIATION.
- 145.** Tachet H. (2006). Invertébrés d'eau douce Systématique,biologie,écologie.CNRS(Ed.).Paris,587.
- 146.** Tausz, M., Trummer, W., Goessler, W., Wonisch, A., Grill, D., Naumann, S., and Morales, D. (2005). Accumulating pollutants in conifer needles on an Atlantic island—A case study with *Pinus canariensis* on Tenerife, Canary Islands. Environmental pollution, 136(3), 397-407.
- 147.** Thibaudon, M., et Sindt, C. (2008). Mesure des allergènes de pollens d'arbre dans l'air (bouleau, olivier). Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique, 48(3), 179-186.
- 148.** Thompson, C. R. (1981). Effects of atmospheric H/sub 2/S on vegetation. Final report, September 1, 1978-February 28, 1981 (No. DOE/EV/70288-T1). California Univ., Riverside (USA). Statewide Air Pollution Research Center.
- 149.** Till, I., Valdeyron, G., et Gouyon, P. H. (1989). Polymorphisme pollinique et polymorphisme génétique. Canadian Journal of Botany, 67(2), 538-543.
- 150.** Tlili, N., Zarrouk, S., Boughediri, L., and Chaoui, F. (2007). Bio-indication of air quality in the Annaba city (East of Algeria). Research Journal of biological sciences, 2(6), 617-619.
- 151.** Van Halluwyn, C., Cuny, D., et Garrec, J. P.(2011).Introduction Générale-Définitions, concepts et enjeux généraux de la biosurveillance de la qualité de l'air. Pollution Atmosphérique,3,7.
- 152.** Wagh, N. D., Shukla, P. V., Tambe, S. B., and Ingle, S. T. (2006). Biological monitoring of roadside plants exposed to vehicular pollution in Jalgaon city. Journal of Environmental Biology, 37(2), 419-421.
- 153.** Wallace, S., Fleming, A., Wellman, C. H., and Beerling, D. J. (2011). Evolutionary development of the plant spore and pollen wall. AoB Plants, 2011, plr027.

- 154.** Wang, B. S. P., et PJ Downie, B. et Charest P.J. (1994). Conservation ex situ de pollen et de graines, et de cultures in vitro de plantes ligneuses pérennes FAO, Roma (Italia) Pp.29-46.
- 155.** Wang, Q., Morita, J., Nakamura, S., Wu, D., Gong, X., Suzuki, M., and Nakajima, D. (2010). Field investigation on modification of Japanese cedar pollen allergen in urban air-polluted area. World Academy of Science, Engineering and Technology, 69, 624-629.
- 156.** Wayne, P., Foster, S., Connolly, J., Bazzaz, F., and Epstein, P. (2002). Production of allergenic pollen by ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) is increased in CO₂-enriched atmospheres. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 88(3), 279-282.
- 157.** Webber, J. E., and Bonnet-Masimbert, M. (1993). The response of dehydrated Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) pollen to three in vitro viability assays and their relationship to actual fertility. In *Annales des sciences forestières* (Vol. 50, No. 1, pp. 1-22). EDP Sciences.
- 158.** Wellburn, F. A., Lau, K. K., Milling, P. M., and Wellburn, P. M. (1996). Drought and air pollution affect nitrogen cycling and free radical scavenging in *Pinus halepensis* (Mill.). *Journal of experimental Botany*, 47(9), 1361-1367.
- 159.** Wolters, J. H. B., and Martens, M. J. M. (1987). Effects of air pollutants on pollen. *The Botanical Review*, 53(3), 372-414.
- 160.** Yassaa, N., Meklati, B. Y., and Cecinato, A. (2005). Organic pollutants in airborne particulates of Algiers city area. In *Environmental Chemistry* (pp. 371-382). Springer Berlin Heidelberg.
- 161.** Zahardis, J., and Petrucci, G. A. (2007). The oleic acid-ozone heterogeneous reaction system : products, kinetics, secondary chemistry, and atmospheric implications of a model system—a review. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 7(5), 1237-1274.
- 162.** Ziemann, P. J. (2005). Aerosol products, mechanisms, and kinetics of heterogeneous reactions of ozone with oleic acid in pure and mixed particles. *Faraday Discussions*, 130, 469-490.

PUBLICATIONS



Invited paper

Chemical modification of coating of *Pinus halepensis* pollen by ozone exposure

Oumsaad Naas^{a, b}, Maxence Mendez^a, Melesio Quijada^c, Sylvie Gosselin^a,
Jinane Farah^{a, d}, Ali Choukri^e, Nicolas Visez^{a, *}

^a Univ. Lille, CNRS, UMR 8522 - PC2A - Physicochimie des Processus de Combustion et de l'Atmosphère, F-59000, Lille, France

^b Laboratoire de Dispositifs Micro-ondes et Matériaux pour les Energies Renouvelables. DIMMER, Département d'Agronomie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Equipe Biodiversité et Environnement, Université Ziane Achour, Djelfa, 17000, Algeria

^c Univ. Lille, CNRS, Univ. Littoral Côte d'Opale, UMR 8187 - LOG - Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences, F-59000, Lille, France

^d Lebanese University, Faculty of Public Health (FSP III), Water & Environment Science, Tripoli, Lebanon

^e Etude et exploitation des propriétés technofonctionnelles des produits alimentaires, Laboratoire de Chimie Organique et Substances Naturelles, Département d'Agronomie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ziane Achour, Djelfa, 17000, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 January 2016

Received in revised form

7 April 2016

Accepted 21 April 2016

This paper has been recommended for acceptance by Dr. Harman Sarah Michele.

Keywords:

Allergy

Adjuvant effect

Sporopollenin

Pollenkitt

Atmospheric chemistry

ABSTRACT

Pollen coating, located on the exine, includes an extractible lipid fraction. The modification of the pollen coating by air pollutants may have implications on the interactions of pollen with plant stigmas and human cells. *Pinus halepensis* pollen was exposed to ozone *in vitro* and the pollen coating was extracted with organic solvent and analyzed by GC-MS. Ozone has induced chemical changes in the coating as observed with an increase in dicarboxylic acids, short-chain fatty acids and aldehydes. 4-Hydroxybenzaldehyde was identified as the main reaction product and its formation was shown to occur both on native pollen and on defatted pollen. 4-Hydroxybenzaldehyde is very likely formed via the ozonolysis of acid coumaric-like monomers constitutive of the sporopollenin. Modification of pollen coating by air pollutants should be accounted for in further studies on effect of pollution on germination and on allergenicity.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Pollen membrane is constituted of three layers: an inner one, the intine, an outer one, the exine, and a coating on top of the exine (Bashir et al., 2013a; Pacini and Hesse, 2005). The chemical composition of the pollen coating was widely investigated among several plant species. Among lipids, the following chemical families were identified: saturated and unsaturated fatty acids, alkanes, alkenes, alcohols, aldehydes, ethers, amino-alcohols and phenolic compounds (Abed El Azim et al., 2015; Bashir et al., 2013b; Henricsson et al., 1996; Human and Nicolson, 2006; Nicolson and Human, 2012; Rozema et al., 2001; Strohl and Seikel, 1965).

Lipids of the pollen coating may play important roles on pollen reproductive function during pollen-stigma interactions (Lin et al.,

2015; Traidl-Hoffmann et al., 2003; Wolters-Arts et al., 2002; Zinkl et al., 1999). The lipids on the pollen coating was shown to play an adjuvant part to the allergenic reaction. The pollen coating is indeed in first line in pollen-human cell interactions. There is a strong interest, in pollen-allergy related literature, for the role of lipids in allergic reaction and sensitization (Allakhverdi et al., 2005; Bashir et al., 2013a, 2013b; Behrendt et al., 2001; Blume et al., 2015; Bublin et al., 2014; Gilles et al., 2009, 2012; Traidl-Hoffmann et al., 2003, 2009).

Pollutants were recognised as modifiers of the pollen allergenicity. The most common air pollutants studied for their effects on pollen are sulfur dioxide, nitrogen dioxide, ozone and particulate matter. Air pollutants may facilitate the pollen allergen dispersal in smaller fraction of the atmospheric aerosol (Beggs, 1998; Motta et al., 2006). The ionic composition of pollen surface may be modified by particulate matter and inorganic compounds (Chassard et al., 2015; Okuyama et al., 2007; Ribeiro et al., 2015), as

* Corresponding author.

E-mail address: nicolas.visez@univ-lille1.fr (N. Visez).

well as the protein content (Rezanejad, 2009; Wang et al., 2012; Zhao et al., 2015). Pollen shape may also be altered by air pollution (Majid et al., 2004; Ouyang et al., 2016; Shahali et al., 2009). These modifications, induced by air pollutants, modify the pollen germinative capabilities and allergenic potential (ANSES, 2014; Cuinica et al., 2014a, 2014b; Gillespie et al., 2015; Lu et al., 2014; Sousa et al., 2012; Wolters and Martens, 1987).

However, to the best of our knowledge, little is known about the modifications of pollen coating by atmospheric pollutants. Pollen flavonoids (Rezanejad, 2009) and amino acids (Ruffin et al., 1986) have already been shown to be modified by air pollutants. As unsaturated organic compounds were identified on pollen coating (Abed El Azim et al., 2015; Bashir et al., 2013b; Henricsson et al., 1996; Nicolson and Human, 2012), reactivity with ozone is very likely to occur. The modification of pollen coating by pollution could in return induces modification in pollen-plant interactions and pollen-human cell interactions, ultimately modifying reproductive and allergenic properties of pollen.

In this work, *Pinus halepensis* pollen was harvested in a rural zone and exposed in laboratory to different ozone concentrations. Our main goal was to determine the modifications of the pollen solvent-extractable lipids following an artificial ozone exposure. Lipids were extracted by methylene chloride and analyzed by GC-MS. Pollen coating was modified by ozone exposure and even sporopollenin structure was altered by ozone oxidation.

2. Materials and methods

The following chemicals were used: methylene chloride $\geq 99.8\%$, Sigma-Aldrich; BSTFA-TMCS 99:1, Supelco (*N*, *O*-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide, trimethylchlorosilane); 4-hydroxybenzaldehyde $\geq 95\%$, Fluka. Synthetic Air was provided by Air Liquide (O_2 20.5% \pm 0.5%; N_2 QSP) $>99.99\%$.

Pinus halepensis Mill. (Aleppo pine) cones were collected from 20 trees in rural areas in Algeria during the flowering season between April and May 2014. Collections were performed from different sides of individual trees. Cones were dried in laboratory at ambient temperature during 2–4 days in warm atmosphere (27°C). The pollen was then collected by cones crushing and further sieving at $90\ \mu\text{m}$. Pollen was dried for 4 h at 37°C and stored at 4°C until use.

For ozone exposure, 100 mg of pollen were deposited onto a 47 mm nylon filter and exposed to ozone into a stainless-steel fluidized bed reactor. Ozone was generated from synthetic air by a UV-generator and its concentration was determined by a ThermoScientific Model 49i analyzer. Synthetic air and ozone were

flowing through the reactor at $1.0\ \text{L}\ \text{min}^{-1}$ with average mixing ratios between 175 and 1350 ppb. After 10 min to 1 h, the ozone is then quite stable for the duration of the exposure as shown in Fig. 1. All the ozone exposures were performed for 16 h at laboratory temperature ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) and dry conditions. Experiments were performed at least in duplicates.

Organic compounds were extracted on 100 mg of pollen by ultrasonic agitation at 20 kHz for 15 min (HF power: 100 W max; Bandelin Sonopuls) with 1 mL of methylene chloride. After centrifugation at 5000 rpm for 2 min, supernatant was collected. Extraction was performed a second time in the same conditions and both supernatants were combined. Solution was filtered using cotton wool pre-washed with methylene chloride and then evaporated to dryness under a nitrogen stream. Extracts were finally solubilized in $50\ \mu\text{L}$ of methylene chloride and $50\ \mu\text{L}$ of a solution of 99% BSTFA – 1% TMCS.

To obtain defatted pollen (pollen without coating), 100 mg of pollen were washed with 10 mL of hexane, 10 mL of methylene chloride and finally with 10 mL of methanol. Pollen grains were finally dried under a gentle flow of pure nitrogen. Extraction procedure performed on defatted pollen has shown that only trace-amount of lipids was still extractable after this washing procedure.

$1\ \mu\text{L}$ of extract was injected into a gas chromatograph (Perkin Elmer 680) coupled with a mass spectrometer (Perkin Elmer 600C). Chromatographic conditions were as follow: inlet heated at 250°C , DB5-MS-UI column initially at 40°C for 1 min and heated to 320°C at $10^\circ\text{C}\ \text{min}^{-1}$ and maintained 10 min at 320°C , helium column flow of $1\ \text{mL}\ \text{min}^{-1}$, split ratio of 10. Mass spectrometer conditions were as follow: mass scan 45–500, scan time 0.2 s, interdelay scan 0.1 s, ionization energy 70 eV. Identification of compounds was based on the comparison with NIST mass spectra database and/or on the comparison of retention times of standards. For the purpose of product quantification, standard solutions of 4-hydroxybenzaldehyde were prepared with different concentrations and injected in the same chromatographic conditions.

3. Results

Chromatograms for native pollen and pollen exposed to the higher ozone concentration of 1350 ppb are shown in Fig. 2. No new products were identified due to ozone exposure: all the compounds were already detected in native pollen. Ozone exposure has modified the ratios between compounds. Similarly, increasing the ozone exposure from 175 ppb to 1350 ppb has only changed the intensities of the modifications.

The species extracted from pollen were identified and their peak areas where compared between native and 1350 ppb exposure (Table 1); \blacktriangleright corresponds to an increase higher than +20% and \blacktriangleleft to a decrease higher than –20%. 4-Hydroxybenzaldehyde was the main reaction product identified. Several dicarboxylic linear acids were produced by ozonolysis; compounds with 6, 8 and 9 carbon atoms were the main contributor to dicarboxylic fraction. Linear fatty acids were identified from C3 to C20 and lower chain fatty acids, C3 to C12, were produced during ozonolysis. Nonanal, phosphoric acid, hydroxyphenol, hydroxybenzoic acid and dihydroxyphenyl acetic acid were produced due to ozone exposure. Several unsaturated compounds, coumaric acid, 9-octadecenoic and limonene, were consumed during ozone exposure.

Based on peak areas, linear alcohols with 24, 26 and 28 carbon atoms were the most abundant compounds found on pollen coating (Fig. 2). Alcohols were not modified, or produced, by the ozone exposure.

The main reaction product, 4-hydroxybenzaldehyde (4HBza), was quantified to $42 \pm 9\ \mu\text{g}$ per gram of pollen for the highest exposure (1350 ppb/16 h). 4HBza was linearly increasing with

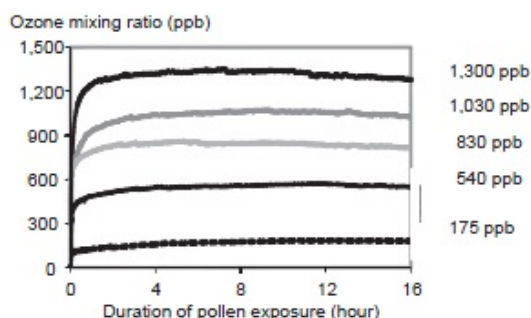


Fig. 1. Temporal trends of ozone mixing ratios during exposure of pollen. Stable ozone mixing ratios were as follow for the five experiments shown: 175; 540; 830; 1030 and 1350 ppb.

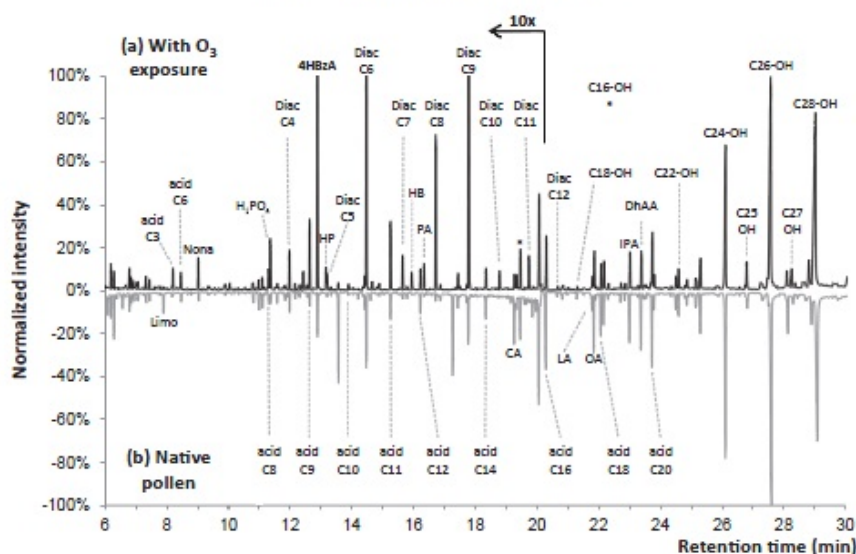


Fig. 2. Chromatograms of (a) *P. halepensis* pollen exposed 16 h to 1350 ppb of ozone and (b) native pollen without treatment. Chromatograms were normalized with the highest peak at 27.3 min (C26-OH). Signals between 5 and 25 min were magnified by a factor of 10 to ease visual interpretation of the chromatograms. Peak labels are explicated in Table 1.

ozone concentration for a constant exposure time (Fig. 3). 4 Hbza was also detected in native pollen, without laboratory ozone exposure, to the concentration of $4 \pm 1 \mu\text{g g}^{-1}$.

Ozone exposure was also performed on defatted pollen. Organic extraction of defatted pollen without ozone exposure shows almost no remaining organic compounds (chromatograms not shown). However, with ozone exposure, 4Hbza was detected, on defatted pollen, as the single reaction product. 4Hbza was produced during exposure of defatted pollen to the concentration of $39 \pm 8 \mu\text{g g}^{-1}$ (compared to $42 \pm 9 \mu\text{g g}^{-1}$ for the exposure of native, non-defatted, pollen).

4. Discussion

Ozone induces modifications on solvent-extractible pollen coating in laboratory conditions. 20 compounds were produced in higher quantities in exposed-pollen compared to untreated pollen. Three unsaturated compounds were shown to decrease with ozone exposure. Similar trends were observed during *in vivo* and *in vitro* ozone exposure of *P. halepensis* needles (Anttonen et al., 1995; Pasqualini et al., 2003). The changes observed in this study are explained by the ozone chemistry on double bonds. Compounds like saturated alcohols were not modified by ozone exposure. Surprisingly linoleic acid, with two double bonds, was extracted on the same ratios between ozone-exposed and native pollen, suggesting a difficulty for ozone to reach these molecules.

Dicarboxylic acids, fatty acids and linear aldehydes are products of the reaction of ozone with linear unsaturated fatty acids. As an example, three identified compounds (nonanal, nonanedioic acid and nonanoic acid) are 3 out of the 4 main reaction products of the ozonolysis of 9-octadecenoic acid (oleic acid) which was detected on both native and exposed pollen (Mendez et al., 2014). Several other unsaturated fatty acids not detected in this work must have been ozonolysed to produce the diversity of dicarboxylic and monocarboxylic acids identified on ozone-exposed pollen. Those unsaturated acid moieties could be attached on larger molecules, lipids or proteins, not detected in our chromatographic conditions.

Those products of the reaction with ozone were not detected from ozonolysis of defatted pollen and are therefore not constitutive of the sporopollenin structure.

Overall, an acidification of the surface of the pollen is therefore expected consecutively to an ozone exposure. This chemistry, leading to an acidification, may have implication on pollen germination and may explain part of the inhibition of germination observed when pollen is treated with pollutants (Benoit et al., 1983; Sénéchal et al., 2015; Wolters and Martens, 1987).

4-Hydroxybenzaldehyde (4Hbza) is an expected product of the ozonolysis of *para*-coumaric acid, which was detected in the pollen coating. Coumaric acid monomer has also been shown to be present in sporopollenin structure of *Pinus Mugo* (Wehling et al., 1989). So, 4Hbza has two potential sources: ozonolysis of *para*-coumaric acid from the pollen coating and ozonolysis of coumaric acid monomer from the sporopollenin (Barrier, 2008). 4Hbza was identified from the ozonolysis of defatted pollen in the same quantities ($39 \pm 8 \mu\text{g g}^{-1}$) as with the ozonolysis of native pollen ($42 \pm 9 \mu\text{g g}^{-1}$). The ozonolysis of a double bond in beta position of a coumaric acid group constitutive of the sporopollenin structure (Fadiran and Meredith, 2014) is therefore a very likely mechanism for the formation of 4Hbza. We can assume that ozone reacted directly with sporopollenin leading to the release of constitutive monomers of the sporopollenin into the organic coating and to the addition of carbonyl and carboxylic group to sporopollenin (Fig. 4). This mechanism of oxidation of sporopollenin has already been used for structural elucidation of the monomers constituents of the sporopollenin (Barrier, 2008) but has never been discussed in the field of atmospheric ageing of pollen by atmospheric ozone. Moreover, degradation of sporopollenin by air pollutants may have implication on the allergen dispersal by easing the rupture of grain.

Reactivity of ozone with sporopollenin gives anti-oxidant capabilities to the *P. halepensis* pollen grain. 4Hbza was indeed the main reaction product. Those double bonds could be natural protective barrier to ozone degradation of more important molecules like lipids and proteins. The *P. halepensis* pollen is known to have a relatively low allergenic potential (Gastaminza et al., 2009); the

Table 1

List of identified compounds on methylene chloride extraction of *P. halepensis* pollen. Trends were obtained by comparing peak areas on chromatograms at 0 and 1350 ppb (duplicates); ↗↘ refers respectively to a difference in peak areas between ozonolysed and native of more than +20%/–20%. Retention times and labels refer to chromatograms on Fig. 2.

Retention time (min)	Label on Fig. 2	Compound	Trend with O ₃ exposure
Dicarboxylic acids			
12,0	Diac C4	butanedioic acid	↗
13,2	Diac C5	pentanedioic acid	↗
14,5	Diac C6	hexanedioic acid	↗
15,6	Diac C7	heptanedioic acid	↗
16,7	Diac C8	octanedioic acid	↗
17,8	Diac C9	nonanedioic acid	↗
18,8	Diac C10	decanedioic acid	↗
19,7	Diac C11	undecanedioic acid	↗
20,7	Diac C12	dodecanedioic acid	=
Mono carboxylic acids			
8,2	C3 acid	hydroxy-propanoic acid	↗
8,5	C6 acid	hexanoic acid	↗
11,3	C8 acid	octanoic acid	↗
12,6	C9 acid	nonanoic acid	↗
13,9	C10 acid	decanoic acid	=
15,3	C11 acid	undecanoic acid	↗
16,3	C12 acid	dodecanoic acid	↗
18,3	C14 acid	tetradecanoic acid	=
19,3	not shown	pentadecanoic acid	=
20,3	C16 acid	hexadecanoic acid	=
22,1	C18 acid	octadecanoic acid	=
23,8	C20 acid	eicosanoic acid	=
Unsaturated carboxylic acids			
19,3	CA	coumaric acid	↘
21,8	LA	linoleic acid	=
21,9	OA	9-octadecenoic acid	↘
Linear alcohols			
19,5	C16-OH	hexadecanol	=
21,3	C18-OH	octadecanol	=
24,6	C22-OH	docosanol	=
26,1	C24-OH	tetracosanol	=
26,9	C25-OH	pentacosanol	=
27,6	C26-OH	hexacosanol	=
28,5	C27-OH	heptacosanol	=
29,0	C28-OH	octacosanol	=
Other compounds			
7,9	Limo	limonene	↘
9,0	Nona	nonanal	↗
11,4	H ₃ PO ₄	phosphoric acid	↗
12,9	4HBzA	4-hydroxybenzaldehyde	↗
13,2	HP	hydroxy-phenol	↗
15,9	HB	hydroxy-benzoic acid	↗
16,3	PA	dihydroxyphenyl acetic acid	↗
23,0	IPA	isopimaric acid	=
23,4	DhAA	dehydroabietic acid	=

health implications of the production of 4-hydroxybenzaldehyde are therefore irrelevant for this species. However, modification of pollen lipids by air pollutants has to be studied for allergenic pollen species.

Ozone alters lipids but could also modifies proteins (Uzun et al., 2012). Pollen grains from different species may have differences on anti-oxidant capabilities depending on the chemical composition of sporopollenin and on the pollen coating composition. Differences

on parameters like the quantity of pollen coat or the presence of coumaric-acid groups on sporopollenin may also explain the differences in the pollutant-responses on various pollen observed by others (Ribeiro et al., 2013).

4-Hydroxybenzoic acid is the other product of molozonide decomposition (Fig. 4); 4-hydroxybenzoic acid was indeed detected with exposed-pollen and increased with ozone exposure (Table 1) but it was not detected during ozonolysis of defatted pollen. 4-

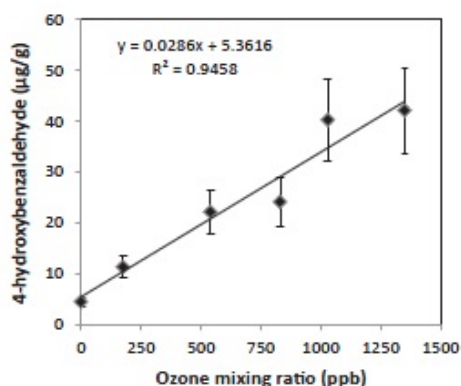


Fig. 3. Formation of 4-hydroxybenzaldehyde ($\mu\text{g/g}$ of pollen) as function of the ozone concentration for an exposure of 16 h. Errors were estimated to $\pm 20\%$ from greatest differences between values and mean value.

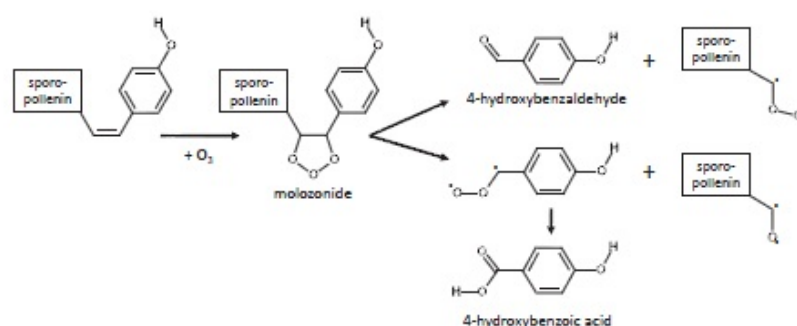


Fig. 4. Mechanism of formation of 4-hydroxybenzaldehyde and 4-hydroxybenzoic acid from the ozonolysis of coumaric acid monomer constituent of the sporopollenin.

Hydroxybenzaldehyde was the only product of ozone exposure of defatted pollen while dicarboxylic acids, fatty acids and n-alkanes have already been observed in litterature (Dominguez et al., 1999) during ozonolysis of purified exine from *Pinus pinaster*, though in much higher oxidative conditions (5% of ozone).

4-Hydroxybenzaldehyde is a very good candidate for indication of ozone dose received by the *Pinus* pollen. 4Hbza was indeed detected in native (i.e. untreated) pollen to $4 \pm 1 \mu\text{g g}^{-1}$ and in laboratory exposed pollen to $42 \pm 9 \mu\text{g g}^{-1}$. Assuming that 4Hbza is only produced by reaction with ozone and is not produced by other mechanisms, the equivalent ozone exposure for the native pollen (ozone dose received by the pollen on the plant, or more generally speaking before our laboratory experiments) could be determined with a linear regression. The assumption that 4Hbza is formed only by ozonolysis is supported by the fact that all the ozonolysis reaction-products were already present in untreated (native) pollen. The amount of 4Hbza in native pollen ($4 \pm 1 \mu\text{g g}^{-1}$) corresponds to an ozone exposure of about 3000 ppb h^{-1} , equivalent to $\sim 190 \text{ ppb}$ for 16 h. The highest exposure in our laboratory conditions (1350 ppb for 16 h) matches with only 7 times the initial supposed ozone exposure of native pollen.

The total ozone exposure of anemophilous pollen during pollination is the sum of the exposure on the plant and the exposure while the pollen is airborne. The relative importance between those exposure pathways is not known. Our determination of 4Hbza initial mass can help to estimate this ratio. For an ozone daily average concentration of 50 ppb ($108 \mu\text{g m}^{-3}$) and an atmospheric

exposure of 10 h, the ozone exposure suffered by pollen while airborne corresponds to $\sim 20\%$ of the initial ozone exposure (equivalent ozone dose received by pollen before our experiments). For short duration transport of pollen in the atmosphere (local scale), the ozone exposure of pollen is probably dominated by plant exposure. This comparison has to be moderated as the pollen is protected by cones during in vivo exposure whereas it is not protected during atmospheric transport. At last, only the direct modification of pollen was taken into account in this study but plants exposed to ozone may also have different responses leading to the modification of pollen in vivo (Albertine et al., 2014; Gillespie et al., 2015).

5. Conclusion

As pollen coating may have important implications for pollen allergenicity (Bashir et al., 2013b) and pollen-water interaction (Lin et al., 2015; Steiner et al., 2015), the modification of the chemical composition of pollen coating has to be taken into account in the

overall transformations of pollen by air pollutants leading to a polluted pollen, or so-called "polluen" (Sénéchal et al., 2015).

Modification of lipid distribution in pollen coating may induce change in pollen reproductive capabilities. Some of the lipids ozonolized may play a role in pollen-stigma interactions (Lin et al., 2015; Wolters-Arts et al., 1998). Moreover, a general acidification of the pollen surface is expected with ozone exposure which has been shown to decrease pollen germination in some species (Paoletti and Bellani, 1990; Wolters and Martens, 1987). Pollen lipids may also play a role in cloud condensation nuclei abilities (Steiner et al., 2015).

Changes in ratios of lipidic compounds in allergenic pollen coating may play an adjuvant effect to the allergenic potential of pollen (Bashir et al., 2013b). Pollen coating is indeed the first part of pollen being encountered by human cells. Pollen has to be considered as a whole entity and not only as an allergen carrier, since the role of its lipids was observed in pollen-cell interactions (Traidl-Hoffmann et al., 2003). To a better comprehension of the effects of pollution on pollen, this work has to be extended to allergenic pollen, accordingly, the role of the coating modifications by pollution have to be tested against pollen-water interactions, germination and allergenicity.

Acknowledgements

NV thanks the University of Lille 1 and the Institut de Recherches Pluridisciplinaires en Sciences de l'Environnement

(IREPSE Fed 4129) for financial support. The CaPPA project (Chemical and Physical Properties of the Atmosphere) is funded by the French National Research Agency (ANR) through the PIA (Programme d'Investissement d'Avenir) under contract ANR-11-LABX-005-01. Florent Caron and Najha Azarkan are acknowledged for their participation in experimental work.

References

- Abed El Azim, M.H.M., El-Mesalamy, A., Yassin, F., Khalil, S., 2015. Identification phenolic and biological activities of methanolic extract of date palm pollen (*Phoenix dactylifera*). *J. Microb. Biochem. Technol.* 07, 47–50.
- 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.
- Alakhverdiz, Z., Bouguermouh, S., Rubio, M., Delespesse, G., 2005. Adjuvant Activity of pollen grains. *Allergy* 60, 1157–1164.
- ANSES, 2014. Etat des Connaissances sur l'Impact Sanitaire Lié à l'Exposition de la Population Générale aux Pollens Présents dans l'Air Ambiant.
- Anttonen, S., Herranen, J., Peura, P., Kärenlampi, L., 1995. Fatty acids and ultra-structure of ozone-exposed Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) needles. *Environ. Pollut.* 87, 235–242.
- Barriet, S., 2008. Physical and Chemical Properties of Sporopollenin Exine Particles. The University of Hull.
- Bashir, M.E.H., Ward, J.M., Cummings, M., Karrar, E.E., Root, M., Mohamed, A.B.A., Naderio, R.M., Preuss, D., 2013a. Dual function of novel pollen coat (surface) proteins: IgE-binding capacity and proteolytic activity disrupting the airway epithelial barrier. *PLoS One* 8, e53337.
- Bashir, M.E.H., Lui, J.H., Palnivele, R., Naderio, R.M., Preuss, D., 2013b. Pollen lipidomics: lipid profiling exposes a notable diversity in 22 allergenic pollen and potential biomarkers of the allergic immune response. *PLoS One* 8, e57566.
- Beggs, P.J., 1998. Pollen and pollen Antigen as triggers of Asthma - what to measure? *Atmos. Environ.* 32, 1777–1783.
- Behrendt, H., Kasche, A., Ebner von Eschenbach, C., Risse, U., Huss-Marp, J., Ring, J., 2001. Secretion of proinflammatory eicosanoid-like substances precedes allergen release from pollen grains in the initiation of allergic sensitization. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 124, 121–125.
- Benoit, L., Skelly, J., Moore, L., Dochinger, L., 1983. The influence of ozone on *Pinus strobus* L. pollen germination. *Can. J. For. Res.* 13, 184–187.
- Blume, C., Swindle, E.J., Gilles, S., Traidl-Hoffmann, C., Davies, D.E., 2015. Low molecular weight components of pollen alter bronchial epithelial barrier functions. *Tissue Barriers* 3, e1062316.
- Bulfin, M., Eiwegger, T., Breiteneder, H., 2014. Do lipids influence the allergic sensitization process? *J. Allergy Clin. Immunol.* 134, 521–529.
- Chassard, G., Choël, M., Gosselin, S., Vong, H., Petitprez, D., Shahali, Y., Tsiopoulos, A., Visez, N., 2015. Kinetic of NO₂ uptake by *Phleum pratense* pollen: chemical and allergenic implications. *Environ. Pollut.* 196, 107–113.
- Cuínica, L.G., Abreu, I., Esteves da Silva, J., 2014a. Effect of air pollutant NO₂ on *Betula pendula*, *Ostrya carpinifolia* and *Carpinus betulus* pollen fertility and human allergenicity. *Environ. Pollut.* 186, 50–55.
- Cuínica, L.G., Cruz, A., Abreu, I., da Silva, J., 2014b. Effects of atmospheric pollutants (CO, O₃, SO₂) on the allergenicity of *Betula pendula*, *Ostrya carpinifolia*, and *Carpinus betulus* pollen. *Int. J. Environ. Health Res.* 0, 1–10.
- Dominguez, E., Mercado, J.A., Quesada, M.A., Heredia, A., 1999. Pollen sporopollenin: degradation and structural elucidation. *Sex. Plant Reprod.* 12, 171–178.
- Fadran, O.O., Meredith, J.C., 2014. Surface treated pollen performance as a renewable reinforcing filler for poly(vinyl acetate). *J. Mater. Chem. A* 2, 17031–17040.
- Gastaminza, G., Lombardero, M., Bernaola, G., Antepara, I., Munoz, D., Gamboa, P., Audicana, M., Marcos, C., Ansoategui, L., 2009. Allergenicity and cross-reactivity of pine pollen. *Clin. Exp. Allergy* 39, 1438–1446.
- 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 Clin. Immunol.* 5, 3.
- Gilles, S., Behrendt, H., Ring, J., Traidl-Hoffmann, C., 2012. The pollen enigma: modulation of the allergic immune response by non-allergenic, pollen-derived compounds. *Curr. Pharm. Des.* 18, 2314–2319.
- Gillespie, C., Stabler, D., Tallentire, E., Goumenaki, E., Barnes, J., 2015. Exposure to environmentally-relevant levels of ozone negatively influence pollen and fruit development. *Environ. Pollut.* 206, 494–501.
- 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.
- 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.
- Lin, H., Lizaraga, L., Bottomley, L.A., Carson Meredith, J., 2015. Effect of water absorption on pollen adhesion. *J. Colloid Interface Sci.* 442, 133–139.
- Lu, S., Ren, J., Hao, X., Liu, D., Zhang, R., Wu, M., Yi, F., Lin, J., Shinich, Y., Wang, Q., 2014. Characterization of protein expression of *Platanus* pollen following exposure to gaseous pollutants and vehicle exhaust particles. *Aerobiologia* 30, 281–291.
- Majd, A., Chehregani, A., Moin, M., Gholami, M., Kohno, S., Nabe, T., Shariatzade, M.A., 2004. The effects of air pollution on structures, proteins and allergenicity of pollen grains. *Aerobiologia* 20, 111–118.
- Mendez, M., Visez, N., Gosselin, S., Crenn, V., Riffault, V., Petitprez, D., 2014. Reactive and nonreactive ozone uptake during aging of oleic acid particles. *J. Phys. Chem. A* 118, 9471–9481.
- 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. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 139, 294–298.
- Nicolson, S.W., Human, H., 2012. Chemical composition of the "low quality" pollen of sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae). *Apidologie* 44, 144–152.
- Okuyama, Y., Matsumoto, K., Okochi, H., Igawa, M., 2007. Adsorption of air pollutants on the grain surface of Japanese cedar pollen. *Atmos. Environ.* 41, 253–260.
- Ouyang, Y., Xu, Z., Fan, E., Li, Y., Zhang, L., 2016. Effect of nitrogen dioxide and sulfur dioxide on viability and morphology of oak pollen. *Int. Forum Allergy Rhinol.* 6, 95–100.
- Pacini, E., Hesse, M., 2005. Pollenkitt - its composition, forms and functions. *Flora-Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* 200, 399–415.
- Paoletti, E., Bellani, L., 1990. The in-vitro response of pollen germination and tube length to different types of acidity. *Environ. Pollut.* 67, 279–286.
- Pasqualini, V., Robles, C., Garzino, S., Greff, S., Bousquet-Melou, A., Bonin, G., 2003. Phenolic compounds content in *Pinus halepensis* Mill. needles: a bioindicator of air pollution. *Chemosphere* 52, 239–248.
- Rezanejad, F., 2009. Air pollution effects on structure, proteins and flavonoids in pollen grains of *Thuja orientalis* L. (Cupressaceae). *Grana* 48, 205–213.
- Ribeiro, H., Duque, L., Sousa, R., Abreu, I., 2013. Ozone effects on soluble protein content of *Acer negundo*, *Quercus robur* and *platanus* spp. pollen. *Aerobiologia* 1–5.
- Ribeiro, H., Guimarães, F., Duque, L., Noronha, F., Abreu, I., 2015. Characterisation of particulate matter on airborne pollen grains. *Environ. Pollut.* 206, 7–16.
- Rozema, I., Noordijk, A.J., Broekman, R.A., Beem, A., van Meijkamp, B.M., Bakker, N.V.J., de Staaij, J.W.M., van de Stroetenga, M., Bohneke, S.J.P., Konert, M., et al., 2001. (Poly)phenolic compounds in pollen and spores of Antarctic plants as indicators of solar UV-B - a new proxy for the reconstruction of past solar UV-B? *Plant Ecol.* 154, 9–26.
- Ruffin, J., Liu, M., Sessoms, R., Banerjee, S., Banerjee, U., 1986. Effects of certain atmospheric pollutants (SO₂, NO₂ and CO) on the soluble amino acids, molecular weight and antigenicity of some airborne pollen grains. *Cytobios* 46, 119.
- Sénéchal, H., Visez, N., Charpin, D., Shahali, Y., Peltre, G., Bielej, J.-P., Lhuissier, F., Couderc, R., Yamada, O., Malrat-Domenge, A., et al., 2015. A review of the effects of major atmospheric pollutants on pollen grains, pollen content and allergenicity. *Sci. World J.* 2015, ID 940243.
- Shahali, Y., Pourpak, Z., Moin, M., Zare, A., Majd, A., 2009. Impacts of air pollution exposure on the allergenic properties of Arizona cypress pollens. *J. Phys. Conf. Ser.* 151, 012027.
- Sousa, R., Duque, L., Duarte, A.J., Gomes, C.R., Ribeiro, H., Cruz, A., Esteves Da Silva, J.C.G., Abreu, I., 2012. In vitro exposure of *Acer negundo* pollen to atmospheric levels of SO₂ and NO₂: effects on allergenicity and germination. *Environ. Sci. Technol.* 46, 2406–2412.
- Steiner, A.L., Brooks, S.D., Deng, C., Thornton, D.C.O., Pendleton, M.W., Bryant, V., 2015. Pollen as atmospheric cloud condensation nuclei. *Geophys. Res. Lett.* 2015GLD64060.
- Strohl, M.J., Seikel, M.K., 1965. Polyphenols of pine pollens: a survey. *Phytochemistry* 4, 383–399.
- 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? *Int. Arch. Allergy Immunol.* 131, 1–13.
- Traidl-Hoffmann, C., Jakob, T., Behrendt, H., 2009. Determinants of allergenicity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123, 558–566.
- Uzun, H., İbanoglu, E., Catal, H., İbanoglu, S., 2012. Effects of ozone on functional properties of proteins. *Food Chem.* 134, 647–654.
- Wang, Q., Morita, J., Gong, X., Nakamura, S., Suzuki, M., Lu, S., Sekiguchi, K., Nakajima, T., Nakajima, D., Miwa, M., 2012. Characterization of the physical form of allergenic Cry j 1 in the urban atmosphere and determination of Cry j 1 denaturation by air pollutants. *Asian J. Atmos. Environ.* AJAE 6.
- Wehling, K., Niester, C., Boon, J., Willems, M., Wiermann, R., 1989. p-Coumaric acid - a monomer in the sporopollenin skeleton. *Planta* 179, 376–380.
- Wolters, J., Martens, M., 1987. Effects of air pollutants on pollen. *Bot. Rev.* 53, 372–414.
- Wolters-Arts, M., Lush, W.M., Mariani, C., 1998. Lipids are required for directional pollen-tube growth. *Nature* 392, 818–821.
- Wolters-Arts, M., Van Der Weerd, L., Van Aelst, A.C., Van Der Weerd, J., Van As, H., Mariani, C., 2002. Water-conducting properties of lipids during pollen hydration. *Plant Cell Environ.* 25, 513–519.
- Zhao, F., Elkelish, A., Durner, J., Lindermayr, C., Winkler, J.B., Rueff, F., Behrendt, H., Traidl-Hoffmann, C., Holzinger, A., Köfler, W., et al., 2015. Common ragweed (*Ambrasia artemisiifolia* L.): allergenicity and molecular characterization of pollen after plant exposure to elevated NO₂. *Plant Cell Environ.* <http://dx.doi.org/10.1111/pce.12601>.
- Zinkl, G.M., Zwiebel, B.J., 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.

Natural Method for Allergen Identification using FastPrep-24™ 5G technology.

Andrea Brazdova¹, Oumsaad Naas², Nicolas Visez², Jean-Pierre Sutra¹, Hélène Sénéchal¹ et Pascal Poncet^{1,3}

1: Hôpital d'Enfants Armand Trousseau, Laboratoire de Biochimie, Equipe «Allergie & Environnement», 26 avenue du Dr Arnold Netter, 75012 - Paris. 2: Université de Lille, Laboratoire de Physico-chimie des Processus de Combustion et de l'Atmosphère, Lille. 3 : Institut Pasteur, département Infection & Epidémiologie, Paris.

Introduction

Allergy is a hypersensitivity disorder of the immune system. According to epidemiological studies, at present, 20-30% of the population in many countries around the world suffers from allergies, and this percentage is growing trend.

Pollen are significant sources of clinically relevant out door aeroallergens, recognized as both a major trigger for, and cause of, allergic respiratory diseases.

Allergens are proteins with a broad range of molecular weights (5-50 kDa) exhibiting different features of solubility and stability, able to cause IgE-mediated hypersensitivity after contact with the immune system. The development of new types of allergy treatments needs diverse and well-characterized allergenic source materials. This study describes an effective method for allergen characterization.

Overview

- **Key word:** Allergen, IgE immunoreactivity, pollen homogenization, hypersensitivity community, DNA extraction
- **Aim of the study:** identification of fast method for protein extraction from pollen grains
- **Application:** Western blot analysis
- **Sample name:** Birch, Nettle, Wall Pellitory pollens
- **Sample type:** Pollen
- **Material:** FastPrep-24™ 5G instrument, CoolPrep adapter, 2 ml Lysing Matrix C & E tubes
- **Buffer:** PBS

Protocol and Parameters

1- Incubation method

- Add 50 mg of pollen and 500 µl of PBS in a tube
- Place the tube in a shaker for 18 hours, in cold room
- Centrifuge the suspension 20 mins at 18 000 x g, 4 °C
- Keep the supernatant at -20 °C prior to analyses

2- Grinding method

- Add 50 mg of pollen and 500µl of PBS in 2 ml Lysing Matrix C or E tube.
- Load Lysing Matrix tubes in a CoolPrep Adapter, containing dry ice.
- Process with the FastPrep-24 5G: 40 sec at a speed setting of 6.0 m/s.
- Centrifuge the Lysing Matrix tubes 20 mins at 18 000 x g, 4 °C to pellet debris.
- Keep the supernatant at -20 °C prior to analyses

Results

Total destruction of the pollen grain structure with FastPrep-24™ 5G instrument and Lysing Matrix C

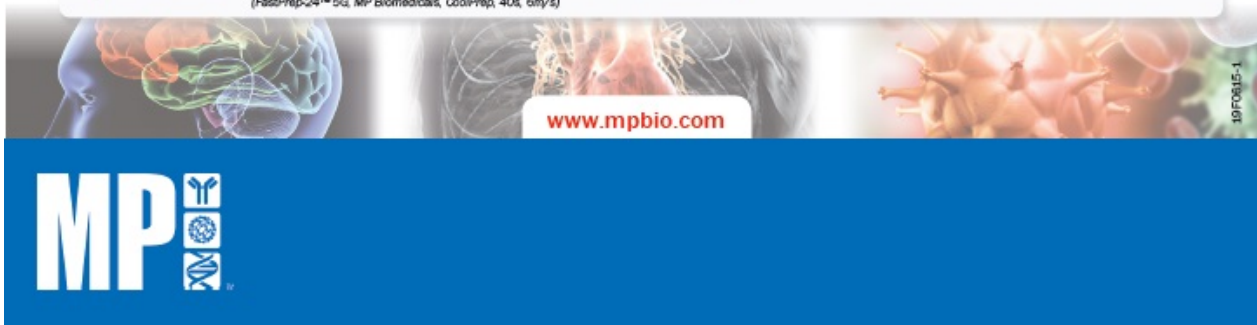


Optical microscope observation of pine pollen (X 200) before and after grinding with the FastPrep-24™ 5G System.

Left: pollen grain before grinding.

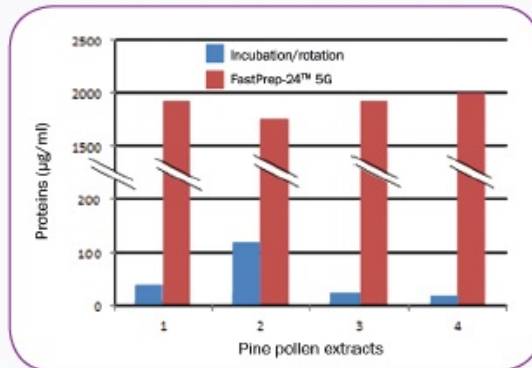
Right: homogenized pollen grain with FastPrep-24™ 5G, 40s at speed 6 m/s with Lysing Matrix C.

(FastPrep-24™ 5G, MP Biomedicals, CoolPrep, 40s, 6m/s)



Results

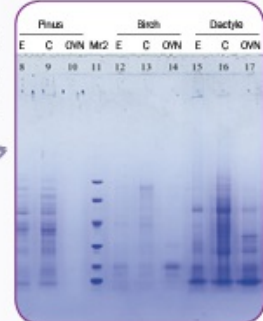
Up to 2 mg/ml of protein extracted with FastPrep-24™ 5G System



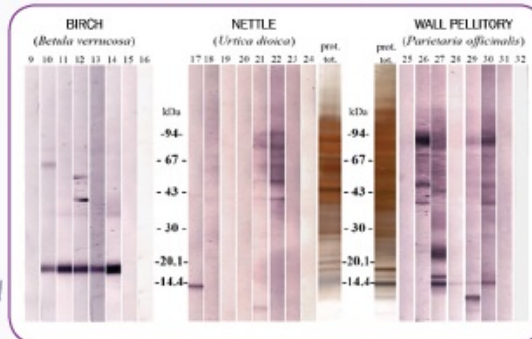
Comparison of 8 pine pollen protein extracts obtained by standard or FastPrep® method. Experience is repeated 4 times using 4 different pollen batches. Protein concentration is determined using Bradford assay.

Effective protein extraction, with the FastPrep-24™ 5G System, for all the tested pollen

Comparison of protein extraction with standard (OVN) or FastPrep method, using Lysing Matrix C or E. Coomassie blue gel staining.

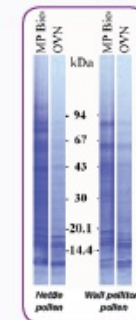


IgE immunoreactivity conservation for pollen extracts



Conserved IgE immunoreactivity in pollen extracts obtained with FastPrep-24™ 5G instrument. Left, IgE immunoreactivity of 6 birch pollen allergic patients tested against birch pollen protein (9-14 strips). Middle and right, IgE immunoreactivity of 12 patients, allergic to herbaceous pollen, tested against nettle and wall pellitory pollen protein (17-22 & 25-30). Relative masses expressed in kDa. 15, 16, 23, 24, 31 & 32 strips correspond to negative controls.

Wide variety composition of protein extracted with FastPrep® method



Protein profiles comparison of nettle and wall pellitory pollen obtained by FastPrep-24™ 5G (MP Bio) homogenization or by overnight incubation (OVN). The 4 extracts are used without dilution or concentration. SDS-PAGE 8-18 %. Coomassie blue gel staining.

Conclusion

- Protein extraction from pollen samples with the FastPrep-24™ 5G showed to be highly effective compared to the standard method based on overnight incubation.
- The effectiveness of the FastPrep® method is quantitative, higher protein yield, and qualitative, wide variety composition of protein extracts.
- The FastPrep® system is a powerful tool to get rapidly and with a very high reproducibility protein extracts ready for electrophoresis (SDS-PAGE) analysis.
- IgE immunoreactivity is conserved in protein extracted with the FastPrep-24™ 5G instrument.

www.mpbio.com

MP

FastPrep® Library

08R0315-1



Wind-induced mechanical rupture of birch pollen: Potential implications for allergen dispersal



Nicolas Visez^{a,*}, Guillaume Chassard^a, Najiha Azarkan^a, Oumsaad Naas^b,
Hélène Sénéchal^c, Jean-Pierre Sutra^c, Pascal Poncet^{c,d}, Marie Choël^e

^a Université de Lille, Physicochimie des Processus de Combustion et de l'Atmosphère, UMR CNRS 8522, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

^b Université Ziane Achour de Djelfa, Laboratoire de Dispositifs Micro-ondes et Matériaux pour les Energies Renouvelables, Algeria

^c Armand Trousseau Children Hospital, Biochemistry Department, Allergy & Environment team, 26 avenue du Dr. Arnold Netter, 75571 Paris, France

^d Pasteur Institute, Infections & Epidemiology Department, 25-28 Rue du Dr. Roux, 75724 Paris 15, France

^e Université de Lille, Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman, CNRS UMR 8516, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 April 2015

Received in revised form

9 July 2015

Accepted 17 July 2015

Available online 29 July 2015

Keywords:

Pollen Allergy

Bioaerosol

Aerobiology

Thunderstorm-related Asthma

ABSTRACT

Mechanical rupture of pollen grains after a mechanical shock against a solid surface was tested as a new approach to one of the mechanisms related to the release of allergen loaded particles from pollen. Birch pollen was aerosolized and sent into an impactor to mimic a shock against a surface (trees, soil, walls, etc.) at wind speeds of atmospheric-relevance. Small particles in the range of 1–2.5 μm were released subsequently to pollen impaction. The number of particles released increased with the velocity of impaction and with the water content of pollen. Damaged grains were observed by transmission electron microscopy and released particles are most likely cytoplasmic granules. This mechanism of pollen rupture and/or discharge may be of great importance in urban environment and may significantly contribute to thunderstorm-related allergic asthma and other associated pollen subparticles IgE mediated diseases.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Detection of pollen allergens in the PM_{10} fraction of the atmospheric aerosol have been widely reported for different pollen species, environments and sampling conditions (Busse, Reed, & Hoehne, 1972; Miguel, Cass, Glovsky, & Weiss, 1999; Riediker, Koller, & Monn, 2000a; Schäppi, Taylor, Suphioglu, & Knox, 1997; Spieksma et al., 1990; Spieksma & Nikkels, 1999; Suphioglu et al., 1992; Traidl-Hoffmann et al., 2003). Several hypotheses are proposed to explain the presence of pollen allergens in small-sized atmospheric particles (Duhoux, 1982; Grundstein & Samat, 2009; Liu & Zhang, 2004; Sofiev & Bergmann, 2012; Solomon, 2002; Taylor, Jacobson, House, & Glovsky, 2007). A first suggested mechanism can be the dispersion of pollen parts, either outer subparticles as orbicules (Vinckier, Cadot, Grote, Ceuppens, & Smets, 2006; Vinckier, Cadot, & Smets, 2005) or inner pollen subparticles including pollen cytoplasmic granules (Motta, Marliere, Peltre, Sterenberg, & Lacroix, 2006). Orbicules dispersion is greatly dependent on the species: birch pollen orbicules are for example uncommon when compared

* Corresponding author. Tel.: +33 320 436 562.

E-mail address: nicolas.visez@univ-lille1.fr (N. Visez).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaerosci.2015.07.005>

0021-8502/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

at least with cypress ones. Secondly, free allergens may be associated to small inorganic particles following a contact between pollen grains and such particles including pollutants (Knox et al., 1997; Solomon, 2002). The biology and chemistry of this specific mechanism is difficult to explore in atmospheric conditions but it has been demonstrated under laboratory conditions (Knox et al., 1997; Ormstad, Johansen, & Gaarder, 1998; Taylor, Flagan, Miguel, Valenta, & Glovsky, 2004).

In some potential, already experimentally explored, allergen dispersal mechanism, pollen cytoplasm is released subsequently to a contact of pollen grain with liquid water or in high relative humidity conditions (Grote, Valenta, & Reichelt, 2003; Miguel, Taylor, House, Glovsky, & Flagan, 2006; Taylor et al., 2004). Rupture of pollen envelope occurs then via osmotic shock for grass species or mainly via abortive germination for birch. It permits in both cases the dispersion of pollen granules (Taylor et al., 2004; Taylor, Flagan, Valenta, & Glovsky, 2002). Hundreds of these particles are present in each pollen grain with a size comprised between 0.5 and 4.5 μm (Bacsi, Choudhury, Dharajiya, Sur, & Boldogh, 2006). Different authors speak at the same time of the starch granules (Schäppi, Suphioglu, Taylor, & Knox, 1997), polysaccharide particles (Heslop-Harrison & Heslop-Harrison, 1982), and other paucimicronic elements. The allergenic potential of these granules have already been reported for several pollens (Abou Chakra et al., 2011, 2012, 2009; Grote, Vrtala, Niederberger, Valenta, & Reichelt, 2000; Schäppi, Taylor, Staff, Suphioglu, & Knox, 1997; Schäppi et al., 1999). Allergens are indeed mainly located into pollen cytoplasm where pollen granules are stored (Emilson, Berggren, Svensson, Takahashi, & Scheynius, 1996; Grote, 1999; Grote et al., 2003). Such small particles, disseminated in the atmosphere, have a clear potential for deep penetration in the human respiratory tract where they could effectively be determinant for triggering asthma (Abou Chakra et al., 2012; Beggs, 1998). The mechanical properties of pollen have already been studied with the aim of optimizing the extraction of nutrients or active substances located inside the grains (Liu & Zhang, 2004). Mechanical destruction of pollen is also studied by palynologists for questions regarding the preservation of pollen through the ages (Campbell, 1991; Campbell & Campbell, 1994). Degradation of pollen has already been observed in atmospheric conditions with pollen being torn, with cracks or empty of their content (Shahali, Pourpak, Moin, Mari, & Majd, 2009; Shahali, Pourpak, Moin, Zare, & Majd, 2009; Taylor et al., 2002, 2004). Nevertheless and to the best of our knowledge, the mechanical rupture of pollen grains has never been directly experimented for atmospheric-relevant conditions, even if, by instance, works on rebound have already been proposed (Aylor & Ferrandino, 1967; Paw, 1983).

In this work, pollen grains were sent into an impactor with relatively low wind-speed to simulate a mechanical shock of pollen against a solid surface (tree, soil, walls, etc.). The subsequent release of particles was quantified with an Aerodynamic Particle Sizer. Birch pollen was chosen for its relevance to the current allergy context in Northern and Eastern Europe where the birch tree is largely present in parks, gardens and recreation zones within urban and suburban areas. Birch pollen is among the most allergenic pollen in these regions. In the present work, we suggest that the rupture of pollen grain following a mechanical stress is a mechanism for pollen cytoplasmic granules and pollen allergen atmospheric dispersal.

2. Materials and methods

2.1. Birch pollen material

Birch Pollen (*Betula pendula*) was harvested in semi-rural areas during pollination of birch in March 2014. Fresh pollen was sieved at 40 μm , placed several hours in a dry atmosphere for desiccation and then stored hermetically at 4 °C. All experiments were done within the month following harvesting.

Fresh water content of the pollen was estimated at about 40% by heating at 100 °C for 8 h and subsequent weighing. Mass of pollen harvested per catkin was around 10 mg, corresponding to an estimated number of 1.6 million pollen grains per catkin, given a single grain pollen mass of 6.1–6.7 ng (Erdman, 1969). For a single *Betula* pollen grain, Schäppi et al. estimated the amount of major allergen Bet v 1 at 0.006 ng, meaning at least around 5% of the total pollen protein content (Schäppi, Suphioglu, Taylor, & Knox, 1997; Schäppi, Taylor et al., 1997).

Dried pollen was obtained by flushing the grains during 8 or 15 h with synthetic air. After drying, pollen water content was estimated to respectively 10% and 0% for pollen dried for 8 h and 15 h. Humidified pollen was obtained by flushing during 8 h the pollen with synthetic air at relative humidity of 40%; the humidified pollen has an estimated water content of 40%.

2.2. Impactor device

The experimental set-up is represented schematically in Fig. 1 for total air flows between 5 and 15 L min^{-1} . Prior to an experiment, the set-up was purged several minutes with particle-free synthetic air. During these purges, the absence of particles was checked with an Aerodynamic Particle Sizer (APS 3321 TSI). The APS gives aerodynamic diameter size distribution from 0.5 to 20 μm with a sampling time set to 20 s. PM_{10-20} will refer to the fraction of the particles with an aerodynamic diameter between 10 and 20 μm .

2.3. Experimental procedures

For an experimental run with pollen, 3 mg of pollen were aerosolized into an air stream with flows between 5 and 15 L min^{-1} regulated by mass-flow controllers. Native pollen size-distributions were obtained with Fig. 1 set-up (a): the aerosolized pollen was sent to a buffer volume of 1 L where the APS collects 5 L min^{-1} . Mechanical stress of the pollen was performed with a 3-stage cascade impactor (Dekati PM_{10}) as shown in Fig. 1 set-up (b). The impactor was solely equipped

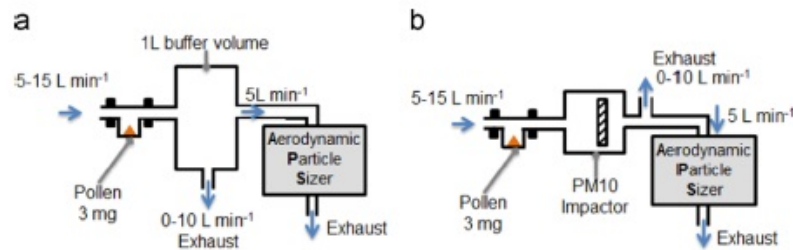


Fig. 1. Schematic view of the two experimental set-ups for size distribution measurements with a total air flow of 5–15 L min⁻¹ of (a) native pollen without mechanical stress and (b) pollen sent on an impactor plate (impacted pollen).

with a PM₁₀ impaction plate; only the PM₁₀ stage was installed on the impactor. Air flow was accelerated at the impactor entrance through an 8 mm orifice and airborne pollen is supposed to reach the same velocity as the gas. The APS was sampling 5 L min⁻¹ at the outlet of the impactor. All experiments were done at laboratory temperature: 20 °C.

For the purpose of offline analysis, pollen and smaller particles were collected on impaction plates PM₁₀ and PM_{0.1} with aerodynamic diameter cut-points of 10 μm and 0.1 μm respectively. Particles were sampled onto adhesive conductive carbon tapes. Investigation of structural damage of the grains and imaging of micrometer-sized particles were performed by FEG-SEM (Hitachi S-4700).

3. Results

3.1. Native pollen size distribution (without impaction)

Aerodynamic size distribution was determined for birch pollen without impaction, referred as 'native pollen', with a flow of 15 L min⁻¹ (Fig. 2, triangles). The aerodynamic diameter for birch pollen was measured between 14 and 16 μm. Small particles with a mean aerodynamic diameter between 1 and 2.5 μm have been detected simultaneously to pollen grains in the experiment without impaction. PM₁₀₋₂₀ was assimilated to pollen grains and the observed ratio PM₁₀/PM₁₀₋₂₀ was around 0.4 (there was 0.4 small-sized particles per pollen grain counted by the APS). The pollen concentration in experiments without impaction has been determined to 59 ± 6 grains cm⁻³. The reproducibility of the concentration of pollen in the aerosol formed by our experimental set-up is good: ± 10% on three runs in the same conditions. This pollen concentrations of 59 grains cm⁻³ account for 66% of the expected pollen concentrations if all the initial pollen grains (3 mg) have reached and were counted by the APS. The difference is mainly explained by losses by sedimentation which were indeed expected to be important for large particles. It was confirmed by observation of pollen deposition in tubing and in the buffer volume. The difference may also be explained by incorrect pollen counting in APS. However, it should be mentioned that APS counting efficiency is expected to be very high, better than 90% for solid particles (Volckens & Peters, 2005).

3.2. Release of fine particles following pollen grains impaction

When the pollen aerosol was directed to the PM₁₀ impactor with a flow of 15 L min⁻¹ the number concentration of fine particles was higher by a factor of 4 compared with native pollen experiments (Fig. 2 square and Table 1). The PM₁₀/PM₁₀₋₂₀ ratio for impaction experiments reaching up to 1.7 (1.7 fine particles released on average for 1 pollen grain counted by APS). As shown by the peak centered at 15 μm in the size distribution, pollen grains were not completely stopped by the PM₁₀ impaction plate. It should be mentioned that no greasing of the impaction surface was applied to prevent particle bounce.

3.3. Effects of air flow and velocity on small particles release

The amplitude of the mechanical stress was investigated by using different flow velocities: 5, 10 and 15 L min⁻¹. The total number of particles determined by APS and the corresponding pollen masses are reported together as a function of air flow rates in Table 1. When the flow velocities was increased the total number of fine particles increased as shown in Fig. 3.

3.4. Effect of pollen dryness

The influence of pollen dryness on the mechanical rupture was studied by drying or humidifying pollen prior to impaction (Fig. 4). The initial mass of pollen sample, 3 mg, was the same for all the experiments even if the water content of pollen sample was modified. As the water content was increased, the mass of a single pollen grain increased and the initial number of pollen grains contained in 3 mg decreased, as measured with the APS pollen total counts. Therefore, the data were normalized by the total count of PM₁₀₋₂₀ to compare the particles released with the same amount of aerosolized

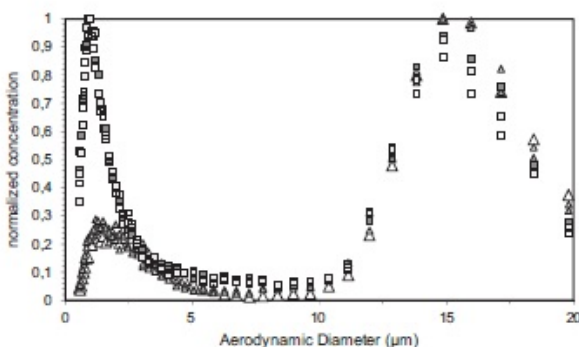


Fig. 2. Comparison of the native pollen aerodynamic size distribution (triangles) and impaction of the pollen (square) on PM_{10} impactor stage at 15 L min^{-1} . Three measurements are drawn to show the good reproducibility of experiments. Size distribution were normalized with the highest concentration.

Table 1

Total number of particles released and the airborne pollen mass determined by APS measurements for the different flow velocities. Average of three experiments; errors are maximum dispersion between the triplicate experiments.

Type of experiment	Flow rate		Released particles ($\# \text{ cm}^{-3}$)	Pollen ($\# \text{ cm}^{-3}$)
	L min^{-1}	m s^{-1}		
Without impaction	15	5.0	23 ± 2	59 ± 6 (66% ^a)
Impaction	5	1.7	46 ± 8	13 ± 3 (5% ^a)
	10	3.3	62 ± 11	53 ± 5 (39% ^a)
	15	5.0	95 ± 7	55 ± 3 (62% ^a)

^a Estimated percentage of initial pollen detected by APS.

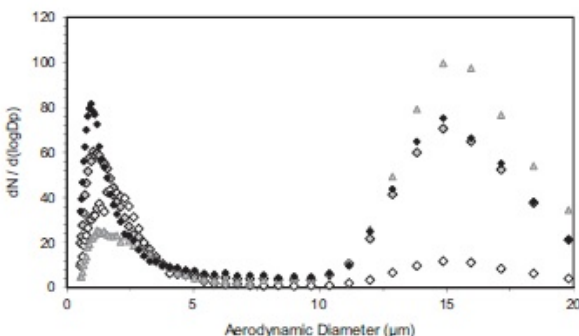


Fig. 3. Number size distributions for three different flow rates: (Δ) native pollen (no impaction) at 15 L min^{-1} , (\diamond) impaction at 5 L min^{-1} , (\circ) impaction at 10 L min^{-1} and (\star) impaction at 15 L min^{-1} . Data shown are averages of triplicate experiments. Error bars are not shown for clarity reasons; maximum deviation for triplicates was $\pm 20\%$.

pollen. This correction is only applicable to take into account the initial number of pollen grains. However, the aerosolization process of pollen may be affected by the water content of pollen grains.

As the water content increases from 0% to 40%, the release of fine particles was enhanced by more than a factor of 5 for value corrected with the same pollen counts.

3.5. TEM observations

TEM images of a broken pollen grain with cracks on exine and cytoplasmic granules (CGs) are shown in Fig. 5. Native pollen was also observed to ensure that no small particles, including orbicules, were initially present on pollen grains (not shown). No physical damage was observed on native pollen grains unlike to impacted pollen grains (Fig. 5a–c).

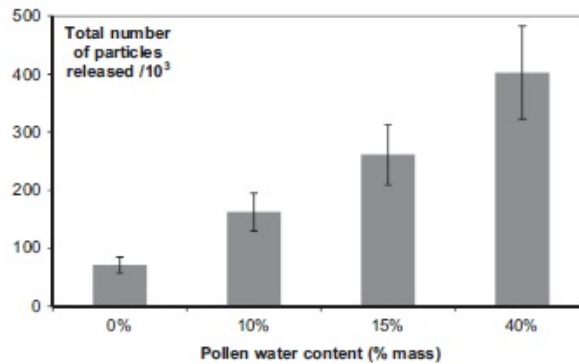


Fig. 4. Total number of fine particles (less than $10\ \mu\text{m}$) released during impactation of pollen with a flow of $15\ \text{L}\ \text{min}^{-1}$ as a function of the pollen dryness. Error bars were set to the maximum deviation observed: $\pm 20\%$.

4. Discussion

Transportation of birch pollen in air has resulted in pollen grain rupture and dispersal of allergens via CGs after a mechanical stress. To the best of our knowledge, this is the first report of this mechanism of rupture for pollen. Repeatability of the experiment of rupture was very good and TEM images proved the effective rupture of pollen and the dispersal as an aerosol of cytoplasmic granules. Fine particles mean diameter determined by APS and TEM was in the micrometer range and fitted with the cytoplasmic granules expected size.

The velocities of flow used for mechanical rupture has been chosen to match mean wind velocities for birch pollination period. Pollen was indeed impacted at flow rates of $2\text{--}5\ \text{m}\ \text{s}^{-1}$, namely a 'light or gentle breeze' on Beaufort wind scale ($5\text{--}18\ \text{km}\ \text{h}^{-1}$). An increase in pollen velocity during impactation increases the number of particles released. The pollen kinetic energy is increasing with the flow velocity and the mechanical stress due to impactation will be accordingly increased. Higher wind velocities may likely happen during pollination and cause more numerous grain ruptures.

Shape and mass of pollen will change with higher water content and has led to more rupture of grains in our experiments. Two explanations are proposed for this observation. Pollen exine may be more fragile with a higher water content or, as the mass of a single grain rise because of water, the impactation of pollen may be more severe (on a kinetic energy point of view) or more frequent (more pollen grain hits the impactation plate).

Impactation velocity and the pollen water content directly correlate with the number of particles released. Therefore, the meteorological conditions, wind speeds and atmospheric relative humidity, will directly rule the extent of this allergen dispersal mechanism in the atmosphere. This mechanism of pollen rupture may therefore have implications in thunderstorm-related asthma (Taylor & Jonsson, 2004).

The total number of pollen count was much lower with the lower flow rate; higher losses and less re-suspension of large particles are indeed expected when decreasing the flow velocity.

Only a fraction of the total number of grains was broken during laboratory impactation. The $\text{PM}_{10}/\text{PM}_{10-20}$ ratio was 1.7 for $15\ \text{L}\ \text{min}^{-1}$ impactation. Indeed by considering that birch pollen cytoplasm is filled with hundreds of granules, the rupture of one pollen grain is likely to emit hundreds of micrometer-sized particles. If we count $100\text{--}1000$ particles released per broken pollen grain, the breaking of grain occurs in our laboratory conditions between 1 and 10 times for 1000 pollen grains.

The main limitation of this work is to extrapolate our findings to birch allergen dispersion in $\text{PM}_{2.5}$ in real atmospheric conditions. Laboratory conditions, like flow velocities, pollen freshness, and water content of pollen, matched atmospheric conditions. It is indeed difficult to extrapolate the total number of particles released by this rupture process in real atmospheric conditions and the importance of this mechanism for birch allergenicity, but it is however quite evident that such allergen-loaded pollen subparticles can interfere with patients epithelia. They can, more easily than whole pollen grains do, line both nasal and bronchial epithelium membranes. At least and given the ratio of $\text{PM}_{10}/\text{PM}_{10-20}$ determined for laboratory conditions, the number of particles released directly as an aerosol should be several times higher than the pollen counts. For a maximum of $622\ \text{grains}\ \text{m}^{-3}$ of ambient air observed in France during HIALINE project (Buters et al., 2012), CGs could be expected to be in the order of more than a thousand per cubic meter. Besides, this mechanism of rupture may have higher occurrence probability in cities where buildings provide many nearby obstacles and even moving vehicles may provide high velocity obstacles for pollen impactation. During preliminary tests for the preparation of this work, pollen from different trees, different pollination season (2012–2013) and at least from one distant sampling point in France ($> 500\ \text{km}$) were also ruptured during impactation. This rupture mechanism is indeed very likely to be a general feature among birch pollen grains.

The mechanical rupture of pollen may also occur during atmospheric pollen samplings with high volume samplers creating biases in allergen determination in fine particles fraction. Pollen rupture indeed occurred in laboratory conditions in a $10\ \text{L}\ \text{min}^{-1}$ impactor. If pollen broke into the impactors, biases could be expected in determination of the partition of

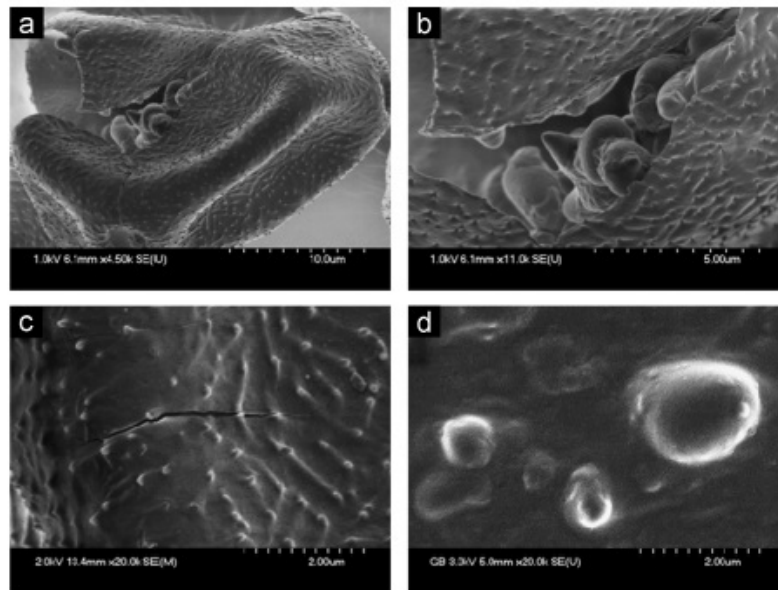


Fig. 5. TEM images: ruptured birch pollen grain (a), view of the CGs inside the grain (b), crack on an impacted pollen grain (c), and fine particles sampling (d).

allergen between pollen and PM_{10} . Greasing the impaction stage will however overcome this sampling issue in most cases (Riediker, Koller, & Monn, 2000b).

5. Conclusion

Mechanical rupture of birch pollen has been shown to occur in laboratory under atmospherically-relevant conditions. The rupture of pollen grains lead to the release of respirable-sized particles. This pollen sub-particles releasing has two major atmospheric implications: potential contribution to ice or cloud condensation nuclei and contribution to health-related allergen dispersal. Cloud condensation nuclei ability of pollen subparticles has already been shown (Steiner et al., 2015) as well as ice nuclei ability (Hader et al., 2014). The rupture mechanism presented here may be an important sub-pollen particles source for these processes as the released particles are directly emitted as aerosols free to further interact with water. Pollen allergens are a real concern in allergy and allergens transported on small particles, such as orbicules, granules and various cytoplasmic debris, have a clear potential for deep penetration in the human respiratory tract where they could effectively trigger asthma (Abou Chakra et al., 2012; Beggs, 1998). Allergic reactions mediated by IgE appear very soon (15–30 min) after the contact with the allergen in a sensitized host. In the case of pollen allergy, these reactions induce mainly allergic asthma and seasonal rhino-conjunctivitis that can be combined, in large cities, with inflammation linked to atmospheric pollutants. The atmospheric aerosol consists of very different types of particles like viruses, bacteria, mold, plant fibers and pollen from anemophilous plants.

This new approach focusing on impaction mechanism and discharge or release of pollen internal small particles could be a clear basis for physicians and city managers for questioning and understanding the persistence of allergic symptoms after the main pollen season for a given species. What is true for *Betula* pollen grains in terms of discharge of internal cytoplasmic granules should be true for other potential allergenic pollen grains like, by instance, those of multiple grasses as well as different herbs and weeds among which *Artemisia* and *Ambrosia*.

Moreover, the modification and weakening of pollen grains is expected in polluted conditions (Kalkar Surekha, & Renu, 2014; Motta et al., 2006; Mumford, Lipke, Laufer, & Feder, 1972; Rezanejad, 2009; Risse, Tomczok, Huss-Marp, Darsow, & Behrendt, 2000). Atmospheric pollution may therefore play an exacerbating role in the allergen dispersal by mechanical rupture of pollen. We suggest that further work on mechanical stress of laboratory-polluted pollen and of pollen harvested in polluted urban areas has to be carried out.

Acknowledgments

The CaPPA project (Chemical and Physical Properties of the Atmosphere) is funded by the French National Research Agency (ANR) through the Programme d'Investissement d'Avenir (PIA) under contract "ANR-11-LABX-0005-01" and by the

Regional Council “Nord-Pas de Calais” and the “European Funds for Regional Economic Development (FEDER)”. The SEM facility of the University of Lille is supported by the Regional Council “Nord-Pas de Calais”, and the FEDER. N.V. gratefully thanks the “Réseau National de Surveillance Aérobiologique” for technical support and the University of Lille for financial support. N.V. thanks Gaël Loubert for participation in experimental work.

References

- Abou Chakra, O., Rogerieux, F., Poncet, P., Sutra, J.-P., Peltre, G., & Sénéchal, H., et al. (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., et al. (2012). Proteomic analysis of major and minor allergens from isolated pollen cytoplasmic granules. *Journal of Proteome Research*, *11*, 1208–1216.
- Abou Chakra, O.R., Sutra, J.-P., Rogerieux, F., Peltre, G., Sénéchal, H., & Lacroix, G. (2009). Immunological interactive effects between pollen grains and their cytoplasmic granules on brown Norway rats. *World Allergy Organization Journal*, *2*, 201–207.
- Aylor, D.E., & Ferrandino, F.J. (1967). Rebound of pollen and spores during deposition on cylinders by inertial impaction. *Atmospheric Environment*, *1967(19)*, 803–806.
- 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.
- Beggs, P.J. (1998). Pollen and pollen antigen as triggers of asthma – What to measure?. *Atmospheric Environment*, *32*, 1777–1783.
- Busse, W.W., Reed, C.E., & Hoehne, J.H. (1972). Where is the allergic reaction in ragweed asthma? II. Demonstration of ragweed antigen in airborne particles smaller than pollen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *50*, 289–293.
- Buters, J., Thibaudon, M., Smith, M., Kennedy, R., Rantio-Lehtimäki, A., & Albertini, R., et al. (2012). Release of Bet v 1 from birch pollen from 5 European countries. Results from the HIAJUNE study. *Atmospheric Environment*, *55*, 496–505.
- Campbell, I.D. (1991). Experimental mechanical destruction of pollen grains. *Palynology*, *15*, 29–33.
- Campbell, I.D., & Campbell, C. (1994). Pollen preservation: Experimental wet-dry cycles in saline and desalinated sediments. *Palynology*, *18*, 5–10.
- Duhoux, E. (1982). Mechanism of exine rupture in hydrated taxoid type of pollen. *Grana*, *21*, 1–7.
- Emilson, A., Berggren, B., Svensson, A., Takahashi, Y., & Scheynius, A. (1996). Localization of the major allergen Bet v 1 in birch pollen by confocal laser scanning microscopy. *Grana*, *35*, 199–204.
- Erdman, G. (1969). *Handbook of palynology. Morphology, taxonomy and ecology. An introduction to the study of pollen grains and spores*. Munksgaard: Copenhagen.
- 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., Valenta, R., & Reichelt, R. (2000). Expulsion of allergen-containing materials from hydrated rye grass (*Lolium perenne*) pollen revealed by using immunogold field emission scanning and transmission electron microscopy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *105*, 1140–1145.
- Grundstein, A., & Sarnat, S.E. (2009). Meteorological mechanisms explaining thunderstorm-related asthma. *Geography Compass*, *3*, 45–63.
- Hader, J.D., Wright, T.P., & Petters, M.D. (2014). Contribution of pollen to atmospheric ice nuclei concentrations. *Atmospheric Chemistry and Physics*, *14*, 5433–5449.
- Heslop-Harrison, J., & Heslop-Harrison, Y. (1982). The growth of the grass pollen tube: I. Characteristics of the polysaccharide particles (“P-particles”) associated with apical growth. *Protoplasma*, *112*, 71–80.
- Kalkar Surekha, A., & Renu, J. (2014). Effects of industrial pollution on pollen morphology of Cassia species. *International Journal of Life Sciences*, *2*, 17–22.
- Knox, R.B., Suphioglu, C., Taylor, P., Desai, R., Watson, H.C., & Peng, J.L., et al. (1997). Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: Implications for asthma and air pollution. *Clinical & Experimental Allergy*, *27*, 246–251.
- Liu, T., & Zhang, Z. (2004). Mechanical properties of desiccated ragweed pollen grains determined by micromanipulation and theoretical modelling. *Biotechnology and Bioengineering*, *85*, 770–775.
- Miguel, A.G., Cass, G.R., Glovsky, M.M., & Weiss, J. (1999). Allergens in paved road dust and airborne particles. *Environmental Science and Technology*, *33*, 4159–4168.
- Miguel, A.G., Taylor, P.E., House, J., Glovsky, M.M., & Fagan, R.C. (2006). Meteorological influences on respirable fragment release from Chinese elm pollen. *Aerosol Science and Technology*, *40*, 690–696.
- Motta, A., Marliere, M., Peltre, G., Stenborg, 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.
- Mumford, R.A., Lipke, H., Laufer, D.A., & Feder, W.A. (1972). Ozone-induced changes in corn pollen. *Environmental Science and Technology*, *6*, 427–430.
- Ormstad, H., Johansen, B., & Gaarder, P. (1998). Airborne house dust particles and diesel exhaust particles as allergen carriers. *Clinical & Experimental Allergy*, *28*, 702–708.
- Paw, U.K.T. (1983). The rebound of particles from natural surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, *93*, 442–452.
- Rezanejad, F. (2009). Air pollution effects on structure, proteins and flavonoids in pollen grains of *Thuja orientalis* L. (Cupressaceae). *Grana*, *48*, 205–213.
- Riediker, M., Koller, T., & Monn, C. (2000a). Determination of birch pollen allergens in different aerosol sizes. *Aerobiologia*, *16*, 251–254.
- Riediker, M., Koller, T., & Monn, C. (2000b). Differences in size selective aerosol sampling for pollen allergen detection using high-volume cascade impactors. *Clinical & Experimental Allergy*, *30*, 867–873.
- Risse, U., Tomczak, J., Huss-Marp, J., Darsow, U., & Behrendt, H. (2000). Health-relevant interaction between airborne particulate matter and aeroallergens (pollen). *Journal of Aerosol Science*, *31*, 27–28.
- 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.
- Schäppi, G.F., Taylor, P.E., Pain, M.C.F., Cameron, P.A., Dent, A.W., & Staff, I.A., et al. (1999). Concentrations of major grass group 5 allergens in pollen grains and atmospheric particles: Implications for hay fever and allergic asthma sufferers sensitized to grass pollen allergens. *Clinical & Experimental Allergy*, *29*, 633–641.
- Schäppi, G.F., Taylor, P.E., Staff, I.A., Suphioglu, C., & Knox, R.B. (1997). Source of Bet v 1 loaded inhalable particles from birch revealed. *Sexual Plant Reproduction*, *10*, 315–323.
- 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.
- 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.
- Sofiev, M., & Bergmann, K.-C. (2012). *Allergenic pollen: A review of the production, release, distribution and health impacts*. Springer: Netherlands.
- Solomon, W.R. (2002). Airborne pollen: A brief life. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *109*, 895–900.

- Spieksma, F.T.M., Kramps, J.A., Van Der Linden, A.C., Nikkels, B.H., Plomp, A., & Koerten, H.K., et al. (1990). Evidence of grass-pollen allergenic activity in the smaller micronic atmospheric aerosol fraction. *Clinical & Experimental Allergy*, 20, 273–280.
- Spieksma, M., & Nikkels, A. (1999). Similarity in seasonal appearance between atmospheric birch-pollen grains and allergen in paucimicronic, size-fractionated ambient aerosol. *Allergy*, 54, 235–241.
- Steiner, A.L., Brooks, S.D., Deng, C., Thomson, D.C.O., Pendleton, M.W., & Bryant, V. (2015). Pollen as atmospheric cloud condensation nuclei. *Geophysical Research Letters*, 2015, GL064060.
- Suphioglu, C., Singh, M.B., Taylor, P., Knox, R.B., Bellomo, R., & Holmes, P., et al. (1992). Mechanism of grass-pollen-induced asthma. *The Lancet*, 339, 569–572.
- Taylor, P., Flagan, R., Miguel, A., Valenta, R., & Glovsky, M. (2004). Birch pollen rupture and the release of aerosols of respirable allergens. *Clinical & Experimental Allergy*, 34, 1591–1596.
- Taylor, P., & Jonsson, H. (2004). Thunderstorm asthma. *Current Allergy and Asthma Reports*, 4, 409–413.
- 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.
- Traidl-Hoffmann, C., Kasche, A., Menzel, A., Jakob, T., Thiel, M., & Ring, J., et al. (2003). Impact of pollen on human health: More than allergen carriers?. *International Archives of Allergy and Immunology*, 131, 1–13.
- 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., Cadot, P., & Smets, E. (2005). The manifold characters of orbicules: Structural diversity, systematic significance, and vectors for allergens. *Grana*, 44, 300–307.
- Volkens, J., & Peters, T.M. (2005). Counting and particle transmission efficiency of the aerodynamic particle sizer. *Journal of Aerosol Science*, 36, 1400–1408.

Le Pollen de Pin d'Alep Bio-Indicateur de la Pollution Atmosphérique

naasoumsaad@hotmail.fr

O. NAAS¹ ; A.S. VERCOUTTER- EDOUART² ; C. RAMBAUD³ et N. VISEZ⁴

¹. Laboratoire de Dispositifs Micro-ondes et Matériaux pour les Energies Renouvelables. DIMMER. Université Ziane Achour de Djelfa. Algérie.

². Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle. UMR 8576 INSERM/CNRS/Université de Lille.

³. Unité de Stress Abiotique et Différenciation des Végétaux Cultivés. SADV. UMR 1281 INRA/Université de Lille.

⁴. Laboratoire de Physicochimie des Processus de Combustion et de l'Atmosphère. PC2A. UMR 8522 CNRS/Université de Lille.

1. Résumé

Le pollen du pin d'Alep, *Pinus halepensis* Mill., est testé pour sa capacité à servir de bio-indicateur de la pollution atmosphérique. Les polluants atmosphériques peuvent en effet perturber physiologiquement le pollen. Ces perturbations atteignent soit la composition biochimique du pollen, soit la morphologie du grain comme sa taille et sa forme, soit également la fonction de reproduction du pollen : sa viabilité.

Les perturbations engendrées par la pollution sur le pollen ont été recherchées par :

- des mesures de la viabilité après réhydratation du pollen pendant 16h et des tests de fertilité effectués par un test colorimétrique avec le réactif d'Alexander (1969) ;
- des mesures de l'acidification des grains de pollen ;
- des dosages des protéines hydrosolubles par électrophorèse SDS-PAGE.

L'influence du lieu de prélèvements du pollen sur ces différents tests sera discutée et une comparaison avec la pollution artificielle à l'ozone en laboratoire sera effectuée.

Mots clefs : Bio-indication ; pollen ; *Pinus halepensis* Mill. ; Ozonolyse ; viabilité ; SDS-PAGE.

2. Introduction :

Dans le contexte de la mesure de la pollution atmosphérique s'inscrit la bio-surveillance comme un outil important (Garrec, 1996 ; L'huissier, 1998 ; Gottardini et al, 2004 ; Bosch-Cano, 2012), qui complète généralement les dispositifs de mesures automatiques (L'huissier, 1998 ; Pucket, 1988 in Dmuchowski et al, 2011; Bosch-Cano, 2012).

Elle se définit selon Garrec et Van Haluwyn (2002), comme : «l'utilisation à tous les niveaux d'organisation biologique (moléculaire, biochimique, cellulaire,

physiologique, histologique, morphologique, écologique) d'un organisme ou d'un ensemble d'organismes pour prévoir et/ou révéler une altération de l'environnement et pour en suivre l'évolution ».

La bioindication de quelques espèces du genre *Pinus* tels que : *Pinus brutia* ; *Pinus sylvestris* et *Pinus canariensis* L. ; *Pinus taeda* a fait l'objet des recherches de : Ruffin et al (1983) ; Micieta et Murin (1996) ; Pukacki et Chalupka (2003) ; Tausz, et al (2005) ; Dogan et al (2007) ; Adekola et al (2002) et Dmuchowski et al (2011).

Micieta et Murin (1996) ont confirmé l'aptitude bio-indicatrice des trois espèces : *Pinus sylvestris*, *Pinus nigra* et *Pinus mugo*. Ces espèces ont montré des modifications importantes au niveau de la morphologie des grains de pollen qui ont été avortés et des anomalies au niveau des chromosomes des cellules méristématiques des aiguilles. L'ensemble de ces modifications a été observé sous un stress sévère d'une pollution chronique (concentrations élevées en : Pb et Cu fluorides, SO₂, NO₂, As, PCB, PAH (Phénanthrène, fluoranthène, pyrène, chrisène, perylène).

L'espèce *Pinus halepensis* Mill. a vu sa capacité à fixer le CO₂ diminuer sous l'effet combiné de l'air sec et de l'exposition à l'O₃ (Wellburn et al, 1996).

Dans l'objectif d'étudier l'effet de quelques polluants atmosphériques sur la viabilité et la structure du pollen du *Pinus halepensis* Mill., l'étude de l'effet de l'ozone sur cette catégorie de pollen, nous paraît importante du fait que ce gaz (l'un des polluants gazeux majeurs de l'atmosphère) affecte significativement la croissance et le développement des végétaux (Paoletti et al, 2007 ; Leisner et Ainsworth, 2012) et particulièrement le pollen (Higgins et al, 2000) ; il peut modifier la nature des nitrates des protéines des particules biologiques primaires de l'aérosol (pollen, spores fongiques (Franze et al, 2005 ; Yang et al, 2010 in Shiraiwa et al, 2011) ; comme il peut diminuer sa viabilité et augmente son pouvoir allergénique (Pasqualini et al, 2011).

3. Matériel :

Le pollen a été prélevé sur quatre sites en Algérie : Djelfa urbain (ville de Djelfa), pollution urbaine moyenne ; Djelfa rural (forêt de Senalba) ; Alger urbain (ville de Benaknoun), pollution urbaine importante et Alger rural (forêt de Bouchaoui).

3.1. Présentation des sites de l'étude :

Les sites choisis pour le prélèvement du pollen de cette étude présentent les caractéristiques citées dans le tableau ci-dessous :

Tableau N°1 : caractéristiques climatiques et édaphiques des sites de l'étude.

Paramètre	Alger urbain	Alger rural	Djelfa urbain	Djelfa rural
Altitude	258m	98m	1200 - 1492 m	1200- 1492 m
Type physiologique	Pinède	Pinède	Pinède	Pinède
sol	calci-magnésique	calci-magnésique	calci-magnésique	calci-magnésique
Hauteur approximative des arbres	15m	20m	20m	20m
Etage bioclimatique	Sub-humide	Sub-humide	Semi aride	Semi aride
Situation géographique	4 km d'Alger	12 km d'Alger	300 km au sud d'Alger	300 km au sud d'Alger

4. Méthodologie :

4.1. Echantillonnage:

4.1.1. Phase terrain (collecte) :

- Choisir au hasard une vingtaine (20) d'arbres ;
- Sélectionner une vingtaine (20) de cônes mâles en prenant en considération l'homogénéité de la sélection des cônes sur l'arbre (Figure N°1);
- Après cette sélection le nombre de cônes atteint est 400.

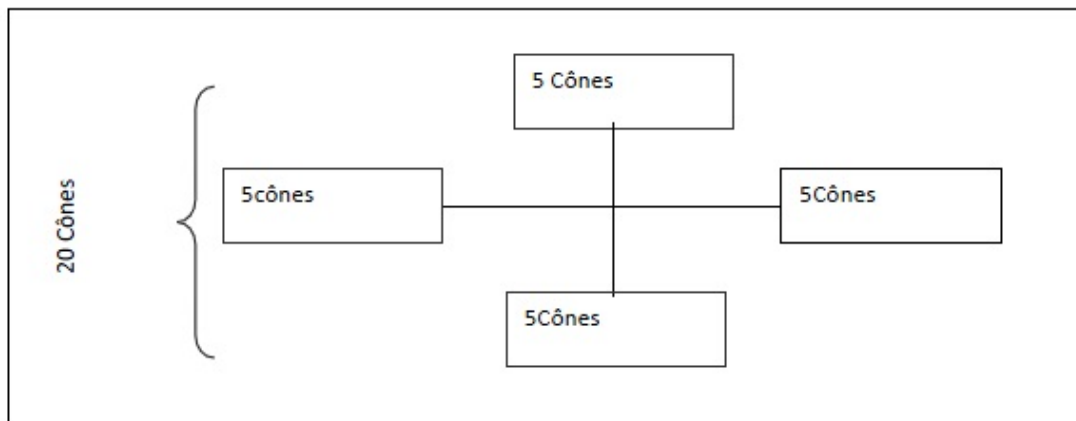


Figure N°1 : La récolte des cônes mâles sur les quatre faces de l'arbre

4.2. Phase laboratoire:

4.2.1. Séchage :

Le brassage de ces cônes dans un tamis de diamètre de 90 µm afin d'obtenir uniquement les grains de pollen et les conserver dans des conditions favorables.

Une déshydratation à l'étuve à 37°C et pendant 4 heures, a été effectuée sur le pollen récolté.

4.2.2. Conservation :

Le pollen déshydraté a été mis en conservation au froid à 4°C jusqu'à utilisation.

4.2.3. Traitements :

4.2.3.1. Exposition à l'O₃ :

L'exposition à l'ozone et à l'air sec, a été effectuée sur le pollen Alger rural collecté à la forêt naturelle de Bouchaoui, dite station non polluée, à différentes concentrations allant de 87 à 305 ppb et à différentes durées, de quelques minutes à plusieurs heures.

4.2.3.2. Réhydratation :

Dans notre étude de la viabilité du pollen de *Pinus halepensis* Mill., une réhydratation pendant 16h a été effectuée. La durée de 16 heures à 100% RH (humidité relative) est plutôt convenable selon Webber et Bonnet-Masimbert (1993) et Dumont-BéBoux et al (1999) pour le pollen du Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*). La même durée de réhydratation était adoptée comme un prétraitement effectué pour la germination du pollen du Pin (Colas et Mercier, 2000). D'après Jett et Frampton (1990) in Colas et Mercier (2000), la teneur en eau du pollen augmente rapidement après 2 heures de réhydratation à 20°C en atmosphère saturée, pour atteindre environ 20%. Un taux élevé de germination in vitro a été engendré après une durée de réhydratation de 1 et 3 heures.

4.3. Analyse :

4.3.1. Mesure du pH :

La mesure du pH a été réalisée sur 60mg du pollen de chaque station après l'ajout de 20ml d'eau distillée et sous agitation ultrasonique (agitateur Fisher Scientific FB 156046) pendant 10mn. Un Bécher témoin contenant de l'eau distillée a subi les mêmes étapes.

4.3.2. Test de fertilité :

La fertilité est la capacité des pollens à germer et à féconder ; ils sont dits « pollens viables ». Celle-ci est testée par le réactif d'Alexander (1969). Pour cela quelques mg de pollen ont été mis au centre de la lame microscopique sur une goutte du réactif, ensuite on le recouvre par une lamelle et on passe à l'observation microscopique, le comptage et la prise des photos.

4.3.3. Test de germination :

Un milieu M1 de pH=6,10 (10% saccharose + 200 mg/L H_3BO_3 + 200 mg/L $Ca(NO_3)_2$) a été préparé en s'inspirant du travail de Bao et al (2009), qui ont engendré des résultats significatifs et ont arrivé à optimiser un milieu de culture favorable pour la germination du pollen du *Betula luminifera*. D'après le test préliminaire qu'on avait réalisé sur le pollen de notre espèce d'étude *Pinus halepensis* Mill. avec ce milieu et un autre milieu M2 (2g de PEG 4000 (Serva)+ 100mg/100ml H_3BO_3 + 300mg/100ml $CaCl_2$) de pH=5,9 ; à une température d'incubation de 27°C ; le milieu M1 a donné de bons résultats du taux de germination.

4.3.4. Dosage des protéines hydrosolubles :

4.3.4.1. Extraction :

Après deux heures d'agitation à 4°C, les échantillons ont été récupérés et mis en centrifugation à V=14800 RPM (19000g) pendant T=30mn à 4°C.

4.3.4.2. SDS-PAGE :

On utilise le système Mini protean III de chez BioRad. Aux 60µl des échantillons (extrait du pollen), on ajoute 15µl de Tampon Laemmli 5X (1X : 250 mM Tris pH 6.8 (0.06 g x5); 5% SDS (0.5g) ; 5% beta-mercaptoéthanol (500µl) ; 40% Glycérol (4ml) ; Eau milli-Q) (qsp 10m). Puis on agite et on chauffe le mélange à 95°C pendant 10mn. A l'aide d'une seringue, on dépose dans les puits du gel en deux séries de dépôt les volumes : 35 µl et 17µl. La migration s'effectue à 20 mA/gel dans un tampon de migration (25 mM Tris base ; 192 Mm Glycine ; 0.1 % SDS ; eau distillée).

4.3.4.3. Coloration du gel :

Lorsque la migration des protéines dans le gel est terminée, le gel est démoulé puis soumis à la coloration.

4.3.4.4. Dosage protéique :

On utilise de kit micro-BCA de chez Thermo Scientific

5. Résultats et discussion :

5.1. Fertilité des grains de pollen :

La préparation microscopique que nous avons effectuée sur le pollen déshydraté et conservé au froid, en utilisant le réactif d'Alexander (1969), nous a permis d'obtenir une coloration qui surestime le taux de fertilité en considérant les grains de pollen fertiles ceux bien colorés en rouge et ceux qui ne sont pas colorés, comme stériles (Colas et Mercier, 2000).

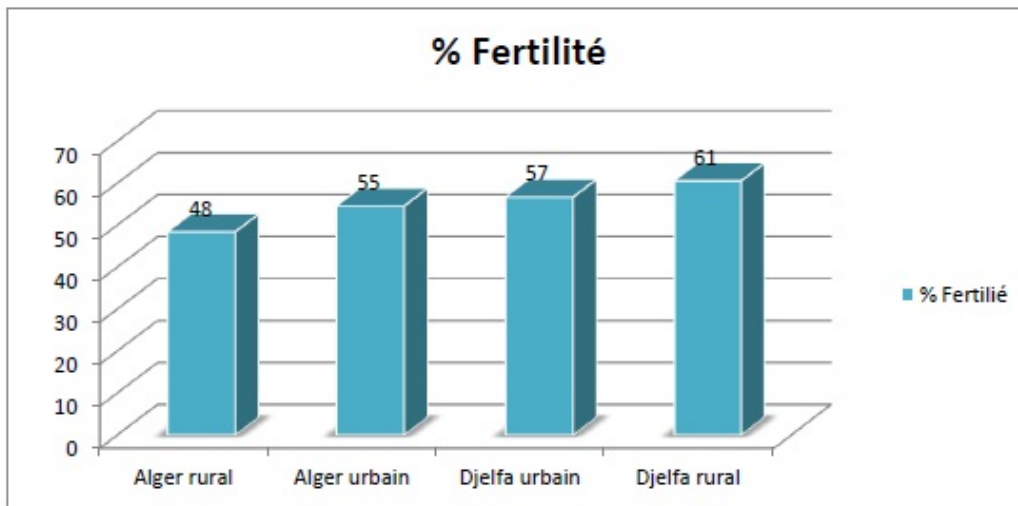


Figure N°2: Taux de fertilité du pollen déshydraté de *Pinus halepensis* Mill.

L'observation de la figure N°2, montre que le pollen rural à Alger a engendré le taux le plus faible 48% des sites étudiés ; et pour celui urbain, la fertilité est d'un pourcentage important 55%. D'après cette lecture, il semble que la fertilité du pollen prélevé du site de forte pollution atmosphérique, n'a pas été affectée par ce paramètre. Ce site est pourtant considéré parmi les endroits les plus pollués à Alger ((Yassaa et al, 2005 ; Ladjji et al, 2007 ; 2009a ; 2009b ; 2010 et 2013).

Par contre, le pollen Djelfa rural, enregistre le taux le plus élevé en dépassant la valeur engendrée chez le pollen urbain prélevé d'un site de faible pollution atmosphérique. Il semble que la viabilité du pollen a été affectée par la faible pollution atmosphérique présente dans cet endroit.

Au niveau de ce site on ne se dispose pas d'équipements de mesures ; mais d'après des observations, la région de Djelfa reste encore moins polluée par rapport aux grandes villes en Algérie.

Il faut rappeler ici que le test a été effectué sur un pollen déshydraté à 37°C pendant 4heures et conservé pendant un mois à 4°C. Les taux de fertilité que nous avons obtenus sont plus faibles que ceux enregistrés sur un pollen frais et pour les mêmes sites (entre 64 et 89%) (Kecir et Hadjari, 2011), ce qui montre l'abaissement de la viabilité du pollen après un mois de conservation. Les grains de pollen ont une résistance physique remarquable et ils sont biochimiquement inertes ; ce qui est due à la sporopollénine, le principal composant de l'exine (Pons, 1958 ; Reille, 1990 et Jeanne, 1993) ; donc, et selon Wang (1975) in Colas et Mercier (2000), toute détérioration est d'ordre physiologique ; elle serait due à des lésions survenues durant la phase de dessiccation : ce qui peut expliquer notre résultat.

La qualité du pollen est également affectée par les conditions de la conservation, tels que : le mode de déshydratation ; le type de contenant utilisé ; la température de conservation ; le mode d'acclimatation du pollen après la conservation et le mode de réhydratation après la conservation (Bajaj, 1987 in Colas et Mercier, 2000).

5.2. Mesure du pH :

La mesure de l'acidification de la surface des grains de pollen semble être un paramètre fiable dans la mesure de la bio-indication du pollen.

Dans le tableau ci-dessous, il est clair que l'effet de l'exposition à l'ozone n'a pas affecté le pH du pollen Alger rural : 6,2 après exposition contre 6,1 avant exposition. Ce dernier comparé au pollen Alger urbain, ne présente qu'une différence moyenne. Par contre, la différence en valeur de ce paramètre est assez importante entre le pollen Djelfa urbain avec 6,3 et celui Djelfa rural avec 5 ; ce dernier est clairement le plus 'acide'.

Tableau N°2 : Mesure du pH des grains de pollen de *Pinus halepensis* Mill. étudiés.

Pollen	pH après 24 heures
Blanc (eau distillée)	7,3
Alger rural Blanc	6,1
Alger rural (O ₃ =89ppb pendant 9h)	6,2
Alger urbain Blanc	5,6
Djelfa urbain Blanc	6,3
Djelfa rural Blanc	5,0

Le pollen Alger urbain marque une tendance acide sous l'effet de la pollution atmosphérique, par contre, chez le pollen Djelfa urbain une augmentation du pH, la plus élevée des mesures, a été enregistrée. Ceci peut être accordé à un autre facteur que celui de la pollution atmosphérique ou celui de la présence de l'ozone.

Dans l'étude de l'effet de l'ozone sur le pollen, Roshchina et Melnikova (2001), confirment son influence directe par oxydation sur les constituants de la paroi du grain de pollen.

La mesure du pH des grains de pollen peut nous renseigner sur le degré de sensibilité de la surface de la paroi externe du grain de pollen soumis à une atmosphère polluée ou chargée de polluants de différentes natures. Des travaux ont été entrepris en ce sujet ; un effet néfaste a été signalé par Hughes et Cox (1993) in

Colas et Mercier (2000), sur la germination du pollen des deux espèces : *Betula papyrifera* et *Betula cordifolia*, présents dans des endroits où une acidité à un niveau élevé caractérise le brouillard.

5.3. Germination :

5.3.1. Résultats :

Dans la mise au point de la durée de réhydratation et d'incubation idéale, pour obtenir un taux de germination de pollen important ; la réhydratation pendant 16heures et l'incubation pendant 24heures, ont été choisies pour notre protocole.

5.3.1.1. Germination du pollen de *Pinus halepensis* Mill. avec et sans ozonolyse :

Les résultats représentés dans la figure ci-dessous, montrent que l'ozonolyse prolongée à faible concentration affecte négativement la germination du pollen Alger rural en enregistrant le taux le plus faible.

Le pollen Alger urbain non traité enregistre une valeur maximale, et celui de Djelfa rural non traité enregistre un taux moyen.

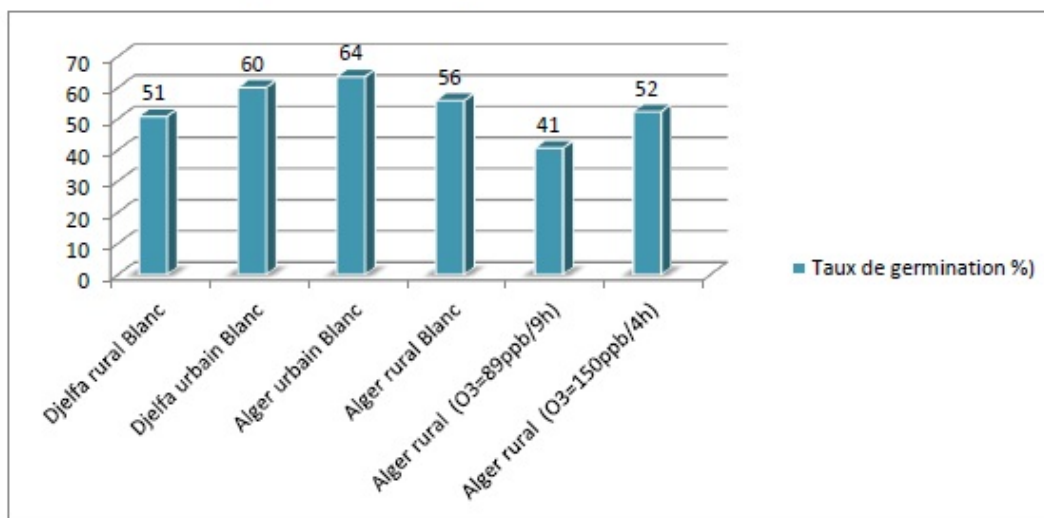


Figure N°3 : Taux de germination du pollen de *Pinus halepensis* Mill. (avant et après exposition à l'Ozone).

5.3.1.2. Germination du pollen Alger rural après exposition à l'O₃ et à l'air sec:

Dans notre travail sur la mesure de la bio-indication du pollen de *Pinus halepensis* Mill., nous avons pris le paramètre du taux de germination comme paramètre de mesure.

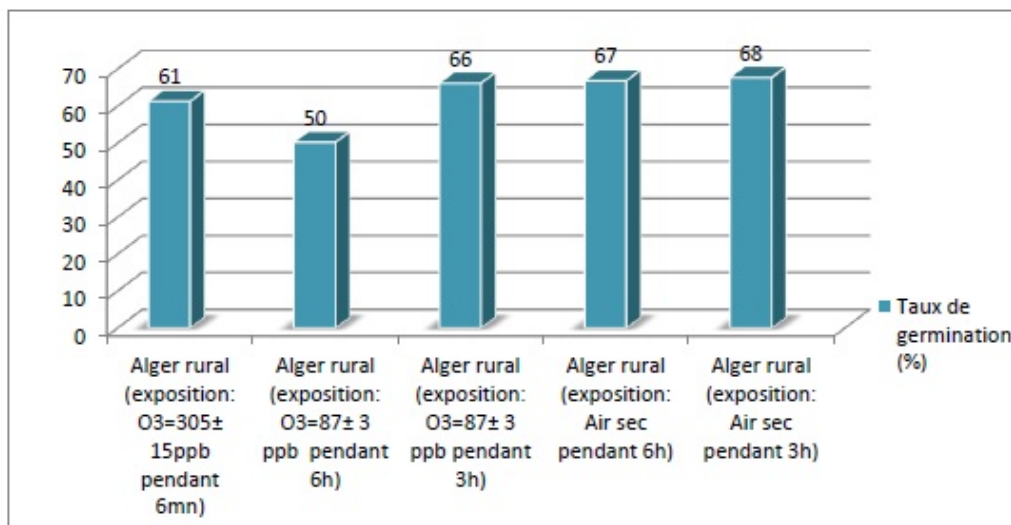


Figure N°4 : Taux de germination du pollen Alger rural de *Pinus halepensis* Mill. (avant et après exposition à l'Ozone et à l'air sec).

L'analyse de la figure N°4 montre qu'une exposition à l'ozone et à forte concentration pendant une courte durée (6mn), n'a pas affectée significativement le pouvoir germinatif du pollen de *Pinus halepensis* Mill. Par contre, une exposition prolongée (6heures) au même gaz et à une concentration faible (87ppb), diminue significativement le taux de germination. Cette même faible concentration et à mi-durée (3heures) ne semble pas affecter le taux de germination (66%).

L'exposition à l'air sec à des durées courtes et prolongées, semble être sans effet négatif sur le pouvoir germinatif des grains de pollen.

5.3.2. Discussions :

L'étude de la viabilité et de la fertilité du pollen est considérée comme un paramètre fiable de mesure de la bio-indication des végétaux supérieurs. Ceci a été prouvé par le travail de Gottardini et al (2008) sur deux espèces *Corylus avellana* L. (Bétulacées) et *Pinus nigra* L.(conifers); ils ont montré que la viabilité, la germination, ainsi la croissance du tube pollinique ont été négativement et significativement affectés par les polluants étudiés NO₂; SO₂; O₃; NOx.

Cela confirme la conclusion d'Iannotti et al (2000) qui avaient étudiés un tel paramètre sur le pollen de *Hedera helix* L., *Convolvulus sepium* L., *Cynodon dactylon* (L.) Pers., *Quercus ilex* L., *Dactylis glomerata* L., *Parietaria diffusa* M. et K., *Daucus carota* L. et *Tilia cordata* Miller.

Il est à noter que nos tests de germination *in vitro*, ont été déroulés selon des conditions préconisées par un nombre d'auteurs, telles : une température d'incubation voisine à 25°C, elle est égale à 27°C (Klaehn et Neu, 1960 ; Stanley et Linskens, 1974 et Shivanna et Johri, 1985 in Colas et Mercier, 2000) ; l'obscurité (Shivanna et Johri, 1985 in Colas et Mercier, 2000) ; un pH voisin de 6 (Shivanna et Johri, 1985 in Colas et Mercier, 2000), et la densité importante du pollen sur le milieu de culture (Brewbaker et Kwack, 1963 in Colas et Mercier, 2000).

La variabilité de nos résultats de germination peut être liée aux différentes étapes subies par notre échantillon après avoir été traité (Déshydratation ; Réhydratation et Ozonolyse) et conservé (Polito et Luza in Colas et Mercier, 2000).

Par ailleurs, la corrélation entre la durée d'exposition du pollen rural du *Pinus halepensis* Mill. et la concentration de l'ozone utilisée, a été visible. A chaque test, une exposition prolongée à une faible concentration d'ozone, affecte significativement la viabilité des grains de pollen ; ce qui peut être expliqué par l'effet accumulateur de l'ozone sur la viabilité du pollen du *Pinus halepensis* Mill..

L'effet de l'air sec sur la viabilité du pollen a été testé ; il n'a aucun effet à signaler, par contre, dans son effet combiné avec une exposition à l'O₃ ; l'espèce *Pinus halepensis* Mill. engendre une réduction de sa capacité de fixer le CO₂ (Wellburn et al, 1996), ce qui favorise une perturbation d'ordre physiologique vue le rôle majeur que joue le CO₂ dans les réactions de la photosynthèse.

5.4. Dosage des protéines hydrosolubles :

La figure ci-dessous montre une concentration de 1960 µg/ml de protéines hydrosolubles chez le pollen Alger rural non exposé à l'O₃ contre une concentration plus élevée de 2678 µg/ml chez le même pollen exposé.

Une forte concentration a été également mesurée sur le pollen Alger urbain par rapport au pollen Alger rural, ce qui rajoute l'effet de la pollution atmosphérique sur la structure biochimique du pollen anémophile.

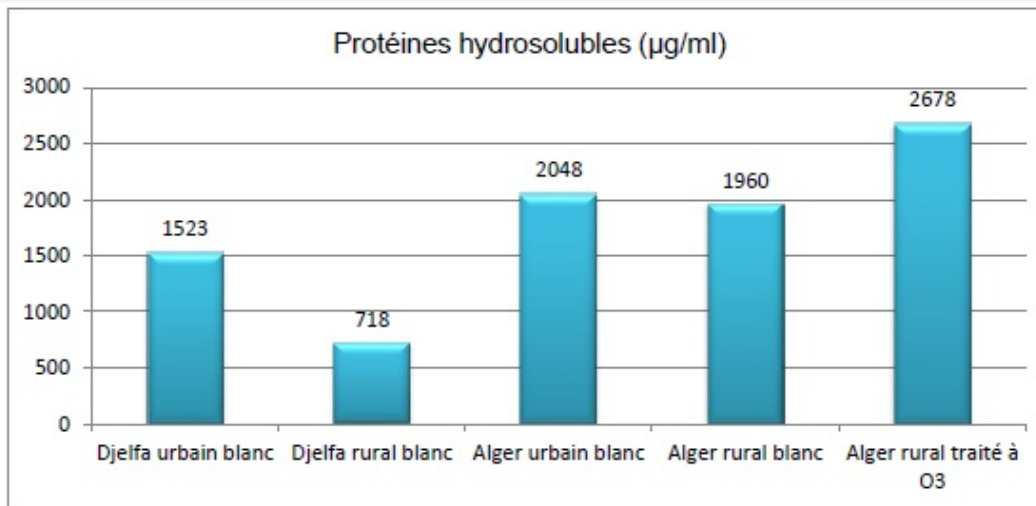


Figure N°5 : Dosage des protéines hydrosolubles du pollen de *Pinus halepensis* Mill.

Avec le pollen Djelfa rural et Djelfa urbain, le dosage de la fraction protéique a donné le même résultat.

Des analyses des extraits de pollen traités au NO₂ ; SO₂ et CO par SDS-PAGE montrèrent l'apparition de nouvelles bandes, montrant que le traitement altérait les allergènes (Ruffin et al, 1986). Ceci a été confirmé avec le pollen de *Chenopodium alba* dans le travail de Guedesa et al (2009), qui ont signalé un changement significatif dans la concentration des protéines solubles totales et une augmentation du taux de la fraction protéique du pollen prélevé d'un milieu urbain.

Behrendt et al (1999), signalent une différence significative dans la concentration en protéines totales et des allergènes libérés des espèces : *Betula alba* L. ; *P. pratense* L. et *P. silvestris* L. entre des pollens fraîchement collectés d'un site rural ; un site à proximité de circulation d'automobile et un pollen commercial.

Le résultat que nous avons obtenu confirme un tel effet des polluants atmosphériques sur l'augmentation de la fraction protéique hydrosoluble.

6. Conclusion :

La mesure de la bio-indication du pollen du *Pinus halepensis* Mill. en utilisant différents paramètres tels que : pH ; la viabilité et la concentration en protéines hydrosolubles ne suffit pas à elle seule de confirmer une telle sensibilité du pollen de cet espèce vis-à-vis de l'ozone.

Dans la perspective de notre travail, des études ultérieures sont programmées :

- L'analyse de surface par microscopie électronique MEB et TOF-SIMS, et également l'analyse de composés organiques en surface des grains de pollen par GC/MS;
- Tests d'exposition à l'ozone et au NO₂ (différentes durées et concentrations).

7. Références bibliographiques :

- [1] Garrec J.P., La pollution des forêts méditerranéennes, exemple de pollution locale par les embruns et de pollution globale par l'ozone - forêt Bletlitter. neennet. XVII, n° 2, avril, 1996
- [2] Huissier F. Les pollens bio-marqueurs de la pollution atmosphérique? Approche microscopique et biochimique - Thèse de doctorat; université de Rouen. Ecole doctorale normande: Chimie-Biologie. Laboratoire des processus ioniques cellulaires.1998 : 67
- [3] Gottardini E.; Cristofolini F.; Paoletti E.; Lazzeri P. and Pepponi G. Pollen Viability for Air Pollution Bio-Monitoring - Journal of Atmospheric Chemistry 49, 2004:149–159.
- [4] Bosch-Cano F. Comparaison des flux polliniques allergisants selon un degré d'urbanisation et association entre grains de pollen et polluants atmosphériques de type éléments traces métalliques (ETMs) - Thèse de Doctorat. UFR des sciences et techniques de l'université de Franche-Comte. Laboratoire chrono-Environnement (UMR CNRS/UFC 6249, Usc INRA), 2012 : 166
- [5] Dmuchowski W. ; Gozdowski D. ; Baczewska A. H. and Brągoszewska P. The comparison bioindication methods in the assessment of environmental pollution with heavy metals - Ochrona Środowiska i Zasobów Natural nych nr 50, 2011
- [6] Garrec J.P. et Van Haluwyn C. Bio-surveillance Végétale de la qualité de l'air - Tec. & Doc. Lavoisier (Ed.). Paris, 2002 : 117
- [7] Ruffin J. ; Williams D.; Banerjee U. and Pinnix K. The effects of some environmental gaseous pollutants on pollen-wall proteins of certain airborne pollen grains: a preliminary study- Grana 22, 1983 : 171-175
- [8] Micieta K. and Murin G. Three species of genus Pinus suitable as bio-indicators of polluted environment. Water, air, and soil pollution - kluwer academic publishers. Printed in the Netherlands, 104 : 1998. c 1998, 1996 : 413–422

- [9] Pukacki P.M. and Chalupka W. Environmental pollution changes in membrane lipids antioxidants and vitality of scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) pollen - Acta Societatis Botanicorum Poloniae. Vol. 72, N° 2, 2003: 99-104
- [10] Tausz M.; Trummer W.; Goessler W. et al. Accumulating pollutants in conifer needles on an Atlantic island. A case study with *Pinus canariensis* on Tenerife, Canary Islands - Environmental Pollution 136, Elsevier. 2005 : 397-407
- [11] Dogan Y. ; N. Durkan N. and Baslar S. Trace element pollution bio-monitoring using the bark of *Pinus brutia* (Turkish red pine) in the Western Anatolian part of Turkey- Trace Elements and Electrolytes, Vol. 24 – No. 3, 2007 : 146-150
- [12] Adekola F.A.; Salami N. and Lawal K.A. Assessment of the bioaccumulation capacity of scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles for zinc, cadmium and sulphur in ilorin and ibadan cities (nigeria) -Nig. J. Pure & Appl. Sci. VQJ 17, 2002
- [13] Wellburn F.A.M.; Lau V.; Milling P.M.K. and Wellburn A. R. Drought and air pollution affect nitrogen cycling and free radical scavenging in *Pinus halepensis* (Mill.) - Journal of Experimental Botany, Vol. 47, No. 302, September 1996 : 1361-1367,
- [14] Paoletti E.; De Marco A. and Raccaluto S. Why Should We Calculate Complex Indices of Ozone Exposure? Results from Mediterranean Background Sites - Environ. Monit. Assess. 128, 2007: 19–30
- [15] Leisner C.P. and Ainsworth E. A. Quantifying the effects of ozone on plant reproductive growth and development - Global Change Biology 18, 2012: 606–616
- [16] Higgins B.G.; Francis H.C. ; Yates C et al. Environmental exposure to air pollution and allergens and peak flow changes - Eur. Respir. 16, J 2000: 61-66
- [17] Franze T.; Michael G. Weller; Reinhardniessner and Andulrichposch, Protein Nitration by Polluted Air - Environ. Sci. Technol. 39, 2005: 1673-1678
- [18] Shiraiwa M.; Sosedova Y.; Rouvière A. et al. The role of long-lived reactive oxygen intermediates in the reaction of ozone with aerosol particles. Nature chemistry. vol 3, April 2011
- [19] Pasqualini S.; Tedeschini E.; Frenguelli G. et al. Ozone affects pollen viability and NAD(P)H oxidase release from *Ambrosia artemisiifolia* pollen - Environmental Pollution 159, 2011: 2823-2830
- [20] Webber J.E. and Bonnet-Masimbert V. The response of dehydrated Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) pollen to three in vitro viability assays and their relationship to actual fertility – Ann. Sci. For. 50, Elsevier /INRA, 1993: 1-22

- [21] Dumont-BéBoux N.; Bradley Anholt, and Aderkas P.V. In vitro Douglas fir pollen germination: influence of hydration, sucrose and polyethylene glycol - Ann. For. Sci. 56, intra/Elsevier, Paris, 1999: 11-18
- [22] Colas F. et Mercier S. Evaluation et maintien de la viabilité des pollens utilisés dans le programme d'amélioration des arbres - Mémoire de recherche forestière N° 135. Projet de recherche n° 3420-0205-212S :« Biologie et conservation du pollen d'arbres forestiers ».2000 : 77
- [23] Alexander M.P. Differential staining of aborted or non-aborted pollen - Stain Tech 41, 1969: 117-122
- [24] Bao L.; Zhigang Z.; Wei C.; Junjie G.; Jiaye L. et Jie Z. Tests on in vitro germination of *Betula luminifera* pollens - Science Press. Guangxi Zhiwu/ Guihaia Vol. 29 N° 2, 2009 : 264-268
- [25] Yassaa N.; B.Y. Meklati and Cecinato A. Organic pollutants in airborne particulates of Algiers city area . Environmental chemistry. Green chemistry and pollutants in ecosystems. Chapter 34, 2005 : 371-382
- [26] Ladj R.; Yassaa N.; Cecinato A. and Meklati B.Y. Seasonal variation of particulate organic compounds in atmospheric PM10 in the biggest municipal waste landfill of Algeria - Atmospheric Research 86, 2007: Pp. 249–260.
- [27] Ladj R.; Yassaa N.; Balducci C.; Cecinato A. and Meklati B.Y. Annual variation of particulate organic compounds in PM10 in the urban atmosphere of Algiers - Atmospheric Research 92, 2009a : 258–269.
- [28] Ladj R.; Yassaa N.; Balducci C.; Cecinato A. and Meklati B. Y., : Distribution of the solvent-extractable organic compounds in fine (PM1) and coarse (PM1–10) particles in urban, industrial and forest atmospheres of Northern Algeria - Science of the Total Environment 408, 2009b : 415–424
- [29] Ladj R.; Yassaa N.; Balducci C. and Cecinato A. Organic components of Algerian desert dusts - Chemosphere 81, 2010: 925–931
- [30] Ladj R.; Yassaa N.; Balducci C. and Cecinato A. Particle size distribution of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) in urban and industrial aerosol of Algiers, Algeria - Environ. Sci. Pollut. Res. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013
- [31] Kecir S.E. et Hadjari A.K.. Contribution à l'étude de la variabilité morphologique et de la viabilité des grains de pollen de *Pinus halepensis* Mill. de trois provenances

forestières algériennes : effet des variations thermiques et de la pollution atmosphérique –Thèse, Djelfa (Algérie), 2011

[32] Pons A. Le pollen- Presse universitaires de France, Paris, 1958 : 125

[33] Reille M. Leçons de palynologie et d'analyses pollinique – Paris, 1990 : 10-11

[34] Jeanne F. Le pollen Aspect physique – Ed O.P.I.D.A., 1993 : 307

[35] Roshchina V.V. and Melnikova E.V. Pollen Chemosensitivity to Ozone and Peroxides - Russian Journal of Plant Physiology, Vol. 48, No. 1, 2001: 74–83. Translated from Fiziologiya Rastenii, Vol. 48, No. 1, 2001: 89–99

[36] Gottardini E.; Cristoforia A.; Cristofolinia F.; Maccherinib S. and Ferrettic M. Ambient levels of nitrogen dioxide (NO₂) may reduce pollen viability in Austrian pine (*Pinus nigra* Arnold) trees — Correlative evidence from a field study. *Science of the Total Environment* 402, 2008: 299 – 305

[37] Iannotti O.; Mincigrucci G.; Bricchi E. and Frenguelli G. Pollen viability as a bio-indicator of air quality – *Aerobiologia* 16, 2000: 361–365

[38] Ruffin J; Liu M.Y. ; Sessoms R.; Banerjee S. and Banerjee U.C. Effects of certain atmospheric pollutants (SO₂, NO₂ and CO) on the soluble amino acids, molecular weight and antigenicity of some airborne pollen grains - *Cyto. bios.* 46(185), 1986: 119-129

[39] Guedesa A.; Ribeiroc N.; Ribeiroc H.; Oliveirac M.; Noronhaa F. and Abreuc I. Comparison between urban and rural pollen of *Chenopodium alba* and characterization of adhered pollutant aerosol particles - *Aerosol Science* 40, 2009: 81—86

[40] Behrendt J.H.; Tomczoka W. ; Sliwa-Tomczoka A. et al. Timothy Grass (*Phleum pratense* L.) Pollen as Allergen Carriers and Initiators of an Allergic Response. Risk Factors for Atopy and Specific Sensitization - *Int Arch Allergy Immunol* 118, 1999:414–418

ANNEXES

ANNEXE I

Protocoles d'analyses d'électrophorèse :

1. Séparation des protéines en SDS-PAGE :

- Le gel utilisé : gel de polyacrylamide 8-18% (ExcelGelTMSDS ; Gradient 8-18 % ; taille du gel : 245 X 110 X 0,5 mm) ;

- Après avoir enlevé le gel de son sac en aluminium, une ligne est tracée du côté du GelBond et des points sont notés pour marquer les dépôts. Ensuite, et avant de déposer le gel sur la plaque du banc réfrigéré à 12°C de l'appareil d'électrophorèse horizontal (Multiphor II, GE Healthcare), quelques gouttes de kérosène sont déposées sur le banc afin d'améliorer la conductivité thermique et l'adhésion du gel sur la platine réfrigérée ;

- Une fois le gel mis en place, deux mèches d'acrylamide (GE Healthcare, ExcelGelTMSDS buffer strips) sont déposées côté anode (+) et cathode (-), sur le bord du gel, en respectant l'orientation des deux charges électriques de l'appareil d'électrophorèse ;

- Dépôt progressif de 8 μ l de chaque extrait, préparé avec le SDS, sur un papier Whatman n° 1 (7 X 5 mm) et dépôt de 1,5 μ L d'un mélange non dilué de protéines (Mr de 94 à 14,4 kDa) servant de marqueurs de Mr (GE Healthcare). Puis l'électrophorèse (SDS-PAGE) est démarrée. Au cours du temps de migration, l'électrophorèse est suivie en notant les données du générateur (EPS 3501 XL), programme 2 ;

- Après 3h20 de migration, le gel est enlevé de l'appareil puis lavé avec du PBS (ce rinçage au PBS est recommandé pour tout type de gel horizontal). Afin de fixer les protéines dans le gel, celui-ci mis dans un bac (verre ou plastique) contenant une solution de TCA 10% + Acide Sulfosalicylique 5% de manière à recouvrir le gel pendant au moins 30 mn. Le gel est mis en agitation à température ambiante une demi-heure à une heure pour une bonne fixation ;

- Ensuite, le gel a été coloré au bleu de Coomassie pendant la nuit. Le lendemain, une décoloration à deux reprises a été faite avec le mélange (30% Ethanol+ 10% acide Acétique), et en agitation pendant 30 mn (suivre à l'oeil la qualité des bandes apparues) ;

- Le gel de SDS-PAGE a été coloré au nitrate d'argent après la coloration au bleu de Coomassie et décoloration du bleu, car très peu de protéines étaient visibles après la première coloration.

2. Coloration en nitrate d'argent (AgNO_3) du gel SDS-PAGE

A. Fixation 1 :

Le fixateur utilisé (30mn à 1h) est : Trichloroacétique (TCA) 10% +acide Sulfo-salicylique 5% (comme pour la coloration au bleu de Coomassie ;

B. Fixation 2 :

Etape 1 : Solution d'éthanol à 40% + acide acétique 10% (EtOH-Ac.Ac.) (Fixateur Blum : Blum H, Beier H, and Gross H.J : Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, Electrophoresis, 1987, 8, 93-9) ;

Etape 2 : Solution à 30% d'éthanol : 3 bains successifs de 20 min chacun ;

Etape 3 : Solution à 0,2 g/L de thiosulfate de Na, H_2O (ou 50 mg /250mL). Un bain de 1 min sous agitation manuelle ;

Etape 4 : 3 bains en H_2O successifs de 20 secondes chacun ;

C. Solution argentique à faire extemporanément de préférence : Solution à 2 g/L de AgNO_3 dans H_2O + 250 μL de formaldéhyde (ou 500 mg/250 mL+ 62,5 μL de formaldéhyde). Incubation d'au moins 20 min dans cette solution.

Etape 5 : 2 bains en H_2O successifs de 20 secondes chacun ;

D. Solution pour développer la coloration argentique « Développeur » : 60g de carbonate de sodium + 0,2g de thiosulfate de sodium (ou 20 mL de la solution de thiosulfate de Na de l'étape 3) dans un litre de H_2O . Ajouter le formaldéhyde dans le volume nécessaire au moment de l'utilisation à raison de 500 $\mu\text{L/L}$. Le développement de la coloration se fait au jugé (à l'œil) ;

E. Solution d'arrêt de la coloration « Arrêteur » : Solution de tris 50 g/L dans H_2O et ajuster le pH (sous pH mètre) avec de l'acide acétique (à 100%) afin d'obtenir un pH = 7.0. Incubation dans ce tampon au moins 1h ou la nuit à 4°C ;

F. Le scan du gel, encore humide, peut se faire lorsque le gel est soit dans la solution d'arrêt soit dans la solution de glycérol 10% ;

G. Solution de glycérol 10% dans H_2O : Incubation au moins 1h ou la nuit à 4°C ;

H. Séchage à l'air à température ambiante après que le gel ait été recouvert avec une feuille de cellophane (microporée) mouillée avec de l'eau. La conservation se fait à sec dans le classeur ;

I. Le gel final de SDS-PAGE a été scanné après la coloration au bleu de Coomassie et après celle au nitrate d'argent.

3. Mise en route de l'IEF 1D des extraits H_2O et PBS de pollen de pin

- Nettoyage de la plaque et avant de déposer le gel sur la plaque du banc préalablement réfrigérée à 18°C de l'appareil d'électrophorèse (Multiphor II, GE Healthcare), Dépôt de quelques gouttes de kérosène sur ce banc afin d'améliorer la conductivité thermique et l'adhésion du gel ;
- Retirer le gel réhydraté de la piscine et le poser sur la platine réfrigérée ;
- Enlever les bulles qui se trouvent entre la plaque et le GelBond du gel ;
- Enlever l'excès de solution d'ampholytes en passant avec précaution un papier Whatman N° 1 ;
- Déposer les morceaux de papier Whatman n°1 déjà découpés aux dimensions précises tout au long de la ligne prévue pour le dépôt des extraits, côté cathodique de l'appareil ;
- Déposer 1,5 μL du mélange des marqueurs de pI (Protein mixture pI 3-10, GE Healthcare) sur un morceau de papier Whatman n° 1 ;
- Déposer 8 μL des différents extraits préparés soit avec de l'eau (N° 1, 2, 3, 4) soit du PBS (N° 6, 7, 8, 9) sur les bouts de papier Whatman n°1 (7 x 5 mm) ;
- Déposer deux mèches de 13cm x 7mm en papier GFB (Whatman) sur les deux bords du gel. Ces mèches ont été imbibées, une avec la solution de cathode fluide 10 [0,22 g/L – arginine base + 0,18 g/L –lysine base + 6 mL éthylène diamine in 50 mL déminéralisée-water, (Serva)], et l'autre avec la solution de anode fluide 3 [0,17 g/L – aspartic acid + 0,18 g/L – glutamic acid in 50 mL déminéralisée-water, (Serva)] ;
- Migration mise en route en utilisant le programme 3 (générateur EPS 3501 XL). Au cours du temps la migration électrophorétique est suivie en notant les données du générateur ;
- Rinçage du gel au PBS puis fixation avec la solution TCA+acide sulfo-salicylique ;
- Coloration au bleu de Coomassie : rien de visible pour les extraits sauf pour les MpI ;

- Décoloration puis fixation avec le fixateur Blum et la suite de la coloration à l' AgNO_3 , le scan du gel (encore humide), son séchage et sa conservation est identique à la procédure utilisée auparavant.

4. Séparation en IEF pour 2D d'extraits TUC de pollen non traités provenant d'Alger et de Djelfa

- Réhydratation d'un gel entier d'IEF avec 23,75 mL de UC (Urée et CHAPS) + 1,25 mL d'Ampholines (Servalylt 3-10);
- Dessin sur le GelBond pour une migration de 9 cm pour 2D ultérieure;
- Dépôt de 80 μ L des extraits N°11; 12; 13; 14 sur papier Whatman N°1 (4,5cm x 7mm) côté de la cathode;
- Dépôt de 8 μ L des deux extraits pollen pollué N°12b et 14b sur des morceaux de papier Whatman N°1 (5x7mm) côté de la cathode;
- Le dépôt de 1,5 μ L des MpI dilués en 1/10 sur papier W1 (4x9mm) côté anode;
- Température de la plaque est de 15°C; banc Multiphor II;
- Lavage du gel avec PBS;
- Découpage de 8 bandelettes de 4,5x9 cm par type de pollen qui sont directement congelées sur de la carboglace, avec une petite découpe du GelBond côté anodique;
- Une fois découpées et congelées, les bandelettes doivent être mises dans des petits sacs en plastique ou gaine thermo-soudables (12,5 x 5 cm); sacs étiquetés (date, type de pollen, provenance, analyse et mode d'extraction); puis mise en congélation (-20°C);
- Fixation et coloration sont identiques à la méthode utilisée page 4 pour les parties intermédiaires du gel destinées aux dépôts de MpI dilués 1/10 et découpées avec deux bandes de 5mm des extraits de nos échantillons de part et d'autre des MpI.

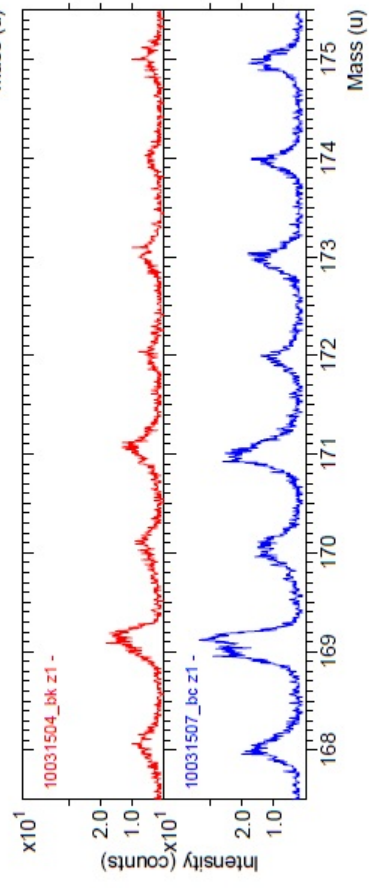
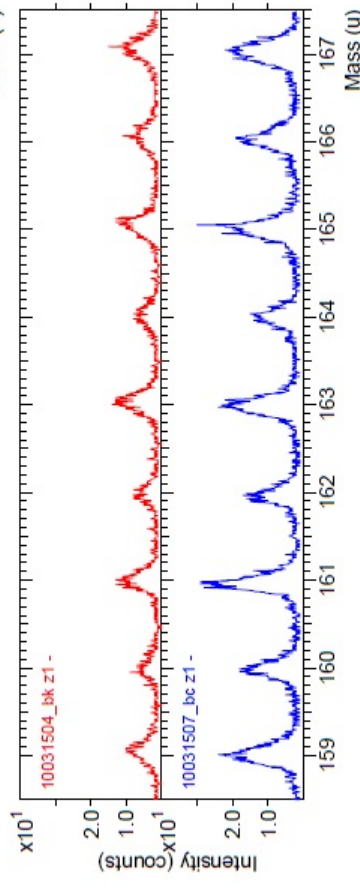
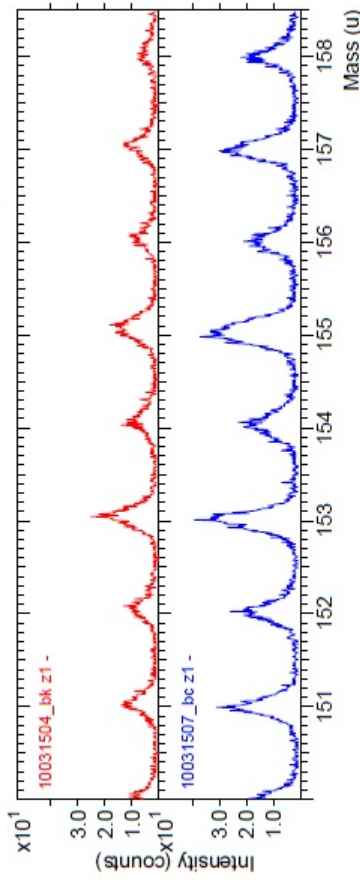
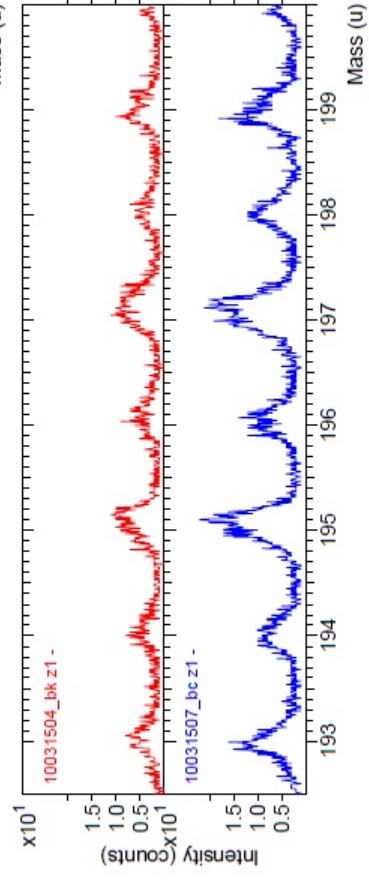
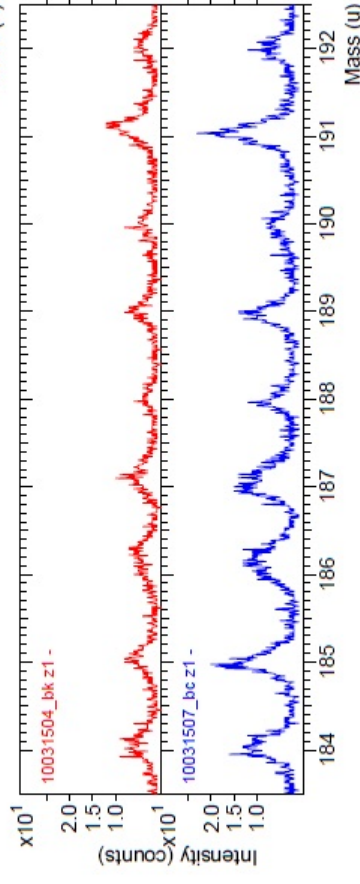
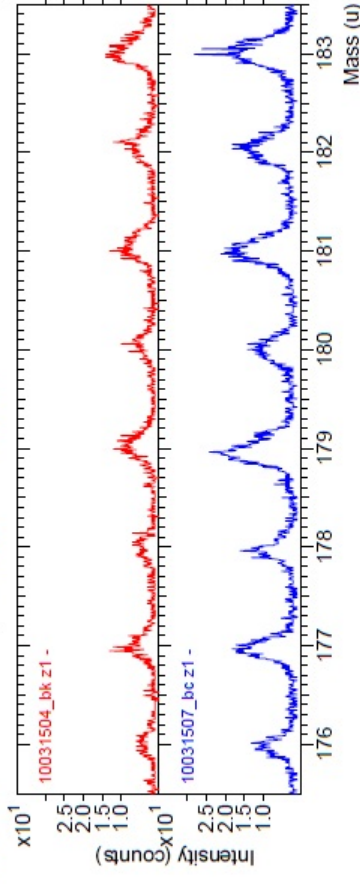
5. Lancement de SDS-PAGE pour une 2e dimension :

une séparation pour le pollen d'Alger (2 migrations, rural et urbain) et une autre pour le pollen de Djelfa(2 migrations, rural et urbain) :

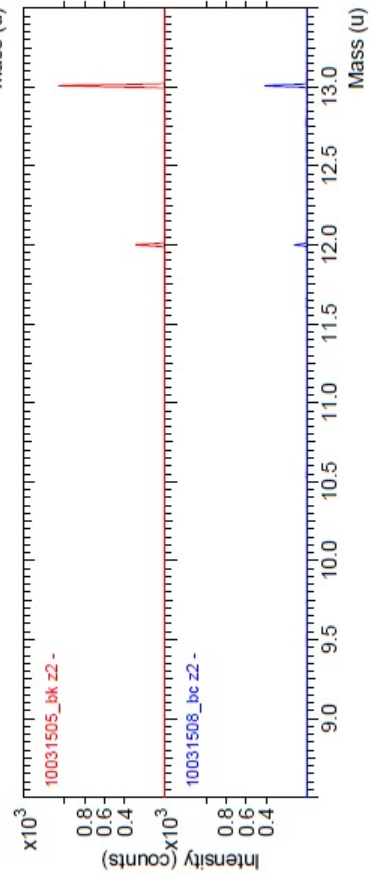
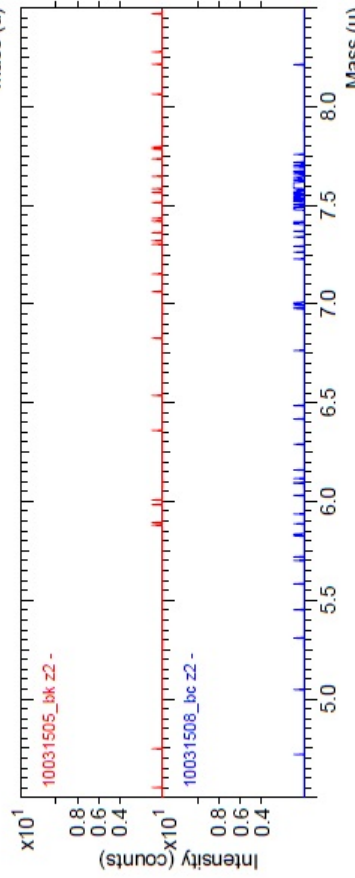
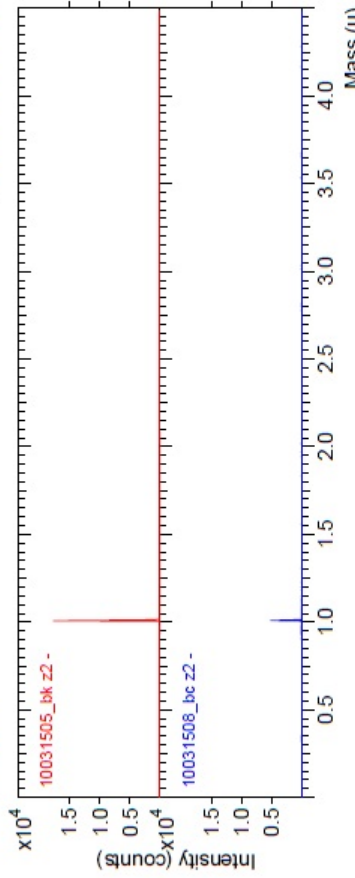
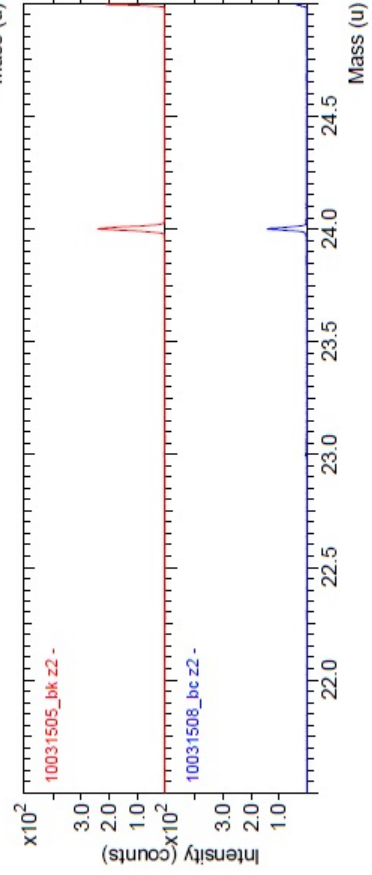
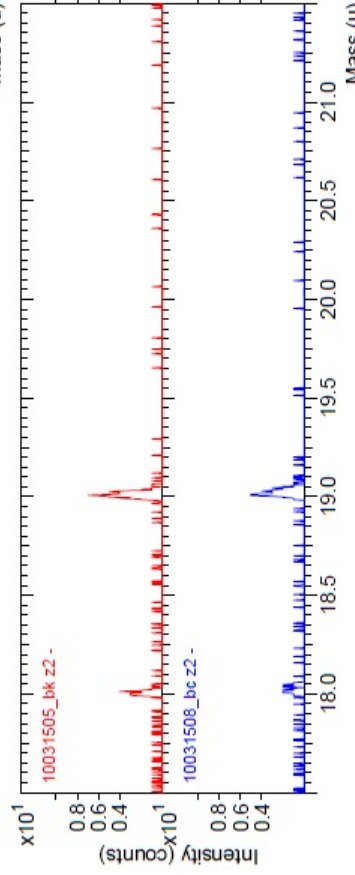
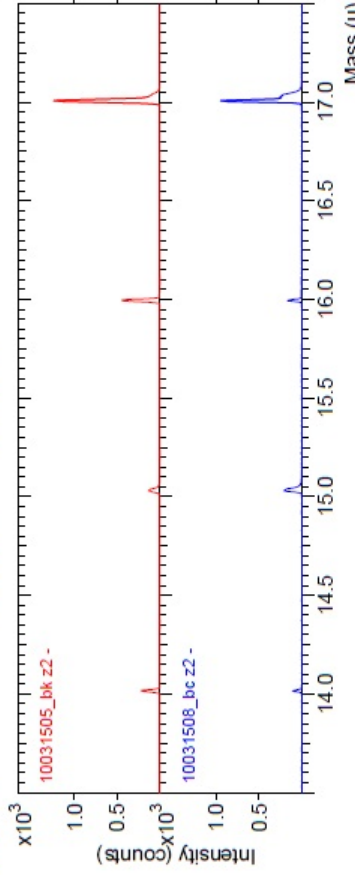
- Nettoyage des deux plaques des appareils d'électrophorèse Multiphor II;
- Utilisation du Multiphor II de droite et du générateur de courant, programmable, EPS3501XL (Amersham Biosciences) pour les IEF des extraits de pollen d'Alger ;
- Utilisation du Multiphor II de gauche et du générateur de courant, manuel, ECPS 3000/150 (Pharmacia) pour les IEF des extraits de pollen de Djelfa ;
- Thermostater préalablement les plaques des appareils d'électrophorèse à 12°C ;
- Traçage au feutre permanent des zones de dépôts sur le GelBond des 2 gels pour SDS-PAGE 8-18% (ExcelGel, GE Healthcare) ;
- Mise en place des 2 mèches, en acrylamide, servant de contact entre les électrodes + et - et le gel ;
- Dépôt des bandelettes équilibrées en SDS (2 bandelettes pour le pollen d'Alger : urbain et rural ; 2 bandelettes pour le pollen de Djelfa : urbain et rural ;
- Lancement de la migration du SDS-PAGE 2D ;
- Prise des mesures chaque 30mn (v ; mA ; w) ;
- Après lavage des gels en PBS, la fixation et la coloration des 2 gels ;
- Le gel 2D du pollen d'Alger a été coloré le jour même de la migration alors que le gel des bandelettes du pollen de Djelfa est resté dans le fixateur Blum pendant toute une nuit et que la coloration a donc été faite le jour suivant la migration.

ANNEXE II

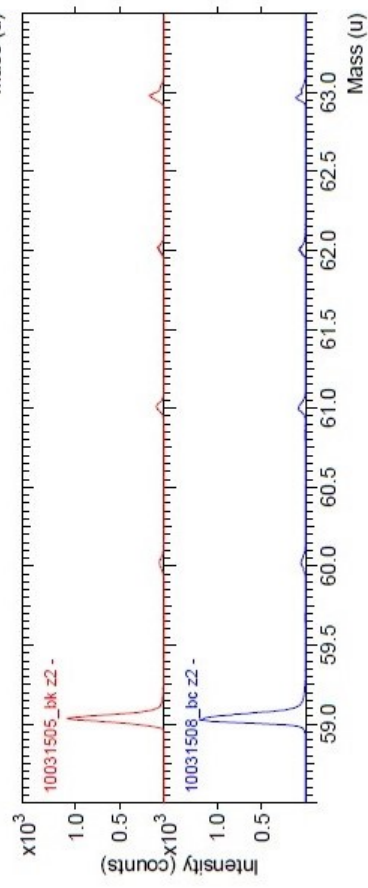
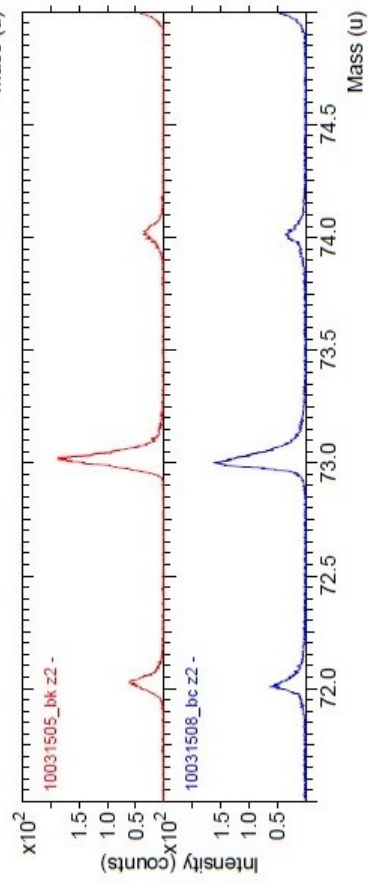
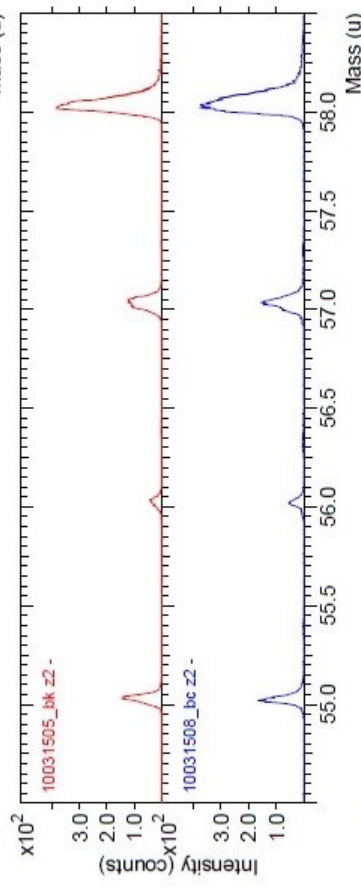
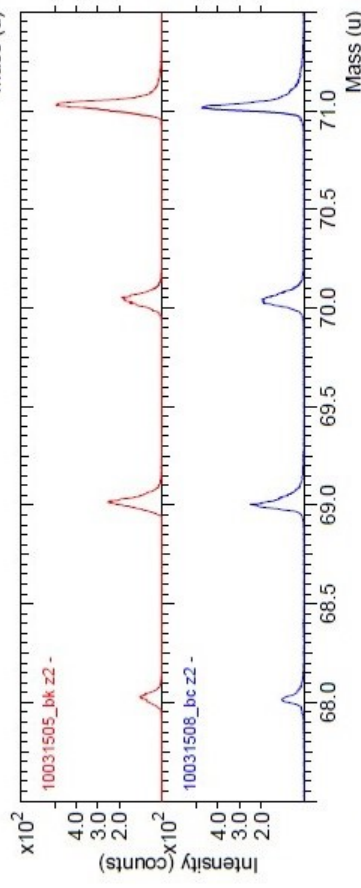
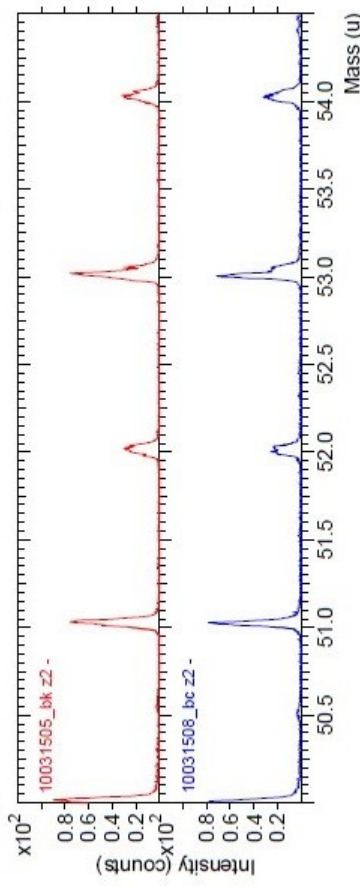
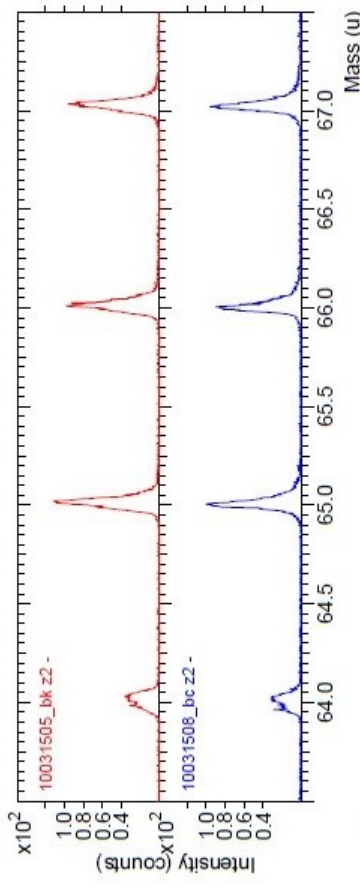
Sample:	10031504_bk z1 -ita	PI Species:	Bi3
Comment:	Tue Mar 10 14:53:25 2015	PI Dose:	
Origin:		Raster Area:	500 x 500 μm^2
		Polarity:	Negative



Sample: Comment: Origin:	PI Species: Bi3 PI Dose: Raster Area: 500 x 500 μm^2	Filename: 10031508_bc z2 -.ita Date: Tue Mar 10 15:03:35 2015 Polarity: Negative
---------------------------------------	---	---



Sample:	10031508_bc z2 - .ita
Comment:	Tue Mar 10 15:03:35 2015
Origin:	Negative
PI Species:	Bi3
PI Dose:	
Raster Area:	500 x 500 μm^2



Sample: Comment: Origin:	PI Species: Bi3 PI Dose: Raster Area: 500 x 500 μm^2	Filename: 10031508_bc z2 -.ita Date: Tue Mar 10 15:03:35 2015 Polarity: Negative
---------------------------------------	---	---

