

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la
Terre et de l'Univers

Département d'Ecologie et Génie de l'Environnement

Laboratoire de Biologie, Eau et Environnement



THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de
Doctorat 3^{ème} cycle en Sciences Biologiques

Option : Santé, Eau et Environnement

Thème

**Identification et caractérisation immunologique d'un
type pollinique allergisant dans l'atmosphère
d'Oued Zenati – GUELMA (Nord- Est de l'Algérie)**

Présentée par

BOUGUENOUN Imane

Devant le jury:

Président:	BENOUARETH D.	Prof.	Université de Guelma
Directrice de thèse:	BENDJEDDOU D.	Prof.	Université de Guelma
Co-Directeur de Thèse:	HOUHAMDI M.	Prof.	Université de Guelma
Examinatrice:	SATTA D.	Prof.	Université de Constantine
Examinatrice:	SOUIKI L.	M.C.A	Université de Guelma
Examineur:	CHAGRA A.	M.C.A	Université d'Annaba

Année Universitaire 2015/2016

Remerciements

Louanges à Allah le miséricordieux, qui m'a donné le courage, la force, m'a éclairé la voix de la science et de la connaissance et par sa grâce j'ai réussi à achever ce modeste travail.

Avec mon enthousiasme le plus vif et le plus sincère, je voudrais rendre mérite à tous ceux qui, à leur manière, m'ont aidé à mener à bien cette thèse. Je désire alors exprimer ma profonde gratitude:

*Au **Professeur BENOUARETH Djamel Eddine** (Université de Guelma), qui m'a honoré en acceptant d'être Président de ce jury.*

*Aux examinateurs qui ont accepté de siéger sur le jury de cette thèse, **Pr. SATTA Dalila** (Université de Constantine), **Dr. SOUIKI Linda** (Université de Guelma) et **Dr. CHAGRA Ali** (Université d'Annaba). Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance pour la lecture, les remarques avisées et le jugement judicieux de ce modeste document.*

*A ma directrice de thèse, **Pr. BENDJEDDOU Dalila** (Université de Guelma), et mon Co-Directeur de thèse, **Pr. HOUHAMDI Moussa** (Université de Guelma), pour avoir accepté de me diriger patiemment, mais également pour m'avoir formé, guidé, encouragé et dirigé tout au long de mon cursus.*

*A mes tuteurs de stage, **Pr. DE PAUW Edwin** et **Dr. DE PAUW-GILLET Marie Claire** (Université de Liège), pour m'avoir accueilli au sein de leurs laboratoires tout en mettant à ma disposition tous le nécessaire à la réalisation de ma pratique. Je ne saurais oublier aussi Leurs conseils, leurs encouragements et leurs lectures et corrections de ma publication. Je suis également reconnaissante à tout le staff du Laboratoire de spectrométrie de masse (Université de Liège), **Mme. TRZPIOT Lisette**, **Mme. ROSIERE Nancy**, **Dr. MAZZUCHELLI Gabriel** et **Mme. BAIWIR Dominique**. A **Mr. BOUILLENNE Fabrice** (Centre for Protein Engineering), **Dr. CATALDO Didier** et **Mme ROCKS Natacha** (CHU-Liège), **Mme ORMENESE Sandra** et **Mr. GUILLAUME Antoine** (GIGA-Liège).*

*A **Pr. IBN TATTOU Mohamed** et **Pr. FEKHAOUI Mohammed** d'avoir accepté de m'accueillir à l'Institut scientifique de l'Université Mohammed V (Rabat- Maroc).*

*Je suis aussi redevable : au personnel de la protection civile (Oued Zenati), le Lycée HACHACH Laid (Oued Zenati) et la Mosquée KHATLA khelifa (Oued Zenati). A **Mme CHAHAT Nora** (Université de Guelma), **Pr. TAHAR Ali**, (Université d'Annaba), **Pr. BOUGHDIRI Larbi** et **Mlle NECIB Asma** (Université d'Annaba) **Dr. DJAHMI** et **Mme KHERRATTE Samira** du laboratoire d'anatomie-pathologique à l'Hôpital Ibn Zohr (Guelma), le staff des laboratoires de chimie appliquée (Université de Guelma), les Laboratoires pédagogiques de la Faculté SNV et STU (Université de Guelma) et le laboratoire d'analyses médicales du **Dr. KACI** (Annaba) ainsi que les membres de l'animalerie de l'Institut de Pharmacie (Constantine).*

A titre personnel, Dr. MERZOUG Seyf Eddine, Mlle BENSAXHRI Zinette et Mlle BERGAL Amira, trouvez ici le témoignage de mes plus sincères remerciements et ma profonde reconnaissance.

A mes enseignants durant mon parcours à l'Université de Guelma

*A la promotion chanceuse de la formation doctorale « **Santé, Eau et Environnement** » et encore un fois au **Pr. HOUHAMDI Moussa**, à qui nous devons une grande reconnaissance de nous avoir offert cette opportunité....Merci professeur.*

A toute personne qui a contribué de près ou de loin par un simple geste ou un mot d'encouragement.

Ainsi, Dieu merci de m'avoir entouré d'une famille unique et formidable qui m'a constamment encouragée et soutenue tout au long de ces années. Je ne saurai passer sous silence l'apport précieux de chaque membre (Prières des Grands-mères, tantes, oncles, cousines et cousins) chacun à sa façon, et ce, à différentes étapes de mon cheminement.....Merci beaucoup.

En fin, Je dédie cette thèse.....A la mémoire de ma très chère MAMAN,

A la mémoire de mon cher grand-père

A mon cher héros PAPA

A ma très chère Nina

Et... .. à ma petite future docteur sœur

Imane

Table des matières

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction	1
Chapitre I : Synthèses bibliographique	
1. L'allergie.....	4
1.1. Définition.....	4
1.2. L'histoire scientifique de l'allergie.....	4
2. Classification des hypersensibilités.....	6
2.1. Classification de Gell et Coombs.....	6
2.2. Classification de Johansson.....	7
3. Mécanisme et acteurs de la réponse allergique.....	7
3.1. Déroulement de la réaction allergique (hypersensibilité de type I).....	8
3.2. Les acteurs de la réaction allergique.....	10
3.2.1. Les cellules dendritiques.....	10
3.2.2. Les monocytes – macrophages.....	11
3.2.3. Les lymphocytes T.....	12
3.2.4. Les lymphocytes B.....	14
3.2.5. L'immunoglobuline E (IgE).....	15
3.2.6. Les mastocytes.....	16
3.2.7. Les basophiles.....	16
3.2.8. Les éosinophiles.....	17
3.2.9. Les neutrophiles.....	18
3.2.10. Les plaquettes.....	18
3.2.11. Les médiateurs préformés.....	19
3.2.12. Les médiateurs néoformés.....	19
3.2.13. Les cytokines et les chimiokines.....	20
4. Les facteurs de risque.....	21
4.1. L'atopie.....	21
4.2. L'âge.....	21
4.3. L'environnement.....	21
4.4. Les infections.....	22
4.5. La taille de la famille.....	22

4.6. Le tabagisme.....	22
4.7. La densité en allergènes.....	23
4.8. Les facteurs causals (les pneumallergènes).....	23
4.8.1. Les acariens.....	23
4.8.2. Les spores fongiques.....	24
4.8.3. Les animaux domestiques.....	24
4.8.4. Les insectes	24
4.8.5. Allergènes professionnels.....	25
4.8.6. Le pollen.....	25
A. Caractéristiques du pollen.....	26
B. Composition du pollen	29
C. La dispersion des pollens.....	31
D. Pollen et allergie.....	31
Chapitre II : Matériel et méthodes	
1. Description de la zone d'étude (Oued Zenati).....	34
2. Climatologie	35
2.1. La température	35
2.2. Les précipitations.....	36
2.3. L'humidité	37
2.4. Le vent.....	38
3. Synthèse climatique	38
3.1. Diagramme de Bagnlous et Gaussen.....	38
3.2. Climagramme d'Emberger.....	39
4. Le compte pollinique	40
5. Etude immunologique.....	41
5.1. Modèle biologique animal	41
5.2. Modèle biologique végétal	42
5.2.1. Présentation de l'espèce	42
5.2.2. Les allergènes de l'espèce	43
5.3. Préparation de l'extrait brut du Cyprès (EBC).....	44
5.4. Précipitation sur sulfate d'ammonium.....	44
5.5. La sensibilisation nasale.....	45
5.6. Les tests effectués.....	46
6. Identification et purification de l'allergène.....	48

6.1. La spectrométrie de masse couplée à la Chromatographie liquide (MS-LC).....	48
6.1.1. La digestion complète à la trypsine.....	48
6.1.2. Reconstitution des échantillons.....	51
6.2. La chromatographie échangeuse d'ion.....	52
6.3. Dosage colorimétrique des protéines.....	53
7. Etude <i>in vitro</i>	54
7.1. La culture cellulaire.....	54
7.2. La viabilité cellulaire.....	57
8. Le dosage des cytokines.....	57
9. Analyse statistique.....	59

Chapitre III : Résultats et discussion

Première partie : Approche aéropalynologique

1. Résultats	60
1.1. Identification de la composition pollinique atmosphérique.....	60
1.2. Pourcentage pollinique des différentes familles.....	61
1.3. Météorologie et pollinisation.....	63
1.4. La fréquence pollinique mensuelle des principales familles identifiées	64
1.5. Quantité et pourcentage du pollen anémophile et entomophile.....	65
1.6. Les différentes familles allergisantes.....	66
1.7. Le calendrier pollinique.....	67
2. Discussion.....	69

Deuxième partie : Approche immunologique

1. Résultats.....	74
1.1. Extraction et fractionnement de l'extrait brut pollinique du <i>Cupressus sempervirens</i> (Cyprés commun).....	74
1.2. Effet de l'instillation nasale de l'extrait pollinique brut du Cyprés commun.....	75
1.2.1. L'effet sur la formule leucocytaire	75
1.2.2. L'effet sur le liquide nasal et bronchoalvéolaire.....	76
1.2.3. L'effet de l'extrait pollinique sur la rate.....	78
1.2.4. Effet de la sensibilisation sur les poumons	78
1.3. Effet des fractions (Fr1-Fr4) du <i>Cupressus sempervirens</i>	79
1.3.1. L'effet sur la formule leucocytaire.....	79
1.3.2. L'effet des fractions sur le liquide du lavage bronchoalvéolaire et nasal.....	83
1.3.3. L'effet des fractions sur le taux des splénocytes.....	85
1.3.4. L'étude histologique des poumons.....	85

1.4. Identification des allergènes dans les fractions Fr1-Fr4.....	87
1.5. Purification et dosage de l'allergène majeur du <i>Cupressus sempervirens</i> Cup s 1.....	89
1.6. Viabilité cellulaire et test de cytokine.....	89
1.7. Dosage des cytokines.....	93
2. Discussion.....	96
Conclusion et perspectives.....	104
Références bibliographiques	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Annexes	

Liste des abréviations

Liste des abréviations

ACN : Acétonitrile

ADH : Alcool déshydrogénase de levure

ANAP : Association Nationale des Allergologues Privés

ANOVA : Analysis of variance

BEAS-2B / B2B : Human Bronchial Epithelial Cells

BEH : Ethylene Bridged Hybrid

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2

BSA : Sérum albumine bovine

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

Cup s : *Cupressus sempervirens*

Cup s 1 : Allergène majeur 1

Cup s 3 : Allergène 3

Cup a : *Cupressus arizonica*

Cup a 1 : Allergène majeur 1

DC : Cellules dendritiques

Der p : *Dermatophagoides pteronyssinu*

Der p1 : Allergène majeur 1

Der f : *Dermatophagoides farinae*

DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DTT : Dithiotréitol

EBC : Extrait brut pollinique du Cyprès

ECFA : Eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis

EDTA : Ethylène-diamine- tétra-acétique

ENO : Enolase 1 de levure

F12 : Milieu de Ham

FCS : Fetal calf serum

Fmole : femtomole

Fr (1-4) : Fraction

G-CSF : Granulocyte-colonystimulating factor

GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

GP : Grains de pollen

GPB : Glycogène phosphorylase b de lapin

Gro-a : Growth-related protein-a

IAA : Iodoacétamide

ICAM : Inter Cellular Adhesion Molecule

Ig : Immunoglobulines

IL : Interleukine

IFN : Interféron

LB : Lymphocyte B

LC : Liquid chromatography

LOD : Limits of detection

LT : Leucotriène

MCP : Monocyte chemoattractant protein

MDC : Macrophage-derived chemokine

mM : millimolaire

nm : nanomètre

MPDS Mix : Mass protein digestion standard mixtures

MS : Mass spectrometry

MTS : Le sel de tétrazolium ou 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tétrazolium

NaCl : Chlorure de sodium

NCFA : Neutrophil chemotactic factor of anaphylaxis

NH₄HCO₃ : Bicarbonate d'Ammonium

OMS : Organisation mondiale de la santé

PAF : Plaquette activating factor

PAMP : Pathogen-associated molecular patterns

PBS : Phosphate buffered saline

pDC : plasmacytoïd dendritic cells

PG : Prostaglandines

Pg : Picogramme

PN : Cellules Polynucléaires

PR-5 : Pathogenesis-Related protein-5

RANTES : Regulated on activation normal T cell expressed and secreted

RSV : Respiratory Syncytial Virus

SA-PE : Streptavidine-PE

SBTI : Soybean trypsin inhibitor

SCF : Stem cell factor

SD: Standard deviation

TARC : Thymus and activation regulated chemokine

T reg : T régulateur

TCR : T-cell receptor

TFA : Trifluoroacetic acid

TGF: Transforming growth factor

Th : T helpers

TLP : Thaumatine-like

TLR : Toll-like receptors

TNF : Tumor necrosis factor

Tr : Souris traitées

TSLP : Thimic stromal lymphopoietin

UI : Unité internationale

UPLC : Ultra Performance Liquid Chromatography

WAO : World Allergy Organization

m/s : mètre par seconde

Liste des Tableaux

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
1	classification des hypersensibilités, modifiée d'après Gell et Coombs.	06
2	Températures moyennes mensuelles en °C (1994-2014)	36
3	Précipitations moyennes mensuelles en °C (1994-2014)	36
4	Les coordonnées des trois points d'échantillonnage	41
5	Saturation du sulfate d'ammonium à 0°C	45
6	Calendrier pollinique d'Oued Zenati de l'année 2012	68
7	Les différents allergènes présents dans chaque fraction	88
8	Différentes séquences des différents allergènes	88

Liste des figures

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Classification de Johansson	07
2	Mécanismes généraux de l'allergie	09
3	Aspect graphique des phases de la réaction allergique	09
4	Rôle des cellules dendritiques	11
5	Les cellules cibles des lymphocytes Th2	13
6	Interaction des LTh2 et des LB	15
7	Mécanisme de la dégranulation des mastocytes	17
8	Stimulation de la dégranulation des basophiles	17
9	La pollinisation	25
10	stratification de la paroi pollinique	26
11	Les différentes formes du pollen	27
12	Image typique d'une ouverture	28
13	Une composition moyenne du pollen	30
14	Situation géographique de la ville d'Oued Zenati	35
15	Variation de la température : Guelma (1994-2014)	36
16	Variation des précipitations : Guelma (1994-2014)	37
17	Variation de l'humidité : Guelma (1994-2014)	37
18	Variation de la vitesse du vent : Guelma (1994-2014)	38
19	Diagramme Ombrothermique : Guelma (1994-2014)	39
20	Climagramme d'Emberger (Station : Guelma)	40
21	Vue aérienne des trois points d'échantillonnage	41
22	<i>Cupressus sempervirens</i> planté à Oued Zenati	42
23	Pollen de <i>Cupressus sempervirens</i>	43
24	Modèle en 3d des allergènes du Cup s	43
25	La poudre pollinique du Cyprès commun	44
26	Instillation nasale	46
27	Protocole expérimental	46
28	Filtre d'amicon et micro-tube	53
29	Les cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B	54
30	Gélules de cryoconservation des différents passages	55
31	Cassette du nucleocounter	56

32	Dilution du standard d'antigène (instruction/ebioscience)	58
33	Les étapes de la réparation de la plaque	58
34	Différent grains de pollen capturés	62
35	Pourcentage polliniques des différentes familles	63
36	Quantité de pollen en fonction de la température, la précipitation et la vitesse du vent	64
37	Fréquence pollinique mensuelle de l'année 2012	65
38	Quantité du pollen anémophile et entomophile de l'année 2012	65
39	Pourcentage proportionnel du pollen anémophile et entomophile	66
40	Les différentes familles allergisantes dans l'atmosphère d'Oued Zenati	66
41	Pourcentage proportionnel des familles allergisantes et non allergisantes	67
42	Extraction et fractionnement de l'extrait pollinique brut du Cyprès	74
43	Variation du taux des lymphocytes et des neutrophiles	75
44	Variation du taux des éosinophiles et de monocytes	76
45	Variation du taux des plaquettes	77
46	Variation du nombre des cellules du liquide nasal et broncho-alvéolaire	77
47	Effet de la sensibilisation sur la rate	78
48	Coupe histologique des poumons des souris témoins et traitées (x250)	79
49	Le nombre des lymphocytes	80
50	Le nombre des monocytes	80
51	Variation du nombre des cellules polynucléaires neutrophiles	81
52	Variation du nombre des cellules polynucléaires éosinophiles	82
53	Variation du nombre des basophiles	82
54	Variation du taux des plaquettes	83
55	variation du nombre cellulaire dans le liquide bronchoalvéolaire	84
56	variation du nombre cellulaire dans le liquide du lavage	84
57	variation du nombre des cellules splénique	85
58	Etude histologique des poumons des souris témoins et traitées (x 250)	87
59	Chromatogramme du fractionnement du Cup s 1	90
60	Aspect de la croissance des cellules BEAS-2B	91
61	Viabilité testée par MTS	92
62	Pourcentage de viabilité des cellules BEAS-2B traitées avec l'allergène majeur du <i>Cupressus sempervirens</i>	93

63	Concentration de l'IL-8 sécrétée par les cellules BEAS-2B	94
64	Concentration de l'IL-6 sécrétée par les cellules BEAS-2B	95

Introduction

Les maladies allergiques occupent une place centrale au sein des pathologies chroniques. Depuis plus de 20 ans, leur fréquence n'a cessé d'augmenter. Selon l'organisation mondiale de l'allergie (WAO), ces maladies touchent environ 30 à 40 % de la population mondiale. Ainsi, environ 400 millions de personnes souffrent de la rhinite allergique **(Pawankar et al., 2012)**.

Une étude menée sur plus d'un million d'enfants de différents âges a montré que la prévalence de l'allergie varie considérablement d'un pays à un autre. Cette la prévalence tend à être significativement plus élevée dans les pays riches, mais sa gravité tend à être plus importante dans les pays pauvres **(Aït Khaled et al., 2009)**.

À ce jour, les raisons de l'augmentation de la prévalence des maladies allergiques ne sont pas complètement élucidées. Certains individus, étant donné leur prédisposition génétique, seraient plus susceptibles de développer une réponse allergique **(Ring et al., 2001)** mais d'autres facteurs comme, l'environnement, sont également incriminés et prises en considération **(D'Amato et Cecchi, 2008)**.

Cependant, les allergies respiratoires représentent une proportion importante dans l'ensemble des manifestations allergiques **(Laaidi et Carli, 2002)** dont les pollinoses. Ces dernières se définissent par l'ensemble des manifestations cliniques induites par l'allergie aux grains de pollens **(Gaussorgues et Demoly, 2013)**. L'installation d'une pollinose témoigne d'une rupture de tolérance, chez un individu génétiquement prédisposé, vis-à-vis d'un ou plusieurs types de pollens, substances *a priori* inoffensives. Dans ses formes classiques respiratoires, la pollinose correspond à un processus d'hypersensibilité dépendant des immunoglobulines (Ig) E. Elle implique donc une effraction de la barrière épithéliale, une rencontre productive avec les cellules immunitaires sentinelles et le choix d'une réponse mal orientée (Th2) et trop prolongée (par défaut de lymphocytes T régulateurs) **(Vitte, 2012)**.

Le plus souvent il s'agit d'une rhinite allergique dont la symptomatologie est induite par l'inflammation allergique des muqueuses du nez mais aussi des sinus, des yeux et parfois des bronches. La rhinite pollinique souvent dénommée «rhume des foins» est ainsi très souvent associée à une conjonctivite, parfois à un asthme **(Gaussorgues et Demoly, 2013)**.

Les allergies aux pollens représentent environ la moitié des allergies **(Guillam et Ségala, 2008)** et affectent 10 à 30 % des habitants de la planète, selon les zones géographiques **(Gaussorgues et Demoly, 2013)**.

En Algérie, environ 25% de la population a développé cette sensibilité. D'après l'Association Nationale des Allergologues Privés (ANAP), 15% de la population nationale, soit 5 millions d'algériens, présentent une rhinite allergique, considérée comme étant une maladie sous-diagnostiquée et sous-estimée. Les gens dédramatisent ses symptômes, et la soignent souvent comme si c'était un rhume.

Toutefois, un grain de pollen doit posséder ce qu'on appelle le potentiel allergisant, indiquant ainsi sa capacité de provoquer des symptômes chez les allergiques aux pollens. Il est coté de 0 (nul) à 5 (très fort) (**Gouranton-Lagier *et al.*, 2009**). Si les pollens occasionnent en eux-mêmes des symptômes d'allergie parfois conséquents, ceux-ci peuvent être aggravés par l'effet des conditions météorologiques et de la pollution atmosphérique, cette dernière agissant soit directement sur les voies respiratoires, soit indirectement sur ce spermaphyte en modifiant son allergénicité (**Laaidi *et al.*, 2002**).

Il faut noter que les périodes d'émission des pollens dans l'air sont variables. Par ailleurs, les plantes émettrices de pollen allergisant se répartissent selon des aires géographiques assez précises en fonction du climat qui leur convient et qui représente un déterminant majeur de leur phénologie, de leur distribution et de leur productivité (**Sofiev *et al.*, 2009**). Bien que d'autres facteurs comme la modification de l'utilisation des sols puissent intervenir, sous l'effet du réchauffement climatique, les aires de répartition des végétaux pourraient se déplacer, engendrant des allergies nouvelles dans des régions où elles étaient jusque-là inconnues et pouvant également entraîner un allongement de la saison de pollinisation et une augmentation des quantités de pollens produites (**Laaidi *et al.*, 2011**).

Pour cela, un calendrier, dit pollinique, est établi pour chaque région, suite à la combinaison de deux domaines de recherche. Le premier, aéropalynologique ; il permet l'identification et le dénombrement de la composition pollinique atmosphérique ainsi que la détermination des périodes de pollinisation de chaque espèce végétale. Le deuxième domaine est allergologique. Un allergologue doit diagnostiquer le type de pollen présentant un risque pour un patient allergique, par un questionnaire et des tests cutanés, en utilisant des standards à base d'extrait pollinique.

Ce présent projet de thèse a été subdivisé en deux approches. La première aéropalynologique. Elle consiste à établir un compte et une identification pollinique des familles végétales, entre autre, allergisantes dans l'atmosphère d'Oued Zenati (Wilaya de Guelma). Trois sites ont été choisis pour assurer la collecte gravimétrique du pollen et la

réalisation d'un calendrier pollinique de l'année 2012, pour cette zone géographique. Notre deuxième approche est immunologique. Elle consiste, d'une part, à évaluer le potentiel d'une espèce végétale considérée comme allergisante et appartenant à une famille classée comme abondante, dans l'atmosphère de notre zone d'étude, sur un modèle murin. D'autre part, cette approche a pour objectif, la caractérisation immunologique de l'allergène majeur de cette espèce, par des tests *in vitro*.

Dans ce contexte, ce modeste document scientifique sera présenté en trois chapitres. Le premier comprend une synthèse bibliographique, qui aborde les points essentiels à la compréhension de la physiopathologie de la réponse inflammatoire allergique aux pneumallergènes et la biologie du pollen. Le deuxième chapitre décrit le matériel ainsi que les différentes méthodes utilisées pour achever nos recherches. Un dernier chapitre illustre les résultats ainsi que leur discussion et enfin on termine par une conclusion générale et des perspectives.

Chapitre I

Synthèse

bibliographique

1. L'allergie

1.1. Définition

L'épidémie d'allergie se répand comme une traînée de poudre: une maladie qui passe au 4^{ème} rang mondial dans le classement de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Car si tout le monde peut faire une allergie un jour ou l'autre, ce sont surtout les tendances aux allergies qui se développent : rhume des foins, asthme, eczéma, allergies alimentaires...(Festy, 2004).

Le mot « allergie » qui a fait fortune et que l'on utilise abusivement dans le langage courant vient étymologiquement du grec : *allos* (autre) et *ergon* (action). Il signifie une réaction inhabituelle de l'organisme à un stimulus généralement inoffensif. L'organisme est, grâce à ses cellules, ses tissus, ses protéines, capable de distinguer ses propres éléments (le soi) des éléments étrangers (le non-soi) et parmi ceux-ci, ceux qui lui sont nocifs et ceux qui ne le sont pas. Il met en jeu son système immunologique qui est par définition le système de défense et va adapter sa réponse en fonction de cette reconnaissance. Mais l'allergique fournit une réponse inadaptée et excessive à ses agresseurs. Il s'agit en quelque sorte d'une immunité mal réglée, d'un processus de défense exacerbé, qui dépasse son but. Ainsi, l'allergie répond à un certain nombre de mécanismes biologiques de mieux en mieux précisés. Mais, toute réaction indésirable de l'organisme n'est pas allergique. C'est le cas, par exemple, de l'intolérance et de l'intoxication (Molina, 1995).

1.2. L'histoire scientifique de l'allergie

« Vieux comme le monde », est une expression populaire que l'on pourrait utiliser pour les phénomènes d'allergie. En effet, le premier allergique connu aurait été Ménes, Pharaon de la 1^{ère} dynastie en l'an 2650 avant JC (Jésus-Christ), allergique au venin d'Hyménoptère, il serait mort à la suite d'une piqûre de guêpe. Des personnages célèbres, tels qu'Hippocrate (cinquième siècle avant JC.) et Galen (second siècle après JC.) ont reconnu que le lait de vache ou de chèvre pouvait causer des troubles digestifs et de l'urticaire (Mondoulet, 2005). En 1483, le roi Richard III présentait une urticaire après avoir déguster une coupe de fraises et l'ingestion, après quelques heures, de ces fruits rouges. En 1586, Marcello Donati décrivit le cas d'un jeune comte qui développait un angio-œdème chaque fois qu'il consommait des œufs (Dutau et Rancé, 2006). Mais il a fallu attendre le début du 20^{ème} siècle pour que l'allergie soit clairement définie.

En 1902, Portier et Richet effectuent la première injection d'une faible dose de venin d'anémone de mer, ils l'appellent l'hypnotoxine ou actinotoxine. Après une semaine, une seconde dose est effectuée et parfaitement tolérée par le chien. Puis après quelques jours, alors que l'animal ne présente aucune anomalie, une troisième dose lui est administrée. Les auteurs attendaient un effet protecteur de ces injections répétées à dose non mortelle. Or, en quelques minutes, le fameux chien Neptune s'effondre et meurt. Ce phénomène une fois bien établi sur le plan expérimental, Richet décide de lui donner un nom « anaphylaxie ». Richet montra par la suite que les protéines contenues dans les extraits du venin étaient responsables du phénomène. La brutalité de l'accident l'amène aussi à parler de choc et le terme de « choc anaphylactique » était créé (**Molina, 1995**).

En 1906, le terme « allergie » a été créé par Von Pirquet et sa collaboratrice Bela Shick (**Molina, 1995**). Il observa des réactions immunitaires inattendues (souvent néfastes) chez des individus immunisés et mis en contact avec l'antigène. Ce terme a ensuite évolué pour prendre des sens différents se confond avec une hypersensibilité induite par un antigène de l'environnement, l'allergène (**Espinosa et Chillet 2010**).

En 1921, Prausnitz et Küstner firent une expérience restée célèbre : Prausnitz, non allergique au poisson, s'est injecté dans la peau le sérum de Küstner, allergique au poisson. Ils ont alors montré qu'une injection d'extrait de poisson au même site provoquait l'apparition d'une réaction allergique cutanée, une papule érythémateuse, appelée réaction de Prausnitz-Küstner. Cette expérience leur permit de démontrer que trois paramètres sont importants dans l'allergie : la spécificité envers l'allergène, l'existence de facteurs présents dans le sérum du patient allergique préexposé à l'allergène (les réagines) et des acteurs tissulaires présents chez tous les individus (**Espinosa et Chillet, 2010**).

En 1968, le Centre de Référence International pour les Immunoglobulines de l'OMS a décidé qu'un nombre suffisant de données essentielles étaient disponibles pour annoncer la présence d'un cinquième isotype d'immunoglobulines, les IgE (**Bouaziz, 2014**).

Au milieu des années 1970, les réactions allergiques classiques dépendantes des IgE aux allergènes inhalés ont été désignées par Pepys par le terme « allergie atopique ». Le terme « atopique » est aujourd'hui utilisé comme un synonyme de « IgE dépendant » par la plupart des médecins et des scientifiques travaillant dans le domaine de l'allergologie (**Johansson et al., 2001**).

2. Classification des hypersensibilités

2.1. Classification de Gell et Coombs

En 1963, P. Gell et R. Coombs ont distingué quatre types d'hypersensibilité en fonction des mécanismes immunitaires incriminés et de la cinétique de la réponse. Il faut cependant garder à l'esprit que ces mécanismes immunitaires ne sont propres aux réactions d'hypersensibilité, mais sont des mécanismes classiques de l'immunité. Ces réactions font partie des processus allergiques et y sont parfois étroitement imbriquées. Gell et Coombs ont classé les réactions d'hypersensibilité en se basant sur les symptômes de ces manifestations et les quelques mécanismes immunitaires connus à l'époque (**Espinosa et Chillet 2010**) : Hypersensibilité de types I, II et III dépendent de l'interaction de l'antigène et d'anticorps humoraux, alors que le type IV implique la reconnaissance de l'antigène par des cellules T. Ce dernier a été appelé dans le passé « hypersensibilité retardée » en raison du temps plus long nécessaire à la production de la réaction (**Tab.1**) (**Roitt et Rabson 2002**).

Tableau 1 : classification des hypersensibilités, modifiée d'après Gell et Coombs (Espinosa et Chillet 2010).

HS (délai)	Effecteurs	Mécanisme	Dommages tissulaires	Fonction initiale détournée
HS type I ou immédiate (0 à 4h)	IgE	Activation des mastocytes, éosinophiles et basophiles	Inflammation, œdème, bronchoconstriction, dégradation de MEC, urticaire.	Lutte contre les parasites eucaryotes, notamment pluricellulaires (ex. : vers)
HS type II (4 à 8h)	IgG IgM	ADCC, activation du complément	Lyse de cellules ou tissus particuliers	Lutte contre des micro-organismes extracellulaires par activation du complément et opsonisation
HS type III (8 à 12h)	IgG IgM	Dépôts de complexes immuns, action des neutrophiles	Arthrites, glomérulonéphrites	Neutralisation des particules virales et des antigènes microbiens solubles (ex. : toxines)
HS type IV ou retardée (24 à 48h)	LTh1	Activation de l'immunité adaptative à médiation cellulaire (LTh1, LTc, MP)	Inflammation, destruction de cellules ou tissus	Réponse contre des pathogènes intracellulaires (PAMP de type I)

ADCC : cytotoxicité dépendante des anticorps, **LT** : lymphocytes T, **HS** : hypersensibilité, **MEC** : matrice extracellulaire, **MP** : macrophage, **PAMP** : motifs moléculaires associés aux pathogènes.

2.2. Classification de Johansson

Au cours des deux dernières décennies, est apparue une tendance à utiliser le mot « allergie » pour décrire toutes sortes de réactions inattendues de la peau et des muqueuses, Johansson et ses collaborateurs ont proposés que le terme d'hypersensibilité soit utilisé comme terme général pour désigner ce type de réactions (**Fig.1**), et que sa définition soit la suivante : *L'hypersensibilité provoque des symptômes ou des signes cliniques reproductibles objectivement, initiés par une exposition à un stimulus défini, à une dose tolérée par des sujets normaux (Johansson et al., 2001).*

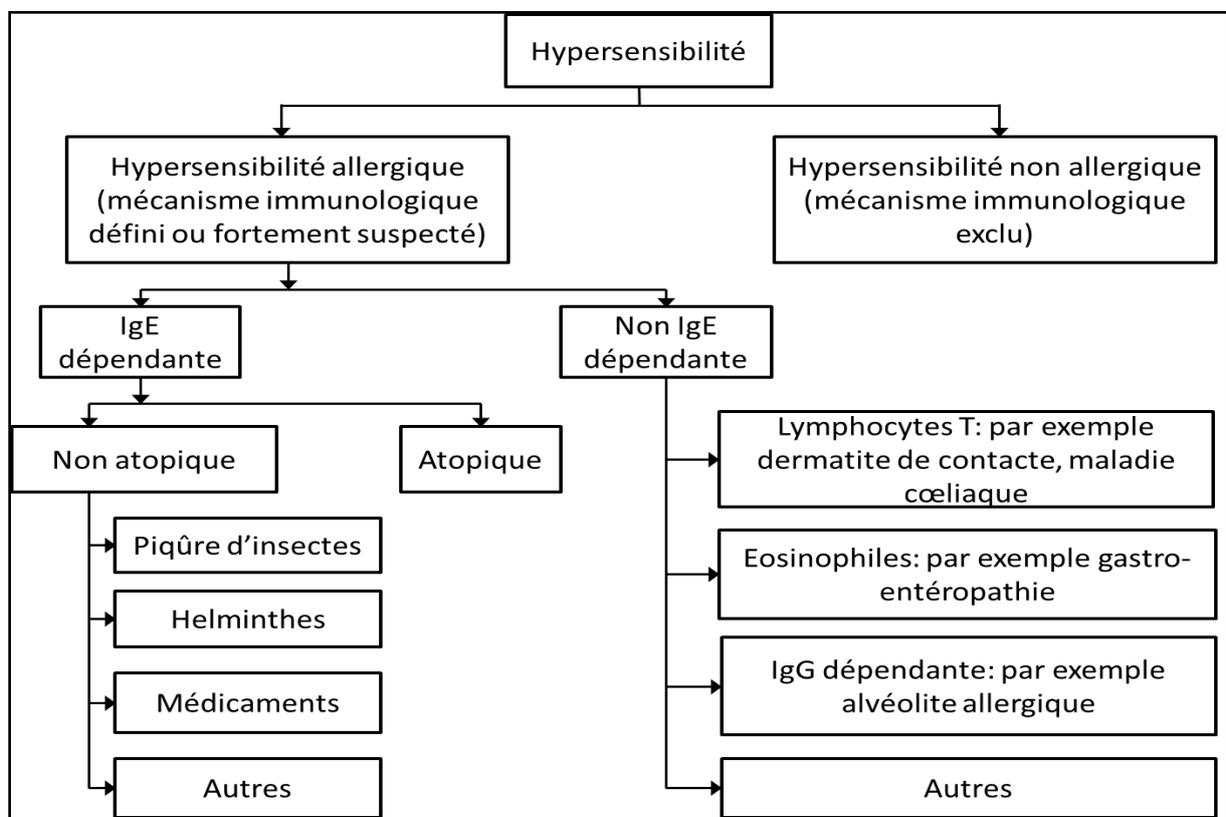


Figure 1 : Classification de Johansson (Johansson et al., 2001).

3. Mécanisme et acteurs de la réponse allergique

L'épithélium respiratoire et les cellules sentinelles sont au premier rang de la rencontre avec les substances inhalées, nocives ou non. Ils doivent détecter les agresseurs potentiels, « décider » de l'opportunité d'une réponse immune et si oui choisir son orientation (Chanez, 2005). La barrière épithéliale assure la protection physique (tapis mucociliaire) ainsi que chimique (défensines, autres molécules antibactériennes) et coopère étroitement avec le

réseau de cellules immunitaires (mastocytes, cellules dendritiques, macrophages, lymphocytes) chargées de la reconnaissance et de l'élimination des pathogènes potentiels (**Holt et al., 2008**). La nature et l'état d'activation des cellules présentes dans la barrière bronchique varient selon la présence ou non d'agents pathogènes (virus, bactéries, autres micro-organismes), de polluants chimiques ou particuliers (suies, gaz de combustion, allergènes) et de l'orientation des réponses immunes (**Broide, 2008**).

3.1. Déroulement de la réaction allergique (hypersensibilité de type I)

L'allergie, maladie n'apparaît jamais du jour au lendemain : elle est toujours précédée d'une période silencieuse, asymptomatique appelée période de sensibilisation (**Fig.2**). Celle-ci peut durer plusieurs mois à plusieurs années selon les allergènes concernés. Il faut donc toujours un premier contact sensibilisant avant l'apparition de la maladie elle-même (**Quéquet, 2005**).

Les IgE produites après les premiers contacts avec l'allergène se fixent sur les récepteurs Fcε des cellules effectrices de l'allergie. Lors d'une nouvelle exposition à l'allergène, ce dernier se combine aux IgE elles-mêmes fixées sur la membrane des cellules effectrices et induit un pontage et une modulation des récepteurs Fcε. Ce phénomène est suivi de l'activation de divers systèmes enzymatiques, puis de l'extrusion rapide des granulations intra-cytoplasmiques et de la synthèse, plus lente, des médiateurs. La réaction allergique, notamment dans les voies respiratoires, se déroule le plus souvent en deux temps (**Ponvert et Weill, 2003**) :

➤ Une phase précoce, de survenue rapide (**Fig.3**) (quelques minutes à quelques dizaines de minutes après le contact avec l'allergène) (**Ponvert et Weill, 2003**). La réaction immédiate résulte de la libération de médiateurs préformés ou rapidement synthétisés. Elle est caractérisée par une dilatation capillaire intense avec exsudation, spasme des muscles lisses, hypersécrétion de mucus et stimulation des extrémités nerveuses. L'activation mastocytaire entraîne également le recrutement progressif et l'activation de plusieurs types de cellules sanguines : polynucléaires neutrophiles, basophiles, éosinophiles, lymphocytes T, monocytes et cellules dendritiques. Cet infiltrat est responsable de la phase retardée ou chronique de l'inflammation allergique (**Delespesse, 2012**).

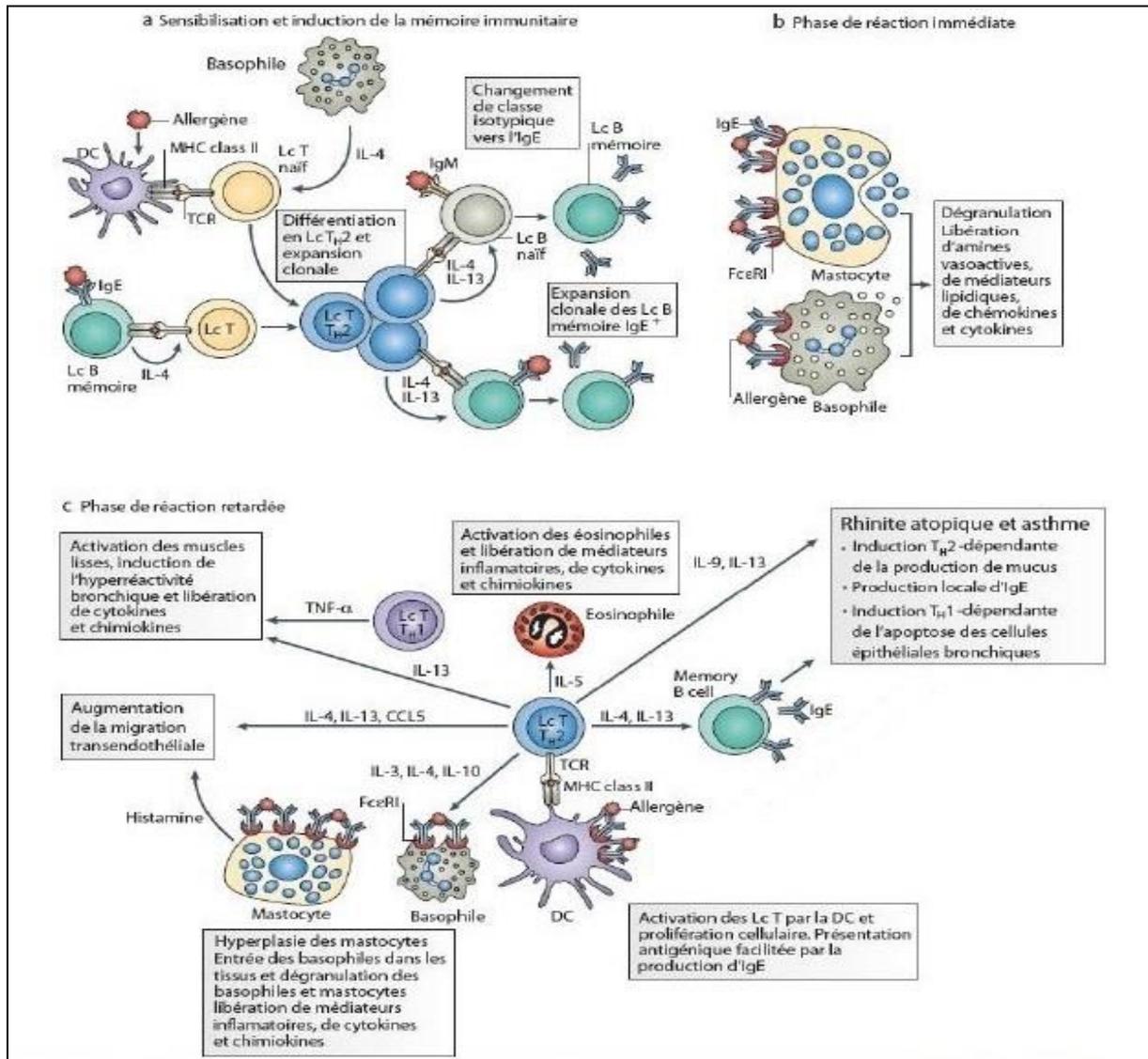


Figure 2 : Mécanismes généraux de l'allergie (Larché *et al.*, 2006) (Modifiée par Bouguenoun, 2015)

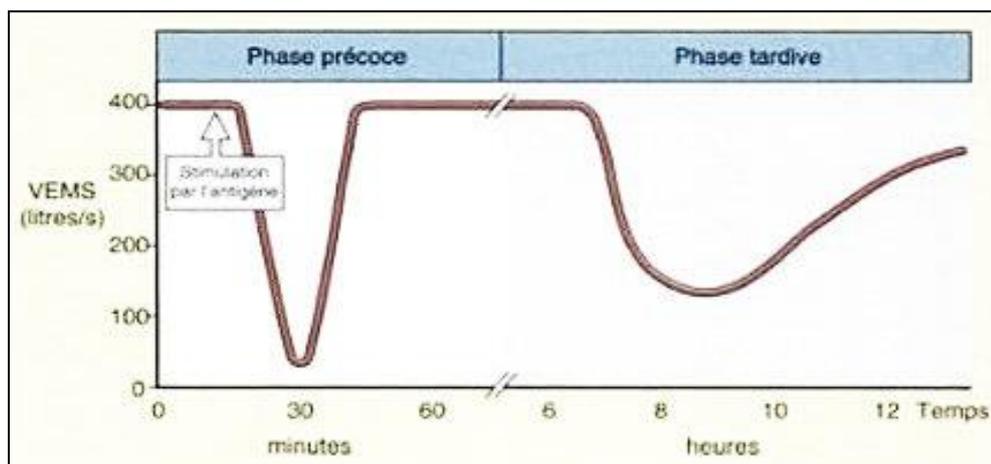


Figure 3 : Aspect graphique des phases de la réaction allergique (Janeway *et al.*, 2003) (Modifiée par Bouguenoun, 2015)

➤ La phase retardée ou tardive, se développe progressivement dans les heures suivantes (**Fig. 3**) et est caractérisée par une réaction inflammatoire lente à régresser (**Ponvert et Weill, 2003**). Elle est induite par la synthèse et la libération de médiateurs comme les leucotriènes, les chimiokines et des cytokines qui activent les mastocytes. Ces cellules vont recruter sur le site de l'inflammation d'autres leucocytes comme les éosinophiles et les lymphocytes Th2 (T helper) (**Ponvert, 2002**).

Bien que cliniquement moins marquée que la réponse immédiate, la réaction tardive est associée à une seconde phase de contraction des muscles lisses, d'œdème continu et à la caractéristique principale de l'asthme allergique, une réactivité accrue aux agents constricteurs des bronches comme l'histamine ou la méthacholine. La réaction tardive est responsable de la majorité des maladies chroniques, par exemple l'asthme chronique. Cette réponse retardée peut facilement se transformer en une réponse inflammatoire chronique si l'antigène persiste et active les cellules Th2 spécifiques, qui à leur tour, induisent une éosinophilie et une production d'IgE (**Janeway et al., 2003**). La production des cytokines de type Th2 par les lymphocytes T présents sur le site de la réaction est corrélée avec la sévérité des symptômes (**Ponvert et Weill, 2003**).

3.2. Les acteurs de la réaction allergique

3.2.1. Les cellules dendritiques

La nature de la réponse immunitaire, y compris vis-à-vis des allergènes, est déterminée en grande partie par les cellules dendritiques (DC) (**Delespesse, 2012**). Des nombres plus élevés de DC ont été observés au niveau de la muqueuse bronchique et nasale de sujets allergiques (**Tsicopoulos et al., 2008**). Après exposition à l'allergène et à un signal de danger, les DC vont maturer et migrer vers les ganglions drainant suite à l'expression du récepteur chimiokinique CCR7 (**Hammad et al., 2002**) et induire une réponse lymphocytaire T. L'expression de molécules de costimulation telles que CD86 ou OX40-L par les DC favorisent un profil Th2 (**Fig.4**) (**Hammad et al., 2001**).

Les propriétés fonctionnelles des cellules dendritiques sont elles-mêmes dépendantes du microenvironnement tissulaire dans lequel elles résident. Celles situées sous la barrière épithéliale seront influencées par les cytokines produites par les cellules épithéliales en réponse à l'antigène. Des études récentes suggèrent que la TSLP (thymic stromal lymphopoietin), une cytokine produite par les cellules épithéliales (**Fig.4**), programme les

cellules dendritiques pour induire la différenciation des cellules T naïves en lymphocytes Th2 pro-inflammatoires, produisant de grandes quantités de cytokines Th2, d'IL-10 et beaucoup de TNF α (Delespesse, 2012).

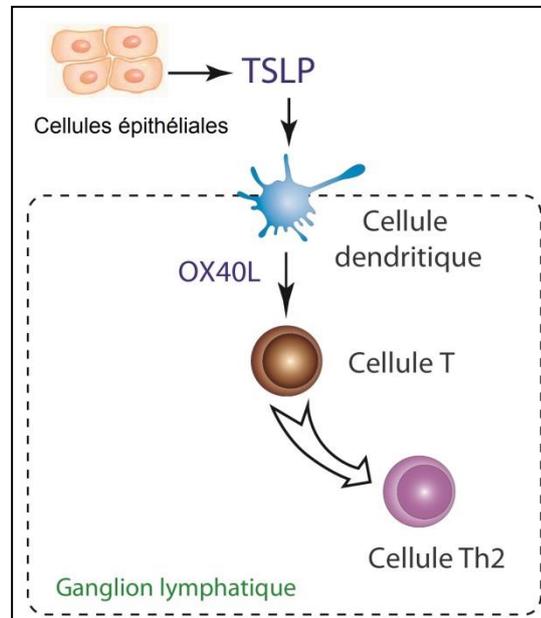


Figure 4 : Rôle des cellules dendritiques (Li, 2013)

La polarisation lymphocytaire est aussi influencée par un autre type de DC les DC plasmacytoïdes (pDC). Dans des conditions physiologiques, les pDC sont impliquées dans le développement d'une tolérance vis-à-vis d'un antigène inhalé chez la souris (De Heer *et al.*, 2004). Cependant, dans l'asthme allergique, les pDC de patients sensibilisés aux acariens induisent une polarisation Th2 après activation par l'allergène majeur Der p1, ce qui pourrait refléter un défaut intrinsèque des pDC chez les patients allergiques (Charbonnier *et al.*, 2003).

Il existe également des cellules considérées comme présentatrices non professionnelles pouvant présenter l'antigène aux lymphocytes T dans certaines conditions seulement, dont les cellules endothéliales et épithéliales. Chez un rhinitique, il semble exister une expression accrue de molécules d'adhésion ICAM-1 (Inter Cellular Adhesion Molecule) sur les cellules épithéliales et de plusieurs types sur les cellules endothéliales (Demoly, 2005).

3.2.2. Les monocytes – macrophages

Ils appartiennent au système des phagocytes mononucléés. Les monocytes représentent la forme circulante et une fois dans les tissus, se différencient en macrophages

tissulaires. Ils ont à la fois un rôle de phagocytose, de présentation d'antigène et des activités sécrétoires. Ils sécrètent en particulier les prostaglandines, les leucotriènes, des cytokines et des facteurs de croissance tels que IL-1 (Interleukine), IL-10, TNF α (Tumor necrosis factor), TGF β (Transforming growth factor), IFN γ (Interféron) (**Demoly, 2005**). Les cellules de la lignée monocyttaire possèdent en général des Fc ϵ R2, dans certaines conditions des Fc ϵ R1. Ce sont des cellules essentielles de toute inflammation chronique et elles participent à la réparation tissulaire (**Demoly et Bousquet, 2002**). Les monocytes sont augmentés en nombre chez les rhinitiques allergiques (**Demoly, 2005**).

3.2.3. Les lymphocytes T

- **Les lymphocytes Th2** : l'orientation vers un profil Th2 se fait sous le contrôle de nombreux facteurs incluant les conditions d'activation (liaison au TCR « T-cell receptor » molécules de co-stimulation), la nature et dose de l'antigène, la nature de la cellule présentatrice d'antigène et l'environnement en cytokines (**Bouaziz, 2014**). Chez le sujet non allergique, la réponse spécifique à un allergène ayant pénétré dans l'organisme est de type Th1, alors qu'un des aspects importants de l'inflammation nasale chez le patient ayant une rhinite allergique est la présence de lymphocytes de type Th2 (**Demoly et Bousquet, 2002**).

Les lymphocytes Th2 pro-inflammatoires ont un rôle causal dans l'allergie, ils sont non seulement indispensables pour la production d'IgE, mais exercent également une activité inflammatoire intrinsèque particulièrement importante dans les formes chroniques de la maladie. Les lymphocytes Th2 se définissent par leur profil de cytokines (quantités importantes d'IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 et IL-13) et par l'expression de récepteurs à certaines chimiokines produites au site de la réaction allergique, expliquant leur accumulation préférentielle à ce niveau. Trois récepteurs aux chimiokines sont préférentiellement exprimés à la surface des Th2 : le CCR3 (liant l'éotaxine, RANTES « Regulated on activation normal T cell expressed and secreted », MCP-2, -3, -4, -5 « Monocyte chemoattractant protein »), le CCR4 (liant les chimiokines TARC « Thymus and activation regulated chemokine » et MDC « Macrophage-derived chemokine »), le CCR8 (liant la chimiokine I-309, principalement produite par les mastocytes) (**Delespesse, 2012**). Les cytokines Th2 sont non seulement responsables de la synthèse des IgE (IL-4 et IL-13), mais également impliquées dans le recrutement, l'activation et la survie des éosinophiles, basophiles et mastocytes au site d'exposition à l'allergène (**Fig. 5**) (**Delespesse, 2012**).

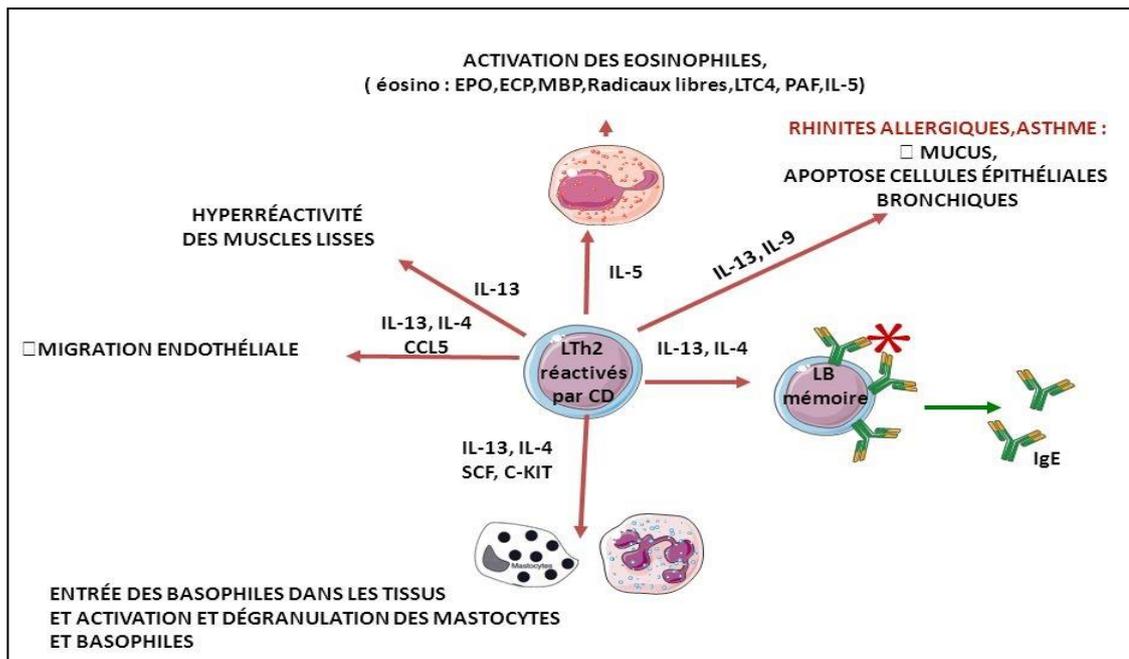


Figure 5 : Les cellules cibles des lymphocytes Th2 (Lotte, 2011).

- **Les lymphocytes Th17** : le lymphocyte Th17 exerce un effet pro-inflammatoire, par l'intermédiaire des cytokines qu'il sécrète (IL17, IL21, IL22) (Bettelli *et al.*, 2007). Il favorise l'expansion, au niveau de la moelle osseuse, des progéniteurs des neutrophiles et des monocytes par la production des facteurs de croissance hématopoïétiques (granulocyte-colonystimulating factor [G-CSF], granulocyte-macrophage-colony stimulating factor [GM-CSF]). Les neutrophiles et les monocytes migrent ensuite grâce à l'action des chémoattractants tels l'IL-8, le MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), le growth-related protein-a (Gro-a) et atteignent le site d'agression où l'inflammation est amplifiée par les cytokines pro-inflammatoires: IL-6, la prostaglandine (PGE2), l'IL1b, TNF α , l'INF γ et le CD40L (ligand). Le lymphocyte TH17 régule la pénétration des neutrophiles dans les tissus en augmentant l'expression des chimiokines (Essakalli *et al.*, 2010).

- **Les lymphocytes T régulateurs (Treg)** : les lymphocytes T régulateurs (Treg) constituent de petites populations de lymphocytes T, dont la plus largement étudiée est la population « innée », CD4 + CD25^{high}CD127^{low}. Dans l'allergie, on considère qu'ils sont le substratum de la tolérance normale vis-à-vis des allergènes, et que c'est une rupture de cette tolérance qui mène à l'allergie (Langelot *et al.*, 2010). Ils ne prolifèrent pas en réponse à l'antigène dont ils sont spécifiques, et au contraire inhibent la prolifération des lymphocytes T spécifiques pro-inflammatoires (Akdis *et al.*, 2004). Ces lymphocytes CD4+CD25+ sont producteurs de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et/ou le TGF- β . L'action des

Treg se fait via la production de ces deux cytokines immunosuppressives et peut également s'exercer par contact direct avec les cellules présentatrices de l'antigène notamment, les cellules dendritiques, ainsi que par une interaction entre le TGF- β membranaire et son récepteur sur les LT (lymphocyte T) (**Burks *et al.*, 2008**).

Un lien direct entre un déficit en Treg et l'allergie a été mis en évidence pour la première fois dans l'allergie au pollen de graminées par **Ling *et al.* (2004)**. Ces auteurs ont observé que la production d'IL-5 et la prolifération induites par l'allergène *in vitro* étaient inhibées par la population CD4+CD25+ chez les sujets non atopiques mais, cet effet était atténué chez les sujets allergiques en dehors de la saison pollinique, et aboli lors de celle-ci.

3.2.4. Les lymphocytes B

La différenciation des lymphocytes B en plasmocytes synthétisant des IgE est régulée étroitement par les lymphocytes T et cela par le biais de l'IL-4 et l'IL-13. La synthèse des IgE nécessite en outre une interaction physique entre les lymphocytes B (LB) et T impliquant de nombreuses molécules de surfaces et d'adhésion (**Demoly et Bousquet, 2002**), dont l'engagement d'une protéine membranaire (CD40) du lymphocyte B avec son ligand (CD40-L ou CD154) sur la cellule T activée. La ligation du CD40 induit une réponse polyclonale à IgE, la spécificité est conférée par l'interaction avec le récepteur spécifique au niveau de la cellule B. L'engrènement du couple CD40-CD154 est un élément clef dans le contrôle de la commutation de classe (**Fig.6**). Le déficit en CD40 conduit à une absence de production des IgE (**Romagnani, 2000**).

Les lymphocytes T, en exprimant le CD40L, incitent les lymphocytes B à exprimer le CD80. L'interaction ultérieure entre le CD80 et son ligand le CD28 augmente la synthèse de cytokines Th2 et l'expression du CD40L par les lymphocytes Th2 (**Demoly et Bousquet, 2002**). Cependant l'engagement réciproque des molécules CD23 et CD21 renforce les capacités de liaison intercellulaire entre les lymphocytes B et T, induit l'expression du Bcl-2 qui inhibe l'apoptose et permet la différenciation en plasmocytes et permet une synthèse accrue d'IgE. Indépendamment de cette interaction avec le CD21, le CD23 peut également jouer un rôle dans la présentation de l'antigène aux lymphocytes T. Exprimé à la surface des cellules B par l'action de l'IL-4 et de l'IL-13, le CD23 fixe l'IgE qui se lie à l'antigène. Le complexe ainsi formé est internalisé et les peptides sont présentés aux lymphocytes T, qui vont à leur tour induire la production d'IgE (**Fig.6**) (**Guenounou et David, 2000**).

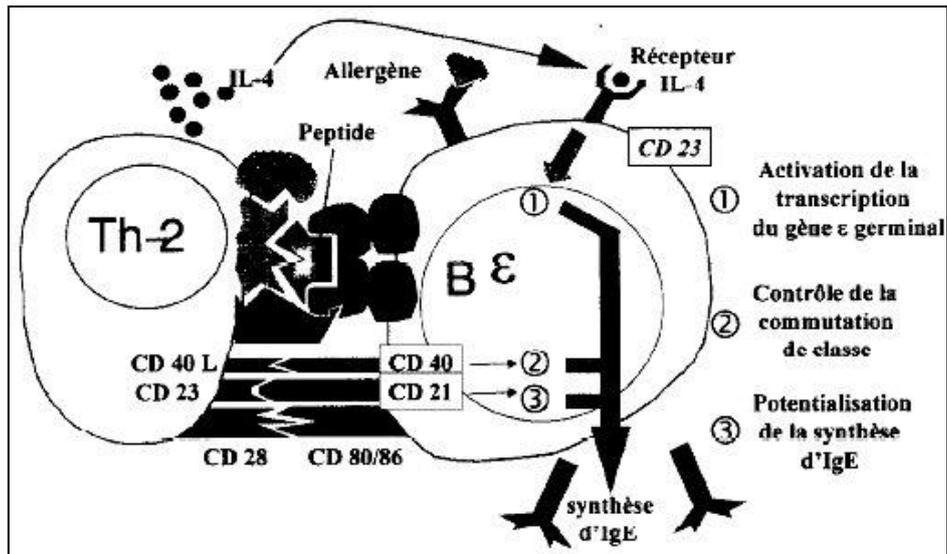


Figure 6 : Interaction des LTh2 et des LB (Guenounou et David, 2000)

3.2.5. L'immunoglobuline E (IgE)

Les IgE sont en effet des agents majeurs de la réaction d'hypersensibilité immédiate. Dans un grand nombre de cas, l'élévation des titres des IgE spécifiques peut être corrélée à l'intensité des manifestations de l'allergie atopique (Guenounou et David, 2000). Leur demi-vie plasmatique est de 2 ou 3 jours alors qu'elles persistent pendant plusieurs semaines après s'être fixées aux cellules porteuses de leur récepteur de forte affinité (Burton et Oettgen, 2011) et leur production est supprimée par les lymphocytes Th1 et leurs cytokines ($IFN\gamma$), de même que par l' $IFN\alpha$ et le $TGF\beta$ (Delespesse, 2012).

Les immunoglobulines E constituent une exception par rapport à la plupart des anticorps qui se répartissent dans les liquides corporels, car elles se fixent aux récepteurs $Fc\epsilon$ de haute affinité en absence de l'antigène. La majorité des IgE se trouve donc fixées dans les tissus sur les mastocytes ainsi que sur les basophiles circulants et les éosinophiles activés. Le pontage de ces IgE induit l'activation des cellules au site d'entrée de l'antigène et la libération des médiateurs lipidiques inflammatoires, des cytokines et des chimiokines ce qui augmente la réponse allergique (Janeway *et al.*, 2003).

Il existe deux types de récepteurs Fc pour les IgE. Le premier $Fc\epsilon RI$, un récepteur de haute affinité, qui fixe les IgE sur les mastocytes, les basophiles et les éosinophiles activés. Le second récepteur est le $Fc\epsilon RII$ ou le CD23. Il reconnaît les IgE avec une faible affinité et il est exprimé par plusieurs types cellulaires dont les lymphocytes B, lymphocytes T, monocytes,

éosinophiles et les plaquettes. Ce récepteur semble être important dans la régulation des taux des IgE (Janeway *et al.*, 2003).

3.2.6. Les mastocytes

Les mastocytes expriment de manière constitutive le FcεRI à leur surface et sont activés lorsque les antigènes pontent les IgE fixées à ces récepteurs. La dégranulation se produit en quelques secondes, libérant l'histamine, des enzymes comme les trypases et les chymases ainsi qu'une grande quantité de facteur nécrosant les tumeurs (TNF-α) (Fig.7) activant ainsi les cellules endothéliales en induisant une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion, ce qui provoque un afflux de leucocytes inflammatoires et des lymphocytes dans les tissus. Lors de l'activation, les mastocytes synthétisent et libèrent des chimiokines, des médiateurs lipidiques comme les leucotriènes et le facteur activant les plaquettes / Platelet Activating Factor (PAF) ainsi que d'autres cytokines telles que l'IL-4 et l'IL-13 qui vont entretenir la réponse Th2 (Janeway *et al.*, 2003).

3.2.7. Les basophiles

Les basophiles constituent moins de 1% de l'ensemble des leucocytes circulants, leur durée de vie n'est que de quelques jours. Il n'y a pas de basophiles dans les tissus normaux mais ils s'accumulent rapidement au site de la réaction allergique. Comme les mastocytes, ils y sont rapidement activés par l'allergène et amplifient donc la réaction inflammatoire locale. Leur développement et leur activité sont fortement contrôlés par l'IL-3 (Delespesse, 2012).

Ils sont porteurs de récepteurs FcεRI de forte affinité pour les IgE. Leurs granulations intra-cytoplasmiques contiennent de faible quantité de MBR (Major basic protein) ainsi que des médiateurs préformés dont l'histamine, l'ECFA (Eosinophils Chemotactic Factor of Anaphylaxis) et le NCFA (Neutrophils Chemotactic Factor of Anaphylaxis) qui seront expulsés lors de leur activation (Fig.8). Les basophiles synthétisent et libèrent, également, des médiateurs néoformés comme les prostaglandines (PGD₂, PGF₂α) et les thromboxanes (Ponvert et Weill, 2003).

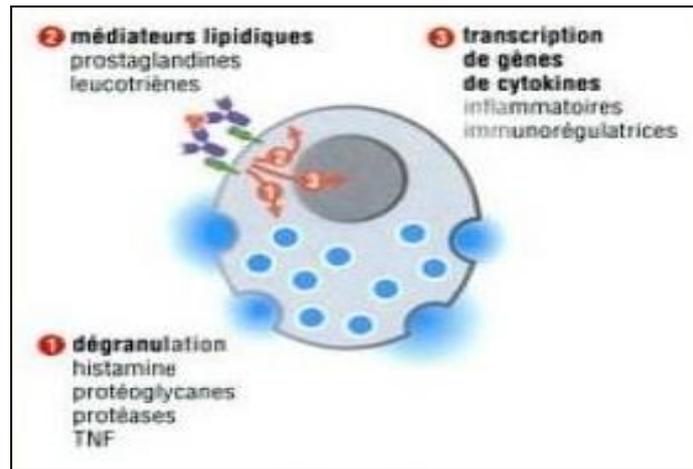


Figure 7 : Mécanisme de la dégranulation des mastocytes (De Franco *et al.*, 2009)

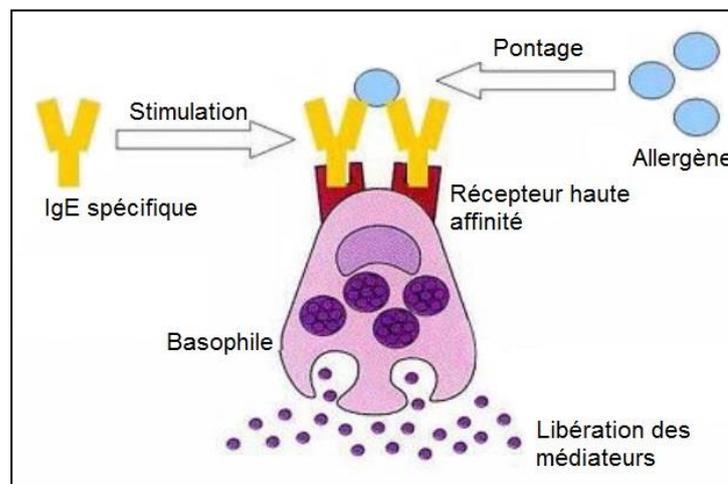


Figure 8 : Stimulation de la dégranulation des basophiles (Bouaziz, 2014)
(Modifiée par Bouguenoun, 2015)

3.2.8. Les éosinophiles

Lors des réactions allergiques, la dégranulation des mastocytes et l'activation des Th2 provoquent l'accumulation des éosinophiles et leur activation. Leur présence continue est caractéristique d'une inflammation allergique chronique. Ils semblent être les principaux responsables des lésions tissulaires (Janeway *et al.*, 2003). L'activation des éosinophiles stimule l'expression des molécules d'adhésions telles que les ICAM-1, permettant l'attachement à la surface de l'endothélium et le passage à travers celui-ci (Decot et Capron, 2006), des récepteurs de chimiokines dont le CCR3, CCR1 (Velazquez *et al.*, 1999), le CCR2 et le CXCR3 (Jinquan *et al.*, 2000) et les deux récepteurs pour les IgE, le FcεRI et le FcεRII (CD23) (Kayaba *et al.*, 2001). L'IgE est capable

d'entraîner la dégranulation des éosinophiles en se fixant sur ces deux récepteurs (**Dombrowicz et al., 2000**).

Le PAF et les leucotriènes LT B4, D4 et E4 constituent les médiateurs lipidiques les plus puissants synthétisés par l'éosinophile. En produisant leurs propres facteurs chimio-attractants tels que l'éotaxine, RANTES ou encore le PAF, les cellules favorisent le recrutement d'autres éosinophiles et leucocytes, ce qui a pour effet d'amplifier la cascade inflammatoire (**Decot et Capron, 2006**).

Les éosinophiles, les mastocytes et les basophiles peuvent interagir entre eux. La dégranulation des éosinophiles induit la libération de la protéine basique majeure, qui à son tour, induit la dégranulation des mastocytes et des basophiles. Cet effet est augmenté par toutes les cytokines qui affectent la croissance, la différenciation et l'activation des éosinophiles et des basophiles, comme l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF (**Janeway et al., 2003**).

3.2.9. Les neutrophiles

Les neutrophiles sont les premières cellules immunitaires à migrer du sang circulant vers le foyer inflammatoire (**Hurtado-Nedeleca et al., 2014**). Cette migration trans-endothéliale est extrêmement bien orchestrée par les médiateurs de l'inflammation et sous la dépendance de molécules d'adhérence exprimées d'une part par ces polynucléaires, d'autre part par les cellules endothéliales (**Woodfin et al., 2010**). Le chimiotactisme vers le site inflammatoire se fait sous l'influence de gradients de substances chimio-attractantes dont les principales sont : le leucotriène B4 (LTB4), le PAF et l'IL-8 (**Swaney et al., 2010**). Les neutrophiles peuvent être activés via le récepteur FcεRI déclenchant la sécrétion d'IL-8 (**Gounni et al., 2001**), capable à son tour de recruter d'autres neutrophiles, comme ils peuvent aussi exprimer, après activation par le GM-CSF, le récepteur de faible affinité pour les IgE, CD23/FcεRII (**Halbwachs-Mecarelli, 2005**).

3.2.10. Les plaquettes

Elles interviennent également dans le processus inflammatoire allergique. Sur leur surface, on peut trouver le récepteur de haute affinité pour les IgE (FcεRI) (**Klouche et al., 1997**). La stimulation des plaquettes via ce récepteur, induit le relargage de sérotonine et de Rantes (**Abou Chakra, 2009**). Suite à une exposition chronique aux allergènes, les plaquettes entraînent un remodelage des voies respiratoires (**Pitchford et al., 2013**).

3.2.11. Les médiateurs préformés

- **L'histamine** : l'histamine est un médiateur essentiel des effets immédiats des réactions allergiques très précoce et très actif, et parce qu'elle est métabolisée rapidement (un temps de demi-vie d'une minute environ) les effets sont donc de courte durée (**De Franco et al., 2009**). Elle exerce diverses activités physiologiques par l'intermédiaire de trois types de récepteurs (H1, H2, H3). Les réactions allergiques impliquent la fixation de l'histamine au récepteur H1 des muscles lisses et des endothéliums vasculaires situés à proximité, ce qui augmente la perméabilité des vaisseaux sanguins et accroît l'entrée d'autres cellules et molécules dans les tissus contenant l'allergène, causant ainsi l'inflammation et la constriction des voies respiratoires. L'histamine agit également sur les surfaces épithéliales des muqueuses ce qui augmente la sécrétion de mucus (**Parham, 2003**).

- **Les protéases et les protéoglycanes** : les protéases sont les constituants majeurs des granules. Celles des mastocytes contiennent la trypase dont sa détection dans les liquides biologiques est utilisée comme marqueur spécifique de l'activation mastocytaire, la chymase ainsi que la cathepsine G. les granules des basophiles contiennent des enzymes différentes des mastocytes (élastases, β -glycuronidase...). Quant aux protéoglycanes, les plus connus sont l'héparine qui se trouve dans les mastocytes séreux et le sulfate de chondroïtine, retrouvé dans les mastocytes séreux et les basophiles. Les protéoglycanes jouent le rôle de matrice qui fixe et stabilise l'histamine et les enzymes des granules, après l'exocytose et contrôlent la vitesse de libération des différents médiateurs (**Delespesse, 2012**).

3.2.12. Les médiateurs néoformés

Leur synthèse est initiée après activation des mastocytes, des basophiles et des éosinophiles (**Bouaziz, 2014**). Les principaux médiateurs lipidiques sont : les prostaglandines dont la PGD₂, issus du métabolisme de l'acide arachidonique et synthétisée par les mastocytes. La PGD₂ a des effets vasodilatateurs, bronchoconstricteurs et facilite le recrutement des neutrophiles. Les leucotriènes, principalement LTD₄, produits par les mastocytes muqueux et les basophiles, ont des effets prolongés au niveau des muscles lisses bronchiques et des capillaires sanguins, et sont impliqués dans le recrutement des éosinophiles (**Delespesse, 2012**).

3.2.13. Les cytokines et les chimiokines

Les cytokines sont des glycoprotéines qui assurent la communication et la coordination intercellulaire et interviennent aussi dans la croissance, la différenciation ou encore la mort cellulaire. On distingue des cytokines « Th1 » impliquées dans le mécanisme de défense immune à médiation cellulaire et des cytokines « Th2 » impliquées dans l'inflammation et la réaction allergique (**Bouaziz, 2014**) dont :

- **L'IL-4 et l'IL-13**, inducteurs puissants de la synthèse des IgE, sont sécrétées principalement par les lymphocytes Th2 (**Bouaziz, 2014**), les mastocytes, les basophiles et les éosinophiles (**Delespesse, 2012**).

- **L'IL-5** est produite par divers types cellulaires incluant les lymphocytes T, les mastocytes et les éosinophiles (**Hamid et Tulic, 2009**). Cette cytokine joue un rôle crucial dans la différenciation, la maturation, la survie et l'activation des éosinophiles (**Bice et al., 2014**). En les activant, l'IL-5 induit la libération d'autres agents chimiotactiques comme l'éotaxine et les protéines basiques responsables des dommages tissulaires (**Mamessier et Magnan, 2006**).

Outre ces cytokines, un large spectre est produit par différents types cellulaires dont, l'IL-1, IL-3, IL-6, TNF α , TGF β , GM-CSF (mastocytes, éosinophiles), TGF β (éosinophiles), le SCF (mastocytes) (**Delespesse, 2012**) ainsi que l'IL-17 qui orchestre l'inflammation locale en induisant la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines par les fibroblastes bronchiques, les cellules épithéliales, les cellules musculaires et les cellules endothéliales. Ce phénomène aboutit au recrutement et à l'infiltration du site inflammatoire par les neutrophiles (**Wang et Liu, 2008 ; Leite de Moraes et Dy, 2008**).

Concernant les chimiokines, elles sont en générale des médiateurs pro-inflammatoires secondaires induits par l'action de cytokines sur de nombreuses cellules. On distingue les chimiokines CXC dont l'IL-8, sont essentiellement chimiotactiques pour les neutrophiles, et des chimiokines CC (MCP, RANTES, éotaxines...) attirent les monocytes, certains lymphocytes et les éosinophiles. Les chimiokines ont aussi la capacité d'activer les cellules dont les basophiles (**Demoly et Bousquet, 2001**).

4. Les facteurs de risque

4.1. L'atopie

L'allergie immédiate se développe préférentiellement chez les sujets porteurs d'un terrain prédisposant, dit « atopique » (Weill et Batteux, 2003). L'atopie est l'aptitude à produire une quantité anormale d'anticorps IgE spécifiques en réponse à une exposition à des allergènes de l'environnement (Salmeron, 2008). Elle constitue un problème de santé publique croissant, en particulier dans les pays riches. Son caractère génétique a initialement été mis en évidence par des études de familles. Ainsi les études de transmission des parents aux enfants montrent que, pour un enfant, le risque d'être atopique est respectivement de l'ordre de 15%, 25 à 30%, et 50 à 60% lorsque aucun, un seul ou les deux parents sont allergiques ; ce risque peut même atteindre 80% lorsque les deux parents sont atteints de la même maladie allergique (rhinite et/ou asthme, notamment). Des recommandations concernant l'habitat, l'alimentation infantile et les facteurs aggravants, comme le tabagisme passif, doivent être portées à la connaissance des patients (Weill et Batteux, 2003).

4.2. L'âge

La plupart des enfants exposés aux pneumallergènes ubiquitaires de l'environnement peuvent développer une réponse immune de type IgE. Cette réponse n'est pas détectable avant l'âge de 1an ; elle commence à apparaître à l'âge de 4 ans, et culmine autour de 12 ans. Les manifestations respiratoires dues aux pneumallergènes sont donc beaucoup plus fréquentes, et se développent plus tardivement dans l'enfance, mais persistent, voire augmentent, avec l'âge (Molina, 1995).

4.3. L'environnement

Les facteurs environnementaux contribuent également au développement d'allergie spécifique. Une étude réalisée dans les pays scandinaves a montré que les allergies au pollen de bouleau, très abondant au printemps, sont beaucoup plus fréquentes chez les bébés nés à la fin de l'hiver ou au début de printemps que chez ceux nés à un autre moment de l'année, ce qui suggère l'existence d'une période critique après la naissance pendant laquelle la sensibilisation est la plus susceptible de conduire à une allergie à ce pollen (De Franco *et al.*, 2009).

Quant à la pollution due à la circulation automobile, elle a cru considérablement et représente le responsable principal de l'émission de particules et de la formation de gaz. Nombreuses sont les études qui montrent une relation entre le niveau de cette pollution extérieure et la survenue des maladies respiratoires chez les nourrissons. Certains polluants accroissent le risque allergique : il a été noté au Japon, que l'habitat proche d'autoroutes accroît sensiblement le risque de sensibilisation au pollen de cèdre du Japon. Certes l'ozone peut en être en partie responsable en stimulant les anticorps de l'allergie, mais il a été aussi constaté que les particules de diesel fixent à leur surface des protéines de pollens qui atteignent alors une taille critique pour favoriser la sensibilisation. La pollution agresse les végétaux qui répondent, vraisemblablement pour assurer leur survie, par une pollinisation plus importante (Michel et Menardo, 2004).

4.4. Les infections

Un certain nombre de données épidémiologiques démontrent que certaines infections sont capables de prévenir l'apparition de sensibilisation aux pneumallergènes, la rhinite et l'asthme (Demoly, 2005). Par exemple, une infection par un organisme qui induit une réponse Th1 au cours de l'enfance pourrait réduire la probabilité de développer des réponses Th2 plus tard et vice-versa. En revanche, il semble que les enfants qui ont souffert de bronchiolite associée à une infection par le virus syncytial respiratoire (RSV) sont prédisposés au développement de l'asthme. Les enfants hospitalisés avec cette maladie présentent un ratio de cytokines inadapté avec prédominance de L'IL-4 par rapport à l'INF- γ , ce qui favorise les réponses Th2. (Janeway *et al.*, 2003).

4.5. La taille de la famille

Il a été suggéré, par des études, que le risque de sensibilisation aux allergènes, le risque de rhinite allergique saisonnière et le risque d'asthme, étaient inversement proportionnels au nombre de frères et sœurs plus âgés présents dans les familles étudiées. L'interprétation donnée a été la suivante : être né dans une famille nombreuse augmente le risque d'exposition aux infections respiratoires dans la petite enfance, vraisemblablement en déviant le système immunitaire vers une réponse lymphocytaire de type Th1 (Demoly, 2005).

4.6. Le tabagisme

Le tabagisme maternel pendant la grossesse et pendant les premières années de vie, s'associe à une altération de la croissance pulmonaire et de la fonction respiratoire. Quant à

l'impact du tabagisme passif sur l'asthme allergique, les études montrent que les cellules T helper du sang du cordon, en présence d'acariens de la poussière de maison, produisent d'avantage de cytokines si le nouveau-né a été soumis à un tabagisme passif durant la grossesse, même en prenant en compte d'éventuels facteurs de confusion comme l'atopie maternelle (**Grimfeld et Just, 2005**).

4.7. La densité en allergènes

Dès les premiers mois de vie, la densité en allergènes influence la future sensibilisation du nourrisson. Une naissance durant la saison pollinique amplifie le risque de sensibilisation aux pollens notamment de graminées. La sensibilisation aux acariens est dépendante de la teneur en acariens au domicile dès les premiers mois de vie. La présence d'un animal domestique favorise la sensibilisation à cet animal (**Just et al., 1998**).

4.8. Les facteurs causals (les pneumallergènes)

Les pneumallergènes ou allergènes aéroportés ou allergènes respiratoires sont présents dans nos environnements extérieurs et intérieurs, personnels ou professionnels (**Demoly, 2005**). Leur taille mesurée selon leur diamètre aérodynamique est très importante car les particules se déposent au niveau des fosses nasales (grosses particules de plus de 10 à 20 μm), de l'arbre trachéo-bronchique ou des alvéoles (très petites particules de 1 μm) en fonction de leur taille. Les pneumallergènes sont très souvent impliqués dans la genèse des rhinites, conjonctivites et asthme. On les classe en allergènes perannuels (Acarien de la poussière de maison, moisissures et phanère d'animaux) et allergènes saisonniers (pollens et moisissures dans certaines régions). En fait, cette classification est artificielle, car le caractère perannuel ou saisonnier d'un allergène varie énormément d'un pays à l'autre et d'une région à l'autre dans un même pays (**Demoly et Bousquet, 2002**).

4.8.1. Les acariens

Les acariens, principaux allergènes de la poussière de maison, sont également retrouvés dans beaucoup d'autres lieux (**Demoly, 2005**). Les acariens domestiques mesurent entre 170 et 500 microns, vivant environ trois mois, ils se reproduisent une à deux fois dans leur vie. Ils se nourrissent essentiellement de notre peau d'où leur nom *Dermatophagoides* (mangeur de squames). Les plus connus se nomment *Dermatophagoides pteronyssinu* (Der p) et *Dermatophagoides farinae* (Der f) (**Quéquet, 2005**). Der p et Der f produisent une cinquantaine d'antigènes, mais seule une dizaine d'entre eux est allergisante. La majorité de

ces allergènes sont des enzymes digestives ; elles sont trouvées dans les pelotes fécales dont la taille est semblable à celle des grains de pollens (environ 20 µm), ce qui explique leur implication dans les allergies hautes et basses (**Demoly, 2005**).

4.8.2. Les spores fongiques

Les champignons supérieurs, moisissures et levures libèrent dans l'atmosphère de grandes quantités de spores allergéniques. Les spores fongiques sont de petite taille (3-10µm) et pénètrent profondément dans l'appareil respiratoire, pouvant provoquer aussi bien de la rhinite que de l'asthme. L'allergie respiratoire aux moisissures est plus difficile à mettre en évidence que pour les autres allergènes aéroportés. Les principales moisissures sont : *Alternaria*, *Cladosporium*, *Stemphylium*, *Aspergillus* et *Penicillium*. Les *Penicillium* (*roqueforti*, *caseicolum*, *notatum*...) sont les classiques moisissures des maisons, d'activité perannuelle avec une recrudescence en automne et en hiver (**Demoly et Bousquet, 2002**).

4.8.3. Les animaux domestiques

Le chat représente l'animal le plus allergisant, les allergènes se trouvent en quantité beaucoup plus importante dans ses glandes sébacées que dans sa salive. En ce qui concerne le chien, les protéines allergisantes sont présentes sur la peau, le pelage et dans la salive. Elles sont véhiculées par l'air ambiant (**Quéquet, 2005**). Cependant, l'allergie aux rongeurs se rencontre en général dans un contexte professionnel lié à l'exposition aux animaux de laboratoire (rats, cobayes). L'allergène est retrouvé dans les urines et la salive. Les allergènes des autres rongeurs se trouvent également dans les urines, dans la salive et dans les follicules pileux. Quant aux chevaux, leurs allergènes de poils et de squames déclenchent des crises d'asthme aiguës, parfois graves et des épisodes de rhinites ou de conjonctivites, pour cette raison l'équitation est contre-indiquée chez les asthmatiques allergiques (**Quéquet, 2005**).

4.8.4. Les insectes

Les blattes sont reconnues comme un constituant antigénique essentiel de la poussière de maison. Leurs allergènes sont responsables principalement d'asthme, moins fréquemment d'une rhinite persistante. Sa sensibilisation est souvent associée à une sensibilisation aux acariens (**Quéquet, 2005**).

4.8.5. Allergènes professionnels

Bien que l'allergie professionnelle soit une pathologie d'adulte, des allergènes produits sur le lieu de travail peuvent sensibiliser des sujets non exposés directement. En pathologie respiratoire professionnelle, on peut distinguer les allergènes selon leur poids moléculaire ; plus de 250 substances ont été identifiées et la liste s'allonge. Seuls les allergènes de haut poids moléculaire déterminent une hypersensibilité principalement médiée par les IgE dont les produits animaux (poils, plumes, déjections...), les produits végétaux (pollens, farines, fibres, gommes, latex...), les micro-organismes, certains médicaments et en règle générale les substances protéiques (Quéquet, 2005).

4.8.6. Le pollen

Les grains de pollen représentent une génération supplémentaire et l'élément reproducteur mâle des végétaux supérieurs qui provient des étamines des plantes à fleurs (Foresman, 2015). Les pollens sont produits dans l'anthère à partir des cellules mères aux noyaux diploïdes volumineux (Renault-Miskovsky et Petzold, 1992). Pendant le transport, les grains de pollen sont complètement séparés de la plante mère et parfaitement adaptés à leur rôle - le transfert de matériel génétique - et sont en mesure de résister au stress de l'environnement hostile sur leur chemin vers les parties femelles de la fleur (Hesse *et al.*, 2009). Les grains de pollen se déposent sur le pistil de la fleur afin de la féconder, formant ainsi une graine qui donnera naissance à une nouvelle plante (Fig.9) (Foresman, 2015).

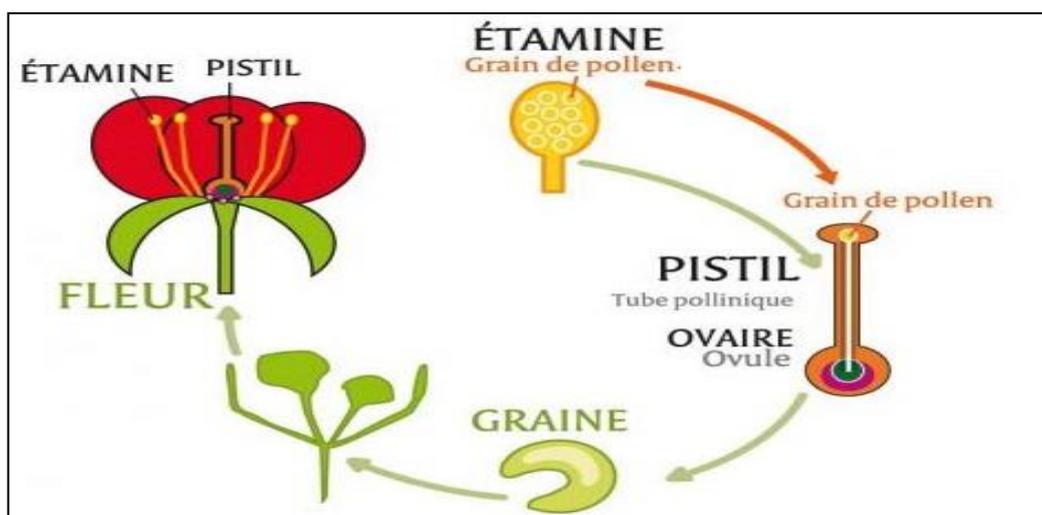


Figure 9 : La pollinisation (Porteau, 2013).

A. Caractéristiques du pollen

Ces minuscules organismes ont généralement comme paramètres variables : la forme, la taille, le type et la position des apertures et structure et sculpture la paroi.

- **La paroi pollinique** : en général, la paroi pollinique (le sporoderme) est constituée de deux couches principales: l'exine extérieure et l'intine interne. L'exine se compose principalement de sporopollénines, qui sont des biopolymères résistants à l'acétolyse et à la décomposition. L'intine est principalement composée de cellulose et de la pectine. Généralement, la paroi de pollen dans les régions aperturées est caractérisée par la réduction des structures d'exine ou par un exine déviant, et souvent une bicouche d'intine. Deux couches au sein de l'exine sont distinguées: un endexine intérieure et une extérieure ektexine. Ce dernier se compose d'une couche basale, un infratectum et un tectum. Quant à l'endexine, c'est une couche unique essentiellement non structurée (**Fig.10**) (**Hesse et al., 2009**).

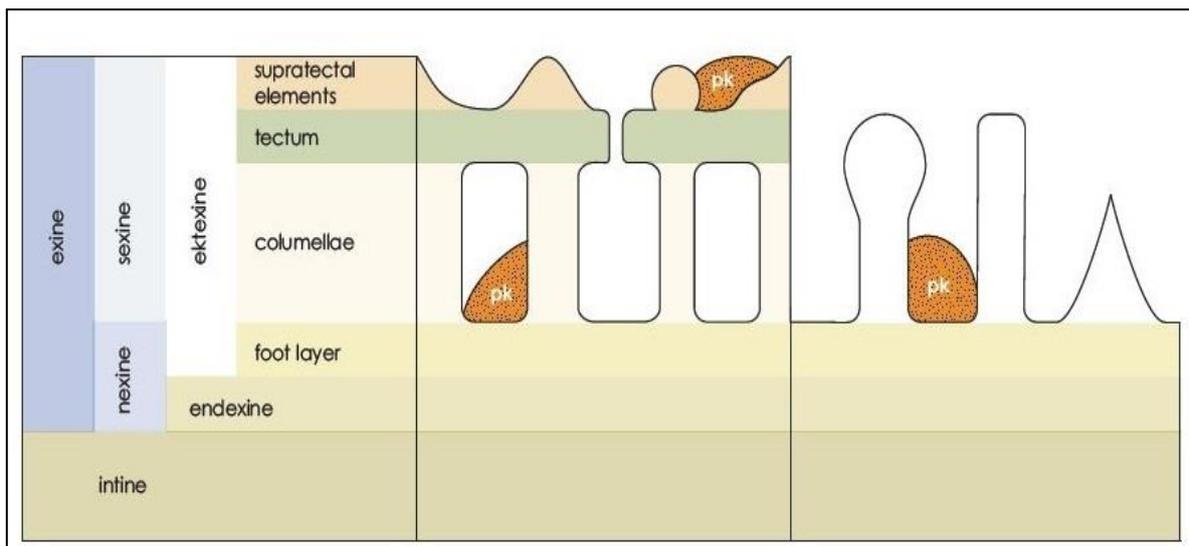


Figure 10 : stratification de la paroi pollinique (Hesse et al., 2009).

Les termes sexine pour l'exine externe structurée, et nexine pour la couche d'exine intérieure, non structurée, sont largement utilisés dans la microscopie optique, mais ne correspondent absolument pas à ekt- et endexine, respectivement (**Hesse et al., 2009**).

- **La forme** : la forme du pollen se rapporte au ratio P/E: le rapport de la longueur de l'axe polaire (P) au diamètre équatorial (E). Dans les grains de pollen sphéroïdal (ou isodiamétrique) l'axe polaire est \pm égal au diamètre équatorial. Les grains de pollen avec un axe polaire plus long que le diamètre équatorial s'appellent allongés, les grains où l'axe

polaire est plus court que le diamètre équatorial sont décrits comme oblate ou aplatis (**Fig.11**) (**Hesse et al., 2009**).

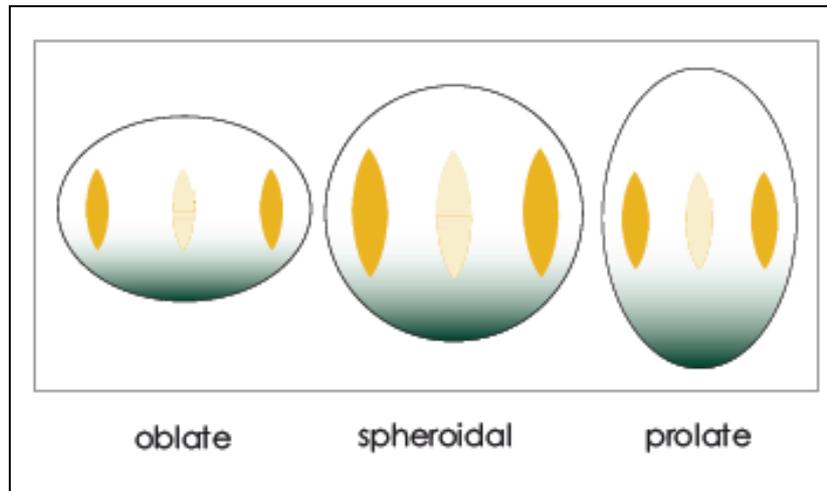


Figure 11 : Les différentes formes du pollen (Hesse et al., 2009).

- **La taille :** la taille du pollen varie entre moins que $10\mu\text{m}$ et plus que $100\mu\text{m}$. L'utilisation des catégories de taille suivantes peut être utile: très petit ($< 10\mu\text{m}$), petit ($10-25\mu\text{m}$), médian ($26-50\mu\text{m}$), grands ($51-100\mu\text{m}$) et très grands ($> 100\mu\text{m}$) (**Hesse et al., 2009**).

- **Les apertures :** une aperture est une partie, qui diffère de manière significative du reste de la paroi du pollen en sa morphologie et/ou anatomie. Elle est considérée, généralement, comme le site de germination et joue un rôle dans l'harmomégaithie (**Hesse et al., 2009**).

Les grains de pollen dépourvus d'une aperture s'appellent « inaperturé ». Une aperture circulaire s'appelle un porus et l'ovale s'appelle un colpus, alors qu'un colporus (**Fig.12**) représente la combinaison des deux (**Hesse et al., 2009**).

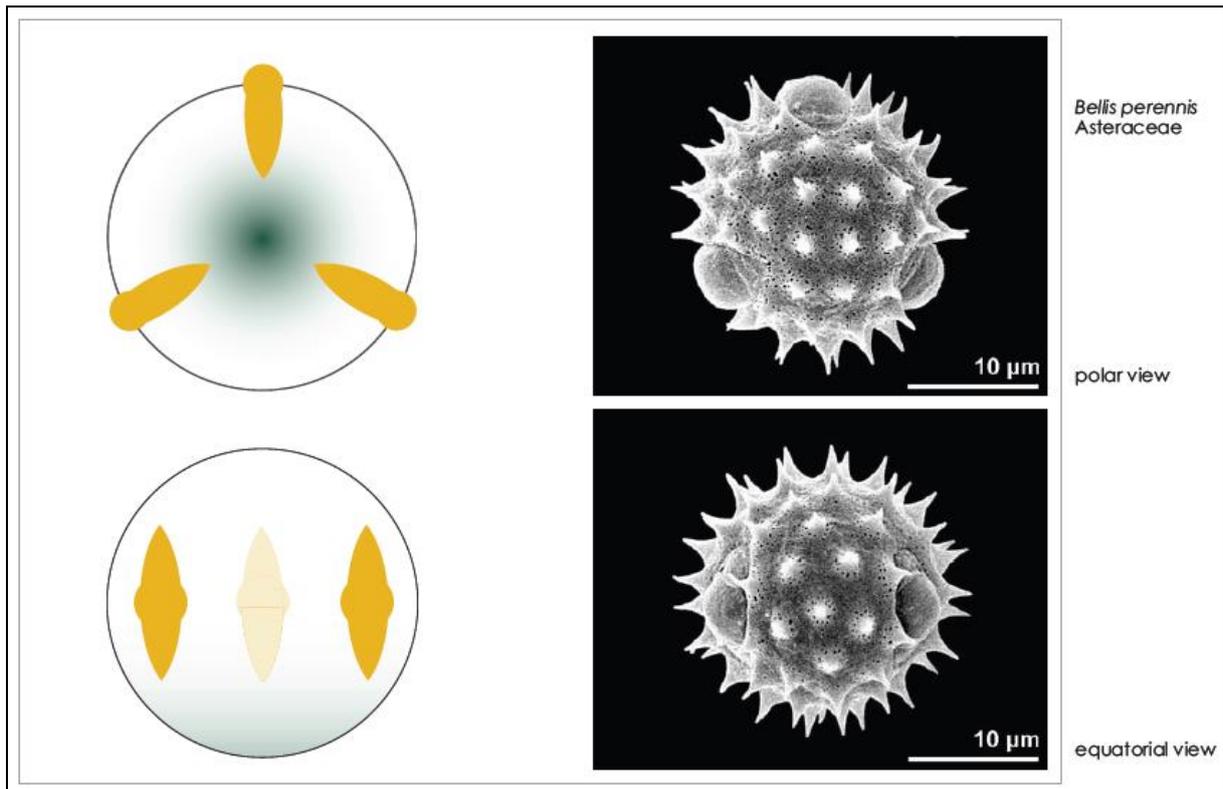


Figure 12 : Image typique d'une ouverture (Hesse *et al.*, 2009).

Une ouverture circulaire ou elliptique avec les marges indistinctes est un poroid. Le nombre d'ouvertures équatoriales (pori, colpi, colpори) est indiqué par les préfixes di-- ou tri -, cependant, le tétra penta- ou hexa sont parfois employés. Les ouvertures sont normalement couvertes par une couche « exinus » ; la membrane d'aperture. Elle peut être ornementée, par exemple, couverte de divers éléments d'exine, ou peut être lisse. En revanche, un opercule est un épais bouclier d'exine cohérent et couvre l'aperture comme un couvercle. En général, les membranes d'aperture ne sont pas pliées dans l'état sec du pollen et après l'acétolyse elles peuvent être perdues (Hesse *et al.*, 2009).

- **La couleur** : les grains de pollen sont le plus souvent de couleur jaune, s'étendant à une nuance crème ou orange. Plus rarement, ils peuvent être blancs, bruns, noirs, rouges ou même bleus ou violets. La couleur peut parfois être adaptative en soi; par exemple, dans la pollinisation ornithophile des orchidées et de cactus (Rose et Barthlott, 1994), les pollens mat-bruns se produisent, quoique les espèces entomophiles relatives aient un habituel pollen jaune. Une telle nuance de coloration indique une faible fonction de signalisation pour le pollen de plantes ornithophiles, mais elle a été également interprétée comme une adaptation à

la couleur du bec ou de visage afin de réduire le risque de la visibilité du pollen (**Willmer, 2011**).

Beaucoup de pollens changent de couleur quand ils se dessèchent, apparaissant souvent blanchâtre suite à la déshydratation en fonction du temps, ce qui pourrait à nouveau servir comme un signal utile par le pollen lui-même, indépendamment de la couleur des fleurs. Généralement, la couleur dans le pollen frais dérive des pigments dans la couche du pollenkitt (manteau pollinique) (**Willmer, 2011**). Les couleurs jaunes lumineuses sont principalement dues à des caroténoïdes tels que β -carotène, la lutéine et antheraxanthine, qui se produisent dans la plupart des pollens zoophilis (**Dobson, 1988**).

- **L'odeur** : les grains de pollen portent fréquemment leur propre odeur, qui est originaire du pollenkitt et est significativement plus fréquente chez les plantes zoophiles que chez les plantes anémophiles. L'odeur implique les mêmes types de volatiles qui produisent d'autres senteurs florales (**Dobson et Bergström, 2000**) mais ne sont, généralement, pas identiques aux composants odorants du reste de la fleur. L'odeur de pollen peut être fonctionnelle dans sa défense contre les prédateurs des fleurs (**Willmer, 2011**).

- **L'ornementation** : ce terme général, en palynologie est appliqué aux structures de la surface. Toutes les caractéristiques d'ornementation comme échine, fossula, granulum, réticulum... etc, sont considérées comme extrêmement variables; néanmoins, elles sont importantes dans la description de pollen. L'ornementation est souvent très hétérogène, en particulier dans les régions aperturées. Les revêtements de pollen comme pollenkitt ou tryphine peuvent la masquer (**Hesse et al., 2009**).

- **L'harmomégaithie** : tous les grains de pollen vivant sont capables d'absorber et libérer de l'eau; ainsi, chacun existe dans deux états morphologiquement différents: un état sec et hydraté. Le mécanisme d'harmomégaithie, par exemple, l'invagination de la paroi du pollen, prend en considération, la variation de la pression osmotique dans le cytoplasme lors de l'hydratation ou de la déshydratation (**Hesse et al., 2009**).

B. Composition du pollen

La composition chimique du pollen varie d'une fleur à une autre. Il est constitué de protéines, lipides, glucides, des minéraux et des substances diverses.

- **Les protéines et les acides aminés** : les protéines constituent près d'un quart de la masse du pollen et fournissent une quantité significative d'acides aminés. Selon la provenance

du pollen, la teneur peut varier de 11 à 35% (**Fig13**). Cette dernière, varie également, en fonction des conditions climatiques, des caractéristiques du sol où poussent les plantes et de la saison. Le pollen contient également des acides aminés dont l'arginine, l'histidine, la leucine, la lysine et tryptophane (**Gabiot, 2013**).

- **Les glucides et les lipides** : les glucides sont présents en quantités variables et proviennent principalement du nectar. Le pollen contient entre 20 et 40% de sucres réducteurs (glucose, fructose, maltose) et entre 0 et 20% de sucres non réducteurs (saccharose). Quant aux lipides, leur présence est de 1 à 25% (**Fig.13**), dont une grande partie d'acides gras essentiels (**Gabiot, 2013**).

- **Les autres substances** : les éléments divers constituent seulement 9% du pollen. On y trouve de nombreuses vitamines (la vitamine A, B1, B2, B5, B6, B8, B9, B12, C, D, E), des minéraux et des oligo-éléments (potassium, magnésium, calcium, cuivre, fer, silicium, phosphore, soufre, chlore et le manganèse), ainsi qu'un antioxydant très rare ; le sélénium; présent en quantité substantielle. On y trouve aussi des enzymes, coenzymes, stérols, flavonoïdes, des substances bactériostatiques et de croissance, des pigments, des arômes et des huiles volatiles (**Gabiot, 2013**).

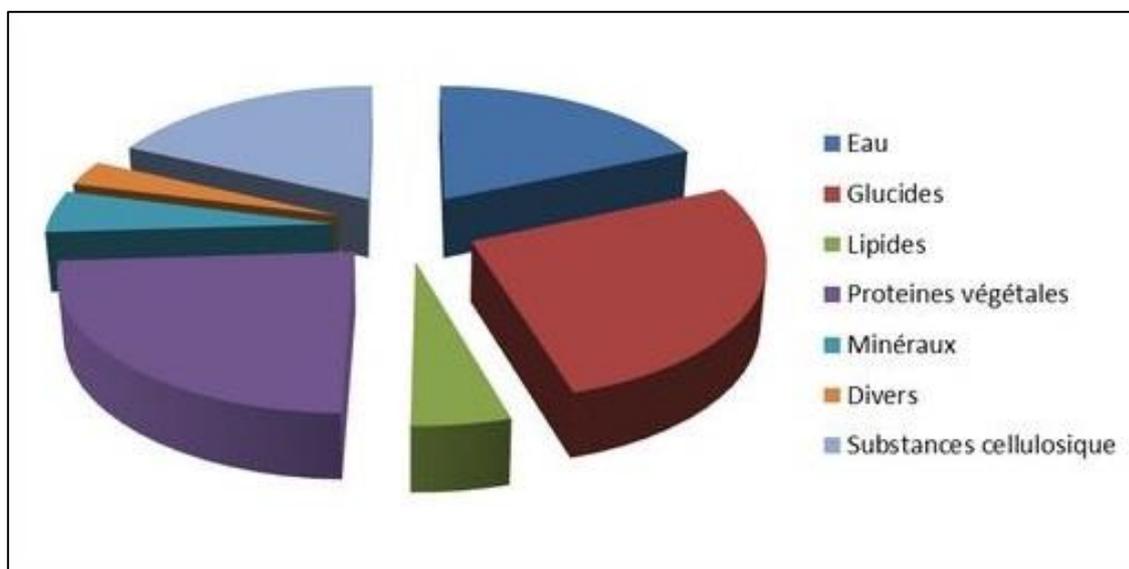


Figure 13 : Une composition moyenne du pollen (**Gabiot, 2013**).

C. La dispersion des pollens

La dispersion des grains de pollen en vue de la fécondation fait intervenir différents vecteurs : les êtres vivants, notamment les insectes butineurs (plantes entomogames), l'eau (plantes hydrogames) et le vent (plantes anémogames) (**Laaidi et al., 1997**). Les pollens anémophiles sont très aérodynamique et les plus dangereux car ils sont émis en grande quantité, déplacés sur de longues distances depuis leur émission, et apportés par le vent au contact des muqueuses respiratoires. Les pollens entomophiles, sont rarement allergisants, sauf lors des contacts étroits comme chez les fleuristes et certains agriculteurs (**Demoly et Bousquet, 2002**).

D. Pollen et allergie

L'étude du contenu pollinique de l'atmosphère relève du domaine de recherche de l'aéro-palynologie dont l'objectif est l'identification et la caractérisation des pollens transportés par le vent ainsi que leurs processus de production, d'émission, de dispersion et de dépôt. Cette science a vu un développement rapide lié aux diverses applications qu'elle suscite surtout en allergologie. En effet, il existe parmi les pollens en voyage dans l'atmosphère ceux qui sont allergisants (**Chafai-Ketfi et al., 2009**).

- **Le diagnostic des allergies aux pollens** : le diagnostic des maladies allergiques se repose sur :

- **L'interrogatoire** de l'allergique, un élément clé du diagnostic. Il consiste à préciser l'existence d'antécédents familiaux ou personnels, l'allergène en cause, lieu géographique, les conditions climatiques et les conditions professionnelles.

- **Les tests cutanés**, qui ont pour but de confirmer l'existence d'une sensibilisation à un ou plusieurs allergènes soupçonnés à l'interrogatoire. Ils doivent être prescrits quand la maladie récidive.

- **Le dosage *in vitro* des IgE spécifiques**, réservé aux cas où les tests cutanés sont contre-indiqués ou non interprétables.

- **Les tests de provocation**, qui visent à produire, chez le malade, les symptômes de sa maladie par l'administration prudente d'un allergène dont on cherche à prouver la responsabilité (**Ponvert et Weill, 2003**).

- **Les allergies liées au pollen**

La rhinite, la conjonctivite et l'asthme sont les tableaux cliniques typiques d'allergie au pollen et ils se produisent souvent chez le même patient simultanément au cours de la saison pollinique (**Sofiev et Bergmann, 2013**).

En effet, beaucoup de particules (10-40µm de diamètre) comme les pollens de graminées, alors qu'elles sont logées dans la muqueuse nasale, libèrent des substances antigéniques solubles (**Chapel et al., 2004**) entraînant ce qu'on appelle **la rhinite allergique saisonnière** ou **rhume de foin** et activant ainsi les mastocytes qui s'y trouvent. Elle se caractérise par un œdème local entraînant l'obstruction des voies nasales et la sécrétion de mucus riche en éosinophiles. De plus, la libération de l'histamine cause une irritation générale du nez. Cette réaction peut s'étendre aux oreilles et à la gorge (**Parham, 2003**).

Le même type d'allergène peut provoquer **la conjonctivite allergique** se traduisant par des démangeaisons, des larmes et de l'inflammation. Bien que désagréables et fâcheuses, ces réactions sont généralement de type aigu et n'entraînent pas de lésions durables (**Parham, 2003**).

Quant à **l'asthme allergique**, il est déclenché par des allergènes qui activent les mastocytes situés sous la muqueuse des voies respiratoires inférieures. Quelques secondes après la dégranulation mastocytaire, la sécrétion de mucus et d'autres liquides biologiques dans le tractus respiratoire augmente et les bronches se resserrent à la suite des contractions de leur muscle lisses. L'inflammation chronique est le caractère typique impliquant une infiltration persistante de leucocytes comprenant des lymphocytes Th2, des éosinophiles et des neutrophiles (**Parham, 2003**).

- **L'immunothérapie de l'allergie**

➤ **Traitement de la poussée** associe des antihistaminiques (ayant un effet antagoniste au niveau du récepteur H1), des antidégranulants (stabilisent la membrane mastocytaire) ou des corticoïdes (exercent un effet anti-inflammatoire) (**Ponvert et Weill, 2003**).

➤ **La vaccination** : le contrôle de la réponse IgE nécessite peut-être une intervention préventive. Une stratégie de vaccination, pendant l'enfance, serait l'immunisation par un

mélange des principaux allergènes avec un adjuvant en favorisant le développement des clones de lymphocytes T mémoires spécifiques d'allergènes de type 1 qui protégerait contre le développement de la production des IgE, de l'éosinophilie et de l'expression des cytokines Th2 (**Guenounou et David, 2000**).

➤ **La désensibilisation** : consiste à administrer des doses croissantes d'allergène afin de conduire à l'établissement d'un état de tolérance immunologique et clinique. L'exploration des cytokines au cours de l'immunothérapie a conduit à des résultats intéressants. La désensibilisation est souvent associée à un rétablissement de l'équilibre Th-1 /Th-2 (**Guenounou et David, 2000**).

Dans le cas de la rhinite pollinique, l'éviction des allergènes de nature pollinique étant impossible, la désensibilisation est considérée comme le seul traitement spécifique de l'allergie. Les recommandations internationales proposent de recourir à la désensibilisation spécifique dans la pollinose lorsque celle-ci est sévère et/ou prolongée, qu'elle est mal contrôlée par le traitement pharmacologique adéquat ou que ce traitement entraîne des réactions secondaires importantes (**Demoly, 2005**).

Chapitre II

Matériel et méthodes

1. Description de la zone d'étude (Oued Zenati)

La daïra d'Oued Zenati appartient à la wilaya de Guelma, elle est distante de 40 km du chef-lieu de la wilaya "Guelma". Elle se trouve sur la route nationale (RN) 20, à 70 km à l'Est de Constantine. Sa superficie de 484 km² en 1985 et actuellement de 143,77 km² (A.P.C d'Oued Zenati, 2011).

La ville est limitée : au Nord par les communes de Bordj Sabbat et de Ras El-Agba, à l'Est par les communes de Sellaoua Announa et de Ain Makhoulouf, à l'Ouest par la commune de Ain Regada, et au Sud par la commune de Tamlouka (Fig.14). Elle présente une altitude moyenne de 640 m, qui se caractérise par une morphologie de collines et de piedmonts représentant près de 72 % de la surface communale, les plaines et les plateaux, n'occupent que 20 %, et le reste soit 3 % de la surface totale de la commune est montagneux (A.P.C d'Oued Zenati, 2011).

Du point de vue géologique, la ville est caractérisée par des ensembles assez homogènes où l'érosion est plus active sur l'ensemble argileux-marneux au Nord et moins active sur les croûtes calcaires dans la région Sud (A.P.C d'Oued Zenati, 2011).

L'extension de la mono-culture céréalière est due notamment aux conditions favorables que présente le milieu physique homogène dans son ensemble.

La commune d'Oued-Zenati est connue comme étant un grand domaine où la céréaliculture est prédominante. L'agriculture occupe une part très importante soit 88 % des terres. Les meilleures terres sont cependant situées sur le long de la Vallée de l'Oued-Zenati et principalement vers le Sud de la commune sur les plaines d'Ain Trab (A.P.C d'Oued-Zenati, 2011).



Figure 14 : Situation géographique de la ville d’Oued Zenati
(Source : URBACO, 2015)

2. Climatologie

2.1. La température

La température représente un facteur essentiel agissant sur la vitesse de croissance de la végétation en première partie de saison et déterminant le moment de la floraison. L’évolution la plus régulièrement étudiée concerne la date de début de pollinisation (**Besancenot, 2009**).

Sur une période s’étalant de 1994 à 2014, nous constatons qu’à l’échelle mensuelle, le mois le plus froid à Guelma est le mois de janvier avec une température de 8,99 °C et le mois le plus chaud est le mois de juillet avec une température de 29,37 °C (**Fig.15a**) (station de

Guelma). Quant à l'échelle annuelle, les variations thermiques fluctuent entre 16,40 à 21,49 °C (Fig.15b)

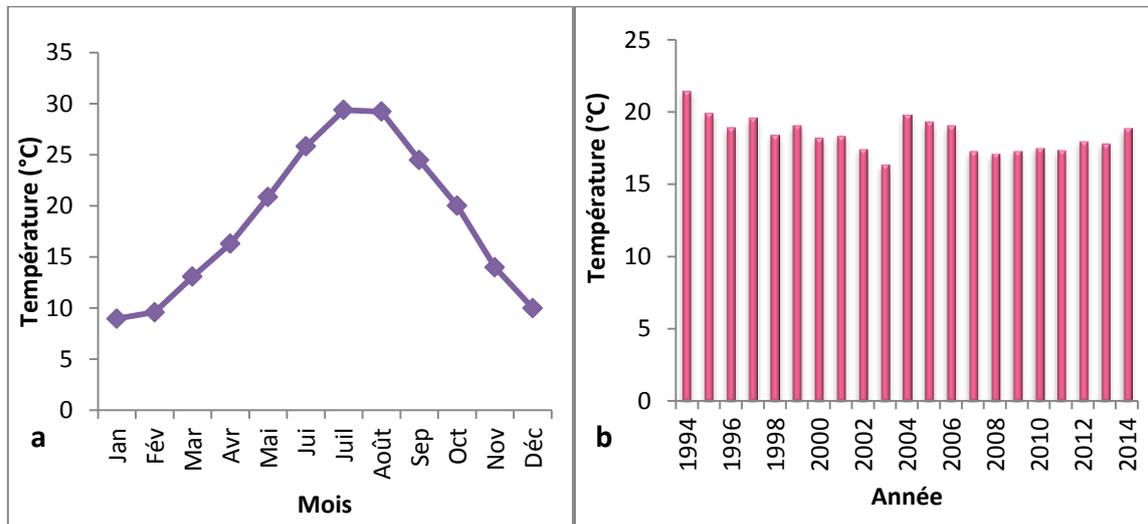


Figure 15 : Variation de la température : Guelma (1994-2014)

a : moyenne mensuelle, b : interannuelle

2.2. Les précipitations

La précipitation fait partie des facteurs météorologiques qui commandent la production, la libération ou la dispersion des pollens. Une bonne croissance des bourgeons floraux implique que soient satisfaits les besoins en eau des plantes, ce qui suppose des précipitations relativement abondantes (Laaidi *et al.*, 1997).

D'après les données de la station météorologique de Guelma concernant la période 1994-2014, le mois le plus pluvieux est le mois de décembre avec un taux de précipitation de 83,6 mm. Alors que juillet représente le mois le plus sec des précipitations atteignant les 4,20 mm (Fig. 16).

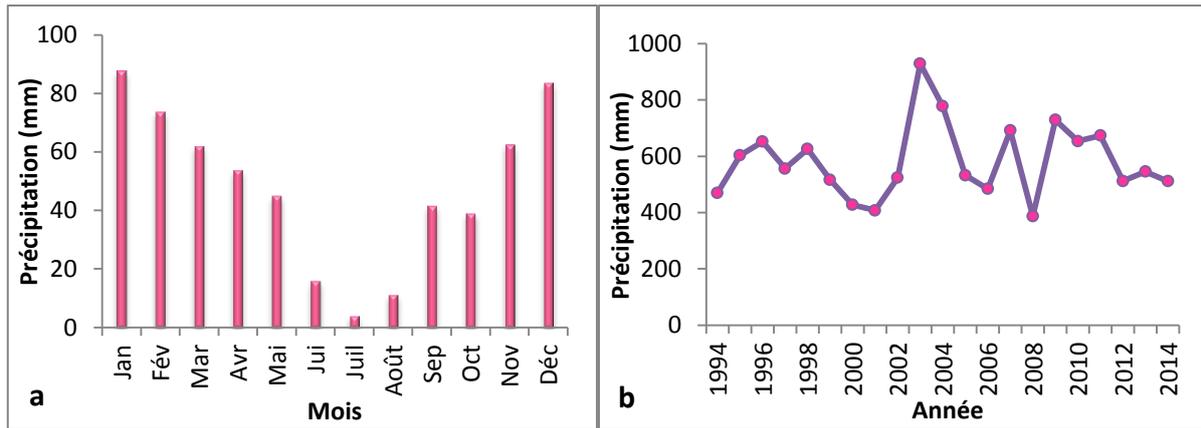


Figure 16 : Variation des précipitations : Guelma (1994-2014)

a : moyenne mensuelle, b : interannuelle

La figure ci-dessus, illustre les variations inter annuelles des précipitations montrant ainsi que, sur la période 1994-2014, l'année 2003 est la plus pluvieuse avec un maximum de 928,8 mm/an (station de Guelma). En revanche, l'année la plus sèche est l'année 2008 des précipitations ne dépassant pas les 380,6 mm/an (station de Guelma).

2.3. L'humidité

L'humidité est facteur climatique dont son excès freine l'ouverture des étamines, alors qu'un air sec favorise leur éclatement. De point de vue mensuel, l'humidité atteint un maximum de 76,72% le mois de janvier et un minimum de 55,57% le mois de juillet (**Fig. 17**). On remarque également, que suite à des comparaisons interannuelles, l'année 2000 a été caractérisée par un pourcentage de 65,46% d'humidité, alors que cette dernière a été de 72,6% en 2007 (**Fig.17**).

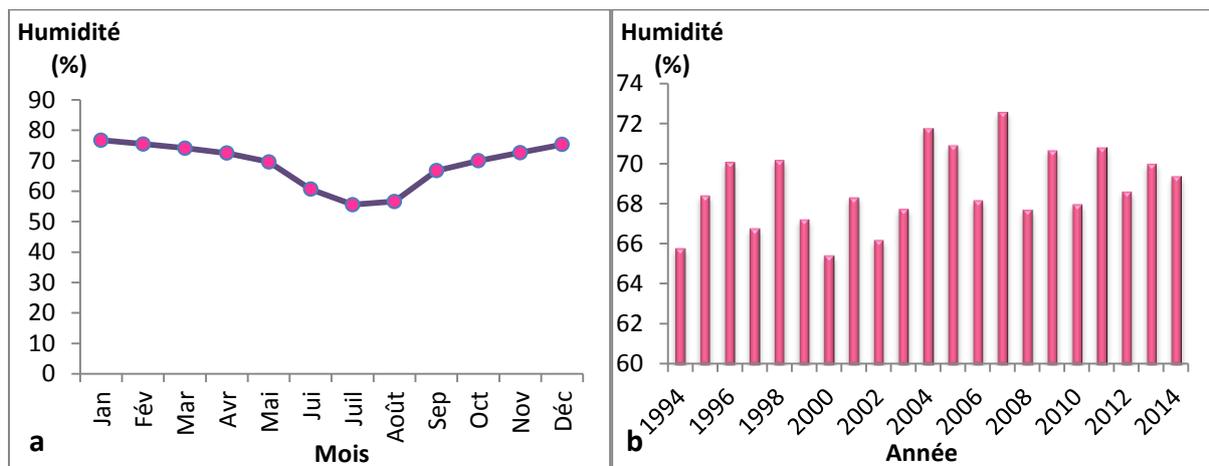


Figure 17 : Variation de l'humidité : Guelma (1994-2014)

a : moyenne mensuelle, b : interannuelle

2.4. Le vent

Il joue un rôle essentiel au devenir des grains après qu'ils aient été libérés. L'air présente toujours une certaine agitation, même si elle est trop faible pour être détectée par les anémomètres usuels. En particulier, il suffit de courants ascendants extrêmement ténus pour maintenir en suspension ces particules très légères. La vitesse moyenne du vent, enregistrée à Guelma, fluctue dans un intervalle de 1,4 à 1,91 m/s. Cependant, la valeur maximale a été prise en note en 2010 avec 2,03m/s (**Fig.18**).

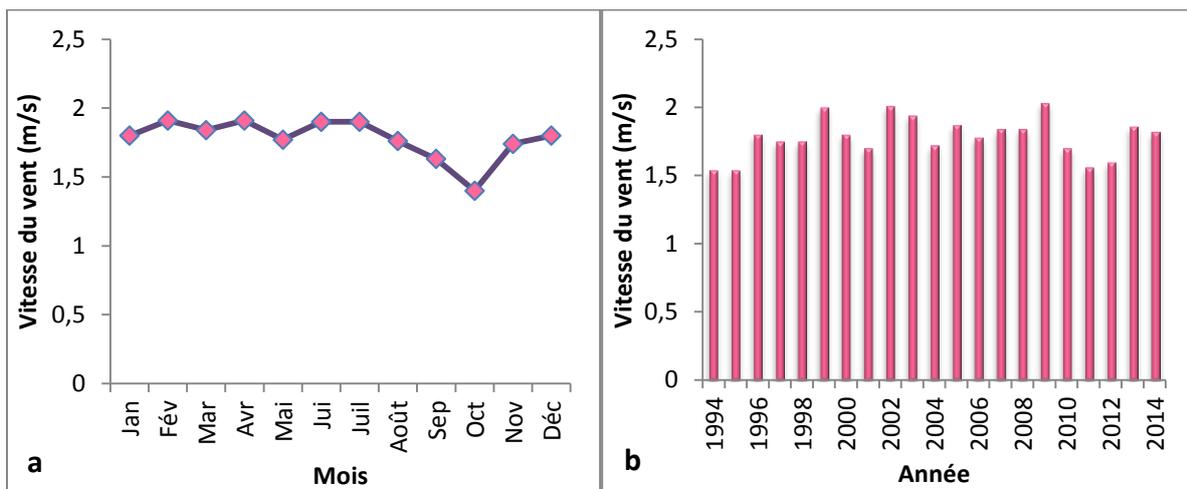


Figure 18 : Variation de la vitesse du vent: Guelma (1994-2014)

a : moyenne mensuelle, b : interannuelle

3. Synthèse climatique

3.1. Diagramme de Bagnlous et Gaussen

Le diagramme ombrothermique de Bagnlous et Gaussen est un moyen graphique, par lequel, la période sèche et humide est déterminée. Il se caractérise par ses deux axes d'ordonnées dont l'un porte les valeurs de précipitations (P) et l'autre les valeurs des températures (T), avec $P=2T$ (**Fig. 19**).

Selon le diagramme ci-dessous, on peut dire que Guelma a une période froide et humide s'étalant sur sept mois (mi-octobre à avril) et une autre chaude et sèche qui s'étale sur cinq mois, (mai à septembre).

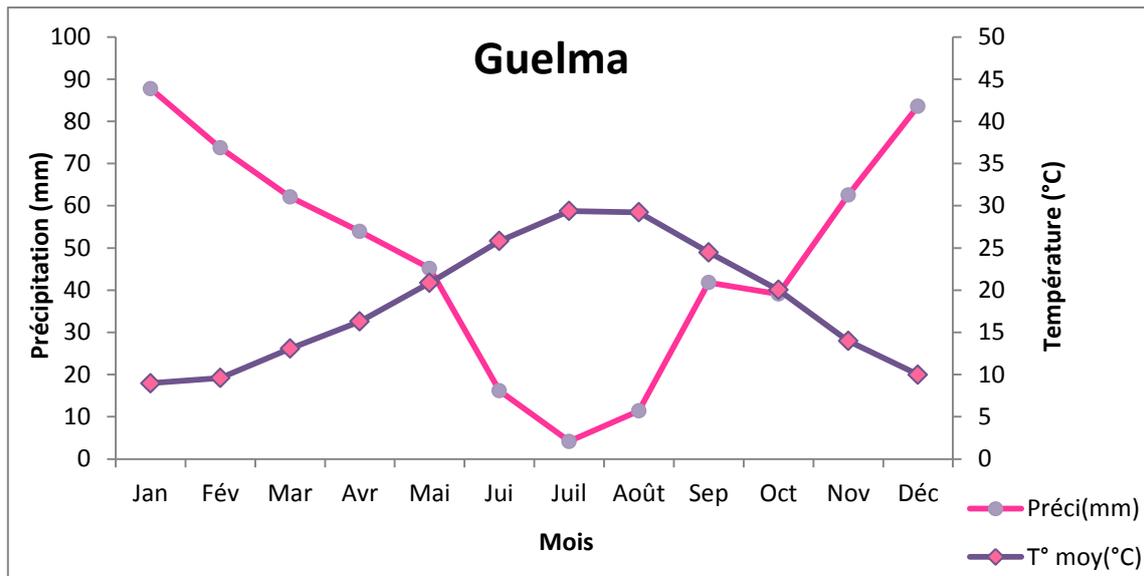


Figure 19 : Diagramme Ombrothermique : Guelma (1994-2014)

3.2. Climagramme d'Emberger

Le quotient pluviothermique " Q_2 " d'Emberger permet de diviser le climat méditerranéen en cinq étages bioclimatiques. Le calcul de cet indice se fait selon la formule suivant (Emberger, 1955) :

$$Q_2 = P.1000 / \frac{(M + m).(M - m)}{2}$$

M : Température maximale du mois le plus chaud (°K).

m : Température minimale du mois le plus froid (°K).

P : Précipitation moyenne annuelle.

La région de Guelma présente un $Q_2 = 64,99$ ce qui correspond à l'étage bioclimatique semi-aride (Fig. 20).

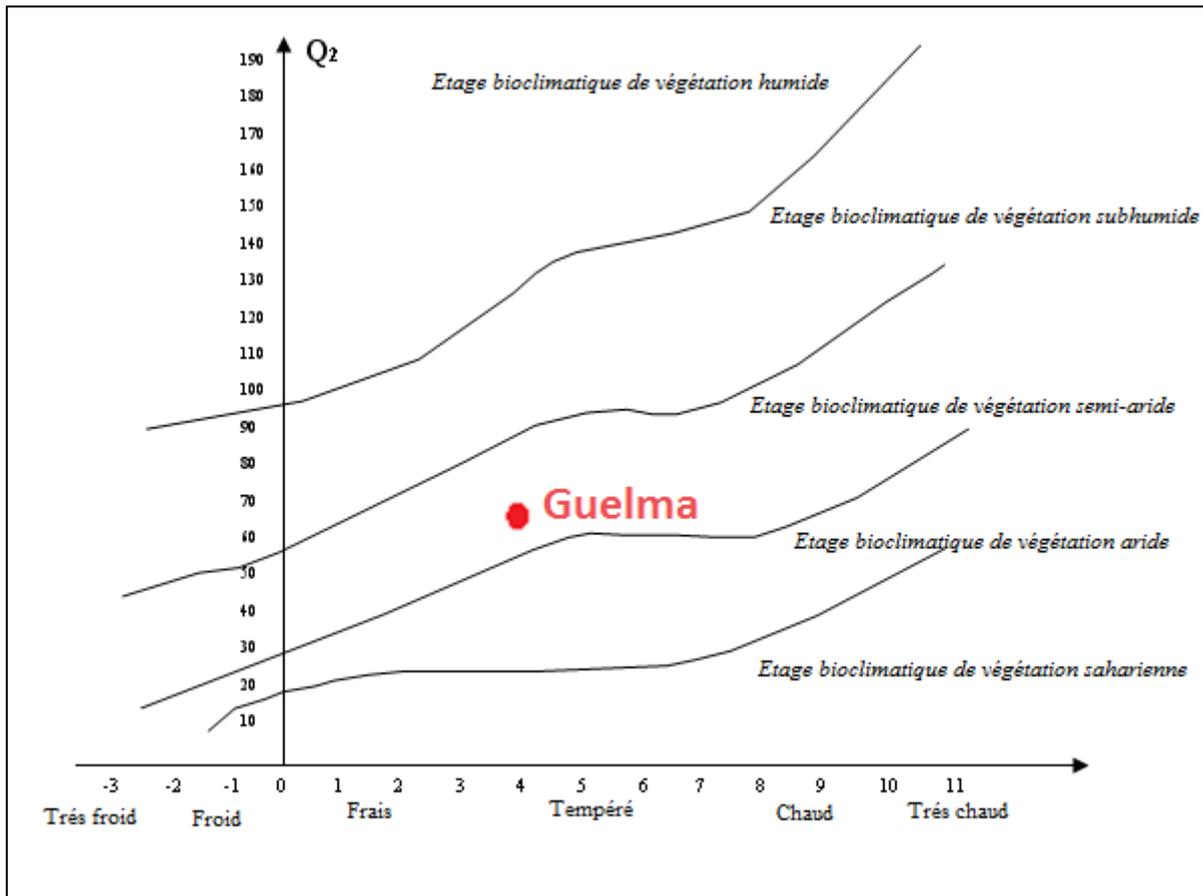


Figure 20 : Climagramme d'Emberger (Station : Guelma).

4. Le compte pollinique

Afin d'analyser le contenu pollinique de l'atmosphère d'Oued Zenati, des échantillonnages mensuels ont été effectués, en optant pour la méthode gravimétrique. Trois points (**Tab.4**) de déposition de lames ont été choisis en prenant en considération l'accessibilité et l'environnement (**Fig.21**). L'étude consiste à déposer des lames couvertes d'une matière collante, entre autre la gélatine glycinée, pour pouvoir piéger le pollen atmosphérique. Les lames sont exposées à l'air, pendant 24h, au niveau des trois sites choisis, ensuite, transportées dans des boîtes de Pétri, afin d'être examinées au laboratoire sous microscope pour une éventuelle identification et un compte pollinique.

L'examen microscopique nous a permis de cibler une espèce végétale, avec une certaine abondance, appartenant à une famille avec un potentiel allergisant élevé. Cette espèce a fait l'objet de notre étude immunologique.

Tableau 4 : Les coordonnées des trois points d'échantillonnage

	X	Y	Z
Protection civile	36°19'05,16'' N	7°10'13,29'' E	635 m
Mosquée khelifa khatla	36°18'46,26'' N	7°10'01,74'' E	633 m
Lycée Hachach Laid	36°18'08,40'' N	7°09'32,81'' E	652 m



Figure 21 : Vue aérienne des trois points d'échantillonnage (Google Earth, 2015)
 Site 1 (Protection civile), Site 2 (Mosquée khelifa khatla), Site 3 (Lycée Hachach Laid)

5. Etude immunologique

5.1. Modèle biologique animal

La souris présente certaines caractéristiques similaires à celles de l'homme, telles que la production des anticorps IgE, une inflammation éosinophilique et une hyperréactivité bronchique (Torres *et al.*, 2005).

Notre travail a été réalisé sur des souris femelles blanches « *Mus musculus* », fournies par l'institut de pharmacie (Constantine). Elles sont âgées de huit semaines avec un poids corporel compris entre 25 et 40 grammes. Les manipulations pratiquées sont effectuées en respectant leur bien-être, excluant tout état de stress susceptible d'interférer avec les résultats.

Les souris sont élevées dans des cages en polypropylène assez transparentes pour permettre la surveillance sans déranger l'animal et nettoyées régulièrement pour éviter toute contamination. L'élevage s'est fait dans des conditions caractérisées par une température et

une photopériode naturelles ainsi qu'un besoin alimentaire journalier composé d'aliment riche en graines (blé, maïs, ...), du pain rassis et d'eau.

5.2. Modèle biologique végétal

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à l'étude du potentiel allergisant du *Cupressus sempervirens*.

5.2.1. Présentation de l'espèce

Le Cyprès commun ou Cyprès vert (*Cupressus sempervirens*) est originaire du bassin méditerranéen oriental, de la Perse et de la Syrie (Ariano, 2008). Il appartient à la famille des Cupressaceae et est encore appelé cyprès d'Italie, cyprès toujours vert ou cyprès de Provence. C'est un arbre monoïque atteignant 30 m à feuilles persistantes en écailles avec une longévité supérieure à 500 ans et une croissance lente de dix mètres tous les 20 ans. Il supporte la sécheresse, mais résiste mal aux températures inférieures à moins 10 °C, on le trouve sous deux formes : en pinceau : var. *pyramidalis* ou évasé : var. *horizontalis* (Fig.22), planté dans toute la région méditerranéenne, utilisé comme «brise vent» et en décoration (Gouranton-Lagier *et al.*, 2009).



Figure 22 : *Cupressus sempervirens* planté à Oued Zenati (Prise personnelle)

La pollinisation du cyprès est classiquement hivernale (entre janvier et avril). Elle varie d'une saison à l'autre en fonction des conditions météorologiques avec des pics polliniques parfois précoces entre octobre et novembre (Charpin *et al.*, 2005 ; Calleja et Ferrera, 2003).

Le grain de pollen du *Cupressus sempervirens* est anémophile de forme sphéroïdale ou allongée (Fig. 23). Le contour peut être circulaire ou ovale. Les dimensions sont petites ou moyennes, 25–30 micromètres (Ariano, 2008). Certaines études ont montré que l'activité allergénique du pollen de Cyprès se prolonge pendant de longues périodes, même des années,

après élimination de la plante et qu'un pollen de Cyprès « vieux » de six ans, même en perdant ses caractéristiques de vitalité et de capacité germinative, maintenait, presque inaltérée dans le temps, sa puissance allergisante, par rapport à un extrait « frais » (Ariano *et al.*, 2006). Le potentiel allergisant de cette espèce est considéré comme étant égal à 5 (Plus fort sur une échelle de 0-5) (Gouranton-Lagier *et al.*, 2009).



Figure 23 : Pollen de *Cupressus sempervirens* (Prise personnelle)

5.2.2. Les allergènes de l'espèce

Cupressus sempervirens (Cup s) a fait l'objet de plusieurs études, non seulement pour la standardisation de son extrait mais aussi pour mettre en évidence les différents allergènes responsables de ses pollinoses. Jusqu'à présent, deux allergènes (Cup s) ont été bien caractérisés : le Cup s 1 (Fig. 24 a), reconnu comme l'allergène majeur du cyprès, est une protéine de 45 kDa appartenant à la famille des pectate-lyases et le Cup s 3 (Fig. 24 b), une protéine de 34 kDa appartenant à la famille des protéines thaumatine-like (TLP) et au groupe des PR-5 (Pathogenesis-Related protein-5) (Shahali *et al.*, 2010).

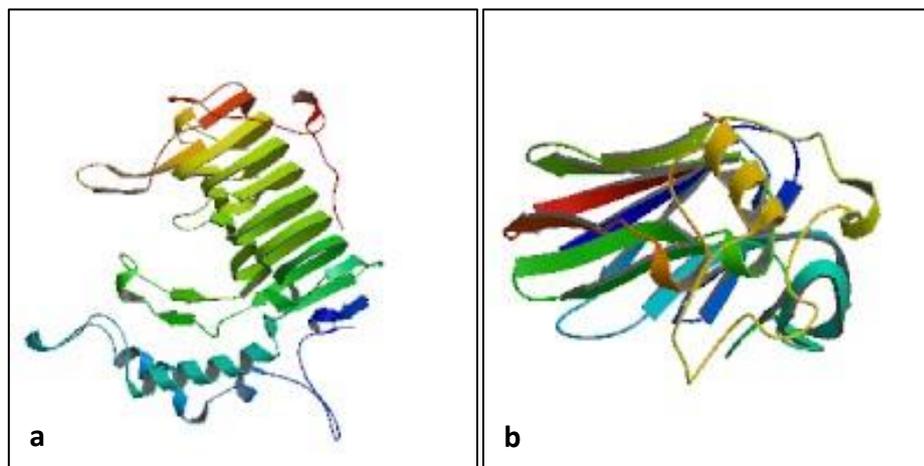


Figure 24 : Modèle en 3d des allergènes du Cup s (Source : Modbase, 2004)

a : Cup s 1 ; b : Cup s 3

5.3. Préparation de l'extrait brut pollinique du Cyprès (EBC)

Les grains de pollen ont été collectés directement à partir des cônes mâles matures du Cyprès commun planté à Oued Zenati. Au cours de la saison de pollinisation, le pollen est obtenu suite à l'ouverture de ces cônes, d'où on a pu récolter ce qu'on appelle une poudre pollinique (**Fig. 25**).



Figure 25 : La poudre pollinique du Cyprès commun (Prise personnelle)

La poudre pollinique est incubée avec du tampon phosphate salin (PBS) (0,01 M, pH 7,2) à 4 °C pendant 14 heures. Le surnageant est recueilli par centrifugation à 14000g pendant 1h à 4°C (**Shahali et al., 2007**), ensuite dialysé contre l'eau distillée puis filtré à l'aide de Millipores "0,45µm". La solution filtrée est congelée et lyophilisée (**Singh et al., 1992**) pour enfin obtenir l'extrait brut du Cyprès commun (l'EBC).

5.4. Précipitation sur sulfate d'ammonium

Le but de la précipitation était de fractionner une partie de l'EBC selon le poids moléculaire. L'extrait brute a été re-suspendu dans le PBS, et les différentes fractions protéiques ont été obtenues par précipitation sur sulfate d'ammonium comme suit : l'extrait a été incubé, pendant 24h, avec le sulfate d'ammonium (concentration de 20%) ensuite centrifugé à 10000g pendant 15 minutes afin de précipiter les protéines. Les concentrations du sulfate d'ammonium ont été augmentées par étape selon un gradient de 40%, 60% et 80% (**Leblanc, 2004**) (**Tab.5**), et les protéines précipitées ont été récupérées à chaque étape par

incubation et centrifugation pour avoir à la fin quatre fractions (Fr1-Fr4), dissoutes par la suite dans du PBS, dialysées, filtrées par des Millipores "0,45µm" et conservées.

Tableau 5 : Saturation du sulfate d'ammonium à 0°C (Leblanc, 2004).

% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C																	
20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																	
106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697	0
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	5
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627	10
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	15
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	20
	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	25
		0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	30
			0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	35
				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	40
					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	45
						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	50
							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	55
								0	31	62	95	129	164	201	239	279	60
									0	31	63	97	132	168	205	244	65
										0	32	65	99	134	171	209	70
											0	32	66	101	137	174	75
												0	33	67	103	139	80
													0	34	68	105	85
														0	34	70	90
															0	35	95
																0	100

5.5. La sensibilisation nasale

36 souris femelles ont été réparties aléatoirement en 6 lots, en raison de 6 souris par lot. La sensibilisation consiste à administrer, par voie nasale (**Fig. 26**), 100µg de l'extrait brut (EBC) ou une fraction spécifique (Fr1-Fr4) dans un volume total de 10µl de la solution de PBS à raison de 5µl dans chaque narine au jour 0 et le jour 7. Le traitement a été répété avec une double dose le jour 15 et 16 soit 200µg dans un volume total de 20µl de la solution de PBS à raison de 10µl par narine avec un intervalle de 4 minutes. Le même traitement a été opté pour le lot des souris témoins en utilisant le PBS seulement (**Fig. 27**) (**Fischer, 2005**).



Figure 26 : Instillation nasale (prise personnelle)

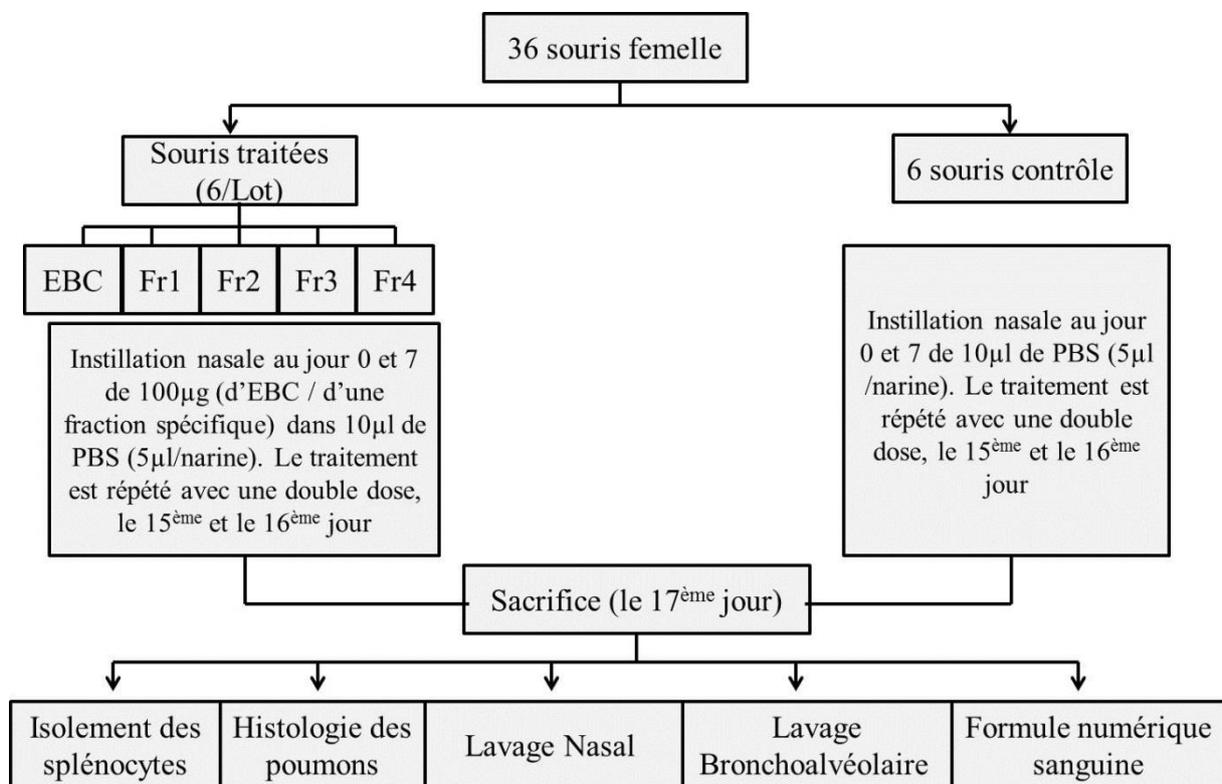


Figure 27 : Protocole expérimental

5.6. Les tests effectués

➤ La formule leucocytaire sanguine

Suite à une légère décapitation partielle, le sang a été collecté dans des tubes à EDTA (Éthylène Diamine Tétra-Acétique) pour une énumération automatique des différentes populations des globules blancs et des plaquettes avec COULTER.

➤ Le lavage nasal

Au 17^{ème} jour du traitement, les souris ont subi des instillations nasales de 1,5 ml de PBS à 37°C dans chaque narine à l'aide d'une seringue (**Urbain et al., 1994**). Le liquide récolté dans les deux cavités nasales a été centrifugé (800 g à 4°C pendant 15 minutes). Chaque culot a été suspendu dans 0,9 ml de PBS ensuite, les cellules ont été colorées avec 0,1 ml de bleu de trypan (0,2 %). Les résultats ont été exprimés en leucocytes par microlitre de liquide récolté.

➤ Le lavage bronchoalvéolaire

24h après le dernier traitement et le sacrifice des souris, un cathéter a été introduit dans le tube trachéal pour réaliser un double lavage avec 0,5ml de PBS à 4°C afin de récolter le liquide bronchoalvéolaire. Après une centrifugation à 1500 rpm pendant 6min, le surnageant a été éliminé et le culot obtenu a été suspendu dans 0,5ml de PBS (**Li et al., 2010**). Les cellules ont été colorées avec 0,1 ml de bleu de trypan (0,2 %), et comptées au microscope (Leica, USA) avec le grossissement 10X. Les résultats ont été exprimés en cellules par microlitre de liquide récolté.

➤ Isolement des splénocytes

Après avoir pesé la rate, cette dernière a été déposée dans une boîte de pétri contenant 3ml de solution de PBS et débarrassée de la graisse. A l'aide de deux pinces, la capsule a été vidée de son contenu cellulaire. La suspension cellulaire a été ensuite filtrée et centrifugée pendant 10 min à 1500 rpm. Le culot doit être suspendu dans 0,5ml de PBS et 4,5ml de solution de lyse des globules rouges (**Daum et al., 1995**). Après une incubation de 10 min, la suspension a été centrifugée 10 min à 1500 rpm, le culot est ainsi remis en suspension dans 3ml de PBS, centrifugé 10 min à 1500 rpm. Cette dernière étape est répétée deux fois. A la fin du dernier lavage, le culot cellulaire a été repris dans 3ml de PBS. Le comptage des splénocytes s'effectue après avoir dilué 100µl de la suspension dans 900µl de bleu de trypan.

➤ L'étude histologique des poumons

Après la dissection des animaux, les poumons ont été prélevés, conservés dans du formol (1%) et orientés vers le laboratoire d'anatomie-pathologique de l'hôpital « Ibn Zohr de Guelma » pour l'étude histologique.

L'organe a été déposé dans une cassette en plastique et déshydraté par des passages dans l'alcool. L'élimination de cette dernière se fait par des solvants dont l'xylène. Le poumon

est ensuite imprégné dans de la paraffine liquide et est refroidi. Ces étapes sont automatisées dans un appareil à inclusion. L'étape finale de l'inclusion est manuelle et consiste à réorienter convenablement le fragment tissulaire dans le sens de la coupe dans un moule de paraffine afin d'obtenir « le bloc en paraffine ».

Le bloc de paraffine contenant le tissu est coupé grâce à un microtome, permettant d'obtenir des coupes de 3 à 5 microns d'épaisseur. Ces coupes sont étalées sur des lames correspondant au support sur lequel sont réalisées toutes les colorations.

En ce qui concerne la coloration, elle associe un colorant basique nucléaire (hématoéine, hématoxyline) et un colorant acide cytoplasmique (éosine érythroéine. ou phloxine), on y ajoute souvent du safran qui se fixe sur le collagène. La coupe colorée est protégée par une lamelle et est analysée au microscope (Leica, USA) à un grossissement 25X.

6. Identification et purification de l'allergène

6.1. La spectrométrie de masse couplée à la Chromatographie liquide (MS-LC)

6.1.1. La digestion complète à la trypsine

Le traitement des échantillons par cette technique permet de générer des peptides de digestions pour les analyser ensuite par spectrométrie de masse en vue de l'identification des protéines présentes dans les échantillons. Cette méthode est à appliquer lorsqu'on souhaite obtenir un digestat peptidique à partir d'un échantillon protéique disponible en solution. Le principe consiste en :

- La préparation de l'échantillon pour la digestion : réduction- alkylation- réduction ;
- L'ajout de la protéase pour réaliser la digestion peptidique ;
- L'arrêt de la réaction et le conditionnement pour l'analyse MS.

➤ Préparation des échantillons

Afin de réduire les ponts disulfures et libérer des groupements thiols, un aliquot de 75µl de chaque fraction, obtenue à partir de l'extrait brut du Cyprès, a été incubé avec le dithioéitol (DTT) à 56°C pendant 40 min avec agitation à 600 rpm. Après la réduction, une alkylation est indispensable pour empêcher la réformation des ponts disulfures. Pour ce fait, et après les avoir placés dans une température ambiante, les échantillons ont été incubés avec l'iodoacétamide (IAA) pendant 30 min à l'abri de la lumière. Ensuite, une seconde réduction

a été réalisée pour éliminer l'excès de l'IAA en ajoutant, aux différentes fractions, le DTT et laissant agir pendant 10 min à une température ambiante.

➤ Le 2D-clean up (Kit)

Le 2D clean up kit est destiné à éliminer les sels et toutes les autres molécules pouvant interférer avec les analyses subséquentes, par exemple : les phospholipides, les polysaccharides et les lipides. Il se base sur le principe de précipitation des protéines en présence d'acide trichloracétique et solvants organiques. Le culot de protéines précipitées est ensuite lavé par des bains successifs d'un mélange d'acétone et d'H₂O additionné d'un mix de surfactants.

Le 2D-clean-up kit est constitué de précipitant, co-précipitant et un « Wash Additive ». Cette technique nécessite aussi l'usage d'un « Wash Buffer » qui doit être conservé à - 20°C. La précipitation des protéines a été réalisée selon le protocole suivant :

- Transférer les échantillons dans un micro-tube de 1,7 ml ;
- Ajouter 300 µl de précipitant, vortexer 3s et laisser sur la glace 15 min ;
- Ajouter 300 µl de co-précipitant, vortexer 3s. Centrifuger à 12000g pendant 5 min à 4°C ;
- Enlever le plus possible de surnageant sans déplacer le précipité ;
- Centrifuger à vitesse max pendant 1min à 4°C. Enlever le surnageant à l'aide d'une pipette ;
- Ajouter 40 µl de co-précipitant. Vortexer 3s. Laisser agir 5min sur glace. Centrifuger à vitesse max pendant 5min à 4°C ;
- Enlever le plus possible de surnageant sans déranger le précipité,
- Ajouter 25 µl d'eau MilliQ. Vortexer 5-10s à 4°C ;
- Ajouter 1 ml de « Wash Buffer » (conservé au préalable à -20°C) et 5 µl de « Wash Additive ». Vortexer pour disperser le précipité ;
- Incuber les tube à -20°C 1h minimum. Vortexer 20s toutes les 10 min ;
- Centrifuger 5 min à vitesse maximale, à 4°C ;
- Enlever le surnageant puis laisser sécher à l'air au moins 5 min ;
- Le culot sera conservé à -20°C ou directement traité.

➤ La digestion trypsique

Les culots obtenus sont re-suspendus dans la Bicarbonate d'Ammonium (NH_4HCO_3) pour une digestion trypsique complète. Le pH de la solution doit être entre 7,5 et 8,5 afin d'être optimum pour la trypsine (Trypsin Protéase), s'il n'est pas adéquat, il faut ajuster en ajoutant 1/10 de volume en NH_4HCO_3 avant de procéder à la digestion. Les volumes de trypsine ajoutés ne doivent pas dépasser 1/10 de volume de l'échantillon.

La digestion trypsique se réalise toujours sur une glace pour éviter l'autolyse de la trypsine, et elle se fait en deux étapes. La première étape nécessite une incubation pendant une nuit (OVN : over night) à 37°C sous agitation (600 rpm), alors que la deuxième étape se fait seulement pendant 3h supplémentaire à 37°C sous agitation (600 rpm) en ajoutant, à chacun des échantillons, de l'Acétonitrile (ACN)

Cependant, l'arrêt de la digestion se fait avec l'acide trifluoroacétique (TFA) (le volume ajouté doit être compris entre 1µl et 1/10 du volume de l'échantillon) car un pH acide inhibe l'activité enzymatique (vérifier le pH à ce qu'il soit < 3). Les échantillons ont été, ensuite, évaporés à sec dans le Speed Vacuum (ils peuvent être stockés à 4°C pendant maximum 1 semaine et si la période de stockage est plus importante, les transférer à -20°C).

➤ Purification avec Zip-Tip C18

Cette méthode est appliquée pour purifier un mélange peptidique ou protéique. Le principe consiste à la fixation des protéines ou de peptides par interactions hydrophobes sur la phase solide des Zip-Tip. Des lavages sont ensuite réalisés à l'aide d'une solution aqueuse 0,1% TFA, afin d'éliminer les impuretés (des sels principalement). Les protéines ou les peptides sont ensuite élués par un mélange d' H_2O / acétonitrile en proportion variable. La réalisation de cette purification se fait selon le protocole suivant :

- Avant de commencer la manipulation il faut préparer:
 - Solution 1 : Acétonitrile pure, soit ACN 100%.
 - Solution 2 : Eluant, soit ACN 50% avec TFA (0,1%) 50%,
 - Solution 3 : Eau acidifiée (H_2O mQ avec TFA 0,1%).
- Régler la micropipette sur 20 µl (tous les prélèvements et les éjections seront réalisés avec ce volume). Ne jamais laisser la phase solide de Zip- Tip à sec ; à chaque étape et entre celles-ci ; s'arrêter au 1^{er} cran de la micropipette.

- Laver le Zip-Tip avec la solution 1 : prélever et rejeter la solution dans un tube ou micro-tubes «waste» 3 fois.
- Activer les Zip-Tip (ils contiennent de la résine) en prélevant la solution 2, la rejeter dans le tube « waste », 3 fois.
- Equilibrer : prélever la solution 3 en rejetant le liquide toujours dans le tube « waste » avec des lavages répétés pour éliminer l'ACN.
- Prélever l'échantillon en pipetant plusieurs fois afin de charger le matériel (protéine ou peptide) sur le Zip-Tip.
- Faire un lavage avec la solution 3 (prélever et rejeter dans le tube « waste » plusieurs fois).
- Enfin, prélever un volume de 10µl de l'éluant et le mettre dans nouveau micro-tube, faisant ainsi un pipetage permettant de libérer les protéines/peptides piégés. Laisser évaporer l'échantillon complètement au Speed Vacuum. Ensuite, stocker l'échantillon au frigo ou procéder à l'analyse subséquente (stockage à 4°C pendant une semaine, si la durée est plus longue, le transférer à -20°C).

6.1.2. Reconstitution des échantillons

Finalement, les échantillons ont été reconstitués dans un volume total de 20 µl. Pour chaque fraction, les protéines digérées sont re-suspendues dans le Formate d'Ammonium (pH 10). Un échantillon standard interne « MPDSMIX » (composé de 4 protéines digérées dont l'alcool déshydrogénase de levure (ADH), le glycogène phosphorylase b de lapin (GPB), l'énolase 1 de levure (ENO) et l'albumine de sérum bovin (BSA)) est ajouté à chaque fraction dans une quantité de 150 fmoles d'alcool déshydrogénase (ADH). Un volume de 9µl par fraction a été injecté sur le système de nanoAcquity UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) - Orbitrap MS (Q Exactive).

La méthode de LC fut un temps total de 180 minutes de run. Les colonnes étaient d'une symétrie de C18 et une colonne analytique BEH C18. Les peptides ont été élus à partir de la colonne à un pH élevé avec l'augmentation de pourcentage d'acétonitrile et après dilution ont été chargés sur la colonne de pH bas. Sur une colonne de pH faible, chaque étape consiste à un gradient de 5 minutes à partir de 99% de A (A : eau de l'acide formique à 0,1%, B : acétonitrile) à 93% de A, suivi par un gradient de 135 minutes à partir de 93% de A à 65 % du même tampon. La méthode de spectrométrie de masse est une méthode Top N-MSMS où N a été fixé à 12, ce qui signifie que le spectromètre acquiert un spectre complet MS, sélectionne

les 12 pics les plus intenses dans ce spectre et fait un spectre complet MS2 de chacun de ces 12 composés. Les recherches sur base de données ont été effectuées par le logiciel Proteome Discoverer 1.4 et le moteur de recherche Sequest HT sur les bases de données fournies FASTA.

6.2. La chromatographie échangeuse d'ion

Afin d'exploiter l'effet *in vitro* de l'allergène majeur Cup s1, un pool a été préparé en mélangeant les quatre fractions Fr1-Fr4 ensemble, afin de réaliser un nouveau fractionnement basé sur le point isoélectrique. Cela a été effectué grâce au système de chromatographie « ÄKTAexplorer™ » conçu pour le développement rapide et l'optimisation de toute la purification biomoléculaire, et une colonne « Mini Q™ 4.6/50 PE » pré-emballée pour la chromatographie échangeuse d'ions à haute performance des protéines et d'autres biomolécules.

Le pool des fractions a été dialysé pendant la nuit à 4°C dans un tampon A (Tris 25 mM, pH 8,2), filtré par des filtres Millipore "0,22µm" et enfin injecté en présence du tampon B (Tris 25 mM pH 8,2 ; NaCl 1M pH 4,0). Les différentes fractions ont été collectées sur le collecteur de fractions.

➤ Le dessalage

Pour éviter l'effet toxique du Tris sur la culture cellulaire, nous avons utilisé des « Amicon » pour remplacer ce tampon par un PBS stérile. Un amicon est un filtre à base de cellulose régénérée placée dans un micro-tube (**Fig.28**), qui permet de dessaler et/ou concentrer l'échantillon et/ou d'échanger le tampon. L'échantillon est placé sur le filtre. Celui-ci retiendra les molécules de masse moléculaire supérieure au cut-off de la membrane +/- 10% tandis que les petites molécules passeront au travers. Cette étape est réalisée en centrifugeant le dispositif.

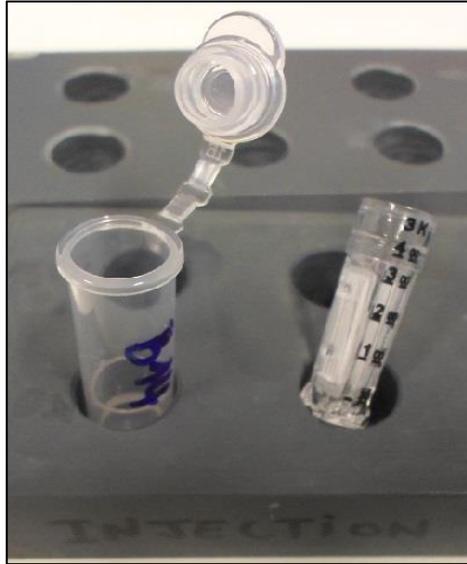


Figure 28 : Filtre d'amicon et micro-tube (Prise personnelle)

Le dessalage se fait pendant une heure selon le protocole suivant :

- Hydrater le filtre avec 500 μ l d'eau MilliQ et le placer ensuite dans le micro-tube pour une centrifugation d'environ 15 à 20 min à 15000g à 20°C.
- Se débarrasser du contenu du filtre et du micro-tube et charger ainsi l'échantillon (le volume de l'échantillon ne doit pas dépasser 500 μ l). Après une centrifugation de 10 à 20 min à 15000g à 20°C, le contenu du micro-tube est enlevé sans secouer le filtre
- Un double lavage, avec 500 μ l de PBS stérile lors du premier et 450 μ l lors du deuxième lavage, est effectué avec une centrifugation de 10 à 20 min à 15000g à 20°C.
- Après le dernier lavage, le filtre est retourné dans un nouveau micro-tube (ouverture vers le fond du micro-tube) et centrifuger 1min à 1000g à 20°C pour récupérer l'échantillon. Un lavage de la membrane peut être réalisé avec le même tampon en centrifugeant pendant 1min à 1000g à 20°C et récupérer ainsi la solution de lavage dans le micro-tube contenant l'échantillon.
- L'échantillon est stocké au frigo ou procéder à l'analyse subséquente (stockage à 4°C pendant une semaine, si la durée est plus longue, le transférer à -20°C).

6.3. Dosage colorimétrique des protéines

Après avoir fractionné le pool en ciblant l'allergène majeur, un dosage de ce dernier a été établi en optant pour la méthode de Bradford comme méthode de dosage de concentration

protéique, utilisant ainsi l'albumine de sérum bovin (BSA pour : bovine serum albumin) comme une référence.

En effet, il s'agit d'un dosage colorimétrique au bleu de Commassie, dont l'absorbance change selon la couleur de l'échantillon, cela permettra de déterminer les différentes concentrations en comparant avec une gamme d'étalon.

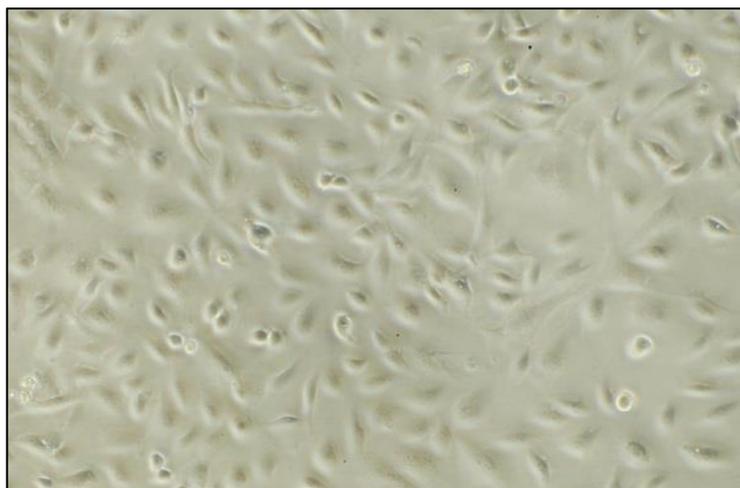
La gamme d'étalon a été réalisée en faisant une série de tubes contenant un volume identique mais des quantités croissantes et connues de la protéine de référence (BSA). Les valeurs obtenues à partir des tubes de cette gamme ont permis de tracer une droite d'étalonnage dont : **l'absorbance = f (Quantité)**.

En parallèle, une série de tubes, contenant les différentes fractions, a été préparée. L'intensité de la coloration a été déterminée au spectrophotomètre à 595 nm et la droite d'étalonnage obtenue a permis de convertir la densité optique en quantité de protéine.

7. Etude *in vitro*

7.1. La culture cellulaire

BEAS-2B (**Fig.29**), une lignée de cellules épithéliales bronchiques humaines transformées par un adénovirus 12 SV40 hybride, nous a été fournie par le Centre Hospitalier Universitaire/ Université de Liège, Belgique, sous forme congelée au passage 39.



**Figure 29 : Les cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B
(Prise personnelle)**

Un milieu de base des cellules épithéliales des voies aériennes avec un Pack Supplément contenant 100 UI /ml de pénicilline, 100 µg /ml de streptomycine a été utilisé comme milieu spécifique pour la culture des BEAS-2B.

- **Décongélation**

Les cellules ont été en premier décongelées avec le milieu de base et la suspension obtenue a été centrifugée à 200g pendant 5min. Le culot remis dans 2ml de medium a été ensuite placé dans deux flacons de culture (flasque) T-25 cm², en raison de 1ml par flacon, avec 7ml de milieu de base et 5% de FCS (fetal calf serum / sérum de veau foetal). L'incubation se fait à 37 ° C /5% de CO₂.

- **Passage et congélation**

Après 72h, le milieu a été enlevé, et les flacons sont rincés avec du PBS⁻ (sans Calcium et Magnésium) pendant 5sec. Pour détacher les cellules qui se sont adhérees, il faut ajouter 1ml de la trypsine-EDTA diluée (10x) et laisser agir quelques minutes tout en vérifiant sous microscope. Dès que les cellules se détachent, une solution d'inhibiteur de la trypsine, préalablement préparée (le SBTI «soybean trypsin inhibitor» dans du PBS⁺⁺ (avec Magnésium et calcium) à 10 mg/ml) est ajoutée à la suspension cellulaire (1mg/ml pour chaque ml de trypsine). La suspension de chaque flasque a été remise dans un tube conique et centrifugée à 200 g pendant 5 min.

Pour la cryoconservation, 950µl de milieu de base et 50µl de DMSO (diméthylsulfoxyde) sont ajoutés à l'un des culots. La suspension est transférée dans une gélule avec toutes les informations (**Fig.30**), congelée pendant 24h à -80°C puis transférée dans l'azote liquide.



Figure 30 : Gélules de cryoconservation des différents passages (prise personnelle)

Pour réaliser le passage, 1ml de milieu de base est rajouté au culot. La suspension cellulaire a été transférée dans un flacon T-75 cm² avec 15ml de milieu de base et incubée à 37°C et 5% de CO₂. Les mêmes étapes ont été suivies jusqu'au passage 41, où le culot a été remis en suspension dans un milieu de base dépourvu de sérum, et un NucleoCounter NC-100 a été utilisé pour déterminer le nombre de cellules.

- **Le comptage au NucleoCounter**

Le comptage se fait par l'usage d'un réactif A (tampon de lyse/désagrégation), réactif B (tampon stabilisateur) et une cassette (**Fig. 31**) associés au nucleocounter. Pour calculer le nombre du total cellulaire, on prend 150 µl de la suspension cellulaire et on rajoute à 50µl seulement le même volume en réactif A et B. Pour les cellules mortes, on fait une lecture directe de la suspension cellulaire qui en reste (soit 100µl). La suspension passe dans un circuit de la cassette qu'on place dans le lecteur du nucleocounter. Après le comptage, les cellules sontensemencées à une concentration de 1×10^5 cellules/ml dans une plaque à 96 puits.



Figure 31 : Cassette du nucleocounter (prise personnelle)

Lorsque les cellules épithéliales bronchiques étaient en semi confluence, au passage 42 dans le milieu de base dépourvu de sérum, elles ont été exposées pendant 24 h à une concentration de 0,02µg/µl, 0,06µg/µl, 0,1 µg/µl, 0,3 µg/µl et 0,9µg/µl de l'allergène majeur du *Cupressus sempervirens* (Cup s 1).

7.2. La viabilité cellulaire

Après 24h d'exposition des cellules, aux différentes concentrations allergéniques, les surnageants de culture ont été récoltés et stockés à -80 °C. La viabilité cellulaire a été mesurée par la méthode colorimétrique MTS. Le test permet de quantifier l'activité métabolique d'une population cellulaire. Le sel de tétrazolium (MTS) est capable d'être réduit en dérivé formazan grâce à la capacité des déshydrogénases des cellules vivantes.

Pour cette analyse, les puits ont été rincés avec 100 µl de milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) / F12 milieu de Ham (F12). Ensuite, 20 µl de MTS avec 100 µl de DMEM ont été ajoutés à chaque puits. A l'abri de la lumière, la plaque a été incubée pendant 1 h à 37 °C et 5% de CO₂. L'absorbance a été mesurée à l'aide du lecteur de microplaques à 490 nm. L'absorbance obtenue est proportionnelle aux cellules vivantes dans la solution.

8. Le dosage des cytokines

La quantification d'IL-6 et IL-8, dans les surnageants de culture, a été réalisée grâce un Luminex100 (laboratoires Bio-Rad). La technologie Luminex100 est une nouvelle technologie, qui allie les compétences de la technique de cytométrie en flux à deux lasers et une utilisation de microsphères ou microbilles. Il s'agit d'un système multi-analytique puissant puisque jusqu'à 100 microbilles différentes peuvent être incluses dans un même puits de la plaque d'analyse, ce qui laisse augurer de grandes capacités d'analyses (Moalic *et al.*, 2004).

Le Kit simplex qui nous a été fourni est constitué d'un standard d'antigène, un tampon de lavage, des billes magnétiques d'anticorps, solution de détection d'anticorps, streptavidine-PE (SA-PE), une plaque de 96 puits à fond plat et une série de 8 micro-tubes. Les limites de détection (LOD) de ce dosage varie entre [1,68 - 6900pg /ml] pour l'IL-8 et [10-10275pg/ml] pour l'IL-6.

Avant de commencer, il faut diluer le tampon de lavage concentré (10x) avec de l'eau déminéralisée et le conservez à 2-8 °C. Concernant le standard d'antigène, il doit être centrifugé à 2000 g pendant 10 sec, lui ajouter 250 µl de milieu de culture, vortex doucement pendant 30 sec et l'incuber sur la glace pendant 5-10 min. Ensuite une série de dilution du standard d'antigène est réalisée (**Fig. 32**). Les tubes Std 2-7 doivent contenir préalablement

150 μ l du milieu de culture cellulaire. Les étapes de la préparation de la plaque sont démontrées dans la figure 33.

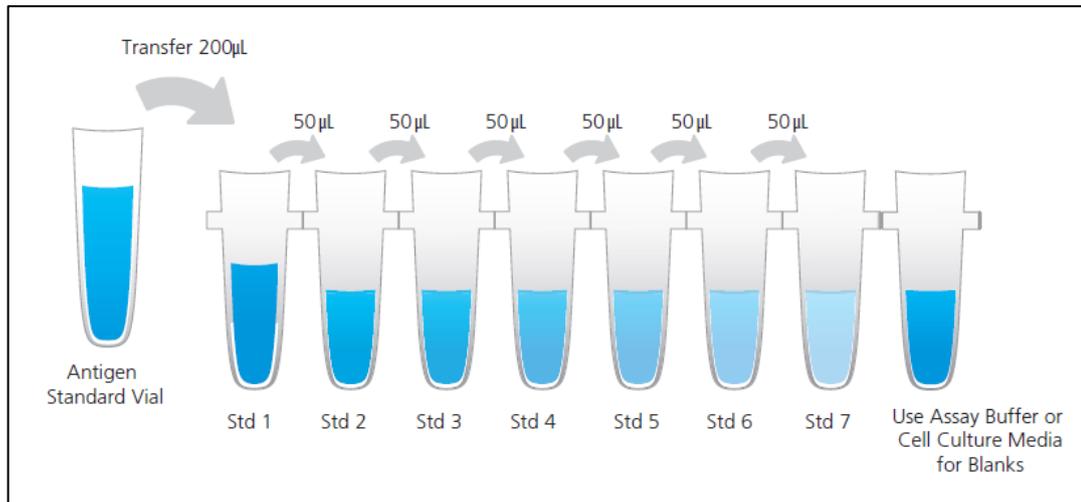


Figure 32 : Dilution du standard d'antigène (instruction/ebioscience)

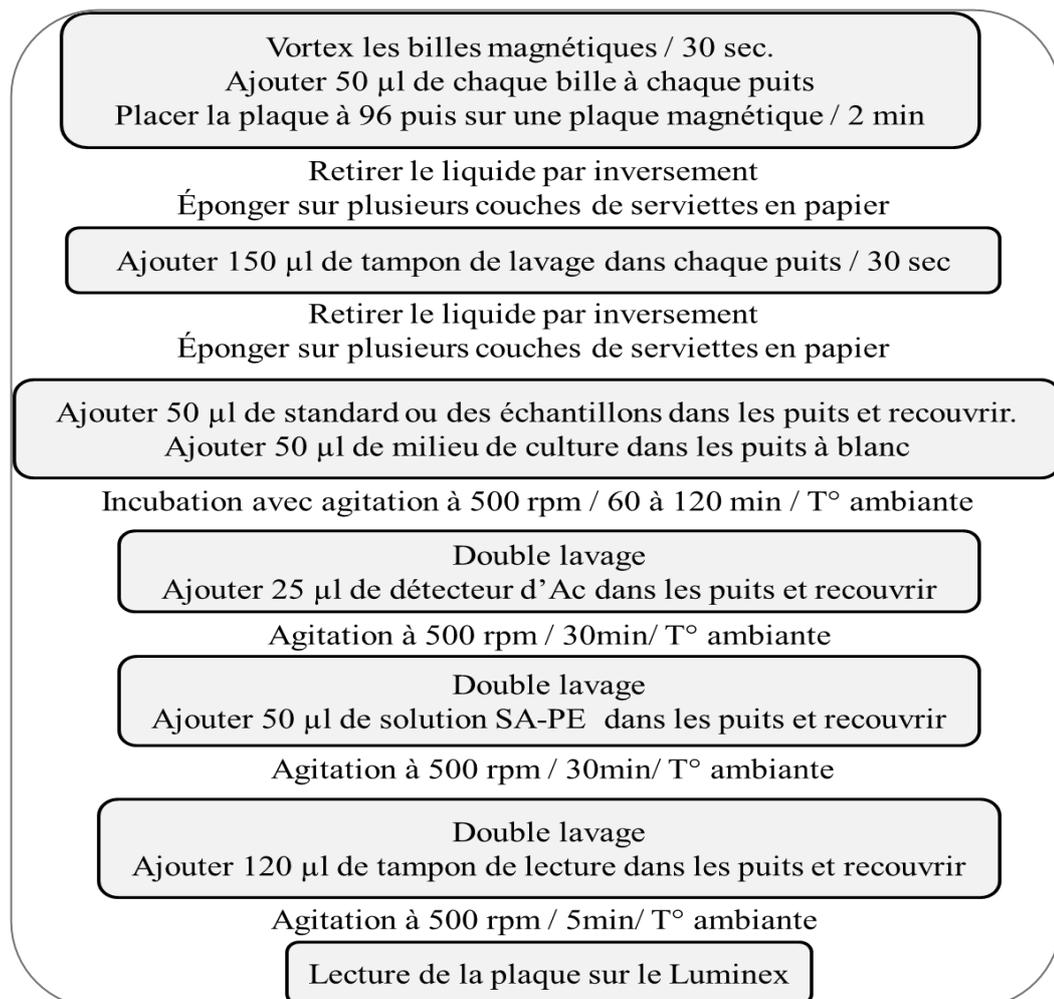


Figure 33 : Les étapes de la réparation de la plaque

9. Analyse statistique

Les données sont exprimées en moyenne \pm SD. L'analyse de la signification statistique a été déterminée en utilisant l'ANOVA à un facteur suivie par test de Dunnett pour des comparaisons multiples avec le témoin et le test Tukey pour des comparaisons par paire. Les différences ont été considérées comme significatives pour $P < 0,05$.

Chapitre III

Résultats et discussion

Première partie

Approche

aérodynamologique

1. Résultats

1.1. Identification de la composition pollinique atmosphérique

Après une collecte étalée sur une période de janvier à décembre 2012, utilisant la méthode gravimétrique, un total de 6543GP/cm² (soit GP : grains de pollen) a été capturé. L'analyse microscopique nous a permis d'identifier, aux niveaux des trois sites étudiés, 22 familles dont cinq sont connues par leur haut potentiel allergisant (Cupressacées, Bétulacées, Poacées, Fagacées et Oléacées). Néanmoins, 866 grains de pollen/cm² ont été considérés comme indéterminés. A partir du compte pollinique, les familles identifiées sont classées comme suit :

- La famille des **Cupressacées (Fig.34a)** : occupe la première place avec un total de 1171GP/cm² de l'ensemble des grains de pollens identifiés. Représenté principalement par le genre « *Cupressus* », le pollen de cette famille a été trouvé dans nos lames de collecte pendant toute l'année avec un taux maximal de 560 GP/cm², enregistré pendant le mois de mars.
- **Les Myrtacées (*Eucalyptus*) (Fig.34b)** : Pour lesquelles 1087GP/cm² en totalité ont été dénombrés avec un pic de 923 GP/cm² noté pendant le mois de juin.
- **Les Graminées (Fig.34c)** : avec un total de 523 GP/cm² et un maximum pollinique de 249GP/cm² durant le mois de mai.
- **Les Pinacées (Fig.34d)** : avec 454 grains/cm² dont le plus grand nombre est de 208 GP/cm² pendant le mois d'avril, avec comme genre majoritaire « *Pinus* ».
- **Les Urticacées** : avec 413 GP/cm², dont 149 GP/cm² ont été comptés au mois d'avril.
- **Les Oléacées (Fig.34e)** : avec un nombre de 366GP/cm² et un maximum de 173GP/cm² enregistré pendant le mois de mai. Deux genres appartenant à cette famille ont été identifiés, dont *Olea* et *Fraxinus*.
- **Les Chénopodiacées (Fig.34f)** : 276 GP/cm² ont été compté pour ce taxon avec 104 GP/cm² comme nombre maximal durant le mois de septembre.
- **Les Casuarinacées (*Casuarina*) (Fig.34g)** : dont le total est de 223 GP/cm² et le nombre le plus élevé a été noté en septembre avec 175 GP/cm².
- **Les Ericacées (*Erica*) (Fig.34h)** : avec un total de 213 GP/cm². La quantité maximale a été enregistrée durant le mois de mars (136 GP/cm²).
- **Les Astéracées (Fig.34i)** : le nombre de leur pollen a atteint les 172 GP/cm² avec un maximum de 100 GP/cm² pendant le mois d'avril.

- **Les Rosacées (Fig.34j)** : représentées par 157 GP/cm² et un maximum de 104 GP/cm² pendant le mois de mars.
- **Les Apiacées (Fig.34k)** : avec une abondance de 97 GP/cm² pendant le mois d'avril, globalement, le nombre n'a pas dépassé les 153 GP/cm².
- **Les Fagacées (Fig.34l)** : dont le genre *Quercus* a été identifié. Cette famille est représentée par un total de 152 GP/cm² et un seuil maximal de 87 GP/cm² enregistré pendant le mois de juin.
- **Les Juglandacées (*Juglans*) (Fig.34m)** : leur total a atteint les 102 GP/cm², dont le maximum est de 47 GP/cm² durant le mois de mai.
- **Les Brassicacées (Fig.34n)** : un total de 68 GP/cm² a été capturé avec 31 GP/cm² comme nombre maximal en septembre.
- **Les Cypéracées (Fig.34o)** : le nombre de pollen de cette famille n'a pas dépassé 43 GP/cm² avec un maximum de 23 GP/cm² enregistrés pendant le mois de juin.
- **Les Betulacées (Fig.34p)** : représentées par les deux genres ; *Betula* et *Alnus*. 38 grains de pollen/cm² appartenant à cette famille ont été capturés, avec un maximum de 14 GP/cm² en avril.
- **Les Moracées** : dont le nombre total n'a pas dépassé les 29 GP/cm² et un taux maximal de 27 GP/cm² capturés pendant le mois d'avril.
- **Les Salicacées** : 15 GP/cm² ont été dénombrés avec un maximum de 10 GP/cm² pendant le mois de mai.
- **Les Tiliacées (*Tilia sp*) (Fig.34q)** : sur un total de 14 GP/cm², 7 grains/cm² ont été capturés le mois de juillet.
- **Les Mimosacées (*Acacia sp*) (Fig.34r)** : seulement 3 GP/cm² ont été capturés le mois d'avril.
- **Les Ephedracées (*Ephedra sp*) (Fig.34s)** : on a enregistré un total de 5 GP/cm² dont le nombre maximal est de 4 GP/cm² en juillet.

1.2. Pourcentage pollinique des différentes familles

Suite à notre compte pollinique, nous pouvons dire que l'atmosphère d'Oued Zenati se caractérise par la présence de deux types polliniques, le premier rassemble les familles considérées comme abondantes, dont : les Cupressaceae avec 18%, les Myrtaceae (17%), les Poaceae (8%), les Pinaceae (7%), les Urticaceae (6%), les Oleaceae (6%), les Chenopodiaceae (4%), les Casuarinaceae (3%), les Asteraceae (3%), les Fagaceae avec 2% et le second type renferme les familles peu abondantes y compris, les Juglandaceae (1,55%),

les Betulaceae (0,58%), les Moraceae (0,44%), les Salicaceae (0,22%) et les Tiliaceae avec seulement 0,21% (Fig.35).

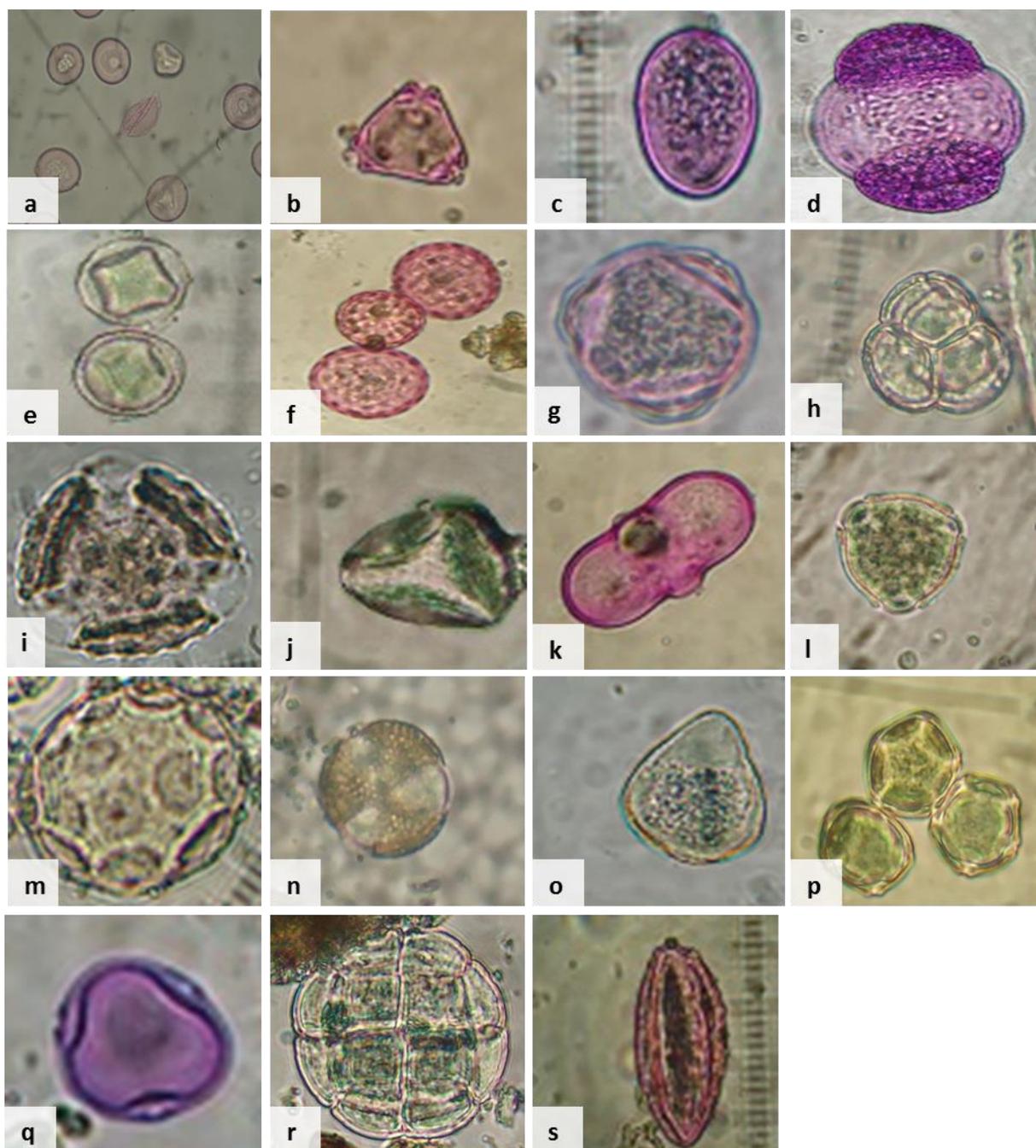


Figure 34 : Différent grains de pollen capturés (Prises personnelles)

- a** : Cupressacées, **b** : Myrtacées, **c** : Graminées, **d** : Pinacées, **e** : Oléacées, **f** : Chénopodiacées,
g : Casuarinacées, **h** : Ericacées, **i** : Astéracées, **j** : Rosacées, **k** : Apiacées, **l** : Fagacées,
m : Juglandacées, **n** : Brassicaceae, **o** : Cypéracées, **p** : Bétulacées, **q** : Tiliacées,
r : Mimosacées, **s** : Ephédracées.

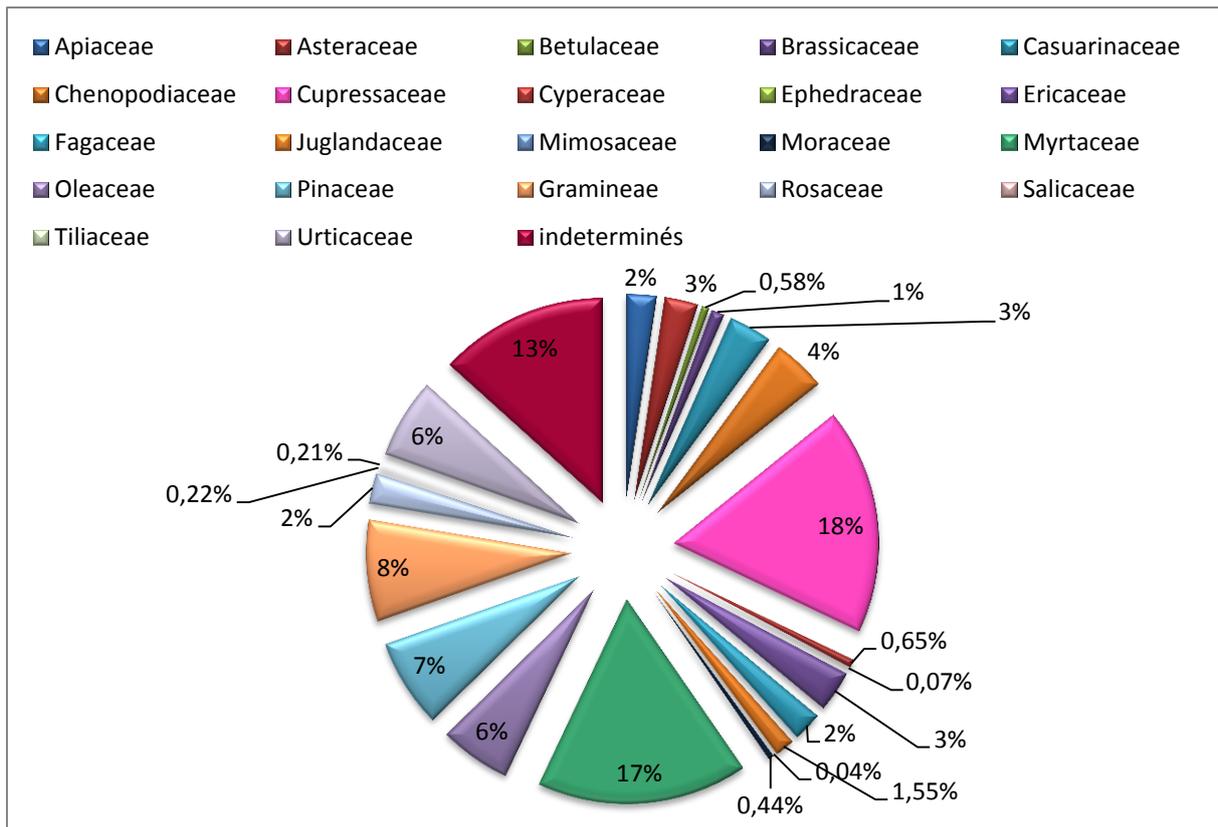


Figure 35 : Pourcentage pollinique des différentes familles

1.3. Météorologie et pollinisation

La précipitation, la température et le vent sont considérés comme des facteurs climatiques ayant un impact direct sur la pollinisation. Selon **la figure 36**, l'année 2012 s'est caractérisée par une vitesse de vent qui n'a pas dépassée les 2,40 m/s, quant à la température moyenne, elle a oscillé entre 5,23°C (température minimale enregistrée durant le mois de février) et 30,43°C (température maximale notée durant le mois d'août). Cependant, les précipitations élevées caractérisent la saison hivernale, alors qu'elles commencent à décliner à partir du printemps. Pour ce fait, une pollinisation remarquable est notée avec l'augmentation de la température et la diminution des précipitations, d'où on peut distinguer deux pics : le premier, printanier, apparaît durant le mois d'avril avec 1273 GP/cm², caractérisé par une forte pollinisation des Pinaceae, alors que le deuxième pic, estival, apparaît au mois de juin avec 1463GP/cm². Il correspond à la forte pollinisation des Myrtaceae (**Chafai-Ketfi et al., 2009**).

Selon l'aspect de l'histogramme, on remarque que le maximum des émissions polliniques est enregistré entre mars et juin. Le nombre de pollen diminue en juillet et aout,

lorsque la température est très élevée, pour montrer une légère augmentation durant le mois de septembre, correspondant à une pollinisation considérable des Casuarinaceae (**Fig.36**).

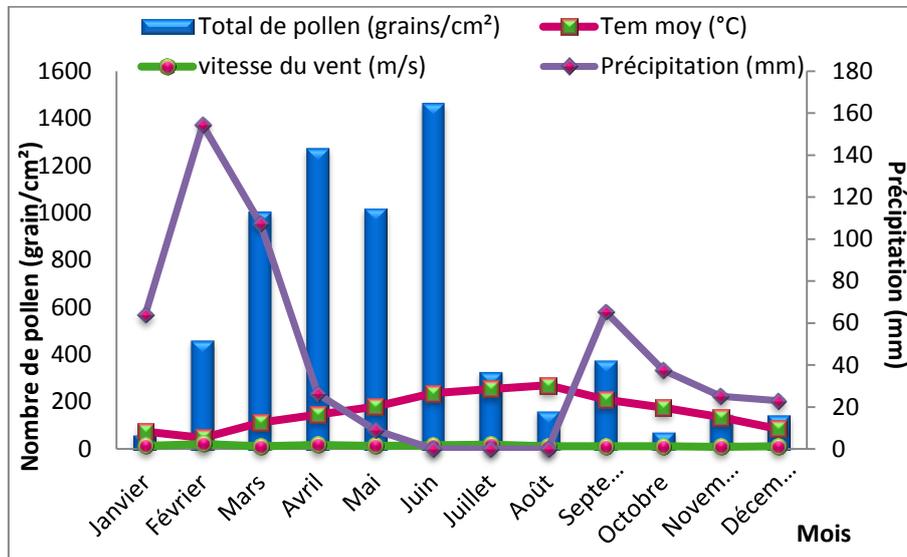


Figure 36 : Quantité de pollen en fonction de la température, la précipitation et la vitesse du vent.

1.4. La fréquence pollinique mensuelle des principales familles identifiées

La fréquence mensuelle montre qu'il existe une diversité pollinique remarquable dans l'atmosphère de notre zone d'étude, pendant l'année 2012. Selon la **figure 37**, on remarque que les Cupressacées dominent pendant les mois de janvier, février et mars avec une légère apparition des Pinacées (**Fig.37**). Quant aux mois d'avril et de mai, ce sont les plus diversifiés, avec une pollinisation notable des Pinacées, des Graminées et des Oléacées. La saison estivale, à Oued Zenati, est surtout marquée par une forte pollinisation des Myrtacées avec l'apparition des Chénopodiacées, alors que l'automnale, se caractérise principalement par la dispersion des grains de pollen des Casuarinacées ainsi que des Chénopodiacées. Cependant, une réapparition tardive des Oléacées a été notée durant le mois de décembre.

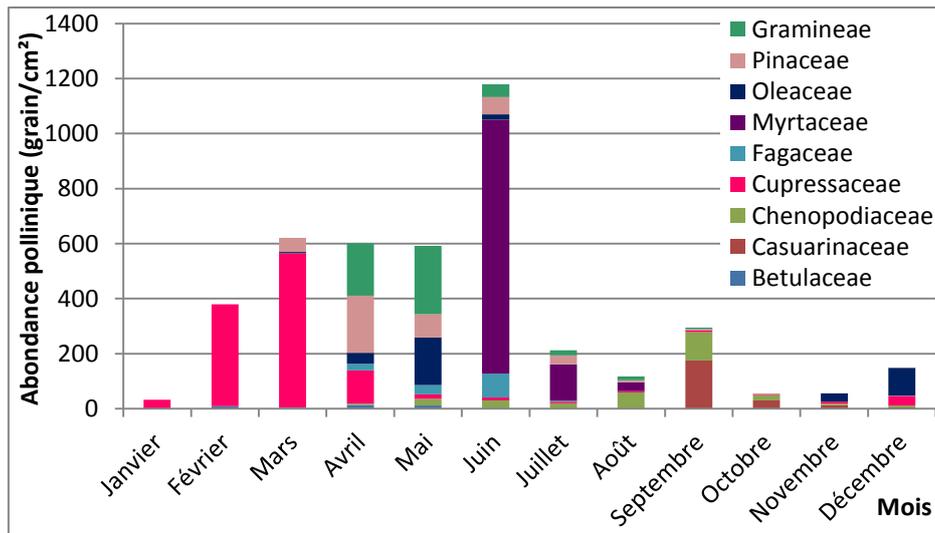


Figure 37 : Fréquence pollinique mensuelle de l'année 2012

1.5. Quantité et pourcentage du pollen anémophile et entomophile

L'histogramme ci-dessous montre qu'il existe dans l'atmosphère de notre zone d'étude, non seulement, des pollens anémophiles mais aussi des pollens entomophiles. Le premier type pollinique a été repéré tout au long de l'année 2012, quant au pollen entomophile, des valeurs considérables ont été enregistrées durant les mois de mars, d'avril et de juin correspondant, respectivement, à la pollinisation des Ericaceae, des Asteraceae et des Myrtaceae (Fig.38).

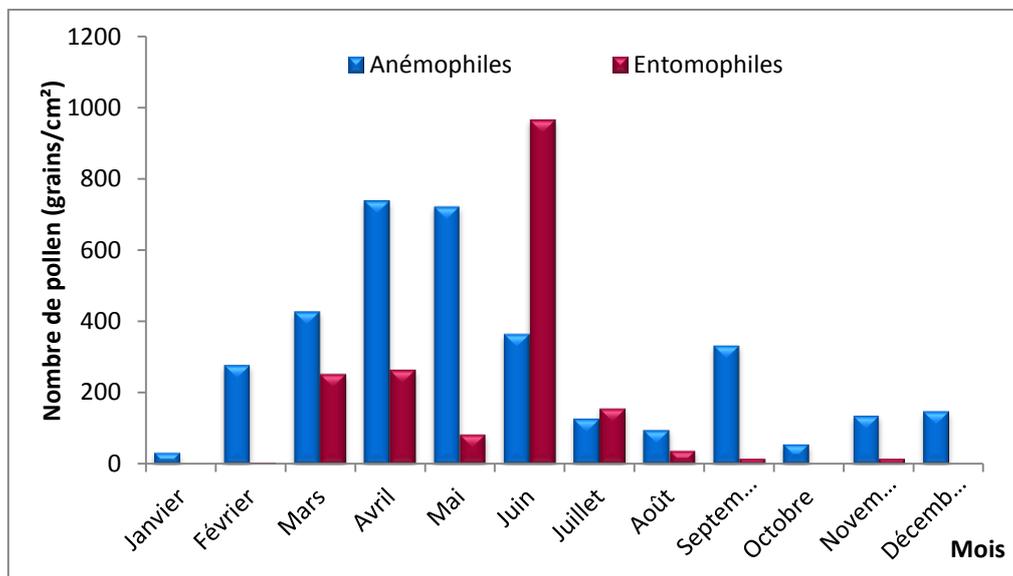


Figure 38 : Quantité du pollen anémophile et entomophile de l'année 2012.

Toutefois, en prenant en considération les grains de pollens nos identifiés, le pollen anémophile détient lui seul 60%, alors que le pollen entomophile représente 27% de l'ensemble du pollen capturé (Fig.39).

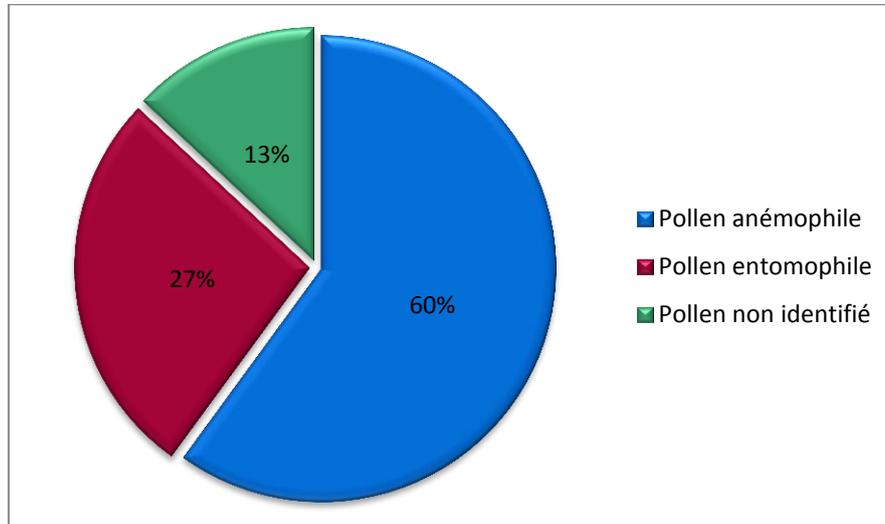


Figure 39 : Pourcentage proportionnel du pollen anémophile et entomophile.

1.6. Les différentes familles allergisantes

Parmi les familles identifiées, quatorze (14) d'entre elles figurent sur la liste des familles végétales ayant un potentiel allergisant prouvé. La famille des Cupressaceae, dont le genre *Cupressus*, s'exprime avec un pic majeur, représentant ainsi la famille la plus abondante avec 1171 GP/cm², suivie des Myrtaceae (*Eucalyptus*), avec 1087 GP/cm². Quant au taux des Salicaceae et des Tiliaceae, ils ne dépassent pas les 15 grains/cm² (Fig.40).

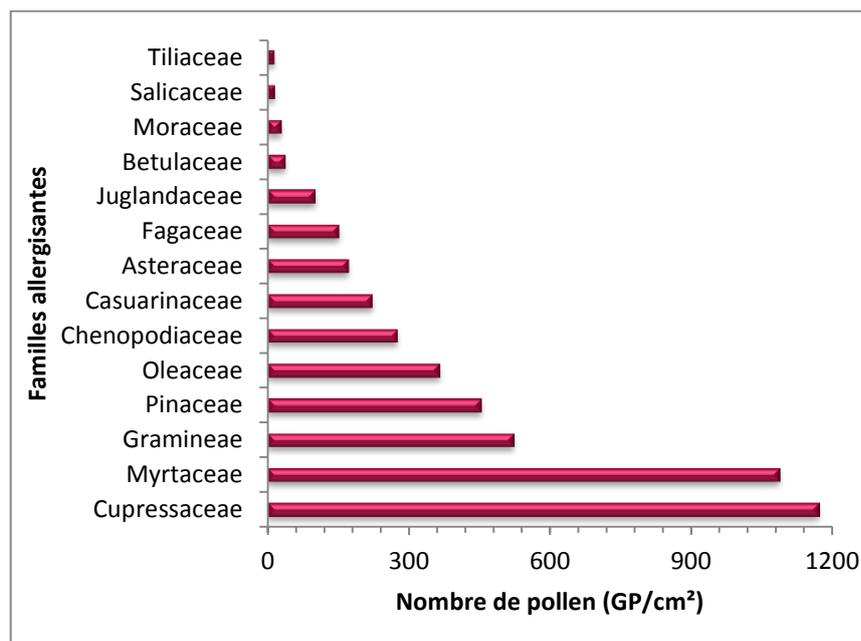


Figure 40 : Les différentes familles allergisantes dans l'atmosphère d'Oued Zenati.

Cependant l'ensemble des grains de pollen allergisant dans l'atmosphère d'Oued Zenati est de 80% par rapport au pollen des familles non allergisantes (**Fig.41**). Notons que certaines de ces dernières n'ont pas le potentiel pour déclencher des allergies respiratoires mais par ailleurs peuvent entraîner d'autres types d'allergies telles que les Urticaceae, qui sont responsables des dermatites.

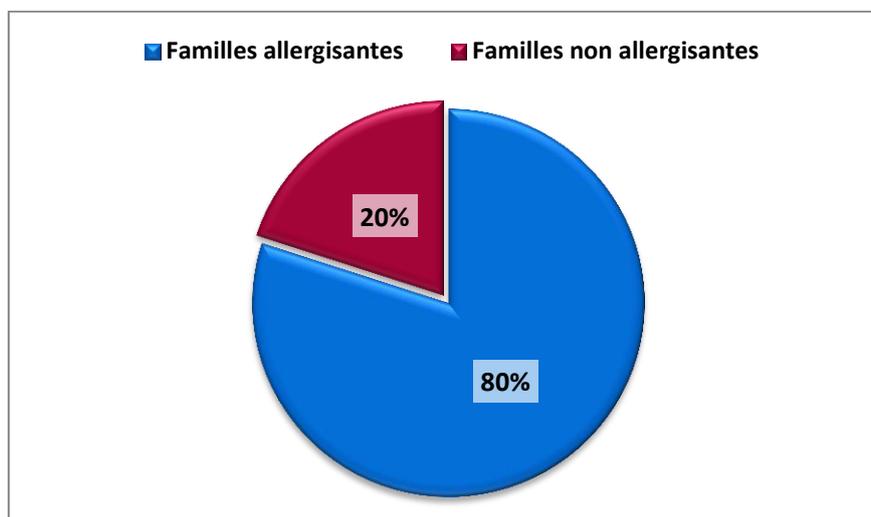


Figure 41 : Pourcentage proportionnel des familles allergisantes et non allergisantes.

1.7. Le calendrier pollinique

Après le compte et l'identification des grains de pollen en suspension dans l'air d'Oued Zenati, les périodes de pollinisation et la persistance des pollens des différentes familles végétales, dans cette atmosphère, ont été récapitulées sous forme de calendrier pollinique.

Le calendrier pollinique de l'année 2012 (**Tab.6**), se divise en trois périodes principales : La première période correspond à la pré-saison pollinique, c'est une période courte (de janvier à mars) caractérisée par l'émission de pollen d'arbres principalement celui des Cupressaceae, Ericaceae, Betulaceae, Rosaceae et Pinaceae.

La deuxième période, autrement dit, la grande saison pollinique : c'est une période longue (avril à août) et la plus diverse. Un taux élevé de pollen y ont été dénombré et elle est caractérisée essentiellement par la pollinisation des Asteraceae, Betulaceae, Gramineae, Pinaceae, Urticaceae, Oleaceae et les Myrtaceae.

Enfin, la troisième période : c'est une période courte située entre septembre et décembre, où une pollinisation remarquables des Chenopodiaceae et des Casuarinaceae a été notée.

Cependant, la pollinisation de certaines familles allergisantes peut être définie comme prolongée, dont celle des Fagaceae, Gramineae, Pinaceae, Chenopodiaceae et principalement celle des Cupressaceae.

La persistance et la succession de la pollinisation des familles allergisantes est un risque majeur pour les allergique de cette zone d'étude.

Tableau 6 : Calendrier pollinique d'Oued Zenati de l'année 2012

Mois Familles	Janvier	Février	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet	Aout	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre
Apiaceae												
Asteraceae												
Betulaceae												
Brassicaceae												
Casuarinaceae												
Chenopodiaceae												
Cupressaceae												
Cyperaceae												
Ephedraceae												
Ericaceae												
Fagaceae												
Juglandaceae												
Mimosaceae												
Moraceae												
Myrtaceae												
Oleaceae												
Pinaceae												
Gramineae												
Rosaceae												
Salicaceae												
Tiliaceae												
Urticaceae												

De 1-19
 De 20-49
 De 50-99
 Plus de 100

2. Discussion

L'intérêt de notre approche aéropalynologique est d'établir un compte pollinique et une identification de l'ensemble des grains de pollen dans l'atmosphère d'Oued-Zenati, afin de mettre en place un calendrier pollinique de cette région. La collecte a été réalisée en suivant la méthode gravimétrique, où le pollen est piégé sur des lames couvertes par de la gélatine glycinée.

L'exploitation de cette atmosphère nous a permis de dénombrer un taux élevé de pollen et d'identifier 22 familles végétales.

Cette variabilité dans le taux des grains de pollen, autrement dit: la pollinisation, diffère d'une saison à une autre et est induite principalement par les facteurs climatiques, dont l'ensoleillement, entre autre la température, le vent et la précipitation qui ont une importante influence sur le nombre de grains de pollen aéroportés (**Xu et al., 2012**). La pluie qui, le plus souvent, précipite les grains au sol, au point de laver l'atmosphère de tout contenu pollinique. Il y a certes des exceptions, notamment en présence d'averses convectives à grosses gouttes où, probablement en raison de violents courants ascendants, le début des précipitations est parfois marqué par un doublement, voire un triplement de la densité pollinique (**Norris-Hill et Emberlin, 1993**). Mais il est courant qu'une pluie fine fasse instantanément tomber le nombre pollinique de quelques centaines à moins de dix grains par mètre cube d'air (**Laaidi et al., 1997**). Par ailleurs, les vents modérés favorisent les pics polliniques (**Laaidi et al., 2011**), ce qui est le cas dans notre zone d'étude.

Concernant la température, les taux les plus élevés de pollen ont été enregistrés lorsque ce facteur météorologique est favorable, autrement dit élevé. Une température convenable, favorise la germination et la floraison des plantes, en agissant sur la vitesse de croissance de la végétation au début de la saison et déterminant le moment de la floraison, l'évolution la plus régulièrement étudiée concerne la date de début de pollinisation. Plusieurs études montrent qu'elle est de plus en plus précoce (**Besancenot, 2009**). **Damialis et al. (2007)**, ont montré que l'augmentation des quantités de pollens produites est corrélée avec celle des températures.

Pour ce qui est fréquence pollinique, la saison hivernale est marquée surtout par la pollinisation des Cupressaceae, ce qui concorde avec certaines études antérieures, dont celle de **Didier et al., (1988)** sur l'atmosphère de Toulouse (France) où ils ont démontré que de janvier à mars, la pollinisation des Cupressacées est la plus abondante et la plus précoce,

précédant celle des Bétulacées, alors que la période printemps-été, elle comprend presque la totalité des pollens observés dont les Pinaceae, Oleaceae, Fagaceae et les Graminées. L'automne, quant à lui ; il est caractérisé par la présence de Chenopodiaceae (**Negrini et al., 1987**). Cette saison se spécifie aussi par les concentrations les plus élevées de *Casuarina*, étroitement associée aux pluies saisonnières qui dans le bassin méditerranéen se produisent principalement à l'automne (**Trigo et al., 1999**), ce qui concorde avec nos résultats

Cependant, les grains de pollen identifiés dans l'atmosphère d'Oued Zenati, pendant l'année 2012, se divise en deux grandes catégories, la première celle des pollens anémophiles qui détient 60% par rapport à la deuxième qui représente les pollens entomophiles avec 27%, dont la famille des Myrtaceae est la majoritaire. Selon la littérature scientifique, les grains de pollen anémophiles possèdent des caractéristiques qui lui confèrent une dispersion et une persistance dans l'air en grande quantité, tels que la faible taille (20 – 60µm) et les éléments structuraux fins, contrairement, aux pollens entomophiles, ayant des éléments développés qui entraînent leur fixation sur le vecteur (**Leuschner, 1993 ; Chafai-Ketfi et al., 2009**).

Parmi cet ensemble de pollens anémophiles et entomophiles, 14 familles identifiées regroupent des espèces à potentiel allergisant prouvé. A Oued Zenati, certaines de ces familles sont plus abondantes que d'autres dont :

- **Les Cupressacées**, cette famille se caractérise par une pollinisation hivernale. Cependant ses espèces fleurissent de décembre à juin et produisent de grande quantité de pollen (**Gouranton-Lagier et al., 2009**). Les mois avec de gros symptômes sont février (58 %), mars (52 %) janvier (39 %), avril (27 %) et décembre (19 %). Quant aux pourcentages des différentes formes de symptômes sont les suivants : rhinites (49 %), conjonctivites (32 %), asthme (16 %), dermatites (3 %) (**Ariano, 2008**).

- **Les Graminées** : leur pollinisation prolongée notée dans notre étude a été également citée par plusieurs auteurs dont **Vega-Maray et al. (1999)** et **Dopazo-Martinez et al. (2000)**. Cette famille regroupe un nombre très élevé d'espèces qui sont, pour la plupart des anémophiles, émetteurs de grandes quantités de pollen (**Dopazo-Martinez et al., 2000**). Leur saison de pollinisation diffère d'une région à l'autre en fonction des conditions climatologiques et géographiques (**Emberlin et al., 2000**). Selon **Njock et al. (2010)**, au cours de l'année 2001 à Caen (France), le pourcentage maximum de patients consultant pour des symptômes allergiques était de 18,65 % et le pourcentage maximum de patients consultant

pour une rhinite allergique était de 9,1 % pendant la période qui correspondait exactement à la période de pollinisation des pollens de Graminées.

- **Les Pinacées** : représentées principalement par le genre *Pinus* et une pollinisation prolongée avec une abondance pendant le mois d'avril. Ce résultat est en accord avec celui de **Carinanos et al. (2000)**, qui ont montré qu'après deux ans de suivi, le *Pinus* a une pollinisation plutôt prolongée mais les plus fortes concentrations sont enregistrées en avril pour l'année 1996 puis en mars pour l'année 1997. Certaines études ont démontrées que les Pinacées sont très peu allergisantes, alors qu'en Espagne, elles ont été signalées comme responsables de pollinoses modérées (**Aira et al., 1998**).

- **Les Oleacées** : se sont exprimées par un pic pendant le mois de mai à Oued Zenati. **Dominguez-Vilches et al. (1993)** ont montré que la pollinisation de ce taxon est élevée entre les mois de mai et de juin, et la concentration de son pollen est beaucoup plus importante que celle de tous les autres taxons présents dans l'atmosphère, elle dépasse même celle des Graminées. Il a été prouvé qu'elles sont responsables d'un pourcentage élevé de pollinoses notamment le frêne (*Fraxinus*) et l'olivier (*Olea europaea*). De plus, le pollen de l'olivier peut être facilement transporté dans l'atmosphère à des distances relativement grandes qui peuvent aller jusqu'à 50 km (**Fornaciari et al., 2000**).

Quant aux **Chénopodiacée**, leur pollinisation a commencé durant le mois de mars pour être prolongée jusqu'à la fin de l'année avec des fortes concentrations pendant le mois de septembre. Cette prolongation a été remarquée dans l'étude de **Carinanos et al. (2000)** mais avec de fortes concentrations en juillet et août. Les espèces de cette famille sont beaucoup plus résistantes à la sécheresse.

Cependant **les Casuarinacées** sont responsables des maladies allergiques telles que les rhinites et/ou l'asthme automnal vue que leur pollinisation est spécifique à cette saison.

- **Les Fagacées**, représentées principalement par le *Quercus* dont sa pollinisation était ordinaire commençant durant le mois d'avril. Sa saison de pollinisation est bien définie en printemps et se caractérise par un commencement brusque. En France, le *Quercus* est signalé comme responsable de symptômes d'allergie modérés ainsi que d'un pourcentage élevé d'allergie (**Aira et al., 1998**).

- **Les Astéracées** : leur forte pollinisation a été enregistrée durant le mois d'avril dans l'actuelle étude contrairement à celle de **Carinanos et al. (1998)** où ils ont signalé une forte

pollinisation entre la fin de l'été et le début de l'automne. Le genre *Artemisia* est considéré comme l'un des plus importants agents responsables de pollinoses, pouvant même causer des réactions allergiques à de faibles quantités (**Carinanos et al., 2000**). De plus, l'*Ambrosia* a été aussi considérée comme responsable des manifestations allergiques souvent enregistrées pendant la fin Août (**Chafai-Ketfi, 2009**).

- **Les Juglandacées**, représentées principalement par le genre *Juglans* sont aussi connues comme un taxon allergisant (**Charpin et Surinyach, 1974**).

- **Les Betulacées** : les genres les plus représentatifs de cette famille sont *Alnus* et *Betula* avec des périodes de pollinisation relativement courtes. En Espagne, ils représentent respectivement 5 % et 12 % du total pollinique annuel. Plus de 90 % du total annuel de l'*Alnus* (aulne) a été collecté entre janvier et février et 70 % du pollen de *Betula* (bouleau) a été collecté en avril (**Spieksma et al., 1995**), ce qui en concordance avec les résultats obtenus dans notre zone d'étude. Quand en France, le bouleau est le premier arbre responsable de pollinoses printanières. Environ un tiers des patients présentant une rhinoconjonctivite allergique au pollen de bouleau ont un asthme (**Lavaud et al., 2014**).

En dernier, **les Myrtacées**. Cette famille, principalement à pollen entomophile, s'est exprimée avec une abondance remarquable. Des résultats identiques en été enregistré en Espagne où le pollen des Myrtacées fait partie des plus abondants dans l'atmosphère (**Dopazo-Martinez et al., 2000**). L'Eucalyptus qui est très répandu dans notre zone d'étude, a été également capturé en grandes quantités dans différentes études dont celle de **Fontana et al. (2001)**. Par railleur, certains les considèrent comme arbre à pouvoir allergisant important (**Dopazo-Martinez et al., 2000**), dont l'*Eucalyptus*, le genre le plus représentatif de cette famille, fait partie des plantes pouvant causer de faibles réactions allergiques (**Aira et al., 1998**).

Toutes les connaissances acquises ont été récapitulées dans un calendrier pollinique spécifique à Oued Zenati. Une abondance pollinique a caractérisé l'atmosphère de cette région avec des périodes de pollinisation soit précoces, décalées ou prolongées pour certains taxons. Il a été prouvé que ces modifications sont sous l'influence de la température. Par exemple, l'augmentation des températures hivernales, aurait pour effet de prolonger la dormance hivernale (la plante n'ayant pas eu suffisamment de froid) et de décaler la floraison. Ce phénomène compense en partie l'effet des températures chaudes au printemps, qui contribuent à la levée de dormance et donc à l'avancement de la floraison. En ce qui concerne

la fin de la période de pollinisation, elle est souvent retardée car la chaleur prolonge la période de production pollinique (**Menzel et al., 2006**). La sortie de dormance plus tôt au printemps permet à la plante d'accumuler davantage de ressources tout au long de la saison et ainsi d'augmenter sa biomasse et son effort reproducteur (**Gilmour et al., 2006**). De plus, même si peu d'études ont été pour l'instant réalisées, l'élévation des températures devrait rendre le grain de pollen plus allergisant (**Levetin et al., 2008**).

Cette approche réalisée sur l'atmosphère d'Oued Zenati, nous a permis de mettre en évidence une pollinisation importante et prolongée des Cupressaceae. Cette famille est représentée principalement par *Cupressus sempervirens* (le Cyprès commun) nommé brise-vent, fortement planté dans cette région à vocation agricole. Cette espèce a fait l'objet de notre approche immunologique.

Deuxième partie

Approche

immunologique

1. Résultats

1.1. Extraction et fractionnement de l'extrait brut pollinique du *Cupressus sempervirens* (Cyprés commun)

Suite à l'étude aéropalynologique d'Oued Zenati, nous avons ciblé comme espèce végétale allergisante le Cyprés toujours vert. Le choix de cette espèce revient au fait qu'elle soit la plus répandue dans notre zone d'étude.

La collecte du pollen de *Cupressus sempervirens* a permis d'obtenir une poudre pollinique de 20g. En suivant un protocole d'extraction, nous avons obtenu 3g d'extrait pollinique brut, dont 75% de ce dernier ont été fractionnés, par principe de précipitation sur sulfate d'ammonium, en quatre fractions, dont Fr1 :51mg ; Fr2 : 20mg ; Fr3 : 3mg et Fr4 : 2mg (Fig.42).

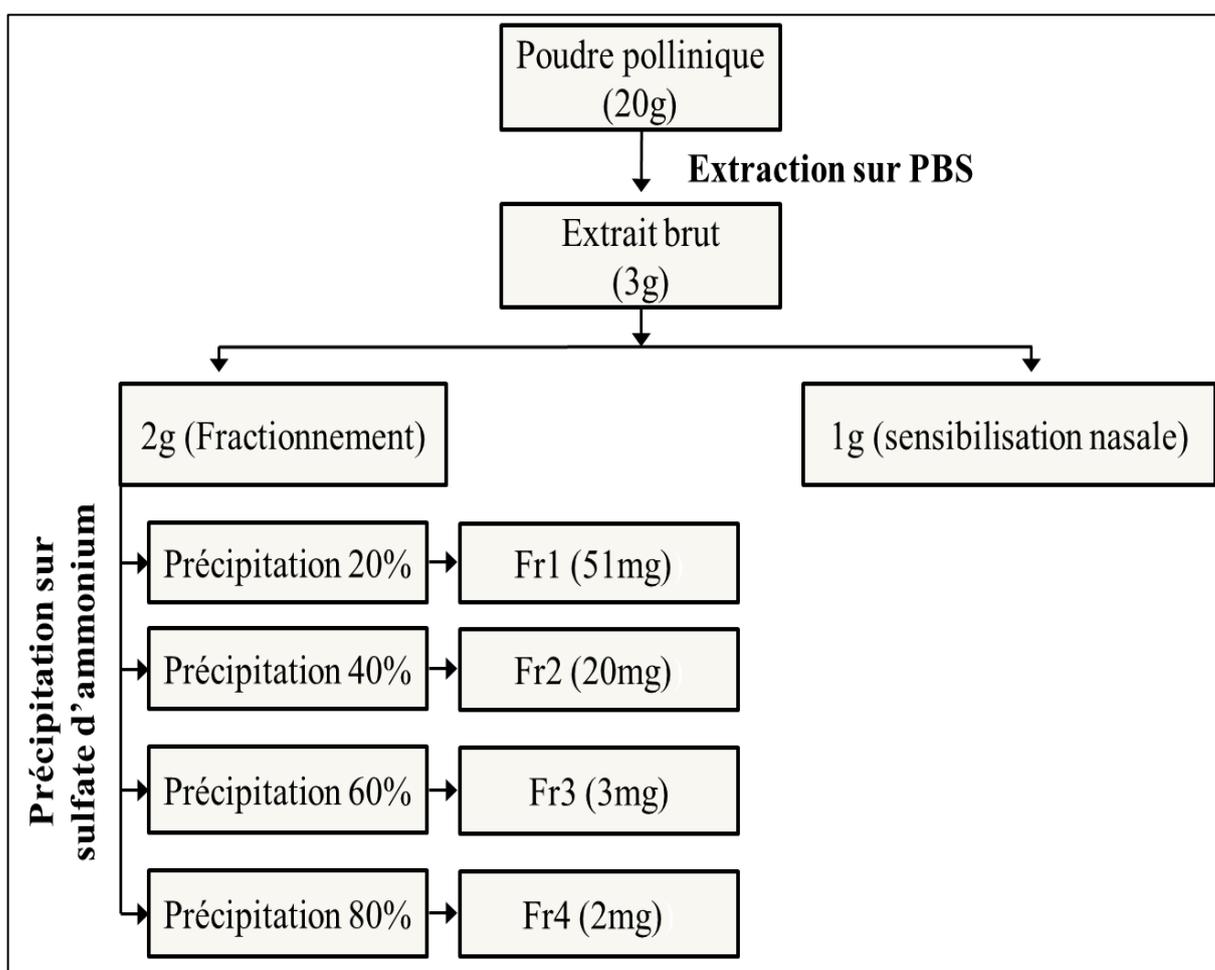


Figure 42 : Extraction et fractionnement de l'extrait pollinique brut du Cyprés

Fr : Fraction

1.2. Effet de l'instillation nasale de l'extrait pollinique brut du Cyprès commun

1.2.1. L'effet sur la formule leucocytaire

L'analyse de la formule leucocytaire a révélé une augmentation du taux des lymphocytes chez les souris traitées (**Tr**) par l'extrait pollinique par rapport aux témoins (**T**) (**T** : $3,15 \pm 1,24 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$ et **Tr** : $3,75 \pm 0,57 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$). En revanche une diminution du nombre des neutrophiles (**T** : $2,3 \pm 1,4 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$ et **Tr** : $0,27 \pm 0,007 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$) a été enregistrée chez les souris sensibilisées (**Fig. 43**).

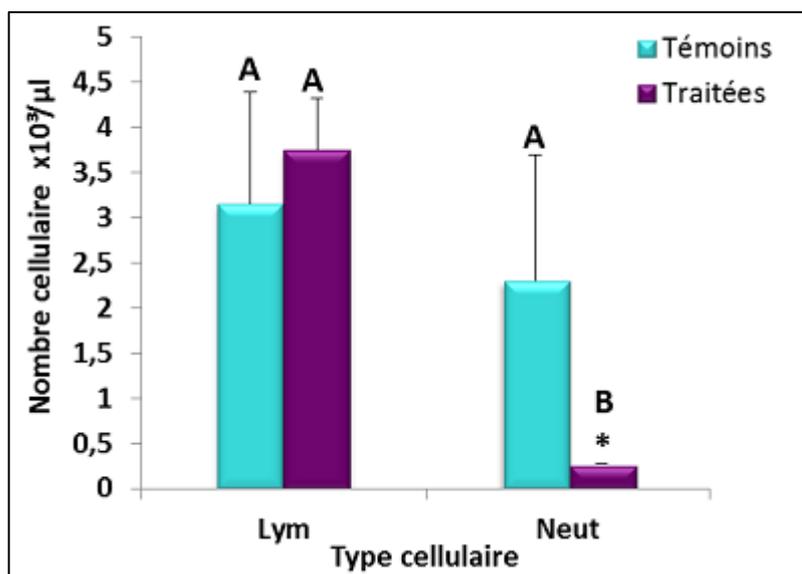


Figure 43 : Variation du taux des lymphocytes et des neutrophiles

Lym : Lymphocytes, **Neut** : Neutrophiles

Lettres majuscules : Les moyennes qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes / Différence significative de Tukey ($P < 0,05$)

En ce qui concerne les éosinophiles, une augmentation (**T** : $0,07 \pm 0,02 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$ et **Tr** : $0,1 \pm 0,05 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$) a été notée, tandis que le taux de monocytes n'a montré aucune différence entre les deux lots ($0,05 \pm 0,03 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$) (**Fig. 44**).

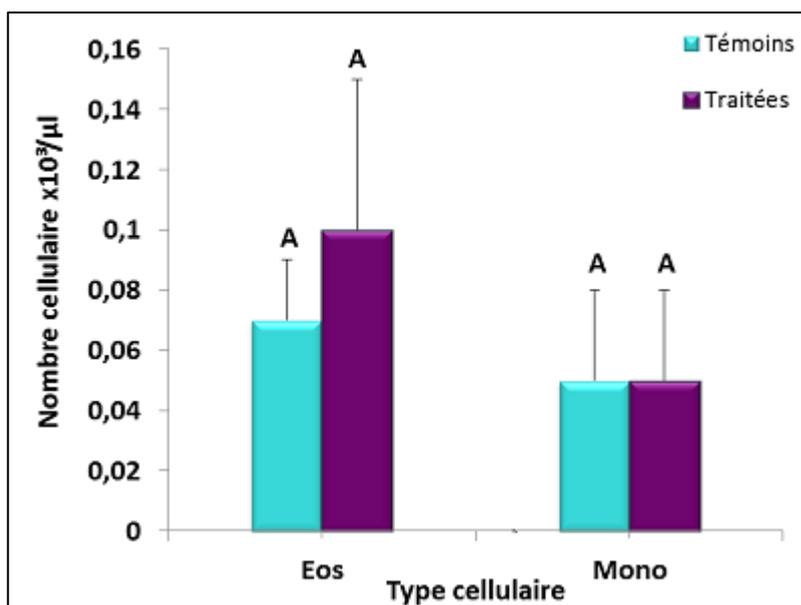


Figure 44: Variation du taux des éosinophiles et de monocytes

Eos : Eosinophiles, **Mono** : Monocytes

Lettre majuscule : Les moyennes qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes / Différence significative de Tukey ($P < 0,05$)

L'analyse statistique n'a révélé aucune différence significative en comparant le taux de l'ensemble des globules blancs entre les deux lots.

Quant aux plaquettes sanguines, une augmentation notable de leur nombre a été enregistrée chez les souris sensibilisées (**T** : $386 \pm 147 \times 10^3 \text{ cell}/\mu\text{l}$ et **Tr** : $627,75 \pm 54 \times 10^3 \text{ cell}/\mu\text{l}$). Une différence significative a été trouvée chez les souris traitées en comparaison avec celle des témoins à $P = 0,038$ (**Fig. 45**).

1.2.2. L'effet sur le liquide nasal et bronchoalvéolaire

Suite à l'instillation de l'extrait brut du *Cupressus sempervirens*, une augmentation remarquable du nombre de cellules dans le liquide du lavage nasal a été observée (**T** : $196,25 \pm 25,15 \times 10^9 \text{ cell/l}$ et **Tr** : $517,5 \pm 100 \times 10^9 \text{ cell/l}$). Une différence hautement significative a été enregistrée à $P = 0,002$. La même observation a été constatée avec le nombre des cellules du liquide bronchoalvéolaire (**T** : $241,9 \pm 58,37 \times 10^9 \text{ cell/l}$ et **Tr** : $333 \pm 108,23 \times 10^9 \text{ cell/l}$) (**Fig. 46**). En revanche, le test statistique a montré que cette différence est non significative.

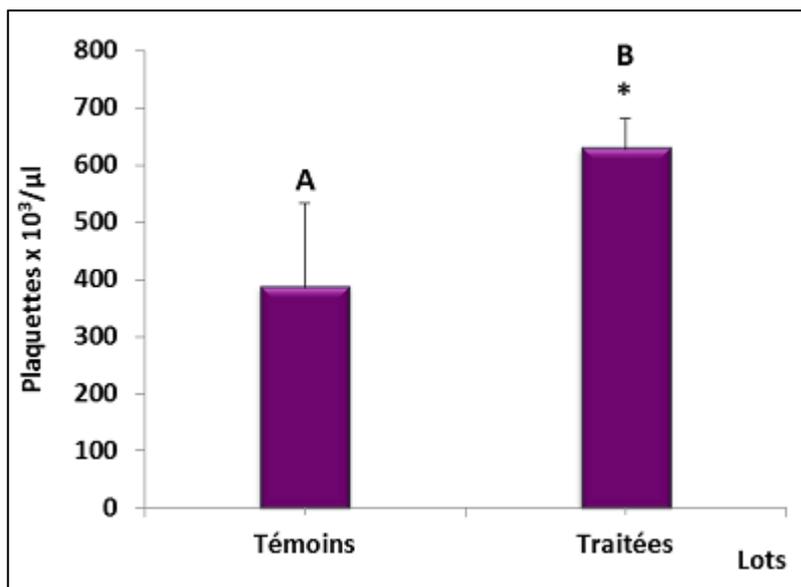


Figure 45 : Variation du taux des plaquettes

Différence significative de Dunnett (* $P < 0,05$)

Lettre majuscule : Les moyennes qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes / Différence significative de Tukey ($P < 0,05$)

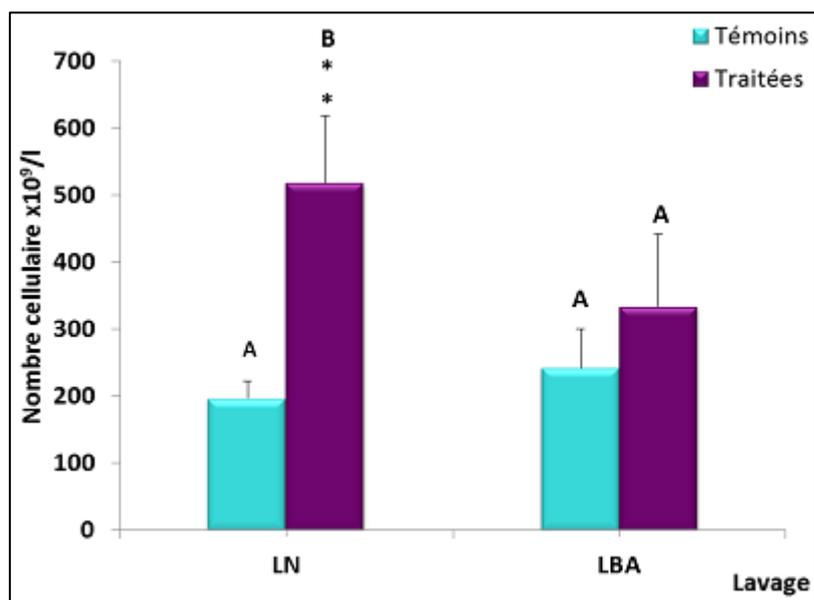


Figure 46 : Variation du nombre des cellules du liquide nasal et broncho-alvéolaire

LN : Liquide nasal, **LBA :** Liquide broncho-alvéolaire

Différence significative de Dunnett (* $P < 0,05$)

Lettre majuscule : Les moyennes qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes / Différence significative de Tukey ($P < 0,05$)

1.2.3. L'effet de l'extrait pollinique sur la rate

La sensibilisation des souris par l'extrait pollinique de cyprès vert a permis d'enregistrer une augmentation significative dans le nombre des splénocytes (**T** : $152,5 \pm 25 \times 10^9$ cell/l et **Tr** : $304,37 \pm 89,02 \times 10^9$ cell/l) (**Fig. 47**), dont $P = 0,029$.

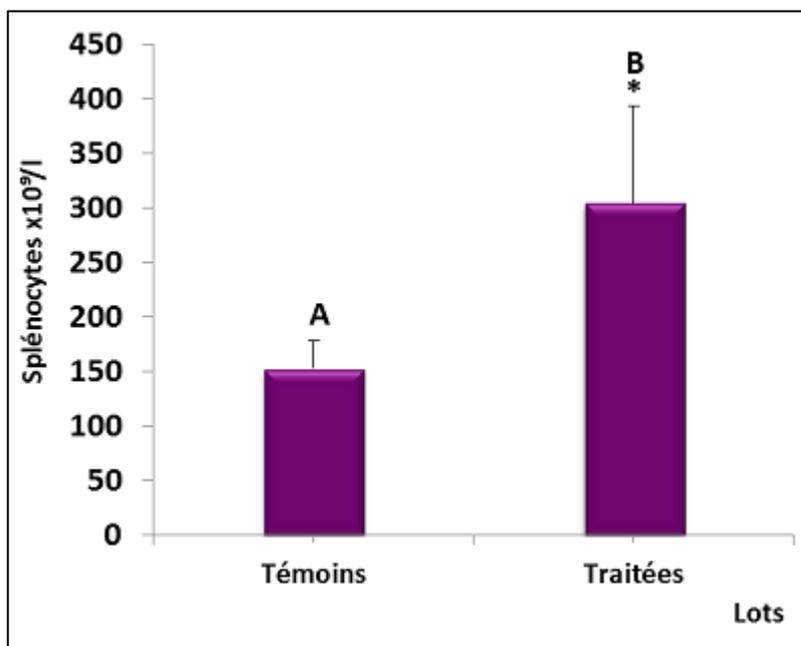


Figure 47 : Effet de la sensibilisation sur la rate

Différence significative de Dunnett ($*P < 0,05$)

Lettre majuscule : Les moyennes qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes / Différence significative de Tukey ($P < 0,05$)

1.2.4. Effet de la sensibilisation sur les poumons

Pour plus de confirmation des résultats déduits, des coupes histologiques de cet organe ont été réalisées (**Fig. 48**).

L'examen microscopique a montré chez les témoins, un poumon normal avec une simple congestion vasculaire, des alvéoles avec des cloisons inter-alvéolaires. La structure histologique semble normale. En effet, les parois alvéolaires sont formées par un ensemble de cellules dont des pneumocytes et des cellules endothéliales (**Fig. 48a**).

Pour les souris soumises à des instillations nasales avec l'extrait pollinique, un infiltrat inflammatoire péri-bronchiolaire chronique mononucléée a été bien remarqué avec présence de lymphocytes (**Fig. 48b**). Le traitement a aussi entraîné une diminution du diamètre alvéolaire.

Ceci pourrait être dû à un épaississement de la paroi alvéolaire par prolifération des fibres conjonctives.

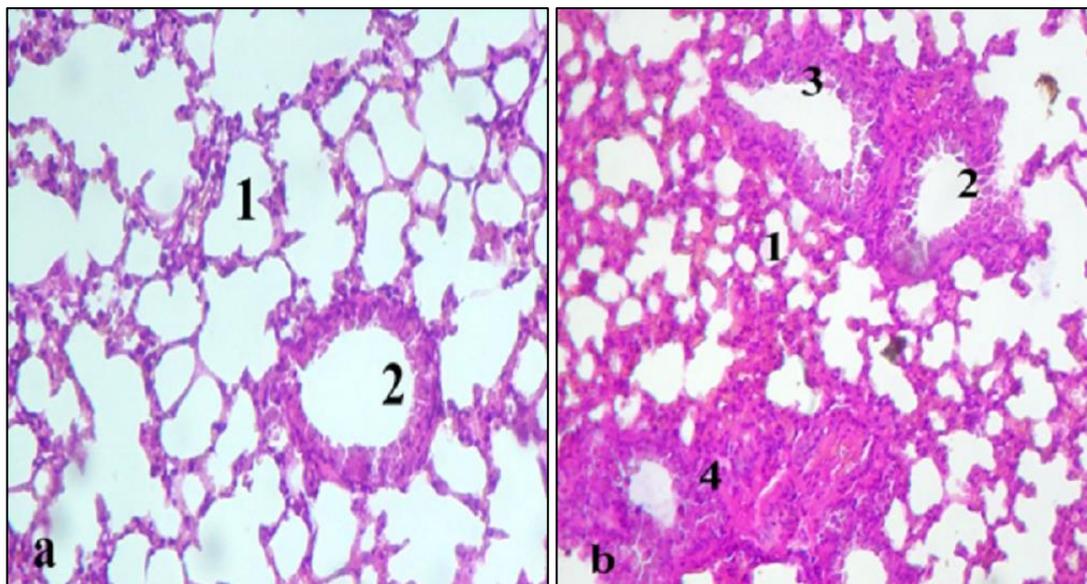


Figure 48: Coupe histologique des poumons des souris témoins et traitées (x250).

a) Poumon normal du témoin b) Poumon du traité avec l'extrait pollinique
 1-Alvéole, 2- Bronchiole, 3- Vaisseaux sanguin, 4-Infiltrat cellulaire

1.3. Effet des fractions (Fr1-Fr4) du *Cupressus sempervirens*

Suite à la précipitation de l'extrait brut du Cyprès vert sur sulfate d'ammonium, l'effet des quatre fractions (Fr1-Fr4) obtenues a été évalué. Cela est représenté dans les résultats ci-dessous.

1.3.1. L'effet sur la formule leucocytaire

Les résultats représentés dans la **figure 49** révèlent une augmentation non significative dans le taux des lymphocytes chez les souris traitées avec les fractions Fr 1, 2 et 3 respectivement ($4,18 \pm 1,55 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$; $3,73 \pm 2,15 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$; $3,87 \pm 1,26 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$) et une légère diminution chez le lot traité avec la Fr 4 ($3,21 \pm 0,47 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$) par rapport au lot témoin ($3,65 \pm 1,05 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$).

En revanche, une augmentation des taux des monocytes a été enregistrée après sensibilisation par toutes les fractions (**Fr1** : $0,73 \pm 0,58 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$; **Fr2** : $0,26 \pm 0,41 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$; **Fr3** : $0,19 \pm 0,16 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$; **Fr4** : $0,47 \pm 0,49 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$). Cependant, l'analyse statistique a démontré que cette augmentation est, seulement,

significative en comparant le lot traité avec la première fraction avec le lot témoin ($0,73 \pm 0,58 \times 10^3 \text{ cell}/\mu\text{l}$), soit $P=0,01$ (Fig. 50).

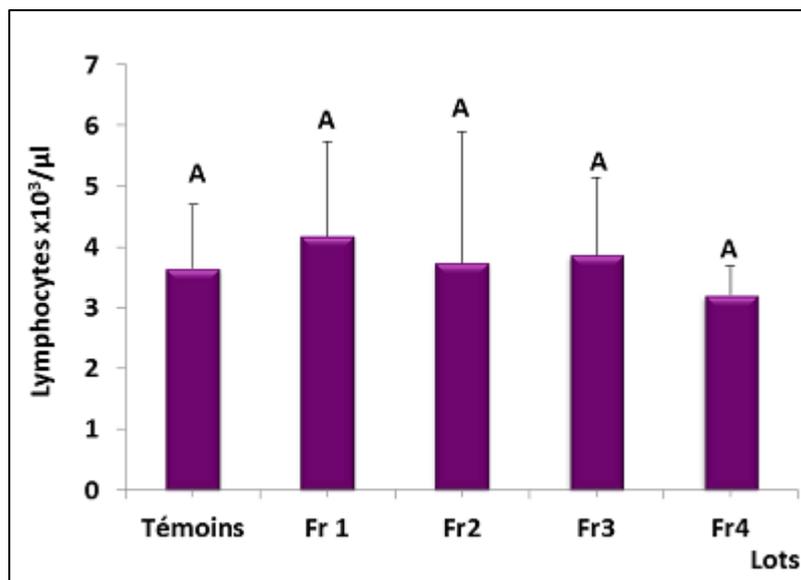


Figure 49 : Le nombre des lymphocytes

Lettre majuscule : Les moyennes qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes

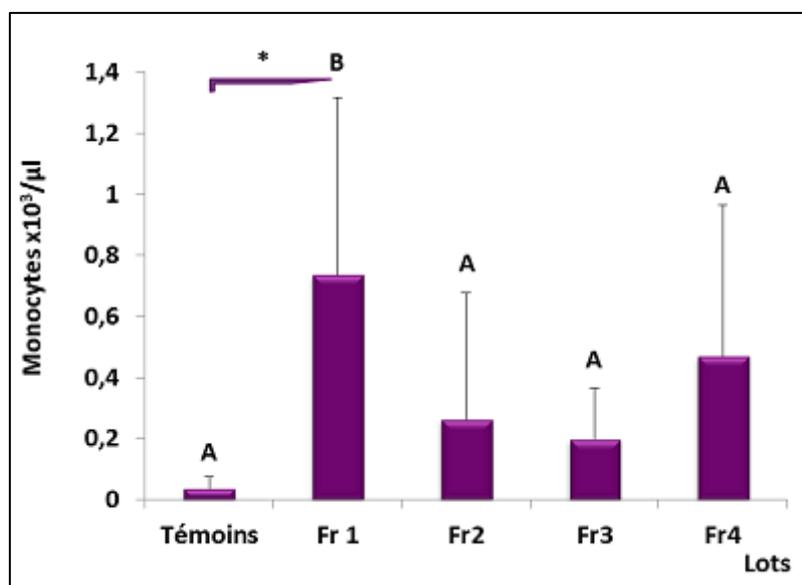


Figure 50 : Le nombre des monocytes

Différence significative de Dunnett ($*P<0,05$)

Lettre majuscule : Les moyennes qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes / Différence significative de Tukey ($P<0,05$)

Concernant les polynucléaires neutrophiles, l'instillation nasale des fractions Fr1 ; Fr2, Fr3 et Fr4 a diminué, de façon significative, leur nombre à $0,47 \pm 0,33 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$; $0,99 \pm 0,37 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$; $1,31 \pm 0,52 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$ et $0,98 \pm 0,43 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$, respectivement, par rapport à leur nombre chez les souris témoins ($3,53 \pm 1,26 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$) (soit $P=0,000$) (Fig. 51).

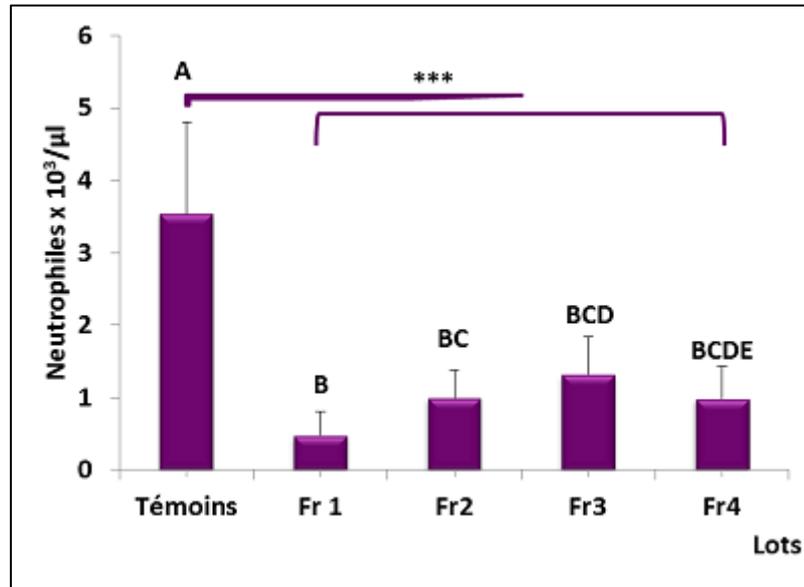


Figure 51 : Variation du nombre des cellules polynucléaires neutrophiles

Différence significative de Dunnett (***) $P < 0,001$)

Lettre majuscule : Les moyennes qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes / Différence significative de Tukey ($P < 0,05$)

Des résultats opposés ont été obtenus pour le nombre d'éosinophiles. La stimulation avec les fractions Fr1, Fr2, Fr3 et Fr4 obtenues à partir de l'extrait brut de pollen de Cyprés, a augmenté le nombre d'éosinophiles à : $0,01 \pm 0,01 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$; $0,02 \pm 0,01 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$; $0,02 \pm 0,02 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$; $0,04 \pm 0,03 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$, respectivement par rapport au témoin : $0,005 \pm 0,005 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$. Mais l'analyse statistique n'a révélé aucune différence significative à l'exception du lot traité par la fraction Fr4 ($P=0,02$ en le comparant avec le lot des témoins) (Fig.52).

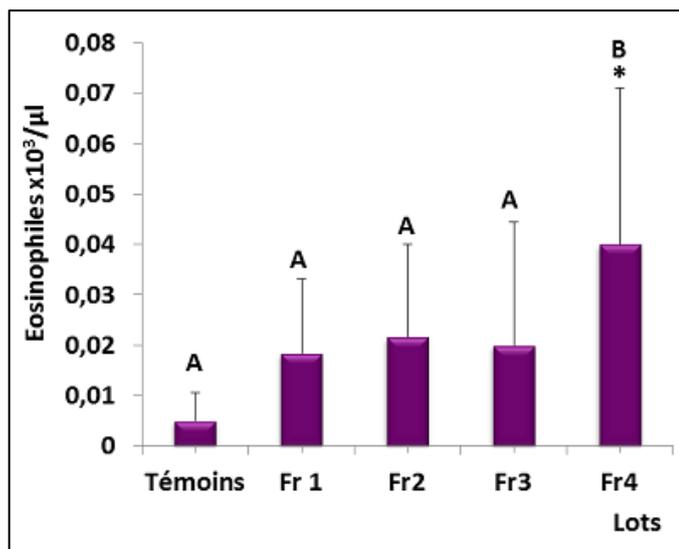


Figure 52 : Variation du nombre des cellules polynucléaires éosinophiles

Différence significative de Dunnett (* $P < 0,05$)

Lettre majuscule : Les moyennes qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes / Différence significative de Tukey ($P < 0,05$)

En parallèle du taux des éosinophiles, celui des basophiles a été significativement augmenté suite à la sensibilisation par la Fr4 à $0,1 \pm 0,07 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$, par rapport aux souris témoins ($0,02 \pm 0,03 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$), soit $P = 0,01$. Ainsi, la réponse aux autres fractions a été avec les taux suivants: $0,02 \pm 0,01 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$ (**Fr1**); $0,02 \pm 0,01 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$ (**Fr2**) et $0,03 \pm 0,01 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$ (**Fr3**) (**Fig. 53**).

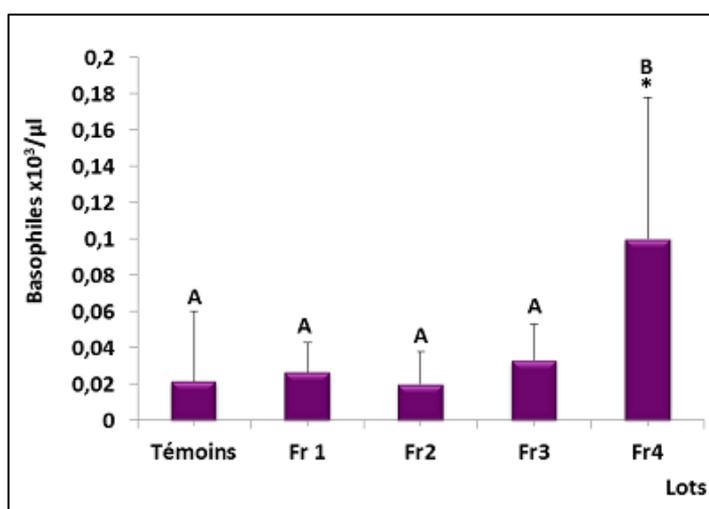


Figure 53 : Variation du nombre des basophiles

Différence significative de Dunnett (* $P < 0,05$)

Lettre majuscule : Les moyennes qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes / Différence significative de Tukey ($P < 0,05$)

Pour ce qui est taux des plaquettes, une augmentation notable et significative a été enregistrée chez les souris mises sous des instillations nasales des fractions Fr3 et Fr4 ($702 \pm 87,33 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$ et $726,5 \pm 148,22 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$, respectivement) par rapport aux souris témoins ($484,66 \pm 27,11 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$) soit ($P=0,04$, $P=0,02$ respectivement). Une légère augmentation a été notée chez le lot traité par la Fr1 ($565 \pm 212,97 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$). Tandis qu'une diminution, non significative, des thrombocytes a été remarquée chez les souris traitées par la Fr2 à $396,83 \pm 164,95 \times 10^3 \text{cell}/\mu\text{l}$ (**Fig. 54**).

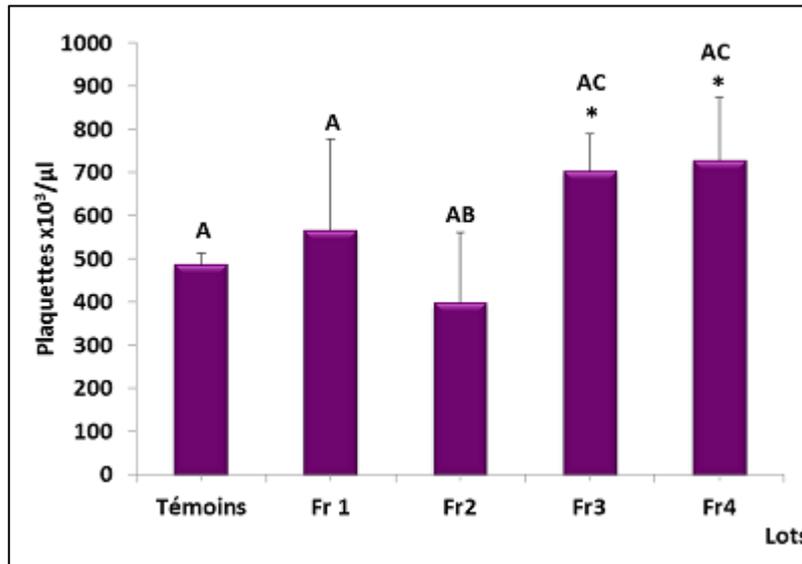


Figure 54 : Variation du taux des plaquettes

Différence significative de Dunnett (* $P < 0,05$)

Lettre majuscule : Les moyennes qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes / Différence significative de Tukey ($P < 0,05$)

1.3.2. L'effet des fractions sur le liquide du lavage bronchoalvéolaire et nasal

Après l'instillation des différentes fractions **Fr** obtenues à partir de l'extrait pollinique de *C. sempervirens*, une augmentation très significative du nombre des cellules dans le lavage broncho-alvéolaire (LBA) a été observée dans les lots sensibilisés avec la fraction Fr1 et Fr2 ($507,5 \pm 162,84 \times 10^9 \text{cell}/\text{l}$ et $389,16 \pm 158,59 \times 10^9 \text{cell}/\text{l}$, respectivement) par rapport au lot témoin ($273 \pm 71,07 \times 10^9 \text{cell}/\text{l}$) soit ($P < 0,01$). Par contre, une diminution non significative a été remarquée chez les souris traitées avec la fraction Fr3 ($173,33 \pm 47,74 \times 10^9 \text{cell}/\text{l}$) et la fraction Fr4 ($176,33 \pm 42,47 \times 10^9 \text{cell}/\text{l}$). Cependant, l'analyse statistique a révélé une présence d'une différence significative entre les lots traités par les différentes fractions (**Fig.55**).

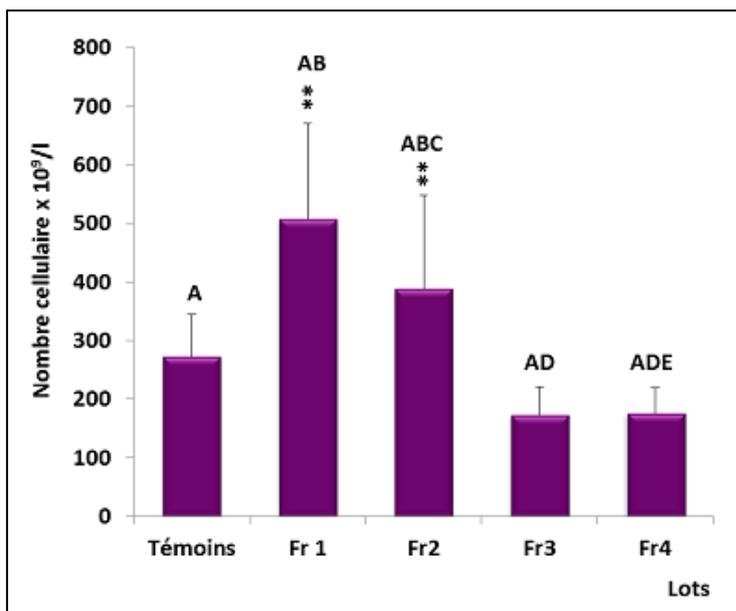


Figure 55 : variation du nombre cellulaire dans le liquide du lavage bronchoalvéolaire

Différence significative de Dunnett (** $P < 0,01$)

Lettre majuscule : Les moyennes qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes / Différence significative de Tukey ($P < 0,05$)

Dans l'ensemble des lots, l'augmentation du nombre cellulaire a été aussi remarquée, dans le liquide du lavage nasal, par rapport aux souris témoins, dont une signification statistique a été notée, seulement, chez le lot traité par la Fr1. Les taux enregistrés sont comme suit : **T** : $188,91 \pm 25,26 \times 10^9 \text{ cell/l}$, **Fr1** : $322,91 \pm 140,23 \times 10^9 \text{ cell/l}$, **Fr2** : $303,75 \pm 54,35 \times 10^9 \text{ cell/l}$, **Fr3** : $278,33 \pm 56,64 \times 10^9 \text{ cell/l}$ et **Fr4** : $275,25 \pm 21,82 \times 10^9 \text{ cell/l}$ (**Fig.56**).

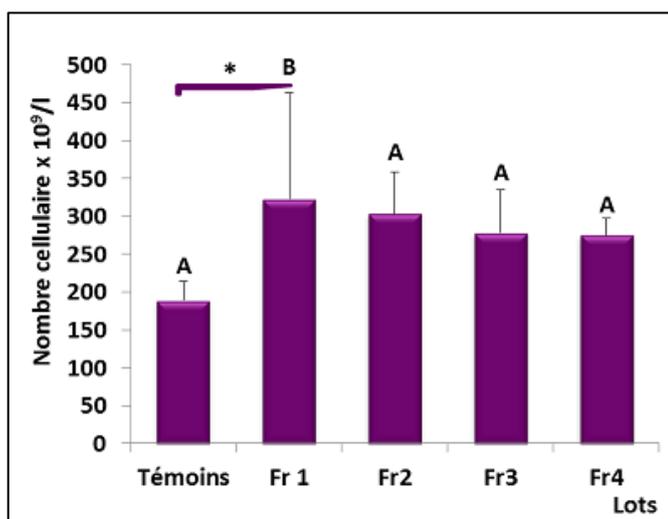


Figure 56 : variation du nombre cellulaire dans le liquide du lavage nasal

Différence significative de Dunnett (* $P < 0,05$)

Lettre majuscules : Les moyennes qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes / Différence significative de Tukey ($P < 0,05$)

1.3.3. L'effet des fractions sur le taux des splénocytes

La numération cellulaire des cellules spléniques a permis de mettre en évidence une augmentation significative chez les souris ayant subi des instillations nasales des fractions Fr1 ($398,75 \pm 76,80 \times 10^9 \text{ cell/l}$) et Fr2 ($363,75 \pm 72,40 \times 10^9 \text{ cell/l}$), par rapport aux souris sensibilisées par les fractions Fr3 ($231,25 \pm 61,30 \times 10^9 \text{ cell/l}$) et Fr 4 ($233,75 \pm 60,67 \times 10^9 \text{ cell/l}$) ainsi que les témoins ($150,25 \pm 23,24 \times 10^9 \text{ cell/l}$) (**Fig. 57**).

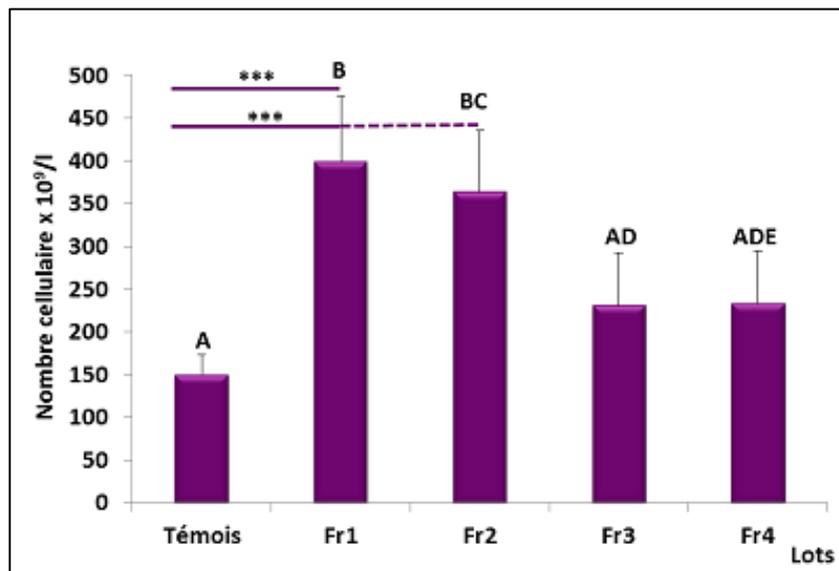


Figure 57 : variation du nombre des cellules splénique

Différence significative de Dunnett (***) $P < 0,01$;

Lettre majuscule : Les moyennes qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes / Différence significative de Tukey ($P < 0,05$)

1.3.4. L'étude histologique des poumons

L'étude histologique a permis de mettre en évidence différents aspects tissulaires, qui se distinguent d'un lot à un autre. L'examen microscopique a montré chez les souris témoins, un poumon avec une structure histologique normale. En effet, les parois bronchiques ont été formées par des pneumocytes et des cellules endothéliales (**Fig.58a**). Cependant, les souris sensibilisées ont présenté différentes modifications tissulaires.

Chez les souris exposées à la fraction Fr1, des cellules inflammatoires intra-épithéliales ainsi qu'un œdème, illustrant la migration cellulaire, ont été remarqués (**Fig.58b**).

Quant aux animaux traités avec la fraction Fr2, nous avons observé une importante lymphocytose intra-épithéliale et des cellules polynucléaires (PN) dans la lumière, les parois bronchiques étaient hyperplasiques avec un infiltrat inflammatoire péri-bronchique, essentiellement lymphocytaire. Il était également composée de PN et avec une présence considérable des cellules épithéliales. Un œdème péri-bronchique et péri-vasculaire a également été noté chez ce lot (**Fig.58c**).

La coupe histologique des poumons de souris sensibilisées par la fraction Fr3 a été caractérisée par une forte teneur en PN dans la lumière, un infiltrat péri-bronchiolaire polymorphe composé de PN, lymphocytes et des plasmocytes ainsi qu'un œdème péri-vasculaire et péri-bronchique (**Fig.58d**).

Enfin, la sensibilisation par la fraction Fr4, a entraîné la formation des infiltrats inflammatoires péri-bronchiolaires denses et polymorphes (lymphocytes et PN) ainsi qu'une lymphocytose intra-épithéliale (**Fig.58e**).

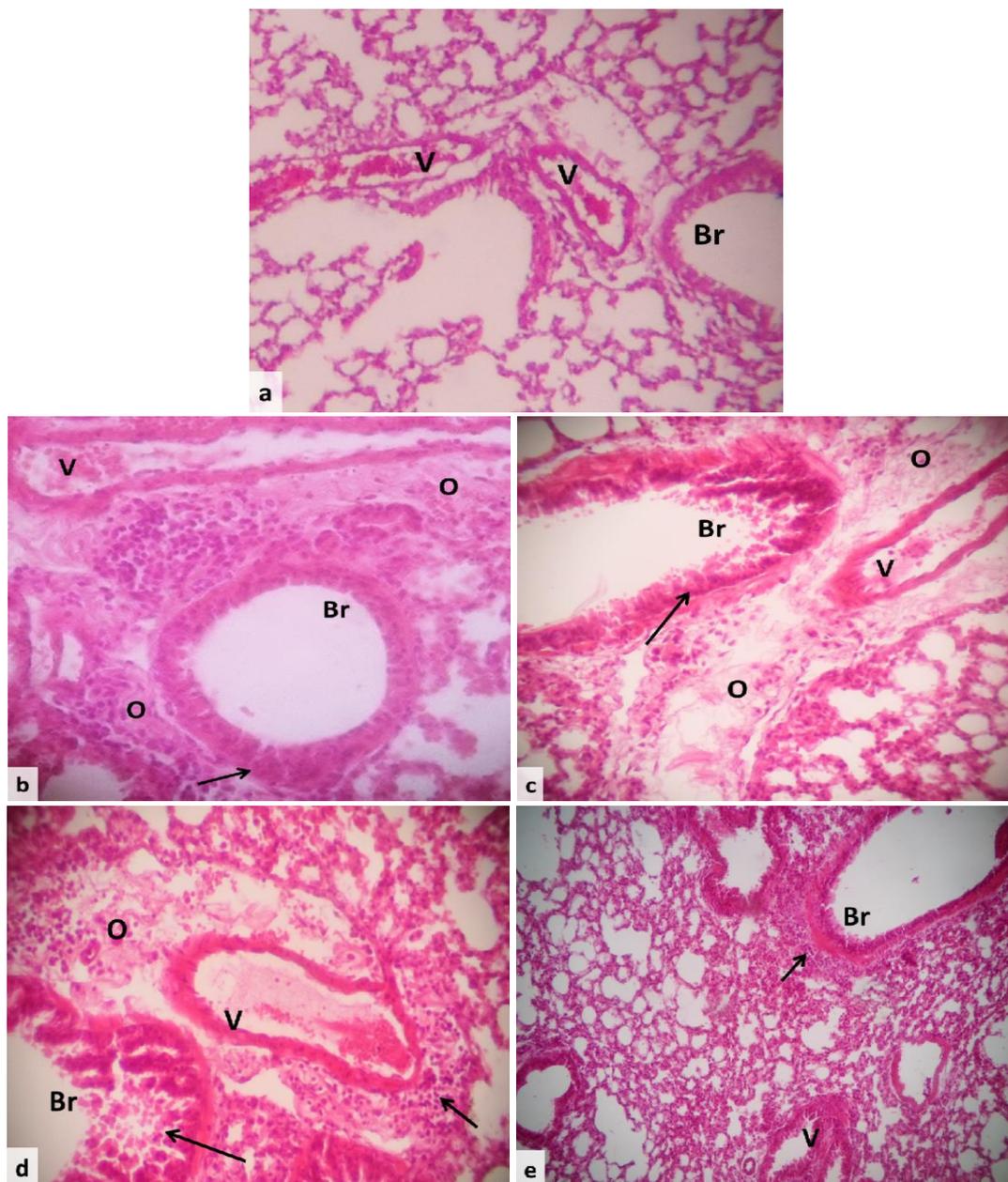


Figure 58: Etude histologique des poumons des souris témoins et traitées (x 250).

a : Témoin, **b-e**/traitées par: **b** - Fr1, **c** - Fr2, **d** - Fr3, **e** - Fr4,

Br: Bronchiole, **V**: vaisseaux, **O**: Œdème, (—→): Infiltrat inflammatoire

1.4. Identification des allergènes dans les fractions Fr1-Fr4

L'identification des allergènes présents dans chaque fraction a été réalisée par la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide ultra performance (MS-UPLC). Cette technique nous a permis de mettre en évidence la présence de l'allergène majeur Cup s 1 dans toutes les fractions. Cependant, d'autres protéines ont été détectées dans la fraction Fr4, dont la pathogenesis-related protein (Cup s 3) et un des allergènes du *Cupressus arizonica* (Cup a 1) (**Tab.7**).

Tableau 7 : Les différents allergènes présents dans chaque fraction

Fractions	Fr 1	Fr 2	Fr 3	Fr 4		
Description	Cup s1	Cup s1	Cup s1	Cup s1	Cup s3	Cup a 1
# Unique Peptides	2	3	3	2	2	2
# Peptides	2	3	3	5	2	5
# AAs	367	367	367	367	225	346
MW [kDa]	39.8	39.8	39.8	39.8	23.7	37.6
pI	6,58	6,58	6,58	6,58	5,12	6,39

AAs: Acides aminés ; **MW:** Poids moléculaire; **pI:** point Isoélectrique.

Cette approche protéomique nous a permis d’obtenir les différentes séquences peptidiques de chaque allergène. Ces dernières sont démontrées dans le tableau ci-dessous (Tab.8).

Tableau 8: Différentes séquences des différents allergènes

Allergène	Séquences
Allergènes majeur (Cup s 1)	VTVAFNQFGPNAGQR TEETNIYNSNEAFK VMLLGHDDTYDDDK ALWIIFSQNmNIK GADVHLGNGGPcLFMR
Pathogenesis-related protein (Cup s 3)	LDQGQTWTVNLAAGTASAR ADINAVcPSELK
Cup a1	VTVAFNQFGPNAGQR VMLLGHDDTYDDDK ALWIIFSQNmNIK AEDTNIYNSNEAFK DNPIDScWR

Cup : *Cupressus* ; **s :** *sempervirens* ; **a :** *arizonica* ; **Lettre des séquences (Voir Annexe)**

1.5. Purification et dosage de l'allergène majeur du *Cupressus sempervirens* (Cup s 1)

Afin d'étudier le potentiel inflammatoire de l'allergène majeur, loin de toute réaction croisée avec les autres allergènes (Cup s 3 et Cup a 1), le Cup s 1 a été purifié à partir du pool des fractions avec chromatographie échangeuse d'ion, cela nous a permis d'obtenir plusieurs fractions, contenant des concentrations différentes du Cup s 1 (**Fig. 59**).

Selon le chromatogramme, l'allergène majeur est présent notablement dans la gamme allant de la fraction A15 jusqu'à la fraction B8.

Les concentrations du Cup s 1 ont été déterminées par la méthode de Bradford. Puis, cinq concentrations, dont 0,02µg/µl, 0,06µg/µl, 0,1µg/µl, 0,3µg/µl et 0,9µg/µl, ont été choisies pour le test *in vitro*.

1.6. Viabilité cellulaire et test de cytokine

Les cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B/ B2B) ont été mises en culture avec les différentes concentrations de l'allergène majeur du Cypres commun, pendant 24h.

Suite à l'examen microscopique, un aspect vital, avec une croissance cellulaire normale, a été visualisé dans les puits des cellules exposées à l'allergène par rapport aux cellules des puits témoins (**Fig. 60**).

La viabilité de ces cellules a été évaluée par le test MTS. La réduction des sels de tétrazolium s'est manifestée par le virage de la couleur du jaune vers le brun, illustrant ainsi l'activité cellulaire (**Fig. 61**).

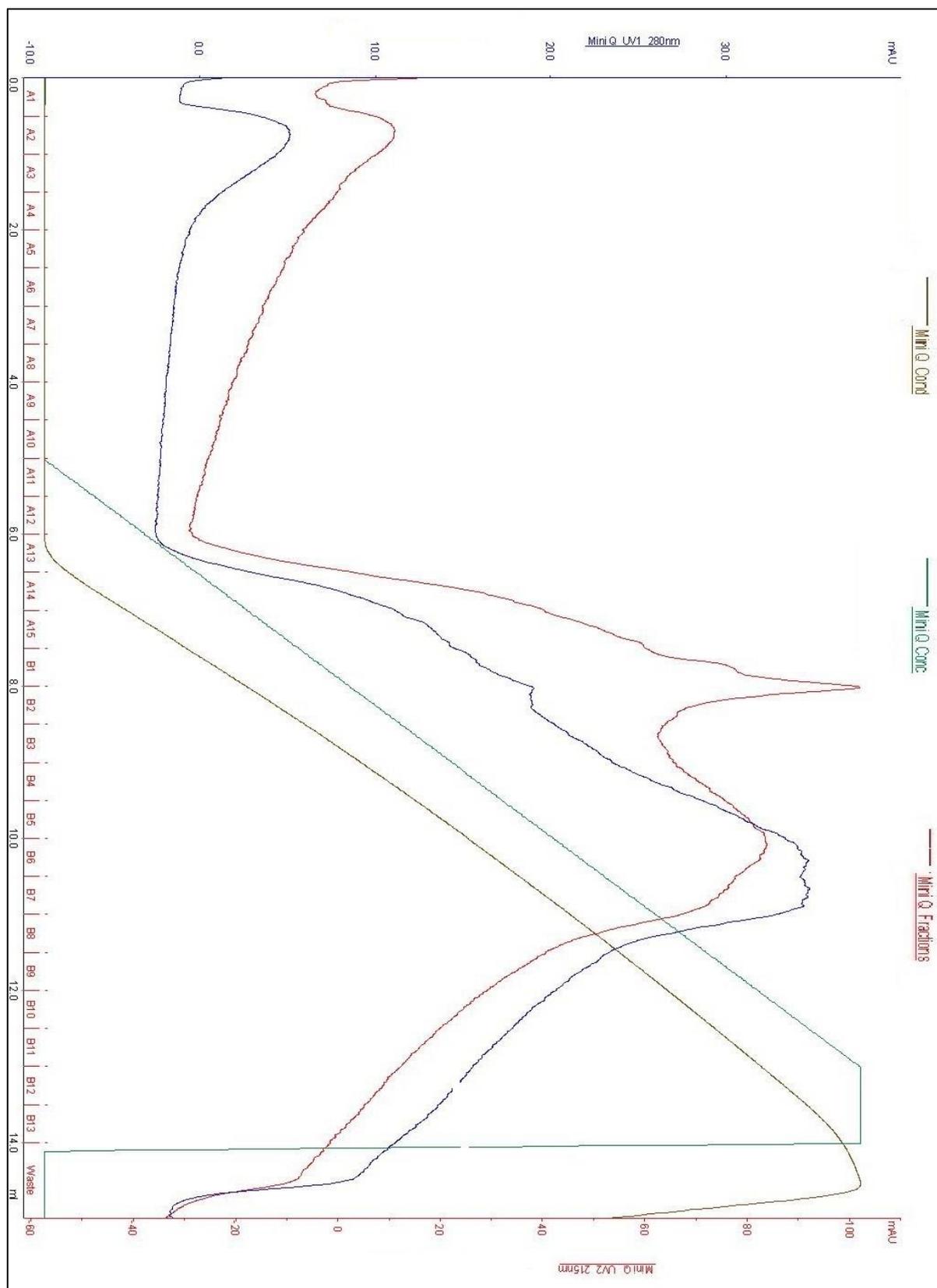


Figure 59 : Chromatogramme du fractionnement du Cup s 1

UV1 :280nm ; UV2 :215nm ; Cond : Conductivité de l'éluant ; Conc : Concentration du Na Cl ;

mAU : mass Absorbance Unit

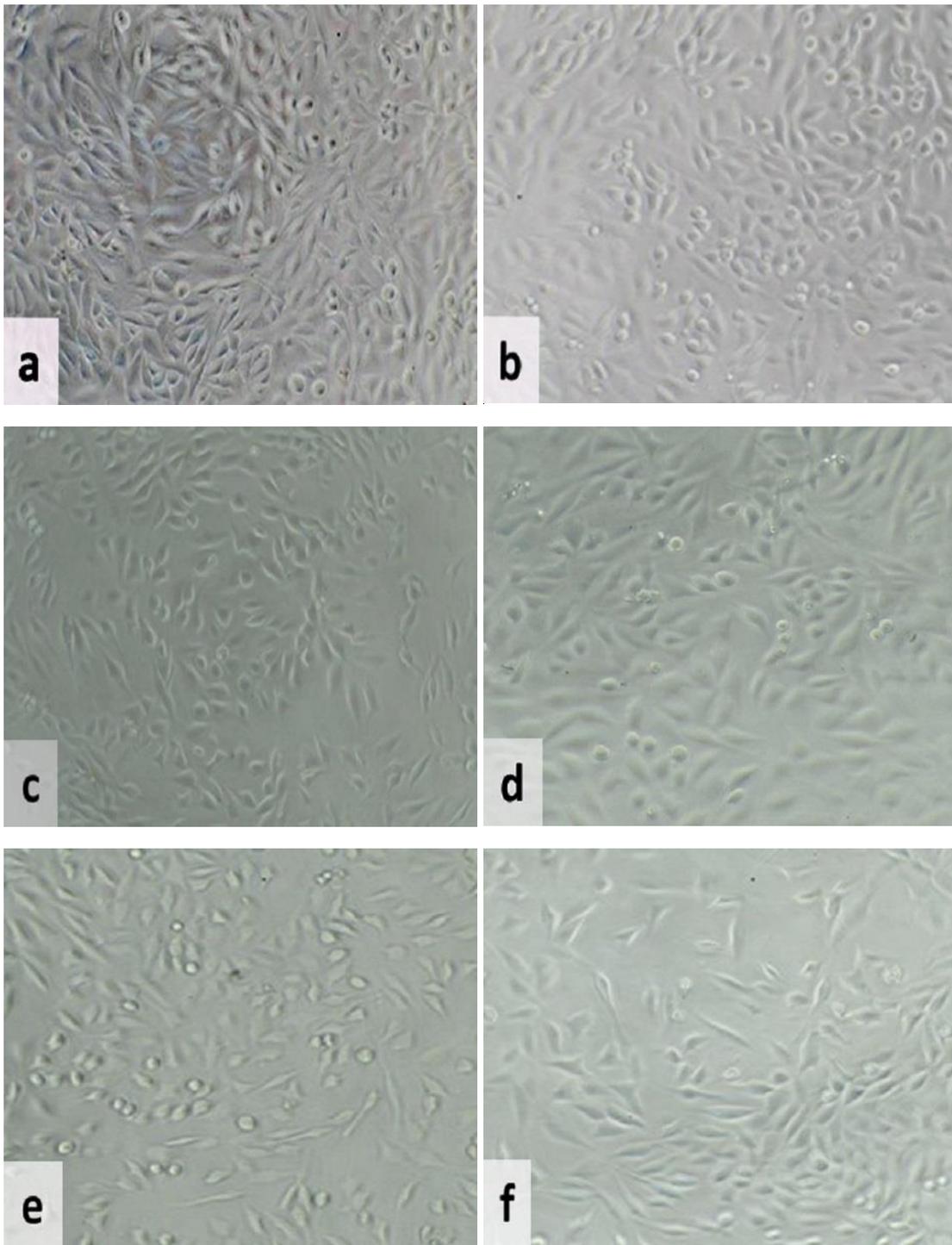


Figure 60 : Aspect de la croissance des cellules BEAS-2B

a : Témoin, **b-f** / traitées avec : **b** 0,02µg/µl, **c** : 0,06µg/µl, **d** : 0,1µg/µl, **e** : 0,3µg/µl, **f** : 0,9µg/µl

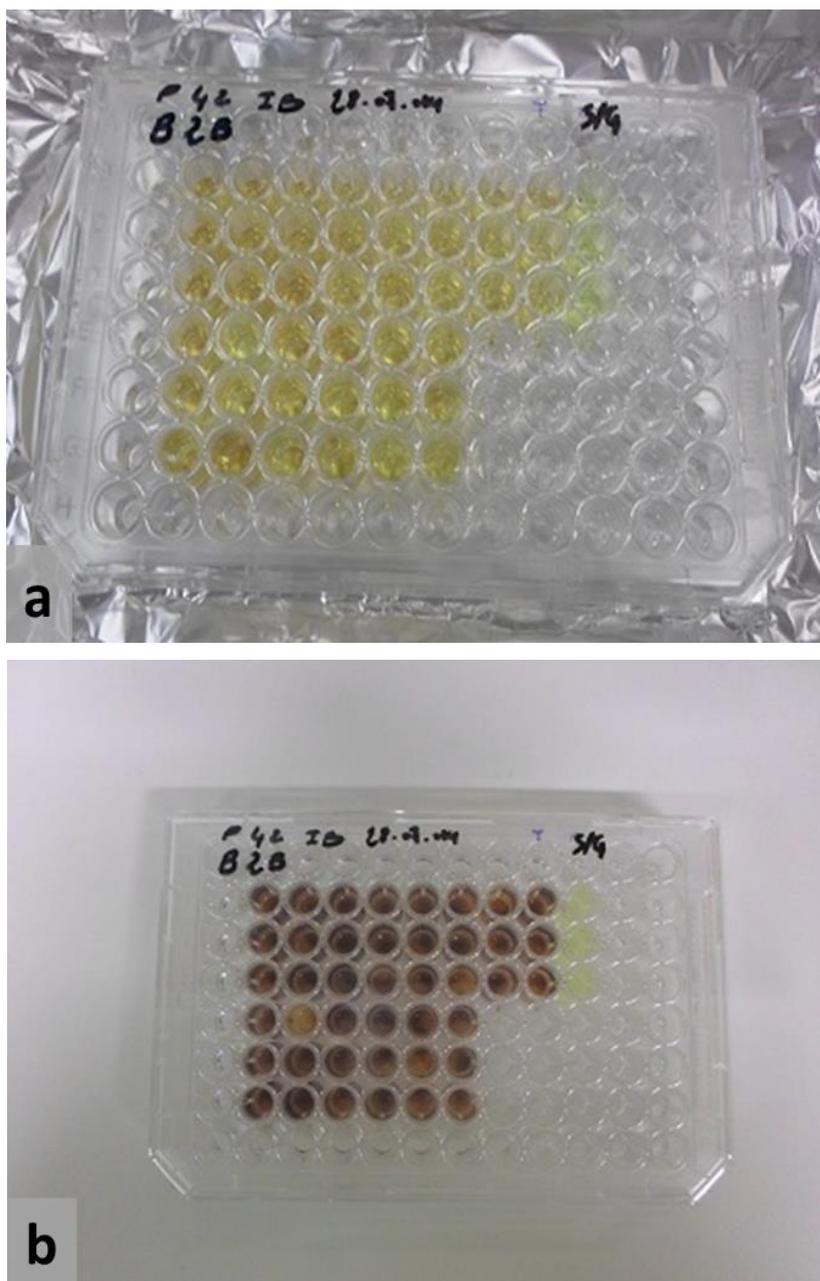


Figure 61 : Viabilité testée par MTS

a : Avant incubation avec le MTS, **b** : après 1h d'incubation

Colonnes 2-7 : cellules traitées avec l'allergène ; **Colonnes 8 et 9** : Témoin ;

Colonne 10 : Blanc sans cellules

Les résultats, obtenus suite à la lecture de la plaque, ont montré que $99,57 \pm 12,74\%$, $99,2 \pm 10,37\%$, $97,18 \pm 13,64\%$, $98,81 \pm 21,17\%$, $96,45 \pm 8,79\%$ et $96,33 \pm 4,85\%$ des cellules BEAS-2B, respectivement, sont viables (témoin considéré comme 100%). Cette différence est non-significative par rapport aux cellules témoins (**Fig.62**).

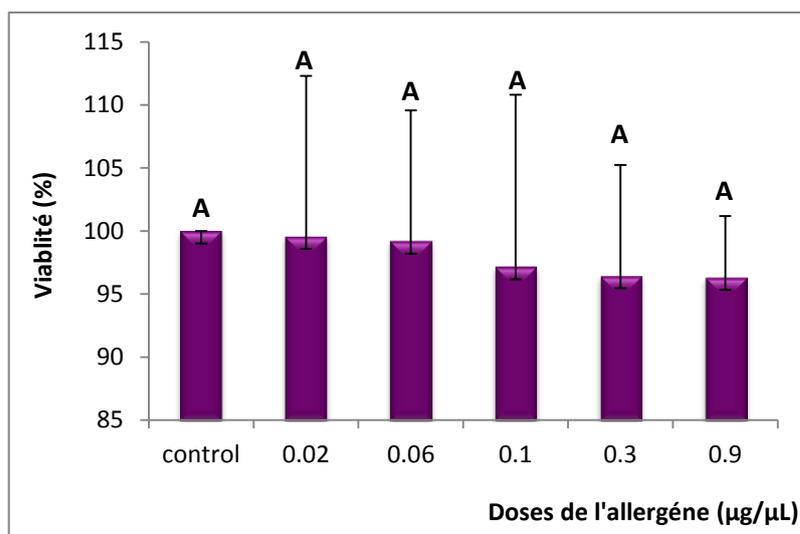


Figure 62 : Pourcentage de viabilité des cellules BEAS-2B traitées avec l'allergène majeur du *Cupressus sempervirens*

Lettre majuscule : Les moyennes qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes / Différence significative de Tukey ($P < 0,05$)

1.7. Dosage des cytokines

La libération de l'IL-8, par les cellules exposées aux différentes concentrations du Cup s 1, a montré une diminution significative dans les surnageants des cellules traitées avec 0,02µg/µl de l'allergène ($138,86 \pm 9,5$ pg/ml) ($P < 0,001$), ainsi qu'une augmentation hautement significative ($P = 0,000$) a été obtenue avec les cellules exposées à 0,1µg/µl, 0,3µg/µl et 0,9µg/µl de l'allergène ($403,81 \pm 11,23$ pg/ml ; $465,58 \pm 24,8$ pg/ml et $549,47 \pm 54,8$ pg/ml) respectivement. La libération dans le surnageant des cellules BEAS-2B traitées avec 0,06µg/µl ($199,68 \pm 19,75$ pg/ml) ($P = 0,977$) a été presque similaire aux cellules témoins ($209,99 \pm 14,86$ pg/ml). Cependant, le test Tukey a permis de déduire la présence de différence significative entre les cellules traitées par les différentes concentrations (**Fig.63**).

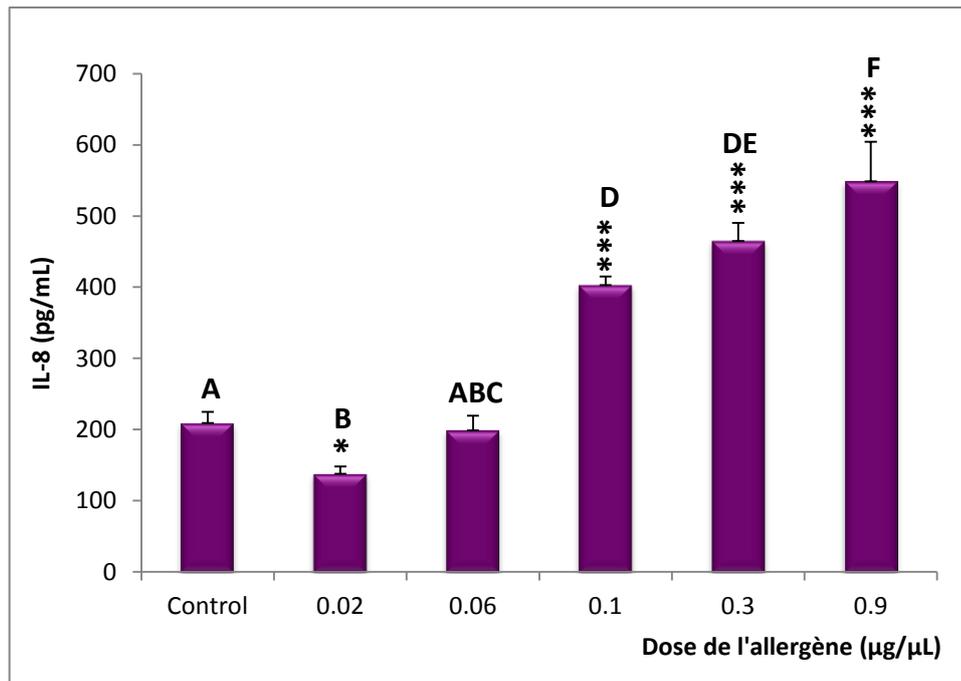


Figure 63 : Concentration de l'IL-8 sécrétée par les cellules BEAS-2B

Différence significative de Dunnett (* $P < 0,05$) ; (***) $P < 0,001$)

Lettre majuscule : Les moyennes qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes / Différence significative de Tukey ($P < 0,05$)

D'autre part, la culture des cellules avec 0,02 µg/µl et 0,06 µg/µl de Cup s 1 a induit une diminution hautement significative de l'IL-6 à 299,85±8,31 pg/ml et 281,87±10,16 pg/ml respectivement ($P < 0,001$). En revanche, l'exposition à des concentrations élevées (0,1 µg/µl, 0,3 µg/µl et 0,9 µg/µl) a stimulé la libération de cette interleukine (795,64±42,89 pg/ml, 905,34±118,21 pg/ml, 1228,69±8,17 pg/ml) respectivement, voir significative, en tant qu'une réponse aux concentrations de 0,3 µg/µl et 0,9 µg/µl par rapport aux cellules témoins (727,03±10,65 pg/ml). La différence significative de Tukey a été obtenue aussi entre les différentes concentrations (**Fig.64**).

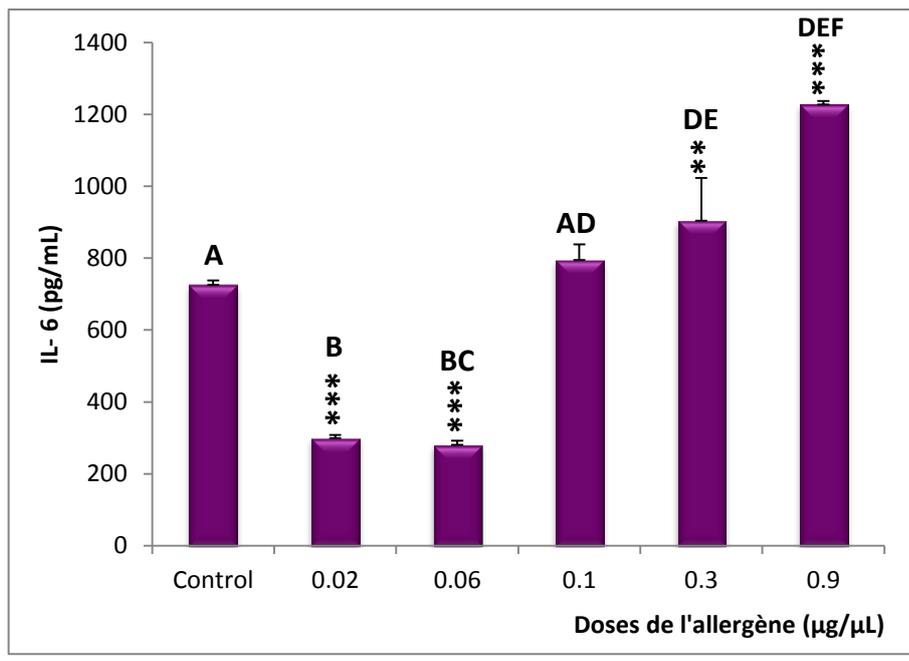


Figure 64 : Concentration de l'IL-6 sécrétée par les cellules BEAS-2B

Différence significative de Dunnett (** $P < 0,01$) ; (***) $P < 0,001$),

Lettre majuscule : Les moyennes qui ne partagent pas la même lettre sont significativement différentes / Différence significative de Tukey ($P < 0,05$)

2. Discussion

L'allergie au Cupressaceae est une pollinose d'hiver, dans le monde entier, provoquée par plusieurs espèces (Caimmi *et al.*, 2012). Le rôle de celles appartenant au genre « Cupressus », dans cette pollinose, a été clairement démontré (Cortegnano *et al.*, 2004), dont le *Cupressus sempervirens* (Cyprés commun). Cependant, la plantation à grande échelle, du Cyprés commun dans le cadre décoratif et jardinage, a contribué à la propagation de grandes quantités de pollen, qui est devenu un polluant biologique majeur dans le bassin méditerranéen (Charpin *et al.*, 2005). Cette espèce, répandue notamment en Algérie, et typiquement à Oued Zenati, a fait l'objet de la présente étude.

En évaluant la sensibilisation d'un modèle animal vis-à-vis l'extrait pollinique brut du *C. sempervirens* et les différentes fractions issues suite à une précipitation sur sulfate d'ammonium, des modifications au niveau des paramètres sanguins ont été enregistrées, dont une augmentation du nombre des lymphocytes. De point de vue immunologique et suite à leur déposition sur l'épithélium muqueux, les allergènes polliniques sont internalisés et traités par des cellules présentatrices d'antigène (Roitt et Rabson, 2002). Il est bien connu que les lymphocytes T helper (Th) jouent un rôle clé dans les réactions inflammatoires par la libération de cytokines. Dans les cas des hypersensibilités immédiates, ces lymphocytes se différencient en lymphocytes Th₂ caractérisés par la production d'IL-4, IL-5 et IL-6 (Berthe Ahui *et al.*, 2008), favorisant d'une part la synthèse des IgE et améliorant, d'autre part, une éosinophilie des voies aériennes et la production de mucus dans les poumons (Berthe Ahui *et al.*, 2008). Selon la littérature, les individus allergiques ont, non seulement, dans leur sang de grandes quantités de lymphocytes Th₂ spécifiques d'allergènes, mais aussi chacune de ces cellules produit plus d'IL-4 que celle d'un individu normal (c'est-à-dire non allergique) (Roitt et Rabson, 2002).

Egalement pour les monocytes, la sensibilisation avec les différentes fractions a entraîné une augmentation de leur nombre, surtout la fraction (Fr1). Selon Demoly (2015), une augmentation en nombre, chez le rhinitiques allergiques, de ces leucocytes est enregistré, illustrant leur contribution dans les réactions allergiques. Une production accrue de monocytes est ainsi suscitée pour se différencier en macrophages ou cellules dendritiques sous conditionnement par des facteurs de croissance et des cytokines locales pro-inflammatoires (Shi et Pamer, 2011).

Certaines études ont montré que la différenciation des monocytes en cellules dendritiques est beaucoup plus importante dans des conditions inflammatoires (**Plantinga et al., 2013**), à certains moments de l'inhalation des allergènes, la barrière des cellules épithéliales du poumon produisent des chimiokines pro-inflammatoires comme CCL2 et CCL7 qui agissent sur la moelle osseuse pour augmenter la libération de CCR2 des monocytes (**Hammad et al., 2009**). Lorsque ces monocytes atteindront la muqueuse des voies aériennes, en tant que partie d'une réponse inflammatoire, ils peuvent contribuer à une hausse importante du complexe d'histocompatibilité de classe II (CMH II) et des CD11c et donner ainsi des cellules dendritiques dérivées de monocytes (moDCs) (**Robays et al., 2007**). De plus, cette lignée cellulaire peut être entièrement capable de favoriser l'immunité cellulaire de type Th1 (**Wüthrich et al., 2012**).

Toutefois, **Pacciani et al. (2010)** ont montré que chez les patients allergiques, les cellules dendritiques dérivées de monocytes peuvent être reprogrammées pour orienter la réponse lymphocytaire sur le versant T régulateur Tr1 (associé à la tolérance) plutôt que Th2 (associé à l'allergie). Cette reprogrammation est obtenue *in vitro* en supplémentant le milieu des cellules dendritiques en interleukine-10. Cependant, on peut dire que les monocytes jouent un rôle modulateur dans les réactions allergiques.

Quant aux neutrophiles, les instillations nasales répétées de l'extrait brut et ses quatre fractions, ont provoqué une diminution remarquable de leur nombre. Cela peut être dû au fait que ces cellules représentent la sous population majoritaire et la première à être recrutée lors d'une détection d'un problème par le système immunitaire (**Anceriz, 2008**). Dans les circonstances des hypersensibilités, leur diminution est due à leur rapide et massive migration vers le site inflammatoire (**Milani et al., 2011**). Une étude sur les allergies aux acariens a démontré que la stimulation de ces cellules polynucléaires peut induire des dommages tissulaires, responsables de l'inflammation allergique des voies respiratoires (**Yamaoka et al., 1996**).

En revanche, chez les souris qui ont subi des sensibilisations au Cyprès commun, les polynucléaires éosinophiles avaient tendance à s'exprimer par une augmentation surtout par la fraction (Fr4). Selon **Lacy et Moqbel (2001)**, Ces cellules, sont considérées comme les principales cellules effectrices secondaires de l'allergie immédiate de l'homme. Leur rôle pro-inflammatoire a été mis en évidence dans l'asthme ainsi qu'une augmentation de leur nombre est observée dans la rhinite allergique (**Borges, 2008**). Les éosinophiles prolifèrent sous

l'effet de l'IL-5 sécrétée par les lymphocytes Th₂ activés (**Borges, 2008**) et sont ensuite recrutés au site de l'inflammation, d'une part, grâce à l'interaction de leurs molécules d'adhérence avec l'endothélium et d'autre part, sous l'influence de facteurs chimiotactiques responsables de leur migration vers les sites inflammatoires et les muqueuses (**Decot et Capron, 2006**).

Au niveau tissulaire, ils sont alors capables de moduler la réponse inflammatoire en libérant des cytokines, des chimiokines, des espèces activées de l'oxygène ou encore des médiateurs lipidiques. En produisant leurs propres facteurs chemoattractants tels que l'éotaxine, Rantes ou encore le PAF, les cellules favorisent le recrutement d'autres éosinophiles et leucocytes, ce qui a pour effet d'amplifier la cascade inflammatoire (**Decot et Capron, 2006**). Cependant, les éosinophiles représentent une source importante d'IL-6 et IL-8 (**Desreumaux et Capron, 1996**).

Par ailleurs, cette même augmentation en nombre a été enregistrée pour les basophiles de ces mêmes lots de souris. Ces polynucléaires font l'objet de plusieurs récentes investigations scientifiques qui s'intéressent à la compréhension de leur contribution dans la pathogénèse des allergies, car ces cellules constituent une source importante de cytokines multifonctionnelles. Cela indique leur participation évidente aux réactions d'hypersensibilité à médiation d'IgE (**Burd et al., 1995**). Connus comme une excellente source d'IL-4, IL-6 et histamine (**Pham Van, 2010**), les basophiles sont essentiels pour l'initiation et le maintien des réponses allergiques, entre autre les réponses Th₂, soit directement, par leur profil Th₂ de cytokine ou indirectement par le biais de la libération d'histamine qui inhibe les réponses Th₁ (**Schneider et al., 2002**).

Cependant, d'autres études se focalisent au test d'activation des basophiles, cherchant à reproduire *in vitro* le déclenchement de la réaction d'hypersensibilité médiée par les IgE en mettant directement en contact la cellule avec les allergènes incriminés. Différents moyens peuvent être utilisés pour visualiser l'activation cellulaire et la libération de ses granules: le dosage des médiateurs libérés préformés (test d'histamino-libération) ou rapidement synthétisés (test de libération des leucotriènes), ou bien l'observation phénotypique de la cellule qui peut se faire au microscope (test dit de dégranulation des basophiles) ou par le test dit d'activation des basophiles avec un cytomètre en flux (**Beauvillain et al., 2008**).

Concernant les plaquettes, notre étude *in vivo* nous a permis d'enregistrer des taux élevés chez les souris traitées. Cette augmentation reflète leur importance dans la réponse

inflammatoire. **Pitchford (2007)**, a montré dans ses recherches le rôle critique des plaquettes dans l'asthme allergique, car l'exposition à l'allergène induit leur activation et leur migration vers les voies respiratoires où elles activent les leucocytes.

En outre, il a également été prouvé que les plaquettes sont essentielles dans le remodelage des voies respiratoires à la suite de l'exposition aux allergènes (**Benton et al., 2010**). Cela en libérant des enzymes agissant sur les voies aériennes (**Pitchford et al. 2013**). Récemment, **Page et Pitchford (2014)** ont rajouté que la présence extravasculaire des plaquettes dans les poumons des modèles animaux de l'inflammation pulmonaire allergique suggère que les plaquettes peuvent également contribuer directement à l'inflammation allergique, par des altérations de la fonction pulmonaire, ou par des procédés impliqués dans les voies respiratoires modulant ainsi le remodelage de la paroi.

De plus, les plaquettes possèdent des récepteurs spécifiques aux IgE (CD 23), contiennent l'histamine (**Pitchford et al., 2013**) et plusieurs chimiokines y compris les RANTES (**Abou Chakra, 2009**). Ces derniers sont des facteurs chimiotactiques sélectifs d'éosinophiles et induisent la dégranulation et la libération préférentielle de l'histamine par les basophiles des individus allergiques (**Schall, 1991**). Leur stockage dans les plaquettes souligne leur rôle dans des réactions inflammatoires allergiques (**Kuna et al., 1992**). Il est important à signaler que lors de la phase effectrice de l'hypersensibilité type I, il y a production de médiateurs lipidiques nouvellement formés qui sont des broncho constricteurs très puissants augmentant aussi la perméabilité vasculaire. Parmi ces médiateurs, on peut citer les Facteurs Activateurs de Plaquettes (PAF) qui entraînent la prolifération et l'activation des plaquettes (**Borges, 2008**), d'où leur augmentation chez les souris sensibilisées.

Dans notre expérimentation, la sensibilité des souris s'est exprimée aussi par une abondance cellulaire dans les liquides bronchoalvéolaires et nasaux. Ce résultat concorde avec les travaux d'**Abou Chakra (2009)**, où une augmentation des cellules leucocytaires du liquide nasal a été observée après une sensibilisation par l'extrait pollinique. **Iliopoulos et al. (1992)** ont détectés des taux élevés de basophiles dans le liquide du lavage nasal après des provocations allergéniques des patients ayant une rhinite allergique.

Par ailleurs, plusieurs études sur l'asthme allergique ont démontré une accumulation transitoire et initial des polynucléaires dans les poumons des patients exposés à un allergène. Dans cette phase précoce, le nombre de neutrophiles dans le LBA des patients peut être jusqu'à 90 fois plus élevé que chez les témoins (**Kelly et al., 2000**). De même, dans le modèle

murin de la pré-sensibilisation à l'ovalbumine suivie par une instillation intranasale de l'allergène, la première réponse inflammatoire spécifique pour cet antigène a été observée huit heures après l'instillation. A ce stade, les cellules recrutées dans les voies respiratoires sont presque exclusivement des neutrophiles. Cette première phase a été suivie, 24 heures plus tard, par un afflux d'éosinophiles et de lymphocytes, associée au développement d'une hyper réactivité des voies respiratoires (**Halbwachs-Mecarelli, 2005**). Cela peut expliquer la diminution du nombre de neutrophiles ainsi que l'augmentation cellulaire dans le LBA.

Cependant, dans les coupes histologiques des poumons des souris traitées, des infiltrats inflammatoires et des œdèmes dans les poumons, ce qui est un des aspects des réactions allergiques inflammatoires, ont été observés. Argumentée par les travaux antérieurs, l'inflammation des voies respiratoires dans les manifestations allergiques, telle que celle observée dans l'asthme allergique, est associée au recrutement et l'activation des cellules inflammatoires (**Borish et al., 2008**). Selon **Ma et al. (2012)**, au niveau de l'arbre bronchique, les médiateurs inflammatoires induisent l'accumulation des cellules inflammatoires dans les voies respiratoires et les poumons y compris les éosinophiles et les macrophages, une broncho constriction, un œdème et une augmentation de la sécrétion des muqueuses.

Concernant la rate, nous avons noté une augmentation du taux des splénocytes chez les souris traitées par l'extrait pollinique brut du *C. sempervirens* ainsi que par les différentes fractions, surtout la fraction (Fr1 et Fr2). D'après la littérature, la rate représente un organe lymphoïde secondaire organisé à faciliter le maximum d'interaction entre les cellules T et B, jouant ainsi un rôle majeur dans l'immunité à la fois humorale et cellulaire. Dans le cas des allergies, les cellules migrent au niveau des organes lymphoïdes secondaires pour présenter l'antigène aux lymphocytes TCD4 qui s'activent conduisant à la mise en place d'une réponse Th₂ menant ainsi à l'activation et la différenciation des lymphocytes B spécifiques à l'allergène (**Espinosa et Chillet, 2010**), cela explique l'augmentation du nombre des splénocytes.

Après avoir démontré l'immuno-réactivité des souris vis-à-vis l'extrait brut pollinique du *C. sempervirens* et ses différentes fractions, une identification des allergènes dans chaque fraction a été réalisée par MS-LC illustrant la présence, d'une part, de l'allergène majeur Cup s 1 avec un poids moléculaire de 39,8 kDa dans toutes les fractions, et d'une autre part, la présence du Pathogenesis-related protein (23,7 kDa) Cup s 3, et le Cup a 1 (37,6 kDa), l'allergène majeur d'une espèce qui n'existe pas en Algérie, dans la fraction Fr4. Cette technique nous a permis de constater non seulement un changement dans le poids moléculaire

des deux allergènes appartenant au *Cupressus sempervirens* (Cup s), mais aussi une composition d'une protéine appartenant à une espèce voisine.

Jusqu'à présent, deux allergènes Cup s ont été bien caractérisés. Le Cup s 1, une protéine de 45 kDa appartenant à la famille de pectate-lyase, est actuellement reconnue comme l'allergène majeur du pollen de *C. sempervirens* (**Taube et al., 2003**). Il est constitué de 3 feuillets parallèles associés en prisme allongé et légèrement incurvé. Deux chaînes glycaniques correspondant à des sites de N-glycosylation sont localisées dans la région C-terminale du prisme et font de Cup s 1 un glyco-allergène. Les épitopes B séquentiels liant les IgE se situent essentiellement aux deux extrémités du prisme où ils confluent pour former des zones épitopiques étendues. Cette répartition particulière des régions épitopiques facilite leur accessibilité aux IgE des patients allergiques. La plupart des épitopes B sont bien conservés dans les pectate lyases d'autres Cupressaceae et ces homologies de séquence et de conformation expliquent parfaitement les réactivités croisées couramment observées entre les pollens de différentes espèces de Cupressacées (**Rougé et al., 2010**).

Le Cup s 3, une thaumatine-like protein (**Di Felice et al., 2001**) de 34 kDa est considérée comme une protéine pathogenesis-related (PR-5), exprimée, particulièrement, dans un environnement pollué (**Suarez-Cervera et al., 2008**). Plusieurs épitopes B séquentiels liant les IgE ont été identifiés sur la surface moléculaire de Cup s 3. Certains épitopes sont confluents et définissent des régions épitopiques plus étendues qui pourraient correspondre à des épitopes discontinus. L'ensemble de ces régions épitopiques explique la forte allergénicité de Cup s 3. Des TLP voisines se retrouvent dans le pollen d'autres Cupressaceae, des genévriers (*Jun a 3*), des cryptomeria (*Cry j 3*) et des thuja (*Thu o 3*). Elles expliquent les réactivités croisées observées entre les différentes Cupressaceae (**Rougé et al., 2010**).

Un motif principal, de liaison aux IgE, était mis en évidence dans l'étude de **Shahali et al. (2010)** et **Shahali et al. (2012a ; b)** représentant des patients avec une réactivité IgE hétérogène à plusieurs allergènes (pI 3,5- 8,5) avec des masses moléculaires allant de 35 à 94 kDa. Le Cup a 1 a été identifié comme l'allergène majeur de *C. arizonica* (**Arilla et al., 2004 ; Suarez-Cervera et al., 2008**), avec un potentiel de réaction croisée avec le Cup s 1 (**Shahali et al., 2009 ; Shahali et al., 2010**). La réaction croisée entre Cup s 1, Cup s 3 et Cup a 1 peut être la cause de l'augmentation significative des éosinophiles et des basophiles dans le groupe de souris traitées avec la Fr4.

Cependant, Pour évaluer le potentiel allergénique de l'allergène majeur Cup s 1, loin de toute réaction croisée avec d'autres protéines identifiées dans l'extrait brut du Cyprés commun, l'effet stimulateur a été étudié sur la lignée des cellules épithéliales bronchiques humaines. Les cellules BEAS-2B ont été exposées à différentes concentrations de cet allergène.

En ce qui concerne la viabilité cellulaire, cette expérience nous a permis de montrer que l'allergène n'a aucun effet toxique sur les cellules. A propos la libération de l'IL-8 et l'IL-6, on a remarqué qu'elle a été inhibée par les faibles doses de l'allergène majeur, tandis qu'elle a été stimulée avec l'augmentation des concentrations. L'inhibition des cytokines pro-inflammatoires, observée dans notre étude, pourrait être induite par la production de cytokines pro-allergiques, telles l'IL-4 et l'IL-13, par les cellules BEAS-2B après stimulation allergénique qui sont définies en tant qu'inhibiteur de la production d'IL-6 et IL-8 (**Barletta et al., 1996**).

Il a été prouvé que l'exposition à des allergènes communs peut provoquer l'asthme symptomatique chez les personnes sensibilisées. La modification de la fonction des voies aériennes peut être secondaire à une réaction inflammatoire qui suit la production et la libération de médiateurs chimiotactiques par les cellules inflammatoires (**Liu et al., 2013**), comme l'IL-8, trouvé dans les lavages bronchoalvéolaires après stimulation par un allergène. L'étude de la sécrétion après la provocation allergénique met en évidence une augmentation dans sa sécrétion (**Cavaillon, 1995**) car elle est considérée comme la chimiokine principale impliquée dans le recrutement des neutrophiles (**Dubé et Boulet ,1996**), qui peut être accumulée dans le liquide bronchoalvéolaire dans la phase précoce de l'asthme allergique (**Lukacs, 2001**) et être responsable, en conjointement avec d'autres chimioattractants, de l'amplification de la migration cellulaire vers le site inflammatoire (**Nathan, 2006**).

Par ailleurs, l'augmentation de l'IL-8 provoque une augmentation de la libération d'IL-6, un médiateur pro-inflammatoire (**Gras et al., 2006**), qui peut se lier au récepteur soluble (IL-6R), présent avec abondance, après provocation allergénique chez les patients asthmatiques (**Doganci et al., 2005**). Ce médiateur peut contrôler la production de l'IL-4 au cours de la différenciation Th2, ce qui inhibe la différenciation Th1 (**Rincon et Irvin, 2012**).

IL-6 est sécrétée non seulement par des cellules immunitaires dont les macrophages, les cellules dendritiques, les mastocytes, les neutrophiles, lymphocytes B mais aussi par des cellules non leucocytaires telles que les cellules endothéliales et épithéliales (**Hirano, 1998**).

Des taux élevés de cette interleukine ont été remarqués dans le liquide bronchoalvéolaire des patients ayant un asthme allergique.

Bien que l'augmentation de taux d'IL-6 a été associée à la présence des cellules inflammatoires (par exemple les macrophages, les neutrophiles), certaines études suggèrent que la présence de cette interleukine dans les voies aériennes pulmonaires peut être indépendante de l'inflammation. Un certain nombre d'études ont montré une surexpression de l'IL-6 dans des cellules épithéliales bronchiques chez des patients (adultes et enfants) ayant un asthme allergique. En outre, une autre étude a montré que le gène de l'IL-6 est constitutivement exprimé dans les cellules primaires épithéliales du poumon de souris naïves et l'exposition aux allergènes peuvent déclencher la production de cette cytokine avant le recrutement des cellules inflammatoires (**Rincon et Irvin, 2012**).

*Conclusion et
perspectives*

Les allergies aux grains de pollen, à l'heure actuelle, posent un problème majeur de santé publique vue la diversité pollinique. Cependant, tous les pollens ne sont pas allergisants, leur nature et leur quantité varient considérablement en fonction de la région et des conditions climatiques.

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à l'atmosphère d'Oued Zenati (Wilaya de Guelma) afin d'identifier la contenance pollinique, déterminer les familles allergisantes et enfin cibler une espèce végétale répondue, abondante et allergisante pendant l'année 2012. Cette approche a été suivie par une étude expérimentale réalisée sur un modèle murin, d'une part, et un modèle cellulaire, d'autre part.

Suite à l'étude aéropalynologique, un total de 6543 Gp/cm² a été dénombré et 22 familles ont été identifiées, dont 14 ont, plus au moins, un potentiel allergisant prouvé. Cette diversité pollinique s'est caractérisée par la présence, non seulement, de pollen anémophile avec un pourcentage de 60%, mais aussi de pollen entomophile (27%), les indéterminés ont représenté 13% de l'ensemble de pollen capturé. Cependant, un taux élevé de pollen allergisant est aéroporté dans notre zone d'étude, détenant un pourcentage de 80%. La famille des Cupressaceae a occupé la première place avec un total de 1171 Gp/cm², et a été considérée comme étant famille la plus abondante pendant l'année 2012.

A Oued Zenati, *Cupressus sempervirens* (le Cyprés Vert), espèce appartenant à la famille des Cupressacées, est planté avec abondance. Son pollen occupe à nos jours une des premières places parmi tous les pollens d'arbres jugés capables de provoquer des réactions allergiques. Dans ce contexte il s'est avéré intéressant d'étudier cette espèce, en évaluant l'effet de son extrait pollinique et ses fractions sur le système immunitaire des souris BALB/c, identifier ses allergènes et étudier le potentiel inflammatoire de son allergène majeur sur les cellules épithéliales bronchiques (BEAS-2B).

Ces expérimentations nous ont permis de mettre en évidence le pouvoir modulateur de l'extrait brut et surtout ses fractions, dont on a enregistré, d'une part, une diminution significative des neutrophiles et d'autre part, une augmentation des monocytes, des plaquettes et des splénocytes. Celle des éosinophiles et des basophiles a été significative surtout pour le lot traité avec la fraction 4. Par ailleurs, les liquides des lavages nasaux et bronchoalvéolaires ont montré aussi une richesse cellulaire. Quant à l'histologie pulmonaire, elle a témoigné le potentiel, de l'extrait et de ses fractions, à stimuler la formation des infiltrats inflammatoires.

Une approche protéomique, utilisant la spectrométrie de masse, a démontré la présence de l'allergène majeur (Cup s 1) dans toutes les fractions avec une présence spécifique de Cup s 3 et Cup a 1 dans la fraction 4. L'allergène majeur a été purifié par chromatographie échangeuse d'ions afin d'évaluer son potentiel sur les BEAS-2B. Cette étude *in vitro*, a permis d'obtenir des diminutions parallèles de l'IL-6 et l'IL-8 par les faibles doses et des augmentations, aussi semblables, par les fortes concentrations de l'allergène majeur.

Pour conclure, nous pouvons dire que le calendrier pollinique établi est le premier qui soit fait à une des régions de la Wilaya de Guelma, soit, Oued Zenati, illustrant une synchronisation des périodes de pollinisation des familles allergisantes avec une dominance des Cupressacées, entre autre, *Cupressus sempervirens*. Planté avec abondance à l'Est de l'Algérie, cette espèce est caractérisée par un complexe d'allergènes pollinique, dont une pectate lyase (Cup s 1), une Pathogenesis-related protein (Cup s 3) et l'allergène majeur du *Cupressus arizonica* (Cup a 1). La présence de ce dernier représente un point important dans la standardisation des extraits destinés au diagnostic des allergies aux Cyprès Vert en Algérie.

D'autre part, l'allergène majeur (Cup s 1) loin de toute réaction croisée avec les autres allergènes, possède non seulement un potentiel inflammatoire sur un modèle murin, mais peut aussi stimuler les cellules épithéliales bronchiques humaines et déclencher une réponse inflammatoire en stimulant la production et la libération des cytokines pro-inflammatoires d'une manière dose dépendante.

Cependant, la sous-estimation et l'ignorance des allergies, notamment l'allergie hivernale au Cyprès commun, à l'échelle nationale, peut accroître l'impact sur la santé d'une population ayant une exposition fréquente, en particulier, les personnes atopiques. Pour ce fait, il est recommandé d'explicitier l'identification des genres et des espèces végétales, sur un spectre large et réaliser un réseau régional et national afin de mieux contrôler les périodes de pollinisation et les pluies polliniques, car celles-ci peuvent changer d'une année à l'autre et d'une région à une autre, en fonction des conditions météorologiques.

De plus, la plantation massive de Cyprès Vert, comme brise vent ou décoratif peut être remplacée par d'autres espèces non allergisantes, telles que laurier ou le Tamarix. Enfin, une compréhension plus approfondie sur la structure et le mode d'action de ces pneumallergènes, la sensibilisation de la population et les études épidémiologiques sont préconisées afin de cerner les manifestations allergiques et faciliter le mode de désensibilisation.

Résumé(s)

Résumé

Le recueil des grains de pollen dans l'atmosphère d'Oued Zenati (Wilaya de Guelma), par méthode gravimétrique a permis d'établir un calendrier pollinique caractérisé par 60% de pollens anémophiles, 27% de pollens entomophiles et 13% de pollens non identifiés. Cependant, le pollen allergisant a représenté un pourcentage de 80% de la totalité identifiée, avec une abondance de la famille des Cupressaceae. *Cupressus sempervirens*, une espèce appartenant à ce taxon, a fait l'objet de notre approche immunologique. Cette espèce végétale est plantée massivement en Algérie, notamment à Oued Zenati et possède une capacité allergénique très élevée. Nous avons étudié, d'abord, comment l'instillation nasale de l'extrait brut pollinique de cette espèce et ses différentes fractions peuvent moduler la réponse immunitaire chez les souris, ensuite la stimulation des cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B) par l'allergène majeur, identifié par spectrométrie de masse et purifié par chromatographie échangeuse d'ions. La sensibilisation des souris a révélé, d'une part, une diminution du nombre de neutrophiles, une augmentation des monocytes, des éosinophiles, des basophiles et des plaquettes et d'autre part, une augmentation significative du total cellulaire dans le liquide du lavage bronchoalvéolaire et nasal. L'étude histologique des poumons a montré une présence d'infiltrat inflammatoire et d'œdème péri-bronchique. La spectrométrie de masse a révélé la présence de l'allergène majeur Cup s 1 dans toutes les fractions avec une présence spécifique du Cup s 3 et Cup a 1 dans la fraction 4. Cet allergène avait le potentiel pour stimuler la libération de l'IL-8 et l'IL-6 par la lignée cellulaire, BEAS-2B, *in vitro* d'une manière dose dépendante.

Mots clés : Calendrier pollinique, Allergie, *Cupressus sempervirens*, allergène majeur, Oued Zenati, BEAS-2B.

Abstract

The collection of pollen in the atmosphere of Oued Zenati, by gravimetric method has established a pollen calendar characterized by 60% of anemophilous pollen, 34% of entomophilous pollen and 13% none identified pollen. However, the allergenic pollen has represented a percentage of 80% of all identified, with an abundance of Cupressaceae. The *Cupressus sempervirens*, species belonging to this taxon, was the subject of our immunological approach. This plant species is planted massively in Algeria, including Oued Zenati, and possesses a very high allergenic capacity. First, we investigated how the nasal instillation of pollinic crude extract, of this species, and its different fractions can modulate the immune response in mice and then we studied the stimulation of human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) by the major allergen identified by mass spectrometry and purified by ion Exchange Chromatography. The mice sensitizing revealed, in one hand, a decrease in the amount of neutrophils and an increase in the monocytes, eosinophils, basophils, platelets and in the other hand, a significant increase in the cell population of liquid of bronchoalveolar lavage and nasal lavage. The histological study of lungs showed a presence of an inflammatory infiltrate and peri-bronchial edema. The mass spectrometry analysis revealed the presence of the major allergen Cup s 1 in all fractions with a specific presence of the Cup s 3 and Cup a 1 in the fraction 4. Cup s 1 had the potential to stimulate the release of IL-8 and IL-6 by BEAS-2B cell line *in vitro* in a dose-dependent manner.

Keywords: Pollen calendar, Allergy, *Cupressus sempervirens*, major allergen, Oued Zenati, BEAS-2B.

ملخص

إن جمع حبوب الطلع الموجودة في هواء منطقة وادي الزناتي (ولاية قالمة) مكننا من وضع رزنامة خاصة بالتلقيح و التي تميزت بنسبة 60% من حبوب الطلع ذات التلقيح الهوائي، 27% ذات التلقيح الحشري و 13% لم يتم التعرف عليها. وقد مثلت حبوب الطلع المسببة للحساسية نسبة 80% من مجموع غبار الطلع المتعرف عليه، خاصة منها السرويات. يعتبر السرو الاخضر (*Cupressus sempervirens*) إحدى الأنواع المنتمة لهذه الفصيلة و الذي أجريت عليه دراستنا المناعية.

يتميز هذا النوع من الأشجار بكثرة انتشاره في الجزائر، بما في ذلك منطقة وادي الزناتي، و قدرته العالية على إحداث الحساسية. و عليه حاولنا في البداية دراسة تأثير التقطير الأنفي للمستخلص الخام لحبوب هذا النوع وقطراته المختلفة، على الاستجابة المناعية لفئران التجارب، تبعه دراسة تنبيه الخلايا الطلائية القصبية للإنسان (BEAS-2B) بمسبب الحساسية الرئيسي و الذي تم التعرف عليه بتقنية الطيف الكتلي و تنقيته عن طريق كروماتوغرافيا التبادل الأيوني.

كشفت هذه الدراسة عن انخفاض عدد الخلايا المتعادلة و زيادة عدد وحيدات النوى ، الخلايا الحامضية، الخلايا القاعدية والصفائح الدموية هذا من جهة، و من جهة أخرى لوحظت زيادة كبيرة في العدد الإجمالي لخلايا سائل غسل القصبات والأنف، بينما أظهر الفحص النسيجي للرئتين وجود ارتشاح التهابي و وذمة حول الشعب الهوائية. في حين، كشفت تقنية الطيف الكتلي عن وجود مسبب الحساسية (Cup s 1) في جميع القطرات مع وجود مسبب الحساسية (Cup s 3) و (Cup a 1) في القطعة 4. إن لمسبب الحساسية (Cup s 1) القدرة على تنبيه إفراز الأنترلوكينات IL-6 و IL-8 من طرف السلالة الخلوية BEAS-2B تبعاً للجرعة.

كلمات المفتاح: رزنامة حبوب الطلع، الحساسية. السرو الأخضر. مسبب الحساسية الرئيسي؛ وادي الزناتي؛ السلالة الخلوية BEAS-2B .

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

Abou Chakra O. 2009. Allergénicité des granules cytoplasmiques du pollen. [Thèse]. Université Diderot, Paris (France). 200p.

Aira M.J., Dopazo A.y. et Rodriguez F.J. 1998. Aerobiologia en Galicia : Estacion de Santiago De Compostela (1995-1996). R.E.A., 3 : 77-80.

Aït Khaled N., Pearce N., Anderson H.R., Ellwood P., Montefort S. et Shah J. 2009. Global map of the prevalence of symptoms of rhinoconjunctivitis in children: The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three. *Allergy*, 64 : 123-148.

Akdis M., Verhagen J., Taylor A., Karamloo F., Karagiannidis C., Cramer R., Thunberg S., Deniz G., Valenta R., Fiebig F., Kegel C., Disch R., Schmidt-Weber C.B., Blaser K. et Akdis C.A. 2004. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J. Exp. Med.*, 199 (11) : 1567–1575.

Anceriz N. 2008. Rôle des protéines S100 dans la migration des neutrophiles au site inflammatoire. [Thèse]. Université de Laval, Québec (Canada). 220p.

A.P.C (Assemblée populaire communale) d'Oued Zenati. 2011. Données sur Oued Zenati.

Ariano R., Mistrello G., Mincigrucci G., Bricchi E., Lannotti O., Frenguelli G., Passalacqua G. et Panzani R.C. 2006. In vitro and in vivo biological activities of old and fresh *Cupressus arizonica* pollen. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, 16 (3) : 177–182.

Ariano R. 2008. Allergie aux pollens de Cyprès. *Rev. Fr. Allergol.*, 48 (4) : 321–324.

Arilla M.C., Ibarolla I., Garcia R., De La Hoz B., Martinez A. et Asturias J.A. 2004. Quantification of the major allergen from cypress (*Cupressus arizonica*) pollen, Cup a 1, by monoclonal antibody-based ELISA. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 134 (1) : 10-16.

Barletta B., Afferni C., Tinghino R., Marl A., Di Felice G. et Pini C. 1996. Cross-reactivity between *Cupressus arizonica* and *Cupressus sempervirens* pollen extracts. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 98 (4) : 797-804.

Beauvillain C., Drouet M. et Renier G. 2008. Le test d'activation des basophiles. *Rev. Fr. Lab.* 404 : 67-77.

Benton S.A., Kumar N., Lerner J., Wiles A., Foerster M., Teach S.J. et Freishtat R.J. 2010. Airway platelet activation is associated with airway eosinophilic inflammation in asthma. *J. Investig. Med.*, 58 (8) : 987- 990.

Berthe Ahui M.L., Champy P., Ramadan A., Pham Van L., Araujo L., Brou André K., Diem S., Damotte D., Kati-Coulibaly S., Offoumou M.A., Dy M., Thieblemont N. et Herbelin A. 2008. Ginger prevents Th2-mediated immune responses in a mouse model of airway inflammation. *Int. Immunopharmacol.*, 8: 1626–1632.

Besancenot J.P. 2009. Pollens et pollinoses à l'épreuve du changement climatique. *Allergol. Pratique.*, 89 : 5–10.

Bettelli E., Korn T. et Kuchroo V.K. 2007. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr. Opin. Immunol.*, 19 : 652–657.

Bice J.B., Leechawengwongs E. et Montanaro A. 2014. Biologic target therapy in allergic asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 112 (2) : 108-115.

Borges J.P. 2008. Caractérisation structurale et immunologique d'allergènes alimentaires: les protéines de transfert de lipides de fruits. [Thèse]. Université Paul Sabatier, Toulouse (France). 208p.

Borish L. et Culp J.A. 2008. Asthma: a syndrome composed of heterogeneous diseases. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 101 (1) : 1-9.

Bouaziz A. 2014. Mise au point d'une forme stable de l'allergène Der p 3 de *Dermatophagoides pteronyssinus* pour le diagnostic rapide et le développement de nouvelles approches d'immunothérapie de l'allergie aux acariens. [Thèse]. Université de Liège, Liège (Belgique). 106p.

Broide D.H. 2008. Immunologic and inflammatory mechanisms that drive asthma progression to remodeling. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 121:560–570.

Burd P.R., Thompson W.C., Max E.E. et Mills F.C. 1995. Activated mast cells produce interleukin-13. *J. Exp. Med.*, 181: 1373-1380.

Burks A.W., Laubach S. et Jones S.M. 2008. Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: implications for future treatment. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 121:1344–1350.

Burton O.T. et Oettgen H.C. 2011. Beyond immediate hypersensitivity: evolving roles for IgE antibodies in immune homeostasis and allergic diseases. *Immunol. Rev.*, 242 (1) : 128-143.

Caimmi D., Raschetti R., Pons P., Dhivert-Donnadieu H., Bousquet P.J., Bousquet J. et Demoly P. 2012. Epidemiology of Cypress Pollen Allergy in Montpellier. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, 22 (4) : 280-285.

Calleja M. et Ferrera I. 2003. Le cyprès : un nouveau fléau pour la région Rhône- Alpes ? *Allerg. Immunol.*, 35: 92–96.

Carinanos P., Galan C., Alcazar P. et Dominguez E. 1998. Analisis del contenido polinico de la atmosfera de Chirivel (Almeria) durante los anos 1996 y 1997. *Polen*, 9 : 51-62.

Carinanos P., Galan C., Alcazar P. et Dominguez E. 2000. Allergenic pollen in the subdesert areas of the Iberian peninsula. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.*, 10 (4) : 242-247.

Cavaillon J.M. 1995. L'inflammation : un équilibre précaire entre cytokines pro- et anti-inflammatoires. *Rev. Fr. Lab.*, 276 : 27-35.

Chafai-Ketfi L., Azzouz F., Salemkour N. et Boughediri L. 2009. Contenu pollinique de l'atmosphère de deux régions de Nord –Est Algérien : El-Hadjar (W. Annaba) et Dréan (W. El-Tarf). *Rev. Synth.*, 20 : 31-39.

Chanez P. 2005. Severe asthma is an epithelial disease. *Eur. Respir. J.*, 25: 945–946.

Chapel H., Haeney M., Misbah S. et Snowden N. 2004. Immunologie clinique: De la théorie à la pratique, avec cas cliniques. Ed. De Boeck. Bruxelles. 372p.

Charbonnier A.S., Hammad H., Gosset P., Stewart G.A., Alkan S., Tonnel A.B. et Pestel J. 2003. Der p 1-pulsed myeloid and plasmacytoid dendritic cells from house dust mite-sensitized allergic patients dysregulate the T cell response. *J. Leukoc. Biol.*, 73: 91–99.

Charpin J. et Surinyach R. 1974. Atlas Européen des pollens allergisants. Ed. Sandoz. Paris. 229 p.

Charpin D., Calleja M., Lahoz C., Pichot C. et Waisel Y. 2005. Allergy to cypress pollen. *Allergy*, 60 : 293–301.

Charpin D., Hugues B., Mallea M., Thibaudon M., Sutra J.P., Ivry M., Balansard G., Vervloët D. et Charpin J. 1990. L'allergie au Cyprès. *Rev. Fr. Allergol.*, 30 (1) : 21-26.

Cortegnano I., Civantos E., Aceituno E., del Moral A., Lopez E., Lombardero M., del Pozo. V et Lahoz C. 2004. Cloning and expression of a major allergen from *Cupressus arizonica* pollen, Cup a 3, a PR-5 protein expressed under polluted environment. *Allergy*, 59 (5):485-90.

D'Amato G. et Cecchi L. 2008. Effects of climate change on environmental factors in respiratory allergic diseases. *Clin. Exp. Allergy*, 38 (8) : 1264-1274.

Damialis A., Halley J.M., Gioulekas D. et Vokou D. 2007. Long-term trends in atmospheric pollen levels in the city of Thessaloniki, Greece. *Atmos. Environ.*, 41: 7011–7021.

Daum J.R., Shepherd D.M. et Noelle R.J. 1995. Physical interactions and early signaling between Helper T lymphocytes and B lymphocytes. In **Burleson G.R., Dean J.H. et Munson A.E.** (eds) *Methods in Immunotoxicology*. Wiley-Liss Inc. New-York, pp 469–481.

Decot V. et Capron M. 2006. Le polynucléaire éosinophile, structure et fonctions. *Presse Med.*, 35: 113-124.

De Franco A.L., Robertson M. et Locksley R.M. 2009. *Immunité: la réponse immunitaire dans les maladies infectieuses et inflammatoires*. Ed. De Boeck. Bruxelles. 400p.

- De Heer H.J., Hammad H., Soullie T., Hijdra D., Vos N., Willart M.A., Hoogsteden H.C. et Lambrecht B.N. 2004.** Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J. Exp. Med.*, 200 (1) : 89–98.
- Delespesse G. 2012.** Hypersensibilité liée aux immunoglobulines E. In **Chatenoud L. et Bach J.F.** (eds). *Immunologie - 6e édition*. Ed. Lavoisier. Paris. pp 290-300.
- Demoly P. 2005.** Rhinite allergique et polypose nasosinusienne. Ed. John Libbey Eurotext. Paris. 158p.
- Demoly P. et Bousquet J. 2001.** La réaction d'allergie immédiate et l'urticaire. In **Nicolas J.F., Thivolet J. et Goujon C.** (eds). *Les urticaires: de la clinique à la thérapeutique*. Ed. John Libbey Eurotext, Montrouge. pp11-26.
- Demoly P. et Bousquet J. 2002.** La rhinite allergique. Ed. John Libbey Eurotext. Montrouge. 148p.
- Desreumaux P. et Capron M. 1996.** Eosinophils in allergic reactions. *Curr. Opin. Immunol.*, 8 (6) : 790-795.
- Di Felice G., Barletta B., Tinghino R. et Pini C. 2001.** Cupressaceae pollinosis: identification, purification and cloning of relevant allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 125 (4) : 280-289.
- Didier A., Meffre J., Jalut G., Delaude A. et Leophonte P. 1988.** Le calendrier pollinique de Toulouse. Données aéropalynologiques et cliniques. *Rev. Fr. Allergol.*, 28 (3) : 183-189.
- Dobson H.E.M. 1988.** Survey of pollen and pollenkitt lipids – Chemical cues to flower visitors? *Americ. J. Bot.*, 75 (2) : 170–182.
- Dobson H.E.M. et Bergstrom G. 2000.** The ecology and evolution of pollen odors. *Plant Syst. Evol.*, 222: 63-87.
- Doganci A., Sauer K., Karwot R. et Finotto S. 2005.** Pathological role of IL-6 in the experimental allergic bronchial asthma in mice. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 28 (3) : 257-269.

Dombrowicz D., Woerly G. et Capron M. 2000. IgE receptors on human eosinophils. *Chem. Immunol.*, 76 : 63-76.

Dominguez-Vilches E., Infante Garcia-Pantaleon F., Galan Soldevilla C., Guerra Pasadas F. et Villamandos de la Torre F. 1993. Variations in the concentrations of airborne *Olea* pollen and associated pollinosis in Cordoba (Spain) : A study of the 10 year period 1982- 1991. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.*, 3 (3) : 121-129.

Dopazo Martinez A., Jato Rodriguez V. et Aira Rodriguez M.J. 2000. Allergenic pollen types in the atmosphere of Santiago De Compostela (NW Spain): A pollen calendar for the last six years. *Bota. Helv.*, 110 (1) : 51-60.

Dubé J. et Boulet L.P. 1996. Rôles de l'inflammation et des modifications des structures bronchiques dans l'asthme allergique. *Med. Sci.*, 12 (3) : 351-357.

Dutau G. et Rancé F. 2005. Histoire de l'allergie alimentaire : Des précurseurs à l'histoire contemporaine. *Rev. fr. Allerg. Immunol. Clin.*, 46 : 312-323.

Emberger L. 1955. Une classification biogéographique des climats. *Rev. Trac. Bot. Géol. Zool. Fase. Sci. Montpellier.* 343 p.

Emberlin J., Jaeger S., Dominguez-Vilches E., Galan Soldevilla C., Hodal L., Mandrioli P., Rantio Lehtimäki A., Savage M., Spieksma F.T. et Bartlett C. 2000. Temporal and geographical variations in grass pollen season in areas of Western Europe: An analysis of season dates at sites of the European pollen information system. *Aerobiologia*, 16 : 373-379.

Essakalli M., Brick C., Bennani N., Benseffaj N., Ouadghiri S. et Atouf O. 2010. Le lymphocyte TH17 dernier-né de la famille des lymphocytes T CD4+. *Path. Bio.*, 58 (6) : 437-443.

Espinosa E. et Chillet P. 2010. *Immunologie.* Ed. Ellipses. Paris. 511p.

Festy D. 2004. *Soigner les allergies en douceur.* Ed. Leduc.s. Paris. 237p.

Fischer R., Mc Ghee J.R., Vu H.L., Atkinson T.P., Jackson R.J., Tomé D. et Boyaka P.N. 2005. Oral and nasal sensitization promote distinct immune responses and lung reactivity in a mouse model of peanut allergy. *Americ. J. Path.*, 167 (6) : 1621-1630.

Fontana S.L., Fernandez C.A. et Dedomenici A.C. 2001. Calendario polinico preliminar del area de monte hermoso, Buenos aires, Argentina. *Palinologia : Diversidad y Aplicaciones. trabajos del XII Simposio de Palinología (APLE). León*, pp. 227-233.

Foresman P.S. 2015. Cycle du pollen.

<http://www.msss.gouv.qc.ca/professionnels/pollens/#cycle> (Consulté le 29/04/2015).

Fornaciari M., Galan C., Mediavilla A., Dominguez E. et Romano B. 2000. Aeropalynological and phenological study in two different Mediterranean olive areas: Cordoba (Spain) and Perugia (Italy). *Plant Biosys.*, 134 (2) : 199-204.

Gabiot E. 2013. Qu'est-ce que le pollen. <http://apisudest.fr/recolte-pollen/> (Consulté le 20/09/2015)

Gaussorgues R. et Demoly P. 2013. Environnement et allergies : la pollinose des Cupressacées. *Rev. Fr. Allergol.*, 53 (Suppl 1) : S65-S68.

Guillam M.T. et Ségala C. 2008. Pollens et effets sanitaires : synthèse des études épidémiologiques. *Rev. Fr. Allergol. Immunol. Clin.*, 48 (1) : 14–19.

Gilmour A.I., Jaakkola M.S., London S.J., Nel A.E. et Rogers C.A. 2006. How exposure to environmental tobacco smoke, outdoor air pollutants, and increased pollen burdens influences the incidence of asthma. *Environ. Health Perspe.*, 114 (4) : 627–633.

Gounni A.S., Lamkhioued B., Koussih L., Ra C., Renzi P.M. et Hamid Q. 2001. Human neutrophils express the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI): role in asthma. *F.A.S.E.B. J.*, 15 (6) : 940–949.

Gouranton-Lagier M., Cheynel A., Navarro R. et Sulmont G. 2009. Le pollen : sa vie, son œuvre. *Rev. Fr. Allergol.*, 49 (2) : 96-106.

Gras D., Bonnans C., Vachier I., Tiers L., Godard P., Lehmann S. et Chanez P. 2006. Effet de l'interleukine-8 (IL-8) sur les réponses des cellules épithéliales bronchiques humaines. *Rev. Mal. Respir.*, 23 (5) : 523.

Grimfeld A. et Just J. 2005. Asthme de l'enfant et allergie. In **Bérard F., Bellon G. et Lachaux A.** (eds). *Allergie pédiatrique*. Ed. John Libbey Eurotext. Montrouge. pp 13-28.

Guenounou M. et David B. 2000. Les cytokines dans la physiopathologie et l'exploration de la réponse allergique. *Rev. Fr. Lab.*, 2000 (328) : 51–56.

Halbwachs-Mecarelli L. 2005. Neutrophiles dans l'hypersensibilité. *Rev. Fr. Allergol. Immunol. Clin.*, 45 (1) : 68–73.

Hamid Q. et Tulic M. 2009. Immunobiology of asthma. *Annu. Rev. Physiol.*, 71 : 489–507.

Hammad H., Charbonnier A.S., Duez C., Jacquet A., Stewart G.A., Tonnel A.B. et Pestel J. 2001. Th2 polarization by Der p 1-pulsed monocyte-derived dendritic cells is due to the allergic status of the donors. *Blood*, 98 (4) : 1135–1141.

Hammad H., Lambrecht B.N., Pochard P., Gosset P., Marquillies P., Tonnel A.B. et Pestel J. 2002. Monocyte-derived dendritic cells induce a house dust mitespecific Th2 allergic inflammation in the lung of humanized SCID mice: involvement of CCR7. *J. Immunol.*, 169 (3) : 1524–1534.

Hammad H., Chieppa M., Perros F., Willart M.A., Germain R.N. et Lambrecht B.N. 2009. House dust mite allergen induces asthma via Tolllike receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat. Med.*, 15 : 410–416.

Hesse M., Halbritter H., Zetter R., Weber M., Buchner R., Frosch-Radivo A. et Ulrich S. 2009. *Pollen Terminology*. Ed. Springer. Vienna. 266p.

Hirano T. 1998. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Intern. Rev. Immunol.*, 16 (3) : 249–284.

Holt P.G., Strickland D.H., Wickström M.E. et Jahnsen F.L. 2008. Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nat. Rev. Immunol.*, 8:142–152.

Hurtado-Nedeleca M., Dang P., Monteiroa R.C., El Benna J. et Gougerot-Pocidallo M.A. 2014. Physiologie des polynucléaires neutrophiles humains. *Rev. Franco. Lab.*, 2014 (462) : 25–38.

Iliopoulos O., Baroody F.M., Naclerio R.M., Bochner B.S., Kagey-Sobotka A. et Lichtenstein L.M. 1992. Histamine-containing cells obtained from the nose hours after antigen challenge have functional and phenotypic characteristics of basophils. *J. Immunol.*, 148 (7) : 2223–2228.

Janeway C.A., Traves P., Walport M. et Shlomchik M. 2003. Immunobiologie: le système immunitaire fondamental et pathologique. Ed. De Boeck. Paris. 782p.

Jinquan T., Jing C., Jacobi H.H., Reimert C.M., Millner A., Quan S., Hansen J.B., Dissing S., Malling H.J., Skov P.S. et Poulsen L.K. 2000. CXCR3 expression and activation of eosinophils: role of IFN-gamma-inducible protein-10 and monokine induced by IFN-gamma. *J. Immunol.*, 165 (3) : 1548-1556.

Johansson S.G., Hourihane J.O., Bousquet J., Brujnzeel-Koomen C., Dreborg S., Haahtela T., Kowalski M.L., Mygind N., Ring J., van C.P., van Hage-Hamsten M. et Wuthrich B. 2001. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy*, 56 : 813-824.

Just J., Charavel A., Baglin-Gobet S. et Grimfeld A. 1998. Immunopathologie de l'asthme du nourrisson. In **Labbé A. et Dutau G.** (eds). *Asthme du nourrisson et du petit enfant*. Ed. Arnette. Paris. pp 268.

Kayaba H., Dombrowicz D., Woerly G., Papin J.P., Loiseau S. et Capron M. 2001. Human eosinophils and human high affinity IgE receptor transgenic mouse eosinophils express low levels of high affinity IgE receptor, but release IL-10 upon receptor activation. *J. Immunol.*, 167 (2) : 995-1003.

Kelly E.A., Busse W.W. et Jarjour N.N. 2000. Increased matrix metalloproteinase-9 in the airway after allergen challenge. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 162 (3) : 1157– 1161.

Klouche M., Klinger M.H.F., Kfihnel W. et Wilhelm D. 1997. Endocytosis, storage, and release of IgE by human platelets: Differences in patients with type I allergy and nonatopic subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 100 (2) : 235–241.

Kuna P., Reddige S.R., Schall T.J., Rucinski D., Viksman M.Y. et Kaplan A.P. 1992. RANTES, a monocyte and T lymphocyte chemotactic cytokine releases histamine from human basophils. *J. Immunol.*, 149 (2) : 636-642.

Laaidi K., Laaidi M. et Besancenot J.P. 1997. Pollens, pollinoses et météorologie. *La Météorologie*, 8 (20) : 41-56.

Laaidi M., Laaidi K. et Besancenot J.P. 2002. Synergie entre pollens et polluants chimiques de l'air : les risques croisés. *Environ. Risques Sante*, 1 (1) : 42–49.

- Laaidi K. et Carli P.M. 2002.** Comment détecter un risque émergent en santé environnementale ? Le cas de la pollinose au cyprès en Bourgogne. *Environ. Risque Santé*, 1 (4) : 217-222.
- Laaidi M., Chinot T. et Aegerter P. 2011.** Allergies au pollen, pollution et climat : revue de la littérature. *Rev. Fr. Allergol.*, 51 (7) : 622–628.
- Lacy P. et Moqbel R. 2001.** Immune effector functions of eosinophils in allergic airway inflammation. *Allergy Clin. Immunol.*, 1 (1) : 79 - 84.
- Langelot M., Botturi-Cavaillès K., Lair D., Wessel F., Germaud P., Pipet A. et Magnan A. 2010.** Lymphocytes T régulateurs. *Rev. Fr. Allergol.*, 50 (3) : 98–101.
- Larché M., Akdis C.A. et Valenta R. 2006.** Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.*, 6 (10) : 761-771.
- Lavaud F., Fore M., Fontaine J.F., Pérotin J.M. et De Blay F. 2014.** Allergie au pollen de bouleau. *Rev. Mal. Resp.*, 31 (2) : 150–161.
- Leblanc B. 2004.** Biochimie des protéines : La purification des protéines. <http://biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca/5e.html> (Consulté le 12/02/2014)
- Leite de Moraes M. et Dy M. 2008.** La famille des IL-17 et la réponse allergique. *Rev. Fr. Allergol. Immunol. Clin.*, 48 (3) : 252–255.
- Leuschner R.M. 1993.** Pollen. *Hum. Biomet. part II*, 49 (11): 931-942.
- Levetin E. et Van de Water P. 2008.** Changing pollen types/concentrations/distribution in the United States: fact or fiction? *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 8 (5) : 418–424.
- Li M. 2013.** Vers une meilleure compréhension de la réponse immunitaire Th2 dans les maladies allergiques. <http://www.cnrs.fr/insb/recherche/parutions/articles2013/m-li.html> (Consulté le 07/04/2015).
- Li Y., Zhang L., Liu Y., Yang X. et Sun X. 2010.** Establishment of a mouse model of Humulus pollen allergen-induced allergic asthma. *J. Xi'an Jiaotong Univ. (Med. Scien.)*, 31(5) : 562-565.
- Ling E.M., Smith T., Nguyen X.D., Pridgeon C., Dallman M., Arbery J., Carr V.A. et Robinson D.S. 2004.** Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-

driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet*, 363 (9409) : 608–615.

Liu J.Y., Chen Y.C., Lin C.H. et Kao S.H. 2013. *Perilla frutescens* Leaf Extract Inhibits Mite Major Allergen Der p 2-induced Gene Expression of Pro-Allergic and Pro-Inflammatory Cytokines in Human Bronchial Epithelial Cell BEAS-2B. *Plos one*, 8 (10): e77458.

Lotte P. 2011. Hypersensibilité : classification de Gell et Coombs. <http://slideplayer.fr/slide/1290393/> (Consulté le 20/03/2015).

Lukacs N.W. 2001. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. *Nat. Rev. Immunol.*, 1:108-116.

Ma W.J., Bao M.J., Zhu J.P., Yao H.Y., Xie Y.C., Guan Y., Lib F.F., Dongb X.W., Zhengb Y.M. et Xieet Q.M. 2012. Oral administration of allergen extracts from mugwort pollen desensitizes specific allergen-induced allergy in mice. *Vaccine*, 30 (8) : 1437–1444.

Mamessier E. et Magnan A. 2006. Cytokines in atopic diseases: revisiting the Th2 dogma. *Eur. J. Dermatol.*, 16 (2) : 103-113.

Menzel A, Sparks T.H., Estrella N., Koch E., Aasa A., Ahas R., Alm-Kübler K., Bissolli P., Braslavská O., Briede A., Chmielewski F.M., Crepinsek Z., Curnel Y., Dahl Å., Defila C., Donnelly A., Filella Y., Jatzcak K., Måge F., Mestre A., Nordli Ø., Peñuelas J., Pirinen P., Remišová V., Scheifinger H., Striz M., Susnik A., Van Vliet A.J.H., Wielgolaski F.E., Zach S. et Zust A. 2006. European phenological response to climate change matches the warming pattern. *Glob. Change. Biol.*, 12 (10) : 1969–1976.

Michel F.B. et Menardo J.L. 2004. Les allergies. Ed. Le cavalier bleu. Paris. 125p.

Milani M., Pecora S. et Rainbow Study Investigator Group. 2011. Clinical relevance of non-grass respiratory allergies in Italy and effects of specific sublingual immunotherapy: the Rainbow Trial, a multicenter 3 year prospective observational study. *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.*, 43 (4) : 111–116.

Moalic V., Mercier B. et Ferec C. 2004. Technologie Luminex™ : principe, applications, et perspectives. *Immuno-anal. Biol. Spéci.*, 19 (4) : 181-187.

Modbase. 2004. Database of Comparative Protein Structure Models. http://modbase.compbio.ucsf.edu/modbase-cgi/model_details.cgi (Consulté le 15/05/2014).

Molina C. 1995. L'allergie à l'aube du troisième millénaire. Ed. John Libbey Eurotext. Paris.103p.

Mondoulet L. 2005. Diversité de la réponse IgE dans l'allergie à l'arachide, caractérisation des allergènes et devenir de leur potentiel allergénique lors des traitements et des processus digestifs. [Thèse]. Institut national des sciences appliquées de Toulouse. France. 249p.

Nathan C. 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.*, 6 (3) : 173-182.

Negrini A.C., Arobba D., Ebbli A., Troise C. et Voltolini S. 1987. Le calendrier pollinique de Gênes: Considérations aéropalynologiques, météorologiques et cliniques. *Rev. Fr. Allergol.*, 27 (2) : 65-70.

Njock R., Edy E., Béquignon A., Belloso A., Chatizel B., Jung C. et Babin E. 2010. Calendrier pollinique et rhinite allergique à Caen (14). *Rev. Fr. Allergol.*, 50 (2) : 44–50.

Norris-Hill J. et Emberlin J. 1993. The incidence of increased pollen concentrations during rainfall in the air of London. *Aerobiologia*, 9 (1): 27-32.

Pacciani V., Gregori S., Chini L., Corrente S., Chianca M., Moschese V., Rossi P., Roncarolo M.G. et Angelini F. 2010. Induction of anergic allergen-specific suppressor T cells using tolerogenic dendritic cells derived from children with allergies to house dust mites. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 125 (3) : 727–736.

Page C. et Pitchford S. 2014. Platelets and allergic inflammation. *Clin. Exp. Allergy*. 44 (7) : 901–913.

Parham P. 2003. Le système immunitaire. Ed. De Boeck. Paris. 424p.

Pawankar R., Bunnag C., Khaltaev N. et Bousquet J. 2012. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma in Asia a Pacific and the ARIA update 2008. *World Allergy Organ. J.*, Symposium Report Supplement : S212-217.

Pham Van L. 2010. Modulation de la réponse immunitaire par des agonistes de la voie de signalisation TLR/IL-1R dans le modèle d'asthme. [Thèse] Université René Descartes, Paris (France). 261p.

Pitchford S.C. 2007. Defining a role for platelets in allergic inflammation. *Biochem. Soc. Trans.*, 35 (Pt5) : 1104-1108.

Pitchford S.C., Yano H., Lever R., Riffo-Vasquez Y., Ciferri S., Rose M.J., Giannini S., Momi S., Spina D., O'Connor B., Gresele P. et Page C.P. 2003. Platelets are essential for leukocyte recruitment in allergic inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 112 (1) : 109- 118.

Plantinga M., Guilliams M., Vanheerswynghels M., Deswarte K., Branco-Madeira F., Toussaint W., Vanhoutte L., Neyt K., Killeen N., Malissen B., Hammad H. et Lambrecht B.N. 2013. Conventional and Monocyte-DerivedCD11b+ Dendritic Cells Initiate and Maintain T Helper 2 Cell-Mediated Immunity to House Dust Mite Allergen. *Immunity*, 38 (2) : 322–335.

Ponvert C. 2002. Immunopathogénie de l'allergie immédiate et de l'anaphylaxie. In **Nicolas J.F., Cousin F. et Thivolet J.** (eds). *Immunologie clinique et allergologique*. Ed. John Libbey Eurotext. Paris. 210p.

Ponvert C. et Weill B. 2003. Allergie et hypersensibilité chez l'enfant et chez l'adulte. In **Weill B. et Batteux F.** (eds). *Immunopathologie et réactions inflammatoires*. Ed. De Boeck. Bruxelles. 312p.

Porteau C. 2013. La vie de la ruche.

<http://lerucherdumarcassin.blogspot.com/2013/01/vie-de-la-ruche-un-peu-dhistoire-depuis.html> (Consulté le 01/04/2015).

Quéquet C. 2005. Vaincre l'allergie. Ed. Alpen. Monaco. 95 p.

Renault-Miskovsky J. et Petzold M. 1992. Pollens et spores. Ed. Delachaux et Niestlé. Neuchâtel. 360 p.

Rincon M. et Irvin C.G. 2012. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. *Int. J. Biol Sci.* 8 (9): 1281–1290.

Ring J., Krämer U., Schäfer T. et Behrendt H. 2001. Why are allergies increasing? *Curr. Opin. Immunol.*, 13 (6): 701-708.

Robays L.J., Maes T., Lebecque S., Lira S.A., Kuziel W.A., Brusselle G.G., Joos G.F. et Vermaelen K.V. 2007. Chemokine receptor CCR2 but not CCR5 or CCR6 mediates the increase in pulmonary dendritic cells during allergic airway inflammation. *J. Immunol.*, 178 (8) : 5305–5311.

Roitt I.M. et Rabson A. 2002. *Immunologie médicale: l'essentiel.* Ed. Maloine. Paris. 272p.

Romagnani S. 2000. The role of lymphocytes in allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 105 (3): 399–408.

Rose M.J. et Barthlott W. 1994. Coloured Pollen in Cactaceae: a Mimetic Adaptation to Hummingbird-Pollination? *Bot. Acta*, 107 (6) : 402–406.

Rougé P., Austruy E., Maggiorani D., Culerrier R., Granier C., Saggio B. et Barre A. 2010. Allergène : Caractérisation des épitopes B liant les IgE de Cup s 1, l'allergène majeur du pollen de cyprès (*Cupressus sempervirens*). *Rev. Fr. Allergol.*, 50 (2010) : 308–314.

Rougé P., Campistron M., Culerrier R., Granier C., Saggio B., Didier A. et Barre A. 2010. Allergène : Caractérisation des épitopes B liant les IgE de Cup s 3, un allergène majeur du pollen de cyprès (*Cupressus sempervirens*). *Rev. Fr. Allergol.*, 50 (2010) : 308–314.

Salmeron S. 2008. *Pneumologie.* Ed. Estem. Paris. 312p.

Schall T.J. 1991. Biology of the RANTES/SIS cytokine family. *Cytokine*, 3 (3) : 165-183.

Schneider E., Rolli-Derkinderen M., Arock M. et Dy M. 2002. Trends in histamine research: new functions during immune responses and hematopoiesis. *Trends Immunol.*, 23 (5) : 255- 263.

Shahali Y., Majd A., Pourpak Z., Tajadod G., Haftlang M. et Moin M. 2007. Comparative Study of the Pollen Protein Contents in Two Major Varieties of *Cupressus arizonica* Planted in Tehran. Iran. *J. Allergy Asthma Immunol.*, 6 (3) : 123-127.

- Shahali Y., Pourpak Z., Moin M., Mari A. et Majd A. 2009.** Instability of the structure and allergenic protein content in Arizona cypress pollen. *J. Allergy*, 64 (12) : 1773 – 1779.
- Shahali Y., Sutra J.P., Peltre G., Charpin D., Sénéchal H. et Poncet P. 2010.** IgE Reactivity to Common Cypress (*C. sempervirens*) Pollen Extracts: Evidence for Novel Allergens. *World Allergy Organiz. J.*; 3 (8) : 229-234.
- Shahali Y., Sutra J.P., Charpin D., Mari A., Guilloux L., Sénéchal H. et Poncet P. 2012a.** Differential IgE sensitization to cypress pollen associated to a basic allergen of 14 kDa. *FEBS J.*, 279 (8) : 1445– 1455.
- Shahali Y., Sutra J.P., Haddad I., Vinh J., Guilloux L., Peltre G., Sénéchal H. et Poncet P. 2012b.** Proteomics of cypress pollen allergens using double and triple one-dimensional electrophoresis. *Electroph. J.*, 33 (3) : 462– 469.
- Shi C. et Pamer E.G. 2011.** Monocyte recruitment during infection and inflammation *Nature Rev. Immunol.* 11: 762-774.
- Singh A.B., Malik P., Parkash D. et Gupta C.K. 1992.** Biological Standardization of Pollen Allergens from India. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.*, 10 (2) : 103-109.
- Sofiev M., Bousquet J., Linkosalo T., Ranta H., Rantio-Lehtimäki A. et Siljamo P. 2009.** Pollens, allergies and adaptation. In: Burton I., McGregor G.R. (eds). *Biometeorology and adaptation to climate variability and change*. Ed. Springer. Toronto. pp 75–106.
- Sofiev M. et Bergmann K.C. 2013.** *Allergenic Pollen*. Ed. Springer. London. 252p.
- Spieksma F.Th.M., Emberlin J.C., Hjelmroos M., Jägerd S. et Leuschner R.M. 1995.** Atmospheric birch (*Betula*) pollen in Europe: Trends and fluctuations in annual quantities and the starting dates of the seasons. *Grana*, 34 (1) : 51-57.
- Suarez-Cervera M., Castells T., Vega-Maray A., Civantos E., del Pozo V., Fernandez-Gonzalez D., Moreno-Grau S., Moral A., López-Iglesias C., Lahoz C. et Seoane-Camba J.A. 2008.** Effects of air pollution on Cup a 3 allergen in *Cupressus arizonica* pollen grains. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 101 (1) : 57– 66.

Swaney K.F., Huang C.H. et Devreotes P.N. 2010. Eukaryotic chemotaxis : a network of signaling pathways controls motility, directional sensing, and polarity. *Annu. Rev. Biophys.*, 39 : 265-289.

Taube C., Dakhama A., Rha Y.H., Takeda K., Joetham A., Park J.W., Balhorn A., Takai T., Poch K.R., Nick J.A. et Gelfand E.W. 2003. Transient neutrophil infiltration after allergen challenge is dependent on specific antibodies and Fc gamma III receptors. *J. Immunol.*, 170 (8) : 4301– 4309.

Torres R., Picado C. et De Mora F. 2005. Use of the mouse to unravel allergic asthma: a review of the pathogenesis of allergic asthma in mouse models and its similarity to the condition in humans. *Arch. Broncopneumol.*, 41 (3): 141-152.

Trigo M.M., Recio M., Toro F.J., Cano M., Dopazo M. et García H. 1999. Annual variations of airborne Casuarina pollen in the Iberian Peninsula. *Polen*, 10 : 71–77.

Tsicopoulos A., Azzaoui I. et Duez C. 2008. Immunité innée et allergie : les cellules dendritiques. *Rev. Fr. Allergol. Immunol. clin.*, 48 (3) : 150–154.

URBACO (Bureau d'Études d'Urbanisme de Constantine). 2015. Découpage administratif de la Wilaya de Guelma.

Urbain B., Mast J., Goddeeris B., Ansay M. et Gustin P. 1997. Influence d'une exposition aux poussières sur la composition cellulaire des liquides de lavage nasal et broncho-alvéolaire chez le porc. *J. Rech. Por. Fr.*, 29 : 17-22.

Vega-Maray A., Valencia-Barrera R.M., Fernandez-Gonzalez D. et Estrada J. 1999. Variation Anuel del polen en la atmosfera de Ponferrada. Anos1995-1996. *Acta. Bot. Mala.*, 24: 89-99.

Velazquez J.R., Lacy P., Mahmudi-Azer S. et Moqbel R. 1999. Effects of interferon-gamma on mobilization and release of eosinophil- derived RANTES. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 118 (2): 447-449.

Vitte J. 2012. Cofacteurs de la pollinose. *Rev. Fr. Allergol.*, 52 (3) : 189–193.

Wang Y.H. et Liu Y.J. 2008. The IL-17 cytokine family and their role in allergic inflammation. *Curr. Opin. Immunol.*, 20 (6) : 697–702.

Weill B. et Batteux F. 2003. Immunopathologie et réactions inflammatoires. De Boeck. Bruxelles. 312p.

Willmer P. 2011. Pollination and Floral Ecology. Ed. Princeton University Press. Princeton. 778p.

Woodfin A., Voisin M.B. et Nourshargh S. 2010. Recent developments and complexities in neutrophil transmigration. *Curr. Opin. Hematol.*, 17 (1) : 9-17.

Wüthrich M., Ersland K., Sullivan T., Galles K. et Klein B.S. 2012. Fungi subvert vaccine T cell priming at the respiratory mucosa by preventing chemokine- induced influx of inflammatory monocytes. *Immunity*, 36 (4) : 680–692.

Xu J.X., Zhang D.S. et Li L.H. 2012. Seasonal variations of airborne pollen in Beijing, China and their relationships with meteorological factors. *Acta. Ecolo. Sinica.*, 32 (4) : 202–208.

Yamaoka K.A., Arock M., Issaly F., Dugas N., Le Goff L. et Kolb J.P. 1996. Granulocyte macrophage colony stimulating factor induces Fc epsilon RII/CD23 expression on normal human polymorphonuclear neutrophils. *Int. Immunol.*, 8 (4) : 479 - 90.

Annexes

Tableau 1 : Liste des abréviations des acides aminés en une lettre

Les acides aminés	Abréviation en une lettre
Alanine	A
Arginine	R
Aspartic acid	D
Asparagine	N
Cysteine	C
Glutamic acid	E
Glutamine	Q
Glycine	G
Histidine	H
Isoleucine	I
Leucine	L
Lysine	K
Methionine	M
Phenylalanine	F
Proline	P
Serine	S
Threonine	T
Tryptophan	W
Tyrosine	Y
Valine	V

Tableau 2 : Préparation des solutions utilisées

Nom de la solution	Composition	Quantité des réactifs
Phosphate Buffer Saline ou PBS (10Mm) pH7,4	Na Cl	9 g
	Na ₂ HPO ₄	1.09 g
	Na H ₂ PO ₄	0.32 g
	Eau distillée	1000 ml
Solution de lyse	NH ₄ Cl	0.83 g
	Eau distillée	100 ml
<i>Bleu de trypan (0,2%)</i>	Bleu de trypan	0.2 g
	Eau distillé	100 ml



Disponible en ligne sur
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com

REVUE FRANÇAISE
D'**Allergologie**

Revue française d'allergologie xxx (2015) xxx-xxx

Article original

Effet inflammatoire des extraits de *Cupressus sempervirens* planté dans l'Est de l'Algérie : du modèle murin à la stimulation des cellules BEAS-2B par l'allergène majeur Cup s 1

Inflammatory effect of extracts from Cupressus sempervirens, cypress trees found in Algeria: From a mouse model to stimulation of BEAS-2B cells by the major cypress allergen Cup s 1

I. Bouguenoun^{a,*}, M.-C. De Pauw-Gillet^b, Z. Bensakhri^a, D. Baiwir^c, G. Mazzucchelli^d,
E. De Pauw^e, D. Bendjeddou^f

^a Laboratoire de biologie, eau et environnement, université 8-Mai-1945, BP 401, 24000 Guelma, Algérie

^b Laboratoire de la culture des cellules des mammifères, institut de chimie B6C, université de Liège, Sart-Tilman, 4000 Liège, Belgique

^c GIGA protéomique, institut de chimie B6C, université de Liège, allée du Six-Août-11, 4000 Liège, Belgique

^d Laboratoire de spectrométrie de masse, institut de chimie B6C, université de Liège, Sart-Tilman, 4000 Liège, Belgique

^e Université de Liège, Sart-Tilman, 4000 Liège, Belgique

^f Département de biologie, université 8-Mai-1945, BP 401, 24000 Guelma, Algérie

Reçu le 22 juin 2015 ; accepté le 17 septembre 2015

Résumé

Cupressus sempervirens est l'une des espèces les plus répandues en Algérie ayant une capacité allergénique très élevée. Nous avons étudié, d'abord, comment l'instillation nasale des différentes fractions de l'extrait pollinique de cette espèce peut moduler la réponse immunitaire chez les souris, et, ensuite, la stimulation des cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B) par l'allergène majeur, identifié par spectrométrie de masse et purifié par chromatographie échangeuse d'ions. La sensibilisation des souris a révélé, d'une part, une diminution du nombre de neutrophiles et une augmentation des éosinophiles, et, d'autre part, une augmentation significative du total cellulaire dans le liquide du lavage bronchoalvéolaire. L'étude histologique des poumons a montré une présence d'infiltrat inflammatoire et d'œdème péri-bronchique. La spectrométrie de masse nous a permis de mettre en évidence la présence de l'allergène majeur Cup s 1 dans toutes les fractions avec une présence spécifique du Cup s 3 et Cup a 1 dans la fraction 4. Cet allergène avait le potentiel pour stimuler la libération de l'IL-8 et l'IL-6 par la ligné cellulaire, BEAS-2B, in vitro d'une manière dose-dépendante.

© 2015 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Allergie ; Cyprès ; Allergène majeur ; Lavage bronchoalvéolaire ; BEAS-2B

Abstract

Cupressus sempervirens (Mediterranean cypress) is one of the most widespread tree species in Algeria; it has a very high allergenic capacity. First, we investigated how nasal instillation of different fractions of an extract of this tree's pollen modulates the immune response in mice. Then we studied the stimulation of human bronchial BEAS-2B cells by its major allergen Cup s 1, which we had identified by mass spectrometry and purified by ion exchange chromatography. We sensitized mice using a *C. sempervirens* pollen extract and when we then examined the cells in their bronchoalveolar fluid, we observed, on the one hand, a decrease in the number of neutrophils and an increase in the number of eosinophils and, on the other hand, a significant increase in the total cell population in this fluid. Histological study of the mouse lungs showed the presence of an inflammatory infiltrate and peri-bronchial edema. Liquid chromatography-mass spectrometric analysis revealed the presence of the major allergen

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : imeneb87@yahoo.com (I. Bouguenoun).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.reval.2015.09.005>

1877-0320/© 2015 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Cup s 1 in all fractions of the pollen extract and the specific presence of Cup s 3 and Cup a 1 in fraction 4. Cup s 1 had the potential to stimulate the release of IL-8 and IL-6 by BEAS-2B bronchial cells in vitro in a dose-dependent manner.

© 2015 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Allergy; Cypress; Allergens; Mouse model; Bronchoalveolar lavage; BEAS-2B cells

1. Introduction

Le pollen est considéré comme source d'allergène et de substances immuno-modulatrices, pouvant jouer un rôle crucial dans la sensibilisation et/ou l'exacerbation des allergies [1]. De point de vue allergologique, l'importance particulière des grains de pollen dépend du potentiel allergénique du pollen et de son abondance dans l'atmosphère. Douze types polliniques, y compris le genre *Cupressus*, ont un intérêt allergologique [2]. Ce genre est composé de plusieurs espèces qui sont largement réparties sur la Méditerranée dont l'une des espèces les plus communes autour du bassin méditerranéen est le *Cupressus sempervirens* [3]. L'allergie à son pollen a augmenté dans ces dernières décennies dans ce bassin [4], où il représente la source majeure des allergies respiratoires hivernales (fin de l'hiver/début du printemps) [5]. En Algérie, cette espèce est plus abondante vers le Nord du pays car elle a été introduite dans le cadre de la construction des barrages verts.

Différentes études ont été réalisées sur la caractérisation et la standardisation des extraits de pollen de cyprès, menant ainsi à l'identification de quelques allergènes dont le Cup s 1, l'allergène majeur, et la Cup s 3. Cependant, cette pathologie saisonnière est encore sous-estimée, car beaucoup de gens souffrent pendant l'hiver sans savoir qu'ils sont sensibilisés au pollen de cyprès, où la pollinisation coïncide avec le rhume et la grippe [6], de plus, les extraits allergiques actuels utilisés dans le diagnostic et les soins des allergies au pollen de cyprès ont une efficacité douteuse [7].

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à l'allergie au cyprès qui est peu connue et étudiée en Algérie, ce qui peut provoquer l'évolution d'une allergie saisonnière simple à un asthme. Dans ce contexte, l'objectif était d'étudier le potentiel allergisant de l'allergène majeur de cette espèce, en réalisant différentes expérimentations explorant ainsi l'effet des différentes fractions produites à partir de l'extrait brut préparé à partir de cyprès commun planté à l'Est algérien, sur un modèle murin, d'une part, et, d'autre part, une approche protéomique a été utilisée pour déterminer la composition de ces fractions et la présence de l'allergène majeur afin de démontrer son potentiel pro-inflammatoire sur les cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B, qui représentent notre modèle cellulaire.

2. Matériel et méthodes

2.1. Préparation de l'extrait et fractionnement

2.1.1. Extrait brut du cyprès (EBC)

Les grains de pollen du *C. sempervirens* ont été collectés directement à partir des cônes mâles matures du cyprès planté à

la région d'Oued Zenati, une commune de la Wilaya de Guelma en Algérie (36° 18' 55" N 7° 09' 50" E), au cours de la saison de pollinisation.

Le pollen est obtenu suite à l'ouverture des cônes mâles. L'extrait pollinique a été obtenu en utilisant le tampon phosphate salin (PBS) 0,01 M, pH 7,2 à 4 °C pendant 14 heures. Le surnageant est recueilli par centrifugation à 14 000 g pendant 1 h à 4 °C [8], ensuite dialysé contre l'eau distillée puis filtré à l'aide de Millipores « 0,45 µm ». La solution filtrée est congelée et lyophilisée pour enfin obtenir l'EBC [9].

2.1.2. Précipitation sur sulfate d'ammonium

L'EBC a été re-suspendu dans le PBS et les différentes fractions protéiques ont été obtenues par précipitation sur sulfate d'ammonium comme suit : l'extrait a été incubé, pendant 24 h avec le sulfate d'ammonium (concentration de 20 %), ensuite centrifugé à 10 000 g pendant 15 min afin de précipiter les protéines. Les concentrations du sulfate d'ammonium ont été augmentées par étape (40, 60 et 80 %), et les protéines précipitées ont été récupérées à chaque étape par incubation et centrifugation pour avoir à la fin quatre fractions, Fr1 (51 mg), Fr2 (20 mg), Fr3 (3 mg) et Fr4 (2 mg). Ces dernières ont été dissoutes dans du PBS stérile.

2.2. Étude in vivo des fractions Fr1–Fr4 sur les souris

Cette étude a été réalisée sur des *Mus Musculus* (BALB/C) femelles de huit semaines fournies par l'institut de pharmacie de Constantine, avec un poids corporel entre 25 et 40 g. Les manipulations pratiquées sur ces souris sont effectuées en respectant leur bien-être, excluant tout état de stress susceptible d'interférer avec les résultats.

2.3. Sensibilisation nasale

Trente souris femelles ont été réparties aléatoirement en 5 lots dont 6 souris témoins et 6 souris traitées par fraction (Fig. 1). Les souris ont été sensibilisées par voie nasale en administrant 100 µg d'une fraction spécifique dans un volume total de 10 µL de la solution de PBS à raison de 5 µL dans chaque narine les jours 0 et 7. Le traitement a été répété avec une double dose les jours 15 et 16, soit 200 µg dans un volume total de 20 µL de la solution de PBS à raison de 10 µL par narine avec un intervalle de 4 minutes. Le même traitement a été opté pour le lot des souris témoins en utilisant le PBS seulement [10].

2.4. La formule numérique sanguine

Suite à une légère décapitation partielle, le sang a été collecté dans des tubes à EDTA (*acidethylene diamine tetra-acetic* ;

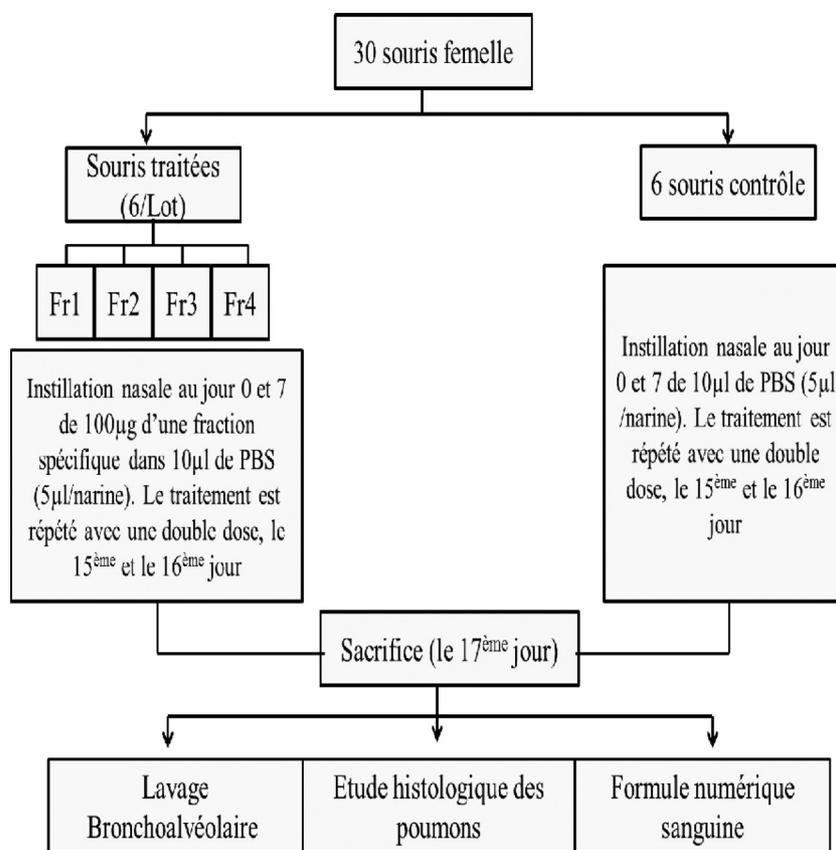


Fig. 1. Protocole de l'expérimentation sur le modèle murin. Trente souris femelles ont été réparties en 5 groupes à raison de 6 souris contrôles (témoins) et 6 souris traitées par une fraction spécifique.

PlastiLab, Lebanon) pour une énumération automatique des neutrophiles et des éosinophiles avec COULTER.

2.5. Lavage bronchoalvéolaire (LBA)

Vingt-quatre heures après le dernier traitement, les souris ont été sacrifiées. Un cathéter a été introduit dans le tube trachéal pour réaliser un double lavage avec 0,5 mL de PBS à 4 °C afin de récolter le liquide bronchoalvéolaire. Après une centrifugation à 1500 rpm pendant 6 min, le surnageant a été éliminé et le culot obtenu a été suspendu dans 0,5 mL de PBS [11]. Les cellules ont été colorées avec 0,1 mL de bleu trypan (0,2 %), et comptées au microscope (Leica, États-Unis) avec le grossissement 10×.

2.6. Étude histologique

Après la dissection des animaux, les poumons ont été prélevés, conservés dans du formol (1 %) et orientés vers le laboratoire d'anatomie pathologique de l'hôpital Ibn Zohr de Guelma pour l'étude histologique. L'organe a été déposé dans une cassette en plastique et déshydraté par l'alcool dont son élimination se fait par le xylène. Le poumon a été imprégné dans de la paraffine liquide et est refroidi. L'étape finale de l'inclusion est manuelle et consiste à réorienter convenablement le fragment tissulaire dans le sens de la coupe dans un moule de paraffine afin d'obtenir « le bloc en paraffine ». Ce dernier est coupé grâce à un microtome. Les coupes obtenues sont colorées en associant

un colorant basique nucléaire (hématoxyline, hématoxyline) et un colorant acide cytoplasmique (éosine, érythrosine ou phloxine), on y ajoute souvent du safran qui se fixe sur le collagène, et enfin sont analysées au microscope (Leica, États-Unis) à un grossissement 25×.

2.7. Étude protéomique des fractions Fr1–Fr4

2.7.1. Digestion des fractions

Un aliquot de 75 µL de chaque fraction a été réduit avec le dithiothréitol (DTT), suite à une incubation à 56 °C pendant 40 min avec agitation à 600 rpm. Placés dans une température ambiante, les échantillons ont été incubés avec l'iodoacétamide (IAA) pendant 30 min à l'abri de la lumière. Ensuite, une seconde réduction a été réalisée pour éliminer l'excès de l'IAA en ajoutant, aux différentes fractions, le DTT pendant 10 min.

La précipitation des protéines a été réalisée par l'usage du 2D-clean-up kit (GE Healthcare, États-Unis), suivant les instructions du fabricant. Les culots sont re-suspendus dans la bicarbonate d'ammonium (NH₄HCO₃), pour une digestion tryptique complète, qui se fait en deux étapes, en ajoutant la trypsine protéase (Pierce/Thermo Scientific, Inc) : la première pendant une nuit d'incubation et la seconde pendant 3 h supplémentaire à 37 °C.

Finalement, et pour chaque fraction, les protéines digérées sont purifiées par le Zip tip C18 (Millipore), lyophilisées et re-suspendues dans le formate d'ammonium (pH 10). Un

échantillon standard interne « MPDSMIX » (Waters, États-Unis) composé de 4 protéines digérées est ajouté à chaque fraction dans une quantité de 150 fmol d'alcool déshydrogénase (ADH). Un volume de 9 μL par fraction a été injecté sur le système de nanoAcquity UPLC (Aters, États-Unis) – Orbitrap MS (Q Exactive, Thermo Scientific).

2.7.2. Chromatographie liquide – spectrométrie de masse (LC-MS)

La méthode de LC fut un temps total de 180 min de run avec un gradient de 140 min. Les colonnes étaient d'une symétrie de C18 et une colonne analytique BEH C18. La méthode de spectrométrie de masse est une méthode Top N-MSMS où N a été fixé à 12, ce qui signifie que le spectromètre acquiert un spectre complet MS, sélectionne les 12 pics les plus intenses dans ce spectre et fait un spectre complet MS2 de chacun de ces 12 composés. Les recherches sur base de données ont été effectuées par le logiciel Proteome Discoverer 1,4 et le moteur de recherche Sequest HT (Thermo Scientific) sur les bases de données fournies FASTA.

2.8. Chromatographie échangeuse d'ion du pool des fractions (pFr)

Un pool a été préparé en mélangeant les quatre fractions Fr1–Fr4 ensemble afin de réaliser un nouveau fractionnement basé sur le point isoélectrique, ciblant l'allergène majeur Cup s 1. Cela a été effectué grâce au système de chromatographie (ÄKTAexplorer™, GE Healthcare, États-Unis) et une Mini Q™ 4,6/50 PE (Tricorn™, GE Healthcare, YSA). Le pool a été dialysé pendant la nuit à 4 °C dans un tampon A (Tris 25 mM, pH 8,2), filtré par des filtres Millipore « 0,22 μm » et enfin injecté en présence du tampon B (Tris 25 mM, pH 8,2, NaCl 1 M, pH 4,0). Les différentes fractions ont été collectées sur le collecteur de fractions et testées sur une culture cellulaire.

2.9. La culture cellulaire

BEAS-2B (American Type Culture Collection, Rockville, MD), une lignée de cellules épithéliales bronchiques humaines transformées par un adénovirus 12 SV40 hybride, a été aimablement fournie par le Dr D.Cataldo (centre hospitalier universitaire, université de Liège, Belgique) sous forme congelée au passage 39. Des passages de culture ont été réalisés en cultivant les cellules dans un milieu de base des cellules épithéliales des voies aériennes avec un pack supplément (Promocell, Belgique) contenant 100 UI/mL de pénicilline, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de streptomycine (Lonza, BioWhittaker, Belgique), supplémenté de 5 % de FCS (*fetal calf serum*/sérum foetal veau) (Lonza, BioWhittaker, Belgique) en T-25 cm^2 à 37 °C/atmosphère enrichie de 5 % de CO_2 . Les cellules ont été détachées par la trypsine-EDTA (Gibco, Life Technologies, Royaume-Uni). La solution d'inhibiteur de la trypsine a été préparée en ajoutant le SBTI (*soybean trypsin inhibitor* – SIGMA, Saint-Louis, États-Unis) dans un tampon phosphate (Lonza, BioWhittaker, Belgique) à 10 mg/mL, et ajoutée à la suspension cellulaire

(1 mg/mL pour chaque millilitre de trypsine), suivie d'une centrifugation (200 g pendant 5 min). Le culot a été remis en suspension dans un milieu de base dépourvu de sérum, et un Nucleo Counter NC-100 (ChemoMetec) a été utilisé pour déterminer le nombre de cellules avant l'ensemencement à une concentration de 1×10^5 cellules/mL dans une plaque à 96 puits.

Lorsque les cellules épithéliales bronchiques étaient en semi-confluence, au passage 42 dans le milieu de base dépourvu de sérum, elles ont été exposées pendant 24 h à une concentration de 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,06 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ et 0,9 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de l'allergène majeur du *C. sempervirens* (Cup s 1).

2.10. Viabilité cellulaire et production des cytokines

Après 24 h d'exposition des cellules, aux différentes concentrations allergéniques, les surnageants de culture ont été récoltés et stockés à -80 °C jusqu'à l'analyse. La viabilité cellulaire a été mesurée par le test de MTS. Pour ce dosage, les puits ont été rincés avec 100 μL de milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)/F12 milieu de Ham (F12) (Gibco, Life Technologies, Royaume-Uni), puis 20 μL de MTS (Promega, États-Unis) avec 100 μL de DMEM ont été ajoutés à chaque puits. À l'abri de la lumière, la plaque a été incubée pendant 1 h à 37 °C et 5 % de CO_2 . L'absorbance a été mesurée à l'aide du lecteur de microplaques Power Wave X (Bio-tec Inc, États-Unis) à 490 nm.

Les taux d'IL-6 et d'IL-8 (eBioscience, France) dans les surnageants de culture ont été mesurés par un multiplex (Luminex 100, des laboratoires Bio-Rad) selon les instructions du fabricant. Les limites de détection (LOD) de ce dosage varie entre [1,68–6900 pg/mL] pour l'IL-8 et [10–10275 pg/mL] pour l'IL-6.

2.11. Analyse statistique

Les données sont exprimées en moyenne \pm SD. L'analyse de la signification statistique a été déterminée en utilisant l'ANOVA à un facteur suivie par test de Dunnett pour des comparaisons multiples avec le témoin. Les différences ont été considérées comme significatives pour $p < 0,05$.

3. Résultats

3.1. Effet de la sensibilisation par les fractions sur les neutrophiles et les éosinophiles sanguines

Comme le montre la Fig. 2a, l'instillation nasale des fractions Fr1, Fr2, Fr3 et Fr4 diminue, de façon significative, le nombre de neutrophiles à $0,47 \pm 0,33 \times 10^3$ cellules/ μL , $0,99 \pm 0,37 \times 10^3$ cellules/ μL , $1,31 \pm 0,52 \times 10^3$ cellules/ μL et $0,98 \pm 0,43 \times 10^3$ cellules/ μL , respectivement, par rapport à leur nombre chez les souris témoins ($3,53 \pm 1,26 \times 10^3$ cellules/ μL ; $p < 0,001$ par rapport au témoin).

Des résultats opposés ont été obtenus pour le nombre d'éosinophiles. La stimulation avec les fractions Fr1, Fr2, Fr3 et Fr4, obtenues à partir de l'extrait brut de pollen de cyprès, a augmenté le nombre d'éosinophiles à : $0,01 \pm 0,01 \times 10^3$

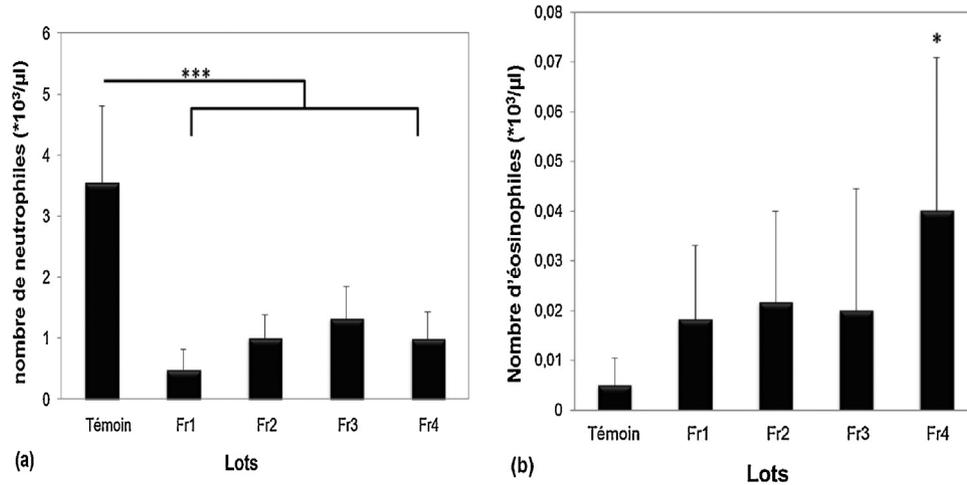


Fig. 2. Variation du nombre de neutrophiles (a) et des éosinophiles (b). Les souris ont été sensibilisées par instillation nasale avec 100 μg d'une fraction spécifique, les jours 0 et 7. Une double dose a été introduite les jours 15 et 16 avec 200 μg de la même fraction. Le sang a été récupéré pour analyser la formule leucocytaire. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD des cinq lots (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

cellules/μL, $0,02 \pm 0,01 \times 10^3$ cellules/μL, $0,02 \pm 0,02 \times 10^3$ cellules/μL, $0,04 \pm 0,03 \times 10^3$ cellules/μL, respectivement par rapport au témoin: $0,005 \pm 0,005 \times 10^3$ cellules/μL. Mais l'analyse statistique ne révèle aucune différence significative à l'exception de la fraction Fr4 ($p < 0,05$ par rapport au témoin) (Fig. 2b).

3.2. L'effet des fractions sur le liquide de lavage bronchoalvéolaire

Après l'instillation des différentes fractions obtenues à partir de l'extrait pollinique de *C. sempervirens*, une augmentation très significative du nombre de cellules dans le lavage bronchoalvéolaire (LBA) a été observée dans les lots sensibilisés avec les fractions Fr1 et Fr2 ($507,5 \pm 162,84 \times 10^9$ cellules/L, $389,16 \pm 158,59 \times 10^9$ cellules/L; $p < 0,01$) par rapport au témoin ($273 \pm 71,07 \times 10^9$ cellules/L). Cependant, une diminution non significative a été remarquée chez les souris traitées avec la fraction Fr3 ($173,33 \pm 47,74 \times 10^9$ cellules/L) et la fraction Fr4 ($176,33 \pm 42,47 \times 10^9$ cellules/L) (Fig. 3).

3.3. Étude histologique

Pour plus de confirmation sur la sensibilisation vis-à-vis des fractions allergéniques, des coupes histologiques de poumons ont été réalisées (Fig. 4).

L'examen microscopique a montré, chez les souris témoins, un poumon normal. La structure histologique semblait normale. En effet, les parois bronchiques ont été formées par les pneumocytes et les cellules endothéliales (Fig. 4a).

Cependant, les souris sensibilisées ont présenté différentes modifications tissulaires. Les souris exposées à la fraction Fr1 ont montré des cellules inflammatoires intra-épithéliales, ainsi qu'un œdème illustrant la migration cellulaire (Fig. 4b).

Chez les animaux traités avec la fraction Fr2, nous avons observé une importante lymphocytose intra-épithéliale et des cellules polynucléaires (PN) dans la lumière, les parois

bronchiques étaient hyperplasiques avec un infiltrat inflammatoire péri-bronchique, essentiellement lymphocytaire. Il était également composé de PN et avec une présence considérable des cellules épithéliales. Un œdème péri-bronchique et péri-vasculaire a également été noté chez ce groupe (Fig. 4c).

La coupe histologique des poumons de souris sensibilisées par la fraction Fr3 a été caractérisée par une forte teneur en PN dans la lumière, un infiltrat péri-bronchiolaire polymorphe composé de PN, des lymphocytes et des plasmocytes ainsi qu'un œdème péri-vasculaire et péri-bronchique (Fig. 4d).

Quant à la sensibilisation par la fraction Fr4, nous avons trouvé des infiltrats inflammatoires péri-bronchiolaires denses et polymorphes (lymphocytes et PN) et une lymphocytose intra-épithéliale (Fig. 4e).

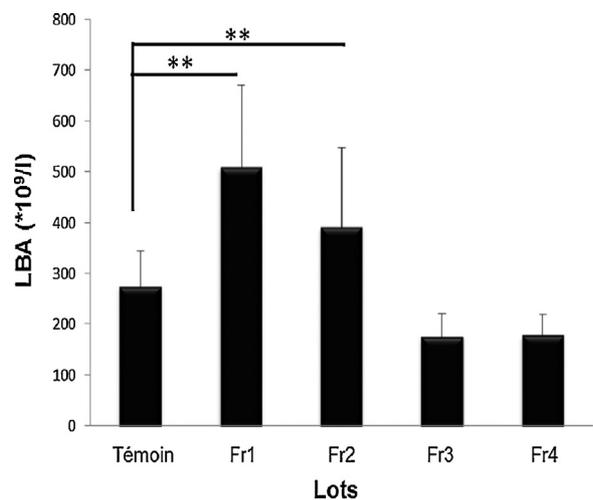


Fig. 3. Variation du nombre cellulaire dans le liquide bronchoalvéolaire (LBA). Les souris ont été sensibilisées par voie nasale (5 μL/narine) les jours 0 et 7. Une double dose (10 μL/narine) a été introduite les jours 15 et 16. Le liquide de lavage bronchoalvéolaire a été récupéré après 24 h du dernier traitement. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD des cinq lots. Une différence significative a été enregistrée avec $p = 0,004$ pour les lots exposés aux fractions Fr1 et Fr2 en comparant avec le témoin (** $p < 0,01$).

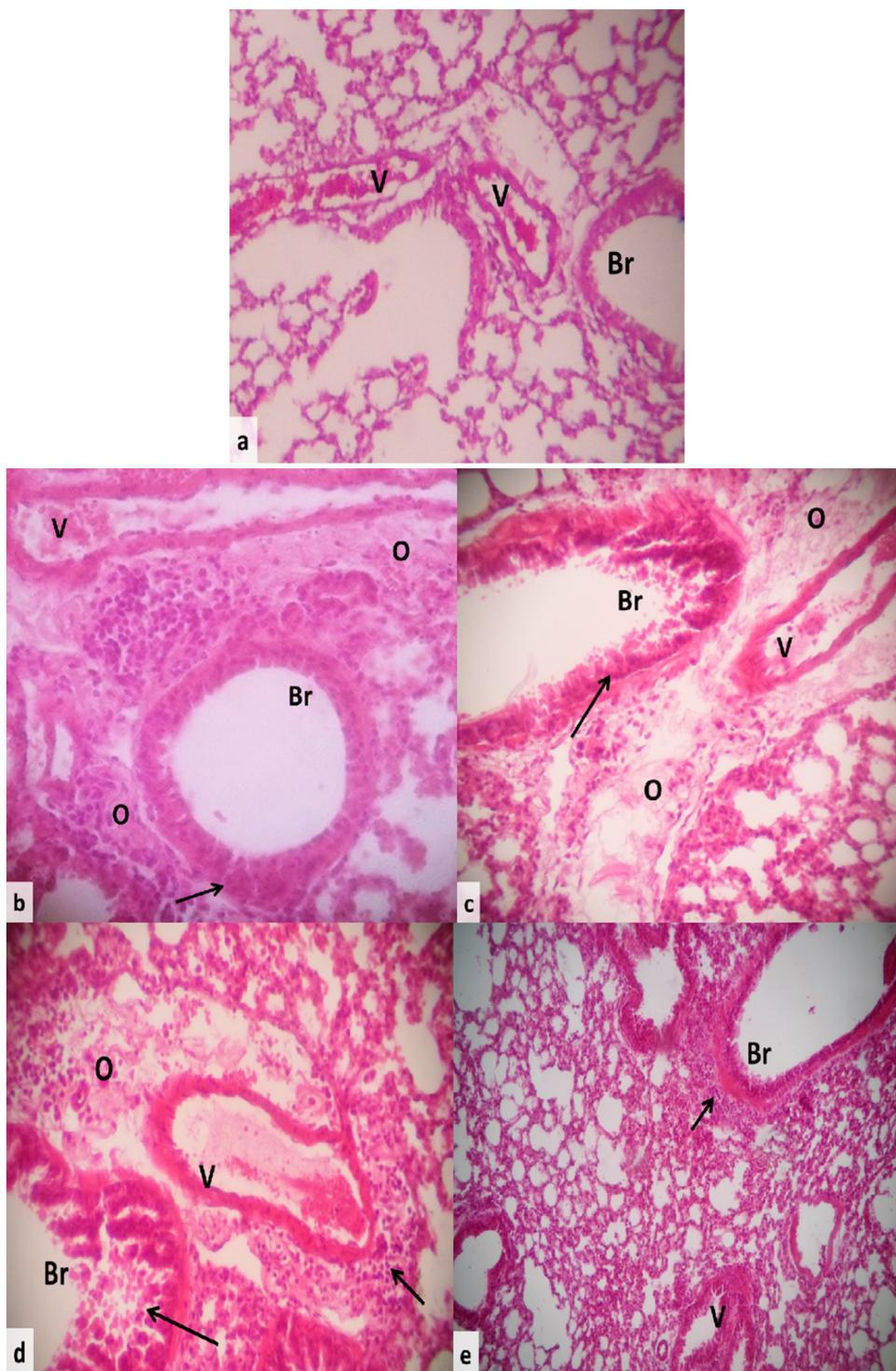


Fig. 4. Étude histologique des poumons des souris témoins et traitées ($\times 250$): a: témoin; b-e: traitées par: b -Fr1, c -Fr2, d -Fr3, e -Fr4, Br: bronchiole; V: vaisseaux, O: œdème; la flèche: infiltrat inflammatoire. Les souris ont été sensibilisées par voie nasale ($5 \mu\text{L}/\text{narine}$) les jours 0 et 7. Une double dose ($10 \mu\text{L}/\text{narine}$) a été introduite les jours 15 et 16. Les poumons ont été conservés dans du formol 1 % et orientés vers le laboratoire d'anatomie pathologique de l'hôpital Ibn Zohr de Guelma pour l'étude histologique. Les échantillons ont été enrobés en paraffine et colorés par l'HES (hématéine-éosine-safran).

3.4. Identification des allergènes dans les fractions Fr1-Fr4 par spectrométrie de masse et purification de l'allergène majeur Cup s 1

L'identification des allergènes présents dans chaque fraction a été réalisée par la spectrométrie de masse couplée à la

chromatographie liquide. Cette technique nous a permis de mettre en évidence la présence de l'allergène majeur Cup s 1 dans toutes les fractions. Cependant, la présence d'autres protéines a été détectée dans la fraction Fr4, dont la *pathogenesis-related protein* (Cup s 3) et un des allergènes du *Cupressus arizonica* (Cup a 1) (Tableau 1).

Tableau 1
Les différents allergènes présents dans chaque fraction.

Description	Fr1	Fr2	Fr3	Fr4		
	Cup s 1	Cup s 1	Cup s 1	Cup s 1	Cup s 3	Cup a 1
# Uniques peptides	2	3	3	2	2	2
# Peptides	2	3	3	5	2	5
# AA	367	367	367	367	225	346
MW [kDa]	39,8	39,8	39,8	39,8	23,7	37,6

AA : acides aminés ; MW : poids moléculaire ; pI : point isoélectrique.

Dans le but d'étudier le potentiel inflammatoire de l'allergène majeur, loin de toute réaction croisée avec les autres allergènes (Cup s 3 et Cup a 1), le Cup s 1 a été purifié à partir du pool des fractions avec chromatographie échangeuse d'ion.

3.5. Viabilité cellulaire et test de cytokine

Les cellules épithéliales bronchiques humaines ont été mises en culture avec l'allergène majeur du cyprès commun avec les concentrations suivantes : 0,02 µg/µL, 0,06 µg/µL, 0,1 µg/µL, 0,3 µg/µL et 0,9 µg/µL, pendant 24 h. La viabilité de ces cellules a été évaluée par le test MTS. Les résultats ont montré que 99,57 ± 12,74 %, 99,2 ± 10,37 %, 97,18 ± 13,64 %, 98,81 ± 21,17 %, 96,45 ± 8,79 % et 96,33 ± 4,85 % des cellules BEAS-2B, respectivement, sont viables (témoin considéré comme 100 %). Cette différence est non significative par rapport aux cellules témoins (Fig. 5).

La libération de l'IL-8 par les cellules exposées aux différentes concentrations du Cup s 1 a montré une diminution de haute signification dans les surnageants des cellules traitées avec 0,02 µg/µL de l'allergène (138,86 ± 9,5 pg/mL ; $p < 0,001$), ainsi qu'une augmentation hautement significative ($p = 0,000$) a été obtenue avec les cellules exposées à 0,1 µg/µL, 0,3 µg/µL

et 0,9 µg/µL de l'allergène majeur (403,81 ± 11,23 pg/mL, 465,58 ± 24,8 pg/mL, 549,47 ± 54,8 pg/mL) respectivement. La libération dans le surnageant des cellules BEAS-2B traitées avec 0,06 µg/µL (199,68 ± 19,75 pg/mL ; $p = 0,977$) a été presque similaire aux cellules témoins (209,99 ± 14,86 pg/mL) (Fig. 6a).

D'autre part, la culture des cellules avec 0,02 et 0,06 µg/µL de Cup s 1 a induit une diminution hautement significative de l'IL-6 à 299,85 ± 8,31 pg/mL et 281,87 ± 10,16 pg/mL respectivement ($p < 0,001$). En revanche, l'exposition à des concentrations élevées (0,1 µg/µL, 0,3 µg/µL et 0,9 µg/µL) a stimulé la libération de cette interleukine (795,64 ± 42,89 pg/mL, 905,34 ± 118,21 pg/mL, 1228,69 ± 8,17 pg/mL) respectivement, qui a été hautement significative ($p = 0,000$) en tant qu'une réponse à une concentration de 0,9 µg/µL par rapport aux cellules témoins (727,03 ± 10,65 pg/mL) (Fig. 6b).

4. Discussion et conclusion

Avec une telle augmentation au cours de ces dernières décennies, l'allergie au Cupressaceae, en particulier au *C. sempervirens*, a fait l'objet de plusieurs recherches scientifiques qui ont conduit à la connaissance des différentes molécules (allergènes) responsables du déclenchement de réactions allergiques. En plus de la rhinite, la conjonctivite et l'asthme allergique, les allergènes de cette espèce peuvent être à l'origine des attaques bronchiques sévères [12].

Dans notre étude, l'extrait brut, préparé à partir du cyprès commun planté dans le Nord-Est algérien, a été fractionné, par précipitation sur sulfate d'ammonium, en quatre fractions (nommés Fr1-Fr4). Ensuite, les réactions cellulaires et tissulaires des souris vis-à-vis chaque fraction ont été évaluées.

Les instillations nasales répétées ont diminué le nombre de neutrophiles dans le sang. Dans de telles circonstances, la diminution est due à leur rapide et massive migration vers le site inflammatoire [13]. Une étude sur les allergies aux acariens a démontré que la stimulation de ces cellules polynucléaires peut induire des dommages tissulaires, responsables de l'inflammation allergique des voies respiratoires [14].

En outre, le traitement avec ces fractions a augmenté significativement le nombre d'éosinophiles dans le sang de souris exposées à la fraction Fr4. Leur rôle pro-inflammatoire a été prouvé dans l'allergie et ils sont considérés comme principales cellules effectrices secondaires de l'allergie immédiate de l'homme [15]. De plus, ces cellules représentent une source de cytokines telles que l'IL-6 et IL-8 [16].

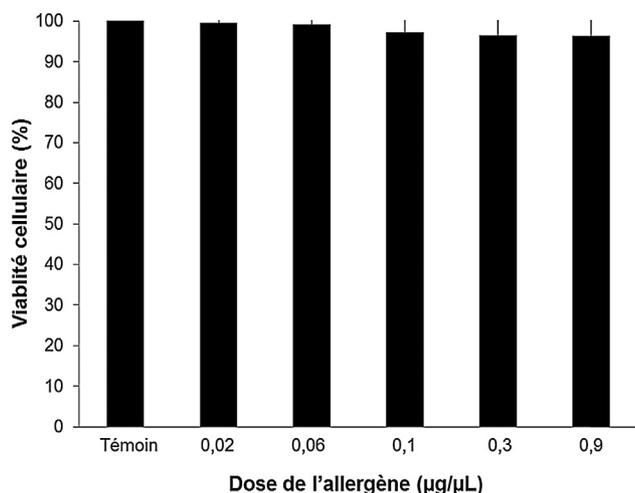


Fig. 5. Pourcentage de viabilité des cellules BEAS-2B traitées avec l'allergène majeur du *Cupressus sempervirens*. Après une culture de 24 h avec les différentes concentrations de l'allergène. La viabilité cellulaire a été mesurée par le test de MTS. Pour ce dosage, les puits ont été rincés avec 100 µL de milieu DMEM/F12 milieu de Ham (F12), puis 20 µL de MTS avec 100 µL de DMEM ont été ajoutés à chaque puits. Après une incubation pendant 1 h à 37 °C et 5 % de CO₂, à l'abri de la lumière, l'absorbance a été mesurée à 490 nm. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD.

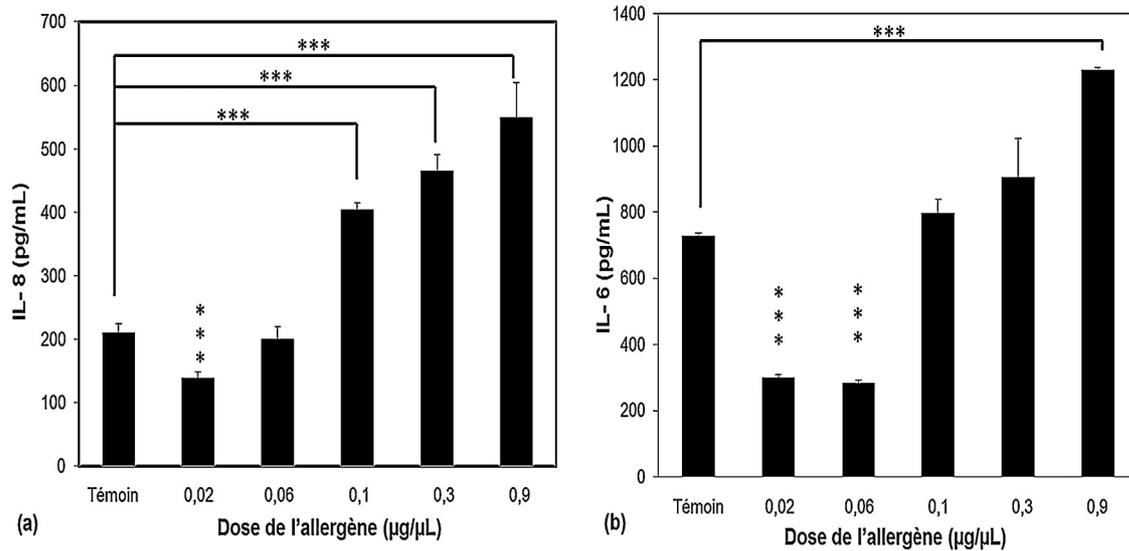


Fig. 6. Concentration des cytokines sécrétées par les cellules BEAS-2B. Après une culture de 24 h, avec les différentes concentrations de l'allergène, le taux de l'IL-6 et l'IL-8 sont mesurés dans les surnageants des cultures en suivant les instructions du fabricant des kits (eBioscience). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001) en comparant avec les cellules témoins.

Dans cette expérimentation in vivo, la sensibilisation des souris s'est exprimée aussi par une abondance cellulaire du LBA. Cependant, des infiltrats inflammatoires et des œdèmes dans les poumons, un des aspects des réactions allergiques inflammatoires, ont été observés. Plusieurs études sur l'asthme allergique ont démontré une accumulation transitoire et initiale des polynucléaires dans les poumons des patients exposés à un allergène. Dans cette phase précoce, le nombre de neutrophiles dans le LBA des patients peut être jusqu'à 90 fois plus élevé que chez les témoins [17]. De même, dans le modèle murin de la pré-sensibilisation à l'ovalbumine suivie par une instillation intranasale de l'allergène, la première réponse inflammatoire spécifique pour cet antigène a été observée huit heures après l'instillation. À ce stade, les cellules recrutées dans les voies respiratoires sont presque exclusivement des neutrophiles. Cette première phase a été suivie, 24 heures plus tard, par un afflux d'éosinophiles et de lymphocytes, associée au développement d'une hyper-réactivité des voies respiratoires [18]. Cela peut expliquer la diminution du nombre de neutrophiles ainsi que l'augmentation cellulaire dans le LBA.

Après avoir démontré l'immuno-réactivité des souris vis-à-vis des différentes fractions, une identification des allergènes dans chaque fraction a été réalisée par MS-LC illustrant la présence, d'une part, de l'allergène majeur Cup s 1 avec un poids moléculaire de 39,8 kDa dans toutes les fractions et, d'autre part, la présence du *pathogenesis-related protein* (23,7 kDa) Cup s 3, et le Cup a 1 (37,6 kDa), qui est considéré comme l'allergène majeur d'une espèce qui n'existe pas en Algérie, dans la fraction Fr4. Cette technique nous a permis de constater non seulement un changement dans le poids moléculaire des deux allergènes appartenant au *C. sempervirens* (Cup s), mais aussi une composition d'une protéine appartenant à une espèce voisine. Jusqu'à présent, deux allergènes Cup s ont été bien caractérisés.

Le Cup s 1, une protéine de 45 kDa appartenant à la famille de pectate-lyase, est actuellement reconnu comme l'allergène

majeur du pollen de *C. sempervirens* [19]. Le Cup s 3, une *thaumatin-like protein* [20] de 34 kDa, est considéré comme une protéine *pathogenesis-related* (PR-5), exprimée, particulièrement, dans un environnement pollué [12]. Un motif principal, de liaison aux IgE, était mis en évidence dans l'étude de Shahali et al. en 2010 [21] représentant des patients avec une réactivité IgE hétérogène à plusieurs allergènes (pI: 3,5–8,5) avec des masses moléculaires allant de 35 à 94 kDa. Le Cup a 1 a été identifié comme l'allergène majeur de *C. arizonica* [12], avec un potentiel de réaction croisée avec le Cup s 1 [21]. La réaction croisée entre Cup s 1, Cup s 3 et Cup a 1 peut être la cause de l'augmentation significative des éosinophiles dans le groupe de souris traitées avec la Fr4.

Pour évaluer le potentiel allergénique de l'allergène majeur Cup s 1, loin de toute réaction croisée avec d'autres protéines identifiées dans l'extrait brut du cyprès commun, l'effet stimulateur a été étudié sur la lignée des cellules épithéliales bronchiques humaines. Les cellules BEAS-2B ont été exposées à différentes concentrations de cet allergène.

En ce qui concerne la viabilité cellulaire, cette expérience nous a permis de montrer que l'allergène n'a aucun effet toxique sur les cellules. À propos de la libération de l'IL-8 et de l'IL-6, on a remarqué qu'elle a été inhibée par les faibles doses de l'allergène majeur, tandis qu'elle a été stimulée avec l'augmentation des concentrations. L'inhibition des cytokines pro-inflammatoires, observée dans notre étude, pourrait être induite par la production de cytokines pro-allergiques, telles l'IL-4 et l'IL-13, par les cellules BEAS-2B après stimulation allergénique qui sont définies en tant qu'inhibiteur de la production d'IL-6 et d'IL-8 [22].

Il a été prouvé que l'exposition à des allergènes communs peut provoquer l'asthme symptomatique chez les personnes sensibilisées. La modification de la fonction des voies aériennes peut être secondaire à une réaction inflammatoire qui suit la production et la libération de médiateurs chimiotactiques par

les cellules inflammatoires [23], comme l'IL-8, trouvée dans les lavages bronchoalvéolaires après stimulation par un allergène. L'étude de la sécrétion après la provocation allergénique met en évidence une augmentation dans sa sécrétion [24] car elle est considérée comme la chimiokine principale impliquée dans le recrutement des neutrophiles [25], qui peut être accumulée dans le liquide bronchoalvéolaire dans la phase précoce de l'asthme allergique [26] et peut être responsable, conjointement avec d'autres chemoattractants, de l'amplification de la migration cellulaire vers le site inflammatoire [27]. L'augmentation de l'IL-8 provoque une augmentation de la libération d'IL-6, un médiateur pro-inflammatoire [28], qui peut se lier au récepteur soluble (IL-6R), présent avec abondance, après provocation allergénique chez les patients asthmatiques [29].

On peut dire que l'induction de tolérance dépend des propriétés de l'allergène, sa dose et la fréquence d'exposition [30]. Ces conditions peuvent détourner la réponse Th2 à une réponse immunitaire de type Th1.

L'absence d'une étude épidémiologique et l'ignorance de l'allergie hivernale au cyprès commun en Algérie peut accroître l'impact sur la santé d'une population ayant une exposition fréquente, en particulier, les personnes atopiques.

Pour conclure, nous pouvons dire que le *C. sempervirens*, planté à l'Est de l'Algérie, est une espèce hybride ayant un pollen caractérisé par un complexe d'allergènes avec l'expression de la *pathogenesis-related protein* (Cup s 3) et l'allergène majeur du *C. arizonica* (Cup a 1). La présence de ce dernier représente un point important dans la standardisation des extraits destinés au diagnostic des allergies aux cyprès communs en Algérie.

En outre, l'allergène majeur (Cup s 1), loin de toute réaction croisée avec ces allergènes, possède non seulement un potentiel inflammatoire sur un modèle murin, mais peut aussi stimuler les cellules épithéliales bronchiques humaines et déclencher une réponse inflammatoire en stimulant la production et la libération des cytokines pro-inflammatoires d'une manière dose-dépendante.

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Remerciements

Les auteurs remercient Lisette Trzpiot, Nancy Rosiere, Fabrice Bouillenne, Sandra Ormenese et Antoine Guillaume pour leur excellente assistance technique. Ils aimeraient aussi remercier Dr Seyf Eddine Merzoug du centre universitaire de Mila (Algérie), Pr Moussa Houhamdi de l'université 8-Mai-1945 (Guelma, Algérie), Pr Ali Tahar, de l'université Badji Mokhtar (Annaba, Algérie), Dr Djahmi du laboratoire d'anatomie pathologique à l'hôpital Ibn Zohr (Guelma, Algérie), Pr Lahcen Benaabidate de l'université Sidi Mohamed Ben Abdellah (Fès, Maroc), le staff des laboratoires de chimie appliquée de l'université 8-Mai-1945 (Guelma, Algérie) et le laboratoire d'analyses médicales du Dr Kaci (Annaba, Algérie) ainsi que les membres de l'animalerie de l'institut de pharmacie (Constantine, Algérie).

Références

- [1] Kamijo S, Takai T, Kuhara T, Tokura T, Ushio H, Ota M, et al. Cupressaceae pollen grains modulate dendritic cell response and exhibit IgE-inducing adjuvant activity in vivo. *J Immunol* 2009;183(10):6087–94.
- [2] Skjøth CA, Šikoparija B, Jäger S, EAN-Network. Pollen sources. In: Sofiev M, Bergmann KC, editors. *Allergenic pollen*. London: Springer; 2013. p. 9–27.
- [3] Charpin D, Calleja M, Lahoz C, Pichot C, Waisel Y. Allergy to cypress pollen. *Allergy* 2005;60:293–301.
- [4] Ariano R. Allergie aux pollens de cyprès. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2008;48:321–4.
- [5] Shahali Y, Sutra JP, Charpin D, Mari A, Guilloux L, Sénéchal H, et al. Differential IgE sensitization to cypress pollen associated to a basic allergen of 14 kDa. *FEBS J* 2012;279:1445–55.
- [6] Shahali Y, Sutra JP, Haddad I, Vinh J, Guilloux L, Peltre G, et al. Proteomics of cypress pollen allergens using double and triple one-dimensional electrophoresis. *Electrophor J* 2012;33:462–9.
- [7] Shahali Y, Pourpak Z, Moin M, Mari A, Majd A. Instability of the structure and allergenic protein content in Arizona cypress pollen. *J Allergy* 2009;64:1773–9.
- [8] Shahali Y, Majd A, Pourpak Z, Tajadod G, Haftlang M, Moin M. Comparative study of the pollen protein contents in two major varieties of *Cupressus arizonica* planted in Tehran. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2007;6(3):123–7.
- [9] Singh AB, Malik P, Parkash D, Gupta CK. Biological standardization of pollen allergens from India. *Asian Pac J Allergy Immunol* 1992;10:103–9.
- [10] Fischer R, McGhee JR, Vu HL, Atkinson TP, Jackson RJ, Tomé D, et al. Oral and nasal sensitization promote distinct immune responses and lung reactivity in a mouse model of peanut allergy. *Am J Pathol* 2005;167(6):1621–30.
- [11] Li Y, Zhang L, Liu Y, Yang X, Sun X. Establishment of a mouse model of Humulus pollen allergen-induced allergic asthma. *J Xi'an Jiaotong Univ (Med Sci)* 2010;31(5):562–5.
- [12] Suarez-Cervera M, Castells T, Vega-Maray A, Civantos E, del Pozo V, Fernandez-Gonzalez D, et al. Effects of air pollution on Cup a 3 allergen in *Cupressus arizonica* pollen grains. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008;101:57–66.
- [13] Milani M, Pecora S, Rainbow Study Investigator Group. Clinical relevance of non-grass respiratory allergies in Italy and effects of specific sublingual immunotherapy: the Rainbow Trial, a multicenter 3-year prospective observational study. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2011;43:111–6.
- [14] Yamaoka KA, Arock M, Issaly F, Dugas N, Le Goff L, Kolb JP. Granulocyte macrophage colony stimulating factor induces Fc epsilon RII/CD23 expression on normal human polymorphonuclear neutrophils. *Int Immunol* 1996;8:479–90.
- [15] Lacy P, Moqbel R. Immune effector functions of eosinophils in allergic airway inflammation. *Allergy Clin Immunol* 2001;1:79–84.
- [16] Desreumaux P, Capron M. Eosinophils in allergic reactions. *Curr Opin Immunol* 1996;6:790–5.
- [17] Kelly EA, Busse WW, Jarjour NN. Increased matrix metalloproteinase-9 in the airway after allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1157–61.
- [18] Nocker RE, Out TA, Weller FR, Mul EP, Jansen HM, Van der Zee JS. Influx of neutrophils into the airway lumen at 4 hours after segmental allergen challenge in asthma. Neutrophiles dans l'hypersensibilité. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2005;45:68–73.
- [19] Taube C, Dakhama A, Rha YH, Takeda K, Joetham A, Park JW, et al. Transient neutrophil infiltration after allergen challenge is dependent on specific antibodies and Fc gamma III receptors. *J Immunol* 2003;170:4301–9.
- [20] Di Felice G, Barletta B, Tinghino R, Pini C. Cupressaceae pollinosis: identification, purification and cloning of relevant allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;125:280–9.
- [21] Shahali Y, Sutra JP, Peltre G, Charpin D, Sénéchal H, Poncet P. IgE reactivity to common cypress (*C. sempervirens*) pollen extracts: evidence for novel allergens. *World Allergy Organ J* 2010;3(8):229–34.
- [22] Barletta B, Afferni C, Tinghino R, Marl A, Di Felice G, Pini C. Cross-reactivity between *Cupressus arizonica* and *Cupressus sempervirens* pollen extracts. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98(4):797–804.

- [23] Liu JY, Chen YC, Lin CH, Kao SH. Perilla frutescens leaf extract inhibits mite major allergen Der p 2-induced gene expression of pro-allergic and pro-inflammatory cytokines in human bronchial epithelial cell BEAS-2B. PLoS One 2013;8(10):e77458.
- [24] Cavillon JM. L'inflammation : un équilibre précaire entre cytokines pro et anti-inflammatoires. Rev Fr Lab 1995;276:27-35.
- [25] Dubé J, Boulet LP. Rôles de l'inflammation et des modifications des structures bronchiques dans l'asthme allergique. Med Sci 1996;12(3):351-7.
- [26] Lukacs NW. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. Nat Rev Immunol 2001;1:108-16.
- [27] Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. Nat Rev Immunol 2006;6(3):173-82.
- [28] Gras D, Bonnans C, Vachier I, Tiers L, Godard P, Lehmann S, et al. Effet de l'interleukine-8 (IL-8) sur les réponses des cellules épithéliales bronchiques humaines. Rev Mal Respir 2006;23(5):523.
- [29] Doganci A, Sauer K, Karwot R, Finotto S. Pathological role of IL-6 in the experimental allergic bronchial asthma in mice. Clin Rev Allergy Immunol 2005;28(3):257-69.
- [30] Rance F. Lymphocytes T et allergie alimentaire. Rev Fr Allergol Immunol Clin 2007;47s:214-8.