

Mise au point

La pollinose au frêne : données palynologiques, description des allergènes et réactivité croisée

Ash tree pollinosis: botanical aspects, description of allergens and cross-reactivities

I. Papanikolaou, R. Barderas, M. Thibaudon, G. Pauli *

Service de pneumologie, hôpital Lyautey, 1, place de l'Hôpital, BP 426, 67091 Strasbourg cedex, France

Reçu le 21 juin 2005 ; accepté le 24 juin 2005

Disponible sur internet le 03 août 2005

Résumé

La fréquence des sensibilisations cutanées au pollen de frêne commun (*Fraxinus excelsior*), constatée depuis quelques années pose de nombreuses difficultés diagnostiques aux allergologues, d'autant plus que cette sensibilisation est souvent mise en évidence dans un contexte de polysensibilisations vis-à-vis de nombreux pollens. Au fur et à mesure de la progression des connaissances, la réactivité croisée avec des espèces proches ou taxonomiquement éloignées est de mieux en mieux connue rendant le diagnostic de cette pollinose particulièrement difficile. Dans ce travail, nous portons un intérêt particulier aux caractéristiques botaniques, géographiques et palynologiques du frêne. Une mise au point sur la composition allergénique du pollen de frêne est ensuite réalisée au vu des connaissances récemment acquises.

© 2005 Publié par Elsevier SAS.

Abstract

The frequency of cutaneous sensitization to ash tree pollen (*Fraxinus excelsior*) reported over the past years is a source of many diagnostic difficulties for allergists, all the more so as this sensitization often occurs in patients who are sensitized to numerous pollens. As knowledge of cross reactivities among closely related or taxonomically distant botanical species has progressed, the diagnosis of this pollinosis has become particularly difficult. In the present study, special attention is given to botanical aspects and geographical distribution of the ash tree, as well as to characteristics of its pollen. We then present an up-to-date review of the allergenic components of ash pollen, based on the latest scientific reports.

© 2005 Publié par Elsevier SAS.

Mots clés : Allergènes ; Allergènes croisés ; Allergie au frêne ; Frêne ; Pollinose

Keywords : Ash tree; *Fraxinus excelsior*; Pollinosis; Allergens; Cross-reactivity

1. Introduction

Pendant de nombreuses années, les pollens de frêne commun (*Fraxinus excelsior*) ont été considérés comme ayant une allergénicité mineure, bien que durant la période de mars et avril les comptes polliniques aient montré des quantités

importantes dans plusieurs régions de France. Ainsi, dans la région parisienne, la pollinose au frêne a été authentifiée dès les premiers calendriers polliniques établis par Charpin en 1965 [1]. En Alsace, les premiers cas d'allergie au pollen de frêne ont été rapportés dès les années 1970 [2,3]. Cependant, à la même époque, seuls les arbres appartenant à la famille des bétulacées étaient tenus responsables des manifestations de pollinose dans cette région, ce qui ne laissait aucune place aux autres pollens d'arbres, notamment le frêne [4]. Le pro-

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : Gabrielle.Pauli@chru-strasbourg.fr (G. Pauli).

blème du diagnostic différentiel de la pollinose au frêne avec la pollinose au bouleau a été soulevé compte tenu de la coïncidence des pluies polliniques. Par ailleurs, ce problème était à l'origine de la méconnaissance de la pollinose au frêne lors de manifestations d'hypersensibilité pour les bétulacées, si le test cutané au frêne n'était pas pratiqué systématiquement.

À partir des années 1990, plusieurs publications ont souligné l'apparition du frêne parmi les causes de pollinoses printanières précoces [5,6]. La découverte fréquente dans les résultats de multi-RAST tels que le Matrix®, d'IgE spécifiques au pollen d'olivier chez des malades n'ayant jamais séjourné dans des régions où ces arbres sont largement implantés, a contribué à la reconnaissance de cette pollinose et a attiré l'attention non seulement des cliniciens mais également de nombreux biochimistes [7].

2. Données botaniques

La famille des oléacées (*Oleaceae*), de la division des magnoliacées (*Magnoliophyta*), de la classe des *Magnoliopsida* et de l'ordre des scrophulariacées (*Scrophulariales*), comporte sept arbres : le frêne, l'olivier, le troène, le *Phillyrea*, le jasmin, le lilas et le forsythia.

Le genre *Fraxinus* regroupe environ 65 espèces d'arbres et d'arbustes. Les différentes espèces de frêne se rencontrent essentiellement dans les régions tempérées ou subtropicales de l'hémisphère nord.

Le genre *Fraxinus* (Fig. 1) est un arbre forestier généralement disséminé, qui pousse en Europe et exige des sols frais et riches. En France deux espèces principales sont rencontrées : *F. excelsior*, frêne commun et *Fraxinus ornus* ou frêne

à fleurs. Le premier est l'un des grands arbres des forêts françaises. Il s'agit d'une espèce dite « noble » en raison de ses usages qui concernent principalement l'ébénisterie, la décoration, les sièges, les articles de sport et les manches d'outils. On le rencontre jusqu'à 1500 m d'altitude, sauf dans les régions méditerranéennes. Ses besoins en eau sont très importants. Cette espèce affectionne particulièrement les conditions de forte humidité atmosphérique. Toutefois, il peut se développer sur des sols secs. L'arbre peut atteindre 40 m de hauteur maximale et 2 m de diamètre [8]. Il peut vivre de 150 à 200 ans.

Le frêne oxyphylle (*Fraxinus oxyphylla*) remplace le frêne commun dans les régions méditerranéennes. La deuxième espèce, *F. ornus*, spontanée uniquement en Corse et dans les Alpes Maritimes, est plantée dans les parcs et les jardins pour l'aspect décoratif de ses inflorescences. Le frêne est une importante espèce de reboisement car il donne d'excellents résultats en forêt ainsi que sur d'anciens sols cultivés. L'expansion de cet arbre en Europe est un phénomène récent qui peut être lié, à la décroissance de la population rurale à partir du 19^e siècle qui a laissé des grands terrains reboisés par des arbres tels que le frêne [9]. Par ailleurs, les grands travaux d'aménagement et de canalisation des rivières, effectués par les ingénieurs de cette époque, ont entraîné des grands changements hydromorphiques qui ont favorisé le développement et la croissance du frêne commun.

3. Données palynologiques

La pollinisation de *F. excelsior* et de *F. oxyphylla* est anémophile et la fructification commence généralement quand

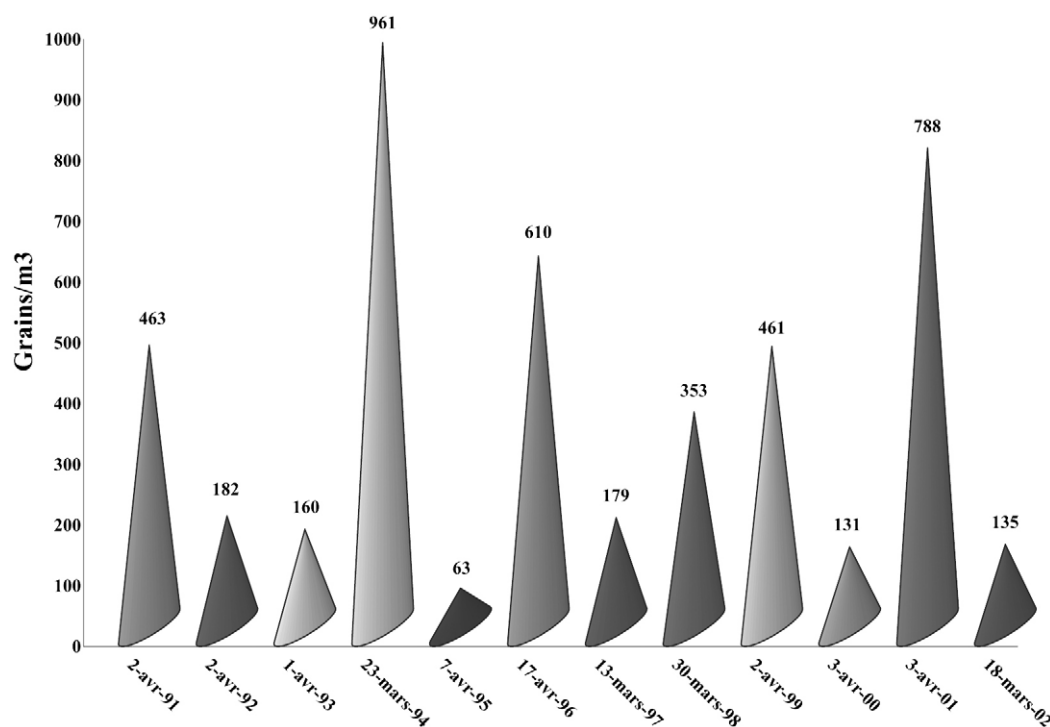


Fig. 1. Pics de pollinisation du frêne observés à Strasbourg de 1991 à 2002 (grains/m³/jour).

les arbres atteignent 30 et 40 ans. Les grains sont légèrement bréviaxes de 28 μm en vue polaire et de 26 μm en vue méridienne, soit un volume et un poids moyens respectivement de 10000 μm^3 et de 13 ng [8].

Ce n'est que depuis 1991 que des comptes polliniques spécifiques du frêne sont effectués par le réseau national de surveillance aérobiologique (RNSA) [10,11]. Cependant, la synthèse des comptes polliniques effectués à Strasbourg pendant une période de 12 ans permet d'arriver aux conclusions suivantes :

- les premiers grains de pollens de frêne apparaissent dès les premiers jours du mois de février. Ils persistent à des niveaux très bas jusqu'aux premiers jours du mois de mars ;

- la pollinisation s'étend essentiellement jusqu'à la troisième semaine du mois d'avril. Néanmoins, les pollens de frêne sont présents dans l'air à de faibles quantités jusqu'à mi-mai ;
- il peut exister des variations assez importantes dans les périodes de pollinisation d'une année à l'autre. Toutefois, si l'on élimine les valeurs les plus faibles et si l'on ne retient que des chiffres significatifs, on constate qu'il existe une relative stabilité des périodes de pollinisation ;
- les pics de pollinisation sont observés les premiers jours du mois d'avril (Figs. 2 et 3). Des grandes variations interannuelles sont observées avec un rapport d'intensité qui s'échelonne de 1 à 15 ; le pic le plus fort est enregistré en

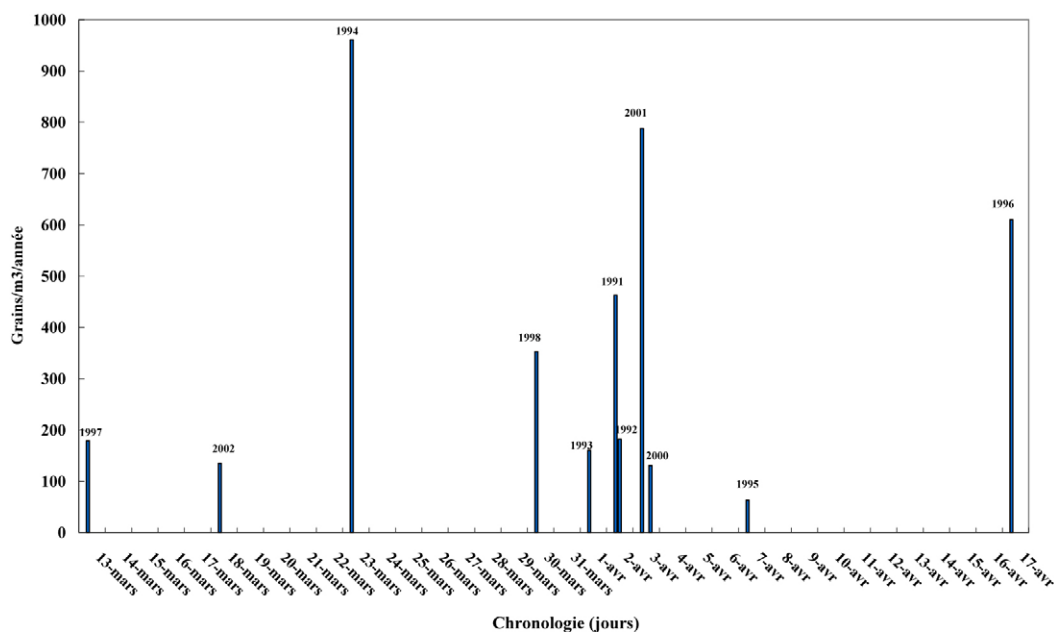


Fig. 2. Pics de pollinisation du frêne à Strasbourg, selon la date de survenue, entre mars et fin avril.

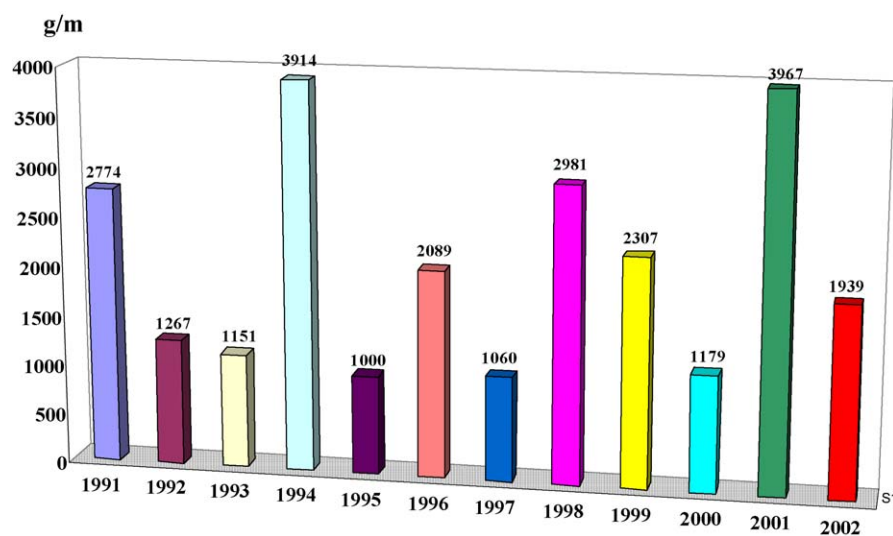


Fig. 3. Pollinisation du frêne à Strasbourg de 1991 à 2002 (quantité totale de grains de pollens/m³ par année).

1994 (961 grains/m³), le plus faible en 1995 (63 grains/m³). La valeur moyenne du pic de pollinisation est de 374 grains/m³. Les pics représentent en moyenne 18 % (extrêmes de 6 à 29 %) par rapport à la totalité du pollen recueilli sur une année pollinique ;

- en moyenne, entre 1991 et 2002, les pollens de frêne atteignent un niveau de l'ordre de 2136 grains/m³ par année et représentent 6 % de la concentration pollinique atmosphérique globale (Fig. 3) ;
- la quantité de grains de pollen recueillie peut être variable d'une année à l'autre avec un rapport de 1 à 4. L'explication la plus rationnelle semble être les variations des conditions météorologiques puisqu'il a été démontré que les conditions thermiques au moment de la floraison mais aussi durant la période d'initiation des bourgeons floraux plusieurs mois auparavant, interviennent dans la quantité des émissions polliniques régionales [12] ;
- au niveau national, les comptes du RNSA effectués dans 42 centres français en 2000 montrent que les pollens de frêne se placent à la huitième position et à la troisième place en 2001, soit 6,6 et 13,2 % respectivement par rapport aux comptes polliniques totaux du premier semestre. Les comptes polliniques comparatifs entre le bouleau et le frêne pour trois années consécutives en Alsace (2000 à 2002) nous permettent de relever les points suivants :
 - la pollinisation du bouleau est nettement plus intense pour les trois années étudiées ;
 - les tendances sont similaires pour les deux types de pollens : les années 2000 et 2002 sont caractérisées par des pollinisations relativement faibles par rapport à l'année 2001 ;
 - les pics de pollinisation du bouleau et du frêne coïncident les premiers jours du mois d'avril ;
 - les périodes de pollinisation sont quasiment superposées. Il est pourtant important de noter que l'émission pollinique du frêne devance d'environ une semaine celle du bouleau.

Au total, on peut constater grâce aux récoltes effectuées pendant ces 12 années consécutives que ce n'est pas l'augmentation du nombre de pollens émis qui semble expliquer l'augmentation apparente de la sensibilisation au pollen de frêne [13].

4. Allergènes

4.1. Historique

La première analyse portant sur la composition antigénique du pollen de frêne remonte à 1985. De nombreuses études permettant de progresser dans ce domaine, ont été menées afin d'objectiver une réactivité croisée avec le pollen d'olivier, responsable de manifestations allergiques majeures dans le sud de l'Europe ; le frêne était considéré jusqu'à la fin des années 1990 d'une allergénicité mineure. Bousquet et al. [14] réussissent à individualiser trois composants antigéniques du

pollen de frêne, révélés par des arcs de précipitation en immunoelectrophorèse croisée. En 1991, Wahl et al. [15] détectent par SDS-PAGE deux bandes qui correspondent à des allergènes communs de la famille des oléacées, et dont le poids moléculaire est évalué à 14,4 et 20,0 kDa respectivement. Dans le même sens, Pajaron et al. mettent en évidence six allergènes communs entre le pollen de frêne et d'olivier, localisés à 49,6 ; 40 ; 36,7 ; 19,7 ; 16,7 et 14 kDa [16].

Bien que ces travaux n'aient pas eu comme objectif principal l'identification d'allergènes dans l'extrait de pollen de frêne, ils nous permettent d'avoir une première approche de la pluralité des allergènes du pollen de frêne. Les travaux qui ont suivi, en étant plus complets, restent en parfait accord avec les résultats initiaux.

4.2. Fra e 1

Fra e 1 a été purifié pour la première fois en 1993 par l'équipe d'Obispo en même temps que les allergènes majeurs des autres oléacées, en particulier le troène (*Lingustrum vulgare*) et le lilas (*Syringa vulgaris*) [17]. Cette purification a été obtenue grâce au passage d'extrait de pollen de frêne sur des colonnes de chromatographie d'affinité sur lesquelles étaient fixés des anticorps monoclonaux anti-Ole e 1. En SDS-PAGE, cet allergène est signalé par une zone de précipitation à 20 kDa, présentant une très forte analogie avec Ole e 1, l'allergène majeur du pollen d'olivier.

Selon Fernandez, cet allergène à 20 kDa est localisé au niveau cellulaire, dans le réticulum endoplasmique [18]. Par ailleurs, comme son homologue Ole e 1, il possède un site de N-glycosylation qui est détruit après le traitement de la molécule par des systèmes enzymatiques faisant appel à une PNGase F (peptide-N-[acetyl-β-glucosaminyl]-asparagine amidase) [19]. Mais la spécificité IgE des composants glycosylés d'Ole e 1 et forcément des autres « Ole e 1-like » allergènes (dont celui du frêne) ne serait pas forcément liée à la présence des motifs identifiés par cette enzyme (β[1,2]-xylose et/ou une α[1,3]-fucose) [20].

D'après la publication d'Hemmer et al. en 2000, Fra e 1 est considéré comme l'allergène majeur du frêne puisque dans cette étude 70 % des patients sensibilisés au pollen de frêne possèdent des IgE spécifiques anti-Fra e 1 [21]. Par ailleurs, ce même travail suggère que la moitié des épitopes de Fra e 1 correspond à des sites non linéaires compte tenu des résultats obtenus sur des immunoblots réalisés avec l'allergène natif et avec l'allergène dénaturé. Dans l'étude de Niederberger et al. [22], parmi les 40 sérums de patients strasbourgeois allergiques au pollen de frêne, 23 reconnaissent une protéine de poids moléculaire de 21–25 kDa présumée être l'allergène majeur du frêne, Fra e 1.

Malgré l'absence de démonstration directe, il est vraisemblable que Fra e 1, compte tenu de son homologie avec Ole e 1, appartient à une famille de glycoprotéines hautement conservées, présentant des similarités de structure avec les protéines inhibitrices de la trypsine du soja se trouvant dans de nombreux végétaux [23]. Cela est clairement établi pour

l'allergène majeur de l'olivier qui partage 44 % d'homologie avec Lol p 11, un allergène majeur de l'ivraie, proche de cette famille d'inhibiteurs [24]. En faveur de cette hypothèse plaide également l'inhibition observée sur un immunoblot de pollen de frêne dans la zone de 21 kDa, lorsque le sérum d'un patient de la série de Niederberger est préincubé avec un extrait naturel de pollen de graminées [22].

Très récemment, l'allergène majeur du pollen de frêne a été cloné et reproduit sous forme recombinante à l'aide de la levure *Pichia pastoris*. Grâce à une collaboration espagnole et strasbourgeoise, son activité immunologique a pu être validée *in vitro* chez une population de patients strasbourgeois exposés au pollen de frêne et présentant un test cutané positif à l'extrait commercial du pollen de frêne [13,25].

4.3. Fra e 2

En 1998, Ledesma et al. ont pu révéler la présence d'un allergène de 14 kDa présent dans un extrait de pollen de frêne en utilisant un sérum de lapin immunisé par la profiline du pollen d'olivier, Ole e 2 [26]. La profiline du pollen de frêne, nommée Fra e 2, a été identifiée par Hemmer et al. à 14 kDa grâce aux anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre la profiline de céleri [21]. Niederberger et al. démontrent l'existence d'épitopes communs entre la profiline du frêne et la profiline recombinante du bouleau [22] : la préincubation avec l'allergène recombinant rBet v 2 d'un sérum reconnaissant cette bande entre 12 et 18 kDa a induit la disparition complète de ce signal sur l'immunoblot du pollen de frêne.

4.4. Fra e 3

Un troisième allergène, Fra e 3, considéré comme un allergène mineur, a été caractérisé par Hemmer [21]. Cette protéine est détectée à 10 kDa à l'aide du sérum de deux sujets possédant des IgE spécifiques contre des protéines de pollen de colza (Bra n 1) et de pollen d'aulne (Aln g 4). Les travaux de Niederberger et al. démontrent que le sérum de lapin sensibilisé par Aln g 4 reconnaît une bande de 6–8 kDa sur l'immunoblot du pollen de frêne [22]. Cette homologie fait de Fra e 3 une protéine à deux sites de liaison au calcium, appartenant à une grande famille de panallergènes.

4.5. Allergène de 35 kDa

Les travaux de Niederberger et al. [22] ont permis de décrire pour la première fois un quatrième allergène du pollen de frêne qui est détecté sur les immunoblots du pollen de frêne à 35 kDa. La préincubation d'un de ces sérums avec des extraits polliniques de bouleau d'une part, et d'olivier d'autre part, fait disparaître ce signal, suggérant ainsi la présence de communautés antigéniques entre ces deux pollens. Pour le pollen de bouleau, cela pourrait être expliqué par une certaine homologie avec Bet v 5, un allergène mineur du pollen de bouleau, détecté à 35 kDa, et qui a des propriétés enzymatiques d'isoflavone réductase, comme le démontrent Karamloo et al. [27].

4.6. Allergènes de HPM

Hemmer et al. rapportent deux sérums qui révèlent un signal sur l'immunoblot du pollen de frêne qui s'étend sur une large zone située entre 40 et 80 kDa [21]. Pouvant inhiber ces signaux par une préincubation avec la bromélaïne, ils en déduisent qu'il s'agit de résidus polysaccharidiques et de glycoprotéines en se fondant sur les conclusions des travaux de Pike et al. [28]. Dans les expériences de Niederberger et al., 30 % de sérums reconnaissent plusieurs bandes de poids moléculaire supérieur à 30 kDa [22]. Cependant, il est possible que la pertinence clinique de ces allergènes de haut poids moléculaire ne soit pas significative. Cela a été suggéré par d'autres auteurs pour ces allergènes de haut poids moléculaire [29].

4.7. Autres allergènes

La présence d'un autre allergène du pollen de frêne a été évoquée plus récemment de façon indirecte [30]. D'après Ledesma et al., il s'agit d'un allergène croisant d'Ole e 8, lui-même appartenant à la famille de protéines à quatre sites de liaison au Ca^{2+} . Il est détecté à 20 kDa par un sérum de lapin immunisé contre rOle e 8 sur un immunoblot du pollen de frêne.

5. Allergies croisées

5.1. Avec les oléacées

Dans une publication strasbourgeoise de 1976, dix cas de sensibilisation cutanée au pollen d'olivier ont été rapportés [3]. L'absence de cet arbre en Alsace, ainsi que l'association dans cinq cas avec une sensibilisation cutanée au pollen de frêne a déjà incité les auteurs à évoquer la possibilité de la présence d'une communauté antigénique entre ces arbres de la même famille botanique. Depuis, plusieurs auteurs ont souligné que la sensibilisation au pollen de frêne s'accompagne d'une sensibilisation au pollen d'olivier [31,32]. En 1983, Blanca et al. ont pu mettre en évidence une activité allergénique au niveau d'une vingtaine de fractions protéiques de pollen d'olivier obtenu par isoélectrofocalisation [33]. Ces travaux très préliminaires ont bénéficié de l'apport au cours de dix dernières années du progrès des études immunochimiques et des techniques de biologie moléculaire. La publication de Rodriguez et al. fait une synthèse des travaux réalisés pour l'étude des allergènes du pollen d'olivier [34]. Lombardero et al. rapportent les résultats des tests cutanés effectués avec des protéines naturelles purifiées des allergènes majeurs des différentes oléacées (Ole e 1 pour l'olivier, Fra e 1 pour le frêne, Lig v 1 pour le troène et Syr v 1 pour le lilas) [23]. Parmi 15 patients monosensibilisés au pollen d'olivier tous sauf un répondent aux quatre protéines purifiées. Ils confirment ces résultats par des tests d'histaminolibération chez neuf patients. Très récemment, le travail de Barderas et al. n'a

fait que confirmer une homologie importante entre les protéines recombinantes des allergènes majeurs de pollen de frêne (rFra e 1) et d'olivier (rOle e 1) [25].

La présence d'allergènes « olive-like » dans les extraits de pollens de frêne, troène et lilas, a été explorée par Obispo et al. [17] en 1993 en utilisant deux anticorps monoclonaux anti-Ole e 1, appelés OL-2 et OL-7. L'utilisation de ces anticorps sur des colonnes de chromatographie d'affinité a permis de recueillir des fractions purifiées à partir des extraits polliniques des différentes oléacées. En SDS-PAGE, les protéines purifiées de pollens de frêne, de troène et de lilas sont révélées par une bande de précipitation correspondant à un poids moléculaire de 20 kDa, dont la localisation est identique à la bande de précipitation de Ole e 1. Par ailleurs, les courbes doses-dépendantes obtenues par l'inhibition du RAST Fra e 1, Lig v 1 et Syr v 1, en utilisant du sérum d'un patient sensibilisé au pollen d'olivier, étaient parallèles à celle obtenue avec Ole e 1 suggérant ainsi l'existence d'épitopes communs. En 1994, des immunologistes espagnols définissent quatre groupes d'épitopes au niveau de l'allergène majeur du pollen d'olivier, Ole e 1 [35]. La réactivité des différents anticorps monoclonaux dirigés contre ces épitopes, avec des extraits polliniques des autres membres de la famille des oléacées, démontre la présence d'une très forte homologie entre Ole e 1 et le pollen de frêne, qui partagent au moins quatre épitopes.

En ce qui concerne la profiline du pollen de frêne, Fra e 2, des travaux antérieurs utilisant la technique de l'immunoblotting avaient montré une bande de précipitation à 14 kDa, ce qui était en faveur d'un deuxième allergène du frêne, différent de l'allergène majeur mais sa nature n'avait pu être identifiée [15,16]. Hemmer et al. identifient une profiline grâce à l'utilisation d'anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre la profiline du céleri [21]. L'étude de Niederberger et al. est particulièrement démonstrative : le sérum de lapin obtenu par immunisation avec une profiline recombinante de bouleau reconnaît la même bande à 14 kDa sur un immunoblot de pollen de frêne [22]. Des expériences d'inhibition avec rBet v 2 et avec un extrait naturel de pollen d'olivier sur un sérum reconnaissant uniquement une bande entre 10 et 14 kDa montrent la disparition complète du signal sur l'immunoblot du pollen de frêne.

La présence d'un allergène de la famille des polcalcines dans l'extrait du pollen d'olivier avait été démontrée par Batañero et al., dès 1996, grâce à l'homologie de cet allergène avec d'autres allergènes appartenant à cette famille, à savoir Bet v 4, Bra r 1 et Bra r 2 [36]. La même équipe a réussi à purifier cet allergène, appelé Ole e 3 [37]. Hemmer a individualisé plus tard sur les immunoblots du pollen de frêne un allergène sur une bande de précipitation également située à 9–10 kDa dont il suggère qu'il correspond à l'allergène homologue de Ole e 3, il le nomme Fra e 3 [21]. Dans l'étude de Niederberger et al. un sérum de lapin immunisé avec Aln g 4 reconnaît une bande à 8–9 kDa sur l'immunoblot du pollen de frêne [22]. Par ailleurs, la reconnaissance élective par un sérum d'une bande correspondant à la protéine de poids molé-

culaire de 6–8 kDa peut être inhibée par la préincubation avec rPhl p 7, homologue de Aln g 4 et de Ole e 3, ainsi que par des extraits de pollens reconnus comme contenant cet allergène, dont celui du pollen d'olivier.

L'existence d'un allergène commun entre le pollen d'olivier et le pollen de frêne avait été évoquée par les études d'immunoblot réalisées par Pajaron et al. au niveau d'une bande de précipitation à 36,7 kDa dès 1997 [16]. En 1999, Martinez et al. utilisent des anticorps polyclonaux d'un lapin sensibilisé contre une protéine purifiée du pollen d'olivier de poids moléculaire de 36 kDa, appelé Ole e 4. Ils visualisent également une bande sur l'immunoblot du pollen de frêne en utilisant ces anticorps [38]. Dans l'étude de Niederberger et al., il a été possible d'inhiber l'allergène de 35 kDa sur l'immunoblot du pollen de frêne par une préincubation avec un extrait de pollen d'olivier [22].

On pouvait également suspecter des allergènes communs entre le pollen de frêne et le pollen d'olivier compte tenu de la concordance des lignes de précipitation dans les zones de poids moléculaire supérieur à 30 kDa. Cela était également suggéré par des immunoblots de Hemmer [21] et Niederberger [22]. Dans le travail de Niederberger et al., des expériences d'inhibition sont réalisées avec le sérum d'un patient reconnaissant ces bandes. La préincubation de ce sérum avec un extrait de pollen d'olivier entraîne la disparition de ces bandes de haut poids moléculaire. Très récemment, Huecas et al. ont isolé un nouvel allergène, Ole e 9, à 46 kDa, ayant une activité (β)1–3 glucanase [39]. Cet allergène pourrait avoir son homologue dans les pollens d'autres oléacées. Ces auteurs ont pu montrer en utilisant l'ARN messager de Ole e 9 comme sonde de détection en Northern-Blot qu'une protéine homologue pouvait être détectée dans le pollen de frêne.

En ce qui concerne Ole e 8, une publication récente de Ledesma et al. rapporte des nouvelles données sur la communauté antigénique de ces deux pollens [30]. Ainsi, le sérum de lapin immunisé avec l'allergène recombinant rOle e 8 reconnaît la même bande sur l'immunoblot du pollen de frêne et d'olivier. La préincubation de ces deux immunoblots avec rOle e 8 a entraîné la disparition de ces bandes. En revanche, dans ce même travail la préincubation de deux immunoblots avec Ole e 1 ne modifie pas le signal ce qui permet à notre avis de bien différencier ces deux allergènes dont les poids moléculaires sont très proches. Les anticorps de lapin anti-rOle e 8 reconnaissent une protéine de 20 kDa sur l'immunoblot du pollen de genévrier qui pourrait correspondre à un allergène homologue de Jun o 2, qui appartient à la famille des protéines à quatre sites de fixation au calcium. Cela implique l'appartenance d'Ole e 8 et par conséquent de son homologue dans le pollen de frêne à cette famille de panallergènes [40].

5.2. Avec le pollen de bouleau

En 1992, Lelong observe une importante cosensibilisation au bouleau (neuf patients) dans le groupe des 11 malades sensibilisés au pollen de frêne [31]. Schmid et al. rapportent, dès

1994, la fréquence de cosensibilisation au pollen de frêne et au pollen de bouleau chez 417 sujets présentant une pollinose printanière précoce [41]. Cependant, la fréquence de cosensibilisation de ces deux pollens n'est pas décrite. Parmi les 23 sujets allergiques au pollen de frêne sélectionnés par Laurent, cinq sont également sensibilisés au pollen de bouleau [42]. Hemmer affirme en 2000 qu'il existe une cosensibilisation significative entre les pollens de bouleau et de frêne en Autriche : parmi 438 sujets allergiques au pollen de frêne et sensibilisés à un nombre peu élevé d'autres pollens, 26 % ont une sensibilisation concomitante au pollen de fagales [21]. La présence d'une importante cosensibilisation constatée à l'issue des études cliniques a conduit en 1996 Wahl et al. à explorer l'existence d'une réaction croisée entre les allergènes de *F. excelsior* et de *Betula verucosa* [43]. Des tests cutanés et des tests de provocation nasale ont été pratiqués chez 35 patients présentant des manifestations allergiques en mars et en avril. Vingt et un patients sur trente-cinq avaient des tests cutanés positifs pour les deux pollens, 3/35 uniquement au pollen de bouleau et 7/35 uniquement au pollen de frêne. Une analogie remarquable a été observée pour les tests de provocation nasale : parmi les 35 sujets 29 ont réagi au pollen de bouleau et 28 au pollen de frêne. Parmi eux, sept sujets ont réagi uniquement au pollen de bouleau et six sujets uniquement au pollen de frêne. Ces constatations cliniques ont été renforcées par les résultats d'expérimentations in vitro, en particulier par la technique d'inhibition du RAST. Lorsque le pollen de bouleau est fixé sur l'immunoabsorbant, le pourcentage d'inhibition d'un RAST bouleau par le pollen de frêne n'a atteint que 32 %. Les auteurs suggèrent que si Bet v 1 représente l'allergène majeur d'un extrait pollinique de bouleau, le support immunologique de cette réactivité croisée ne peut pas être attribué à cet allergène majeur. Ils démontrent également sur des immunoblots que le signal de Bet v 1 n'est pas modifié en cas de préincubation avec un extrait de pollen de frêne. Niederberger et al. ont renforcé ces conclusions grâce à l'utilisation des allergènes recombinants [22]. D'une part, un sérum de lapin immunisé vis-à-vis de rBet v 1 n'a pas reconnu d'allergène homologue dans l'extrait pollinique de frêne. D'autre part, à plusieurs reprises, la reconnaissance des IgE spécifiques dans la zone de fixation de Fra e 1 (21–25 kDa) de l'immunoblot du pollen de frêne n'a pas été inhibée par rBet v 1.

L'homologie entre la profiline du bouleau et du frêne a été démontrée par ces mêmes travaux comme décrit précédemment pour la profiline du pollen d'olivier. Dans le sérum utilisé pour l'expérimentation ils mettent en évidence un titre élevé des IgE spécifiques vis-à-vis de rBet v 2 par la méthode Elisa [22].

La troisième catégorie d'allergènes croissants concerne une autre famille de panallergènes, les protéines de liaison au calcium. À cette catégorie appartiennent Fra e 3 et Bet v 4. L'homologie entre Bet v 4 et Aln g 4 [44], allergènes mineurs de deux bétulacées, et la découverte d'un allergène de frêne appartenant à cette famille grâce à l'utilisation de Aln g 4 [21], ne laisse que peu de doute quant au partage d'épitopes

communs entre ces trois allergènes. Cette constatation peut être appuyée par les résultats des immunoblots effectués par Niederberger et al. [22] qui mettent en évidence la disparition de la zone de 6–8 kDa de l'immunoblot de frêne après préincubation avec un extrait naturel de pollen de bouleau.

Le dernier niveau de réactivité croisée entre les pollens de frêne et de bouleau concerne les allergènes de haut poids moléculaire. Parmi les 40 sérums de patients présentant une sensibilisation au frêne associée à une sensibilisation au bouleau, Niederberger et al. [22] retrouvent une fixation d'IgE à une protéine de 35 kDa sur l'immunoblot du pollen de frêne dans six cas et reconnue de manière exclusive dans trois cas. Il a été possible d'inhiber ce signal par la préincubation d'un de ces sérums avec un extrait naturel de pollen de bouleau. Le profil immunoélectrophorétique de cet allergène de haut poids moléculaire du bouleau correspond à Bet v 5, identifié et isolé par Karamloo et al. en 1999 [27]. Par analogie à Bet v 5, cet allergène du frêne pourrait avoir des activités biochimiques d'isoflavone réductase. Il a également été possible de démontrer qu'un sérum de lapin immunisé contre un peptide recombinant de la portion C-terminale de la pectinestérase du pollen de bouleau (Bet v 8) reconnaît une bande protéique au niveau de l'immunoblot du pollen de frêne [22]. Les auteurs déduisent qu'un analogue de ce peptide est probablement présent parmi les allergènes du pollen de frêne.

5.3. Avec le pollen de graminées

Un certain nombre de publications ne concernent pas directement les réactions croisées entre le pollen de frêne et le pollen de graminées mais les réactions croisées entre le pollen d'olivier et le pollen de graminées. Compte tenu de la forte communauté antigénique entre les deux espèces de la famille des oléacées et en particulier entre les allergènes majeurs Fra e 1 et Ole e 1, nous considérons que les résultats de ces travaux scientifiques peuvent également être appliqués au pollen de frêne. Les constatations cliniques ont été très parlantes : la publication de Lelong sur la pollinose au frêne a retenu sept cas sensibilisés au pollen de graminées parmi onze sujets allergiques au pollen de frêne [31]. D'après une étude réalisée en 1993, sur mille dossiers de consultants du service d'allergologie de l'hôpital Sainte-Marguerite à Marseille, les oléacées, toutes familles confondues, représentent à peu près le tiers des positivités obtenues pour les graminées ; pour 120 tests cutanés positifs aux oléacées, une association avec une sensibilisation cutanée au pollen de graminées est observée dans 75 cas (soit 62,5 % des cas) [45]. Les résultats obtenus par une équipe japonaise en 1997 suggèrent une réaction croisée entre le pollen d'*Olea europaea* et le pollen de *Dactylis glomerata* [46,47]. Sur une population de 92 patients présentant une rhinite allergique d'avril à juin, les auteurs mettent en évidence des IgE spécifiques vis-à-vis du pollen de *D. glomerata* et vis-à-vis du pollen d'olivier dans le sérum de 20 sujets sur le groupe des 21 personnes possédant des IgE spécifiques antipollen d'olivier (soit 95,2 %). En inhibition du RAST, la courbe obtenue démon-

trait une inhibition dose-dépendante de la fixation des IgE spécifiques antipollen d'olivier par l'extrait de dactyle pelotonné.

Hemmer et al. constatent que la sensibilisation au pollen de frêne est associée dans 13,9 % des cas à une sensibilisation au pollen de graminées [21]. Les travaux de Baldo et al. en 1992 suggèrent l'existence d'allergènes communs entre le pollen d'olivier et le pollen d'ivraie mais le support immunologique de cette réactivité croisée ne serait pas un allergène majeur du pollen d'olivier [48]. Cependant, dans le travail de Niederberger et al., la préincubation de l'immunoblot du sérum d'un patient sensibilisé à Fra e 1 avec un extrait naturel de phléole inhibe partiellement le signal à 21–25 kDa. Nous pouvons interpréter ce résultat par un faible niveau de réactivité croisée entre les deux pollens, par analogie au pollen d'olivier qui partage 44 % d'homologie avec Lol p 11 selon van Ree et al. [24]. Dans le même sens, Lombardero et al. en soulignant l'absence de données directes prouvant la réactivité croisée entre Lol p 11 et Ole e 1, évoquent la présence d'un croisement antigénique de faible degré [23].

L'existence de croisement antigénique entre la profiline du pollen de frêne, Fra e 2, et la profiline du pollen de graminées, Phl p 12, est fortement suggérée devant la disparition complète du signal de la bande à 14 kDa de l'immunoblot du pollen de frêne en cas de préincubation d'un sérum reconnaissant électivement cet allergène par l'extrait naturel de pollen de phléole. Par la suite, le croisement antigénique entre Fra e 3 et Phl p 7, un allergène à deux sites de liaison au calcium est mis en évidence : la préincubation du sérum d'un patient sensibilisé au pollen de frêne, d'une part avec un extrait naturel de pollen de phléole et d'autre part avec l'allergène recombinant rPhl p 7, supprime le signal de 6–8 kDa sur l'immunoblot du pollen de frêne [22]. Dans ce même travail, la préincubation de deux sérums avec un extrait naturel de pollen de phléole inhibe les zones de précipitation à haut poids moléculaire, ce qui constitue un argument supplémentaire en faveur de la présence d'allergènes croissants de haut poids moléculaire entre ces deux espèces polliniques.

5.4. Avec le pollen des herbacées

La publication de Hemmer avait relevé un pourcentage de cosensibilisation frêne-herbacées de 2,2 % [21]. Niederberger et al. ont réalisé des inhibitions d'immunoblots des sérums des patients allergiques au pollen de frêne avec des extraits d'ambrosie [22] : la bande de précipitation de 14 kDa sur l'immunoblot est complètement effacée par l'extrait d'ambrosie ce qui suggère également la présence d'une profiline dans le pollen d'ambrosie. L'état des connaissances actuelles permet de retrouver ce panallergène chez d'autres membres de la famille des herbacées (armoise, mercuriale, tournesol). Par ailleurs, la présence d'allergènes à deux sites de liaison au calcium est vraisemblable dans le pollen d'ambrosie puisque sur l'immunoblot d'un sérum, le signal à 6–8 kDa est quasiment supprimé après préincubation avec un extrait de pollen d'ambrosie. De même pour l'allergène à 35 kDa,

la préincubation de l'immunoblot d'un sérum reconnaissant électivement cet allergène avec l'extrait du pollen d'ambrosie provoque la disparition du signal.

La liste des allergènes croissants entre les pollens de frêne et d'herbacées s'élargit si on tient compte des publications récentes qui mettent en évidence un certain niveau de réactivité croisée entre l'allergène majeur de l'olivier, Ole e 1, et certains allergènes des herbacées. Cela concerne l'allergène majeur du plantain (*Plantago lanceolata*), Pla l 1, d'un poids moléculaire de 16–20 kDa, dont une séquence de l'extrémité N-terminale présente une certaine homologie (estimée à 38,7 %) avec la séquence d'acides aminés d'Ole e 1. Les expériences d'inhibition par ELISA et l'utilisation d'anticorps monoclonaux produits contre les principaux déterminants antigéniques de ces deux allergènes n'ont permis de retrouver qu'un faible partage d'épitopes communs qui d'après les auteurs serait lié aux différences de leur structure tertiaire [49].

L'allergène majeur d'une autre herbacée, le chénopode blanc (*Chenopodium album*), Che a 1, d'un poids moléculaire de 17 kDa présente une homologie d'acides aminés de 27–45 % avec Ole e 1. Malgré une identité de séquence élevée, les deux allergènes, Ole e 1 et Che a 1, ne présentent qu'une réactivité croisée limitée [50].

5.5. Communauté antigénique avec les trophallergènes

En dehors des allergènes associés au pollen de bouleau, la littérature ne rapporte pas de cas d'allergie alimentaire associée à la pollinose au frêne, de même qu'aucune allergie à l'olive, n'est signalée chez des patients sensibilisés au pollen d'olivier.

5.6. Synthèse sur les allergènes croissants

Les communautés antigéniques présumées entre les allergènes de pollen de frêne et les autres pollens, d'après les données de la littérature, sont résumées dans le [Tableau 1](#). Le [Tableau 2](#) représente les croisements antigéniques entre le frêne et les différentes grandes familles botaniques. Il faut souligner le haut degré de réactivité croisée entre les différentes espèces d'oléacées, fondé sur l'importante homologie entre les allergènes majeurs. Quant aux autres pollens, taxonomiquement éloignés, le support immunologique de la réactivité croisée repose essentiellement sur la présence des panallergènes comme la profiline et les protéines liant le calcium.

5.7. Immunothérapie spécifique

À l'heure actuelle, on ne dispose pas de séries publiées concernant la désensibilisation au pollen de frêne à grande échelle. Cela provient certainement de l'incertitude quant à la réalité et la spécificité de cette pollinose, de la superposition de la saison pollinique avec celle du bouleau. Toutefois, certains auteurs y consacrent quelques lignes sous forme de suggestions ou de questions. Ainsi, Schmid et al. [32], en 1992,

Tableau 1
Les allergènes croissants des différents allergènes moléculaires du frêne

Fra e 1	Ole e 1/Lol p 11/Pla l 1/Che a 1 Lig v 1 Syr v 1
Fra e 2	Ole e 2, Phl p 12, Mer a 1, Hel a 2 Bet v 2 profiline de l'armoise et de l'ambroisie
Fra e 3	Ole e 3 Aln g 4 Bet v 4 Phl p 7, Cyn d 7 Bra n 1, Bra r 2 Ambroisie
Allergène de 35 kDa	Ole e 4 Bet v 5
Allergènes de haut PM	Ole e 9 Phl p 4 Bet v 8
Allergène de 18–20 kDa (?)	Ole e 8 Jun o 2

suggèrent pour la première fois la possibilité d'introduire la désensibilisation spécifique au pollen de frêne chez les malades ayant une pollinose printanière précoce et sensibilisés à la fois au pollen de frêne et au pollen de bouleau. Wahl et al. proposent la mise en route d'une immunothérapie spécifique à condition que la sensibilisation soit bien documentée sur le plan allergologique [43]. Ils se posent la question sur le choix de l'extrait, pollen de frêne ou pollen d'olivier, ce dernier ayant une activité allergénique incontestable. Pajaron et al. récusent l'immunothérapie spécifique avec le pollen de frêne arguant du fait que le pollen d'*O. europaea* contient toutes les fractions antigéniques présentes dans le pollen de frêne,

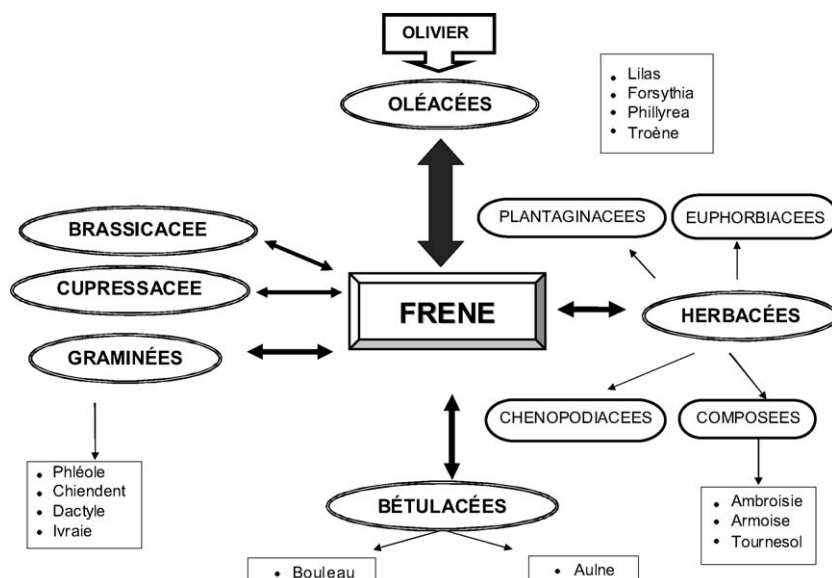
et proposent ainsi d'utiliser l'extrait de pollen d'olivier pour désensibiliser les sujets allergiques au frêne dans le Nord de l'Europe [16].

La standardisation des allergènes du pollen de frêne n'a été effectuée que très récemment. L'utilisation d'extraits commerciaux dont le contenu en allergènes majeurs est précisé, va contribuer à l'amélioration du diagnostic de cette pollinose [51]. Cependant, il serait souhaitable d'avoir à disposition l'allergène recombinant Fra e 1, au moins pour les diagnostics in vitro, ce qui permettrait d'effectuer un diagnostic plus précis. Il faut aussi envisager dans l'avenir de faire des désensibilisations plus ciblées, n'utilisant que les allergènes auxquels le patient est effectivement sensibilisé. Dans le cas du frêne, l'utilisation de Fra e 1 (voire d'Ole e 1) pourrait être la technique du futur.

6. Conclusion

La positivité d'un test cutané vis-à-vis d'un extrait allergénique du pollen de frêne signifie que l'individu est sensibilisé aux allergènes du pollen de frêne. Cela ne signifie pas automatiquement que l'individu est atteint d'une allergie sur le plan clinique. Pour établir le bon diagnostic, le médecin allergologue doit accumuler des preuves objectives de la responsabilité de l'allergène : par l'interrogatoire du patient, par l'étude de l'environnement pollinique et éventuellement par des tests de provocation nasale. Tout l'art du médecin sera de savoir s'il s'agit d'une « fausse » ou d'une « vraie » allergie. La présomption de la pertinence clinique de l'allergie au pollen de frêne repose également sur les connaissances récentes des allergènes croissants.

Tableau 2
Sensibilisations croisées possibles entre le frêne et les autres familles botaniques



Références

- [1] Charpin J, Wolfromm R, Aubert J, Charpin H, Guehot E, Lauriol M. Le calendrier pollinique de Paris. *Rev Fr Allergol* 1965;5:65–75.
- [2] Mantz JM, Pauli G, Moreau G, Muller MA, Dillenschneider E, Braun A. La pollinose en Alsace. *J Med Strasbourg* 1973;4:489–98.
- [3] Pauli G, Bessot JC, Nieder P, Mallea M, Soler M, Renard M. Particularités de l'allergie aux pollens d'arbres en Alsace. *Bull Actual ther* 1976;:1927–34.
- [4] Ott W, Pauli G, Bessot JC, Eckert F, Roegel E. Allergie aux pollens d'arbres en Alsace. *Rev Fr Allergol* 1981;21:1–5.
- [5] de Blay F, Bessot JC, Pauli G. Les nouveaux pneumallergènes. *Rev Pneumol Clin* 1996;52:79–87.
- [6] Charpin D, Vervloet D. Les « nouveaux » aéroallergènes. Interaction allergènes-environnement. *Bull Acad Natl Med* 1997;181:1551–61.
- [7] Pauli G, Papanikolaou I, Niederberger V. Sensibilisation au frêne : allergènes spécifiques et/ou allergènes croissants ? *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2003;43:120–4.
- [8] Guérin B. Plantes, fleurs et taxons allergisants. In: Pollen et allergies. Varennes-en-Argonne: Ed. Allerbio; 1993. p. 98–9.
- [9] Marigo G, Peltier JP, Girel F, Pautou G. Success in the demographic expansion of *Fraxinus excelsior* L. *Trees (Berl)* 2000;15:1–13.
- [10] Thibaudon M, Sulmont G. Le réseau de recueil pollinique : technique et organisation. *Rev Fr Allergol* 1999;39:263–6.
- [11] Bekker A, Thibaudon M. Les calendriers polliniques. *Rev Fr Allergol* 1999;39:267–75.
- [12] Pauli G, Bessot JC, Hutt N, Thibaudon M. L'environnement pollinique et son évaluation. *Rev Pneumol Clin* 1997;53:317–22.
- [13] Papanikolaou I. Allergie aux pollens de frêne (*Fraxinus excelsior*). [Thèse]. Strasbourg : Université Louis-Pasteur ; 2003.
- [14] Bousquet J, Guérin B, Hewitt B, Lim S, Michel FB. Allergy in the Mediterranean area III: cross reactivity among Oleaceae pollens. *Clin Allergy* 1985;15:438–48.
- [15] Wahl R, Roig J, Wimmel BA, Canejero A. Cross reactivity between *Olea europaea* [OE], *Syringa vulgaris* [SV] and *Fraxinus excelsior* [FE]. *J Allergy Clin Immunol* 1991;87(Suppl):185.
- [16] Pajaron MJ, Vila L, Prieto I, Resano A, Sanz ML, Oehling AK. Cross-reactivity of *Olea europaea* with other Oleaceae species in allergic rhinitis and bronchial asthma. *Allergy* 1997;52:829–35.
- [17] Obispo TM, Melero JA, Carpizo JA, Carreira J, Lombardero M. The main allergen of *Olea europaea* is also present in other species of the Oleaceae family. *Clin Exp Allergy* 1993;23:311–6.
- [18] Fernandez MC, Olmedilla A, Alché JD, Palomino P, Lahoz C, Rodriguez-Garcia MI. Immunogold probes for light and electron microscopic localization of Olea e 1 in several Oleaceae pollens. *J Histochem Cytochem* 1996;44:151–8.
- [19] Carreira J, Obispo T, Lombardero M. Alergenos de *Olea europaea* y otras especies relacionadas. *Rev Esp Alergol Immunol Clin* 1994;9:46–50.
- [20] van Ree D, Cabanes-Macheteau M, Akkerdaas J, Milazzo JP, Loutelier-Bourhis C, Rayon C, et al. $\beta(1,2)$ -xylose and $\alpha(1,3)$ -fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant Glycoallergens. *J Biol Chem* 2000;275:11451–8.
- [21] Hemmer W, Focke M, Wantke F, Gotz M, Jarisch R, Jager S, et al. Ash (*Fraxinus excelsior*)-pollen allergy in central Europe: role of pollen panallergens and the major allergen of ash pollen, Fra e 1. *Allergy* 2000;55:923–30.
- [22] Niederberger V, Purohit A, Oster JP, Spitzauer S, Valenta R, Pauli G. The allergen profile of ash (*Fraxinus excelsior*) pollen: cross-reactivity with allergens from various plant species. *Clin Exp Allergy* 2001;32:933–41.
- [23] Lombardero M, Obispo T, Calabozo B, Lezaun A, Polo F, Barber D. Cross-reactivity between olive and other species. Role of Ole e 1-related proteins. *Allergy* 2002;57:29–34.
- [24] van Ree R, Hoffman D, van Dijk W, Brodard V, Mahieu K, Koeleman C, et al. Lol p XI, a new major grass pollen allergen, is a member of a family of soybean inhibitor-related proteins. *J Allergy Clin Immunol* 1995;95:970–8.
- [25] Barderas R, Purohit A, Papanikolaou I, Rodriguez R, Pauli G, Villalba M. Cloning, expression and clinical significance of the major allergen from ash pollen, Fra e 1. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:351–7.
- [26] Ledesma A, Rodriguez R, Villalba M. Olive-pollen profilin. Molecular and immunologic properties. *Allergy* 1998;53:520–6.
- [27] Karamloo F, Schmitz N, Scheurer S, Foetisch K, Hoffmann A, Hauste D, et al. Molecular cloning and characterization of a birch pollen minor allergen, Bet v 5, belonging to a family of isoflavone reductase-related proteins. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:919.
- [28] Pike RN, Bagorozzi Jr. D, Travis J. Immunological cross-reactivity of the major perennial ryegrass (*Lolium perenne*), Lol p I, and the cystéine protéinase, bromelain. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;112:412–4.
- [29] van der Veen M, van Ree R, Aalberse R, Akkerdaas J, Koppelman S, Jansen H, et al. Poor biologic activity of cross-reactive IgE directed to carbohydrate determinants of glycoproteins. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:327–34.
- [30] Ledesma A, Villalba M, Vivanco F, Rodriguez R. Olive pollen allergen Ole e 8: identification in mature pollen and presence of Ole e 8-like proteins in different pollens. *Allergy* 2002;57:40–3.
- [31] Lelong M, Castelain MC, Sulmont G. Existe-t-il en France, une pollinose au frêne ? *Rev Fr Allergol* 1992;32:41–2.
- [32] Schmid P, Peeters AG, Wüthrich B. L'allergie au pollen de frêne existe en Suisse, nous l'avons rencontré. *Rev Fr Allergol* 1992;32:139–40.
- [33] Blanca M, Boulton P, Brostoff J, Gonzalez-Reguera I. Studies of the allergens of *Olea europaea* pollen. *Clin Allergy* 1983;13:473–8.
- [34] Rodriguez R, Villalba M, Batanero E, Gonzalez EM, Monsalve RI, Huecas S, et al. Allergenic diversity of the olive pollen. *Allergy* 2002;57:6–16.
- [35] Martin-Orozco E, Cardaba B, Del Pozo V, De Andrés B, Villalba M, Gallardo S, et al. Ole e 1: Epitope mapping, cross-reactivity with other Oleaceae pollens and ultrastructural localization. *Int Arch Allergy Immunol* 1994;104:160–70.
- [36] Batanero E, Villalba M, Ledesma A, Puente JS, Rodriguez R. Ole e 3, an olive-tree allergen, belongs to a widespread family of pollen proteins. *Eur J Biochem* 1996;241:772–8.
- [37] Ledesma A, Villalba M, Batanero E, Rodriguez R. Molecular cloning and expression of active Ole e 3, a major allergen from olive-tree pollen and member of a novel family of Ca^{2+} -binding proteins (polcalcins) involved in allergy. *Eur J Biochem* 1998;258:454–9.
- [38] Martinez A, Asturias JA, Palacios R, Sanz ML, Sanchez J, Oehling A, et al. Identification of a 36-kDa olive pollen allergen by *in vitro* and *in vivo* studies. *Allergy* 1999;54:584–92.
- [39] Huecas S, Villalba M, Rodriguez R. Ole e 9, a major olive allergen is a 1,3- β -glucanase. Isolation, characterization, aminoacide sequence, and tissue specificity. *J Biol Chem* 2001;276:27959–66.
- [40] Ledesma A, Villalba M, Rodriguez R. Cloning, expression and characterization of a novel four EF-hand Ca^{2+} -binding protein from olive pollen with allergenic activity. *FEBS Lett* 2000;466:192–6.
- [41] Schmid-Grendelmeier P, Peeters AG, Wahl R, Wüthrich B. Zur Bedeutung der Eschenpollenallergie. *Allergologie* 1994;11:535–42.
- [42] Laurent J, Guinépain MT, Sauvaget J, Lafay M. La pollinose du frêne [*Fraxinus excelsior* L.] à Paris. *Rev Fr Allergol* 1998;38:89–93.
- [43] Wahl R, Schmid-Grendelmeier P, Cromwell O, Wüthrich B. In vitro investigation of cross-reactivity between birch and ash pollen allergen extracts. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:99–106.
- [44] Hayek B, Vangelista L, Pastore A, Sperr WR, Valent P, Vrtala S, et al. Molecular and immunological characterization of a highly cross-reactive two EF-hand calcium-binding alder pollen allergen, Aln g 4. *J Immunol* 1998;161:7031–9.
- [45] Montané F. L'allergie à l'olivier et aux oléacées dans le Sud de la France. *Allergol Immunol* 1994;26:320–3.
- [46] Miyahara S. Olive pollinosis in Japan. *Arerugi* 1995;44:1305–10.
- [47] Miyahara S, Nakada M, Nishizaki K, Nishioka K, Hino H. Cross-reactivity to olive tree pollen and orchard grass pollen in patients with pollinosis. *Acta Med Okayama* 1997;51:167–71.

- [48] Baldo B, Panzani R, Bass D, Zerboni R. Olive (*Olea europaea*) and privet (*Ligustrum vulgare*) pollen allergens. Identification and cross reactivity with grass pollen proteins. *Mol Immunol* 1992;29:1209–18.
- [49] Calabozo B, Diaz-Perales A, Salcedo G, Barber D, Polo F. Structural and antigenic similarity between Pla 1 1 and Ole e 1, the major allergens of English plantain and olive pollens. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107 (Abst 51).
- [50] Barderas R, Villalba M, Lombardero M, Rodriguez R. Identification and characterization of Che a 1 allergen from *Chenopodium album* pollen. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;127:47–54.
- [51] Hrabina M, Purohit A, Oster JP, Papanikolaou I, Jain K, Sicard H, et al. Standardisation of an ash (*Fraxinus excelsior*) pollen allergen extract. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; (soumis).