



Disponible en ligne sur www.sciencedirect.com



Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique xxx (2008) xxx–xxx

REVUE FRANÇAISE
D'ALLERGOLOGIE
ET D'IMMUNOLOGIE CLINIQUE

<http://france.elsevier.com/direct/REVCLI/>

Mesure des allergènes de pollens d'arbre dans l'air (bouleau, olivier)

Measure of airborne tree pollen allergens (birch, olive)

M. Thibaudon*, C. Sindt

Réseau national de la surveillance aérobiologique, chemin des Gardes, 69610 Saint-Genis-l'Argentière, France

Résumé

L'information fournie par les comptes polliniques reste incontournable pour les allergologues et les allergiques, toutefois, les discordances constatées de temps en temps avec les observations cliniques ont amené le réseau national de la surveillance aérobiologique (RNSA) à être l'initiateur du projet *Monitoring network of allergens by immunosampling* (Monalisa). De même, un certain nombre de travaux récents ont montré l'influence de la pollution, de la région et même de l'année sur le contenu en allergènes des pollens et, en particulier, du pollen de bouleau. En outre, le projet Monalisa a pour objectif de mettre en œuvre un système de mesure de l'air reposant sur une méthode immunologique afin de valider une nouvelle approche des mesures en direct des pollens dans l'air. Ce projet du programme européen Life Environnement rassemble neuf partenaires : Bertin Technologies (France), RNSA (France), NPARU (Angleterre), Uco (Espagne), Utu (Finlande), Uam (Pologne), Uevora (Portugal), Aia (Italie) et Meteoswiss (Suisse). Les résultats obtenus à la suite de la campagne 2006, puis de la campagne 2007 après modifications apportées au préleveur, restent en demi-teinte. Les principaux résultats concernent la mesure des allergènes arbres Bet v1 (bouleau) et Olea 1 (olivier) en période essentiellement de prépollinisation et parfois en période postpollinisation. Cette présence d'allergènes peut être due à leur présence sur des particules submicroscopiques émises indépendamment de la pollinisation croisant avec les allergènes de bouleau ou d'olivier. Les difficultés rencontrées laissent de beaux jours aux comptes polliniques associés, aux observations phénologiques et aux données cliniques.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

The information provided by pollen counts cannot be ignored by allergists and allergic individuals, but the divergence sometimes observed with clinical observations has led the réseau national de la surveillance aérobiologique (RNSA) to initiate the monitoring network of allergens by immunosampling (Monalisa) project. Moreover, some recent papers has shown the influence of pollution in the region and even of the year on the content in pollen allergens, particularly that of birch pollen. Thus, the goal of the Monalisa project was to set up a measuring system based on an immunological method that would result in validation of this new way of measuring airborne pollen counts. This European Life Environment project includes nine partners: Bertin Technologies (France), RNSA (France), NPARU (England), UCO (Spain), UTU (Finland), UAM (Poland), UEVORA (Portugal), AIA (Italy), and Meteoswiss (Switzerland). The results obtained during the 2006 season and then in the 2007 campaign, after modifications made in the sampler, were not very good. The principal results concern the measurement of birch and olive allergens, captured essentially in the prepollination period and sometimes in the postpollination period. Detection of these allergens may be due either to their presence on submicroscopic particles emitted independently of pollination, these allergens cross-reacting with birch and olive allergens. The difficulties encountered in this study lead us to say that pollen counts, phenological observations and clinical data are still the best way to assess the effects of airborne pollen.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Pollen ; Aérobiologie ; Monalisa ; Allergie

Keywords: Airborne pollen; Tree pollen allergens; Aerobiology; Monalisa

1. Introduction

Si l'information fournie par les comptes polliniques est devenue indispensable à la bonne pratique de l'allergologie, certaines discordances entre données « pollens » et

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : rnsa@rnsa.fr (M. Thibaudon).

« pollinoses » restent constatées. En effet, que ce soit grâce aux bulletins cliniques recueillis par le réseau national de la surveillance aérobiologique (RNSA), que par des observations très spécifiques, il n'est pas rare de constater la survenue de symptômes quelques jours avant l'apparition des comptes de pollens correspondants ou encore leur prolongement quelques jours voire quelques semaines après la disparition des pollens spécifiques [1].

De plus, pour des données polliniques proches d'une année à l'autre, il est constaté une certaine différence de potentiel allergisant du même pollen d'une année à l'autre et d'une région à l'autre [2].

Si les grains de pollens sont les principaux porteurs d'allergènes, certains grains peuvent l'être plus ou moins pour des raisons de pollution [2] ou pour des raisons météorologiques [3,4].

L'équipe de Buters et al. [2,5] a récemment publié des travaux indiquant que la mesure de Betv1 dans des grains de pollens issus de chatons provenant d'environnements différents peut varier de 1 à 6. Les collègues australiens mettent en avant les corrélations entre mesure de Betv1 dans l'air et les conditions météorologiques [3,6].

Depuis 2005, le RNSA a initié un projet de recherche concernant la mesure des allergènes dans l'air. Il s'agit du projet *Monitoring network of allergens by immunosampling* (Monalisa).

Ce projet européen, du programme « Life Environnement » comprend neuf partenaires :

- NPARU – Worcester – Angleterre – Jean Emberlin ;
- Uco – Cordoba – Espagne – Carmen Galan ;
- Utu – Turku – Finlande – Auli Rantio-Lehtimäki ;
- Bertin – Montigny le Bretonneux – France – Esmeralda Carvalho ;
- RNSA – Lyon – France – Michel Thibaudon ;
- Aia – Parma – Italie – Roberto Albertini (intégré en 2007 en tant que membre invité) ;
- Uam – Poznan – Pologne – Alicja Stach
- Uevora – Évora – Portugal – Rui Brandao ;
- Meteoswiss – Payerne – Suisse – Bernard Clot (en sous-traitance avec le RNSA).

Le projet Monalisa a pour objectif le développement d'une nouvelle approche de l'analyse du contenu biologique de l'air associant une méthode d'échantillonnage en milieu liquide et une méthode d'analyse immunologique (Elisa), afin de pouvoir mesurer l'allergénicité/antigénicité des principaux pollens ou particules présents dans l'air [7].

2. Objectifs du projet

Les objectifs du projet sont les suivants :

- mesurer la capacité allergisante des particules dans l'air (approche non limitée à la quantification des grains de pollens) ;

- mettre en place une classification des pollens et autres particules microbiologiques en rapport avec leurs capacités allergisantes ;
- être capable de détecter des grains de pollens et autres petites particules (inférieures à un micron) ;
- établir un protocole d'analyse commun en vue d'une standardisation ;
- démontrer la robustesse et l'efficacité du matériel d'échantillonnage dans sept climats biogéographiques différents.

Le résultat escompté est la mise en place d'un système de collecte et d'analyse directe comme nouvel outil standard pour la mesure des pollens et autres petites particules microbiologiques ayant un potentiel allergisant.

3. Matériel et méthodes

3.1. Échantillonnage des pollens

Au cœur des deux saisons 2006 et 2007, sept partenaires du réseau ont positionné en parallèle un capteur de pollen de type Hirst et un biocollecteur cyclonique conçu spécifiquement par Bertin Technologies.

3.1.1. Capteur de type Hirst

Il s'agit des capteurs utilisés par tous les réseaux d'information dans le monde. Ce sont des girouettes aspirant dix litres d'air par minute et impactant les particules présentes dans l'air sur une bande transparente siliconée défilant devant la buse d'aspiration [8] (Schéma 1).

La bande transparente est tout simplement découpée en tronçons correspondants à 24 heures d'impaction et la préparation pour microscopie est préparée en ajoutant trois gouttes d'un colorant se fixant électivement sur l'exine des pollens [9]. Les lames sont ensuite lues au $\times 400$ en lignes horizontales afin d'enregistrer tous les nuages polliniques de chaque journée. Il est ainsi possible d'incrémenter la base de données nationale avec les concentrations journalières en chaque pollen.

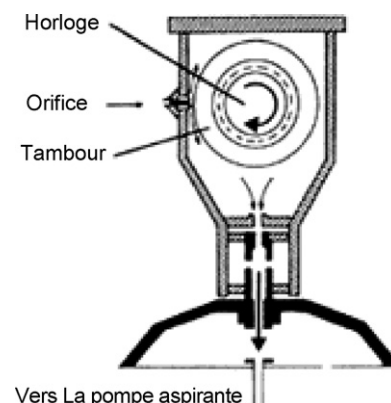


Schéma 1.

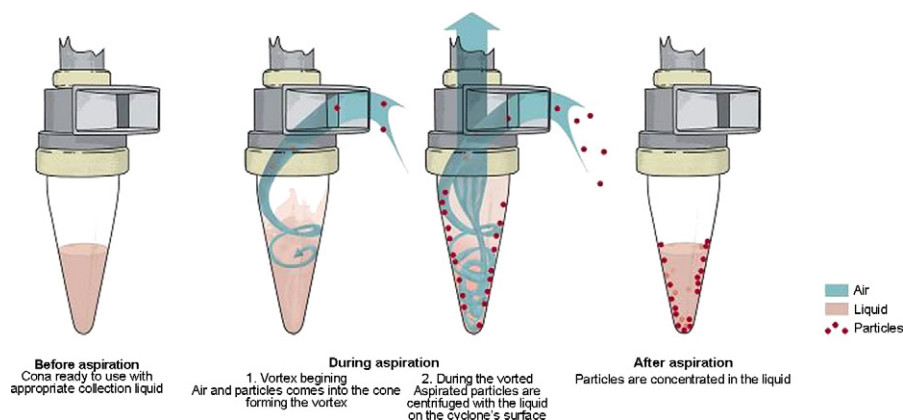


Schéma 2.

3.1.2. Biocollecteur cyclonique

Le biocollecteur cyclonique développé par Bertin Technologies à la fois dans le cadre de la mesure de l'aérobiocontamination et pour le projet Monalisa, est un capteur de type cyclonique qui permet le recueil de toutes les particules supérieures à 0,1 micron de l'air dans un échantillon liquide. Pour la saison 2007, le biocollecteur a été positionné sur une girouette afin d'offrir la buse d'aspiration face au vent. Le débit d'aspiration est de 200 litres par minute et les durées de prélèvement ont varié de 1 heure à 6 heures selon les étapes d'avancement du projet Monalisa (Schéma 2).

Une partie de l'échantillon est utilisée pour l'analyse pollinique au microscope optique, le reste est aliquoté puis congelé à -18°C pour les dosages Elisa.

3.2. Mesure des allergènes

Dans le cadre du projet Monalisa, les pollens étudiés sont *Betula*, *Poaceae*, *Cupressus*, *Olea*, *Parietaria*, *Ambrosia* et

une spore de moisissure *Alternaria*. Pour cette présentation, nous nous limitons aux travaux réalisés sur *Betula* et *Olea*. Les méthodes d'analyses utilisées sont des Elisa sandwichs utilisant pour le bouleau un anticorps anti-betv1mAb3B4 et pour *Olea* un anticorps polyclonal obtenu par immunisation de lapin avec l'allergène majeur olea1. Les analyses ont été faites dans les laboratoires de la faculté de Turku et de Cordoba avec l'aide technique d'Indicia Technologies.

4. Résultats

4.1. Comptes polliniques

Les comptes polliniques réalisés sur les bandes du capteur Hirst ou sur les échantillons liquide du Coriolis sont ajustés pour être représentatifs du même échantillon. Il est ainsi possible de tracer des courbes de superposition des données obtenues avec les deux capteurs.

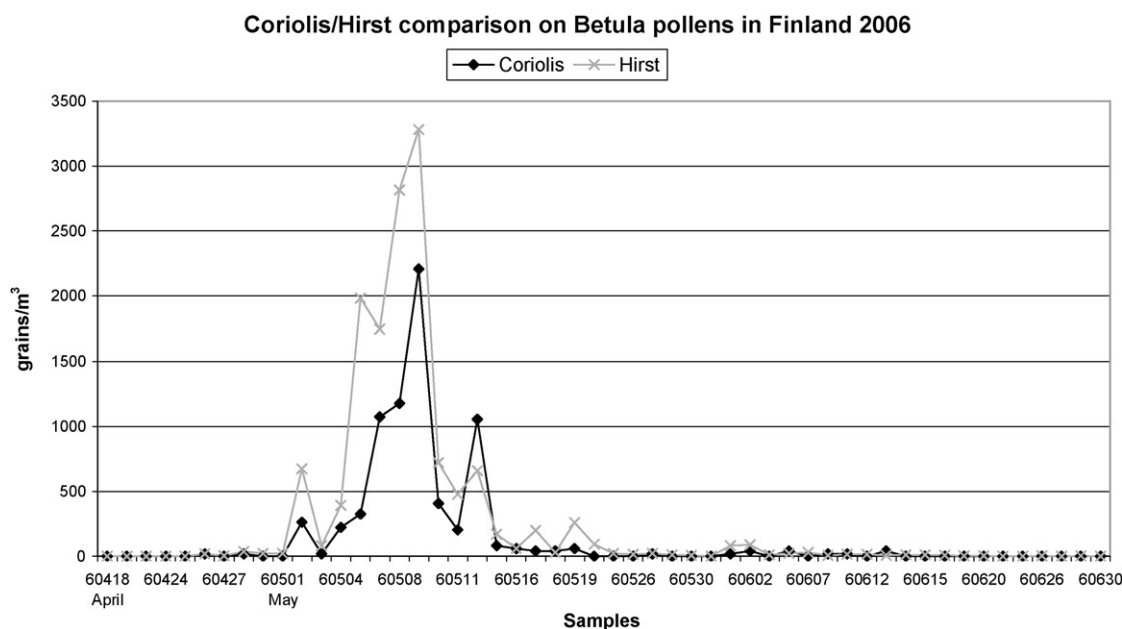


Figure 1. Comparaison des comptes polliniques du bouleau à Turku en Finlande pour l'année 2006.

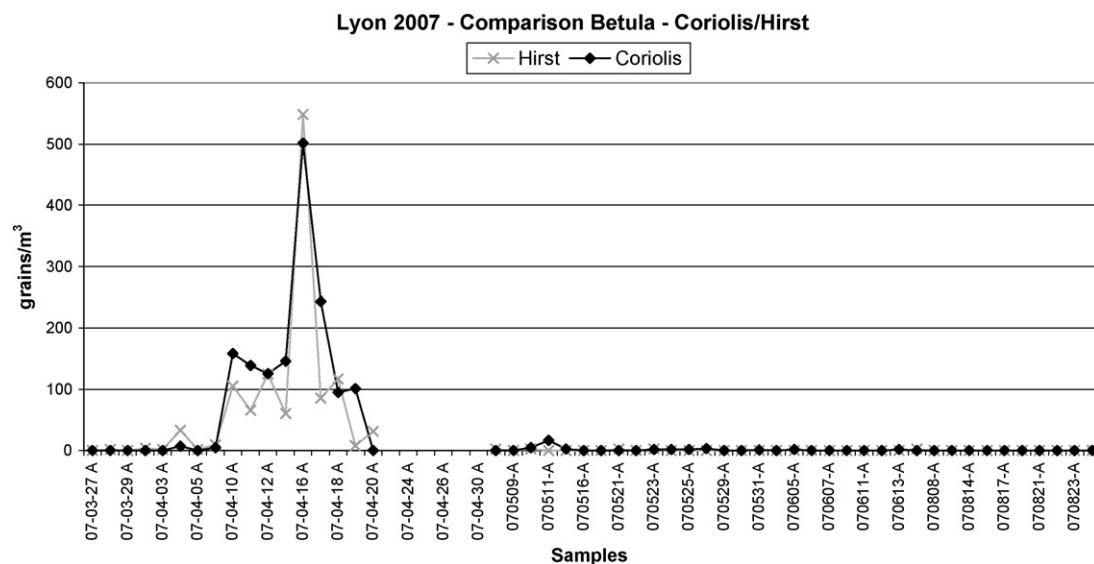


Figure 2. Comparaison des comptes polliniques du bouleau à Lyon en France pour l'année 2007.

Pour le pollen de bouleau, il existe une bonne concordance des comptes polliniques, les pics polliniques se situent en même temps et peuvent être soit supérieurs avec le capteur Hirst (Fig. 1) soit équivalents avec le capteur Coriolis (Fig. 2).

Pour le pollen d'olivier, les résultats sont plutôt en faveur du système Hirst (Figs. 3 et 4) en 2007 alors que sur Cordoba en 2006 les tracés obtenus avec les deux systèmes étaient très proches (Fig. 5).

Les données obtenues sur 2006 et 2007 ont été traitées statistiquement avec un test de Pearson révélant des niveaux de corrélation acceptables (Tableau 1).

4.2. Mesure des allergènes/antigènes par Elisa

Grâce à la courbe de calibration réalisée avec des antigènes de bouleau calibrés, il est possible de transformer les données obtenues en densité optique (DO) en concentration en antigènes.

4.2.1. Pollen de bouleau

Les valeurs obtenues en 2006 sont restées très faibles et difficiles à interpréter due à une trop faible concentration d'allergènes dans les échantillons congelés. En outre, pour la campagne 2007, les durées de prélèvement ont été multipliées

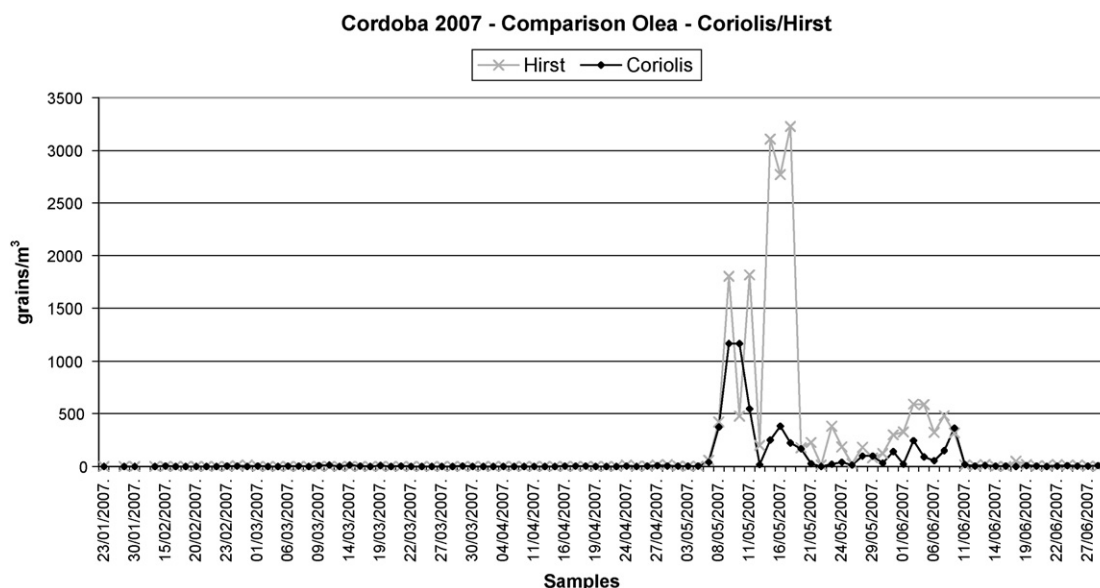


Figure 3. Comparaison des comptes polliniques de l'olivier à Cordoba en Espagne pour l'année 2007.

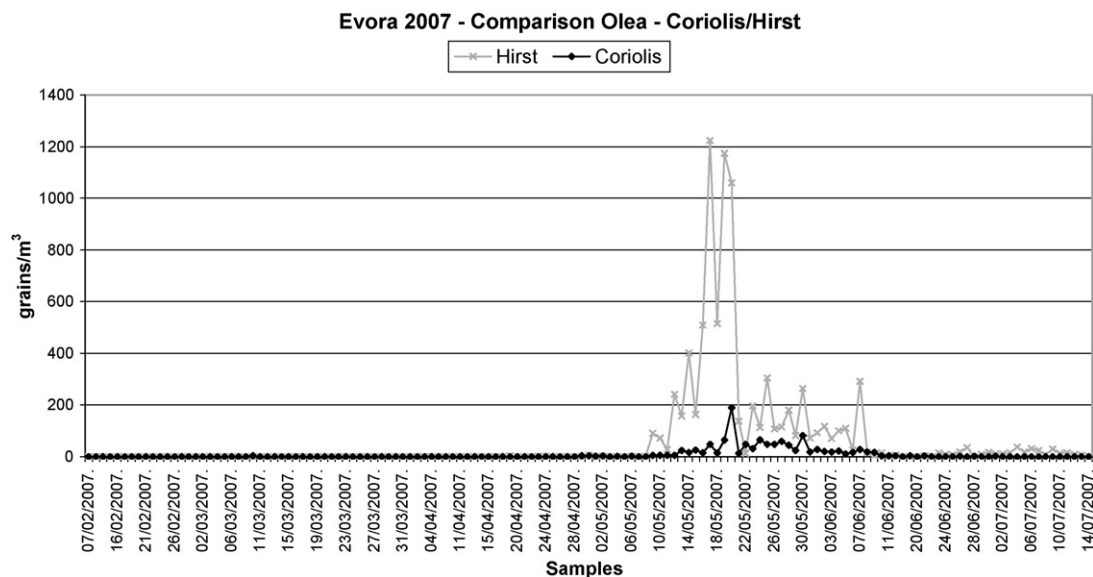


Figure 4. Comparaison des comptes polliniques de l'olivier à Évora au Portugal pour l'année 2007.

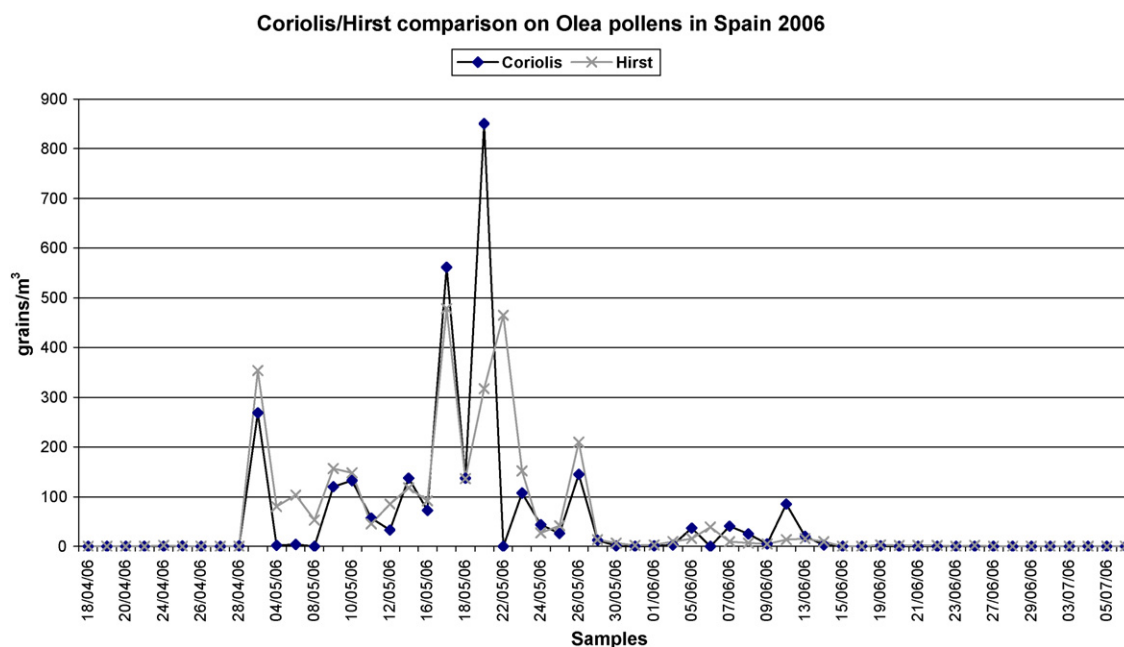


Figure 5. Comparaison des comptes polliniques de l'olivier à Cordoba en Espagne pour l'année 2006.

par six dans l'espoir d'obtenir de meilleurs résultats. Les résultats pour le pollen de bouleau, obtenus dans la ville de Turku (Fig. 6) et dans celle de Poznan (Fig. 7) sont particulièrement intéressants et significatifs.

En revanche, pour Lyon, les résultats ne sont pas concordants avec les données polliniques (Fig. 8).

4.2.2. Pollen d'olivier

Le seul résultat obtenu est celui de l'unité de Cordoba où l'on constate une discordance entre les concentrations antigéniques et les comptes polliniques (Fig. 9).

5. Discussion

La disparité des résultats obtenus montre, en outre, la difficulté de la mise en œuvre de tels projets mais aussi sa nécessité par l'obtention de résultats de concentration d'antigène parfois en décalage avec les concentrations polliniques mesurées.

Dans le cadre de la mesure des concentrations polliniques, pour les pollens de bouleau, on constate une bonne corrélation tant entre la date de démarrage de la pollinisation que pour les dates de survenue des pics et de fin de pollinisation

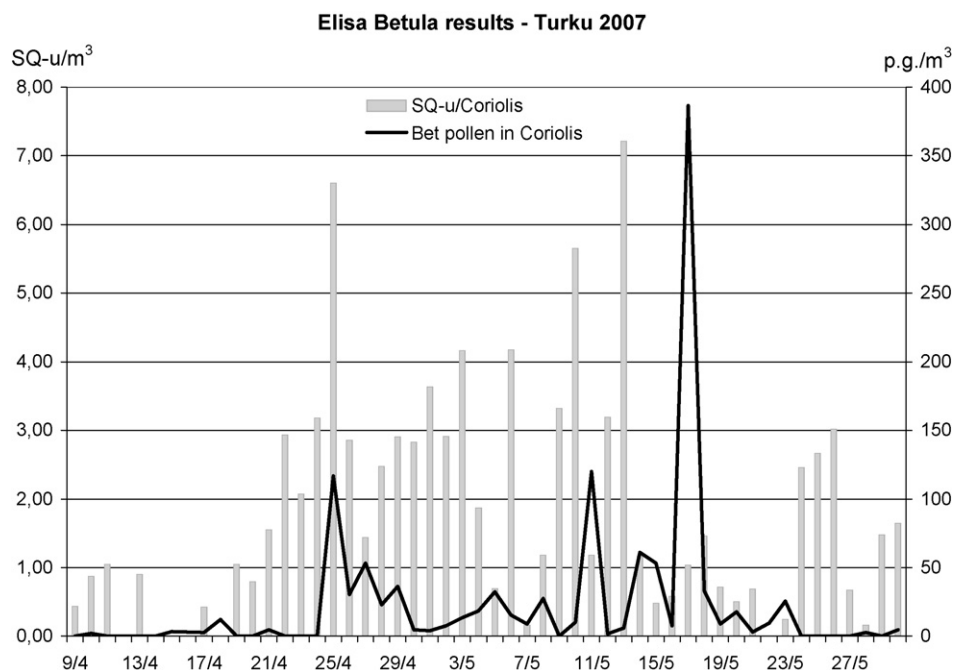


Figure 6. Comparaison comptes polliniques du Coriolis et résultats des tests Elisa pour le bouleau à Turku en Finlande en 2007.

(Figs. 1 et 2) ; les concentrations elles-mêmes pouvant varier selon la méthode.

Pour les pollens d'olivier (Figs. 3 et 4) les données polliniques sont significativement différentes avec les deux capteurs. Il est possible que la densité des grains ait une influence sur la capacité de rétention au sein de l'échantillon liquide obtenu avec le biocollecteur cyclonique en milieu liquide. Toutefois, les courbes obtenues à Cordoba en 2006 (Fig. 5) sont totalement comparables avec un taux de corrélation de 0,7759 (test de Pearson) Tableau 1.

5.1. Mesure des allergènes

5.1.1. Pollen de bouleau

Ce qui est le plus caractéristique des résultats présentés en Figs. 6–8 concerne l'existence d'une précocité de la mesure des antigènes de bouleau par rapport aux comptes polliniques, et un sursaut après le pic pollinique. En revanche, pendant le pic pollinique, la mesure d'allergène reste basse voire nulle. Si l'on peut expliquer la présence d'antigène en avance, par leur présence sur d'éventuelles granules de très petits diamètres, il est difficile de donner une explication à leur absence pendant un

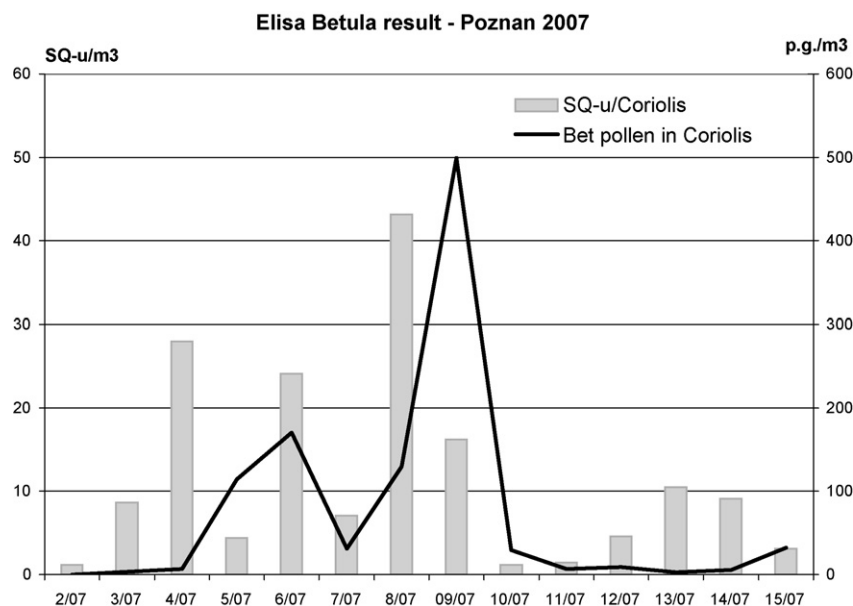


Figure 7. Comparaison comptes polliniques du Coriolis et résultats des tests Elisa pour le bouleau à Poznan en Pologne en 2007.

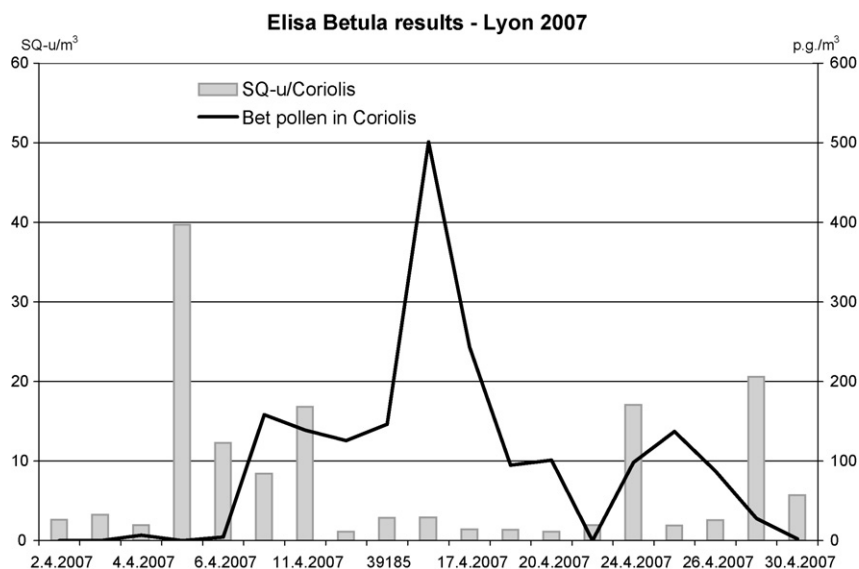


Figure 8. Comparaison comptes polliniques du Coriolis et résultats des tests Elisa pour le bouleau à Lyon en France en 2007.

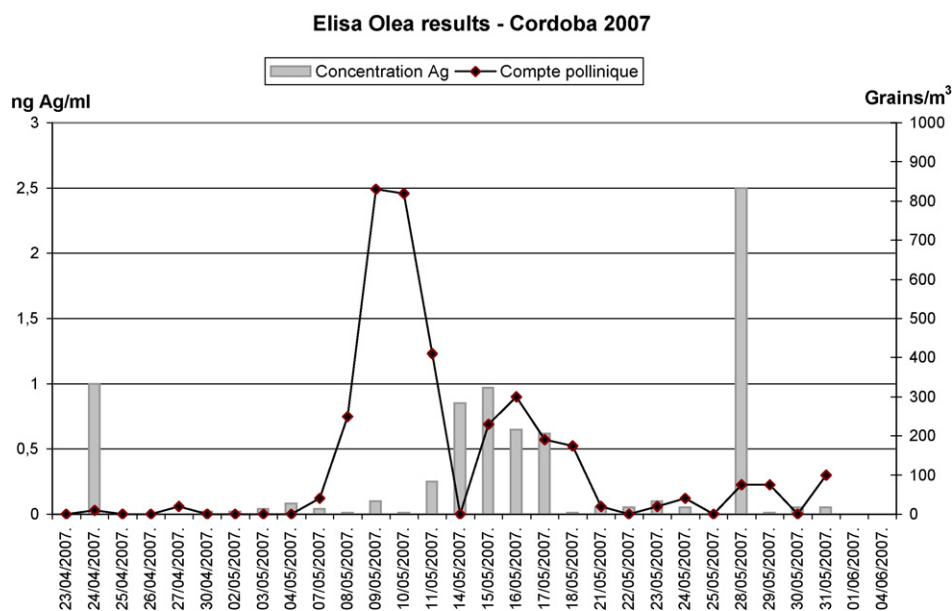


Figure 9. Comparaison comptes polliniques du Coriolis et résultats des tests Elisa pour l'olivier à Cordoba en Espagne en 2007.

Tableau 1

Test corrélation de Pearson sur les concentrations polliniques journalières obtenues avec les méthodes Hirst et Coriolis

Pays	2006		2007	
	Betula	Olea	Betula	Olea
Finlande	0,9129	NA	0,6795	NA
France	0,7666	NA	0,9270	NA
Italie	NA	NA	NA	0,0687
Pologne	0,4740	NA	0,5297	NA
Portugal	NA	0,1149	0,5247	0,7094
Espagne	NA	0,7759	NA	0,5506
Suisse	NA	NA	0,7159	NA

NA = Non applicable.

des pics polliniques en dehors d'un défaut dans la méthodologie (recueil, concentration, spécificité).

De même, comme l'ont montré Buters et al. [2,5] il existe une différence importante d'une année sur l'autre de la concentration en Betv1. Par exemple, à Munich si les comptes polliniques au pic de bouleau de 2004, 2005 et 2006 ont été respectivement de 729, 3522 et 1681 grains par mètre cube par jour, la concentration, en même temps, du pic de Betv1 était de 148, 364 et 1390 pg Betv1 par mètre cube.

Si l'on s'en tient uniquement aux comptes de pollen, l'année 2005 peut être considérée comme la plus importante alors que la concentration en allergène de 2005 est quatre fois inférieure à celle de l'année 2006 qui présente deux fois moins de pollen, soit un écart de huit fois d'une année à l'autre sur le même site.

5.1.2. Pollen d'olivier

La divergence des résultats obtenus à Cordoba pour les pollens d'olivier (Fig. 9) peut s'expliquer, en outre, par la présence de microparticules susceptibles de contenir des allergènes [10] ou par l'existence dans l'air de particules porteuses d'antigènes ayant des réactions croisées avec olea1 [11].

6. Conclusion

La mise en œuvre du projet Monalisa a montré, à la fois l'importance de la mesure d'allergénicité/antigénicité de l'air et des difficultés que l'on peut rencontrer.

Après ces deux années de comparaison des méthodes, il paraît nécessaire de poursuivre les pistes suivantes :

Échantillonnage : l'échantillonnage en milieu liquide présente des avantages mais aussi des inconvénients, et il conviendrait de poursuivre avec, en comparaison, des méthodes de prélèvement soit cyclonique en milieu sec [12] ou par immune empreinte [10,13] ou en utilisant des capteurs de type cascades filtrantes [3,5,6,11].

Méthode Elisa : elle reste une méthode relativement peu sensible puisqu'elle nécessite plusieurs dizaines voire centaines de grains pour être mesurable. D'autres méthodes plus sensibles comme l'immunocytométrie en phase solide [14] devraient pouvoir être testées tout en tenant compte de la qualité et de la spécificité des anticorps utilisés.

En attendant, les comptes polliniques ont de beaux jours devant eux surtout lorsqu'on les associe aux données phénologiques de production de pollens et aux données cliniques représentant l'impact sanitaire de l'exposition aux pollens.

Références

- [1] Oliver G, Thibaudon M. Clinical and phenological data interest for the determination of the allergic risk. EAACI Congress 2007 in Göteborg.

- [2] Buters JT, Kasche A, Weichenmeier I, Schober W, Klaus S, Traidl-Hoffmann C, et al. Year-to-year variation in release of Bet v 1 allergen from birch pollen: evidence for geographical differences between west and south Germany. *Int Arch Allergy Immunol* 2007;145(2):120–30.
- [3] Schäppi GF, Suphioglu C, Taylor PE, Knox RB. Concentrations of the major birch tree allergen Bet v 1 in pollen and respirable fine particles in the atmosphere. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100(5):656–61.
- [4] Spieksma FT, Nikkels AH. Similarity in seasonal appearance between atmospheric birch-pollen grains and allergen in paucimicronic, size-fractionated ambient aerosol. *Allergy* 1999;54(3):235–41.
- [5] Buters JT, Weichenmeier I, Ochs S, Kreyling W, Boere J, Cassee F, et al. Comparison between ambient Bet v 1 concentration and birch pollen count. JES of RNSA 2007 in Barcelona.
- [6] Schäppi GF, Taylor PE, Staff IA, Rolland JM, Suphioglu C. Immunologic significance of respirable atmospheric starch granules containing major birch allergen Bet v 1. *Allergy* 1999;54(5):478–83.
- [7] Thibaudon M, Lachasse C. Phénologie : Intérêt et méthodes en aérobiologie. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* 2005;45:194–9.
- [8] Hirst JM. An automatic volumetric spore traps. *Ann Applied Biology* 1992;39:257–65.
- [9] Kapila M, Penttinen A. An evaluation of the microscopical counting method of the tape in Hirst – Burkard pollen and spore trap. *Grana* 1981;20:131–41.
- [10] Razmovski V, O'Meara TJ, Taylor DJ, Tovey ER. A new method for simultaneous immunodetection and morphologic identification of individual sources of pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105(4):725–31.
- [11] De Linares C, Nieto-Lugilde D, Alba F, Díaz de la Guardia C, Galán C, Trigo MM. Detection of airborne allergen (Ole e 1) in relation to *Olea europaea* pollen in S Spain. *Clin Exp Allergy* 2007;37(1):125–32.
- [12] Moreno-Grau S, Elvira-Rendueles B, Moreno J, García-Sánchez A, Vergara N, Asturias JA, et al. Correlation between *Olea europaea* and *Parietaria judaica* pollen counts and quantification of their major allergens Ole e 1 and Par j 1-Par j 2. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006;96(6):858–64.
- [13] Madeja J, Wypasek E, Plytycz B, Sarapata K, Harmata K. Quantification of airborne birch (*Betula* sp.) pollen grains and allergens in Krakow. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2005;53(2):169–74.
- [14] Thibaudon M, Rabillon J. A new approach of analysis in aerobiology. IPC 2004 in Granada.