

COLLECTE ET CONTROLE DES POLLENS PRÉPARATION DES EXTRAITS

Collecte des pollens

B. GUERIN *

Les techniques de collecte des matières premières constituent l'un des facteurs déterminants de la qualité des allergènes dont l'importance n'a été considérée que récemment. Cette remarque s'applique naturellement aux pollens d'autant qu'ils paraissent, à tort, poser peu de problèmes parce que mieux définis. Certes, la nature de l'allergène est, dans leur cas, moins incertaine qu'en matière de phanères, poussières ou même de médicaments, mais la composition antigénique des extraits obtenus dépend directement de la pureté de la matière première et de ses conditions de collecte et de conservation, qui demeurent mal définies et encore difficilement contrôlables ; une hygrométrie excessive à température ambiante pendant quelques heures, même si elle ne permet pas la croissance significative de moisissures, suffit à engager les processus enzymatiques et donc à modifier la composition cytoplasmique. De même, l'espèce et l'année de collecte peuvent, semble-t-il, s'avérer importantes car certaines plantes d'une même famille pollinisent peu, tandis que les conditions climatiques et météorologiques conditionnent peut-être la composition des pollens.

Afin d'étudier ces différentes variables, nous avons créé, en France, un petit centre expérimental de collecte dont nous rappellerons rapidement les techniques en insistant plus particulièrement sur leurs avantages et inconvénients.

CULTURE ET SÉLECTION DES ESPÈCES

Pour assurer une collecte rationnelle de toutes les espèces allergisantes, il faut idéalement en disposer à proximité du laboratoire soit à l'état sauvage, soit en culture. Cette disponibilité est particulièrement importante pour les plantes qui, comme la plupart

des graminées fourragères, pollinisent pratiquement à la même période et doivent être surveillées journalièrement.

En pratique, le centre devra disposer :

- d'un territoire botanique répertorié où pourront être cueillies les inflorescences d'arbres ou de plantes sauvages préalablement identifiées ;

- d'une réserve de graines sélectionnées et contrôlées pour la constitution de laquelle il est toujours possible d'obtenir l'aide bienveillante de la graineterie du Muséum National d'Histoire Naturelle ;

- d'une zone de culture naturelle pour toutes les plantes courantes dont les besoins de pollen sont importants et qui permettent une collecte mécanique ;

- d'une installation de culture contrôlée en serre pour les plantes à pollinisations particulières généralement échelonnées sur une longue période de temps comme, par exemple, les pariétaires, voire même les plantains.

PRINCIPALES TECHNIQUES DE COLLECTE UTILISÉES

Le choix de la technique utilisable dépend pour chaque espèce tout d'abord de (tableau I) :

1. Son mode de pollinisation, qui peut se faire librement ou nécessiter une action mécanique pour l'ouverture des anthères ; citons à titre d'exemple de ces deux groupes,

comme pollinisateurs naturels :

- l'ensemble des graminées,

* Tirés à part : B. GUERIN, Laboratoire des Stallergènes, 160, quai de Polangis, 94340 JOINVILLE-LE-PONT (France).

TABLEAU I
AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS COMPARÉS DES DIFFÉRENTES TECHNIQUES DE COLLECTE

	(1) ASPIRATION DIRECTE	(2) TECHNIQUE DU BOUQUET	(3) SÉCHAGE SUR CLAIÉ SANS ACTION MÉCANIQUE	(4) SÉCHAGE SUR CLAIÉ OU EN TUNNEL SUIVI DE BROYAGE	(5) COLLECTE DANS SACS PLACÉS SUR L'INFLORESCENCE
Exemples de plantes	Graminées fourragères Ambrosia Armoise	Graminées fourragères Armoise Orties (+ /—)	Arbres types : — aune, — bouleau, — noyer, — sapin, — cèdre, etc.	— luzerne — pissenlit — eucalyptus — oranger — genêt	Pariétaire
Avantages	Grande quantité de pollen Rapidité Élimination du risque de contamination par moisissures si séchage rapide	Vérification aisée de la pureté des espèces récoltées Collecte précédent la pollinisation réalisée à l'abri du vent	Grande quantité de pollens Simplicité de la méthode et du matériel mis en œuvre	Idem (3)	Seule technique permettant d'obtenir un pollen pur pour certaines espèces
Inconvénients	Risque de contamination par pollens étrangers Difficulté d'éliminer l'humidité si la capacité de séchage n'est pas suffisante	Risques : — altérations des pollens si conditions d'hygrométrie insuffisamment surveillées — moisissures	Risque d'échauffement des inflorescences au moment de la collecte Contamination importante possible par débris végétaux si séchage excessif (plantes cassantes)	Idem (3) Contamination importante systématique par débris végétaux (morceaux de plantes ou d'inflorescence)	Rendement très faible Prix de revient élevé Risque d'altération si sacs non surveillés journallement

— de nombreux arbres, type : aulne, peuplier, bouleau, noyer, sapin, noisetier.

Comme représentants du second groupe (étamines restant à l'intérieur de la corolle) :

— de nombreuses légumineuses comme la luzerne, mais aussi le pissenlit, le soja,

— de nombreux arbres ou arbustes comme le robinier ou les genêts.

2. La densité et la pureté des plantes en période de pollinisation puisque ces conditions sont déterminantes pour le choix de la technique utilisable à un moment donné. Il faut noter, en effet, que même dans un champ contenant plusieurs espèces de graminées par exemple, il est possible qu'une seule d'entre elles pollinise à une certaine période ou à une certaine heure, ce qui implique de connaître pour chaque espèce très précisément les conditions optimales toujours liées à l'hygrométrie, à la température et à la luminosité.

C'est finalement la conjonction mode de pollinisation/culture et conditions climatologiques qui permettra de choisir entre :

ASPIRATION

Elle peut être réalisée directement à l'extérieur sur un champ cultivé pour les graminées par exemple ou même dans un terrain vague colonisé par des herbacées sauvages comme le Ragweed (*Ambrosia*) aux Etats-Unis ou certaines armoises en France. Pour obtenir des résultats satisfaisants, il faut disposer d'un aspirateur industriel de grande puissance, automoteur ou monté à l'avant d'un tracteur, réglable en hauteur et éventuellement équipé d'un dispositif inclinant les plantes et les secouant légèrement. Cette solution très élégante est, en pratique, difficile à mettre en œuvre car elle implique une disponibilité permanente, les heures de pollinisation étant prévisibles mais très dépendantes des conditions climatiques locales puisqu'il suffit d'un simple coup de vent pour rendre la manœuvre inopérante.

Son avantage principal est évidemment de permettre une collecte importante et rapide qui, si elle est suivie d'un séchage immédiat, évite les phénomènes de contamination par moisissures ou un début d'activation des processus enzymatiques.

Son principal inconvénient réside dans la difficulté de vérifier l'absence de pollens étrangers d'autant qu'un simple contrôle microscopique ne permet pas, le plus souvent, de distinguer les pollens d'une même famille.

Le procédé par aspiration est également utilisable sous serre pour des plantes cultivées qui pollinisent naturellement. Il est alors fait usage d'un simple aspirateur industriel si possible équipé de filtres pour retenir les éventuels débris végétaux.

TECHNIQUE DU BOUQUET

Pour les plantes sauvages ou même pour les plantes cultivées, lorsque l'aspiration n'est pas possible, les herbes préalablement identifiées sont coupées à la faucille et bottelées en longueur régulière de 30 à 60 cm ; puis disposées à l'intérieur d'une serre ou d'un local bien éclairé dont l'hygrométrie et la température sont réglables, soit :

— dans des seaux, après les avoir tordues en sens inverse avec les mains pour faciliter leur étalement régulier,

— dans des bacs spécialement adaptés de telle sorte que les tiges baignent dans l'eau et que l'inflorescence s'étale librement au-dessus de papiers sulfurisés séparés de la table de collecte pour éviter toute condensation.

A intervalle régulier de quelques heures ou de quelques jours, le collecteur tape doucement sur les bouquets avec une petite règle tout en aspirant les pollens ou en les récoltant en brossant le papier sulfurisé. Le délai de production des plantes immergées varie selon les espèces mais se situe aux environs de 4 à 5 jours, pour une température voisine de 20 °C.

Cette technique permet d'obtenir des pollens très purs botaniquement mais leur qualité dépend de la régularité de la collecte et de l'absence de condensation excessive facilitant la croissance des moisissures.

Excellente pour les graminées fourragères, elle est décevante pour les céréales.

MÛRISSEMENT SUR CLAIE SUIVI OU NON DU BROYAGE DES ANTHÈRES

La plupart des arbres, surtout à pollinisation hivernale, et de nombreuses herbacées peuvent être traités par ce procédé. Il consiste à cueillir les inflorescences, à les sécher sur claies métalliques, elles-mêmes posées sur un papier sulfurisé dans des conditions permettant une bonne aération et à recueillir le pollen, soit :

— directement sur le papier sulfurisé après légère agitation,

— par aspiration,

— une fois desséché complètement après frottement sur un tamis ou utilisation d'un broyeur mécanique.

Si les plantes pollinisent naturellement, le pollen recueilli peut être parfaitement pur mais pour les plantes qui nécessitent une ouverture mécanique des anthères, il est nécessairement contaminé de débris végétaux qu'il faut éliminer par tamisages successifs ou en utilisant leur différence de densité dans des solvants organiques comme le tétrachlorure de carbone et l'acétone, procédé dont l'influence sur la composition antigénique doit être étudiée.

CULTURE EN SERRE SOUS PROTECTION INDIVIDUELLE

Pour les plantes à pollinisation particulière comme la pariétaire par exemple, qui procède par petites explosions de pollen étalées sur une assez longue période de temps, ni l'aspiration ni la technique du bouquet ne sont utilisables ; tandis que le séchage des fleurs ne permet d'obtenir qu'un produit très impur, puisque les pollens actuellement sur le marché contiennent entre 5 et 25 p. cent de débris végétaux et contaminants divers.

Il est possible d'obtenir un produit répondant aux normes internationales de pureté, en entourant chaque inflorescence d'un petit sac protecteur qui permet de retenir le pollen libéré mais le prix de revient du pollen devient prohibitif.

CONTROLE ET CONSERVATION

Immédiatement après avoir procédé à la collecte et à la purification des pollens, il faut, pour les stabiliser et éviter toute contamination ultérieure, procéder à leur séchage à l'étuve en couche mince à une température, en principe, inférieure à 45 °C jusqu'à ce qu'ils contiennent moins de 1 p. cent d'eau, ce que l'on peut vérifier facilement par la perte de poids au séchage par exemple avec la balance automatique équipée d'un système de séchage intégré à infrarouges. La rapidité du séchage est déterminante pour préserver les pollens de toute croissance de moisissures et cette opération doit être entreprise 24 heures au plus tard après la récolte.

Une fois séché, le pollen est réparti dans des flacons préalablement tarés en verre brun et éventuellement conservés sous vide ou en atmosphère de gaz inerte.

La température de stockage est encore actuellement très controversée, certains laboratoires spécialisés recommandent la conservation au réfrigérateur, tandis que d'autres préfèrent la température du laboratoire. Seules des études suivies de contrôle de l'activité dans le temps, que nous avons comme d'autres initiées, permettront de proposer un protocole définitif.

Le problème des techniques de contrôle à utiliser pour vérifier la pureté et la qualité des pollens fait l'objet d'un rapport de P. Cour et nous n'en parlons donc pas ici.

CONCLUSION

Ce rapide rappel des techniques de collecte des pollens permet de conclure que, si l'aspect quantitatif et pratique semble bien codifié, de nombreux paramètres qualitatifs paraissent mal définis, notamment au niveau :

- du choix des espèces retenues,
- de l'influence des facteurs climatiques et météorologiques sur la composition antigénique,
- des risques de contamination,
- des conditions de stockage.

Aucun de ces paramètres ne pouvait, jusqu'à maintenant, être évalué d'une manière définitive, faute de moyens adéquats. Aussi, la mise au point des techniques de standardisation des allergènes, complétée par l'étude du profil immunitaire de la population allergique, permettra de surmonter en partie ces difficultés. Toutefois, l'établissement de produits de référence nécessitera un travail considérable, en raison de la multiplicité des allergènes.

Il restera à déterminer si le nombre des standards de référence disponibles, forcément limité, est suffisamment représentatif de la spécificité botanique des différentes espèces répandues dans le monde.