



HAL
open science

Allergénicité des Granules Cytoplasmiques de Pollen

Oussama Abou Chakra

► **To cite this version:**

Oussama Abou Chakra. Allergénicité des Granules Cytoplasmiques de Pollen. Biologie cellulaire. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2009. Français. NNT : . pastel-00567120

HAL Id: pastel-00567120

<https://pastel.hal.science/pastel-00567120v1>

Submitted on 18 Feb 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ECOLE DOCTORALE ABIES

Doctorat de Toxicologie

Thèse présentée par

Oussama ABOU CHAKRA

Soutenue le 16 Juin 2009

Allergénicité des Granules Cytoplasmiques de Pollen

Allergenicity of Pollen Cytoplasmic Granules

Membres du Jury

Pr. F. MARANO (Présidente)

Pr. D. CHARPIN (Rapporteur)

Dr. H. SENECHAL (Directrice de thèse)

Pr. C. RIPOLL (Rapporteur)

Dr. G. LACROIX (Co-directrice de thèse)

Dr. G. PELTRE (Membre invité)

Dr. M. THIBAUDON (Membre invité)

En souvenir de mon père

À ma mère

À ma sœur

À mon frère

Et à mon amour

Remerciements

Je désire exprimer ma profonde gratitude à mes directrices de thèse, Docteur **Ghislaine Lacroix** et Docteur **Hélène Sénéchal**, qui m'ont accueilli dans leurs équipes, à savoir l'unité de toxicologie expérimentale de l'INERIS et le Laboratoire Environnement et Chimie Analytique de l'ESPCI. Je tiens à les remercier spécialement pour leur soutien constant, leur disponibilité et leur humour. Merci à Ghislaine pour m'avoir proposé cette thèse, et merci à Hélène pour avoir accepté de prendre la relève du Dr. Gabriel Peltre ainsi que pour sa proposition de Post doc au sein de son équipe, notre équipe.

Je remercie également la Professeur **Francelyne Marano** pour m'avoir accepté en thèse à l'université de Paris 7 et m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Je tiens à remercier aussi les Professeurs **Denis Charpin** et **Camille Ripoll** pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse.

Egalement, un grand merci à **Gabriel Peltre** pour ses conseils et ses encouragements, et au Docteur **Michel Thibaudon** pour sa collaboration. Je les remercie tous les deux pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Je ne peux pas oublier Docteur **Jean-Pierre Sutra** que je remercie sincèrement pour sa disponibilité, son aide et ses encouragements. Je remercie aussi Madame **Françoise Rogerieux** pour m'avoir aidé et pour son humour.

Je remercie aussi le Docteur **René de Sèze** pour nos discussions, nos réunions et ses encouragements.

Je remercie également tous ceux qui m'ont aidé tout au long de ce travail : Dr. François-Xavier Desvaux, Mesdames Alice Marchand, Christelle Gamez, Emmanuelle Maillot-Maréchal de Picardie, Maryse Marlière, Sandrine Joachin et Messieurs Anthony Lecomte, Franck Robidel, Frédéric Rémy et Olivier Dupont.

Un grand merci à toutes les autres personnes avec qui j'ai partagé un moment de bonheur et de joie, un café ou un trajet, en particulier ma meilleure amie Sophie Desmots, mon meilleur collègue Dan Elgrabli et mon meilleur colocataire Mohamed Ammari.

SOMMAIRE

| | |
|---|----|
| Préambule | 10 |
| Chapitre 1 : État de l'art | 15 |
| 1.1. Les allergies respiratoires | 16 |
| 1.1.1. Définitions | 16 |
| 1.1.2. De l'allergène à l'allergie | 17 |
| 1.1.3. L'immunoglobuline E | 18 |
| 1.1.4. Les acteurs de l'allergie | 19 |
| 1.1.4.1. Les cellules effectrices de l'allergie | 19 |
| 1.1.4.2. Les médiateurs chimiques de l'allergie | 22 |
| 1.1.4.2.1. Les médiateurs préformés | 23 |
| 1.1.4.2.2. Les médiateurs néoformés | 23 |
| 1.1.4.2.3. Les cytokines | 23 |
| 1.1.4.2.4. Les chimiokines | 24 |
| 1.1.5. Les facteurs de risque | 24 |
| 1.1.5.1. Les facteurs prédisposants | 25 |
| 1.1.5.1.1. La prédisposition génétique | 25 |
| 1.1.5.1.2. Sexe et âge | 27 |
| 1.1.5.2. Les facteurs causaux : les allergènes | 27 |
| 1.1.5.2.1. Le pollen et les allergènes végétaux | 27 |
| 1.1.5.2.2. Les moisissures | 27 |
| 1.1.5.2.3. Les acariens | 28 |
| 1.1.5.2.4. Les animaux domestiques et les blattes | 28 |
| 1.1.5.2.5. Les réactions croisées | 29 |
| 1.1.5.3. Les facteurs favorisants | 30 |
| 1.1.5.3.1. Le tabagisme | 30 |
| 1.1.5.3.2. La pollution atmosphérique | 31 |
| 1.1.5.3.3. Les infections | 33 |
| 1.1.5.3.4. Le mode de vie | 34 |
| 1.1.5.4. Les facteurs déclenchants | 36 |
| 1.2. Pollen et granules | 37 |
| 1.2.1. Généralités | 37 |

| | | |
|---|---|-----|
| 1.2.2. | Les Graminées : de la plante au pollen | 40 |
| 1.2.3. | Du pollen aux granules | 47 |
| 1.3. | Modèle animal et conditions d'étude | 51 |
| 1.3.1. | Modèle animal | 51 |
| 1.3.1.1. | Cobaye | 52 |
| 1.3.1.2. | Souris | 52 |
| 1.3.1.3. | Rat | 53 |
| 1.3.2. | Conditions d'étude | 55 |
| 1.3.2.1. | Voie d'administration | 55 |
| 1.3.2.2. | Protocole expérimental | 57 |
| 1.4. | Références | 59 |
| Chapitre 2 : Partie épidémiologique | | 72 |
| 2.1. | Introduction | 73 |
| 2.2. | Article 1 : Allergies respiratoires et paramètres atmosphériques | 75 |
| 2.3. | Conclusion | 95 |
| Chapitre 3 : Partie expérimentale | | 97 |
| 3.1 | Introduction | 98 |
| 3.2 | Article 2 : Allergénicité des granules isolés | 101 |
| 3.3 | Article 3 : Réaction croisée Granules - Pollen | 121 |
| 3.4 | Article 4 : Granules lavés et granules non-lavés | 140 |
| 3.5 | Conclusion | 161 |
| Chapitre 4 : Partie analytique | | 163 |
| 4.1. | Introduction | 164 |
| 4.2. | Article 5 : Allergènes hydrosolubles et non-hydrosolubles de granules | 166 |
| 4.3. | Conclusion | 186 |
| Conclusions & Perspectives | | 188 |
| Annexes | | 192 |
| Annexe 1 : Amidon – Lugol | | 193 |
| Annexe 2 : Pollen commercialisé et pollen frais | | 195 |
| Annexe 3 : Cobaye | | 196 |

Liste des abréviations

| | |
|-----------------|---|
| Bet v | <i>Betula verrucosa</i> |
| BN | Brown Norway |
| CD | Cellules dendritiques |
| CPA | Cellules présentatrices de l'antigène |
| CTMC | Connective-type tissue mast cell |
| ECFA | Eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis |
| ECP | Eosinophil cationic protein |
| EDN | Eosinophil derived neurotoxin |
| EPO | Eosinophil peroxidase |
| ERO | espèces réactives oxygénées |
| GCP | Granule cytoplasmique de pollen |
| GM-CSF | Granulocyte macrophage colony stimulating factor |
| IFN γ | Interféron gamma |
| IgE | Immunoglobuline E |
| IgG | Immunoglobuline G |
| IL | Interleukine |
| LBA | Liquide bronchoalvéolaire |
| Lol p | <i>Lolium perenne</i> |
| LT | Leucotriènes |
| MBP | Major basic protein |
| MCP | Macrophage chemoattractant protein |
| MIP | Macrophage inflammatory protein |
| KLH | Keyhole limpet hemocyanin. |
| MMC | Mucosal mast cell |
| NADP | Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate |
| NCFA | Neutrophil chemotactic factor of anaphylaxis |
| NKT | Natural Killer |
| NO | Monoxyde d'azote |
| NO ₂ | Dioxyde d'azote |
| O ₃ | Ozone |
| OMS | Organisation mondiale de la santé |
| OR | Odds ratio |
| PAF | Plaquette activating factor |
| PG | Prostaglandines |
| Phl p | <i>Phleum pratense</i> |
| PM | Particulate matter |
| PNB | Polyncléaires basophiles |
| PNE | Polyncléaires éosinophiles |
| PNN | Polyncléaires neutrophiles |
| RAEP | Risque allergique d'exposition au pollen |
| Rantes | Regulation upon activation normal T cell expressed and secreted |
| RNSA | Réseau de surveillance aérobiologique |
| SO ₂ | Dioxyde de soufre |
| TNF | Tumor necrosis factor |
| Th | Lymphocytes T helper |
| TX | Thromboxones |
| VRS | Virus respiratoire syncytial. |

Préambule



Depuis plus de 40 ans, la fréquence des allergies respiratoires, y compris l'asthme et les rhinites allergiques, est en constante augmentation chez les sujets jeunes et les citoyens des pays développés.

La maladie allergique est consécutive à un désordre complexe du système immunitaire dont les causes apparaissent essentiellement d'ordre génétique et/ou environnemental. Ces maladies atopiques sont déclenchées par divers aéroallergènes, notamment ceux issus de pollen*. Toutefois, bien que les symptômes liés à ces affections coïncident avec la saison de pollinisation, il est maintenant bien établi qu'il n'existe pas de relation simple et directe entre ces deux phénomènes et que de nombreux autres facteurs doivent être pris en compte.

Parmi ceux-ci, les polluants atmosphériques semblent jouer un rôle important dans l'incidence des allergies et de la sensibilisation des populations. Ainsi, de nombreuses études épidémiologiques ont établi un lien direct entre le nombre de visites aux urgences pour asthme et les niveaux de certains polluants dans l'air ambiant, notamment les dérivés soufrés. D'autre part, il a été montré que certains polluants tels que le dioxyde de soufre ou les particules diesel présentaient un rôle adjuvant, conduisant à l'augmentation des niveaux en IgE. De plus, les polluants peuvent intervenir sur les manifestations atopiques par une action directe sur les aéroallergènes et notamment ceux issus des pollen.

Les pollen allergisants sont en majorité anémophiles. Les facteurs d'allergénicité sont le nombre et la taille des grains, les caractéristiques de leur surface (lisse ou collante), leur degré de flottaison dans l'air et les taux variables de protéines et donc d'allergènes. Les allergènes qui se situent à l'intérieur du cytoplasme, peuvent être retrouvés libres ou associés aux organites tels que les mitochondries ou les granules cytoplasmiques de pollen GCP.

La libération ou la diffusion des allergènes du grain de pollen est nécessaire pour qu'une réaction soit déclenchée chez les individus sensibilisés. Lorsque le grain de pollen entre en contact avec la muqueuse nasale, les allergènes hydrosolubles diffusent dans le mucus épithélial où ils deviennent disponibles pour le système immunitaire. Les allergènes peuvent également être libérés avant l'inhalation quand le pollen en suspension dans l'air est soumis aux facteurs environnementaux (intempéries, pollution atmosphérique). Il est supposé que

* Le mot **pollen**, du latin « *pollen* » : farine (fine), est employé habituellement au singulier.

suite à l'action des polluants atmosphériques, les allergènes sont libérés sous forme libre et s'agrègent ensuite aux particules présentes dans l'air. Ces allergènes, associés à des particules fines et ultrafines, pourraient rester présents dans l'atmosphère sur des périodes plus longues que les seules périodes de pollinisation et pénétrer plus profondément dans les poumons.

Il existe un deuxième mode de libération d'allergène dans l'atmosphère : la pluie. Lors d'un contact avec l'eau distillée, le grain de pollen natif expulse son cytoplasme par le pore, dans le cas des Graminées. Ce phénomène dynamique est pratiquement instantané et il en résulte en la libération dans l'atmosphère des GCP qui peuvent alors former un aérosol inhalable. Plusieurs études ont mis en évidence la présence d'allergènes associés à ces granules.

En outre, la petite taille ($< 5 \mu\text{m}$) de ces granules leur permet de pénétrer profondément dans les poumons, à l'inverse des pollens entiers (25-60 μm) qui restent bloqués dans les voies respiratoires supérieures. Si aucune étude épidémiologique, tout au moins en France, n'a encore été menée sur le rôle des GCP dans l'allergie au pollen, leur présence dans l'atmosphère a été mise en évidence, associée à la présence de grains de pollen. Après des pluies faibles, leur quantité augmente alors même que les pollen entiers ne sont plus détectables. De plus, ils ont été mis en cause dans les épisodes épidémiques d'asthme associés aux orages ou "thunderstorm asthma". De plus, notre équipe a montré que les polluants atmosphériques sont capables de casser les pollens et d'induire une libération de ces granules.

L'observation épidémiologique des GCP n'est pas encore directement disponible. Bien que de nombreux allergènes aient été caractérisés à leur surface, peu de données existent sur leur potentiel allergénique. Une étude a montré une réaction cutanée positive aux granules chez des patients asthmatiques. Dans cette même étude, l'inhalation de GCP a entraîné une bronchoconstriction chez 4 sujets victimes d'asthme associé aux orages. Enfin, Motta et al ont montré le potentiel allergénique de ces GCP dans un modèle animal. Ces résultats, associés aux travaux du groupe du Pr Schappi qui a observé que la présence de GCP dans l'atmosphère est associée à celle des pollen, suggèrent une importance potentielle, du point de vue de l'impact sur la santé des GCP dans l'allergie respiratoire induite par les pollen. Ainsi, pour une meilleure efficacité, les prévisions et comptages journaliers de pollens devraient inclure également un comptage des GCP atmosphériques.

Compte-tenu de ces différents éléments, ce projet avait pour objectifs :

- de mettre au point une méthode de quantification des GCP dans l'air et d'étudier l'impact des granules cytoplasmiques sur l'épidémie d'allergie au pollen en rapprochant des données d'admissions hospitalières et des compte-rendu de consultations allergologiques avec des mesures du nombre de granules ;
- d'évaluer les potentiels allergique et inflammatoire des granules cytoplasmiques et de les comparer à celui du pollen entier, dans un modèle animal d'allergie respiratoire ;
- de rechercher les différents allergènes hydrosolubles et non hydrosolubles des GCP et de les comparer à ceux du pollen entier.

Chapitre 1



État de l'art

1.1. Les allergies respiratoires

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) classe les maladies allergiques au quatrième rang mondial des affections et considère que ces pathologies représentent "un problème majeur de santé publique en terme de qualité de vie, de perte de jours de travail ou d'enseignement, de coût médicamenteux, voire de mortalité."

L'allergie, ou plutôt la réaction allergique de type immédiat, correspond à une réponse anormale, excessive, du système immunitaire consécutive à un contact avec une substance étrangère, en réalité inoffensive, telle que le pollen.

Les maladies allergiques sont typiquement des affections complexes et font intervenir de nombreux éléments du système immunitaire dont des médiateurs chimiques et des composantes cellulaires.

Leur origine multifactorielle reflète l'interaction de plusieurs facteurs, à la fois génétiques et environnementaux que l'on peut classer, pour ces derniers, en trois groupes: les facteurs causaux tels que les allergènes des grains de pollen, les facteurs favorisants comme, par exemple, la pollution atmosphérique et, enfin, les facteurs déclenchants (orages, hyperventilation, exposition professionnelle, notamment).

1.1.1. Définitions

Le terme allergie, des mots grec *allos* signifiant autre et *ergon* action, a été défini par Von Piquet en 1906 comme « une altération de la capacité de l'organisme à réagir à une substance étrangère ». L'allergie est une exacerbation de la réponse immunitaire vis-à-vis de substances inoffensives communes que l'on appelle alors allergènes parmi lesquelles, très largement impliquées, figurent des protéines et glycoprotéines contenues dans les grains de pollen. L'allergie peut être à médiation humorale ou cellulaire. Elle intervient chez des individus prédisposés génétiquement à produire des anticorps IgE dans des conditions d'exposition particulières. Ils sont appelés « individus atopiques ».

L'allergie au pollen, ou pollinose, est une affection liée à la présence dans l'air, au fil des saisons, d'une plus ou moins grande quantité de grains de pollen issus de plantes très diverses. Cette pathologie provoque à la fois des symptômes légers, bien qu'invalidants, comme des rhinites allergiques, mais aussi des complications bronchiques tels que l'asthme allergique. L'immense majorité des patients souffrant de pollinose sont des allergiques IgE-dépendants. Le mécanisme des allergies IgE-dépendantes sera développé dans la section 1.1.2 (de l'allergène à l'allergie).

La rhinite est définie comme une maladie inflammatoire nasale : *rhino* signifie nez et la terminaison *ite* fait simplement référence à une inflammation. La rhinite allergique est caractérisée par un prurit nasal, une rhinorrhée, des crises sternutatoires (provocatrices d'éternuements) et / ou une obstruction nasale. De plus, la rhinite allergique peut évoluer vers l'asthme allergique.

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des petites bronches qui peut s'accompagner ou non d'exacerbations prenant alors la forme de crises plus ou moins aiguës (dyspnée, toux, sifflement respiratoire). Un rapport d'expertise de l'OMS définit l'asthme ainsi : « état inflammatoire chronique des bronches dans lequel de nombreuses cellules jouent un rôle, en particulier les mastocytes, les éosinophiles et les lymphocytes T » (WHO 2002).

1.1.2. De l'allergène à l'allergie

Après une première phase - appelée sensibilisation (Figure 1a) - durant laquelle a lieu le contact initial avec un allergène, une réponse immunitaire préférentielle de type Th2 s'engage. La réponse immunitaire Th2 est caractérisée par la production de certaines cytokines qui polarisent la réponse immune ; ceci conduisant, entre autres, à la production d'immunoglobulines d'isotype IgE, spécifiques de l'allergène. Ces IgE peuvent ensuite se fixer sur les récepteurs de haute affinité (FcεRI) exprimés à la surface de différentes cellules spécialisées, notamment les basophiles et les mastocytes. Les allergènes, lors de leur réintroduction, se fixent sur les IgE spécifiques liées à leur récepteur membranaire. Une cascade de signalisation est alors mise en place; elle aboutit à la désorganisation de la membrane cellulaire et l'exocytose des granules. Celles-ci contiennent entre autres (Figure 1b) des médiateurs du système immunitaire et de l'inflammation. Outre leurs effets directs concernant la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité capillaire, ces médiateurs induisent l'infiltration des cellules inflammatoires (granulocytes éosinophiles) dans la muqueuse bronchique lesquelles favorisent les réponses allergiques (Figure 1c). Cette phase entraîne une réaction qui s'accompagne de manifestations cliniques telles que la rhinite allergique et l'asthme.

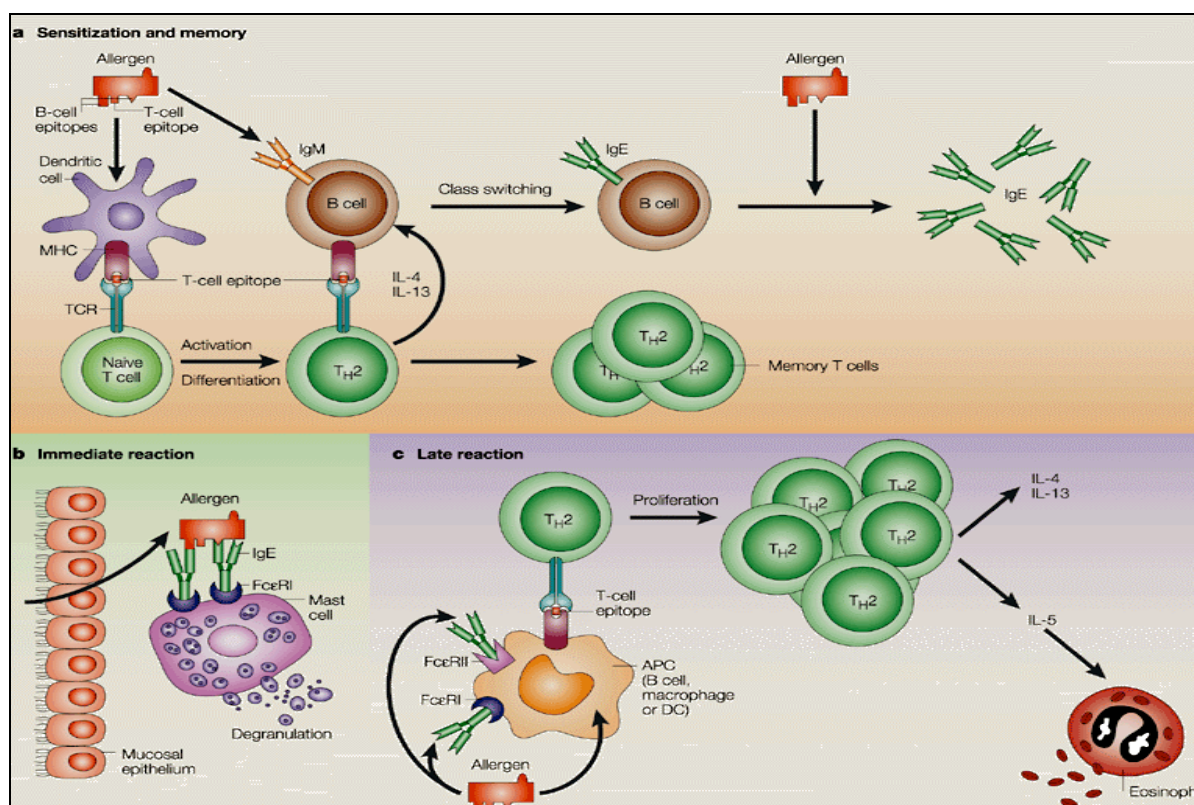


Figure 1 : Représentation schématique du mécanisme de l'allergie. Le premier contact avec l'allergène s'appelle la sensibilisation (a). Le second contact avec l'allergène, ou un autre allergène ayant une structure moléculaire proche de celui qui est responsable de la sensibilisation, entraîne une réaction qui s'accompagne de manifestations cliniques. La réaction allergique est composée de deux phases. Une phase précoce (b), médiée par les IgE, débute 10 minutes après le contact entre l'organisme et l'allergène. Elle atteint son pic en 30 minutes et se résorbe en 1 à 3 heures. La phase tardive (c) est une réaction à médiation cellulaire, Elle atteint son maximum en 6 à 12 heures et s'estompe généralement après 24 heures. (Valenta 2002)

1.1.3. L'immunoglobuline E (IgE)

Découvertes à la fin des années soixante (Bennich 1968), les IgE sont des glycoprotéines de 190 kDa de masse moléculaire, composées de 2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères. La structure des IgE est comparable à celle des autres isotypes d'immunoglobuline. Elles constituent le support immunologique de la réaction allergénique du type immédiat. Les IgE se fixent sur des récepteurs spécifiques, présents à la surface de cellules impliquées dans les phénomènes allergiques. Les IgE sont synthétisées et excrétées par les lymphocytes B et les plasmocytes à IgE. Les IgE sont normalement produites au niveau des principaux sites d'infection parasitaire ; la peau, les poumons et l'intestin. Les réactions induites par les IgE rencontrées lors des réactions allergiques représentent en fait les changements anatomiques et physiologiques mis en œuvre pour lutter contre les parasites, rôle normal des IgE. Les IgE se

retrouvent dans le sérum mais aussi dans des sécrétions telles que la salive, les sécrétions nasales, les larmes, l'urine et les selles. Les concentrations sériques sont quasiment nulles à la naissance et augmentent progressivement jusqu'à atteindre 50 à 100 UI/ml chez l'adulte (Revillard 1994). Du fait de leur niveau de synthèse faible et de leur catabolisme important (la demi-vie dans la circulation est 2,5 jours), les IgE sériques circulantes représentent, chez les individus non allergiques, une infime proportion des anticorps circulants. Les IgE se fixent par leurs fragments Fc sur la membrane des basophiles et des mastocytes, ce qui permet une prolongation de leur demi-vie qui peut alors dépasser 3 à 4 semaines et aller jusqu'à 12 semaines. Les récepteurs des IgE sont de 2 types : un récepteur de forte affinité FcεRI et un récepteur de faible affinité FcεRII (Novak 2001). Outre leur rôle dans les allergies, ces immunoglobulines jouent un rôle dans l'hyperactivité bronchique, indépendamment de la sensibilisation aux pneumallergènes (Burrows 1989).

1.1.4. Les acteurs de l'allergie

1.1.4.1. Les cellules effectrices de l'allergie

L'activation par un allergène des mastocytes et des basophiles, dépendante des IgE fixées sur les récepteurs, provoque la libération brutale de médiateurs vaso-actifs et constricteurs des fibres musculaires lisses, à l'origine des symptômes aigus. Ces cellules - mastocytes et polynucléaires basophiles - sont les cellules responsables de la réaction immédiate (ou précoce). D'autres cellules (polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, monocytes et macrophages, plaquettes, cellules endothéliales, cellules épithéliales et lymphocytes T) jouent également un rôle important dans la pathogénie de ces réactions.

Les mastocytes et les polynucléaires basophiles sont les principales cellules qui produisent les médiateurs de l'allergie immédiate. Elles contiennent des granulations métachromatiques qui sont la source principale des médiateurs chimiques de l'hypersensibilité immédiate. Elles constituent aussi la source majeure des cytokines régulant les fonctions des éosinophiles, cellules clés de l'inflammation allergique et de sa persistance dans les tissus. (Guilpain 2006, Kung 1995, Warner 1994).

Les **mastocytes**, chez les rongeurs comme chez l'homme, sont de deux types. Pour le rongeur, il s'agit des mastocytes muqueux (MMC : mucosal mast cells) et des mastocytes du tissu conjonctif (CTMC : connective-type tissue mast cells) (Enerback 1997). Chez l'homme, les mastocytes peuvent être classés selon leur contenu en protéase. Les mastocytes T, qui se rapprochent des MMC murins, ne contiennent que de la tryptase et sont prédominants au

niveau de la muqueuse intestinale, gastrique et nasale. Ils représentent environ un tiers des mastocytes pulmonaires. Les mastocytes TC, dont les granulations contiennent à la fois de la tryptase et de la chymase, sont prédominants dans la peau et la sous-muqueuse intestinale. Dans la muqueuse nasale de patients allergiques au pollen, on observe une augmentation saisonnière du nombre de mastocytes T. De même, ces mastocytes, qui constituent environ 1 % des cellules recueillies lors d'un liquide bronchoalvéolaire (LBA) chez l'individu sain, passent à 5 % chez le patient atopique (Molina 1997). Par contre, le nombre de mastocytes TC reste, chez ces patients, identique à celui retrouvé chez les sujets non atopiques. (Tunon-De-Lara 2003).

Les **polynucléaires basophiles (PNB)** sont des cellules caractérisées par l'absence de tryptase dans leurs granulations (Enerback 1997). Essentiellement circulantes, elles représentent environ 0,5 % des leucocytes chez un sujet sain. Une augmentation significative de ces cellules est observée chez les individus allergiques, notamment pendant les phases d'exposition à l'allergène. (Prussin 2006).

Les **polynucléaires éosinophiles (PNE)** sont probablement les principales cellules effectrices secondaires de la réaction allergique tardive. Leur différenciation à partir des précurseurs de la lignée myéloïde est activée par des cytokines. Ils sont recrutés sur le site de l'inflammation grâce aux chimiokines et aux molécules d'adhésion (Holgate 2001, Prussin 2006, Teixeira 1995). Leur cytoplasme renferme des granules contenant de nombreux médiateurs préformés et peuvent synthétiser des médiateurs néoformés, ainsi que des cytokines (Broide 2001). Une hyper-éosinophilie est retrouvée dans l'atopie, les rhinites allergiques et l'asthme (Broide 2001, Wardlaw 1994, Wright 2000). De même, le nombre d'éosinophiles dans les liquides bronchoalvéolaire et d'expectoration augmente avec la sévérité de l'asthme allergique (Louis 2000, Walker 1991).

Les **polynucléaires neutrophiles (PNN)** sont des cellules produisant de nombreux médiateurs pro-inflammatoires, histaminolibérateurs et vaso-actifs ainsi que des protéases, qui sont susceptibles de participer à la réaction allergique. Ils sont le premier type cellulaire à pénétrer dans les poumons à la suite d'une provocation allergénique (Smith 1992, Teran 1995). Une neutrophilie a été observée chez les patients souffrant d'asthme nocturne, avec une intensité correspondant au degré de sévérité des symptômes (Martin 1991).

Les **lymphocytes T** jouent probablement un rôle cellulaire non négligeable dans la pathogénie des réactions allergiques de la phase tardive. En effet, on observe couramment un infiltrat riche en lymphocytes T durant cette phase - de type inflammatoire - des réactions allergiques.

Il existe également une augmentation significative de la proportion des lymphocytes T activés dans le sang et la muqueuse bronchique des sujets atteints d'asthme sévère (Jeffery 1989). Il existe des **lymphocytes T auxiliaires** (ou helper : Th) qui peuvent être divisés en 2 sous-classes : les **Th1** et les **Th2**. Ces 2 types de lymphocytes se régulent entre eux et ils contrôlent l'orientation de la réponse immunitaire (Mosmann 1989). Les Th2 favorisent la réaction allergique en produisant des cytokines qui agissent sur la croissance et la différenciation des éosinophiles et des mastocytes, sur la production de mucus et l'hyperréactivité bronchique (Mosmann 1989, Umetsu 2003, Umetsu 1988, Wills-Karp 1999). A l'inverse, les Th1 produisent des cytokines minimisant la réaction allergique. L'augmentation constante de la prévalence des maladies allergiques au cours des 30 dernières années fut attribuée à une baisse de la réponse Th1. Cependant, il est apparu que les Th1 avaient également un effet pro-inflammatoire et n'étaient pas capables de réguler négativement les Th2 (Hansen 1999, Randolph 1999). De plus, les maladies auto-immunes où la voie Th1 est impliquée, connaissent également une augmentation depuis les 3 dernières décennies. Ces découvertes suggèrent qu'il existe un autre système régulant la réponse immunitaire, les **lymphocytes T régulateurs** (Figure 2). Ces derniers ont été étudiés tout d'abord pour leur rôle suppresseur de l'auto-immunité. Mais ils interviennent aussi dans l'acquisition de la tolérance à un antigène. Parmi les lymphocytes T régulateurs, on peut citer, les cellules Th3 (Hansen 2000, Oh 2002), les cellules TR1 (Groux 1997), les cellules CD4+CD25+ (Sakaguchi 1995) et les cellules « natural killer » ou NKT (Miyamoto 2001, Terabe 2000, Wilson 1998).

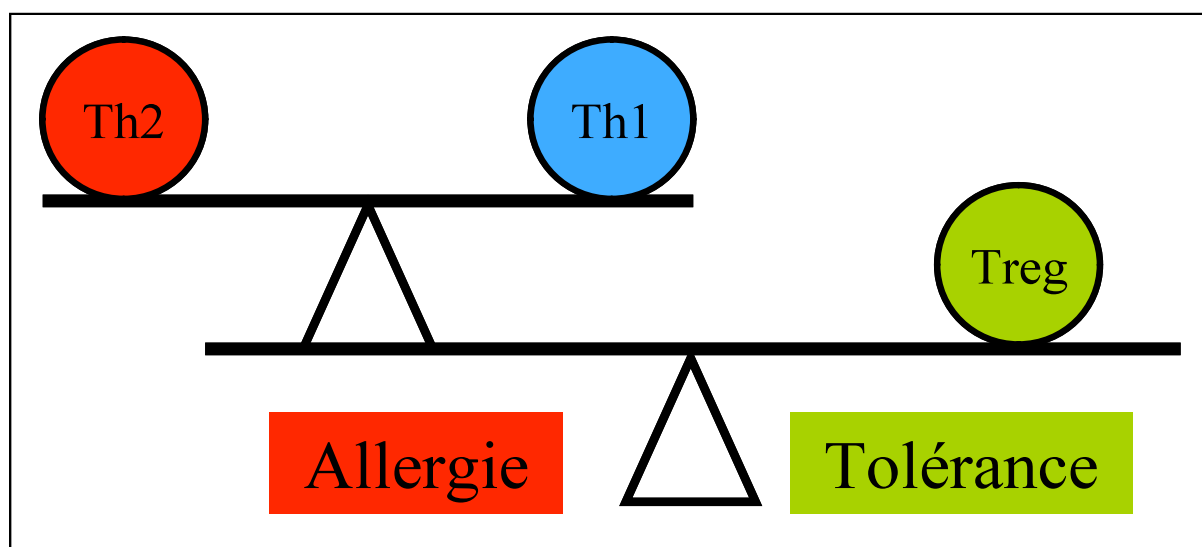


Figure 2 : Influence des différentes classes de lymphocytes T dans la régulation de la réponse allergique. La dichotomie Th1/Th2 est balancée par les lymphocytes T régulateurs, qui jouent un rôle dans l'acquisition de la tolérance aux allergènes.

Les lymphocytes T cytotoxiques ou CD8+, impliqués généralement dans la réponse aux infections, jouent aussi un rôle dans la réponse allergique. Leur action semble principalement dirigée vers la régulation de la production d'IgE. Plusieurs études dans les modèles murins ont montré qu'une déplétion des cellules T CD8+ entraîne une augmentation des taux sériques d'IgE spécifiques (Holmes 1997).

Les **cellules présentatrices de l'antigène (CPA)** : ce sont des cellules qui jouent un rôle important dans la physiopathologie de la réaction allergique et notamment de l'asthme. Plusieurs types cellulaires sont impliqués : les macrophages alvéolaires, les cellules dendritiques (CD) et les lymphocytes B. Il semble que les macrophages pulmonaires aient un effet inhibiteur sur le développement de la réaction allergique respiratoire (Tang 2001). Ces cellules favorisent la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes Th1 et inhibent les lymphocytes Th2 (Desmedt 1998, Tang 2001). Les **cellules dendritiques** sont dédiées à la présentation de l'antigène. Leur rôle dans l'établissement de l'inflammation et dans l'allergie semble être plus important que tout autre CPA. Les CD ont de longues prolongations cytoplasmiques et sont localisées juste au dessous de la membrane basale de l'épithélium respiratoire. Dans les modèles murins, la réaction inflammatoire allergique dans les voies respiratoires est accompagnée d'une augmentation des CD dans la muqueuse pulmonaire et d'une augmentation de la production de leurs précurseurs dans la moelle osseuse (Desmedt 1998, Lambrecht 1999, Tang 2001, Vermaelen 2003). Ces cellules ont également un rôle régulateur de la réponse immunitaire en induisant une réponse Th2 en réponse à l'inhalation d'un allergène (Dodge 2003). Les **lymphocytes B** sont également un élément central de la réponse allergique car ce sont eux qui produisent les IgE spécifiques. Ces cellules se développent dans la moelle osseuse à partir des souches hématopoïétiques. Elles peuvent internaliser l'antigène et le présenter aux lymphocytes T.

Les **plaquettes sanguines** interviennent également dans le processus inflammatoire allergique. Sur leur surface, on peut trouver le récepteur de haute affinité pour les IgE, le FcεRI. La stimulation des plaquettes via ce récepteur, induit le relargage de sérotonine et de Rantes. Les plaquettes joueraient donc un rôle dans le maintien de l'inflammation allergique. (Yssel 1998).

1.1.4.2. Les médiateurs chimiques de l'allergie

Plusieurs cellules, entre autres les mastocytes, les basophiles et les éosinophiles libèrent des molécules médiatrices de la réaction allergique.

1.1.4.2.1. Les médiateurs préformés

L'**histamine** qui est synthétisée par les basophiles peut se définir comme l'un des principales molécules médiatrices impliquées dans la physiopathologie de l'allergie. Chimiquement, cette molécule est formée par la décarboxylation de l'histidine, acide aminé naturel constituant des chaînes protéiques. Cette réaction se fait sous l'action d'une enzyme spécifique, l'histidine décarboxylase. L'histamine est alors stockée, dans sa quasi-totalité, dans les mastocytes et les leucocytes. L'histamine est un puissant vasodilatateur, qui, en outre, augmente la perméabilité capillaire ; elle provoque une bronchoconstriction et active les cellules inflammatoires. (Jamet 2006).

Les **enzymes protéolytiques** telles que la tryptase, la cathepsine G et la superoxyde-dismutase sont libérées par les mastocytes et les basophiles et ont un rôle dans la réponse inflammatoire.

D'autres médiateurs sont présents dans les granules des basophiles, tels que l'ECFA (eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis) et le NCFA (neutrophil chemotactic factor of anaphylaxis), et dans les granules des éosinophiles comme le MBP (major basic protein), l'ECP (eosinophil cationic protein), l'EPO (eosinophil peroxidase) et l'EDN (eosinophil derived neurotoxin) (Prin 1996).

1.1.4.2.2. Les médiateurs néoformés

Les plus importants sont les médiateurs lipidiques : les leucotriènes (LT), les thromboxanes (TX) et les prostaglandines (PG). Ils sont issus du métabolisme de l'acide arachidonique. Le PAF (plaquette activating factor), provenant du métabolisme des lysophospholipides, est produit par un grand nombre de cellules (macrophages, neutrophiles, éosinophiles et plaquettes) (Molina 1997). Ces médiateurs jouent un rôle dans la bronchoconstriction, la vasoconstriction, le recrutement des plaquettes et l'agrégation plaquettaire.

1.1.4.2.3. Les cytokines

La communication entre les différents types cellulaires est assurée par des facteurs solubles : les cytokines qui sont des polypeptides et des glycoprotéines de masse moléculaire inférieure à 50 kDa. Toute cellule possédant à sa surface un récepteur spécifique à une cytokine peut voir son activité modifiée par l'interaction de ce récepteur spécifique avec la cytokine. Le monde des cytokines est donc constitué, tant par des facteurs solubles que par des constituants membranaires que sont les récepteurs. Ce qui distingue les cytokines des hormones, ce sont les nombreuses sources potentielles ainsi que le grand nombre de cellules cibles différentes,

impliquant un large spectre d'action et des activités qui peuvent être aussi bien autocrines que paracrines, voire ne pas nécessiter de sécrétion et agir lors d'un simple contact membranaire. Certaines cytokines peuvent également agir de façon endocrine (ex. IL-1, IL-6 TNF...). Enfin, il existe une forte redondance des activités, puisqu'un même effet peut être obtenu avec des cytokines différentes. Les productions spontanées de cytokines sont extrêmement faibles et ces médiateurs sont essentiellement produits lors d'une activation cellulaire. Parmi les cytokines qui activent le système immunitaire, on trouve : les interleukines (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13...), les lymphotoxines (TNF α), les Colony Stimulating Factor en particulier le GM-CSF, les interférons comme IFN γ (Berger 1996, Goetzl 2008, Guenounou 2000, Ponvert 1997). Les cytokines sont souvent classées en 2 groupes, les cytokines Th1 et Th2. Les premières sont produites en majeure partie par les lymphocytes Th1, elles induisent une inhibition de la réponse allergique, alors que les cytokines Th2 sont produites par les lymphocytes Th2 et favorisent la réaction allergique.

1.1.4.2.4. Les chimiokines

Ce sont des cytokines chimiotactiques qui sont, elles aussi, de faible masse moléculaire (6 - 15 kDa) et dont la classification est basée sur une homologie de séquence concernant des résidus cystéines. On distingue la sous-famille CXC (chimiokines a, telle l'IL-8) et la sous-famille CC (chimiokines b, telles le Rantes, les MCP-1-5 et l'éotaxine).

Les chimiokines sont impliquées dans les réactions allergiques et inflammatoires, en particulier dans le recrutement leucocytaire, notamment des basophiles, éosinophiles, monocytes, au niveau du site inflammatoire. Elles sont produites par de nombreux types cellulaires dont les cellules mononuclées, neutrophiles, éosinophiles, plaquettes, cellules endothéliales, mastocytes et cellules épithéliales. La présence de Rantes et de MCP-3 a été retrouvée au niveau des biopsies cutanées et bronchiques de sujets atopiques après provocation allergénique. De même, l'éotaxine a été identifiée comme un marqueur de différenciation des cellules Th2. (Humbert 2004, Tsicopoulos 1997).

1.1.5. Facteurs de risque

Les allergies respiratoires sont typiquement des manifestations multifactorielles qui résultent à la fois de facteurs génétiques prédisposants et de facteurs environnementaux. La prédisposition génétique est associée à la fois au phénotype atopique (tendance héréditaire à avoir des réactions allergiques) et à l'hyperréactivité bronchique. Il est possible que des

facteurs liés à la mère et s'exprimant pendant la grossesse puissent déterminer la survenue de l'atopie.

Mais les facteurs prédisposants ne peuvent pas expliquer - à eux seuls - l'augmentation de l'incidence et de la prévalence des allergies respiratoires. De nombreux facteurs environnementaux sont en cause. Les facteurs causaux, tels que les allergènes de l'environnement extérieur (issus de pollen et de moisissures) et ceux liés à l'environnement domestique (issus d'acariens, d'animaux domestiques et de blattes), seraient à la base des phénomènes de sensibilisation chez les individus prédisposés. Les facteurs favorisants, tels que la pollution atmosphérique (polluants gazeux et particulaires) et le style de vie (taille de la famille, médicaments, obésité, tabagisme....) entreraient aussi en jeu dans le développement des manifestations allergiques. Enfin, les facteurs déclenchants (effort physique, climat, stress, irritants....) seraient directement impliqués dans les phases initiales des allergies, en particulier les crises d'asthme.

1.1.5.1. Les facteurs prédisposants

Ces facteurs peuvent soit prédisposer soit protéger les individus par rapport au développement de la maladie. Cette catégorie de facteurs comprend les facteurs génétiques, l'atopie, l'hyperactivité bronchique, le sexe, l'âge et l'appartenance ethnique.

1.1.5.1.1. La prédisposition génétique

Le facteur de risque le plus important prédisposant au développement des allergies respiratoires, y compris l'asthme, est de loin l'existence d'autres cas familiaux. Avoir au moins un parent asthmatique multiplie par deux le risque d'être soi même asthmatique. Ainsi il existerait « un ou plus vraisemblablement des gènes de l'allergie et de l'atopie ». L'incidence familiale oscille entre 40 et 65 % dans les familles d'allergiques alors que les pourcentages obtenus dans les groupes témoins non allergiques varient de 7 à 27 % (Demoly 1996).

Des études portant sur des jumeaux ont démontré que les taux de concordance de l'asthme et la rhinite sont substantiellement plus élevés chez les vrais jumeaux que chez les faux jumeaux, suggérant ainsi une forte contribution génétique (Holloway 1999, Wiesch 1999).

Dans l'héritabilité de l'asthme et des manifestations associées, de multiples gènes de susceptibilité seraient impliqués (Los 2001) (Figure 2).

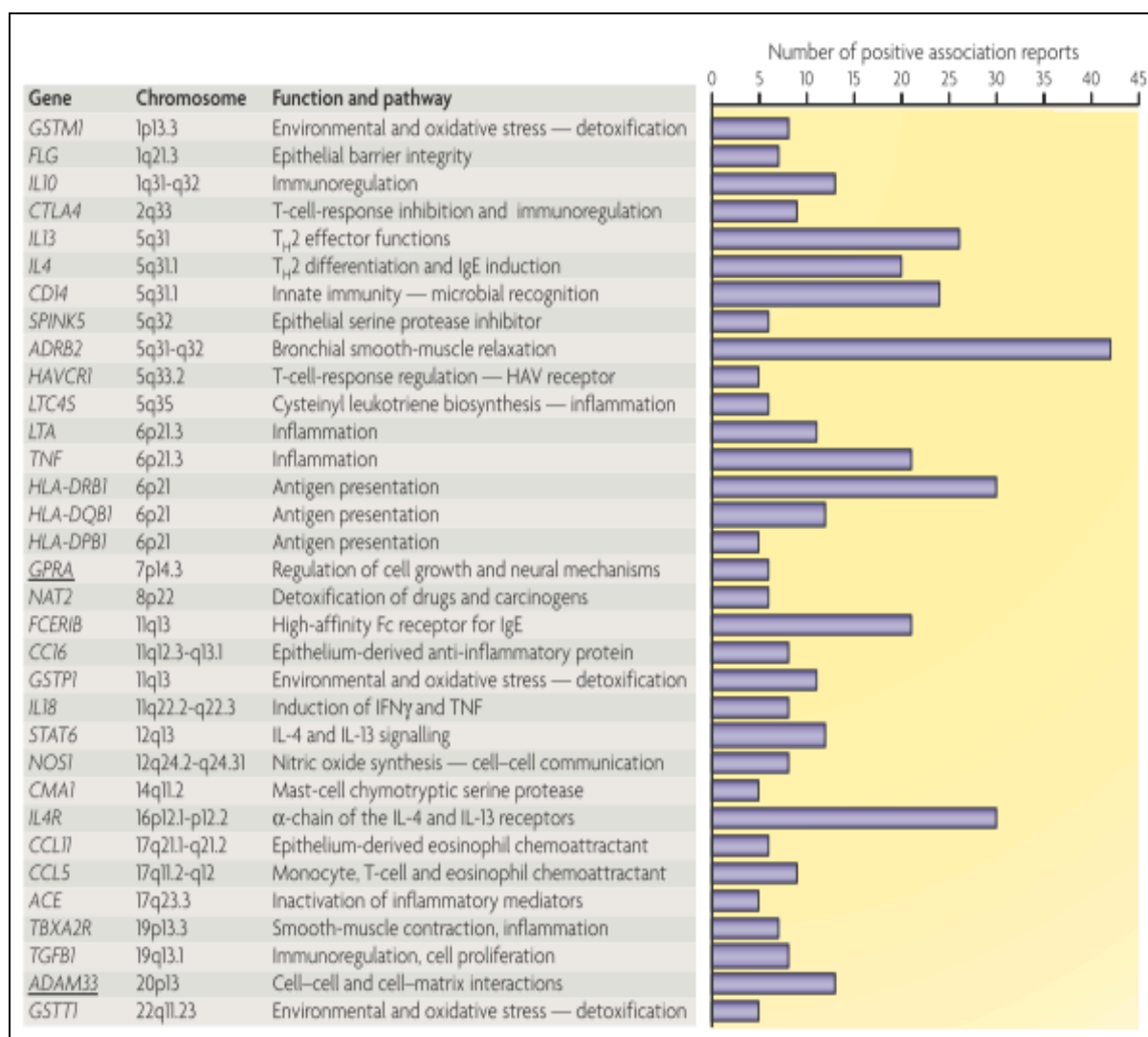


Figure 3 : Les gènes de susceptibilité de l'asthme et d'autres manifestations associées. Ils regroupent les gènes identifiés par clonage positionnel après repérage d'un lien avec l'asthme ou l'atopie ainsi que les gènes candidats dont l'association à l'asthme et l'atopie est très vraisemblable. (Vercelli 2008)

Les preuves fournies par quelques études semblent indiquer que 50 % des cas d'asthme dans la population générale sont attribuables à l'atopie (Pearce 1999). Chez les enfants, par contre, cette proportion est beaucoup plus importante : 90 à 95 % des cas d'asthme chez l'enfant sont liés à l'atopie, mais seulement 25 à 30 % des enfants atopiques sont asthmatiques (2001).

Quelques études ont montré que l'établissement d'un désordre allergique chez les individus est déterminé au cours de la prime enfance, voire pendant la vie fœtale (Piccini 1993, Stazi 2002).

L'hyperréactivité bronchique a une composante héréditaire et est étroitement liée aux niveaux d'IgE sériques et à l'inflammation des voies aériennes. (Jansen 1999, Laprise 1997, Postma 1995).

1.1.5.1.2. Sexe, âge

Plusieurs études ont mis en évidence des facteurs tels que l'âge et le sexe, comme facteurs de risque dans les allergies. En effet, la fréquence de l'asthme est au moins 2 fois plus élevée chez les garçons que chez les filles. Par contre, il n'existerait pas de différence entre les 2 sexes pour les rhumes des foins ou rhinite (Sears 1993).

Chez un individu, au cours de l'histoire naturelle de l'allergie, la rhino-conjonctivite pollinique précède le plus souvent les autres manifestations allergiques, en particulier l'asthme. Les symptômes du rhume des foins s'atténuent avec l'âge et disparaissent le plus souvent après le vieillissement du système immunitaire. (Rancé 2007).

1.1.5.2. Les facteurs causaux : les allergènes

Les allergènes sont des composants naturels de l'environnement. L'identification des sources d'allergènes responsables de la symptomatologie est un préalable indispensable pour initier des conseils et des traitements spécifiques. Les allergènes, qui sont pour la plupart des protéines, sont des antigènes qui réagissent avec des IgE spécifiques. Parmi de très nombreux allergènes, ceux les plus fréquemment impliqués dans la rhinite et l'asthme (pneumallergènes) sont issus de : pollen, moisissures, acariens et animaux domestiques. Dans le cas des pollinoses, différentes parties des grains de pollen contiennent de nombreux allergènes responsables des manifestations allergiques.

1.1.5.2.1. Pollen et allergènes végétaux

Les grains de pollen contiennent les principaux allergènes de l'environnement extérieur. Les pollen sont souvent classés, dans le domaine de l'allergologie, en pollen d'arbres et d'herbacées (les Graminées étant incluses dans ce deuxième groupe). L'étude plus spécifique du pollen fera l'objet de la section 1.2 « Pollen et granules ».

Bien qu'un grand nombre d'allergènes végétaux correspondent à des allergènes de pollen, il existe aussi des allergènes végétaux non polliniques pouvant entraîner rhinite et asthme. Feuilles, graines et fleurs semblent disposer d'un potentiel allergénique (Bessot 2003, Leduc 2008).

1.1.5.2.2. Les moisissures

Les moisissures - champignons microscopiques - sont des organismes ubiquitaires dont beaucoup sont utilisés comme agent de dégradation des produits alimentaires ou industriels. Les pneumallergènes issus de ces champignons sont présents dans les environnements

extérieurs et intérieurs. Certains auteurs considèrent que la saison des moisissures atmosphériques comprise entre juin et octobre, constitue une prolongation de la saison pollinique (Larsen 1981). Les moisissures les plus connues font partie des genres *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* et *Penicillium*. La petite taille de leurs spores (3 à 10 µm) favorise leur pénétration dans les voies respiratoires. Elles provoquent des allergies saisonnières mais également perannuelles de type de rhinite, conjonctivite, asthme. Elles peuvent aussi être associées à une fréquence plus élevée d'infections respiratoires et à une altération de la fonction pulmonaire (Brunekreef 1989). La fréquence de sensibilisations cutanées, vis-à-vis de *Cladosporium*, chez les enfants de moins de quatre ans, atteint 42 % puis décroît avec l'âge (de Blay 2000).

1.1.5.2.3. Les acariens

Les allergènes intérieurs les plus importants sont ceux provenant des acariens (de quelques dizaines de micromètres à 3 cm) qui font partie des arachnides. Ils se comptent par millions dans nos literies et nos moquettes où ils se nourrissent des débris de peau et de poils. 65 à 90 % des asthmes de l'enfant et de l'adulte jeune sont associés à une sensibilisation aux acariens et à leurs fèces. Il en existe plus de 50000 espèces répertoriées, mais ceux responsables des allergies regroupent les acariens pyroglyphides (essentiellement les espèces *Dermatophagoïdes pteronyssinus*, *Dermatophagoïdes farinae*, *Dermatophagoïdes microceras* et *Euroglyphus maynei*) et les acariens de stockage, source occasionnelle d'allergène de la poussière de la maison (*Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescencia* et *Glyciphagus domesticus*) (de Blay 2000).

1.1.5.2.4. Les animaux domestiques et les blattes

Les animaux domestiques à poils et à plumes émettent des allergènes dans les sécrétions comme la salive, les excréments (principalement l'urine) et les desquamations. Ces allergènes peuvent être retenus sur les moquettes et les meubles capitonnés. Ils peuvent persister longtemps, même après éviction des animaux.

Dans les pays occidentaux, les allergènes associés au chat sont ceux le plus fréquemment responsables de sensibilisation après ceux des acariens ; l'exposition aux chats est fréquente et les sensibilisations peuvent atteindre 25 % d'une population générale (de Blay 2000).

L'exposition au chien va de 31 à 50 % en Europe ; la prévalence de la sensibilisation varie de 3 à 14 % dans une population non sélectionnée et jusqu'à 40 % chez les enfants asthmatiques

(de Blay 2000). L'exposition au lapin, en tant qu'animal de compagnie, peut induire un asthme et/ou une rhinite allergique. (Choi 2007).

De plus, d'autres rongeurs dans l'habitat domestique, comme les rats et les souris, constituent aussi une source d'allergènes. Des quantités importantes d'allergènes de rongeurs ont été mises en évidence dans les litières de ces animaux, mais également dans les poussières du sol. Rats et souris sont bien connus comme agents responsables d'allergies respiratoires professionnelles chez les employés d'animalerie ou les chercheurs, la prévalence des sensibilisations variant de 14 à 15 % dans ces populations (Bessot 2008).

De même, les blattes sont des sources d'allergènes fréquentes dans de nombreux pays. Ceci est plus particulièrement vrai dans les régions chaudes d'Amérique du Nord et d'Asie, mais elles constituent une cause relativement rare d'allergie en Europe (Moscato 1991). En France, la fréquence de sensibilisation à ces insectes, parmi les patients consultant en allergologie, varie de 9,8 % à Strasbourg à 22 % à Paris (Bidat 1993, de Blay 1997).

1.1.5.2.5. Les réactions croisées

Des sources allergéniques, ayant une origine taxonomique proche de celle qui est l'origine d'une sensibilisation, peuvent déclencher des manifestations allergiques. C'est le cas des allergies qui proviennent d'allergènes présents dans une même famille botanique, tels que les Graminées. Une personne allergique au pollen de fléole peut développer une allergie au pollen de dactyle, par exemple.

Des associations plus surprenantes d'allergies respiratoires, en particulier de pollinose, avec des allergies alimentaires ont été observées depuis maintenant plusieurs décennies. Certains patients allergiques aux acariens peuvent ainsi développer des allergies aux escargots et aux fruits de mer tels que les homards et les crevettes. Les allergies aux phanères des chats ou aux plumes d'oiseau peuvent être associées à une allergie alimentaire due à la consommation de viande de porc ou d'œufs, respectivement. Les allergies polliniques sont généralement associées aux allergies alimentaires causées par des légumes et des fruits le plus souvent crus (tableau 1).

Tableau 1 : Les réactions croisées les plus fréquentes, entre pollen et aliments (ALK-ABELLO 2008a).

| | |
|-----------------------------|--|
| POLLEN DE BOULEAU | Abricot, amande, avocat, banane, betterave, brugnon (nectarine), carotte, céleri, cerise, châtaigne, concombre, épinard, figue, kiwi, melon, noisette, noix, papaye, pêche, pomme, raisin, sarrasin |
| POLLEN D'ARMOISE | Aneth, carotte, cumin, céleri, coriandre, fenouil, persil |
| POLLEN D'AMBROISIE | Banane, melon, pastèque |
| POLLENS DE GRAMINÉES | Arachide, farine de blé, melon, orange, petit-pois, pomme de terre, poivron, tomate |

1.1.5.3. Les facteurs favorisants

Depuis plusieurs années, l'augmentation des allergies respiratoires et de la mortalité qui lui est liée, est supérieure aux prévisions les plus pessimistes. L'essentiel des hypothèses repose sur l'intervention de facteurs aggravants, dits cofacteurs, liés à l'environnement et au mode de vie, tels que le tabagisme, la pollution atmosphérique, les changements des habitudes alimentaires et l'urbanisation croissante.

1.1.5.3.1. Le tabagisme

La fumée de tabac, source omniprésente d'irritants à l'intérieur des bâtiments jusqu'à il y a peu encore, produit un mélange gazeux de vapeurs et de particules. Le tabagisme, surtout passif, est fortement suspecté d'entraîner une élévation des IgE et également des affections allergiques et de l'asthme, surtout chez les enfants.

Plusieurs études mettent clairement en évidence le rôle de la fumée de tabac dans l'augmentation du risque de développement des maladies des voies respiratoires inférieures *in utero* (Gilliland 2000, Li 2000), dans la prime enfance (Nafstad 1997) et jusqu'à l'adolescence (Ferrence 2000). Ainsi, chez n'importe quel enfant, il favorise les infections des voies aériennes supérieures et inférieures, modifie la croissance et l'évolution naturelle de la fonction respiratoire, facilite l'apparition et l'aggravation d'un asthme, induit ou exacerbe une

hyperréactivité bronchique. Chez l'enfant atopique, le tabagisme passif potentialise la symptomatologie de l'allergie respiratoire (Dubus 1999).

De même, le tabagisme actif pourrait contribuer à la sévérité de l'asthme, sans toutefois être la cause de son développement (Siroux 2000).

1.1.5.3.2. La pollution atmosphérique

Les polluants gazeux et particulaires sont considérés comme facteurs aggravants de la réaction allergique. Dans les pays occidentaux, la pollution atmosphérique est liée, d'une part, à des composés gazeux comme l'ozone (O₃), les oxydes d'azote (NO, NO₂), les hydrocarbures ainsi que le dioxyde de soufre (SO₂) et, d'autre part, à des polluants particulaires tels que les PM₁₀, PM_{2,5} et les particules diesel. Ces polluants agissent, soit d'une manière directe, en fragilisant l'appareil respiratoire, soit sur les aéroallergènes tels que ceux contenus dans les grains de pollen, en modifiant leur allergénicité ou, encore, en jouant sur la structure même du pollen.

De nombreuses études réalisées *in vitro* ou *in vivo* ont évalué les effets inflammatoires de l'**ozone** sur les voies aériennes. L'exposition à des concentrations d'ozone inférieures à 0,5 ppm, en l'absence d'exercice physique, n'entraîne pas d'effet sur la fonction respiratoire. En revanche, l'exposition à l'ozone lors d'un exercice musculaire diminue les performances ventilatoires (diminution de la capacité vitale forcée et du volume expiré maximal par seconde) et augmente la résistance des voies aériennes et la dyspnée (Castillejos 1995, McConnell 2002). Un des effets les plus importants de l'ozone chez les sujets asthmatiques est probablement l'aggravation de l'inflammation chronique des voies aériennes (Vagaggini 2002). De nombreuses études suggèrent que les effets de l'ozone sur l'obstruction bronchique sont beaucoup plus marqués chez les patients asthmatiques que chez les sujets sains. L'exposition à l'ozone augmente la réponse immédiate et retardée à l'allergène chez les sujets asthmatiques (Ball 1996, Vagaggini 1999). L'ozone induit une augmentation de la production intracellulaire de dérivés oxygénés et de la perméabilité des cellules épithéliales, qui pourraient favoriser la pénétration des allergènes inhalés dans la muqueuse respiratoire et la production de cytokines proinflammatoires (Li 2006).

Le **dioxyde de soufre** induit une bronchoconstriction rapide chez les sujets sains et allergiques. Des auteurs ont observés une association entre un polymorphisme d'un promoteur du gène du TNF α et la susceptibilité de sujets asthmatiques au dioxyde de soufre inhalé, avec une baisse supérieure à 12 % du volume expiré maximal par seconde (Winterton 2001).

L'exposition au **dioxyde d'azote** est associée à une augmentation de la prévalence de l'asthme et de la rhinite allergique (de Marco 2002). Chez la souris, l'exposition au dioxyde d'azote augmente la réponse inflammatoire de type allergique et l'hyperréactivité bronchique (Poynter 2006). L'exposition au dioxyde d'azote pourrait favoriser la sensibilisation aux allergènes inhalés. Une exposition à 0,4 ppm de dioxyde d'azote pendant 4 heures augmenterait la réponse immédiate et retardée à l'allergène chez des sujets asthmatiques (D'Amato 2005).

Parmi les **polluants particulaires**, les particules de **diesel** ont été les plus étudiées (Tableau 2). L'exposition répétée à des petites doses de particules diesel dans un modèle animal (souris BALB/c allergiques à l'ovalbumine) augmente la réponse au test de provocation bronchique allergénique. Cette augmentation de l'hyperactivité bronchique est due à la production excessive de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines (Matsumoto 2006). D'autres études ont montré que les particules diesel entraînent la libération d'IL-4 et d'histamine par les basophiles mis en culture, provenant d'individus sensibilisés aux pneumallergènes. Cette libération intervient au bout de 2 heures et se prolonge pendant 20 heures. Elle est aussi importante avec les basophiles des individus sensibilisés qu'avec ceux des témoins. Dans le même sens, plusieurs études ont montré que ces particules, chez des sujets sensibilisés aux acariens ou à l'hémocyanine, augmentaient la production nasale d'IL-4. Elles augmentent aussi la sensibilisation allergique et la production *de novo* d'IgE. (Devouassoux 2002, Diaz-Sanchez 1999, Diaz-Sanchez 2000, Riedl 2005).

Pour les PM₁₀, dans le cas d'une concentration de 10 µg/m³ de ces particules, une augmentation des crises d'asthme a pu être mesurée (+ 3 %) (Dockery 1994). De la même façon, une association peut être faite, concernant les PM₁₀, avec l'utilisation d'un broncho-dilatateur (+ 2,9 %), des visites aux urgences (+ 3,4 %) et des cas d'hospitalisation pour crise d'asthme (+ 1,9 %) (Dockery 1994).

Heinrich et al. ont montré que la **pollution automobile**, tous facteurs confondus, entraîne quelques risques notables, mais peu importants sur le rhume de foin (OR = 1,16) et la toux nocturne (OR = 1,36) (Heinrich 2005). Pourtant, l'urbanisation et le trafic automobile sont pointés du doigt au Japon où la morbidité allergique est liée à 60 % à l'allergie au pollen de cèdre rouge. En effet, sa prévalence varie de 1,7 % (régions montagneuses où il n'y a ni pollen de cèdre, ni circulation automobile) à 5,1 % (en forêt où le pollen est abondant) et à 13,2 % en ville (présence de pollen et de trafic automobile) (Ishizaki 1987). Une autre étude

de Chunling et al. montre que le volume du trafic automobile est corrélé avec la concentration de NO₂ et insiste sur l'importance des symptômes de rhinite (Chunling 2002).

Tableau 2 : Effets adjuvants des particules diesel sur la réponse inflammatoire allergique. (Bonay 2007)

| |
|--|
| 1. Modèles animaux |
| • ↗ IgE totales et spécifiques |
| • ↗ cytokines TH2 (IL-4, IL-5) et GM-CSF |
| • ↗ de l'inflammation à éosinophiles et de l'hyperplasie des cellules à mucus de l'épithélium respiratoire |
| • ↗ de l'hyperréactivité bronchique associée à ↗ de l'inflammation éosinophile |
| 2. Chez l'homme |
| • ↗ IgE totales et spécifiques |
| • ↗ de la commutation isotypique vers la production d'IgE des lymphocytes B |
| • ↗ CC chimiokines (RANTES, MCP-3, MIP-1α) |
| • ↗ cytokines de type TH2 et de la sécrétion d'histamine par les basophiles |
| • ↗ de la réponse IgE induite par un néoantigène (KLH) |

GM-CSF : *granulocyte macrophage colony stimulating factor* ; TH2 : *T helper* de type 2 ; Rantes : *regulation upon activation normal T cell expressed and secreted* ; MCP-3 : *macrophage chemoattractant protein-3* ; MIP-1α : *macrophage inflammatory protein-1α* ; KLH : *keyhole limpet hemocyanin*.

Outre le rôle néfaste des polluants atmosphériques et du tabagisme sur l'appareil respiratoire, les polluants peuvent agir sur les grains de pollen, soit en fragilisant la membrane pollinique, ce qui facilite la libération de petites particules cytoplasmiques dites granules cytoplasmiques de pollen ou GCP (Motta 2006), soit en modifiant les allergènes polliniques (Rogerieux 2007). Ce mécanisme sera détaillé dans la section 1.2 « Pollen et Granules ».

1.1.5.3.3. Les infections

Les infections ont une relation complexe avec les maladies allergiques respiratoires, notamment l'asthme. Elles ont été associées, selon les études, soit à l'augmentation (infections respiratoires virales) soit à une diminution (exposition aux microbes par la voie oro-fécale ou contamination de la nourriture) du risque de développement de l'asthme. À court terme, chez les enfants aussi bien que chez les adultes, les infections respiratoires aiguës de type viral provoquent l'exacerbation de l'asthme (Gern 2000, Johnston 1998). Les **infections virales** provoquent l'exacerbation de l'asthme. En effet, une étude a mis en

évidence l'existence de stigmates d'infection virale des voies aériennes dans 80 à 85 % des exacerbations d'asthme chez l'enfant scolarisé de 9 à 11 ans.

De même, chez l'adulte (Teichtahl 1997), la survenue d'une infection respiratoire virale semble responsable de 37 % des hospitalisations pour asthme, surtout en période hivernale. Les virus les plus fréquemment mis en causes sont les picornavirus, le coronavirus, l'influenza, la parainfluenza, le virus respiratoire syncytial (VRS) et l'adénovirus (WHO 2002).

Les **infections bactériennes** chroniques, particulièrement celles à *Chlamydia pneumonia*, semblent jouer chez l'enfant un rôle important dans le développement de l'asthme au cours de la vie adulte (WHO 2002). Les données disponibles concernent surtout l'association entre, d'une part, infection bactérienne chronique des voies respiratoires et asthme sévère (Gencay 2001) et, d'autre part, infection bactérienne et exacerbation de l'asthme (Allegra 1994).

L'amélioration de l'hygiène et la limitation de la circulation de certaines infections dans la population sont associées à l'augmentation de la prévalence de l'atopie et des maladies allergiques dans les pays occidentaux. On a remarqué ainsi que les allergies respiratoires étaient moins fréquentes chez les personnes largement exposées aux microorganismes bactériens transmis par voie oro-fécale (Matricardi 2000).

1.1.5.3.4. Le mode de vie

L'occidentalisation du mode de vie, notamment la faible taille des familles, l'hygiène accrue, le traitement des infections, les vaccinations, le plus grand nombre d'enfants gardés à domicile, et l'obésité, favoriseraient l'émergence des allergies respiratoires. Le meilleur exemple pour décrire ce facteur de risque est la réunification de l'Allemagne. Après cette réunification en 1990, il a été observé une augmentation significative du nombre de patients allergiques en Allemagne de l'Est considérée comme non occidentale avant 1990. (von Mutius 1994, Weiland 1999). Ceci serait dû à la progression sociale modifiant les aspects de la famille et les comportements au quotidien.

La plus grande fréquence des allergies dans les pays occidentaux a été mise sur le compte du mode de vie spécifique. La fréquence du rhume des foins est inversement corrélée à la taille de la famille : plus la **fratrie** est nombreuse, moins l'enfant risque de développer une pollinose (Bernsen 2003, Bodner 1998, Cohet 2004, Strachan 1989, Wickens 1999) ; ainsi les enfants uniques auraient un risque significativement plus élevé de développer des allergies.

Cependant l'admission précoce en **crèche** diminuerait le risque allergique ultérieur (Haby 2000, Krämer 1999, Nystad 2000).

Des études épidémiologiques ont montré que des enfants d'une **première grossesse tardive** ont un risque significativement plus élevé de développer les maladies allergiques (Ring 2001). D'autres signalent que l'allaitement maternel est un facteur protecteur pour l'asthme (Host 2004).

L'**utilisation d'antibiotiques** au cours de la première année de vie augmenterait le risque allergique. Dans l'étude de Wickens et al., une association entre l'utilisation des antibiotiques et l'existence d'un asthme à l'âge de 5-10 ans est mise en évidence (Wickens 1999). Cette liaison est plus significative dans le cas d'une utilisation des antibiotiques au cours de la première année de vie. Par contre, dans cette étude, l'association de l'antibiothérapie à la pollinose n'était pas significative. Droste et al. donnent des résultats comparables pour l'asthme, mais ils montrent que le risque de pollinose à 7-8 ans est associé à l'antibiothérapie au cours de la première année de vie (Droste 2000). Parmi les autres médicaments incriminés figure le paracétamol, dont l'utilisation en fin de grossesse et chez les nourrissons serait associée à un risque accru de wheezing, de rhinites allergiques et de dermatite atopique. (Barragan-Meijueiro 2006, Jedrychowski 2006, Shaheen 2005, Shaheen 2002). Certaines caractéristiques du style de vie anthroposophique comme, par exemple, la restriction de l'usage des antibiotiques et des antipyrétiques, sont associées à une réduction du risque de maladies allergiques chez l'enfant (Enriquez 2005, Flöistrup 2006).

L'**alimentation** et l'**obésité** sont également suspectées dans l'augmentation du risque d'allergie respiratoire, en particulier en ce qui concerne l'asthme et l'hyperactivité bronchique. La consommation de hamburgers est ainsi associée aux symptômes d'asthme (Tsai 2005). La consommation de plats à emporter a montré une association similaire avec l'hyperactivité bronchique (Tsai 2005). D'autre part, plusieurs études ont signalé des associations fortes entre asthme et obésité aussi bien qu'entre asthme et indice de masse corporelle, chez les enfants et les adultes (Canoy 2004, Hallstrand 2005, Hong 2006, Nystad 2004, Sin 2004).

La **vie en ville** présenterait un facteur de risque de développement des allergies respiratoires quand on compare ce mode de vie au mode de vie rural. De plus, plusieurs études ont montré que naître et vivre à la ferme pendant les deux premières années de vie réduisait le risque allergique par rapport aux témoins constitués soit par des citadins soit par des ruraux ne vivant pas à la ferme. Riedler et al. montrent que le rhume des foin est significativement moins

fréquent à l'âge de 8-10 ans chez les enfants vivants à la ferme (3,1 %) comparés à ceux qui n'ont pas eu de contact avec un environnement de ce type (10,3 %) (Riedler 2000).

1.1.5.4. Les facteurs déclenchants

Certains facteurs de risque déclenchent les crises d'asthme ou l'aggravation des symptômes asthmatiques, en induisant une réaction allergique. Ces facteurs sont variables selon les personnes et la période considérée.

Les facteurs déclenchants reconnus sont principalement :

- l'**exercice physique**, qui entraîne une hyperventilation et favorise une inhalation accrue de grains de pollen. Des études cliniques montrent que beaucoup d'allergies polliniques se manifestent (ou débutent) lors d'une sortie en plein air (Clark 1999) ;
- les **orages et la pluie fine** : des épidémies d'asthme aigu grave ont été associées à ces phénomènes, en particulier à Londres et à Melbourne. (Anto 1997, Bellomo 1992, Davidson 1996, Newson 1997) ;
- l'exposition professionnelle à des produits chimiques tels que les isocyanates (Chan-Yeung 1995) ;
- l'exposition continue à des allergènes intérieurs en période pré et postnatale, déjà considérée comme un facteur initiateur de l'atopie (Platts-Mills 2003).

1.2. Pollen et Granules

Le pollen, producteur des gamètes mâles des végétaux supérieurs, est souvent classé, dans les domaines de l'allergologie et de l'aérobiologie tout au moins, en trois groupes dont un premier pour les arbres et deux pour les herbacées, lesquels sont différenciés généralement en pollen de Graminées et pollen d'autres herbacées.

Le pollen issu des Graminées est quantitativement une des sources majeures d'aéroallergènes, aussi bien dans les régions occidentales que dans d'autres zones géographiques. Il est responsable de maladies allergiques comme l'asthme et la rhinite. La prévalence de ces manifestations augmente depuis quelques décennies. Ceci est vraisemblablement dû, en partie, à une augmentation de la concentration pollinique dans l'air, liée à des changements climatiques assez généraux, avec un effet potentiel de la température et de la concentration en gaz carbonique pouvant avoir une influence particulière (Wayne 2002).

D'autre part, outre son rôle sur l'appareil respiratoire, la pollution atmosphérique induit une fragilisation de la membrane du grain de pollen, qui peut ainsi, notamment au contact de l'eau, libérer de petites particules dites granules cytoplasmiques de pollen ou GCP. Ces particules, de petite taille, contiennent des allergènes majeurs de pollen. En fonction de cette taille réduite, les granules peuvent pénétrer plus profondément que le grain de pollen dans l'appareil respiratoire et provoquer ainsi des réactions allergiques plus fortes que celles induites par le pollen. De ce fait, les GCP sont mises en cause dans les épisodes épidémiques d'asthme associés aux orages.

1.2.1. Généralités

Le mot « pollen » du latin *pollen*, fleur de farine, désigne normalement une substance et ne devrait être employé qu'au singulier. Dans le langage courant et par assimilation, on utilise ce terme pour « grain de pollen » au singulier comme au pluriel.

Le grain de pollen est l'élément reproducteur microscopique produit par les organes mâles des plantes (anthères des étamines). Le grain de pollen est composé de plusieurs cellules et d'une paroi appelée sporoderme. Il est libéré à maturité par déhiscence de l'anthère (Thibaudon 2003). Il intervient dans la fécondation de l'organe femelle des plantes après avoir été déplacé et déposé sur les stigmates des fleurs. Le transport s'effectue par le vent pour les plantes dites anémophiles, par les insectes pour les plantes entomophiles, parfois par les animaux (chauves-

souris) pour les plantes chéiroptérophiles ou par les oiseaux pour les ornithophiles. Plus rarement, le transport se fait par l'eau, notamment pour les plantes immergées hydrophiles. (Thibaudon 2003)

Un grain de pollen est caractérisé par sa taille, sa forme générale et les ornements de sa couche externe appelée « exine ». Certaines de ces caractéristiques permettent d'identifier la plante qui est productrice. Les grains de pollen mesurent de 2,5 à 220 μm selon les espèces, avec une taille moyenne de 20 à 60 μm . Ils ont, souvent, une forme sphérique ou ovoïde.

La paroi des grains de pollen possède des ouvertures appelées apertures. Elles permettent la libération de substances solubles dès que le grain de pollen rencontre une surface humide. Les apertures permettent également le passage du tube pollinique lors de la germination du grain de pollen sur la fleur femelle.

La paroi du grain de pollen ou sporoderme comprend deux couches concentriques de composition chimique différente. La couche externe, l'exine, est constituée d'un copolymère de phénols et de dérivés d'acide gras appelé sporopollénine (Ahlers 1999). De nature glucolipidique, c'est un ensemble de polymères oxydés de caroténoïdes et d'ester de caroténoïdes très résistant aux dégradations biologiques et chimiques (sauf oxydation) (Meuter-Gerhards 1999, Thibaudon 2003). L'exine comprend l'endexine et l'ectexine externe, très caractéristique du grain de pollen de chaque espèce végétale. L'exine est tapissée, pour certaines espèces, de petites particules dites orbicules qui peuvent être des vecteurs d'allergènes (Vinckier 2001). Ces orbicules sont fréquentes sur le pollen de cyprès et en plus petites quantités pour ce qui est des pollen de Graminées (Taylor 2007). La couche interne - l'intine - est de nature pectocellulosique. Elle délimite le cytoplasme du pollen. Contenant, elle aussi, des allergènes, elle est peu résistante et disparaît avec le contenu cellulaire.

Le grain de pollen a une composition biochimique complexe. Il comporte des glucides (cellulose 3 à 10 %, hémicellulose, callose et divers polysaccharides), des composés lipidiques (acides gras, caroténoïdes et sporopollénine ; entre 3 et 25 %), des protéines et des éléments minéraux (Rancé 2007).

Différentes classifications peuvent être utilisées pour classer les pollen selon l'utilisation envisagée. En aérobiologie et en allergologie, on retient souvent trois groupes. (Tableau 3)

Tableau 3 : Principales espèces et familles botaniques dont les pollen sont impliqués dans les pollinoses en France (www.pollens.fr).

| | Famille | Principaux pollen |
|-----------|--|--|
| Arbres | Betulacées Corylacées Cupressacées Fagacées Oléacées Platanacées Salicacées Tiliacées | Bouleau, Aulne Charme, Noisetier Cyprés Chêne, Châtaignier Olivier, frêne Platane Peuplier, Saule Tilleul |
| Herbacées | Composées Plantaginacées Polygonacées Urticacées | Armoise, Ambroisie Plantain Oseille Pariétaire |
| Poacées | Graminées | Dactyle, Fléole |

Tous les pollen ne sont pas allergisants. Pour provoquer des symptômes d'allergie, il paraît clair que les grains doivent être émis en grande quantité. De ce fait, les pollen anémophiles et de petite taille pouvant pénétrer plus profondément dans l'appareil respiratoire sont plus facilement de potentiels inducteurs d'allergie. De même, un grain de pollen doit disposer de substances (principalement des protéines ou des glycoprotéines) reconnues comme immunologiquement néfastes pour un individu donné.

En France, le réseau de surveillance aérobiologique (RNSA) s'intéresse aux types polliniques les plus allergisants. Le RNSA produit, en association avec des prévisions météorologiques, un bulletin allergo-pollinique spécifique ainsi qu'un indice de Risque Allergique d'Exposition au Pollen (RAEP). Cet indice est coté de 0 à 5 (d'un risque nul à très fort). Parmi les grains de pollen les plus allergisants, on trouve ceux de Cyprés, Bouleau, Ambroisie et Graminées (figure 4).

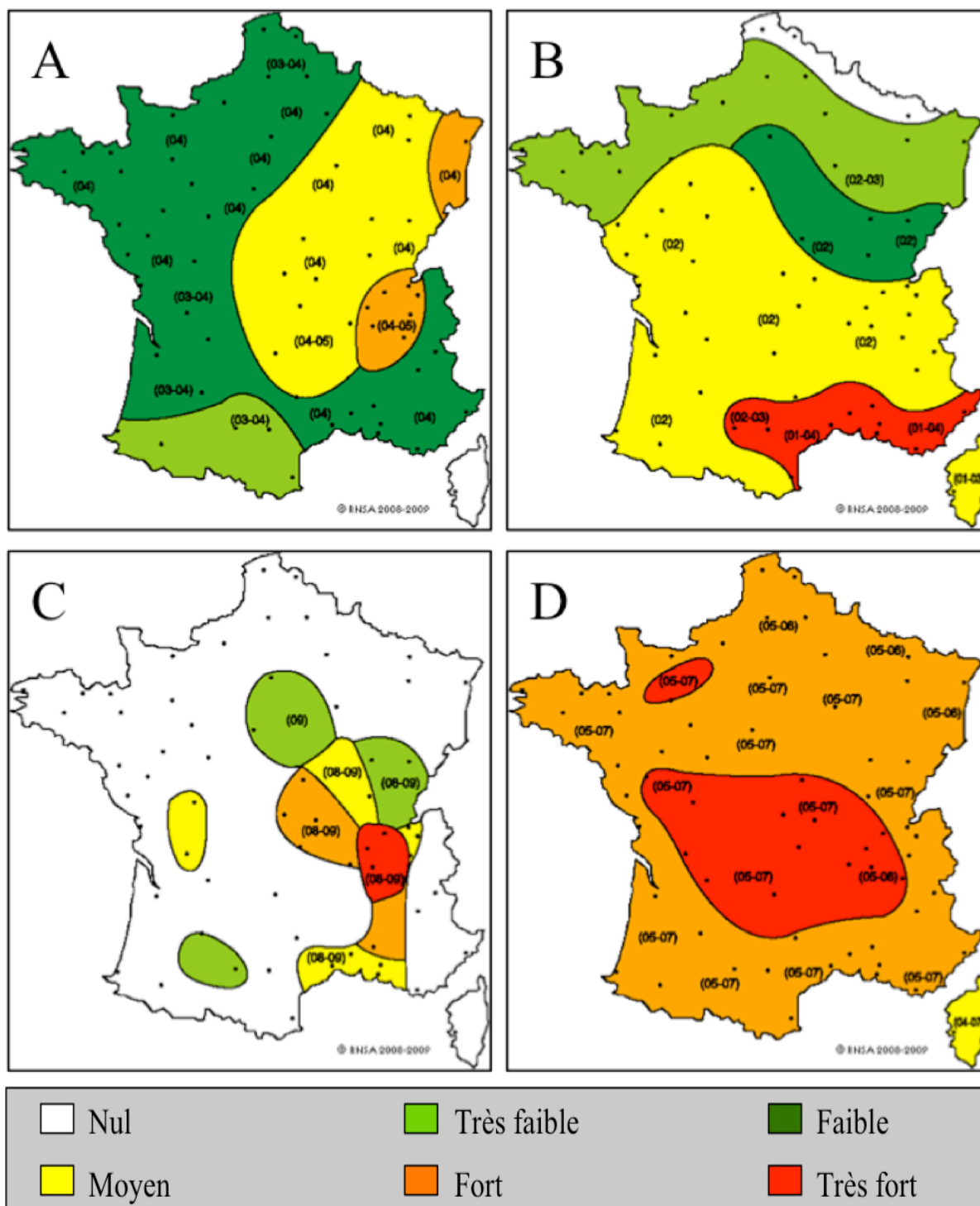


Figure 4 : Cartes de risque allergique en 2008, pour le bouleau (A), le cyprès (B), l'ambroisie (C) et les Graminées (D), au cours des mois mentionnés entre parenthèse. (www.pollens.fr)

1.2.2. Les Graminées : de la plante au pollen

Les Graminées ou Poacées sont une des familles les plus cosmopolites du règne végétal. Elles tirent leur nom actuel du genre *Poa* (les pâturins). On y regroupe près de 12 000 espèces réparties au sein d'un ensemble de plus de 700 genres. On retrouve dans cette famille des

Graminées céréalières (blé, avoine, maïs, orge, riz, seigle, etc.) ainsi que des Graminées fourragères (dactyle, flouve, fléole, etc.) (figure 5). On les trouve partout, depuis les zones équatoriales jusqu'aux cercles polaires. Cette famille de plantes très « sociables » représente environ 20 % de la couverture végétale du globe terrestre. Elles sont l'élément dominant de plusieurs formations végétales très étendues comme la steppe, la savane, la pampa, les grandes plaines américaines et la pelouse alpine.

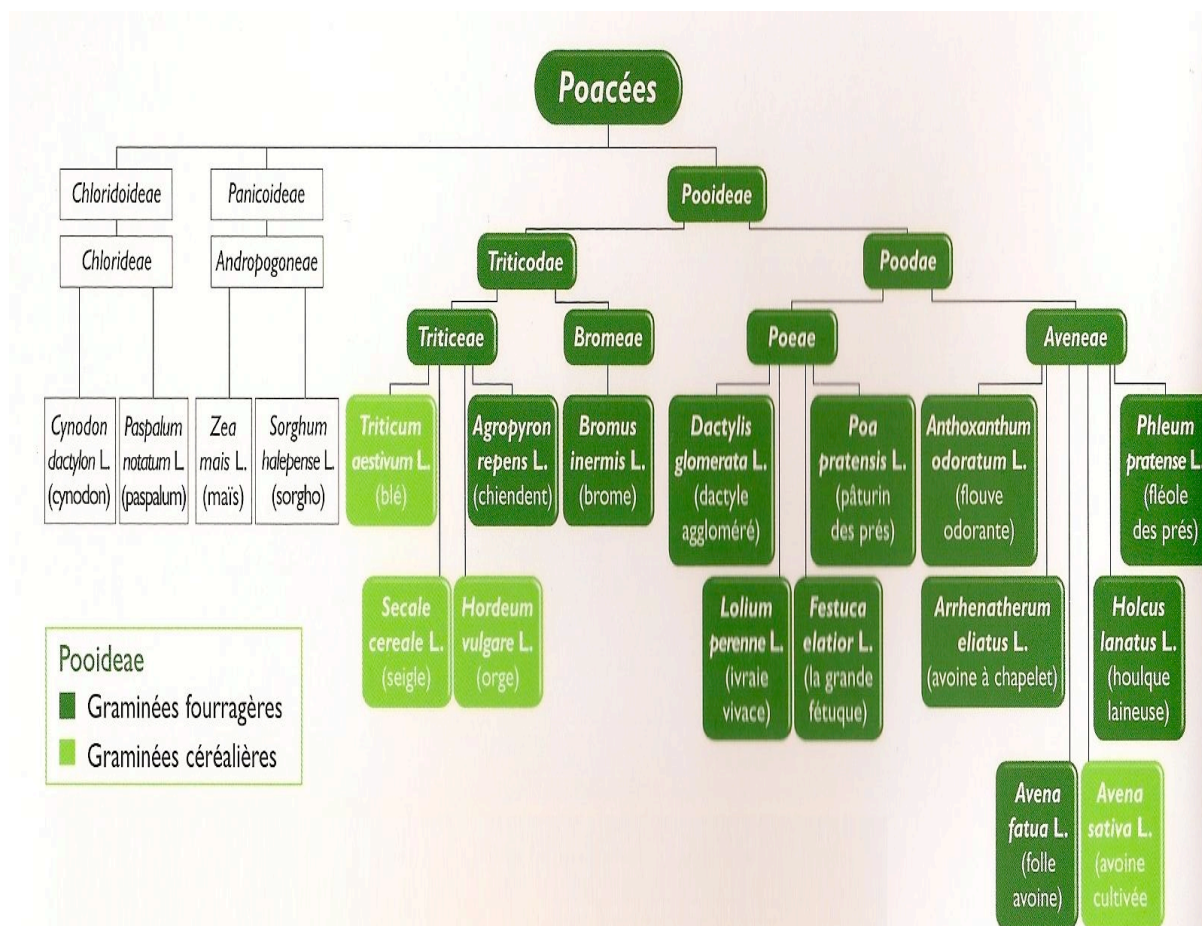


Figure 5 : Famille des Graminées (ALK-ABELLO 2008b)

La fléole des prés (figure 6) est une plante vivace pouvant atteindre 1,50 mètre de haut. Sa tige est cylindrique, creuse et porte des nœuds. Ce chaume est généralement non ramifié, sauf au niveau du sol où un tallage dense, qui conduit à la mise en place de touffes caractéristiques, est fréquemment observé. Les racines produisent un chevelu important, notamment grâce à la formation de nombreuses racines adventives naissant à la base des tiges. Les feuilles étroites, à nervures parallèles, s'attachent sur les tiges par une gaine fendue montrant, à la jonction avec le limbe, une ligne de poils ou une languette (ligule). Les inflorescences sont formées d'épis d'épillets. En France, la fléole des prés est présente dans tous les départements de la métropole (Bock 2008).



Figure 6 : A – planche botanique montrant les différentes parties de la fléole des prés (Thomé 1885) ; B – inflorescence de fléole des prés (www.floralimages.co.uk).

Les grains de pollen des différents genres et espèces de Graminées ont une morphologie relativement homogène. Les grains sont sphériques à ovoïdes, monoporés (pore distal operculé) bréviaxes à longiaxes, avec une exine plus ou moins granuleuse, très peu ornementée (scabre), avec des diamètres compris entre 15 à 55 μm . Le grain est hétéropolaire, à contour équatorial circulaire et contour méridien en forme d'ove. L'intine, d'épaisseur moyenne, est plus marquée à l'hémisphère distal. Le cytoplasme contient : (1) les organites cellulaires tels que mitochondries, chloroplastes et des granules, (2) trois noyaux dont 1 végétatif et 2 génératifs. Le poids moyen d'un grain est de 40 ng. (Rancé 2007)

Un grand nombre de pollen de cette famille botanique sont allergisants (Jaeger 2008), en particulier ceux des Graminées fourragères (brome, chiendent, dactyle, sainfoin, fétuque, fléole, flouve, folle, houlque, ivraie, pâturin, roseau, vulpin). Les grains de pollen de Graminées sont les vecteurs des principaux aéroallergènes impliqués dans la survenue des pollinoses, en particulier pendant une période couvrant une partie du printemps et tout l'été dans les régions de l'Europe moyenne. Il existe un gradient nord/sud d'un mois environ (mai - août), parfois avec un regain en octobre. Ces périodes de pollinisation peuvent varier d'une année à l'autre en fonction des conditions météorologiques; ces variations vont influencer les concentrations polliniques annuelles, voire, globalement, le pouvoir allergisant des différentes Graminées impliquées.

Dans le travail présenté ici, c'est un pollen de Graminées, celui de la fléole des prés (*Phleum pratense*) qui nous intéresse. De par sa large distribution géographique, son spectre altitudinal étendu (populations retrouvées jusqu'à 1800 m), son importance agronomique en tant que plante fourragère, son activité biologique ainsi, enfin, qu'en raison de son allergénicité reconnue et déjà largement étudiée, c'est un modèle de grand intérêt applicable - dans le domaine de l'allergologie - à d'autres pollen de Graminées (Hejl 2009, Lièvre 2009).

L'essentiel de l'allergénicité des grains de pollen de Graminées est attribuable à un nombre limité d'allergènes rapidement libérés après hydratation au contact des muqueuses.

Les allergènes identifiés dans une espèce ont des homologues dans d'autres espèces, et présentent donc des propriétés physicochimiques et immunologiques identiques. Sur cette base ont été formés les groupes 1, 2, 3, etc. rassemblant des allergènes provenant de différentes espèces mais qui partagent bien des propriétés semblables. Pour la fléole des prés, le nom de chaque allergène comprend les lettres Phl p (pour *Phleum pratense*), suivi d'un numéro en chiffre arabe, en accord avec la nomenclature officielle des allergènes de Graminées (Larsen 1996). A ce jour, 11 allergènes ont été identifiés et décrits pour le pollen de Graminées (tableau xxx) (Andersson 2003, Leduc-Brodard 1996, Mecheri 1985, www.allergome.org). Tous ces allergènes ont été étudiés de façon approfondie; Les séquences nucléiques et protéiques primaires ainsi que la structure tridimensionnelle sont connues (Marknell DeWitt 2002, Rossi 2001, Suck 2000, Swoboda 2004, Valenta 2001, Vrtala 1999).

Tableau 4 : Vue d'ensemble des allergènes du pollen de fléole des prés (Hrabina 2007, Motta 2004a).

| Allergène | Nature et Fonction | Poids Moléculaire (KDa) | Point isoélectrique (pI) |
|-----------------|--|-------------------------|--|
| Phl p 1 | β -expansine Relâchement de la paroi cellulaire | 31 - 35 | 5 - 5.7 Phl p 1b: 10 |
| Phl p 2 | Homologie avec Phl p 1 | 10 - 12 | |
| Phl p 3 | Homologie avec Phl p 1 | 11 - 14 | 7.0 - 9.0 |
| Phl p 4 | Glycoprotéine-flavoenzymatique | 50 - 67 | 9.5 - 10 |
| Phl p 5 | Activité ribonucléase 2 isoformes (a et b) | 27 - 33 | Phl p 5a: 4.8 - 5.7 Phl p 5b: 5.8 - 8 |
| Phl p 6 | Isoflavone réductase Homologie avec Phl p 5 | 12 - 13 | 4.0 - 5.9 |
| Phl p 7 | Calcium-binding protéine Polcalcine | 8 - 12 | 3.9 - 4.0 |
| Phl p 10 | Cytochrome C | 12 | |
| Phl p 11 | Inhibiteur de la trypsine de soja | 16 - 18 | |
| Phl p 12 | Actin-binding protéine Profiline | 14 | 3.0 |
| Phl p 13 | Polygalacturonase | 50 - 60 | 6.0 - 7.5 |

Grâce aux allergènes recombinants purifiés, les allergènes sont classés en majeurs et mineurs. Les premiers regroupent les allergènes des groupes 1 et 5. À eux deux, ils contribuent à plus de 80 % de l'allergénicité des grains de pollen de Graminées (Niederberger 1998, Valenta 1999, van Ree 1998). En revanche, moins de 20 % du potentiel allergénique de pollen de Graminées est en relation avec les allergènes mineurs, appartenant aux groupes 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 12 et 13 (Hrabina 2007).

Des homologies de séquence entre les allergènes du même groupe de différentes espèces de Graminées sont observées. En effet, les allergènes majeurs du groupe 1 présentent un degré d'homologie hautement significatif (au moins 90 % au niveau des acides aminés) entre différentes espèces de Pooideae. L'identité globale des acides aminés, parmi les allergènes du groupe 5 de différentes espèces, varie de 55 à 85 %. Cette homologie se traduit par une forte réactivité IgE croisée entre les espèces (figure 7) (Ferreira 2004). Outre les groupes majeurs, d'autres allergènes mineurs (par exemple ceux du groupe 2, 3, 7, 10 et 12) présentent également une homologie significative (supérieure à 60 % entre espèces de Pooideae) (Hrabina 2007).

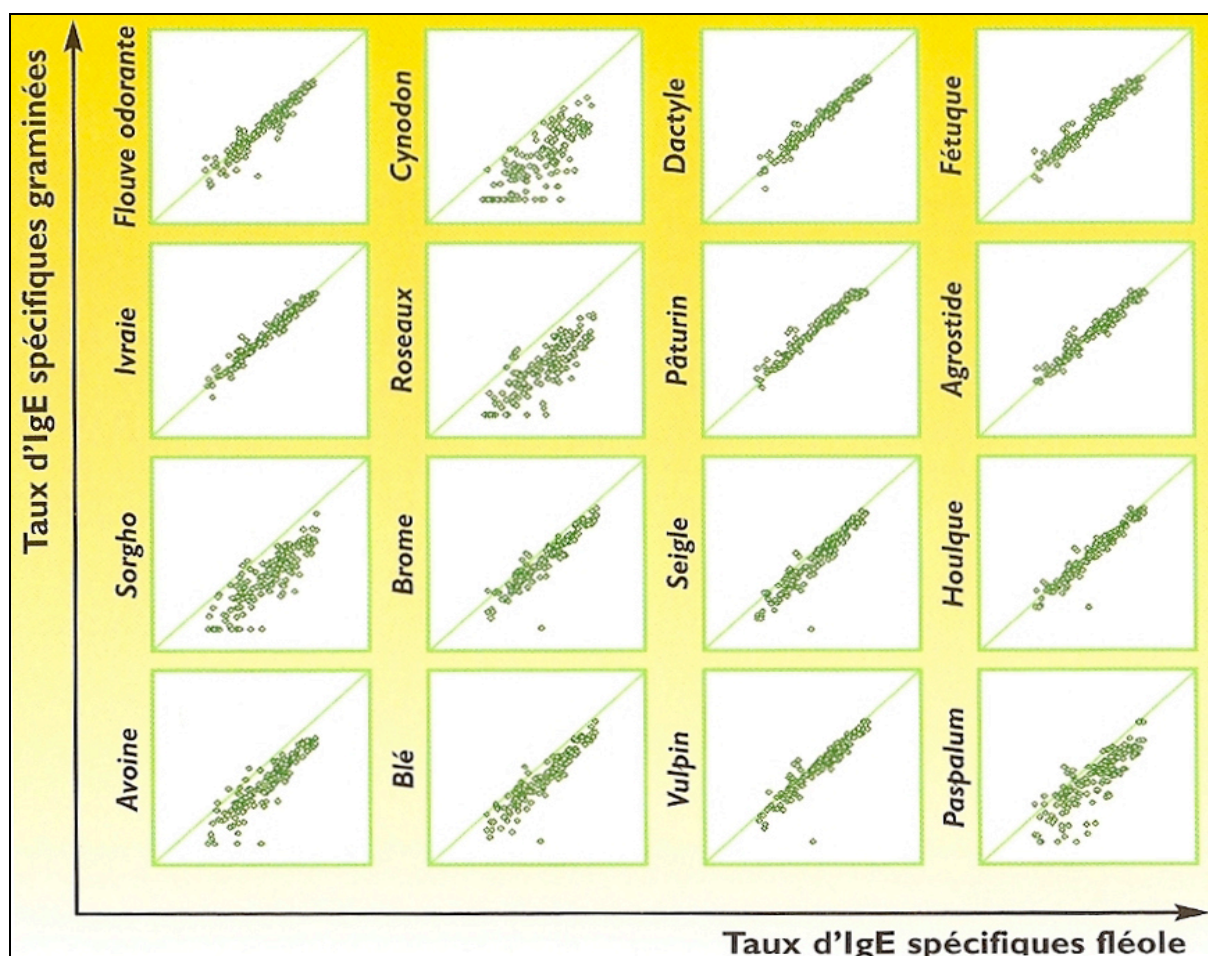


Figure 7 : Réactivité croisée pour le pollen de 16 espèces de Graminées céréalières et fourragères avec le pollen de fléole des prés (ALK-ABELLO 2008b).

Les allergènes, se situent principalement à l'intérieur du cytoplasme, soit sous une forme libre soit en étant associés aux organites tels que les mitochondries ou les granules cytoplasmiques de pollen. Quelques allergènes se trouvent aussi sur ou dans l'exine ainsi que dans l'intine. La libération ou la diffusion des allergènes présents dans ou sur le grain de pollen est nécessaire pour que se déclenche une réaction chez les individus sensibilisés. Dans une atmosphère sèche, le grain de pollen est stable et peut conserver ses allergènes pendant des années. Lorsque le grain de pollen entre en contact avec la muqueuse nasale, les allergènes hydrosolubles diffusent dans le mucus épithélial où ils deviennent disponibles pour le système immunitaire (Behrendt 2001a). La libération des allergènes dépend du pH et de la température, avec un optimum à pH 9 et à 37 °C en ce qui concerne la quantité totale de protéines, et de valeurs parfois différentes pour les allergènes considérés individuellement (pH 7,4 pour la libération de Phl p 5, par exemple) (Behrendt 1999). La diffusion des allergènes hydrosolubles, de diamètre moyen de l'ordre de quelques nanomètres (2 à 5 nm), provenant du cytoplasme hors du grain de pollen intact pourrait s'effectuer par les

nombreuses microperforations (au moins une par μm^2) qui traversent la couche interne de l'exine ($1\ \mu\text{m}$). Ces microperforations ont environ 200 nm de diamètre et aboutissent dans les espaces inter-collumellaires. Ces chambres ou vacuoles d'environ 1 à 2 μm d'épaisseur sont elles-mêmes en communication avec l'extérieur du pollen par de nouvelles microperforations, identiques en dimensions et densité que les précédentes, traversant la couche externe de exine épaisse de 1 à 2 μm (Peltre 1987).

Cependant, les allergènes peuvent également être libérés avant l'inhalation. Il est supposé que suite à l'action des polluants atmosphériques, les allergènes sont libérés sous forme libre et s'agrègent aux particules présentes dans l'air (Behrendt 2001a). Cela a, par exemple, déjà été observé avec des particules diesel (Knox 1997). Ces allergènes, associés à des particules fines et ultrafines, peuvent pénétrer plus profondément dans les poumons. Ils pourraient, par ailleurs, rester présents dans l'atmosphère sur des périodes plus longues que les seules périodes de pollinisation.

La disponibilité des allergènes peut être rendue possible par d'autres phénomènes (figure 8), notamment par l'intermédiaire d'aérosols inhalables constitués, pour tout ou partie, de granules cytoplasmiques de pollen.

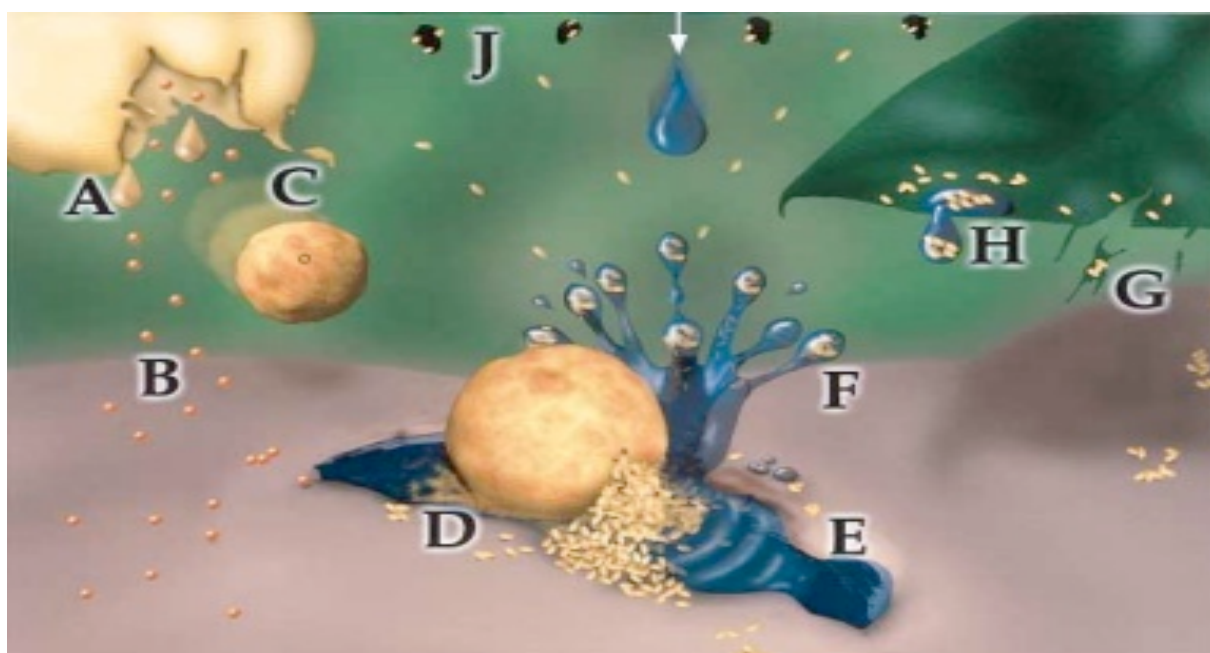


Figure 8 : Mécanismes potentiels de la dispersion des allergènes polliniques : libération directe de liquide du tapetum (A), orbicules (B), fragments (C) issus de la rupture des anthères ; relargage des allergènes cytoplasmiques libres (D) et des granules d'amidon (E) en contact avec des surfaces humides, après libération par le vent ou lavage par association avec des gouttelettes d'eau (F) ; dispersion de fragments végétaux (G), élution des allergènes sur des surface humides (H) et adsorption des bioaérosols sur des particules (inorganiques), y compris les particules diesel (J). (Solomon 2002)

1.2.3. Du pollen aux granules

En contact avec de l'eau, le grain de pollen se ramollit, en quelque sorte, et peut ainsi expulser son cytoplasme par le pore. De ce phénomène dynamique, pratiquement instantané, il résulte une libération dans l'atmosphère de particules microniques (figure 9). Officiellement, aucune nomenclature n'existe encore pour ces microparticules. Les auteurs parlent tout à la fois de granules d'amidon, de particules submicroniques, subpolliniques ou paucimicroniques (Bacsi 2006, Currie 2000, D'Amato 2007, Grote 2001, Motta 2004a, Phelps 2007, Singh 1991, Suphioglu 1992, Taylor 2002, Taylor 1994). Au cours de nos travaux, nous avons choisi d'utiliser le terme de « granules cytoplasmiques de pollen » ou GCP qui regroupe des granules d'amidon, des granules polysaccharidiques et d'autres débris dérivés du cytoplasme, vraisemblablement tous libérés en même temps dans l'atmosphère. Les granules d'amidon ou « starch granules » constituent les réserves énergétiques du grain de pollen et les granules polysaccharidiques ou « p-particles » sont des précurseurs de la membrane pollinique. Des études ont montré qu'un grain de pollen peut libérer entre 700 et 1000 granules d'amidon (taille moyenne : 1 μm) et, aussi, plus de 1 million de p-granules (taille < 500 nm) (Heslop-Harrison 1982, Taylor 2002).

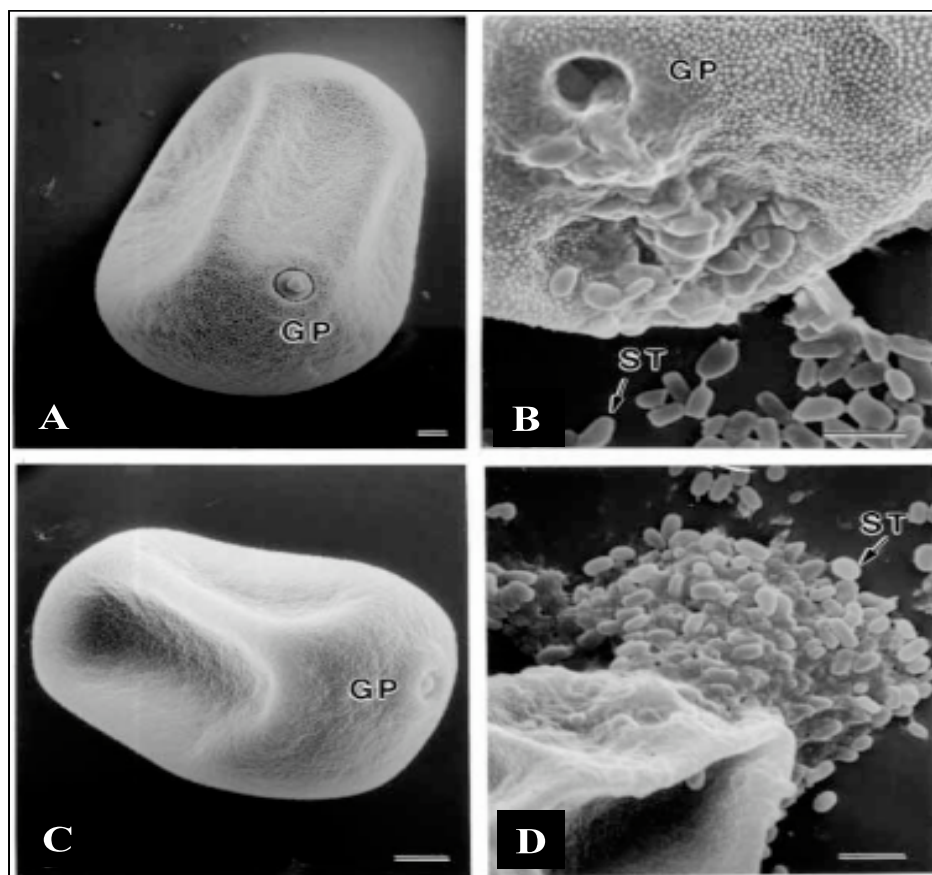


Figure 9 : le grain pollen de fléole expulse les granules cytoplasmiques de pollen (GCP) par le pore, après un contact avec de l'eau. (GP : grain de pollen ; ST : granules d'amidon ou starch granules). (Grote 2001)

La libération des GCP dans l'atmosphère dépend de plusieurs facteurs intrinsèques, tels la fraîcheur du pollen, et extrinsèques, tels que l'action des polluants atmosphériques, sur le grain de pollen lui-même.

En étudiant le pollen d'ivraie (*Lolium perenne*), Taylor et al. ont observé qu'au contact de l'eau, 72 % des grains de pollen, fraîchement récoltés, expulsent leur contenu cytoplasmique, y compris les GCP ; Cette proportion se réduit à 10 % après un stockage à température ambiante pendant 48 heures, alors qu'un pollen commercial, stocké pendant plus d'un an à 4 °C, voit cette proportion baisser à moins de 1 % (Taylor 2002). De même, Taylor et al. montrent que les grains de pollen, issus de différentes espèces de Graminées, ne libèrent pas le même nombre de GCP (Taylor 2007). Par exemple, le pollen de fléole libère 5,5 fois plus de GCP que celui d'ivraie.

D'autre part, la pollution atmosphérique peut fragiliser la membrane pollinique et ainsi faciliter la libération des GCP suite à une hydratation de pollen. En effet, Motta et al. observent une augmentation de la quantité des granules libérées suite à une exposition d'une durée de 4 heures à des polluants gazeux d'un lot de pollen de fléole commercial. Ceci est vrai même à des doses relativement faibles (0,5 ppm pour l'ozone et 2 ppm pour le dioxyde d'azote). Ce travail montre aussi des cassures importantes de la membrane pollinique après l'exposition des pollen à des polluants atmosphériques, ce qui laisse penser que la pollution atmosphérique, à elle seule, peut induire une libération des GCP (figure 10) (Motta 2006).

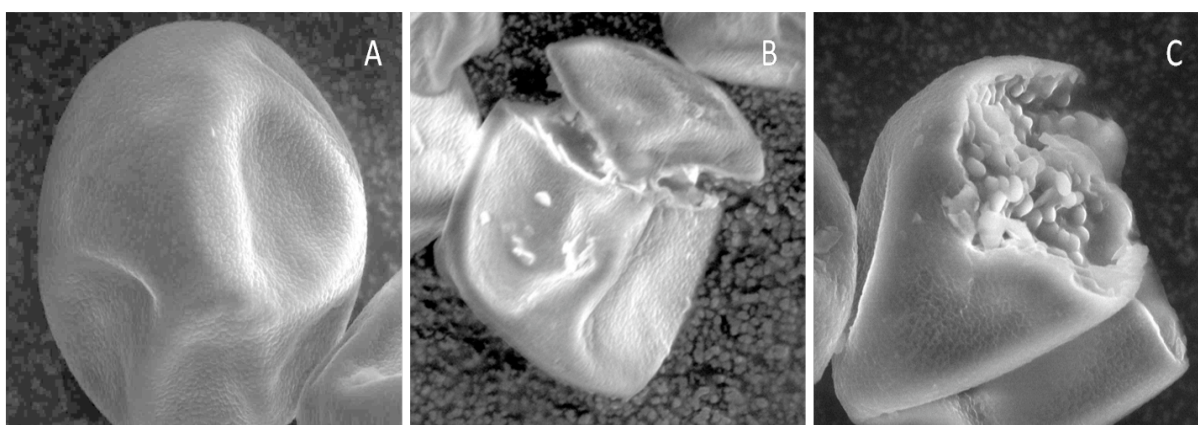


Figure 10 : Pollen intact (A), pollen exposé pendant 4 heures à 2 ppm de NO₂ (B) et à 0,7 ppm d'ozone (C) (Motta 2006).

De plus, des facteurs météorologiques tels que les orages et la pluie fine induisent une augmentation de concentrations atmosphériques de ces particules. Des auteurs ont observé que la concentration de granules d'amidon dans l'air ambiant augmente de 20 à 50 fois après la survenue des orages, alors même que les grains de pollen entiers ne sont plus détectables. Il

faut ajouter que les GCP ont été mises en cause dans les épisodes épidémiques d'asthme associés aux orages ou « thunderstorm asthma » (Marks 2001, Schappi 1999, Suphioglu 1998, Venables 1997). Ce phénomène se caractérise par des pics d'admission aux urgences pour crise d'asthme suivant un mécanisme qui a été décrit par Marks et al. (Marks 2001). Dès le début de l'orage, les grains de pollen libèrent les GCP avec les premières gouttes de pluie. Les GCP sont ensuite emportés par les vents violents avant d'être entraînés au sol par la pluie abondante. Ils sont ainsi transportés à l'avant du front de l'orage, sur une zone pouvant atteindre 1 km de hauteur. Les sujets asthmatiques se trouvant dans cette zone sont alors exposés à de fortes concentrations de GCP en suspension et sont ainsi susceptibles de développer plus facilement des crises d'asthme.

La survenue des ces épisodes allergiques, liés aux GCP, est associée à quelques allergènes polliniques localisés sur ou dans les GCP. Des études immunologiques par marquage ont révélées la présence d'allergènes majeurs, tels que Lol p 1 et Lol p 5 pour l'ivraie, Phl p 5 pour la fléole et Bet v 1 pour le bouleau sur/dans les granules d'amidon. De même, ces granules, issues des grains de pollen de fléole, renferment des allergènes mineurs comme Phl p 4. D'autres allergènes tels que Phl p 6 et Phl p 13 ont été localisés sur les p-particules. On peut signaler que d'autres organites contiennent des allergènes de pollen. (Fischer 1996, Grote 1994, Grote 2005, Singh 1991, Vrtala 1999)

Outre les allergènes protéiques ou glycoprotéiques, les GCP, comme les grains de pollen peuvent contenir des substances inflammatoires tels que le (1→3)- β -glucan et du NADP(H) oxydase (Bacsi 2006, Boldogh 2005, Dharajiyia 2008, Rylander 1999). En effet, pour 1 mg de pollen d'ivraie et les GCP associés à cette quantité de pollen, on a pu mesurer respectivement 51 et 115 ng de (1→3)- β -glucan (Rylander 1999). D'autres substances inflammatoires comme les prostaglandines et les leucotriènes (Behrendt 2001b) peuvent être libérées à partir des grains de pollen, lors du contact avec la muqueuse nasale. Ces substances pourraient agir de concert avec les allergènes et augmenter la réponse allergique. En effet, il a été montré qu'elles ont un effet chemoattractant sur les polynucléaires neutrophiles de sujets allergiques en culture et qu'elles provoquent leur activation (Traidl-Hoffmann 2002). La libération de ces substances est plus élevée chez des espèces comme *Phleum pratense* et *Lolium perenne* que chez certaines autres espèces également allergisantes (Behrendt 2001a).

A ce jour, aucune étude épidémiologique n'a été réalisée permettant de mettre en évidence l'effet des granules dans la survenue des maladies allergiques respiratoires.

Par contre, quelques études expérimentales ont été effectuées afin d'évaluer les caractères allergique et inflammatoire des GCP. *In vitro*, les granules issues de l'ambroisie (ragweed) et de l'amarante (pigweed) induisent des augmentations du taux des espèces réactives oxygénées (ERO, incluant les « radicaux libres », capables d'oxyder aussi bien protéines et ADN que les membranes cellulaires), tout autant dans des cellules humaines broncho épithéliales cancéreuses (A549) que dans des cellules normales (NHBE) (Bacsi 2006).

De même, des études ont déjà montré que les GCP peuvent induire des réactions allergiques humorales et cellulaires chez le rat Brown Norway, sensibilisé avec du pollen de Graminées, et des réactions inflammatoires chez la souris BALB/c, sensibilisée avec du pollen d'ambroisie (Bacsi 2006, Motta 2004a, Motta 2004c).

Enfin, chez les humains, Suphioglu et al. ont montré que les GCP isolés à partir du pollen d'ivraie (*Lolium perenne*) provoquent une réaction positive à un test cutané chez les patients allergiques au pollen de Graminées, ainsi qu'une réponse bronchiale anticipée chez les sujets présentant un asthme associé aux orages (Suphioglu 1992). Par ailleurs, Badorreck et al. ont observé que des patients atteints de rhinite ou d'un asthme moyen, développent des allergies des voies respiratoires inférieures ou « asthme » lors de l'inhalation de 8000 GCP, alors qu'ils développent les symptômes nasaux ou « rhinite » lors de l'inhalation de 4000 grains de pollen (Badorreck 2008).

1.3. Modèle animal et conditions d'étude

De nombreux modèles animaux de l'allergie, tels que les chats, les chiens, les primates, les cochons et les rongeurs permettent de mieux définir et comprendre les mécanismes pathophysiologiques impliqués dans les allergies respiratoires chez les humains. Cependant aucun modèle animal n'est fiable à 100 %.

Parmi les rongeurs, le rat Brown Norway offre à l'expérimentateur un outil d'étude très adapté puisque recouvrant une grande partie des caractéristiques biochimiques et cliniques de l'allergie humaine, telles que la forte production d'IgE, la prolifération lymphocytaires, l'hyper-éosinophilie alvéolaire et une hyperréactivité bronchique.

Dans le modèle animal, différents protocoles expérimentaux et voies d'administration sont envisageables. Chacune possède ses intérêts et ses limites.

Les protocoles expérimentaux sont très nombreux et peuvent être simples ou complexes. Dans les études concernant les allergies, un protocole, constitué par une sensibilisation suivie d'une seule provocation avec l'allergène, semble être à la fois simple et rapide.

Parmi les voies d'administration, on peut citer l'inhalation, l'instillation intranasale et intratrachéale. Cette dernière est une méthode non invasive et rapide qui se rapproche de l'inhalation et dans laquelle on maîtrise la quantité du produit administré.

1.3.1. Modèle animal

Le développement d'un modèle animal pour évaluer la pathogenèse des allergies respiratoires a permis d'améliorer notre compréhension de différentes maladies humaines. Les espèces utilisées varient énormément. Chaque modèle animal présente des forces et des faiblesses, et beaucoup de protocoles ont été mis au point pour examiner des aspects spécifiques de la maladie chez l'homme, en exploitant les caractéristiques uniques de l'expérience sur les espèces. La force des modèles animaux tient notamment au fait qu'ils permettent d'utiliser des méthodes expérimentales invasives afin d'explorer des mécanismes pathogènes, de rendre accessibles des tissus et cellules destinés à des études complémentaires *in vitro* et, enfin, de pouvoir contrôler l'environnement et les facteurs génétiques qui influencent le développement de la maladie. Malheureusement, la limitation fondamentale de tous les modèles animaux étudiés à ce jour, c'est qu'aucun ne permet de reproduire entièrement les complexes réponses physiologiques observées chez l'homme (Boverhof 2008, Coleman 1999).

Afin de reproduire les principales caractéristiques des allergies respiratoires de l'homme, un modèle animal devrait inclure une production des IgE résultant de la bronchoconstriction aiguë et l'augmentation de la résistance des voies aériennes. L'inflammation chronique des voies respiratoires avec des éosinophilies, une élévation de la neutrophilie et la sécrétion de cytokines Th2 devraient également être présentes en même temps que l'obstruction des voies aériennes et l'hypersécrétion muqueuse. Jusqu'à ce jour, aucun modèle animal ne peut prédire avec précision ou reproduire toute la gamme des réponses chez l'homme. Il est donc essentiel d'identifier les éléments clés qui permettent une meilleure prédiction du potentiel allergique des aéroallergènes. Bien que les chiens, les chats, les cochons, les moutons, les chevaux et les primates permettent d'afficher une sensibilité naturelle aux allergènes environnementaux et représentent des modèles viables pour la recherche des allergies respiratoires, la majorité des études *in vivo* se sont focalisées sur les rongeurs comme le cobaye, la souris ou le rat comme modèles de recherche. (Arts 2007, Bice 2000, Karol 1994, Szelenyi 2000, Ward 2007).

1.3.1.1. Cobaye

Il s'agit du premier modèle animal d'étude des allergies respiratoires humaines datant des années 90 (Karol 1994). Cette espèce offre une bonne efficacité concernant la sensibilisation antigénique et une aptitude à provoquer, après l'exposition à l'allergène, des chocs anaphylactiques similaires à ceux de l'homme (Briatico-Vangosa 1994). Comme l'homme, cet animal présente une phase de bronchoconstriction précoce et réversible après exposition allergénique, une éosinophilie pulmonaire persistante et abondante et une implication des médiateurs, eicosanoïdes et cytokines, semblables à celles intervenant dans la pathogénie humaine.

Toutefois, ce modèle présente aussi des désavantages : notamment, une réponse allergique médiée par des sous classes d'IgG, les IgG1 (Pauluhn 2005) et une éosinophilie pulmonaire naturelle.

Cette espèce a été utilisée comme modèle animal de rhinites pour évaluer l'allergénicité du pollen de cèdre japonais (Nabe 1998, Nabe 1997).

1.3.1.2. Souris

Tandis que les cobayes ont été utilisés pour les réactions pulmonaires dans l'allergie respiratoire, les souris offrent une meilleure caractérisation des mécanismes de la sensibilisation et de la réaction allergique. Leur faible coût et la connaissance de leur code génétique ont permis le développement d'une panoplie d'outils principalement en génétique.

Des modèles transgéniques, notamment de délétion de gènes, offrent la possibilité d'étudier les mécanismes d'action de produits ou de la physiopathologie de maladies humaines. De même, 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 (Epstein 2006, Torres 2005).

La taille de l'animal constitue sans doute un des inconvénients majeurs de cet animal. La bronchoconstriction chez la souris est principalement due à la libération de sérotonine, contrairement à l'homme. Parmi les autres différences, notons l'absence de glandes sous muqueuses, de rares cellules en gobelets, l'absence de cartilage au-delà des bronches primaires et un épithélium respiratoire pavimenteux simple au lieu d'une structure pseudostratifiée chez l'homme.

Les souris BALB/c sont les plus utilisées comme modèle d'allergie au pollen d'arbres, notamment le bouleau, ainsi qu'au pollen de Graminées (Herz 2004).

Le modèle murin a souvent été utilisé pour étudier l'impact des polluants atmosphériques sur l'appareil respiratoire et aussi pour mieux évaluer l'effet adjuvant des particules diesel (Nilsen 1997, Steerenberg 2003). Des souris BALB/c ont également servi dans l'étude de l'effet inflammatoire du pollen (Boldogh 2005) et de ses granules (Bacsi 2006). Les souris sensibilisées avec des granules cytoplasmiques de pollen présentent une augmentation du nombre de cellules alvéolaires dans le liquide bronchoalvéolaire, notamment les éosinophiles. Une infiltration cellulaire ainsi qu'une métaplasie dans les poumons sont également possibles (Bacsi 2006).

1.3.1.3. Rat

Depuis quelques années, une augmentation de l'utilisation du rat comme modèle animal des allergies respiratoires est observée. Comme les souris, les rats sont relativement bon marché. Par sa grande taille, le rat présente un avantage significatif par rapport à la souris, en permettant de mesurer plus facilement les caractéristiques des allergies respiratoires : des grands volumes de sérum et du LBA peuvent être obtenus. Associée à sa grande taille, sa grande stabilité sous anesthésie offre aussi des avantages en terme de mesures physiologiques comme l'hyperréactivité bronchique. Plusieurs souches sont utilisées parmi lesquelles on peut citer les rats Wistar, Lewis, Fisher, Sprague - Dawley et Brown Norway (Kips 1992, Misawa 1993, Renzi 1993, Schneider 1997). Le plus populaire, et également le plus courant en terme de modèle animal d'allergie, est le rat Brown Norway (Kimber 2003, Zosky 2007).

La souche Brown Norway, souche consanguine, est très utilisée en immunologie parce qu'elle est la seule souche de rat que l'on peut plus ou moins sensibiliser. A un certain degré, cette souche ressemble au sujet atopique par sa prédisposition génétique (Kimber 2003). Ces rongeurs ont été utilisés comme modèle animal d'asthme allergique (Haczku 1995a, Haczku 1995b, Turner 1996, Uyama 1995) également parce qu'ils présentent plusieurs similarités immunologiques et physiques avec l'asthme humain : une production élevée des IgE (Abadie 1980, Wasserman 1992), une contraction des muscles respiratoires (Dandurand 1994), une hyperréactivité bronchique (Eidelman 1988, Elwood 1991, Renzi 1996, Wasserman 1992), une implication des leucotriènes dans la réaction pulmonaire, une infiltration bronchique des lymphocytes et des éosinophiles.

Cependant, comme tout autre animal utilisé comme modèle de l'allergie respiratoire, le rat Brown Norway présente des inconvénients : une bronchoconstriction faible par rapport au cobaye et une faible connaissance génétique par rapport à la souris. De même, la sensibilisation des rats par des allergènes peut induire des altérations de la fonction des macrophages.

Schneider et al. ont étudié les cinétiques des cellules alvéolaires des rats BN sensibilisés avec de l'ovalbumine en présence d'un adjuvant, l'hydroxyde d'aluminium (Schneider 1997). Des augmentations de diverses cellules alvéolaires, dans le LBA et le parenchyme des poumons, ont été observées. Le jour qui suit la provocation, les cellules dans le LBA augmentent significativement chez les animaux sensibilisés par rapport aux rats témoins. Les taux maximaux de neutrophiles, lymphocytes et éosinophiles sont atteints après 1, 2 et 3 jours après la provocation, respectivement. La concentration maximale des protéines dans les LBA est atteinte entre le 3^{ème} et le 6^{ème} jour après la provocation. Dans la même étude, les taux sériques des IgE et des IgG1 des rats BN ont été plus élevés que ceux observés chez les rats Lewis et Fisher, bien qu'ils soient tous sensibilisés de la même manière.

Cette souche a été utilisée, comme modèle animal d'allergie au pollen, pour étudier l'effet adjuvant des particules diesel (Al-Humadi 2002, Dong 2005a, Dong 2005b, Steerenberg 1999, Steerenberg 2003). Les taux sériques d'IgE et d'IgG1, la cytotoxicité, la prolifération des lymphocytes des ganglions trachéobronchiques et l'expression de plusieurs cytokines ont été étudiés. Iwamoto et al. observent que les lymphocytes issus des ganglions trachéobronchiques des rats BN prolifèrent plus que ceux des rats Lewis (Iwamoto 2000).

Au sein de notre groupe, le rat, sensibilisé au pollen de fléole a aussi été utilisé pour étudier les effets adjuvants provoqués par des nanoparticules (Rogerieux 2008). De plus, cette souche a permis de mieux aborder le potentiel allergique du pollen exposé à divers polluants tels que l'ozone, le dioxyde de soufre et de d'azote (Motta 2004a). Motta et al. ont utilisé ce modèle pour étudier également les réponses humorales et cellulaires suite à une sensibilisation, par instillation intratrachéale, avec des granules cytoplasmiques de pollen. Ces rats ont présenté des taux d'IgE sériques élevés par rapport aux rats témoins (sensibilisés avec du sérum physiologique). De même, une prolifération *in vitro* des cellules issues des ganglions trachéobronchiques des rats sensibilisés avec les GCP a pu être observée. (Motta 2004c, Motta 2004b)

1.3.2. Conditions d'étude

Les réponses allergiques attendues, chez les rats Brown Norway, comme chez les autres animaux utilisés comme modèle animal d'allergie, dépendent en général de la voie d'administration de l'allergène et du protocole de sensibilisation

1.3.2.1. Voie d'administration

Plusieurs techniques sont utilisées pour administrer le produit allergisant chez l'animal. On peut citer les injections intrapéritoniale, intraveineuse ou sous-cutanée, les nébulisations intranasale ou intratrachéale, l'inhalation, et les instillations intranasale et intratrachéale.

Parmi celles-ci, l'inhalation offre une voie naturelle d'entrée dans les voies respiratoires de l'animal et, en tant que telle, elle est préférable à l'introduction de substances toxiques ou allergéniques dans les poumons. Cependant, cette technique ne peut pas toujours être utilisée. La conception et la construction d'un système d'exposition par inhalation requiert des compétences personnelles et des équipements qui ne sont pas disponibles dans de nombreux établissements et qui sont coûteux à acquérir et à entretenir. Même lorsque ces services sont disponibles, d'autres facteurs peuvent rendre impossible l'exposition par inhalation. Par exemple, la grande quantité de produit administré peut être une limite pour la production d'atmosphères à des concentrations suffisantes pour une durée donnée. De la même façon, les essais par inhalation peuvent induire des complications surtout au niveau de la peau et des yeux ; dans le cas de pollen, des risques d'allergies cutanées et oculaires sont envisageables. Les risques de manipulation (allergiques et toxicologiques) pour les techniciens animaliers ne sont pas exclus lors des essais par inhalation (Driscoll 2000). Enfin, des inconvénients d'ordre physiologique peuvent être rencontrés lors de ces essais. Il est difficile de déterminer la vraie

dose inhalée dans les poumons à cause de la rétention des particules. On est alors dépendant du diamètre aérodynamique des ces particules et de la dynamique pulmonaire de chaque animal (Leong 1998).

En raison de ces restrictions, les instillations de produits allergéniques dans les poumons par l'intermédiaire de la trachée (instillation intratrachéale) ou du nez (instillation intranasale) ont été employées dans de nombreuses études comme une alternative à la procédure de l'exposition par inhalation.

Avec l'instillation intranasale, la maîtrise de la quantité de l'allergène administré chez l'animal est loin d'être parfaite. Par ailleurs, cette technique offre l'avantage de permettre uniquement aux particules de petite taille de pénétrer dans l'appareil respiratoire profond, ce qui se rapproche de la réalité (Sabaitis 1999).

Les instillations présentent des avantages par rapport à l'inhalation (Brain 1976). En bref, avec l'instillation, la dose effective livrée dans les poumons de l'animal peut être essentiellement contrôlée. La technique est plus simple que l'inhalation et offre la possibilité de minimiser les risques inhérents aux produits toxiques et allergéniques pour les travailleurs de laboratoire. L'instillation intratrachéale permet l'introduction d'une gamme de doses dans les poumons, dans un court laps de temps. De même elle évite, le plus souvent, l'exposition de la peau et des yeux qui peuvent se produire avec l'exposition par inhalation. Chez les animaux de grande taille, on pourrait se contenter de travailler sur un poumon, même sur un seul lobe de poumon. Cette technique permet d'évaluer le potentiel allergique et inflammatoire de produits difficilement respirables chez les animaux. (Driscoll 2000)

En dépit de certains avantages de l'instillation, cette technique, comme toutes les autres techniques présente des inconvénients. Le principal d'entre eux est que l'introduction de la substance toxique ou allergénique est non physiologique, impliquant des doses plus importantes que celles délivrées pendant l'inhalation. Après instillation, les particules se déposent dans les régions basales des poumons (Brain 1976) et présentent une distribution nettement moins homogène que l'exposition par inhalation (Dorries 1992, Leong 1998, Pritchard 1985). En outre, les voies respiratoires supérieures (c'est-à-dire, les voies nasales, orale, le pharynx et le larynx), qui peuvent potentiellement être une cible importante pour un produit du matériel d'inhalation, sont contournées par l'instillation intratrachéale. Il a été suggéré, aussi, que l'utilisation d'un véhicule, pour obtenir une suspension, peut modifier les résultats de l'étude ou la sensibilisation après chaque administration (Hatch 1981, Henderson 1983). Un inconvénient secondaire est que cette méthode nécessite une anesthésie de

l'animal, ce qui pourrait influencer sur l'effet initial de la substance allergénique et l'animal instillé. (Driscoll 2000)

Osier et al. montre que le nombre de cellules dans le LBA est supérieur chez les animaux sensibilisés par instillation intratrachéale que celui des animaux sensibilisé avec des particules TiO₂ par inhalation intratrachéale. Par contre, le taux de médiateurs comme le MIP-2 et le TNF α dans le LBA sont plus élevés chez les rats sensibilisés par inhalation intratrachéale (Osier 1997). Granum et al. (2001) a trouvé que les réponses humorales (IgE) étaient supérieures chez les souris NIH/OlaHsd sensibilisés, avec de l'ovalbumine mélangée à des particules de polystyrène, par injection intrapéritoniale à celles des souris sensibilisées par instillation intranasale ou intratrachéale. (Granum 2001)

Les premières études des substances allergéniques utilisant l'instillation intratrachéale ont été effectuées chez le cobaye. Ritz et al. observe que la cinétique de la réponse immunitaire, le pourcentage d'animaux qui répondent, et le délai d'apparition des réactions respiratoires ont été similaires pour chez les animaux sensibilisés avec l'allergène par instillation intratrachéale ou par inhalation (Ritz 1993). De plus, l'instillation intratrachéale utilisée dans le cadre des études d'allergies respiratoires a donné des réponses allergiques similaires à celles obtenues par inhalation (Sarlo 1997a, Sarlo 1997b).

Au sein de notre laboratoire, l'instillation intratrachéale est utilisée comme technique d'administration d'allergènes (issus de grains de pollen de fléole et de leurs granules cytoplasmiques), ainsi que de nanoparticules ou de nanotubes de carbone, chez le rat Brown Norway (Motta 2004c, Motta 2004b, Rogerieux 2008).

Lors des expositions des animaux, plusieurs facteurs sont à prendre en compte, notamment la nature et le volume du véhicule utilisé, la méthode de l'anesthésie et le protocole expérimentale (Southam 2002).

1.3.2.2. Protocole expérimental

Comme pour les modèles animaux d'allergie respiratoires et les voies d'administrations de l'allergène, les protocoles expérimentaux utilisés sont très divers. Le nombre de protocoles est presque identique à celui du nombre d'études effectuées. De plus, les études qui utilisent des protocoles complètement identiques sont très rares.

Dans les études des allergies respiratoires, les allergènes peuvent être administrés 2 à 10 fois. De même, le temps est variable, d'une étude à une autre, entre, d'une part, la sensibilisation et

les provocations et, d'autre part, entre la dernière provocation et l'évaluation des paramètres de la réaction allergique.

En fonction de la souche utilisée, les réponses allergiques et inflammatoires peuvent dépendre du nombre de provocations par l'allergène. En effet, chez les souris, l'instillation intratrachéale hebdomadaire avec des particules de diesel pendant 5, 8, 11 et 16 semaines induit des augmentations des taux des cellules alvéolaires dans le LBA et une hypersécrétion de mucus chez les souris IRC et W/W⁻ ; ces augmentations étaient proportionnelles à la durée de traitement (Sagai 1996). Par contre, chez les rats BN sensibilisés par l'ovalbumine, la répétition de la provocation par l'ovalbumine n'induit pas de différences significatives du taux des éosinophiles, lymphocytes et macrophages dans le LBA. Par ailleurs il a été observé que le taux des médiateurs dans les LBA était supérieur chez les rats qui ont été instillés une seule fois. De la même façon, il a été montré que le nombre d'éosinophiles dans les tissus péribronchiques et périvasculaires était plus élevé chez les rats qui ont subi une seule provocation que chez ceux qui ont été provoqués 4 fois. (Tigani 2007)

Dans notre laboratoire, pour étudier l'allergénicité de pollen de Graminées et des GCP, des protocoles presque similaires ont été employés lors des premières études. Les rats étaient sensibilisés et provoqués avec 150 µl de la suspension allergénique, les jours 0 et 21, respectivement. Le nombre de rappel de provocation était différent : 3 pour les rats sensibilisés au pollen et 1 pour les rats sensibilisés au GCP (Motta 2004c, Motta 2004b). Dans une étude complémentaire, s'attachant à l'allergénicité du pollen exposé à différents polluants gazeux tels que l'ozone et les dioxydes de soufre et d'azote, le protocole était restreint à une sensibilisation et une provocation sans aucun rappel (Motta 2004a).

1.4. Références bibliographiques

- Abadie & Prouvost-Danon, 1980. Specific and total IgE responses to antigenic stimuli in Brown-Norway, Lewis and Sprague-Dawley rats. *Immunology*. 39, 561-9.
- Ahlers, Thom, Lambert, Kuckuk & Wiermann, 1999. ¹H NMR analysis of sporopollenin from *Typha Angustifolia*. *Phytochemistry*. 50, 1095-8.
- Al-Humadi, Siegel, Lewis, Barger, Ma, Weissman & Ma, 2002. The effect of diesel exhaust particles (DEP) and carbon black (CB) on thiol changes in pulmonary ovalbumin allergic sensitized Brown Norway rats. *Exp Lung Res*. 28, 333-49.
- Alk-Abello, 2008a. Les allergies croisées. www.alk-abello.com.
- Alk-Abello, 2008b. Les graminées. Document promotionnel.
- Allegra, Blasi, Centanni, Cosentini, Denti, Raccanelli, Tarsia & Valenti, 1994. Acute exacerbations of asthma in adults: role of *Chlamydia pneumoniae* infection. *Eur Respir J*. 7, 2165-2168.
- Andersson & Lidholm, 2003. Characteristics and immunobiology of grass pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 130, 87-107.
- Anto & Sunyer, 1997. Thunderstorms: a risk factor for asthma attacks. *Thorax*. 52, 669-70.
- Arts & Kuper, 2007. Animal models to test respiratory allergy of low molecular weight chemicals: A guidance. *Methods*. 41, 61-71.
- Bacsi, Choudhury, Dharajiya, Sur & Boldogh, 2006. Subpollen particles: Carriers of allergenic proteins and oxidases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 118, 844-850.
- Badorrek, Larbig, Dick, Kock, Hecker, Hofield & Krug, 2008. The role of pollen starch granules in bronchial inflammation. *Allergy*. 63, 65.
- Ball, Folinsbee, Peden & Kehrl, 1996. Allergen bronchoprovocation of patients with mild allergic asthma after ozone exposure. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 98, 563-572.
- Barragan-Meijueiro, Morfin-Maciel & Nava-Ocampo, 2006. A Mexican population-based study on exposure to paracetamol and the risk of wheezing, rhinitis, and eczema in childhood. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 16, 247-52.
- Behrendt & Becker, 2001a. Localization, release and bioavailability of pollen allergens: the influence of environmental factors. *Current Opinion in Immunology*. 13, 709-715.
- Behrendt, Kasche, Ebner Von Eschenbach, Risse, Huss-Marp & Ring, 2001b. Secretion of proinflammatory eicosanoid-like substances precedes allergen release from pollen grains in the initiation of allergic sensitization. *Int Arch Allergy Immunol*. 124, 121-5.
- Behrendt, Tomczok, Sliwa-Tomczok, Kasche, Ebner Von Eschenbach, Becker & Ring, 1999. Timothy grass (*Phleum pratense* L.) pollen as allergen carriers and initiators of an allergic response. *Int Arch Allergy Immunol*. 118, 414-8.
- Bellomo, Gigliotti, Treloar, Holmes, Suphioglu, Singh & Knox, 1992. Two consecutive thunderstorm associated epidemics of asthma in the city of Melbourne. The possible role of rye grass pollen. *Med J Aust*. 156, 834-7.
- Bennich, Ishizaka, Johansson, Rowe, Stanworth & Terry, 1968. Immunoglobulin E: a new class of human immunoglobulin. *Immunology*. 15, 323-4.
- Berger, Taytard & Tunon De Lara, 1996. Cytokines et allergie immédiate : contrôle de la phase tardive. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*. 36, 298-304.
- Bernsen, Jongste & Wouden, 2003. Birth order and sibship size as independent risk factors for asthma, allergy, and eczema. *Pediatric Allergy and Immunology*. 14, 464-469.
- Bessot, 2003. Allergènes végétaux non polliniques Plant derived-allergens (excluding pollen). *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*. 43, 40-52.
- Bessot & Pauli, 2008. Allergènes rares de l'environnement intérieur. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*. 48, 95-101.
- Bice, Seagrave & Green, 2000. Animal models of asthma: potential usefulness for studying health effects of inhaled particles. *Inhal Toxicol*. 12, 829-62.

- Bidat, Chevalier, Croisier, Guérin, Guérin & Scheinmann, 1993. L'apparition de la blatte dans la poussière de maison. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*. 33, 22-29.
- Bock, 2008. Base de données nomenclature de la flore de France. Tela Botanica (www.tela-botanica.org).
- Bodner, Godden & Seaton, 1998. Family size, childhood infections and atopic diseases. The aberdeen whease group. *Thorax*. 53, 28-32.
- Boldogh, Bacsı, Choudhury, Dharajiya, Alam, Hazra, Mitra, Goldblum & Sur, 2005. ROS generated by pollen NADPH oxidase provide a signal that augments antigen-induced allergic airway inflammation. *J Clin Invest*. 115, 2169-79.
- Bonay & Aubier, 2007. Pollution atmosphérique et maladies respiratoires allergiques. *Médecine Sciences*. 23, 187-192.
- Boverhof, Billington, Gollapudi, Hotchkiss, Krieger, Poole, Wiescinski & Woolhiser, 2008. Respiratory sensitization and allergy: Current research approaches and needs. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 226, 1-13.
- Brain, Knudson, Sorokin & Davis, 1976. Pulmonary distribution of particles given by intratracheal instillation or by aerosol inhalation. *Environmental Research*. 11, 13-33.
- Briatico-Vangosa, Braun, Cookman, Hofmann, Kimber, Loveless, Morrow, Pauluhn, Sorensen & Niessen, 1994. Respiratory Allergy: Hazard Identification and Risk Assessment. *Fundamental and Applied Toxicology*. 23, 145-158.
- Broide, 2001. Molecular and cellular mechanisms of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 108, S65-71.
- Brunekreef, Dockery, Speizer, Ware, Spengler & Ferris, 1989. Home dampness and respiratory morbidity in children. *Am Rev Respir Dis*. 140, 1363-7.
- Burrows, Martinez, Halonen, Barbee & Cline, 1989. Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *N Engl J Med*. 320, 271-7.
- Canoy, Luben, Welch, Bingham, Wareham, Day & Khaw, 2004. Fat distribution, body mass index and blood pressure in 22,090 men and women in the Norfolk cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Norfolk) study. *J Hypertens*. 22, 2067-74.
- Castillejos, Gold, Damokosh, Serrano, Allen, McDonnell, Dockery, Ruiz Velasco, Hernandez & Hayes, 1995. Acute effects of ozone on the pulmonary function of exercising schoolchildren from Mexico City. *Am J Respir Crit Care Med*. 152, 1501-7.
- Chan-Yeung & Malo, 1995. Occupational Asthma. *N Engl J Med*. 333, 107-112.
- Choi, Kim & Park, 2007. Allergic Asthma and Rhinitis Caused by Household Rabbit Exposure: Identification of Serum-Specific IgE and Its Allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 119, S103-S103.
- Chunling, Tamura, Matsumoto, Endo, Watari, Arai & Murakami, 2002. Effects of quantity of Japanese cedar pollen, air pollution and urbanization on allergic rhinitis morbidity in Ibaraki prefecture. *Nippon Koshu Eisei Zasshi*. 49, 631-42.
- Clark & Cochrane, 1999. Physical activity and asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 5, 68-75.
- Cohet, Cheng, Macdonald, Baker, Foliaki, Huntington, Douwes & Pearce, 2004. Infections, medication use, and the prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and eczema in childhood. *J Epidemiol Community Health*. 58, 852-857.
- Coleman, 1999. Current animal models are not predictive for clinical asthma. *Pulm Pharmacol Ther*. 12, 87-9.
- Currie, Stewart & McWilliam, 2000. Alveolar macrophages bind and phagocytose allergen-containing pollen starch granules via C-type lectin and integrin receptors: implications for airway inflammatory disease. *J Immunol*. 164, 3878-86.
- D'amato, Cecchi, Bonini, Nunes, Annesi-Maesano, Behrendt, Liccardi, Popov & Van Cauwenberge, 2007. Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy*. 62, 976-90.
- D'amato, Liccardi, D'amato & Holgate, 2005. Environmental risk factors and allergic bronchial asthma. *Clinical & Experimental Allergy*. 35, 1113-1124.
- Dandurand, Wang, Laberge, Martin & Eidelman, 1994. In vitro allergic bronchoconstriction in the brown Norway rat. *Am J Respir Crit Care Med*. 149, 1499-505.

- Davidson, Emberlin, Cook & Venables, 1996. A major outbreak of asthma associated with a thunderstorm: experience of accident and emergency departments and patients' characteristics. Thames regions accident and emergency trainees association. *BMJ*. 312, 601-4.
- De Blay, Lieutier-Colas, Krieger, Casel & Pauli, 2000. Asthme, allergie et polluants de l'habitat (à l'exception du tabac). *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*. 40, 193-215.
- De Blay, Sanchez, Hedelin, Perez-Infante, Vérot, Chapman & Pauli, 1997. Dust and airborne exposure to allergens derived from cockroach (*Blattella germanica*) in low-cost public housing in Strasbourg (France). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 99, 107-112.
- De Marco, Poli, Ferrari, Accordini, Giammanco, Bugiani, Villani, Ponzio, Bono, Carrozzi, Cavallini, Cazzoletti, Dallari, Ginesu, Lauriola, Mandrioli, Perfetti, Pignato, Pirina & Struzzo, 2002. The impact of climate and traffic-related NO₂ on the prevalence of asthma and allergic rhinitis in Italy. *Clinical & Experimental Allergy*. 32, 1405-1412.
- Demoly, Bousquet, Godard & Michel, 1996. Existe-t-il des gènes candidats à l'allergie ? . *Asmanet* (www.asmanet.com). XXème Journée Scientifique.
- Desmedt, Rottiers, Doms, Fiers & Grooten, 1998. Macrophages induce cellular immunity by activating Th1 cell responses and suppressing Th2 cell responses. *J Immunol*. 160, 5300-8.
- Devouassoux, Saxon, Metcalfe, Prussin, Colomb, Brambilla & Diaz-Sanchez, 2002. Chemical constituents of diesel exhaust particles induce IL-4 production and histamine release by human basophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 109, 847-853.
- Dharajiya, Boldogh, Cardenas & Sur, 2008. Role of pollen NAD(P)H oxidase in allergic inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 8, 57-62.
- Diaz-Sanchez, Garcia, Wang, Jyrala & Saxon, 1999. Nasal challenge with diesel exhaust particles can induce sensitization to a neoallergen in the human mucosa. *J Allergy Clin Immunol*. 104, 1183-8.
- Diaz-Sanchez, Penichet-Garcia & Saxon, 2000. Diesel exhaust particles directly induce activated mast cells to degranulate and increase histamine levels and symptom severity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 106, 1140-1146.
- Dockery & Pope, 1994. Acute Respiratory Effects of Particulate Air Pollution. *Annual Review of Public Health*. 15, 107-132.
- Dodge, Carr, Cernadas & Brenner, 2003. IL-6 production by pulmonary dendritic cells impedes Th1 immune responses. *J Immunol*. 170, 4457-64.
- Dong, Yin, Ma, Millecchia, Barger, Roberts, Zhang, Antonini & Ma, 2005a. Exposure of brown Norway rats to diesel exhaust particles prior to ovalbumin (OVA) sensitization elicits IgE adjuvant activity but attenuates OVA-induced airway inflammation. *Toxicol Sci*. 88, 150-60.
- Dong, Yin, Ma, Millecchia, Wu, Barger, Roberts, Antonini, Dey & Ma, 2005b. Effect of diesel exhaust particles on allergic reactions and airway responsiveness in ovalbumin-sensitized brown Norway rats. *Toxicol Sci*. 88, 202-12.
- Dorries & Valberg, 1992. Heterogeneity of phagocytosis for inhaled versus instilled material. *Am Rev Respir Dis*. 146, 831-7.
- Driscoll, Costa, Hatch, Henderson, Oberdorster, Salem & Schlesinger, 2000. Intratracheal Instillation as an Exposure Technique for the Evaluation of Respiratory Tract Toxicity: Uses and Limitations. *Toxicol. Sci*. 55, 24-35.
- Droste, Wieringa, Weyler, Nelen, Vermeire & Van Bever, 2000. Does the use of antibiotics in early childhood increase the risk of asthma and allergic disease? *Clin Exp Allergy*. 30, 1547-53.
- Dubus, Bodiou & Millet, 1999. [Respiratory allergy in children and passive smoking]. *Rev Infirm*. 8-10.
- Eidelman, Bellofiore & Martin, 1988. Late airway responses to antigen challenge in sensitized inbred rats. *Am Rev Respir Dis*. 137, 1033-7.
- Elwood, Lötval, Barnes & Chung, 1991. Characterization of allergen-induced bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation in actively sensitized Brown-Norway rats. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 88, 951-960.

- Enerback, 1997. The differentiation and maturation of inflammatory cells involved in the allergic response: mast cells and basophils. *Allergy*. 52, 4-10.
- Enriquez, Addington, Davis, Freels, Park, Hershow & Persky, 2005. The relationship between vaccine refusal and self-report of atopic disease in children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 115, 737-744.
- Epstein, 2006. Are mouse models of allergic asthma useful for testing novel therapeutics? *Experimental and Toxicologic Pathology*. 57, 41-44.
- Ferreira, Hawranek, Gruber, Wopfner & Mari, 2004. Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic. *Allergy*. 59, 243-67.
- Ferrence & Ashley, 2000. Protecting children from passive smoking. *BMJ*. 321, 310-1.
- Fischer, Grote, Fahlbusch, Muller, Kraft & Valenta, 1996. Characterization of Phl p 4, a major timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen. *J Allergy Clin Immunol*. 98, 189-98.
- Flöistrup, Swartz, Bergström, Alm, Scheynius, Van Hage, Waser, Braun-Fahrländer, Schram-Bijkerk, Huber, Zutavern, Von Mutius, Üblagger, Riedler, Michaels, Pershagen & The, 2006. Allergic disease and sensitization in Steiner school children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 117, 59-66.
- Gencay, Rudiger, Tamm, Soler, Perruchoud & Roth, 2001. Increased Frequency of Chlamydia pneumoniae Antibodies in Patients with Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 163, 1097-1100.
- Gern, 2000. Viral and bacterial infections in the development and progression of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 105, S497-502.
- Gilliland, Berhane, McConnell, Gauderman, Vora, Rappaport, Avol & Peters, 2000. Maternal smoking during pregnancy, environmental tobacco smoke exposure and childhood lung function. *Thorax*. 55, 271-6.
- Goetzl, 2008. Changing paradigms in the immunological science of allergy: 2008. *Curr Allergy Asthma Rep*. 8, 28-31.
- Granum, Gaarder & Løvik, 2001. IgE adjuvant effect caused by particles -- immediate and delayed effects. *Toxicology*. 156, 149-159.
- Grote, Dolecek, Van Ree & Valenta, 1994. Immunogold electron microscopic localization of timothy grass (*Phleum pratense*) pollen major allergens Phl p I and Phl p V after anhydrous fixation in acrolein vapor. *J Histochem Cytochem*. 42, 427-31.
- Grote, Swoboda, Valenta & Reichelt, 2005. Group 13 allergens as environmental and immunological markers for grass pollen allergy: studies by immunogold field emission scanning and transmission electron microscopy. *Int Arch Allergy Immunol*. 136, 303-10.
- Grote, Vrtala, Niederberger, Wiermann, Valenta & Reichelt, 2001. Release of allergen-bearing cytoplasm from hydrated pollen: A mechanism common to a variety of grass (*Poaceae*) species revealed by electron microscopy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 108, 109-115.
- Groux, O'garra, Bigler, Rouleau, Antonenko, De Vries & Roncarolo, 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 389, 737-42.
- Guenounou & David, 2000. Les cytokines dans la physiopathologie et l'exploration de la réponse allergique. *Revue Française des Laboratoires*. 2000, 51-56.
- Guilpain, Guillevin & Mouthon, 2006. Eosinophil granule cationic proteins: eosinophil activation markers. *Rev Med Interne*. 27, 406-8.
- Haby, Marks, Peat & Leeder, 2000. Daycare attendance before the age of two protects against atopy in preschool age children. *Pediatric Pulmonology*. 30, 377-384.
- Haczku, Chung, Sun, Barnes, Kay & Moqbel, 1995a. Airway hyperresponsiveness, elevation of serum-specific IgE and activation of T cells following allergen exposure in sensitized Brown-Norway rats. *Immunology*. 85, 598-603.
- Haczku, Moqbel, Jacobson, Kay, Barnes & Chung, 1995b. T-cells subsets and activation in bronchial mucosa of sensitized Brown-Norway rats after single allergen exposure. *Immunology*. 85, 591-7.
- Hallstrand, Fischer, Wurfel, Afari, Buchwald & Goldberg, 2005. Genetic pleiotropy between asthma and obesity in a community-based sample of twins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 116, 1235-1241.

- Hansen, Berry, Dekruyff & Umetsu, 1999. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J Clin Invest.* 103, 175-83.
- Hansen, McIntire, Yeung, Berry, Thorbecke, Chen, Dekruyff & Umetsu, 2000. CD4(+) T helper cells engineered to produce latent TGF-beta1 reverse allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *J Clin Invest.* 105, 61-70.
- Hatch, Slade, Boykin, Hu, Miller & Gardner, 1981. Correlation of effects of inhaled versus intratracheally injected males on susceptibility to respiratory infection in mice. *Am Rev Respir Dis.* 124, 167-73.
- Heinrich, Topp, Gehring & Thefeld, 2005. Traffic at residential address, respiratory health, and atopy in adults: the National German Health Survey 1998. *Environmental Research.* 98, 240-249.
- Hejl, Wurtzen, Kleine-Tebbe, Johansen, Broge & Ipsen, 2009. *Phleum pratense* alone is sufficient for allergen-specific immunotherapy against allergy to Pooideae grass pollens. *Clinical & Experimental Allergy.* 39, 752-759.
- Henderson & Lowrey, 1983. Effect of anesthetic agents on lavage fluid parameters used as indicators of pulmonary injury. *Lab Anim Sci.* 33, 60-2.
- Herz, Botchkarev, Paus & Renz, 2004. Increased airway responsiveness, allergy-type-I skin responses and systemic anaphylaxis in a humanized-severe combined immuno-deficiency mouse model. *Clin Exp Allergy.* 34, 478-87.
- Heslop-Harrison & Heslop-Harrison, 1982. The growth of the grass pollen tube: 1. Characteristics of the polysaccharide particles ("P-particles") associated with apical growth Protoplasma. 112, 71-80.
- Holgate, Church & Lichtebein (2001) *Allergy*, London.
- Holloway, 1999. The genetic basis of atopic asthma. *Clinical & Experimental Allergy.* 29, 1023-1032.
- Holmes, Macary & Kemeny, 1997. Depletion of CD8+ T cells following primary immunization with ovalbumin results in a high and persistent IgE response. *Int Arch Allergy Immunol.* 113, 160-2.
- Hong, Lee, Soo-Young, Kang-Mo, Jae-Won, Kyu-Earn, Joon-Sung & Ha-Baikfor, 2006. The Korean Isaac Study Group Korean Academy of Pediatric Allergy and Respiratory Disease Seoul Korea: High body mass index and dietary pattern are associated with childhood asthma. *Pediatric Pulmonology.* 41, 1118-1124.
- Host & Halken, 2004. Hypoallergenic formulas--when, to whom and how long: after more than 15 years we know the right indication! *Allergy.* 59 Suppl 78, 45-52.
- Hrabina, 2007. Immunologie moléculaire des allergènes de pollens de graminées. *Expressions.* 26, 8-12.
- Humbert & Garcia, 2004. Éotaxine, chimiokine de premier plan de l'allergie. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique.* 44, 62-64.
- Inserm (2001) *Asthme: Dépistage et prévention chez l'enfant*, Paris.
- Ishizaki, Koizumi, Ikemori, Ishiyama & Kushibiki, 1987. Studies of prevalence of Japanese cedar pollinosis among the residents in a densely cultivated area. *Ann Allergy.* 58, 265-70.
- Iwamoto, Nishino, Magone, Whitcup, Yoshida, Yoshida, Ozaki, Fukushima & Ueno, 2000. Experimental immune-mediated blepharoconjunctivitis in rats induced by immunization with ragweed pollen. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 238, 346-51.
- Jaeger, 2008. Exposure to grass pollen in Europe. *Clinical & Experimental Allergy Reviews.* 8, 2-6.
- Jamet, Botturi, Diquet & Mollimard, 2006. Histamine : le rôle du médiateur. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique.* 46, 474-479.
- Jansen, Rijcken, Schouten, Kraan, Weiss, Timens & Postma, 1999. The Relationship of Skin Test Positivity, High Serum Total IgE Levels, and Peripheral Blood Eosinophilia to Symptomatic and Asymptomatic Airway Hyperresponsiveness. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159, 924-931.
- Jedrychowski, Galas, Whyatt & Perera, 2006. The prenatal use of antibiotics and the development of allergic disease in one year old infants. A preliminary study. *Int J Occup Med Environ Health.* 19, 70-6.
- Jeffery, Wardlaw, Nelson, Collins & Kay, 1989. Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis.* 140, 1745-53.
- Johnston, 1998. Viruses and asthma. *Allergy.* 53, 922-32.

- Karol, Cormier, Donham, Von Essen, Gruber, Lundholm, Richerson & Chan-Yeung, 1994. Animal models. *Am J Ind Med.* 25, 135-8.
- Kimber, Dearman, Penninks, Knippels, Buchanan, Hammerberg, Jackson & Helm, 2003. Assessment of protein allergenicity on the basis of immune reactivity: animal models. *Environ Health Perspect.* 111, 1125-30.
- Kips, Cuvelier & Pauwels, 1992. Effect of acute and chronic antigen inhalation on airway morphology and responsiveness in actively sensitized rats. *Am Rev Respir Dis.* 145, 1306-10.
- Knox, Suphioglu, Taylor, Desai, Watson, Peng & Bursill, 1997. Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution. *Clin Exp Allergy.* 27, 246-51.
- Krämer, Heinrich, Wjst & Wichmann, 1999. Age of entry to day nursery and allergy in later childhood. *The Lancet.* 353, 450-454.
- Kung, Stelts, Zurcher, Jones, Umland, Kreutner, Egan & Chapman, 1995. Mast cells modulate allergic pulmonary eosinophilia in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 12, 404-9.
- Lambrecht, Carro-Muino, Vermaelen & Pauwels, 1999. Allergen-induced changes in bone-marrow progenitor and airway dendritic cells in sensitized rats. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 20, 1165-74.
- Laprise & Boulet, 1997. Asymptomatic Airway Hyperresponsiveness: A Three-year Follow-up. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156, 403-409.
- Larsen, 1981. A three-year-survey of microfungi in the air of Copenhagen 1977-79. *Allergy.* 36, 15-22.
- Larsen & Lowenstein, 1996. Allergen nomenclature. *J Allergy Clin Immunol.* 97, 577-8.
- Leduc-Brodard, Inacio, Jaquinod, Forest, David & Peltre, 1996. Characterization of Dac g 4, a major basic allergen from *Dactylis glomerata* pollen. *J Allergy Clin Immunol.* 98, 1065-72.
- Leduc, Laval, Ledent & Mairesse, 2008. Allergie respiratoire aux protéines de feuilles, implication d'un nouvel allergène. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique.* 48, 521-525.
- Leong, Coombs, Sabaitis, Rop & Aaron, 1998. Quantitative morphometric analysis of pulmonary deposition of aerosol particles inhaled via intratracheal nebulization, intratracheal instillation or nose-only inhalation in rats. *J Appl Toxicol.* 18, 149-60.
- Li, Gauderman, Avol, Dubeau & Gilliland, 2006. Associations of Tumor Necrosis Factor G-308A with Childhood Asthma and Wheezing. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173, 970-976.
- Li, Gilliland, Berhane, McConnell, James Gauderman, Rappaport & Peters, 2000. Effects of In Utero and Environmental Tobacco Smoke Exposure on Lung Function in Boys and Girls with and without Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162, 2097-2104.
- Lièvre, Aparicio, Lellemand, Kosmowski & Leduc, 2009. Le pollen de fléole (*Phleum pratense* L.) est-il représentatif de l'ensemble des pollens de graminées? *Revue Française d'Allergologie.* 49, 333.
- Los, Postmus & Boomsma, 2001. Asthma Genetics and Intermediate Phenotypes: A Review From Twin Studies. *Twin Research.* 4, 81-93.
- Louis, Lau, Bron, Roldaan, Radermecker & Djukanovic, 2000. The relationship between airways inflammation and asthma severity. *Am J Respir Crit Care Med.* 161, 9-16.
- Marknell Dewitt, Niederberger, Lehtonen, Spitzauer, Sperr, Valent, Valenta & Lidholm, 2002. Molecular and immunological characterization of a novel timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen, Phl p 11. *Clin Exp Allergy.* 32, 1329-40.
- Marks, Colquhoun, Girgis, Koski, Treloar, Hansen, Downs & Car, 2001. Thunderstorm outflows preceding epidemics of asthma during spring and summer. *Thorax.* 56, 468-471.
- Martin, Cicutto, Smith, Ballard & Szefer, 1991. Airways inflammation in nocturnal asthma. *Am Rev Respir Dis.* 143, 351-7.
- Matricardi, Rosmini, Riondino, Fortini, Ferrigno, Rapicetta & Bonini, 2000. Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. *BMJ.* 320, 412-417.
- Matsumoto, Hiramatsu, Li, Azuma, Kudoh, Takizawa & Sugawara, 2006. Repeated exposure to low-dose diesel exhaust after allergen challenge exaggerates asthmatic responses in mice. *Clinical Immunology.* 121, 227-235.

- McConnell, Berhane, Gilliland, London, Islam, Gauderman, Avol, Margolis & Peters, 2002. Asthma in exercising children exposed to ozone: a cohort study. *The Lancet*. 359, 386-391.
- Mecheri, Peltre & David, 1985. Purification and characterization of a major allergen from *Dactylis glomerata* pollen: the Ag Dg1. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 78, 283-9.
- Meuter-Gerhards, Riegart & Wiermann, 1999. Studies on sporopollenin biosynthesis in *Curcubita maxima* (DUCH)-II: the involvement of aliphatic metabolism. *J. Plant Physiol*. 154, 431-6.
- Misawa & Chiba, 1993. Repeated antigenic challenge-induced airway hyperresponsiveness and airway inflammation in actively sensitized rats. *Jpn J Pharmacol*. 61, 41-50.
- Miyamoto, Miyake & Yamamura, 2001. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature*. 413, 531-4.
- Molina (1997) *L'allergie À L'aube Du Troisième Millénaire*, Medecine Sciences Selection.
- Moscato, Lodigiani, Biale, Dellabianca, Vinci, Pisati & Marraccini, 1991. 734 Allergy to cockroaches is not an important factor in asthma and rhinitis in Northern Italy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 87, 323-323.
- Mosmann & Coffman, 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 7, 145-73.
- Motta (2004a) Effets de polluants atmosphériques gazeux sur l'allergénicité du pollen de *Phleum pratense* et sur la réponse allergique respiratoire. Paris, Université Paris VII.
- Motta, Dormans, Peltre, Lacroix, Bois, Steerenberg, Motta, Withagen & Bois, 2004b. Intratracheal instillation of cytoplasmic granules from *Phleum pratense* pollen induces IgE- and cell-mediated responses in the Brown Norway rat
- Phleum pratense* pollen starch granules induce humoral and cell-mediated immune responses in a rat model of allergy. *Int Arch Allergy Immunol*. 135, 24-9.
- Motta, Marliere, Peltre, Sterenberg & Lacroix, 2006. Traffic-related air pollutants induce the release of allergen-containing cytoplasmic granules from grass pollen. *Int Arch Allergy Immunol*. 139, 294-8.
- Motta, Peltre, Dormans, Withagen, Lacroix, Bois & Steerenberg, 2004c. *Phleum pratense* pollen starch granules induce humoral and cell-mediated immune responses in a rat model of allergy. *Clin Exp Allergy*. 34, 310-4.
- Nabe, Mizutani, Shimizu, Takenaka & Kohno, 1998. Development of pollen-induced allergic rhinitis with early and late phase nasal blockage in guinea pigs. *Inflamm Res*. 47, 369-74.
- Nabe, Shimizu, Mizutani, Saeki, Yamamura, Takenaka & Kohno, 1997. A new model of experimental allergic rhinitis using Japanese cedar pollen in guinea pigs. *Jpn J Pharmacol*. 75, 243-51.
- Nafstad, Kongerud, Botten, Hagen & Jaakkola, 1997. The role of passive smoking in the development of bronchial obstruction during the first 2 years of life. *Epidemiology*. 8, 293-7.
- Newson, Strachan, Archibald, Emberlin, Hardaker & Collier, 1997. Effect of thunderstorms and airborne grass pollen on the incidence of acute asthma in England, 1990-94. *Thorax*. 52, 680-5.
- Niederberger, Laffer, Froschl, Kraft, Rumpold, Kapiotis, Valenta & Spitzauer, 1998. IgE antibodies to recombinant pollen allergens (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, and Bet v 2) account for a high percentage of grass pollen-specific IgE. *J Allergy Clin Immunol*. 101, 258-64.
- Nilsen, Hagemann & Eide, 1997. The adjuvant activity of diesel exhaust particles and carbon black on systemic IgE production to ovalbumin in mice after intranasal instillation. *Toxicology*. 124, 225-232.
- Novak, Kraft & Bieber, 2001. IgE receptors. *Curr Opin Immunol*. 13, 721-6.
- Nystad, 2000. Daycare attendance, asthma and atopy. *Ann Med*. 32, 390-6.
- Nystad, Meyer, Nafstad, Tverdal & Engeland, 2004. Body Mass Index in Relation to Adult Asthma among 135,000 Norwegian Men and Women. *Am. J. Epidemiol*. 160, 969-976.
- Oh, Seroogy, Meyer, Akbari, Berry, Fathman, Dekruyff & Umetsu, 2002. CD4 T-helper cells engineered to produce IL-10 prevent allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 110, 460-8.

- Osier, Baggs & Oberdorster, 1997. Intratracheal instillation versus intratracheal inhalation: influence of cytokines on inflammatory response. *Environ Health Perspect.* 105 Suppl 5, 1265-71.
- Pauluhn & Mohr, 2005. Experimental approaches to evaluate respiratory allergy in animal models. *Exp Toxicol Pathol.* 56, 203-34.
- Pearce, Pekkanen & Beasley, 1999. How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax.* 54, 268-72.
- Peltre, Cerceau-Larrival, Hideux, Abadie & David, 1987. Scanning and Transmission electron microscopy related to immunochemical analysis of grass pollen. *Grana.* 26, 158-70.
- Phelps, 2007. Ragweed subpollen particles reach deep into lungs. *Environ Health Perspect.* 115, A193.
- Piccini, Mecacci & Sampognaro, 1993. Aeroallergen sensitization can occur during fetal life. *Int Arch Allergy Immunol.* 102, 301-303.
- Platts-Mills, Erwin, Allison, Blumenthal, Barr, Sredl, Burge & Gold, 2003. The relevance of maternal immune responses to inhalant allergens to maternal symptoms, passive transfer to the infant, and development of antibodies in the first 2 years of life. *The Journal of allergy and clinical immunology.* 111, 123-130.
- Ponvert, 1997. Les cytokines. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique.* 37, 36-55.
- Postma, Bleecker, Amelung, Holroyd, Xu, Panhuysen, Meyers & Levitt, 1995. Genetic Susceptibility to Asthma - Bronchial Hyperresponsiveness Coinherited with a Major Gene for Atopy. *N Engl J Med.* 333, 894-900.
- Poynter, Persinger, Irvin, Butnor, Van Hirtum, Blay, Heintz, Robbins, Hemenway, Taatjes & Janssen-Heininger, 2006. Nitrogen dioxide enhances allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in the mouse. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 290, L144-152.
- Prin, 1996. Mastocytes, basophiles, éosinophiles Analyse des marqueurs biologiques. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique.* 36, 889-896.
- Pritchard, Holmes, Evans, Evans, Evans & Morgan, 1985. The distribution of dust in the rat lung following administration by inhalation and by single intratracheal instillation. *Environ Res.* 36, 268-97.
- Prussin & Metcalfe, 2006. 5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 117, S450-6.
- Rancé, Navarro-Rouimi & Dutau (2007) *Les allergies polliniques*, Paris.
- Randolph, Carruthers, Szabo, Murphy & Chaplin, 1999. Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergen-specific Th1 and Th2 cells in a mouse model of asthma. *J Immunol.* 162, 2375-83.
- Renzi, Al Assaad, Yang, Yasruel & Hamid, 1996. Cytokine expression in the presence or absence of late airway responses after antigen challenge of sensitized rats. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 15, 367-73.
- Renzi, Olivenstein & Martin, 1993. Inflammatory cell populations in the airways and parenchyma after antigen challenge in the rat. *Am Rev Respir Dis.* 147, 967-74.
- Revillard (1994) *Immunologie*, Bruxelles.
- Riedl & Diaz-Sanchez, 2005. Biology of diesel exhaust effects on respiratory function. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 115, 221-228.
- Riedler, 2000. Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization. *Clinical & Experimental Allergy.* 30, 194-200.
- Ring, Krämer, Schäfer & Behrendt, 2001. Why are allergies increasing? *Current Opinion in Immunology.* 13, 701-708.
- Ritz, Evans, Bruce, Fletcher, Fisher & Sarlo, 1993. Respiratory and Immunological Responses of Guinea Pigs to Enzyme-Containing Detergents: A Comparison of Intratracheal and Inhalation Modes of Exposure. *Fundamental and Applied Toxicology.* 21, 31-37.
- Rogerieux, Godfrin, Senechal, Motta, Marliere, Peltre & Lacroix, 2007. Modifications of Phleum pratense grass pollen allergens following artificial exposure to gaseous air pollutants (O₃, NO₂, SO₂). *Int Arch Allergy Immunol.* 143, 127-34.
- Rogerieux, Robidel, Abou Chackra & Lacroix, 2008. Effect of repeated intratracheal instillation of TiO₂ and carbon black nanoparticles on the allergic reaction in grass pollen-sensitized rats. *Allergy.* 63, 620.
- Rossi, Monasterolo & Monasterolo, 2001. Measurement of IgE antibodies against purified grass-pollen allergens (Phl p 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, and 12) in sera of patients allergic to grass pollen. *Allergy.* 56, 1180-5.

- Rylander, Fogelmark, McWilliam & Currie, 1999. (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucan may contribute to pollen sensitivity. *Clin Exp Immunol.* 115, 383-4.
- Sabaitis, Leong, Rop & Aaron, 1999. Validation of intratracheal instillation as an alternative for aerosol inhalation toxicity testing. *J Appl Toxicol.* 19, 133-40.
- Sagai, Furuyama & Ichinose, 1996. Biological effects of diesel exhaust particles (DEP). III. Pathogenesis of asthma like symptoms in mice. *Free Radical Biology and Medicine.* 21, 199-209.
- Sakaguchi, Sakaguchi, Asano, Itoh & Toda, 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 155, 1151-64.
- Sarlo, Fletcher, Gaines & Ritz, 1997a. Respiratory allergenicity of detergent enzymes in the guinea pig intratracheal test: association with sensitization of occupationally exposed individuals. *Fundam Appl Toxicol.* 39, 44-52.
- Sarlo, Ritz, Fletcher, Schrotel & Clark, 1997b. Proteolytic detergent enzymes enhance the allergic antibody responses of guinea pigs to nonproteolytic detergent enzymes in a mixture: implications for occupational exposure. *J Allergy Clin Immunol.* 100, 480-7.
- Schappi, Taylor, Staff, Rolland & Suphioglu, 1999. Immunologic significance of respirable atmospheric starch granules containing major birch allergen Bet v 1. *Allergy.* 54, 478-83.
- Schneider, Van Velzen, Moqbel & Issekutz, 1997. Kinetics and Quantitation of Eosinophil and Neutrophil Recruitment to Allergic Lung Inflammation in a Brown Norway Rat Model. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 17, 702-712.
- Sears, Burrows, Flannery, Herbison & Holdaway, 1993. Atopy in childhood. I. Gender and allergen related risks for development of hay fever and asthma. *Clin Exp Allergy.* 23, 941-8.
- Shaheen, Newson, Henderson, Headley, Stratton, Jones & Strachan, 2005. Prenatal paracetamol exposure and risk of asthma and elevated immunoglobulin E in childhood. *Clinical & Experimental Allergy.* 35, 18-25.
- Shaheen, Newson, Sherriff, Henderson, Heron, Burney & Golding, 2002. Paracetamol use in pregnancy and wheezing in early childhood. *Thorax.* 57, 958-63.
- Sin, Spier, Svenson, Schopflocher, Senthilselvan, Cowie & Man, 2004. The Relationship Between Birth Weight and Childhood Asthma: A Population-Based Cohort Study. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 158, 60-64.
- Singh, Hough, Theerakulpisut, Avjioglu, Davies, Smith, Taylor, Simpson, Ward, McCluskey & Et Al., 1991. Isolation of cDNA encoding a newly identified major allergenic protein of rye-grass pollen: intracellular targeting to the amyloplast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88, 1384-8.
- Siroux, Pin, Orszczyn, Le Moual & Kauffmann, 2000. Relationships of active smoking to asthma and asthma severity in the EGEA study. *Epidemiological study on the Genetics and Environment of Asthma. Eur Respir J.* 15, 470-477.
- Smith, Larsen, Cherniack, Wenzel, Voelkel, Westcott & Bethel, 1992. Inflammatory cells and eicosanoid mediators in subjects with late asthmatic responses and increases in airway responsiveness. *J Allergy Clin Immunol.* 89, 1076-84.
- Solomon, 2002. Airborne pollen: A brief life. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 109, 895-900.
- Southam, Dolovich, O'byrne & Inman, 2002. Distribution of intranasal instillations in mice: effects of volume, time, body position, and anesthesia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 282, L833-839.
- Stazi, Sampogna, Montagano, Grandolfo, Couilliot & Annesi-Maesano, 2002. Early life factors related to clinical manifestations of atopic disease but not to skin-prick test positivity in young children. *Pediatric Allergy and Immunology.* 13, 105-112.
- Steenberg, Dormans, Van Doorn, Middendorp, Vos & Van Loveren, 1999. A pollen model in the rat for testing adjuvant activity of air pollution components. *Inhal Toxicol.* 11, 1109-22.
- Steenberg, Withagen, Dormans, Van Dalen, Van Loveren & Casee, 2003. Adjuvant activity of various diesel exhaust and ambient particles in two allergic models. *J Toxicol Environ Health A.* 66, 1421-39.
- Strachan, 1989. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ.* 299, 1259-60.

- Suck, Hagen, Cromwell & Fiebig, 2000. The high molecular mass allergen fraction of timothy grass pollen (Phleum pratense) between 50-60 kDa is comprised of two major allergens: Phl p 4 and Phl p 13. Clin Exp Allergy. 30, 1395-402.
- Suphioglu, 1998. Thunderstorm asthma due to grass pollen. Int Arch Allergy Immunol. 116, 253-60.
- Suphioglu, Singh, Taylor, Bellomo, Holmes, Puy & Knox, 1992. Mechanism of grass-pollen-induced asthma. Lancet. 339, 569-72.
- Swoboda, Grote, Verdino, Keller, Singh, De Weerd, Sperr, Valent, Balic, Reichelt, Suck, Fiebig, Valenta & Spitzauer, 2004. Molecular characterization of polygalacturonases as grass pollen-specific marker allergens: expulsion from pollen via submicronic respirable particles. J Immunol. 172, 6490-500.
- Szelenyi, 2000. Animal models of bronchial asthma. Inflamm Res. 49, 639-54.
- Tang, Inman, Van Rooijen, Yang, Shen, Matsumoto & O'byrne, 2001. Th type 1-stimulating activity of lung macrophages inhibits Th2-mediated allergic airway inflammation by an IFN-gamma-dependent mechanism. J Immunol. 1666, 1471-81.
- Taylor, Flagan, Valenta & Glovsky, 2002. Release of allergens as respirable aerosols: A link between grass pollen and asthma. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 109, 51-56.
- Taylor, Jacobson, House & Glovsky, 2007. Links between pollen, atopy and the asthma epidemic. Int Arch Allergy Immunol. 144, 162-70.
- Taylor, Staff, Singh & Knox, 1994. Localization of the two major allergens in rye-grass pollen using specific monoclonal antibodies and quantitative analysis of immunogold labelling. Histochem J. 26, 392-401.
- Teichtahl, Buckmaster & Pertnikovs, 1997. The Incidence of Respiratory Tract Infection in Adults Requiring Hospitalization for Asthma. Chest. 112, 591-596.
- Teixeira, Williams & Hellewell, 1995. Mechanisms and pharmacological manipulation of eosinophil accumulation in vivo. Trends Pharmacol Sci. 16, 418-23.
- Terabe, Matsui, Noben-Trauth, Chen, Watson, Donaldson, Carbone, Paul & Berzofsky, 2000. NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. Nat Immunol. 1, 515-20.
- Teran, Carroll, Frew, Montefort, Lau, Davies, Lindley, Howarth, Church & Holgate, 1995. Neutrophil influx and interleukin-8 release after segmental allergen or saline challenge in asthmatics. Int Arch Allergy Immunol. 107, 374-5.
- Thibaudon, Dulmont & Navarro-Rouimi (2003) *Pneumallergènes polliniques*.
- Thomé, 1885. Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. www.biolib.de.
- Tigani, Cannet, Karmouty-Quintana, Ble, Zurbrugg, Schaeublin, Fozard & Beckmann, 2007. Lung inflammation and vascular remodeling after repeated allergen challenge detected noninvasively by MRI. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 292, L644-653.
- Torres, Picado & De Mora, 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 Bronconeumol. 41, 141-52.
- Traidl-Hoffmann, Kasche, Jakob, Huger, Plotz, Feussner, Ring & Behrendt, 2002. Lipid mediators from pollen act as chemoattractants and activators of polymorphonuclear granulocytes. J Allergy Clin Immunol. 109, 831-8.
- Tsai, Chien, Chen, Shieh & Lin, 2005. Induced apoptosis of TH₂ lymphocytes in asthmatic children treated with *Dermatophagoides pteronyssinus* immunotherapy. Pediatric Allergy and Immunology. 16, 602-608.
- Tsipopoulos, Akoum & Tonnel, 1997. Cytokines et chimiokines au cours de la désensibilisation. Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique. 37, 1078-1082.
- Tunon-De-Lara, Raheison & Berger, 2003. [Anti-IgE and future treatments for respiratory allergies]. Rev Pneumol Clin. 59, 114-20.
- Turner, Myron, Powell & Martin, 1996. The role of endogenous corticosterone in the late-phase response to allergen challenge in the brown Norway rat. Am J Respir Crit Care Med. 153, 545-50.

- Umetsu, Akbari & Dekruyff, 2003. Regulatory T cells control the development of allergic disease and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 112, 480-7; quiz 488.
- Umetsu, Jabara, Dekruyff, Abbas, Abrams & Geha, 1988. Functional heterogeneity among human inducer T cell clones. *J Immunol.* 140, 4211-6.
- Uyama, Ihaku, Kitada, Miyasaka & Sugita, 1995. Role of eosinophils and cell adhesion molecules in the allergen-induced asthmatic response of rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 90, 3-15.
- Vagaggini, Carnevali, Macchioni, Taccola, Fornai, Bacci, Bartoli, Cianchetti, Dente, Di Franco, Giannini & Paggiaro, 1999. Airway inflammatory response to ozone in subjects with different asthma severity. *Eur Respir J.* 13, 274-280.
- Vagaggini, Taccola, Cianchetti, Carnevali, Bartoli, Bacci, Dente, Di Franco, Giannini & Paggiaro, 2002. Ozone exposure increases eosinophilic airway response induced by previous allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med.* 166, 1073-7.
- Valenta, 2002. The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. *Nat Rev Immunol.* 2, 446-53.
- Valenta & Kraft, 2001. Recombinant allergen molecules: tools to study effector cell activation. *Immunol Rev.* 179, 119-27.
- Valenta, Lidholm, Niederberger, Hayek, Kraft & Gronlund, 1999. The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin Exp Allergy.* 29, 896-904.
- Van Ree, Van Leeuwen & Aalberse, 1998. How far can we simplify in vitro diagnostics for grass pollen allergy?: A study with 17 whole pollen extracts and purified natural and recombinant major allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 102, 184-90.
- Venables, Allitt, Collier, Emberlin, Greig, Hardaker, Highham, Laing-Morton, Maynard, Murray, Strachan & Tee, 1997. Thunderstorm-related asthma--the epidemic of 24/25 June 1994. *Clin Exp Allergy.* 27, 725-36.
- Vercelli, 2008. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat Rev Immunol.* 8, 169-182.
- Vermaelen & Pauwels, 2003. Accelerated airway dendritic cell maturation, trafficking, and elimination in a mouse model of asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 29, 405-9.
- Vinckier & Smets, 2001. The potential role of orbicules as a vector of allergens. *Allergy.* 56, 1129-36.
- Von Mutius, Martinez, Fritsch, Nicolai, Roell & Thiemann, 1994. Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *Am J Respir Crit Care Med.* 149, 358-64.
- Vrtala, Fischer, Grote, Vangelista, Pastore, Sperr, Valent, Reichelt, Kraft & Valenta, 1999. Molecular, Immunological, and Structural Characterization of Phl p 6, a Major Allergen and P-Particle-Associated Protein from Timothy Grass (*Phleum pratense*) Pollen. *J Immunol.* 163, 5489-5496.
- Walker, Kaegi, Braun & Blaser, 1991. Activated T cells and eosinophilia in bronchoalveolar lavages from subjects with asthma correlated with disease severity. *J Allergy Clin Immunol.* 88, 935-42.
- Ward & Selgrade, 2007. Animal models for protein respiratory sensitizers. *Methods.* 41, 80-90.
- Wardlaw, 1994. Eosinophils in the 1990s: new perspectives on their role in health and disease. *Postgrad Med J.* 70, 536-52.
- Warner & Kroegel, 1994. Pulmonary immune cells in health and disease: mast cells and basophils. *Eur Respir J.* 7, 1326-41.
- Waserman, Olivenstein, Renzi, Xu & Martin, 1992. The relationship between late asthmatic responses and antigen-specific immunoglobulin. *J Allergy Clin Immunol.* 90, 661-9.
- Wayne, Foster, Connolly, Bazzaz & Epstein, 2002. Production of allergenic pollen by ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) is increased in CO₂-enriched atmospheres. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 88, 279-82.
- Weiland, Von Mutius, Hirsch, Duhme, Fritsch, Werner, Husing, Stender, Renz, Leupold & Keil, 1999. Prevalence of respiratory and atopic disorders among children in the East and West of Germany five years after unification. *Eur Respir J.* 14, 862-870.
- Who, 2002. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. National Heart Lung and Blood institute/World Health Organisation.

- Wickens, Crane, Kemp, Lewis, D'souza, Sawyer, Stone, Tohill, Kennedy, Slater & Pearce, 1999. Family size, infections, and asthma prevalence in New Zealand children. *Epidemiology*. 10, 699-705.
- Wiesch, Meyers & Bleecker, 1999. Genetics of asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 104, 895-901.
- Wills-Karp, 1999. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol*. 17, 255-81.
- Wilson, Kent, Patton, Orban, Jackson, Exley, Porcelli, Schatz, Atkinson, Balk, Strominger & Da., 1998. Extreme Th1 bias of invariant V α 24J α Q T cells in type 1 diabetes. *Nature*. 391, 177-81.
- Winterton, Kaufman, Keener, Quigley, Farin, Williams & Koenig, 2001. Genetic polymorphisms as biomarkers of sensitivity to inhaled sulfur dioxide in subjects with asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 86, 232-8.
- Wright, Hockey, Enhorning, Strong, Reid, Holgate, Djukanovic & Postle, 2000. Altered airway surfactant phospholipid composition and reduced lung function in asthma. *J Appl Physiol*. 89, 1283-92.
- www.allergome.org.
- www.floralimages.co.uk.
- www.pollens.fr.
- Yssel, Abbal, Pene & Bousquet, 1998. The role of IgE in asthma. *Clin Exp Allergy*. 28 Suppl 5, 104-9; discussion 117-8.
- Zosky & Sly, 2007. Animal models of asthma. *Clin Exp Allergy*. 37, 973-88.

Chapitre 2



Étude épidémiologique

2.1. Introduction

Depuis plusieurs décennies, une augmentation de la fréquence des allergies respiratoires - asthme et rhinites - est observée dans les pays développés, en particulier chez les sujets jeunes et les habitants des grandes villes. Toutefois, bien que les symptômes liés à ces affections coïncident le plus souvent avec les périodes de pollinisation, il est maintenant bien établi qu'il n'existe pas de relation simple et directe entre ces deux phénomènes et que de nombreux autres facteurs doivent être pris en compte.

En contact avec l'eau de pluie ou des polluants atmosphériques, le pollen peut libérer des microparticules (de diamètre inférieur à 5 µm) dites granules cytoplasmiques de pollen ou GCP. À cause de leur taille, les GCP peuvent pénétrer plus profondément dans l'appareil respiratoire que le grain de pollen entier et induire ainsi, ensuite, des réactions allergiques, avant tout de type asthmatiforme. De fait, les GCP sont maintenant mis en cause régulièrement dans la survenue d'épisodes d'asthme associés aux orages.

Bien que quelques travaux aient noté l'existence des GCP dans l'atmosphère, une observation épidémiologique concernant les GCP n'est pas encore disponible.

Un effet réel des GCP dans la survenue des allergies respiratoires nécessite une étude épidémiologique dans laquelle, d'une part, les concentrations de ces particules sont disponibles et, d'autre part, les admissions hospitalières et les consultations pour allergies respiratoires, notamment l'asthme et les rhinites allergiques, sont connues.

Jusqu'à ce jour, la quantification des GCP nécessite un prélèvement et une détection de ces particules. L'appareillage pour ce type de quantification est sophistiqué et coûteux. Mais, pour un travail en routine, une méthode simple et rapide paraît la plus appropriée.

Le prélèvement des particules nécessite des capteurs de particules en suspension dans l'air ambiant, utilisés par des réseaux de surveillance de la qualité de l'air. Un capteur de PM₁₀, du type Partisol (Rupprecht & Patashnick ; débit de 16,7 L/min - filtre de 47 mm) a été mis à notre disposition par l'unité AIRE de l'INERIS.

Une détection des particules peut être basée sur un dosage colorimétrique couplé à une détection immunochimique en utilisant, par exemple, des anticorps monoclonaux de lapins dirigés contre des allergènes majeurs des Graminées, tels que les Phl p 1 et Phl p 5.

Les GCP contenant des granules d'amidon ou « starch granules », on peut obtenir, lors de l'ajout d'une solution d'iodure de potassium iodée ou de lugol, une coloration en bleu. Nous avons pu observer, à l'œil nu, pour les solutions d'amidon pur et des suspensions de granules cytoplasmiques de pollen de *Phleum pratense*, ce type de coloration bleue. Mais les lectures de densité optique n'ont pas été positives même pour la solution pure. Malgré une mise au point des différents paramètres du densitomètre, les résultats sont restés négatifs (cf. annexe 1).

Au vu des résultats négatifs obtenus et de la nécessité d'une étude épidémiologique pour établir un effet éventuel des GCP dans la survenue de l'asthme, nous avons décidé de modifier l'objectif initial de cette partie pour nous attacher plus directement à corréler différents paramètres atmosphériques avec des compte rendus de consultations pour allergies respiratoires.

L'étude a été menée sur la ville d'Amiens pendant la saison pollinique de 2007 (avril – septembre 2007). Les données cliniques - relatives aux rhinites, conjonctivites, toux spasmodiques et à l'asthme - ont été fournies par un réseau de généralistes et de spécialistes en collaboration avec l'observatoire régional de la santé et du social (OR2S). Le comptage des pollen d'arbres (bouleau, frêne et platane), de Graminées et d'autres taxons polliniques a été effectué par le réseau national de surveillance aérobiologique (RNSA). Les concentrations des polluants atmosphériques gazeux (NO_x , SO_2 , O_3 et CO) et particulaires (PM_{10}) ont été mesurées par le réseau de surveillance de la qualité de l'air en Picardie (ATMO-Picardie). Plusieurs facteurs météorologiques, tels que les précipitations, la température et l'humidité relative, ont été fournis par Météo-France. Les corrélations entre ces différents paramètres sont effectuées en utilisant des modèles de régression linéaire simple et multiple.

Ce travail, en collaboration avec le Dr. Michel Thibaudon (RNSA), a été synthétisé sous la forme d'un article intitulé : « Synergie pollen – polluants et rôle des facteurs météorologiques sur le risque de pollinose: Évolution des consultations dans la région amiénoise pendant la saison pollinique 2007 ».

2.2. ARTICLE 1

Synergie pollen – polluants et rôle des facteurs météorologiques sur le risque de pollinose: Évolution des consultations dans la région amiénoise pendant la saison pollinique 2007.

Revue Française d'Allergologie
et d'Immunologie Clinique

Oussama R. ABOU CHAKRA, Michel Thibaudon

Résumé

Introduction : Depuis plusieurs décennies, une augmentation de la fréquence des allergies respiratoires est observée dans les pays développés. Bien que ces affections coïncident avec les périodes de pollinisation, il n'existe pas de relation simple et directe entre ces deux phénomènes. De nombreux autres facteurs, tels que les polluants atmosphériques et les facteurs météorologiques, doivent être pris en compte.

Objectifs : Etudier la relation entre des paramètres atmosphériques et le nombre de consultations médicales faisant suite à des crises allergiques, pendant une partie de la période pollinique 2007.

Méthodes : L'étude est menée sur la ville d'Amiens. Les données cliniques sont fournies par l'Observatoire Régional de la Santé et du Social. Les données atmosphériques concernent des comptages polliniques, des taux de polluants atmosphériques et différents paramètres météorologiques. Les corrélations entre ces différents paramètres sont effectuées en utilisant des modèles de régression linéaire simple et multiple.

Résultats : Les consultations pour rhinites sont corrélées positivement avec le pollen des Graminées et le taux d'ozone atmosphérique alors que l'asthme se trouve corrélé avec les précipitations. Les résultats des régressions linéaires multiples permettent de montrer que deux symptômes allergiques, rhinites et asthme, sont liés à plusieurs facteurs atmosphériques, plus particulièrement, les polluants gazeux, la température, et le pollen des Graminées.

Conclusions : Une partie importante des pics de consultations pour allergie respiratoire semble coïncider avec les pics de pollinisation. Ainsi, une relation simple a été trouvée entre la rhinite et le pollen de Graminées sur la période prise en compte. En revanche, les granules cytoplasmiques de pollen paraissent intervenir dans la survenue de crises d'asthme sans relation directe avec les pics.

Mots clés : Allergie respiratoire ; Pollen ; Polluants atmosphériques ; Facteurs météorologiques ; Régression linéaire simple et multiple.

Introduction

Les allergies respiratoires, au sens large, incluant donc aussi bien l'asthme que la rhinite allergique, sont classées par l'Organisation Mondiale de la Santé, parmi les problèmes majeurs de santé publique en zone urbaine. En effet, depuis plus de quatre décennies, une augmentation constante de la fréquence des allergies respiratoires est observée [1]. Sont concernés essentiellement les sujets jeunes, de l'enfance jusqu'à 20-30 ans [2] et les habitants des grandes villes des pays développés [3, 4].

Ces maladies atopiques sont déclenchées par divers aéroallergènes, qui, quantitativement, représentent la source allergénique la plus importante en atmosphère urbaine [5, 6]. Si tous les pollen ne sont pas allergisants, certains sont reconnus depuis longtemps pour leur rôle potentiel dans les affections regroupées sous le terme de « pollinoses », aussi bien parmi les arbres (bouleau, cyprès et frêne, par exemple) que parmi les herbacées (ambroisie et Graminées figurant souvent en tête). Les pollinoses provoquent des symptômes peu invalidants comme des rhinites, conjonctivites, toux, mais aussi des complications bronchiques comme l'asthme.

Toutefois, bien que les symptômes liés à ces affections coïncident avec les périodes de pollinisation, il est maintenant bien établi qu'il n'existe pas de relation simple et directe entre ces deux phénomènes et que de nombreux autres facteurs doivent être pris en compte [7].

Parmi ceux-ci, les polluants atmosphériques semblent jouer un rôle aggravant dans l'incidence des allergies et de la sensibilisation des populations [8-11]. Ainsi, de nombreuses études épidémiologiques ont établi un lien entre le nombre de visites aux urgences pour asthme et les niveaux de certains polluants atmosphériques, notamment les dérivés soufrés [12]. En Angleterre, la sensibilisation d'enfants à divers allergènes (issus d'acariens ou de pollen) apparaît plus importante en zone polluée qu'en zone non polluée [13]. Enfin, des études épidémiologiques réalisées au Japon, ont montré que, pour une quantité similaire de pollen dans l'air, des riverains de voies à grande circulation bordées de cèdres développaient plus de rhino-conjonctivites que des personnes vivant près de forêts de cèdres où le trafic automobile est moins intense (13,2% contre 5,1%) [14]. Ces études suggèrent que la pollution automobile est responsable de l'augmentation de la fréquence des rhino-conjonctivites.

De même, les symptômes d'allergie respiratoire, en particulier de pollinose, sont influencés aussi par les conditions climatiques : une recrudescence par beau temps, surtout après la

survenue de pluie, et une diminution pendant les périodes pluvieuses. L'augmentation du degré hygrométrique a été associée aux augmentations de prévalence de l'asthme, mais cela n'a pas été observé pour les rhinites et de conjonctivites. De plus, différents types d'orages semblent directement liés à des épidémies d'asthme aigu grave. Cela a plus particulièrement été étudié jusqu'alors à Melbourne et à Londres [15-18]. En effet, après des orages violents accompagnés d'une chute brusque de température, d'une augmentation du taux d'humidité relative et de la quantité de pluie, après un court laps de temps, on a pu observer une augmentation des taux de visites aux urgences, pour asthme grave [19].

D'autre part, aussi bien certains polluants atmosphériques que différents facteurs météorologiques, peuvent avoir des effets sur la production en pollen d'arbres et d'herbacées et sur la dispersion de fragments ou d'allergènes polliniques [20-22].

Très peu d'études, notamment en France, se sont intéressées, pour le moment, à l'impact des différents facteurs de pollution, biologique et chimique, et des facteurs météorologiques sur la survenue de ces allergies respiratoires.

L'objectif de cette étude est de corrélérer différents paramètres atmosphériques (pollen, polluants et facteurs météorologiques) et des comptes-rendus de consultations de généralistes et de spécialistes faisant suite à des crises allergiques (allergie respiratoire), en utilisant des modèles de régression linéaire simple et multiple.

Méthodes

L'étude a été menée dans l'agglomération amiénoise, pendant la saison pollinique 2007, entre la semaine 14 (02 avril 2007) et la semaine 36 (09 septembre 2007). Amiens est une ville moyenne, en terme d'habitants (~ 136 000 habitants). Au 1er janvier 2006, elle se situait au 28ème rang parmi les villes de France de plus de 50 000 habitants, entre Villeurbanne et Metz.

La classification des symptômes allergiques (survenue et types) a été réalisée par un réseau de 5 médecins généralistes et 2 allergologues. Le nombre de consultations hebdomadaires et les comptes-rendus étaient ensuite transmis à l'Observatoire Régional de la Santé et du Social de la Picardie (OR2S). Les symptômes allergiques ont été classés en 4 groupes : asthme, rhinites, conjonctivites et toux spasmodique.

Les comptes polliniques sont réalisés à Amiens par recueil des grains de pollen sur des capteurs volumétriques de type Hirst fonctionnant sur le principe de l'impaction [23]. Dans les données du Réseau National de Surveillance Aérobiologique (RNSA) disponibles sur la période considérée, les comptages sont quotidiens [24]. Les pollen pris en compte sont ceux de frêne, platane et bouleau. Un comptage spécifique existe pour le pollen de Graminées et enfin une entité « autres taxons » regroupe différents pollen de plantes diverses.

Les polluants atmosphériques, gazeux et particulaires ont été prélevés, toutes les heures, dans trois stations urbaines de « Atmo-Picardie » (Saint-Leu, Salouël et CCI). Les polluants gazeux quantifiés sont les oxydes d'azote (NO_x), l'ozone (O_3), le dioxyde de soufre (SO_2) et le monoxyde de carbone (CO). Concernant les polluants particulaires, les données relatives aux particules en suspension inférieure à $10 \mu\text{m}$, PM_{10} , étaient les seules disponibles sur la ville d'Amiens pendant la saison considérée. Le monoxyde de carbone et les PM_{10} n'ont pas été mesurés en continu sur les 22 semaines de saison pollinique prises en compte. Pour le CO, les premières mesures sont celles de la semaine 24. Pour les PM_{10} , aucune mesure n'était disponible sur la période « semaine 17 – semaine 24 ».

Les données météorologiques journalières ont été fournies par Météo France. Parmi celles-ci, ont été retenues : la température (en °C), l'humidité relative (en pourcentage de vapeur d'eau), les précipitations (en mm d'eau), la pression atmosphérique (en mm de mercure) et la force du vent (en m/s).

Les concentrations de pollen, de polluants ainsi que les paramètres météorologiques sont représentées par une moyenne hebdomadaire.

Des corrélations simples sont effectuées entre, d'une part, les consultations pour allergies respiratoires et, d'autre part, le nombre de grains de pollen, la quantité de polluants atmosphériques et les facteurs météorologiques. Les effets du pollen sur les différents symptômes ont été aussi étudiés soit une semaine soit deux semaines après le début de la pollinisation. Les coefficients de corrélations (r) sont obtenus à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 4.03).

Des régressions linéaires multiples sont effectuées à l'aide de tests paramétriques entre le nombre de consultations pour allergie respiratoire d'une part, et les autres paramètres - pollen, polluants ainsi que facteurs météorologiques - d'autre part. Lorsque la valeur de p (probabilité critique) est inférieure à 0,05, le résultat est considéré significatif. Les régressions multiples

(coefficient de détermination R^2 , analyse de la variance et équation du modèle retenu) sont obtenues avec des modèles descendants en utilisant Microsoft® Office Excel 2003.

Résultats

1. Médecins et patients

Le nombre de médecins participant à l'étude a varié d'une semaine à l'autre sur la période considérée. Le maximum aura été de 6 médecins pour les semaines 18, 20 et 21. Sur la période allant de la semaine 27 jusqu'à la semaine 29, aucun spécialiste n'a fait partie de l'étude. Les médecins généralistes, quant à eux, ont été absents pendant les semaines 32 et 33.

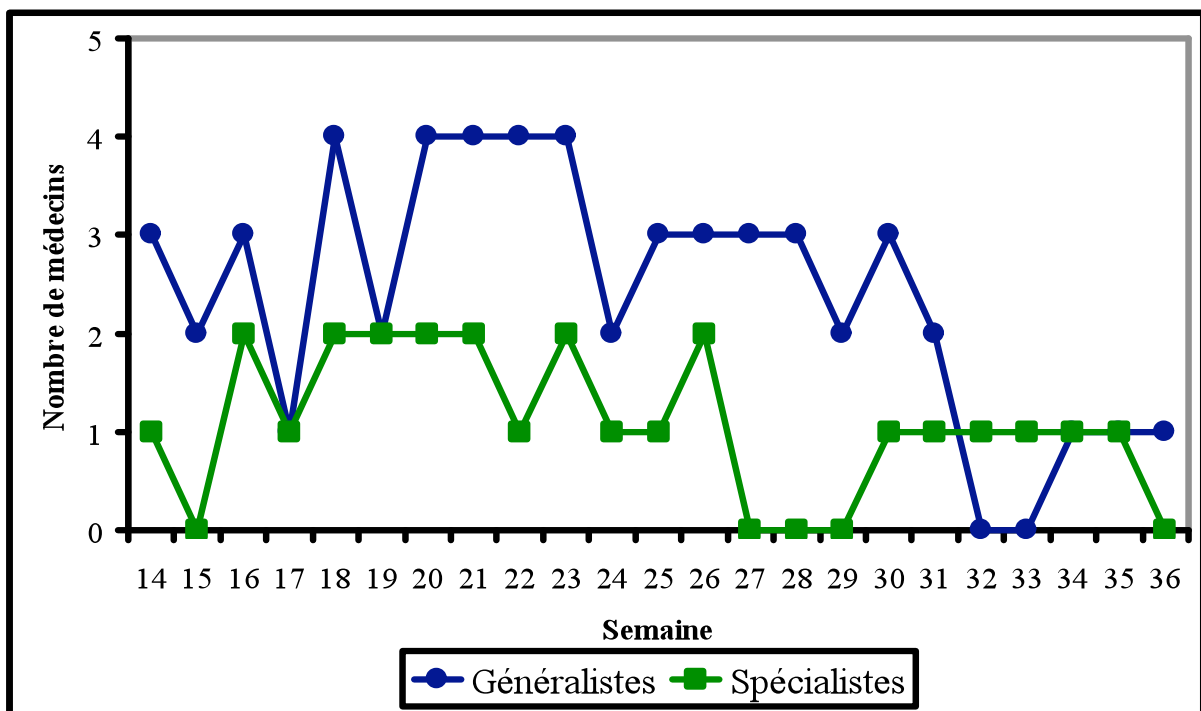


Figure 1 : Participation des médecins à l'étude au cours de la période « semaine 14 – semaine 36 » (OR2S – Pollen Amiens).

Sur l'ensemble de la période d'étude, 184 patients, parmi lesquels 101 hommes et 83 femmes, présentant un ou plusieurs symptôme(s), ont été pris en compte (Tableau 1).

Tableau 1 : Nombre de patients ayant consulté pour les différents symptômes allergiques au fil de l'étude (OR2S – Pollen Amiens).

| Semaine | Rhinites | Asthme | Conjonctivites | Toux |
|---------|----------|--------|----------------|------|
| 14 | 6 | 1 | 3 | 2 |
| 15 | 4 | 3 | 1 | 3 |
| 16 | 15 | 2 | 9 | 9 |
| 17 | 17 | 2 | 6 | 8 |
| 18 | 12 | 0 | 8 | 3 |
| 19 | 5 | 0 | 5 | 2 |
| 20 | 6 | 3 | 4 | 2 |
| 21 | 12 | 2 | 9 | 8 |
| 22 | 16 | 1 | 12 | 8 |
| 23 | 30 | 2 | 22 | 10 |
| 24 | 5 | 3 | 4 | 2 |
| 25 | 7 | 3 | 4 | 4 |
| 26 | 6 | 2 | 3 | 2 |
| 27 | 4 | 3 | 4 | 4 |
| 28 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 29 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 30 | 7 | 7 | 7 | 7 |
| 31 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 32 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 33 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 34 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 35 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 36 | 2 | 2 | 2 | 2 |

La part des patients atteints de rhinite est toujours la plus importante (88 %). En seconde position, les conjonctivites sont également abondamment retrouvées avec 60,1 %. On retrouve plus d'un tiers des patients atteints de conjonctivites durant les semaines 23 et 24. Enfin, 45,9 % des patients venant consulter pour allergie pollinique présentent une toux spasmodique (asthmatiforme) et 23,5% un asthme. De plus, il faut signaler également que la majorité des patients (67 %) présente au moins 2 symptômes.

La répartition des patients allergiques en fonction de l'âge (Figure 2), montre que 36 % des personnes ayant consulté pendant la période considérée avaient entre 0 et 19 ans. La part respective des 20 – 29 ans correspond à 22 % des patients. Pour ce qui est des tranches d'âge '30 – 39' ans et 'plus de 40 ans', elles représentent, respectivement, un quart et un sixième des personnes ayant consulté pendant cette année 2007.

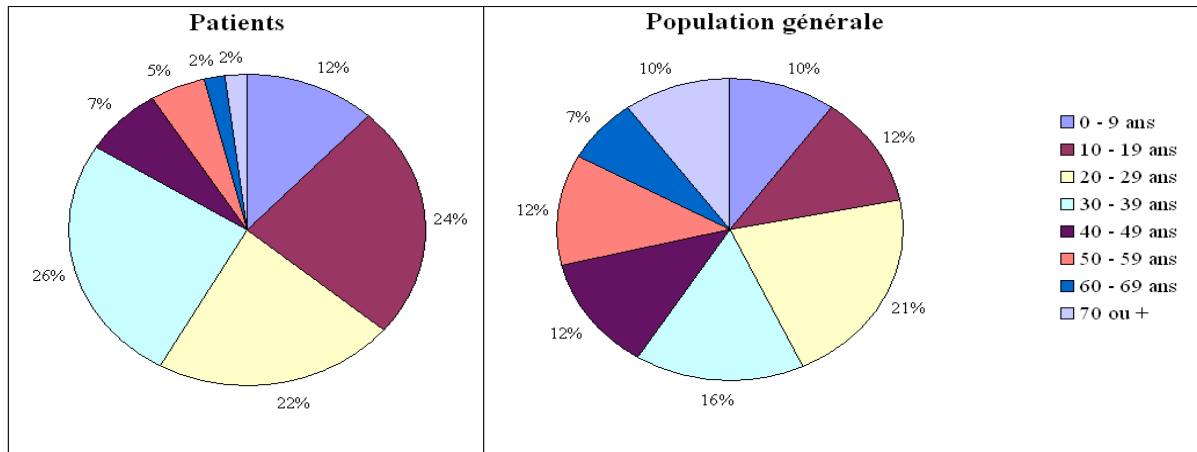


Figure 2 : Répartition des patients allergiques et de la population générale de la Ville d'Amiens en fonction de l'âge. (OR2S – Pollen Amiens).

Quand on s'attache au nombre de patients qui ont consulté pour la totalité des symptômes allergiques, on remarque 2 pics correspondant aux semaines 17 et 23. D'autre part, à partir de la semaine 24, le nombre de patients allergiques consultant diminue significativement (figure 3).

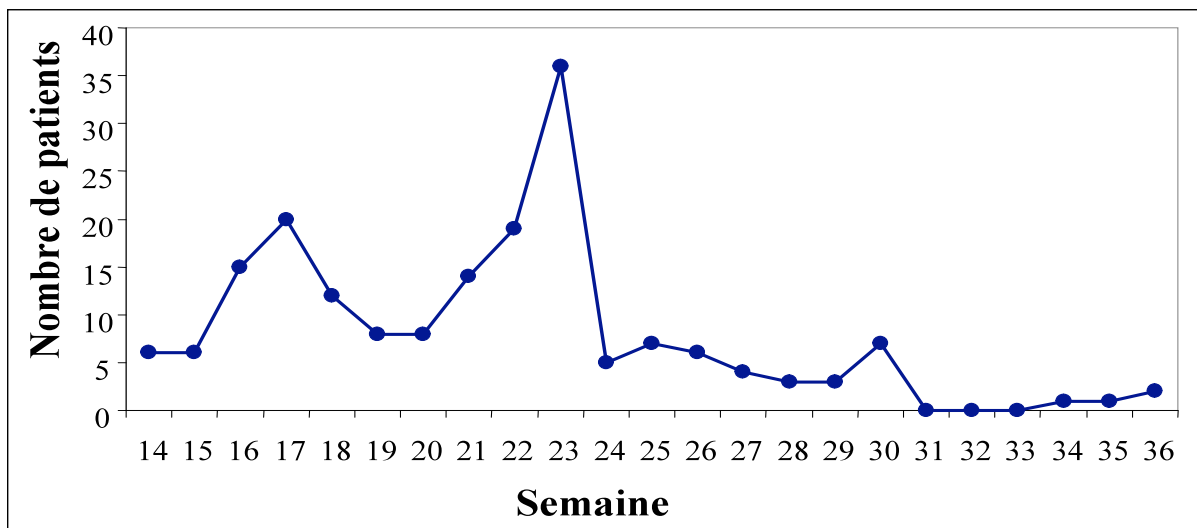


Figure 3 : Evolution du nombre d'allergiques rapporté aux consultations hebdomadaires. (OR2S – Pollen Amiens).

2. Pollen, polluants et facteurs météorologiques

Les concentrations polliniques hebdomadaires les plus fortes de pollen d'arbres (bouleau, platane et frêne) sont situées entre les semaines 14 et 19. Un pic est observé pendant la semaine 15 pour les pollen de bouleau et de frêne et la concentration de pollen de bouleau est 7 fois supérieure à celle du pollen de frêne (350 vs. 50 grains de pollen/m³ d'air, respectivement). Une semaine plus tard (semaine 16), l'optimum du pollen de platane est atteint (70 grains de pollen/m³ d'air) (figure 4).

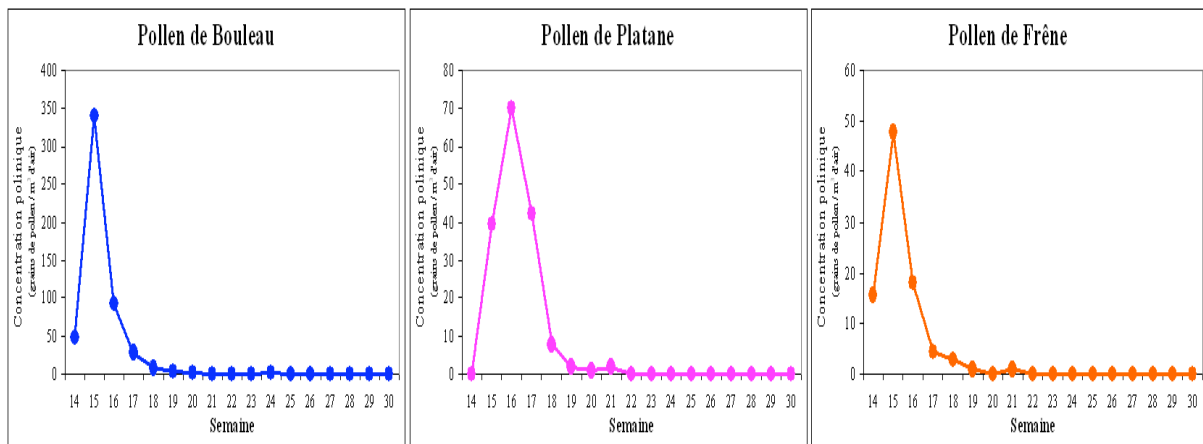


Figure 4 : Evolution des concentrations atmosphériques de pollen d'arbres (bouleau, platane et frêne) sur l'ensemble de la période d'étude.

Pour le pollen de Graminées (figure 5), on remarque que les concentrations polliniques commencent à augmenter à partir de la semaine 17, et s'estompent à partir de la semaine 30. Les taux de pollen de Graminées ont été les plus élevés pendant les semaines 21, 22 et 23 (entre 45 et 62 grains de pollen/m³ d'air).

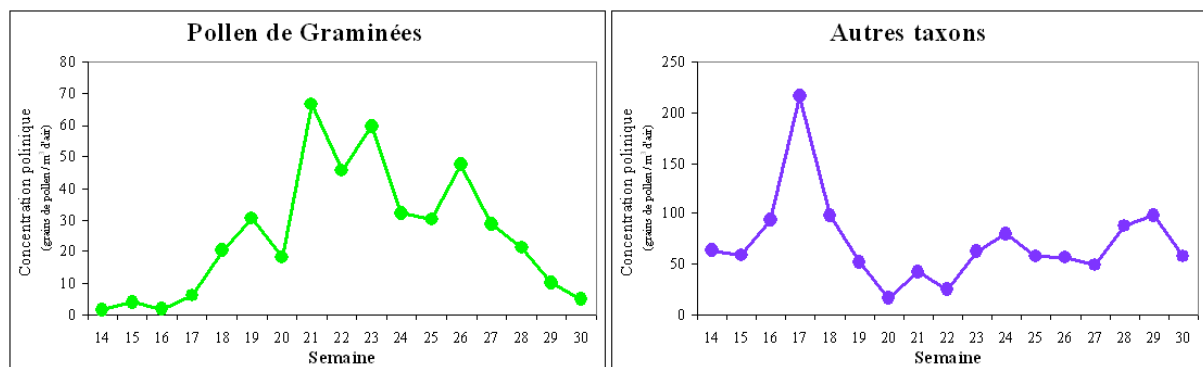


Figure 5 : Evolution des concentrations atmosphériques de pollen de Graminées et autres taxons en fonction du temps.

Les autres taxons polliniques (figure 5) présentent 72 % du recueil pollinique pendant les semaines 17 et 18, avec un pic pendant la semaine 17. À partir de la semaine 24, cette catégorie présente au moins 50 % de tous les taxons pris en compte, avec des proportions supérieures à 80 % à partir de la semaine 27.

3. Corrélations simples

Le tableau 2 montre les coefficients de corrélation (coefficient de Spearman) entre les symptômes allergiques d'une part, les pollen, les polluants et les facteurs météorologiques d'autre part.

Tableau 2 : Corrélations entre les allergies respiratoires d'une part et le pollen, les polluants et les facteurs météorologiques d'autre part, pendant la période pollinique considérée.

| Paramètres | | Rhinites | Conjonctivites | Asthme | Toux |
|--------------------------|------------------|----------|----------------|--------|-------|
| Pollen | Arbres | 0,03 | -0,12 | 0,09 | 0,10 |
| | Graminées | 0,52 ❖ | 0,62 ❖ | -0,03 | 0,42 |
| | Autres | 0,06 | -0,13 | -0,18 | 0,01 |
| Polluants atmosphériques | NO _x | 0,07 | -0,10 | -0,22 | 0,06 |
| | O ₃ | 0,64 ❖ | 0,63 ❖ | -0,23 | 0,41 |
| | SO ₂ | -0,02 | -0,14 | 0,12 | 0,11 |
| | CO | -0,25 | -0,39 | -0,44 | -0,42 |
| | PM ₁₀ | 0,18 | -0,11 | -0,19 | 0,06 |
| Facteurs météorologiques | Température | -0,09 | -0,01 | 0,27 | -0,03 |
| | Humidité | 0,05 | 0,15 | 0,12 | 0,03 |
| | Précipitation | -0,23 | -0,10 | 0,50 ❖ | -0,09 |
| | Pression | -0,13 | -0,18 | -0,03 | -0,30 |
| | Vent | -0,23 | -0,12 | -0,07 | -0,34 |

❖ : $p < 0,05$

Les consultations pour rhinites ont été corrélées significativement avec la concentration de pollen de Graminées ($r = 0,52$; $p = 0,016$) et la concentration d'ozone ($r = 0,64$; $p = 0,002$). En se limitant à la période de pollinisation des arbres (semaine 14 – semaine 19), les consultations pour rhinites étaient significativement corrélées avec les autres taxons ($r = 0,82$; $p = 0,04$). L'effet du pollen de platane sur les consultations pour rhinites est ressenti une

semaine plus tard que le début de la pollinisation ($r = 0,96$, $p = 0,002$). Aucune corrélation entre rhinites et facteurs météorologiques n'a été observée.

S'agissant des consultations pour conjonctivite, des corrélations positives et significatives ont été trouvées avec le pollen de Graminée ($r = 0,62$; $p = 0,002$) et la concentration d'ozone ($r = 0,63$; $p=0,002$). On n'observe aucune corrélation entre les facteurs météorologiques et les consultations pour conjonctivites.

En ce qui concerne les consultations pour toux spasmodique, en se limitant à la période de pollinisation des arbres, ce symptôme est corrélé avec le pollen de platane ($r = 0,87$; $p = 0,02$). De même, l'effet des pollen de frêne ($r = 0,86$; $p = 0,03$) et de bouleau ($r = 0,85$; $p = 0,03$) sur la toux spasmodique apparaît une semaine plus tard que le début de leur pollinisation. Les consultations pour ce symptôme n'ont été corrélées significativement à aucun polluant atmosphérique ni à aucun des facteurs météorologiques.

En revanche, le facteur « précipitations » est statiquement associé aux consultations pour asthme ($r = 0,5$ et $p = 0,02$). En se limitant à la période de pollinisation de Graminées (semaine 17 – semaine 29), l'effet des Graminées sur les consultations pour asthme est perceptible deux semaines après le début de la pollinisation ($r = 0,52$; $p = 0,09$).

4. Régressions linéaires multiples

Les meilleurs modèles expliquant les variations de consultations pour les maladies allergiques respiratoires sont obtenus par des régressions linéaires multiples descendantes.

Les modèles retenus pour tous les symptômes allergiques prennent en compte à la fois des comptages polliniques, des polluants atmosphériques et des facteurs météorologiques. A partir de ces modèles, nous avons mis en évidence des relations significatives entre, d'une part, tous les symptômes étudiés et, d'autre part, les paramètres suivants : pollen de platane, autres taxons, ozone, oxydes d'azote, température et force de vent.

S'agissant des rhinites (tableau 3), le modèle retenu avait un facteur de détermination de 84 %. Outre les paramètres cités ci-dessus, on observe que les consultations pour rhinites se trouvent positivement liées au pollen de Graminées, au dioxyde de soufre et à la pression atmosphérique, mais que la corrélation est négative pour les précipitations.

Tableau 3 : Paramètres de la régression linéaire multiple permettant d'évaluer les patients ayant consulté pour rhinite ($R^2 = 0,84$).

| | <i>Coefficients</i> | <i>Ecart-type</i> | <i>Statistique t</i> | <i>p</i> |
|------------------------|---------------------|-------------------|----------------------|----------|
| Constante | -172,27 | 44,07 | -3,91 | 0,004 |
| Graminées | 0,21 | 0,05 | 3,88 | 0,005 |
| Platane | 0,71 | 0,15 | 4,89 | 0,001 |
| Autres taxons | -0,13 | 0,03 | -4,62 | 0,002 |
| NO _x | 39,23 | 11,36 | 3,45 | 0,009 |
| O ₃ | 0,88 | 0,23 | 3,76 | 0,006 |
| SO ₂ | 5,42 | 1,84 | 2,95 | 0,018 |
| Température | 1,52 | 0,64 | 2,38 | 0,045 |
| Précipitations | -1,28 | 0,55 | -2,33 | 0,048 |
| Pression atmosphérique | 0,12 | 0,04 | 3,23 | 0,012 |
| Force de vent | -0,72 | 0,29 | -2,48 | 0,038 |

Pour les conjonctivites (tableau 4), le facteur de détermination dans le modèle retenu était de 72 %. Les consultations pour les conjonctivites, pendant la saison pollinique 2007, ont été associées au pollen de frêne et de Graminées, mais le rapport est inversement proportionnel à la moyenne hebdomadaire pour les précipitations.

Tableau 4 : Paramètres de la régression linéaire multiple permettant d'évaluer les patients ayant consulté pour conjonctivite ($R^2 = 0,72$).

| | <i>Coefficients</i> | <i>Ecart-type</i> | <i>Statistique t</i> | <i>p</i> |
|-----------------|---------------------|-------------------|----------------------|----------|
| Constante | -34,95 | 19,67 | -1,78 | 0,106 |
| Frêne | 0,12 | 0,22 | 3,36 | 0,007 |
| Graminées | 0,74 | 0,22 | 3,39 | 0,007 |
| Platane | 0,31 | 0,08 | 3,82 | 0,003 |
| Autre taxons | -0,10 | 0,03 | -3,79 | 0,004 |
| NO _x | 1,41 | 0,59 | 2,39 | 0,038 |
| O ₃ | 0,71 | 0,16 | 4,36 | 0,001 |
| Température | 1,81 | 0,76 | 2,37 | 0,039 |
| Précipitations | -1,48 | 0,49 | -3,04 | 0,013 |
| Force de vent | -0,41 | 0,24 | -1,70 | 0,119 |

En ce qui concerne les consultations pour toux, le modèle retenu (avec $R^2 = 0,77$; tableau 5) prend en compte le pollen de Graminées, la concentration de dioxyde de soufre, l'humidité relative et la pression atmosphérique. Des relations positives sont observées avec le pollen de Graminées, de platane, le NO_x , l' O_3 , le SO_2 , la température et la pression atmosphérique.

Tableau 5 : Paramètres de la régression linéaire multiple évaluant les consultants pour toux spasmodiques ($R^2 = 0,77$).

| | <i>Coefficients</i> | <i>Ecart-type</i> | <i>Statistique t</i> | <i>p</i> |
|------------------------|---------------------|-------------------|----------------------|----------|
| Constante | -33,74 | 21,51 | -1,57 | 0,155 |
| Graminées | 0,12 | 0,03 | 3,62 | 0,007 |
| Platane | 0,42 | 0,07 | 6,20 | 0,000 |
| Autres taxons | -0,09 | 0,02 | -5,22 | 0,001 |
| NO_x | 25,41 | 6,36 | 4,00 | 0,004 |
| O_3 | 0,27 | 0,10 | 2,72 | 0,026 |
| SO_2 | 3,34 | 0,91 | 3,67 | 0,006 |
| Température | 0,96 | 0,32 | 3,03 | 0,016 |
| Humidité relative | -0,39 | 0,13 | -3,09 | 0,015 |
| Pression atmosphérique | 0,05 | 0,02 | 2,35 | 0,046 |
| Force de vent | -0,58 | 0,16 | -3,67 | 0,006 |

Les consultations pour asthme (tableau 6) ont été, statistiquement, significativement liées à la concentration atmosphérique de dioxyde de soufre et à l'humidité relative. On observe que les consultations pour rhinites se trouvent positivement liées au pollen de platane, au dioxyde de soufre, à l'ozone et à la température, mais les corrélations sont négatives pour les autres taxons, l'humidité relative et la force du vent. La relation statistique entre les consultations pour asthme et le pollen de frêne n'a pas été significative.

Les différents paramètres du tableau 6 expliquent 68 % de la variation du nombre de consultations pour ce type de symptôme.

Tableau 6 : Paramètres de la régression linéaire multiple évaluant les consultants pour asthme. ($R^2 = 0,68$).

| | <i>Coefficients</i> | <i>Ecart-type</i> | <i>Statistique t</i> | <i>Probabilité</i> |
|-------------------|---------------------|-------------------|----------------------|--------------------|
| Constante | 6,13 | 7,64 | 0,80 | 0,443 |
| Frêne | 0,12 | 0,08 | 1,49 | 0,171 |
| Platane | 0,20 | 0,04 | 4,89 | 0,001 |
| Autres taxons | -0,05 | 0,01 | -4,33 | 0,002 |
| NO _x | 10,76 | 3,81 | 2,83 | 0,020 |
| O ₃ | 0,27 | 0,06 | 4,82 | 0,001 |
| SO ₂ | 2,08 | 0,54 | 3,84 | 0,004 |
| Température | 0,83 | 0,25 | 3,28 | 0,009 |
| Humidité relative | -0,21 | 0,07 | -3,11 | 0,013 |
| Force de vent | -0,41 | 0,10 | -4,22 | 0,002 |

Discussion

Dans cette étude, menée dans l'agglomération amiénoise, pendant la saison pollinique 2007, on a observé un lien entre les consultations pour allergie respiratoire, aussi bien chez les généralistes que chez les spécialistes, et différents indicateurs atmosphériques : pollen, polluants et facteurs météorologiques. Les tests statistiques utilisés, notamment l'analyse de régression pas à pas, permettent d'évaluer le rôle respectif, sur chaque symptôme, des différents paramètres atmosphériques pris en compte.

Dans les dernières décennies, l'augmentation observée des affections allergiques dans la plupart des grandes villes du monde occidental est particulièrement manifeste chez les enfants et les adolescents [25-29]. Dans cette étude, la proportion des jeunes (< 19 ans) qui consultent les médecins pour allergies respiratoires représente 36 % des patients, alors que cette tranche d'âge ne représente que 22 % de la population générale de la ville d'Amiens. De même, par rapport à la saison pollinique 2006, le nombre des patients a augmenté de 9 % [30].

Le pollen est quantitativement la source d'aéroallergènes la plus abondante en Europe. Plusieurs types de pollen - arbres de différentes familles botaniques et quasiment toutes les espèces de Graminées - provoquent des réactions allergiques respiratoires et /ou cutanées [31]. Dans notre étude, le premier pic de consultations, tous symptômes allergiques confondus, est survenu à la semaine 17. Ce pic semble provenir de la pollinisation de

différents arbres parmi lesquels figurent bouleau, frêne et platane. Le second pic de consultations, survenu au cours de la semaine 23, a été plus fort que le premier (36 vs. 20 patients ayant consulté). Ce pic peut être expliqué par la période optimale de pollinisation des Graminées.

La relation entre les comptes polliniques et les différentes maladies allergiques respiratoires a fait l'objet de plusieurs études épidémiologiques. La majorité des ces études montrent que les allergies respiratoires coïncident avec la saison pollinique, mais aucun lien simple et direct entre les 2 phénomènes n'a pu être mis en évidence [7]. Dans notre étude, pendant toute la période étudiée, seul le pollen de Graminées aura été corrélé significativement avec les consultations pour rhinites et conjonctivites. Ce n'est pas le cas de l'asthme. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les grains de pollen, à cause de leur taille ne peuvent atteindre que les voies respiratoires supérieures [32]. Nos résultats montrent aussi que les effets de pollen d'arbres et de Graminées sur l'appareil respiratoire ont été ressentis plus d'une à deux semaines après le début de la pollinisation. En effet, l'augmentation des consultations pour asthme est perceptible deux semaines après le début de la pollinisation.

L'augmentation de la prévalence et de l'incidence des allergies respiratoires met en cause d'autres facteurs, en particulier les polluants atmosphériques issus de la pollution acido-particulaire (SO_2 , NO_x , PM_{10} et particules diesel), photochimique (NO_2 , CO , O_3) ou automobile (SO_2) [31]. Dans notre étude, différents polluants gazeux se trouvent liés statistiquement de façon significative aux consultations pour allergies respiratoires.

En effet, l'ozone induit une diminution des fonctions pulmonaires, une inflammation et des dommages des cellules épithéliales bronchiques [33-36]. Les variations de la teneur ambiante en ozone ont été associées au risque d'asthme [37]. De même, l'ozone a également un effet adjuvant sur la réaction allergique. En effet, plusieurs études épidémiologiques ont montré un lien entre les niveaux ambiants d'ozone et la prévalence de l'allergie respiratoire [38]. Dans cette étude, des relations positives et significatives ont été observées entre la teneur atmosphérique en ozone et les consultations tous symptômes confondus.

Nos résultats montrent des relations significatives et positives entre la teneur atmosphérique en oxydes d'azote (NO_x) et les consultations pour les allergies respiratoires. Les NO_x regroupent le monoxyde d'azote (NO), le dioxyde d'azote (NO_2), le protoxyde d'azote (N_2O), le tétraoxyde de diazote (N_2O_4) et le trioxyde de diazote (N_2O_3). L'inhalation de NO_2 entraîne une diminution des fonctions pulmonaires et déclenche une réaction inflammatoire chez des

sujets humains sains [39, 40]. De plus, les effets de ce polluant sont accentués chez les patients souffrants d'allergie, montrant un rôle adjuvant de ce gaz sur la réaction allergique. De très nombreuses études antérieures ont montré une association entre les niveaux atmosphériques de NO₂ et un accroissement des cas de maladies respiratoires allergiques, rhinites et asthme [41-45].

Dans notre étude, des relations positives et significatives ont été observées entre le dioxyde de soufre (SO₂) et les consultations pour asthme, rhinites et toux. L'inhalation de SO₂ provoque une bronchoconstriction chez les sujets adultes normaux et asthmatiques [46, 47]. Une augmentation de la fréquence respiratoire a été observée à la suite d'une exposition d'une heure de 200 ppb de SO₂ chez des sujets asthmatiques [48]. D'autres études épidémiologiques montrent que le SO₂, composante majeure de la pollution automobile, est souvent corrélé avec la morbidité et la mortalité dues à l'asthme, principalement chez les enfants [37, 49]. En plus, plusieurs équipes [14, 50-52] ont observé que la pollution automobile accentue les phénomènes de bronchite chronique, toux nocturne et rhume des foins.

Dockery et Pope observent qu'une augmentation de 10µg/m³ de PM₁₀ induit une augmentation des crises d'asthme. De la même façon, une association peut être faite, concernant les PM₁₀, avec l'utilisation d'un broncho-dilatateur, des visites aux urgences et des cas d'hospitalisation pour crise d'asthme.[53].

Outre leur action directe sur l'appareil respiratoire, les polluants atmosphériques peuvent avoir un effet sur les grains de pollen en modifiant leur structure mais aussi le contenu allergénique et en fragilisant la membrane cytoplasmique [21, 54].

Les pollinoses sont directement liées, également, aux facteurs météorologiques. Ces derniers influencent aussi bien la production que la libération ou la dispersion du pollen. Les températures élevées (ou même simplement, évoluant à la hausse) induisent l'apparition et l'aggravation des symptômes allergiques [20]. Nos résultats montrent que la température est positivement liée aux consultations avec tous les symptômes pris en compte.

Les chutes de pression atmosphérique favoriseraient assez souvent la déhiscence des anthères ce qui a pour résultat la libération de grains de pollen; ceci ayant directement une incidence sur les rhinites et les crises d'asthme [20]. Dans notre étude, des résultats contradictoires ont été observés s'agissant des consultations pour rhinites et toux spasmodique.

De même, une forte nébulosité agit souvent dans l'amélioration sensible du sort du patient parce qu'elle diminue l'insolation et la chaleur [20]. Dans notre étude, nous avons observé que l'humidité relative était négativement liée aux consultations pour asthme et toux spasmodique.

Dans la littérature, il a été montré que chaque chute de pluie entraîne aussi une diminution de la fréquence des allergies respiratoires ; ceci peut être expliqué par le fait que la pluie entraîne, en quelque sorte, une « noyade » des grains de pollen [20, 31]. Nos résultats, concernant la rhinite et la conjonctivite, vont dans le même sens. Par contre, les consultations pour asthme sont positivement corrélées avec les précipitations. En effet, l'eau de pluie peut induire une libération, par les grains de pollen, de particules microscopiques dites granules cytoplasmiques de pollen qui comprend une quantité substantielle d'amidon. Des auteurs ont observé que la concentration de granules d'amidon dans l'air ambiant augmente de 20 à 50 fois après la survenue des orages [55, 56], alors même que les grains de pollen entiers ne sont plus détectables. Plus récemment, d'autres études ont montré que des polluants atmosphériques peuvent entraîner des cassures de la membrane pollinique et ainsi une libération accrue des granules. Si les grains de pollen pénètrent tout au plus dans la région nasale jusqu'à la trachée, rien n'empêche les granules polliniques de poursuivre leur progression vers les profondeurs du tractus respiratoire et d'induire ensuite des crises d'asthme. Ces microparticules ont été mises en cause dans les épisodes épidémiques d'asthme associés aux orages ou « thunderstorm asthma » [6, 19, 57].

Bien que des corrélations aient pu être mises en évidence entre les consultations pour allergies respiratoires, d'une part, et les facteurs atmosphériques, d'autre part, il faut mentionner un certain nombre de faiblesses. Le plus important est le nombre de patients qui sont inclus dans cette étude. Ceci pourrait en partie être imputé au nombre restreint de médecins ayant participé à l'étude. Dans les prochaines études, les consultations de médecins (généralistes et spécialistes) et les admissions hospitalières pour allergies respiratoires, ainsi que la consommation des médicaments anti-allergiques respiratoires doivent être prises en compte pour approfondir les connaissances des liens les plus significatifs entre allergies respiratoires et différents paramètres atmosphériques. De même, une étude sur une plus longue durée pourrait permettre de mieux caractériser le risque. Enfin, une quantification des granules cytoplasmiques de pollen dans l'air permettrait de rendre plus clair le rôle de ces particules dans la survenue des asthmes allergiques.

En conclusion, cette étude est l'une des rares pour l'heure, en France tout au moins, à prendre en compte différents facteurs atmosphériques (pollen, polluants et facteurs météorologiques) dans la recherche des causes des allergies respiratoires. Des corrélations simples ont été trouvées entre les teneurs en pollen et ozone, d'une part, et les rhinites et les conjonctivites, d'autre part. De plus, la présence des granules cytoplasmiques de pollen pourrait expliquer la corrélation positive entre les précipitations et les consultations pour asthme.

Références

1. Beasley R, Crane J, Lai CKW, Pearce N. Prevalence and etiology of asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2000;105:S466-S72.
2. Duchateau J. Allergies et environnement. *Revue Médicale de Bruxelles*. 1998;19:A355-A7.
3. Kogevinas M, Antó JM, Sunyer J, Tobias A, Kromhout H, Burney P. Occupational asthma in Europe and other industrialised areas: a population-based study. *The Lancet*. 1999;353:1750-4.
4. Weiland SK, von Mutius E, Hirsch T, Duhme H, Fritzsche C, Werner B, et al. Prevalence of respiratory and atopic disorders among children in the East and West of Germany five years after unification. *Eur Respir J*. 1999;14:862-70.
5. Bousquet J, Demoly P, Vignola AM, Godard P, Michel FB. Comprendre la maladie asthmatique = New concepts in asthma. *Médecine/sciences*. 1999;15:823-32.
6. Suphioglu C. Thunderstorm asthma due to grass pollen. *Int Arch Allergy Immunol*. 1998;116:253-60.
7. Davies RJ, Rusznak C, Devalia JL. Why is allergy increasing?--environmental factors. *Clin Exp Allergy*. 1998;28 Suppl 6:8-14.
8. Koenig JQ. Air pollution and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1999;104:717-22.
9. Pauli G, Bessot JC, Quoix E. [Effect of the environment on the development of respiratory allergies]. *Rev Pneumol Clin*. 1989;45:231-6.
10. Rusznak C, Devalia JL, Davies RJ. The impact of pollution on allergic disease. *Allergy*. 1994;49:21-7.
11. von Mutius E. The environmental predictors of allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2000;105:9-19.
12. Lebowitz MD. Epidemiological studies of the respiratory effects of air pollution. *Eur Respir J*. 1996;9:1029-54.
13. Luczynska CM, Walker LA, Burney PGJ. Skin sensitivity in school children in two different areas of London. *Eur Respir J*. 1995;8:250s.
14. Ishizaki T, Koizumi K, Ikemori R, Ishiyama Y, Kushibiki E. Studies of prevalence of Japanese cedar pollinosis among the residents in a densely cultivated area. *Ann Allergy*. 1987;58:265-70.
15. Anto JM, Sunyer J. Thunderstorms: a risk factor for asthma attacks. *Thorax*. 1997;52:669-70.
16. Bellomo R, Gigliotti P, Treloar A, Holmes P, Suphioglu C, Singh MB, et al. Two consecutive thunderstorm associated epidemics of asthma in the city of Melbourne. The possible role of rye grass pollen. *Med J Aust*. 1992;156:834-7.
17. Davidson AC, Emberlin J, Cook AD, Venables KM. A major outbreak of asthma associated with a thunderstorm: experience of accident and emergency departments and patients' characteristics. Thames regions accident and emergency trainees association. *Bmj*. 1996;312:601-4.
18. Newson R, Strachan D, Archibald E, Emberlin J, Hardaker P, Collier C. Effect of thunderstorms and airborne grass pollen on the incidence of acute asthma in England, 1990-94. *Thorax*. 1997;52:680-5.

19. Marks GB, Colquhoun JR, Girgis ST, Koski MH, Treloar ABA, Hansen P, et al. Thunderstorm outflows preceding epidemics of asthma during spring and summer. *Thorax*. 2001;56:468-71.
20. Laaidi K, Laaidi M, Besancenot JP. Pollens, pollinoses et météorologie = Pollen, hay fever and meteorology. *Météorologie*. 1997;20:41-56.
21. Motta AC, Marliere M, Peltre G, Sterenberg PA, Lacroix G. Traffic-related air pollutants induce the release of allergen-containing cytoplasmic granules from grass pollen. *Int Arch Allergy Immunol*. 2006;139:294-8.
22. Wayne P, Foster S, Connolly J, Bazzaz F, Epstein P. Production of allergenic pollen by ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) is increased in CO₂-enriched atmospheres. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2002;88:279-82.
23. Thibaudon M, Sulmont G. Le réseau de recueil pollinique: techniques et organisation. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*. 1999;39:263-6.
24. Thibaudon M. Le réseau national de surveillance aérobiologique (RNSA) Un outil au service de la santé publique, de la biodiversité, du changement climatique et de la recherche. *Environnement risques et santé*. 2008;7:217-9.
25. Aberg N. Asthma and allergic rhinitis in Swedish conscripts. *Clin Exp Allergy*. 1989;19:59-63.
26. Haahtela T, Lindholm H, Bjorksten F, Koskenvuo K, Laitinen LA. Prevalence of asthma in Finnish young men. *Bmj*. 1990;301:266-8.
27. Ninan TK, Russell G. Respiratory symptoms and atopy in Aberdeen schoolchildren: evidence from two surveys 25 years apart. *Bmj*. 1992;304:873-5.
28. Peat JK, Salome CM, Woolcock AJ. Factors associated with bronchial hyperresponsiveness in Australian adults and children. *Eur Respir J*. 1992;5:921-9.
29. Shaw RA, Crane J, O'Donnell TV, Porteous LE, Coleman ED. Increasing asthma prevalence in a rural New Zealand adolescent population: 1975-89. *Arch Dis Child*. 1990;65:1319-23.
30. Geghre N, Trugeon A, Bénabes-Jezraoui B. Bulletin Pollens n°1 - 2006. Observatoire Régional de la santé et du social de Picardie. www.wor2sfr. 2006;
31. Rancé F, Navarro-Rouimi R, Dutau G. Les allergies polliniques. Paris; 2007.
32. Wilson AF, Novey HS, Berke RA, Surprenant EL. Deposition of inhaled pollen and pollen extract in human airways. *N Engl J Med*. 1973;288:1056-8.
33. Broecker F, Arsalane K, Hermans C, Bergamaschi E, Brustolin A, Mutti A, et al. Lung epithelial damage at low concentrations of ambient ozone. *The Lancet*. 1999;353:900-1.
34. Devalia JL, Rusznak C, Davies RJ. Allergen/irritant interaction--its role in sensitization and allergic disease. *Allergy*. 1998;53:335-45.
35. Kinney PL, Thurston GD, Raizenne M. The effects of ambient ozone on lung function in children: a reanalysis of six summer camp studies. *Environmental health perspectives*. 1996;104:170-4.
36. Romieu I, Meneses F, Ramirez M, Ruiz S, Perez Padilla R, Sienna JJ, et al. Antioxidant supplementation and respiratory functions among workers exposed to high levels of ozone. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158:226-32.
37. Sunyer J, Spix C, Quenel P, Ponce-de-Leon A, Ponka A, Barumandzadeh T, et al. Urban air pollution and emergency admissions for asthma in four European cities: the APHEA Project. *Thorax*. 1997;52:760-5.
38. Ramadour M, Burel C, Lanteaume A, Vervloet D, Charpin D, Dutau H, et al. Prevalence of asthma and rhinitis in relation to long-term exposure to gaseous air pollutants. *Allergy*. 2000;55:1163-9.
39. Ponsonby AL, Glasgow N, Gatenby P, Mullins R, McDonald T, Hurwitz M, et al. The relationship between low level nitrogen dioxide exposure and child lung function after cold air challenge. *Clin Exp Allergy*. 2001;31:1205-12.

40. Schindler C, Kunzli N, Bongard J-P, Leuenberger P, Karrer W, Rapp R, et al. Short-Term Variation in Air Pollution and in Average Lung Function Among Never-Smokers . The Swiss Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults (SAPALDIA). *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163:356-61.
41. Anderson HR, de Leon AP, Bland JM, Bower JS, Emberlin J, Strachan DP. Air pollution, pollens, and daily admissions for asthma in London 1987-92. *Thorax*. 1998;53:842-8.
42. Chew FT, Goh DY, Ooi BC, Saharom R, Hui JK, Lee BW. Association of ambient air-pollution levels with acute asthma exacerbation among children in Singapore. *Allergy*. 1999;54:320-9.
43. de Marco R, Poli A, Ferrari M, Accordini S, Giammanco G, Bugiani M, et al. The impact of climate and traffic-related NO₂ on the prevalence of asthma and allergic rhinitis in Italy. *Clin Exp Allergy*. 2002;32:1405-12.
44. Krämer U, Koch T, Ranft U, Ring J, Behrendt H. Traffic-Related Air Pollution Is Associated with Atopy in Children Living in Urban Areas. *Epidemiology*. 2000;11:64-70.
45. Ostro B, Lipsett M, Mann J, Braxton-Owens H, White aM. Air Pollution and Exacerbation of Asthma in African-American Children in Los Angeles. *Epidemiology*. 2001;12:200-8.
46. Horstman D, Roger LJ, Kehrl H, Hazucha M. Airway sensitivity of asthmatics to sulfur dioxide. *Toxicol Ind Health*. 1986;2:289-98.
47. Lawther PJ, Macfarlane AJ, Waller RE, Brooks AG. Pulmonary function and sulphur dioxide, some preliminary findings. *Environ Res*. 1975;10:355-67.
48. Tunnicliffe WS, Harrison RM, Kelly FJ, Dunster C, Ayres JG. The effect of sulphurous air pollutant exposures on symptoms, lung function, exhaled nitric oxide, and nasal epithelial lining fluid antioxidant concentrations in normal and asthmatic adults. *Occup Environ Med*. 2003;60:e15.
49. Sunyer J, Atkinson R, Ballester F, Le Tertre A, Ayres JG, Forastiere F, et al. Respiratory effects of sulphur dioxide: a hierarchical multicity analysis in the APHEA 2 study. *Occup Environ Med*. 2003;60:e2.
50. Chunling W, Tamura K, Matsumoto Y, Endo T, Watari C, Arai T, et al. [Effects of quantity of Japanese cedar pollen, air pollution and urbanization on allergic rhinitis morbidity in Ibaraki prefecture]. *Nippon Koshu Eisei Zasshi*. 2002;49:631-42.
51. Heinrich J, Topp R, Gehring U, Thefeld W. Traffic at residential address, respiratory health, and atopy in adults: the National German Health Survey 1998. *Environmental Research*. 2005;98:240-9.
52. Nicolai T, Carr D, Weiland SK, Duhme H, von Ehrenstein O, Wagner C, et al. Urban traffic and pollutant exposure related to respiratory outcomes and atopy in a large sample of children. *Eur Respir J*. 2003;21:956-63.
53. Dockery DW, Pope CA. Acute Respiratory Effects of Particulate Air Pollution. *Annual Review of Public Health*. 1994;15:107-32.
54. Rogerieux F, Godfrin D, Senechal H, Motta AC, Marliere M, Peltre G, et al. Modifications of Phleum pratense grass pollen allergens following artificial exposure to gaseous air pollutants (O₃, NO₂, SO₂). *Int Arch Allergy Immunol*. 2007;143:127-34.
55. Schappi 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;54:478-83.
56. Suphioglu C, Singh MB, Taylor P, Bellomo R, Holmes P, Puy R, et al. Mechanism of grass-pollen-induced asthma. *Lancet*. 1992;339:569-72.
57. Venables KM, Allitt U, Collier CG, Emberlin J, Greig JB, Hardaker PJ, et al. Thunderstorm-related asthma--the epidemic of 24/25 June 1994. *Clin Exp Allergy*. 1997;27:725-36.

2.3. Conclusion

L'étude épidémiologique portant sur les allergies respiratoires – rhinites, asthme, conjonctivites et toux spasmodique - et réalisée dans la région amiénoise est l'une des rares études, au moins en France, qui prend en compte différents paramètres atmosphériques : les teneurs de pollen d'arbres et de Graminées au cours d'une même saison pollinique, les concentrations pour plusieurs types de polluants gazeux et particulaires et des facteurs météorologiques.

Nos résultats permettent d'affirmer que les allergies respiratoires sont bien des maladies liées en grande partie à l'environnement. De plus, les concentrations atmosphériques de pollen de Graminées étant corrélées avec les rhinites mais pas avec l'asthme, il paraît possible d'impliquer la taille des grains de pollen. La présence des granules cytoplasmiques libérés par les grains de pollen pourrait expliquer l'interaction des différents paramètres atmosphériques ainsi que la corrélation positive entre les précipitations et les consultations pour asthme.

Chapitre 3



Étude expérimentale

3.1. Introduction

Le pollen des Graminées constitue un des vecteurs majeurs d'aéroallergènes dans le monde. Les allergies respiratoires au sens large - incluant donc aussi bien l'asthme que les rhinites allergiques - représentent un problème majeur de santé publique, en particulier dans les pays du monde occidental.

Le pollen de fléole des prèes a été choisi dans cette étude, parce qu'il est représentatif des autres types de pollen de Graminées fourragères et céréalières.

De plus, quelques travaux ont montré que certaines caractéristiques du pollen évoluent au cours du temps, par exemple au niveau de sa capacité de germination et de sa résistance à un choc osmotique. Pour cela, dans un premier temps, une étude comparative entre 3 lots de pollen de fléole des prèes a été réalisée. Les lots utilisés sont les suivants : 2 lots commercialisés ayant subi un traitement post-récolte (P-2003, P-2005 ; Allergon) et un lot de pollen frais de la récolte 2006 n'ayant subi aucun traitement (P-2006 ; Allerbio). Au vu des différents résultats obtenus entre le pollen commercialisé et le pollen frais, en matière d'allergénicité et de libération des granules cytoplasmiques de pollen ou GCP, il nous a semblé préférable de travailler avec du pollen frais, afin de pouvoir se rapprocher au mieux des conditions environnementales (cf. Annexe 2).

L'allergénicité des GCP n'a été jusqu'alors que relativement peu étudiée aussi bien en France qu'à l'étranger. Il a donc paru fondé de vérifier certaines hypothèses proposées par différents auteurs et notamment celles, directement dans notre groupe, d'Alexandre Motta pour tenter de compléter et d'élargir ce qui avait déjà pu être réalisé et mis à jour dans sa thèse (2004).

Les critères de choix des concentrations de GCP servant pour les instillations pratiquées sur les rats BN n'ayant pas été explicitement exposées, nous avons souhaité, dans la présente étude menée à partir de 2006, aborder cet aspect sous un angle rendant possible, relativement facilement et terme à terme, la comparaison entre grain de pollen et GCP. Ainsi, ce sont des quantités initiales pondérales équivalentes de GCP et de pollen, soit 0,5 mg/animal, qui ont été utilisées pour instiller les rats. La quantité particulière, utilisée par ailleurs, de 4.5×10^7 GCP/rat correspond, quant à elle, à la quantité de granules libérées si 100% des grains de pollen contenus dans la suspension d'instillation ont explosé. Deux autres quantités

de GCP ont été prises en compte. Elles correspondent respectivement aux cas où 33% et 3% des grains de pollen ont explosé au moment du choc osmotique.

D'autre part, s'agissant de la taille moyenne des GCP, afin d'obtenir des mesures plus fines que celles disponibles jusqu'alors, un compteur de particules plus sensible a été utilisé. Au lieu de se baser seulement sur un spectre moyen de diamètre situé entre 2 et 5 μm , nous avons pu étendre la mesure vers des diamètres beaucoup plus petits, la largeur du spectre étant maintenant comprise entre 0,6 et 5 μm . Avec cette nouvelle série de mesures, il apparaît clairement que les tailles les plus petites sont celles qui sont les plus représentées.

Les expérimentations précédentes n'avaient pas abordé un autre aspect qu'il nous a paru important de mettre en avant, à savoir une comparaison entre pollen et GCP en s'appuyant sur un même protocole pour l'utilisation des deux sources allergéniques. Ceci peut permettre de mieux évaluer l'allergénicité de chacun des composants en évitant des biais méthodologiques.

À partir de l'ensemble de ces propositions de travail, un premier article intitulé « Effects of pollen grains and their cytoplasmic granules on allergic humoral and cellular responses in the rat » a été composé.

Comme, par ailleurs, aucun travail n'avait été encore réalisé *in vivo* pour essayer d'évaluer les effets conjugués du pollen et des GCP, nous avons abordé expérimentalement cette question en proposant un protocole spécifique.

Quatre groupes ont été étudiés : (1) rats sensibilisés au pollen et provoqués par les GCP, (2) rats sensibilisés par les GCP et provoqués par du pollen, (3) GCP seul et, finalement, (4) pollen seul (sensibilisation et provocation avec le même produit pour les deux instillations des groupes 3 et 4). Ce travail a fait l'objet de la deuxième publication dont le titre est : « About the allergenic potential of *Phleum pratense* pollen cytoplasmic granules: new elements from a Brown Norway rat model ».

Dans nos 2 premières études, afin d'éliminer la plus grande quantité possible d'allergènes hydrosolubles provenant du pollen entier, les GCP ont été lavés. Mais, nous avons pensé que dans des conditions non-expérimentales, en environnement extérieur, des GCP contenant ou dépourvus d'allergènes hydrosolubles - GCP non-lavés et GCP lavés respectivement - peuvent être présents dans l'atmosphère, ceci en fonction des effets potentiels des précipitations. De même, bien que la majorité des études concernant la réaction allergique s'intéressent au rôle des allergènes hydrosolubles, il paraît maintenant important de prendre

également en compte les allergènes non-hydrosolubles puisqu'ils semblent être souvent impliqués dans la réaction allergique. Pour cela, une étude évaluant les potentiels allergique et inflammatoire des GCP lavés et GCP non-lavés a été effectuée en utilisant le même modèle animal d'allergie au pollen, le rat Brown Norway. Trois groupes ont été étudiés : (1) rats sensibilisés et provoqués par les GCP lavés, (2) rats sensibilisés et provoqués par les GCP non-lavés, et, finalement, (3) rats sensibilisés et provoqués par du pollen. De plus, dans cette même étude, une première phase d'identification des allergènes hydrosolubles et non-hydrosolubles de GCP et de pollen a été menée en utilisant des sérums de rats sensibilisés. Ce travail a permis la construction d'un troisième article portant le titre suivant : « Role of water-soluble and water-insoluble allergens of pollen cytoplasmic granules in humoral and cellular allergic responses ».

De plus, une mise au point d'un nouveau modèle animal d'allergie au pollen permettant d'étudier un éventuel effet adjuvant de polluants atmosphériques a été réalisé au cours de ce travail (cf. Annexe 3).

L'allergénicité des différentes sources d'allergènes concernaient les réponses humorales et cellulaires de l'allergie et de l'inflammation chez les rats. Ces réponses ont été évaluées par différents paramètres :

- taux d'IgE et IgG1 dans le sérum ;
- pourcentage d'éosinophiles et concentrations des cytokines Th2 (IL-4, IL-5, IL-13 et Rantes), médiateurs de l'allergie dans le liquide bronchoalvéolaire (LBA) ;
- prolifération spécifique - pour le pollen ou les GCP - des lymphocytes ganglionnaires (mesure de l'incorporation de thymidine tritiée en cpm) ;
- nombre et cytologie (coloration des frottis cellulaires au May Grunwald Giemsa) des cellules - macrophages, lymphocytes, neutrophiles et basophiles - dans les LBA ;
- intégrité de la barrière alvéolo-capillaire (protéines totales dans les LBA) et concentrations des cytokines Th1 (IL-1 ; IL-2, IFN γ , TNF α ...) médiateurs de l'inflammation dans les LBA.

3.2. ARTICLE 2

Effects of pollen grains and their cytoplasmic granules on allergic humoral and cellular responses in the rat.

Open Allergy journal

ABOU CHAKRA Oussama R., ROGERIEUX Françoise, PELTRE Gabriel,
SÉNÉCHAL Hélène and LACROIX Ghislaine

Abstract

Background: Grass pollen is one of the most important aeroallergens in Europe. It highly contributes to respiratory allergic diseases such as asthma or allergic rhinitis. In contact to water or airborne pollutants, pollen grains can release pollen cytoplasmic granules (PCG) containing allergens. Because of their size ($< 5 \mu\text{m}$), PCG may penetrate deeper into the lungs. They can induce higher allergic responses and are already associated in thunderstorm asthma.

Objective: A comparison of allergic potential of whole timothy grass pollen grains and isolated PCG in Brown Norway rats.

Methods: Rats were sensitized (day 0) and challenged (day 21) with pollen grains (0.5 mg) or PCG (1.5×10^6 , 1.5×10^7 , 4.5×10^7 and 0.5 mg). At day 25, blood samples, Bronchoalveolar Lavage fluid (BALF) and bronchial lymph node were collected. IgE and IgG1 levels in sera were assessed by ELISA. Alveolar cells, total proteins and cytokines were quantified in BALF. T-cell proliferation, in response to pollen or granules, was performed by lymph node assay.

Results: Rats sensitized to the 2 highest doses of PCG showed IgE and IgG1 levels higher than negative control, but lower than the pollen group. Eosinophils, lymphocytes and Th2 cytokines in BALF were higher in PCG-sensitized rats than in pollen group. Animals sensitized to PCG or pollen showed similar proliferative responses of lymph node cells.

Conclusion: PCG can induce allergic and inflammatory responses. Cellular responses suggest that PCG could induce asthma rather than rhinitis responses in contrast to pollen.

Keywords: Timothy grass pollen; Pollen Cytoplasmic Granules; Allergy; Humoral responses; Cellular responses.

Introduction

Respiratory allergic diseases, such as allergic rhinitis and asthma, are currently a major public health problem worldwide, in particular in industrialized countries. Over the last decades, epidemiological studies show that the prevalence of allergic diseases has dramatically increased, especially in the younger generations and people living in biggest cities (Lacroix, 2005).

These atopic diseases are complex inflammatory disorders influenced by both genetic and environmental factors, including pollen, clearly one of the most important aeroallergens vectors, in terms of quantities available in the atmosphere. However, although most of the symptoms associated with these affections coincide with the pollination season, it is now well established that simple and direct relation doesn't exist between these two phenomena and that many other factors must be taken into account.

In parallel, several studies have shown that after light rainfall or thunderstorm, one pollen grain can release 700 to 1000 small particles called pollen cytoplasmic granules (PCG) (Singh et al., 1991). PCG consist in starch granules (SG) and polysaccharide-particles (Behrendt and Beckert, 2001). In fact, starch granules have been isolated from the Melbourne atmosphere with 10 to 50-fold increase following rainfall (Suphioglu, 1998, Schappi et al., 1999). Furthermore, our team had previously shown that after exposure to gaseous pollutants such as O₃ (0.5 ppm) or NO₂ (2 ppm) commercialized pollen release PCG (Motta et al., 2006). The likelihood that whole grass pollen grains (15 – 60 µm) will reach the deeper human airways is low, but PCG (< 5 µm) might penetrate into the lower respiratory tract and so, can induce symptoms of bronchial asthma or hay fever (Taylor et al., 2002, Taylor et al., 2004). Several grass pollen allergens have been found in PCG by immunogold labeling and western blot studies, such as Lol p 5 and Lol p 9 for rye grass (Taylor et al., 1994), Phl p 4, Phl p 5 and Phl p 6 for timothy grass (Fischer et al., 1996, Grote et al., 1994, Vrtala et al., 1999). In the same way, small particles derived for birch pollen contain a major allergen Bet v 1 (Schappi et al., 1999).

It has been shown in previous *in vivo* studies that timothy grass PCG can induce higher humoral and cellular responses in pollen and PCG-sensitized rats (Motta et al., 2004a, Motta et al., 2004b). Their presence can provoke the accumulation of eosinophils in the peribronchial area in PCG-sensitized mouse (Bacsi et al., 2006). Moreover, isolated PCG can elicit a positive skin prick test in asthmatic patients and may cause a bronchial obstruction

during thunderstorm in asthmatics (Suphioglu et al., 1992). Thereby, PCG are suspected playing a role in “thunderstorm asthma” (D'Amato et al., 2007). PCG may be also transferred by association with respirable particulate matter present in the atmosphere, such as diesel exhaust particles (DEP) (D'Amato et al., 2000).

The aim of this study was to evaluate, with a rat allergy model, the allergenic potential of different concentrations of isolated PCG and to compare it with the allergenicity of whole timothy grass pollen. Humoral (IgE and IgG1 levels in sera), cellular (eosinophils, lymphocytes, Th2 cytokine concentrations in BALF and lymph node cell proliferation) and inflammatory responses (macrophages, neutrophils, total protein and Th1 cytokine concentrations) have been assessed following intratracheally instillation of PCG or whole pollen in Brown Norway rats, which is a good animal model of allergy (Steerenberg et al., 1999, Szelenyi, 2000). In this study, the same immunization experimental design has been used both for PCG and pollen grains. Rats' immunizations performed by PCG and pollen grains have been processed in parallel.

Methods

1. Animals

Six-week-old male Brown Norway (BN) rats were obtained from Charles River Laboratories (France). Animals were housed in an air-conditioned room (22 °C, 60 % relative humidity) with restricted access. They received conventional laboratory diet and tap water was *ad libitum*. They had a light–dark circadian rhythm of 12 h. Their acclimatation has been of one week before use in animal facility. Rats were handled in accordance with French State Council guidelines for the care and use of laboratory animals (Decree 87-849, October 19th 1987) and experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Comity at the INERIS. The rats were randomly divided into six groups of 6 rats each.

2. Pollen and PCG

Timothy grass pollen (*Phleum pratense*) from the 2006 harvest was obtained from Allerbio AB (Varenes-en-Argonne, France) and had not undergone post harvest conservative treatment. Pollen grains were used for rats' immunization; PCG isolation and water soluble pollen extraction. Pollen grains were stored at 4 °C.

PCG (0.6 - 5 µm) were isolated from whole grass pollen following exposure of intact pollen grains to osmotic stress, according to Motta et al (Motta et al., 2004a) with slight modifications. Timothy grass pollen (500 mg) was suspended in 5 mL distilled water to allow the release of PCG. After 1 h of gentle agitation, the suspension was centrifuged (10 000 x g, 10 min) through a 5 µm mesh filter (Millipore type Ultrafree-MC, Millipore Corp., Bedford, MA, USA). PCG pellet was collected and washed twice in 5 mL distilled water and resuspended in 1 mL of saline solution (NaCl 0.9 %).

The size and the number of PCG were performed with a particle counter (Z3 Multisizer™ Coulter Counter®, Beckman Coulter). For pollen grains, particle counter (Z2™ Coulter Counter®, Beckman Coulter) was used for the size evaluation and the counting.

3. Endotoxin assay

The presence or the absence of endotoxins / lipopolysaccharide (LPS) in pollen extract, PCG extract and saline solution were determined by Limulus Amebocytes Lysate (LAL) test (E-Toxate™ Kit, Sigma).

4. Sensitization and challenge of the rats

Animals were anesthetized by an intramuscular injection of a mixture of ketamine hydrochloride (0.5 mg/kg body weight), atropine (0.1 mg/kg body weight) and xylazine (1 mg/kg body weight). Rats were then sensitized on day 0 and challenged on day 21 by intratracheal instillation of 150 µL of pollen grains or PCG, which were suspended in saline solution (NaCl 0.9 %) and used as allergen sources as described in figure 1. The initial weights were of 0.5 mg of pollen and PCG. The particle quantities of PCG were 1.5×10^6 PCG, 1.5×10^7 PCG, 4.5×10^7 PCG. They correspond to the number of PCG released by 0.5 mg of pollen if 3 %, 33 % and 100 % of pollen burst respectively. Negative control animals received saline solution.

5. Autopsy

At day 25, rats were anaesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital (150 mg/kg body weight). They were exsanguinated by cutting the inferior *Vena Cava* after blood taking. Bronchoalveolar Lavage (BAL) was then performed. A cannula was inserted in the trachea and the lungs were washed 3 times with 10 mL of PBS (pH 7.2). Bronchial lymph nodes were removed and immediately placed in 5 mL of ice cold RPMI-1640 medium.

After collection, blood was kept at 4 °C for about 2-4 h for clotting. The blood samples were then centrifuged for 10 min at 2000 x g at 4 °C. Serum was removed and stored in 500 µL aliquots at – 80 °C until use.

Fluid collected from the BAL of each animal was centrifuged at 150 x g for 10 min. Cell-free BALF was concentrated using Amicon Ultra tubes® (Millipore) centrifuged at 2000 x g, 4 °C until the volume reached 1 mL.

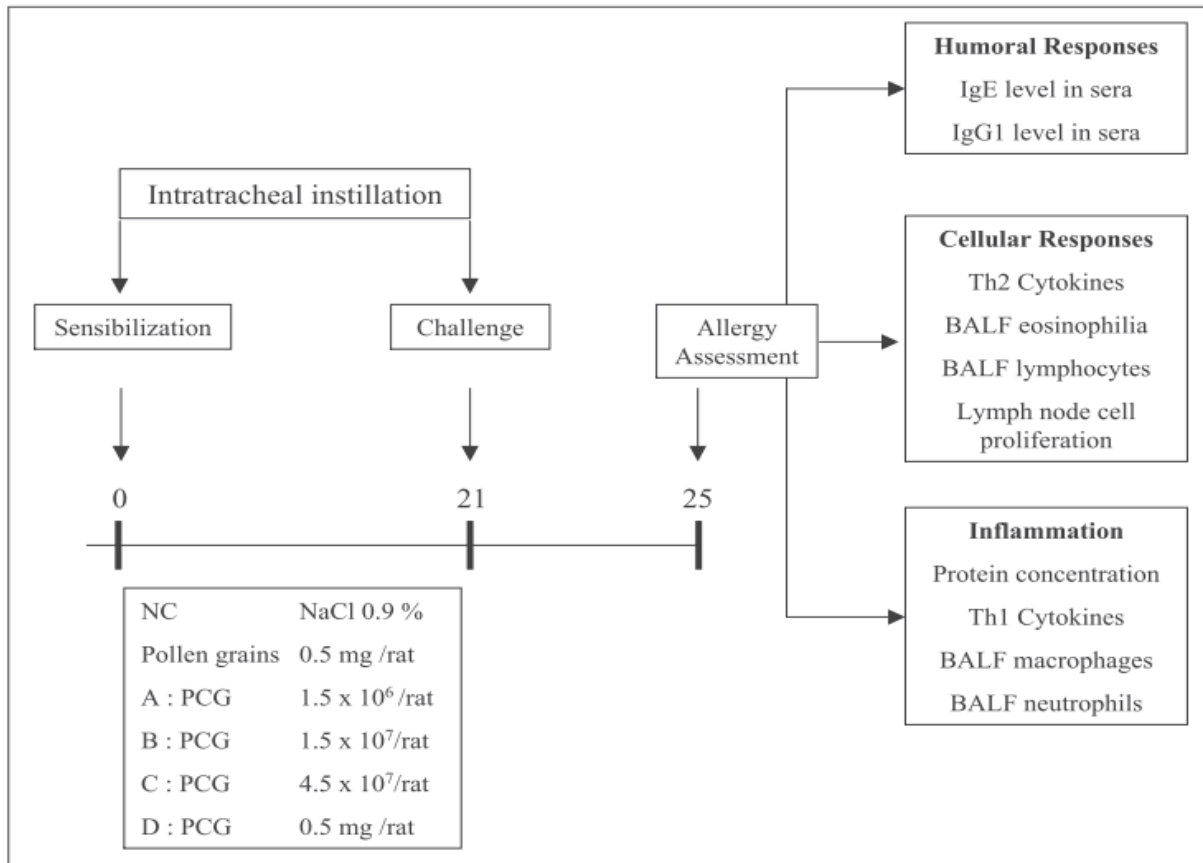


Figure 1: Schematic representation of the experimental design. By intratracheally instillation, rats were sensitized at day 0 and challenged at day 21 with pollen grains or PCG. Negative control animals received saline solution. At day 25, allergic responses (humoral and cellular) and inflammation were assessed. Total rats studied: 36.

6. Protein assay

The protein concentrations in water-soluble extracts of pollen, isolated PCG and in BALF were determined by Lowry method (Lowry et al., 1951). Bovine serum albumin was used to obtain the calibration curve.

7. ELISA for specific anti-timothy pollen IgE and IgG1

Water-soluble pollen extract (PE) was prepared according to Mahler et al. (Mahler et al., 2000). PE was labeled with digoxigenin-3-O-succinyl- ϵ -aminocaproic acid-N-hydroxysuccinimide ester (DIG-NHS) using a DIG protein labeling kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). PE (1 mg/mL) was mixed with DIG-NHS. Labeled proteins were collected and concentrated using centrifugation (2000 x g, 4 °C) in Amicon Ultra tubes® (Millipore) until the volume was equal to 1 mL and stored in 50 μ L aliquots at – 80 °C.

The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed in serum according to Motta et al (Motta et al., 2004a). Briefly, 96-well microtiter plates were coated by 1:500 diluted mouse anti-rat-IgE or anti-rat-IgG1 antibody (Zymed, San Francisco, CA, USA). After night incubation at room temperature, wells were washed and saturated with a solution of PBS containing 1 % (w/v) skimmed milk powder and 0.1 % (v/v) Tween-20. After 1 h incubation, rat sera were added to the wells (in duplicate) at the proper dilution (1:2 and 1:1500 for IgE and IgG1 detection respectively) and incubated for 1 h at 37 °C. After washing, wells were incubated with a pollen-DIG solution (dilution 1:800). Thereafter, a horseradish peroxidase conjugated anti-DIG antibody was added (Roche Diagnostics, Manheim, Germany, dilution 1:625). The amount of IgE or IgG1 was measured by adding peroxidase substrate and the absorbency values were measured at 450 nm with a multichannel photometer (TECAN, France).

8. BALF cellularity

After centrifugation, cells were resuspended in 800 μ L RPMI 1640-medium (Gibco, France). The collected cells (9–20 μ m) were counted with Z2™ Coulter Counter® (Beckman Coulter) and applied to a slide by centrifugation using a Shandon Cytospin 2 (Pittsburgh, PA) at 150 g for 5 min. Cell differential counts were performed after May-Grünwald Giemsa staining and a minimum of 400 cells were counted per slide.

8. Determination of cytokines in BALF

Th1 cytokines were quantified in BALF using bio-plex kit for IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and IFN γ (Cat n°: 171K11070, Biorad, France). Rat Th2 cytokine multiplex immunoassay kit was used for IL-5, IL-13 and Rantes (Cat n° RCYTO-80k-04, Linko, Millipore, France) according to the manufacturer's instructions.

9. Bronchial Lymph Node Cell Assay

The bronchial lymph node assay previously described (Motta et al., 2004a) has been slightly modified. Briefly, isolated lymph nodes taken were forced through a sterile 70 μ m mesh

nylon cell strainer (Falcon, Becton and Dickinson Company, Franklin Lake, NJ, USA). The collected cells were centrifuged twice at 300 x g for 10 min at 4 °C. After removal of the supernatant, the pellet was resuspended in 1 mL of 10 % FCS medium, and counted with Z2™ Coulter Counter®. Cells were incubated in U-bottomed 96 well-plates (Cellstar, Greiner bio one, Frickenhausen, Germany), containing 50 µL 10% FCS medium, 1.5 µM 2-β-mercaptoethanol, with and without allergen sources (Pollen: 10 and 100 µg/mL; PCG: 9 x 10⁵ and 9 x 10⁶ PCG/mL), for 3 days in humidified atmosphere at 37 °C and 5 % CO₂. Then, cells were incubated 24 h with 10 µl/well [³H]-thymidine (Amersham, Buckinghamshire, UK, 37 kBq/mL) and harvested for scintillation counting in a β-plate counter (1205 Betaplate™ Wallac, Turku, Finland) to measure cell proliferation. T-cell reactivity was expressed as counts per minute (cpm).

10. Statistical analysis

The results of all studied parameters are expressed as means ± SEM. For statistical analysis the non-parametric tests (Kruskall-Wallis and Mann-Whitney) were used. The results were considered significant when a p-value < 0.05 was found.

Results

1. Particle size distribution, proteins and endotoxins in instilled solutions

The average diameter of the timothy grass pollen grain, measured by Z2™ Coulter, was 31 ± 2 µm. By such counting type, we had determined that 1 µg of pollen contained 87 ± 5 pollen grains. In contact with distilled water, 500 mg of timothy pollen grains released about 7.5 x 10⁸ PCG. The size distribution of PCG, performed by Z3 Multisizer (Beckman Coulter), is reported in figure 2. The average diameter of PCG was 1.1 µm.

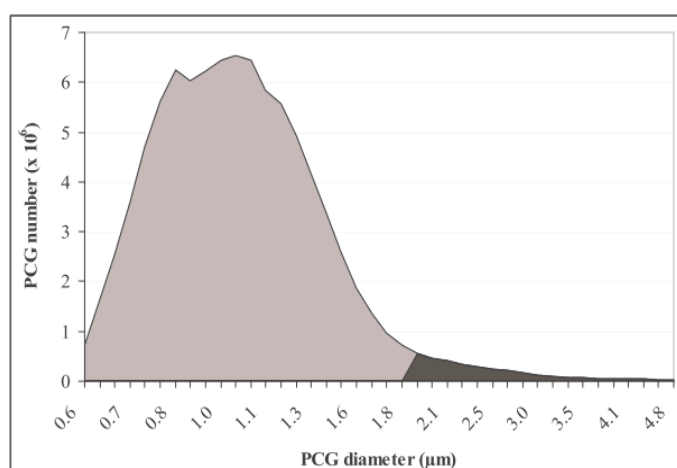


Figure 2: Particle size distribution of timothy grass pollen and their cytoplasmic granules was performed by Z2™ Coulter Counter® Z3 Multisizer™ and Coulter Counter® (Beckman Coulter). The grey area corresponds to PCG counts between 0.6 to 2 µm. The black area corresponds to the PCG counts between 2 to 5 µm.

The water-soluble protein concentrations, in pollen and isolated PCG, extracts are reported in Table 1. These protein concentrations were higher in extracts from pollen grains than those from PCG (76 µg/mL vs. 6.8 µg/mL, respectively). A significant correlation between the number of PCG and the content of water-soluble proteins in extract was found ($r^2 = 0.972$, $p < 0.01$) (Table 1). After each aqueous wash of PCG, a decrease of the protein concentration in the supernatant was observed. After 5 washes, water-soluble protein concentration was near to 0 (data not shown).

Our water pollen extract contains endotoxins, but the LAL results were negative with PCG extract and saline solution.

Table 1: Water-soluble protein concentrations in pollen and PCG extracts used for rats' immunization protocols.

| Allergen sources | Water-soluble protein concentrations (µg/mL) |
|----------------------------|--|
| NaCl 0.9% | 0 |
| Pollen: 0.5 mg | 76.0 ± 0.01 |
| PCG: 1.5 x 10 ⁶ | 0.1 ± 0.01 # |
| PCG: 1.5 x 10 ⁷ | 1.1 ± 0.06 # |
| PCG: 4.5 x 10 ⁷ | 3.6 ± 0.08 # |
| PCG: 0.5 mg | 6.8 ± 0.03 # |

Data were shown by Mean ± SEM. #: significantly different to pollen group ($p < 0.05$).

2. Pollen-specific IgE and IgG1 levels in serum

The IgE and IgG1 levels are presented on figure 3, a and b, respectively.

In contrast to NC, sensitization with 0.5 mg of whole pollen increased significantly pollen specific IgE and IgG1 levels. Among PCG groups, rats sensitized with 1.5 x 10⁶ and 1.5 x 10⁷ PCG showed no statistically difference with the NC group. The two other groups sensitized with 4.5 x 10⁷ and with 0.5 mg of PCG presented higher IgE and IgG1 levels than

NC group. All PCG-sensitized rats presented lower IgE and IgG1 responses than those of the pollen group.

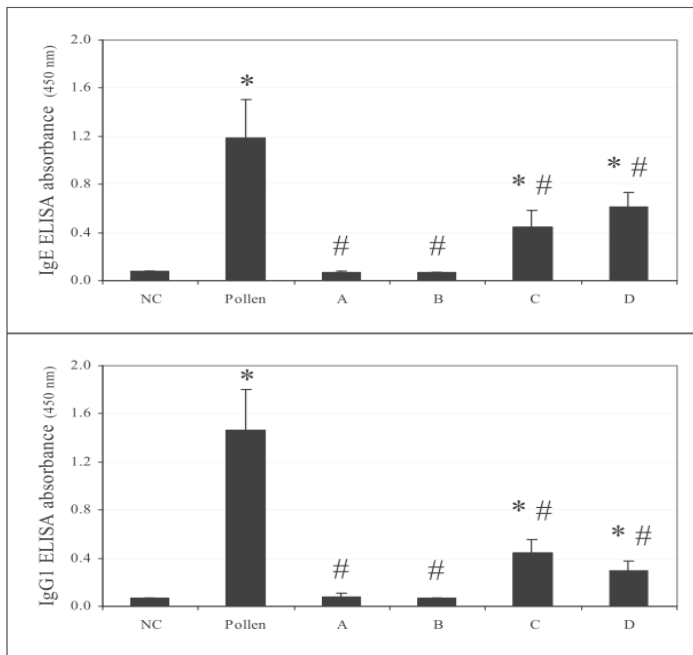


Figure 3: Timothy grass pollen specific IgE and IgG1 levels in sera (Mean \pm SEM). **NC**, negative control group; **pollen**, rats sensitized with 0.5 mg of pollen; **(A-D)** rats sensitized with PCG: **A**, 1.5×10^6 PCG; **B**, 1.5×10^7 PCG; **C**, 4.5×10^7 PCG; **D**, 0.5 mg of PCG. *: significantly different to NC ($p < 0.05$); #: significantly different to pollen group ($p < 0.05$).

3. Protein concentrations in BALF

Protein concentrations in the BALF are presented in figure 4. In contrast to NC, pollen group showed a significant increase of protein concentrations in BALF. All PCG-sensitized rats presented higher amounts of proteins than those of NC group. Compared to pollen group, BALF protein concentrations were lower in 1.5×10^6 and 1.5×10^7 PCG-sensitized groups. No significantly difference was found between protein concentration in BALF from 4.5×10^7 PCG-sensitized and pollen-sensitized groups. Rats sensitized by 0.5 mg of PCG presented higher protein concentration in BALF than the rat's pollen group.

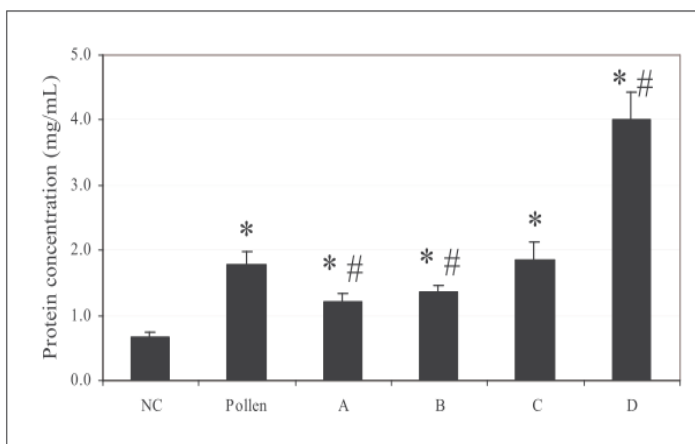


Figure 4: Protein concentration (Mean \pm SEM) in BALF. **NC**, negative control group; **pollen**, rats sensitized with 0.5 mg of pollen; **(A-D)** rats sensitized with PCG: **A**, 1.5×10^6 PCG; **B**, 1.5×10^7 PCG; **C**, 4.5×10^7 PCG; **D**, 0.5 mg of PCG. *: significantly different to NC ($p < 0.05$); #: significantly different to pollen group ($p < 0.05$).

4. Cytokines in BALF

Th1 Cytokine (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and IFN γ) and Th2 cytokines (IL-5, IL-13 and Rantes) concentrations were determined on rats sensitized with saline, pollen grains, and the 2 strongest concentrations of PCG (4.5×10^7 and 0.5 mg) (figure 5 and 6).

In comparison to NC group, all BALF cytokine concentration values were higher on pollen and PCG-sensitized rats, but some differences were statistically significant: (1) pollen grains increased significantly IL-6 and IFN γ concentrations; (2) 4.5×10^7 PCG increased significantly IL-1 β , IL-5, IL-13 and Rantes concentrations; (3) all cytokine concentrations were significantly higher on 0.5 mg of PCG-sensitized rats.

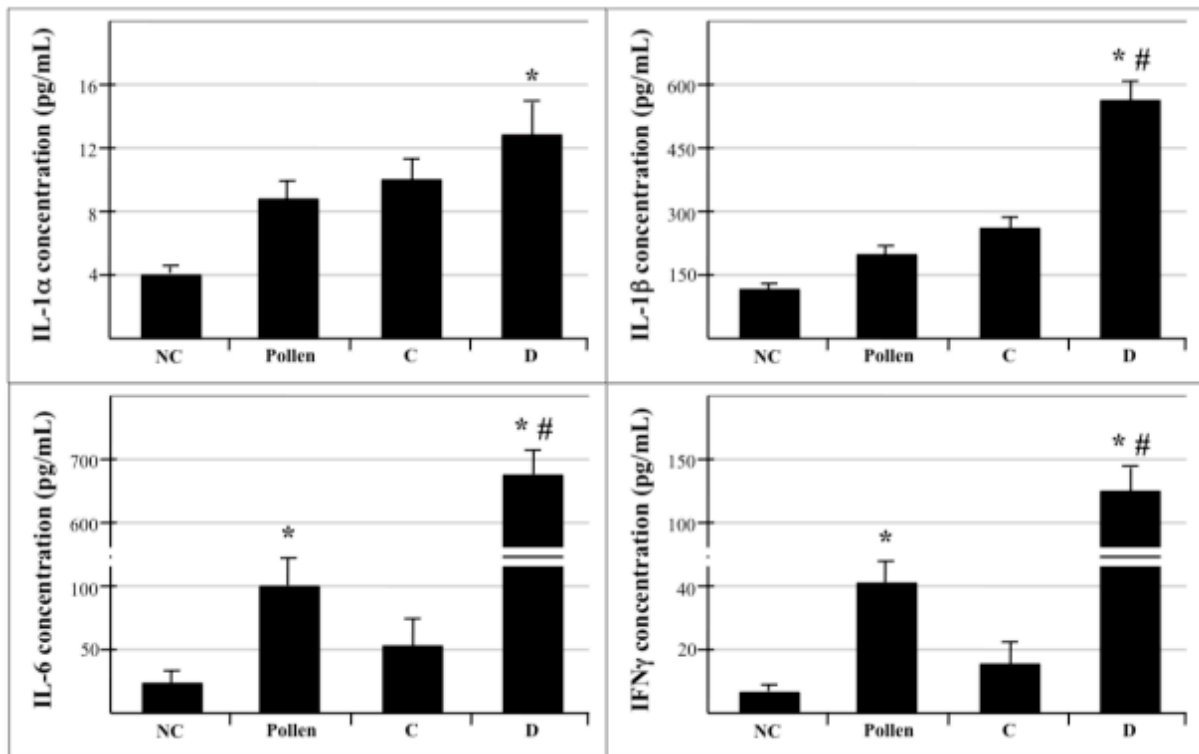


Figure 6: Th1 cytokine levels (Mean \pm SEM) in BALF. Th1 cytokines measured (pg/mL) are: IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and IFN γ . NC, negative control group; **pollen**, rats sensitized with 0.5 mg of pollen; (**C-D**) rats sensitized with PCG: C, 4.5×10^7 PCG; D, 0.5 mg of PCG. *: significantly different to NC ($p < 0.05$); #: significantly different to pollen group ($p < 0.05$).

Compared to pollen-sensitized rats, 4.5×10^7 PCG-sensitized rats presented higher Th2 cytokine concentrations, but the only statistically significant concentration increase was for Rantes. Among Th1 cytokines, IL-6 and IFN γ concentrations in BALF were higher on pollen-sensitized rats than 4.5×10^7 PCG-sensitized rats, but these differences were not statistically significant.

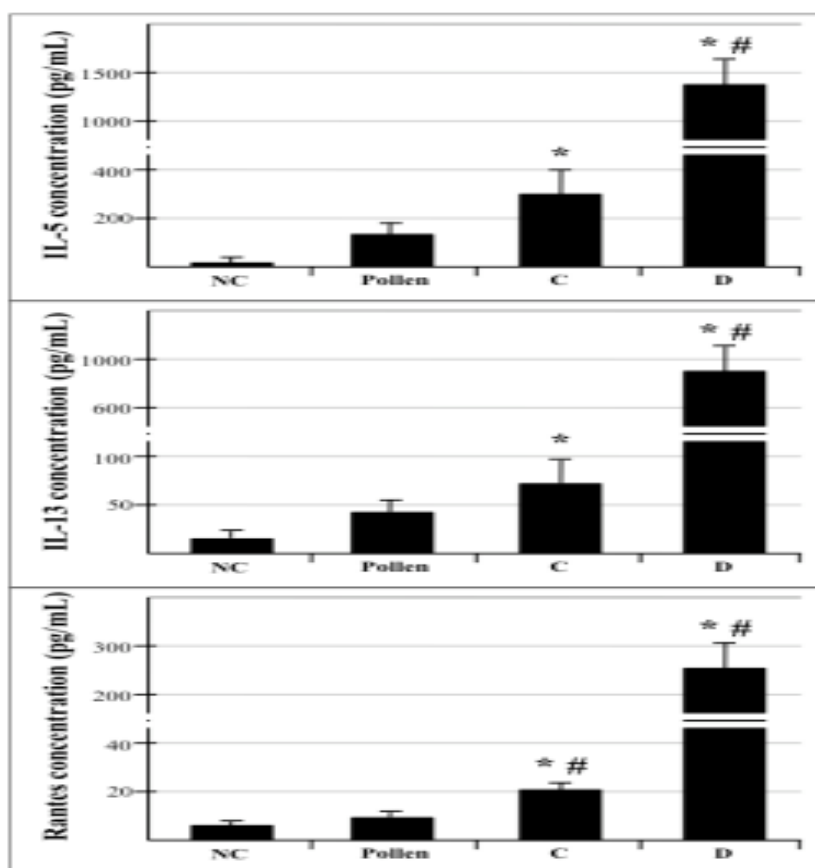


Figure 5: Th2 cytokine levels (Mean \pm SEM) in BALF. Th2 cytokines measured (pg/mL) are: IL-5, IL-13 and Rantes. **NC**, negative control group; **pollen**, rats sensitized with 0.5 mg of pollen; (**C-D**) rats sensitized with PCG: **C**, 4.5×10^7 PCG; **D**, 0.5 mg of PCG. *: significantly different to NC ($p < 0.05$); #: significantly different to pollen group ($p < 0.05$).

For the rats sensitized with 0.5 mg of PCG, all cytokine concentrations were significantly increased compared to pollen-sensitized rats, except for the IL-1 α increase which presented no significant difference.

5. Alveolar cells in BALF

In contrast to NC group, pollen-sensitized rats presented a higher significant number of macrophages, eosinophils and neutrophils (Table 2). Rats sensitized with 1.5×10^6 PCG presented no significant difference of alveolar cell number compared to NC but the 1.5×10^7 PCG dose significantly increased the macrophage level without affecting eosinophil and neutrophil levels. Moreover, the rats' immunization performed with the 2 highest doses of PCG (4.5×10^7 and 0.5 mg) lead to a significant increase of all alveolar cell types in BALF compared NC group.

When compared to pollen-sensitized rats, (1) 1.5×10^6 PCG-sensitized rats presented a significantly lower number of macrophages, eosinophils and neutrophils, (2) 1.5×10^7 PCG-sensitized rats presented a significant decrease of macrophage and neutrophil number in BALF, (3) rats sensitized with 4.5×10^7 PCG presented a decrease of macrophage number and, in the same time, an increase of eosinophils and lymphocytes, this third group being the only one with a statistically significant number, (4) the highest dose of PCG (0.5 mg) increased significantly eosinophil and lymphocyte numbers and lead to a small decrease of macrophage number (Table 2).

Table 2: Number and type of alveolar cells in BALF.

| Group | Macrophages (x 10 ⁶) | Eosinophils (x 10 ⁶) | Lymphocytes (x 10 ⁶) | Neutrophils (x 10 ⁶) |
|---------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| NC | 3.39 ± 0.44 | 0.40 ± 0.09 | 0.21 ± 0.06 | 0.03 ± 0.01 |
| Pollen | 7.85 ± 1.33 * | 4.00 ± 0.83 * | 0.11 ± 0.09 | 0.25 ± 0.11 * |
| A | 3.46 ± 0.41 # | 0.76 ± 0.23 # | 0.08 ± 0.03 | 0.02 ± 0.01 # |
| B | 6.45 ± 0.98 * | 0.68 ± 0.11 # | 0.07 ± 0.03 | 0.06 ± 0.02 |
| C | 6.95 ± 0.50 * | 5.32 ± 0.49 * | 0.63 ± 0.19 * # | 0.29 ± 0.13 * |
| D | 5.40 ± 1.58 * | 7.00 ± 1.33 * # | 0.98 ± 0.21 * # | 0.36 ± 0.10 * |

Data were expressed by Mean ± SEM. **NC**, negative control group; **Pollen**, rats sensitized with 0.5 mg of pollen; **A**, rats sensitized with 1.5×10^6 PCG; **B**, rats sensitized with 1.5×10^7 PCG; **C**, rats sensitized with 4.5×10^7 PCG; **D**, rats sensitized with 0.5 mg of PCG. *: significantly different to NC ($p < 0.05$); #: significantly different to pollen group ($p < 0.05$).

6. Lymph node cell proliferation induced by pollen or PCG

As expected, lymph node cell of pollen-sensitized rats presented a greater proliferation after *in vitro* addition of pollen grains (10 and 100 µg/mL, figure 7a, b, respectively) or PCG (9×10^5 and 9×10^6 PCG/mL, figure 7c, d respectively) than what was obtained with NC group. The lymph node cell proliferation response of animals sensitized with 1.5×10^6 and 1.5×10^7 PCG were not significantly different of NC group or only slightly increased, after *in vitro* addition of PCG and pollen, compared to NC group (figure 7).

After *in vitro* addition of 10 µg of pollen, slightly less proliferation was observed in lymph node cells from animals sensitized to the highest doses of PCG (4.5×10^7 and 0.5 mg) than for those issued from pollen-sensitized rats (figure 7a). In other experimental conditions (after addition of 100 µg/mL of pollen grains, 9×10^5 and 9×10^6 PCG/mL), similar proliferation responses were noted between PCG and pollen-sensitized rats (figure 7b, c, d).

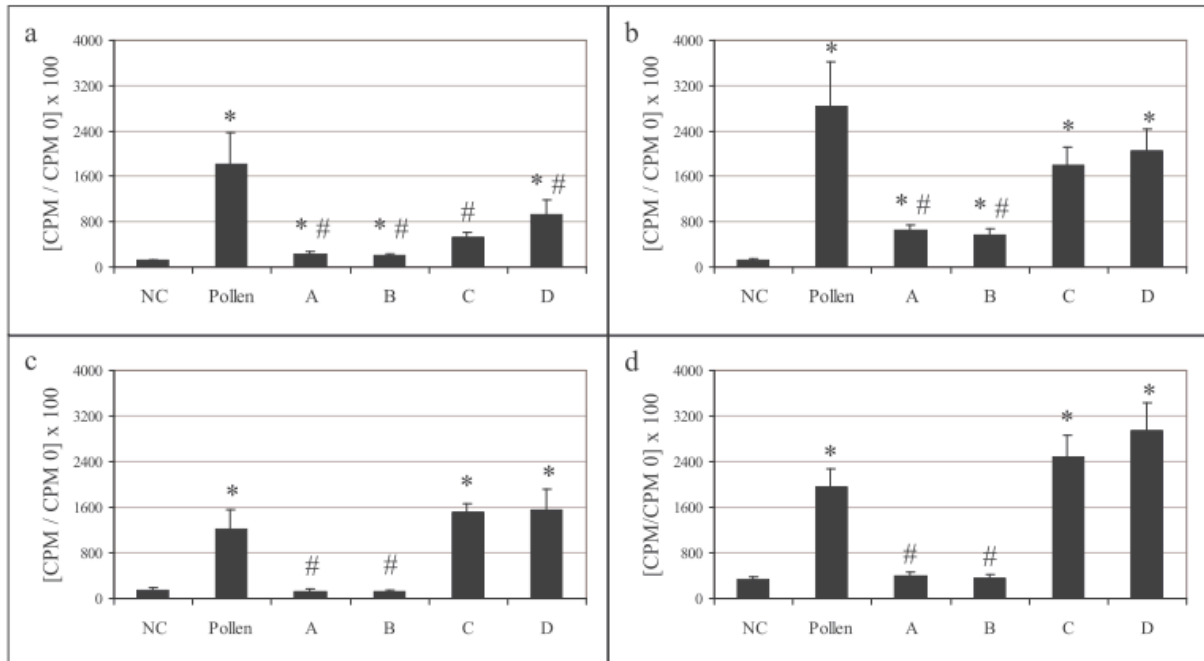


Figure 7: Pollen and PCG-induced proliferation of lymph node. Cells from NC, pollen or PCG-sensitized rats were cultured with [³H]-thymidine in the presence of pollen (10 and 100µg, a and b, respectively) and PCG (9×10^5 and 9×10^6 PCG, c and d respectively). CPM: thymidine incorporation by antigen-stimulated cells; CPM0: thymidine incorporation in control cells. **NC**, negative control group; **pollen**, rats sensitized with 0.5 mg of pollen; **A**, rats sensitized with PCG 1.5×10^6 PCG; **B**, rats sensitized with 1.5×10^7 PCG; **C**, rats sensitized with 4.5×10^7 PCG; **D**, rats sensitized with 0.5 mg of PCG. *: significantly different to NC (p<0.05); #: significantly different to pollen group (p<0.05).

Discussion

In this study, allergenic (humoral and cellular responses) and inflammatory activities induced by cytoplasmic granules of timothy grass pollen had been evaluated using Brown Norway rats. These activities were compared with what was obtained by whole pollen grains. This study is the first one in which the same immunization experimental design has been used for both PCG and pollen grains. Rats' immunizations performed by PCG and pollen grains were processed in parallel. Moreover, PCG doses, chosen for this study, correspond, in terms of

mass, to the amount of pollen (0.5 mg) and in terms of volume to quantities of PCG released from 0.5 mg of pollen, if 100% of pollen is broken (4.5×10^7 PCG) or if pollen is aged few days (1.5×10^7 PCG) or few months (1.5×10^6 PCG).

In our study, by a single sensitization and one challenge, the 2 strongest doses of PCG (4.5×10^7 and 0.5 mg) administered by intratracheally instillation, can induce an increase of IgE and IgG1 levels in sera. In our team, Motta et al (Motta et al., 2004a) previously showed also an increase of these parameters, after sensitization and twice challenge with PCG of timothy grass administered by intratracheally instillation, but this increase was higher than what has been obtained in the present study. This difference could be explained by the different PCG counting: Indeed, using the same filtration experiment, Motta et al (Motta et al., 2004b) counted PCG, by Z2 coulter which counted particles between 2 to 5 μm . This last fraction represents only 1/20 of PCG counted between 0.6 to 5 μm , by Z3 multisizer which was used in our PCG counting (figure 2).

However, in the present study, PCG induce lower humoral responses than pollen grains. The ratio between IgE levels on PCG-sensitized rats and those obtained on pollen-sensitized rats was of 33 % higher. This ratio was closer to this obtained by Motta et al (Motta et al., 2004b, Motta et al., 2004a), using a different design protocol, with 2 or 4 challenges. These differences could be explained by the presence of endotoxins in pollen extract.

In fact, Ormstad et al (Ormstad et al., 2003) showed a strong specific antibody response, both for IgE, IgG1 and IgG2a, when allergen and endotoxins (LPS) were injected simultaneously in mice. Also, differences of humoral responses, between PCG and pollen-sensitized rats, could be explained by the quantity and quality of allergens present on/in isolated PCG versus the pollen grains. PCG solutions, used for rats' immunization, contain water-insoluble allergens from PCG and very small amounts of water-soluble allergens from PCG and pollen grains. But pollen solution, used for rats' immunization, contains water-soluble and water-insoluble allergens from pollen grains and PCG (data not shown). In humans, Suphioglu et al (Suphioglu et al., 1992) showed that isolated granules are capable of triggering IgE-mediated reactions in grass pollen-sensitive patients.

Besides humoral responses, different parameters of cellular responses were evaluated. The different parameters of allergy taken into account were: Th2 cytokine concentrations, eosinophil numbers, lymphocyte numbers in BALF and lymph node cell proliferation. For these parameters, lower effect levels were founded for rats sensitized with 1.5×10^6 and

1.5×10^7 PCG in contrast to pollen-sensitized animals, but 4.5×10^7 PCG and 0.5 mg of PCG have induced similar and / or higher responses than pollen group.

Concerning the Th2 cytokine level, pollen-sensitized animals presented no significant difference with negative control (NC). Rats sensitized with 4.5×10^7 PCG showed increase of Th2 cytokine levels compared to NC and pollen-sensitized rats. Th2 cytokine levels were higher on rats sensitized with 0.5 mg of PCG comparing to NC and pollen-sensitized rats. In previous human studies, increases of IL-5 and IL-13 concentrations were shown in allergic patients (Kim et al., 2003, Till et al., 1997). Asthmatics presented also an increase of Rantes level in BALF during the pollen season compared to their Rantes level before pollen season (Venge et al., 1996). Moreover, asthmatic patients but not seasonal allergic rhinitis patients have increased levels of Rantes in sputum compared to healthy subjects (Barczyk et al., 2006).

In our experiments, 4.5×10^7 PCG and 0.5 mg of PCG doses induced a greater infiltration of eosinophils on lungs than what is obtained with NC and pollen-sensitized rats. But only 0.5 mg of PCG presented a significant difference, for eosinophil levels in BALF, with NC and pollen-sensitized rats. These results were here similar to other previous studies. Mice sensitized intraperitoneally with 150 μ g of ragweed pollen and challenged intranasally with 25 μ g of PCG presented an accumulation of eosinophils in the peribronchial area (Bacsi et al., 2006). In the other hand, in thunderstorm asthmatic patients, whose asthma is suspected to be caused by PCG, elevated sputum eosinophils are observed, compared to non-thunderstorm (Wark et al., 2002). Moreover, previous study showed that eosinophil number in sputum significantly increased with asthma severity (Wright et al., 2000).

In our study, the 2 strongest PCG concentrations provoked an increase of lymphocytes number in BALF, but any increase of BALF lymphocytes was observed on pollen-sensitized rats. Furthermore, when looking at human populations, dense lymphocyte infiltrations were observed in the bronchial walls on patients with severe asthma and in asthma related deaths (Jeffery et al., 1989).

It has to be noted also that, compared to NC, our findings reveal that the 2 greatest PCG concentrations and pollen grains induced a lymph node cell proliferation, *in vitro*. These T-cells mediated responses were similar on PCG and pollen-sensitized rats. The same type of results were previously obtained by Motta et al (Motta et al., 2004a, Motta et al., 2004b).

In this study, the majority of parameters in cellular responses were stronger on PCG-sensitized rats than on pollen-sensitized rats. Among these parameters, Rantes, eosinophils and lymphocytes in BALF showed statistically significant increases. These results suggest that PCG could induce an asthmatic rather than rhinitis response in contrast to pollen. Another experimental study support this hypothesis (Badorrek et al., 2008): by inhalation challenge, pollen grains elicit nasal symptoms and starch granules trigger lower airway inflammation in patients with allergic rhinitis or mild intermittent asthma. In another study, asthmatic volunteers showed a striking bronchial constriction following exposure to starch granules, only (Suphioglu et al., 1992). However, in our study, we didn't assess the bronchoconstriction because Brown Norway rats are not a good model for this parameter (Bice et al., 2000, Boverhof et al., 2008).

Among inflammatory parameters, protein and pro-inflammatory cytokine (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and IFN- γ) concentrations, macrophage and neutrophil numbers were studied in BALF. Some of these parameter findings showed that 4.5×10^7 PCG (PCG released by 0.5 mg of pollen grains if 100 % of pollen burst) provoke similar inflammatory responses than pollen grains. On rats sensitized with the strongest PCG dose (0.5 mg of PCG), inflammatory parameters were higher than those obtained in saline solution and pollen-sensitized rats. In mouse model allergy, PCG and pollen are potent inducers of inflammation in lower airways because of their antigenic content and also of NAD(P)H oxidase-generated oxidative stress (Bacsi et al., 2006, Boldogh et al., 2005). Moreover, (1 \rightarrow 3)- β -glucan, present in PCG and pollen grains, could also explain airways inflammation (Rylander et al., 1999).

In conclusion, PCG could induce humoral, cellular and inflammatory responses in Brown Norway rats by intratracheally instillation. In contrast to pollen-sensitized rats, humoral responses were lower in PCG-sensitized rats, but cellular responses higher. The cellular responses suggest that PCG could induce an asthmatic rather than rhinitis response in contrast to pollen.

In the future, we will compare the allergenicity of non-washed PCG and washed PCG. The characterization of PCG allergens will be performed by electrophoresis separation followed by immunoblot and mass spectrometry.

Acknowledgement

The present study was supported by the French Ministry of Environment and Sustainable Development (BCRD-DRC-05-AP-2005). The contribution of other participants of this study is also acknowledged: Franck ROBIDEL, Emmanuelle MAILLOT-MARÉCHAL and Olivier DUPONT (INERIS). We thank Dr Jean-Pierre SUTRA for helpful discussions.

References

- Bacsi, Attila, Choudhury, Barun K., Dharajiy, Nilesh, Sur, Sanjiv & Boldogh, Istvan, 2006. Subpollen particles: Carriers of allergenic proteins and oxidases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 118, 844-850.
- Badorrek, P., Larbig, M., Dick, M., Kock, W., Hecker, H., Hofield, J. & Krug, N., 2008. The role of pollen starch granules in bronchial inflammation. *Allergy* 63, 65.
- Barczyk, A., Sozanska, E., Farnik, M., Stepniak-Ziolkiewicz, I., Nizio-Masior, J. & Pierzchala, W., 2006. Increased levels of RANTES in induced sputum of chronic asthma but not in seasonal grass pollen-induced rhinitis. *Pneumonol Alergol Pol* 74, 191-6.
- Behrendt, H. & Beckert, W. M., 2001. Localization, release and bioavailability of pollen allergens: the influence of environmental factors. *Current Opinion in Immunology* 13, 709-715.
- Bice, D. E., Seagrave, J. & Green, F. H., 2000. Animal models of asthma: potential usefulness for studying health effects of inhaled particles. *Inhal Toxicol* 12, 829-62.
- Boldogh, I., Bacsi, A., Choudhury, B. K., Dharajiy, N., Alam, R., Hazra, T. K., Mitra, S., Goldblum, R. M. & Sur, S., 2005. ROS generated by pollen NADPH oxidase provide a signal that augments antigen-induced allergic airway inflammation. *J Clin Invest* 115, 2169-79.
- Boverhof, D. R., Billington, R., Gollapudi, B. B., Hotchkiss, J. A., Krieger, S. M., Poole, A., Wiescinski, C. M. & Woolhiser, M. R., 2008. Respiratory sensitization and allergy: current research approaches and needs. *Toxicol Appl Pharmacol* 226, 1-13.
- D'Amato, G., Liccardi, G. & Frenguelli, G., 2007. Thunderstorm-asthma and pollen allergy. *Allergy* 62, 11-6.
- D'Amato, G., Liccardi, G., Russo, M. & D'Amato, M., 2000. On the interrelationship between outdoor air pollution and respiratory allergy. *Aerobiologia* 16, 1-6.
- Fischer, S., Grote, M., Fahlbusch, B., Muller, W. D., Kraft, D. & Valenta, R., 1996. Characterization of Phl p 4, a major timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen. *J Allergy Clin Immunol* 98, 189-98.
- Grote, M., Dolecek, C., Van Ree, R. & Valenta, R., 1994. Immunogold electron microscopic localization of timothy grass (*Phleum pratense*) pollen major allergens Phl p I and Phl p V after anhydrous fixation in acrolein vapor. *J Histochem Cytochem* 42, 427-31.
- Jeffery, P. K., Wardlaw, A. J., Nelson, F. C., Collins, J. V. & Kay, A. B., 1989. Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 140, 1745-53.
- Kim, Chang Keun, Kim, Sang Woo, Park, Choon Sik, Kim, Beyong Il, Kang, Hee & Koh, Young Yull, 2003. Bronchoalveolar lavage cytokine profiles in acute asthma and acute bronchiolitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 112, 64-71.
- Lacroix, G., 2005. Allergies respiratoires, pollens et polluants = Respiratory allergy, pollen and pollutants. *Archives des maladies professionnelles et de l'environnement* 66, 584-591.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.,1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-75.
- Mahler, V., Diepgen, T. L., Kubeta, O., Leakakos, T., Truscott, W., Schuler, G., Kraft, D. & Valenta, R.,2000. Mutual boosting effects of sensitization with timothy grass pollen and latex glove extract on IgE antibody responses in a mouse model. *J Invest Dermatol* 114, 1039-43.
- Motta, A. C., Dormans, J. A., Peltre, G., Lacroix, G., Bois, F. Y. & Steerenberg, P. A.,2004a. Intratracheal instillation of cytoplasmic granules from *Phleum pratense* pollen induces IgE- and cell-mediated responses in the Brown Norway rat. *Int Arch Allergy Immunol* 135, 24-9.
- Motta, A. C., Marliere, M., Peltre, G., Sterenberg, P. A. & Lacroix, G.,2006. Traffic-related air pollutants induce the release of allergen-containing cytoplasmic granules from grass pollen. *Int Arch Allergy Immunol* 139, 294-8.
- Motta, A.C., Peltre, G., Dormans, J. A., Withagen, C. E., Lacroix, G., Bois, F. & Steerenberg, P. A.,2004b. *Phleum pratense* pollen starch granules induce humoral and cell-mediated immune responses in a rat model of allergy. *Clin Exp Allergy* 34, 310-4.
- Ormstad, H., Groeng, E. C., Duffort, O. & Lovik, M.,2003. The effect of endotoxin on the production of IgE, IgG1 and IgG2a antibodies against the cat allergen Fel d 1 in mice. *Toxicology* 188, 309-18.
- Rylander, R., Fogelmark, B., McWilliam, A. & Currie, A.,1999. (1->3)-beta-D-glucan may contribute to pollen sensitivity. *Clin Exp Immunol* 115, 383-4.
- Schappi, G. F., Taylor, P. E., Staff, I. A., Rolland, J. M. & Suphioglu, C.,1999. Immunologic significance of respirable atmospheric starch granules containing major birch allergen Bet v 1. *Allergy* 54, 478-83.
- Singh, M. B., Hough, T., Theerakulpisut, P., Avjioglu, A., Davies, S., Smith, P. M., Taylor, P., Simpson, R. J., Ward, L. D., McCluskey, J. & Et Al.,1991. Isolation of cDNA encoding a newly identified major allergenic protein of rye-grass pollen: intracellular targeting to the amyloplast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1384-8.
- Steerenberg, P. A., Dormans, J. A., Van Doorn, C. C., Middendorp, S., Vos, J. G. & Van Loveren, H.,1999. A pollen model in the rat for testing adjuvant activity of air pollution components. *Inhal Toxicol* 11, 1109-22.
- Suphioglu, C.,1998. Thunderstorm asthma due to grass pollen. *Int Arch Allergy Immunol* 116, 253-60.
- Suphioglu, C., Singh, M. B., Taylor, P., Bellomo, R., Holmes, P., Puy, R. & Knox, R. B.,1992. Mechanism of grass-pollen-induced asthma. *Lancet* 339, 569-72.
- Szelenyi, I.,2000. Animal models of bronchial asthma. *Inflamm Res* 49, 639-54.
- Taylor, P. E., Flagan, R. C., Miguel, A. G., Valenta, R. & Glovsky, M. M.,2004. Birch pollen rupture and the release of aerosols of respirable allergens. *Clin Exp Allergy* 34, 1591-6.
- Taylor, P. E., Flagan, R. C., Valenta, R. & Glovsky, M. M.,2002. Release of allergens as respirable aerosols: A link between grass pollen and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 109, 51-6.
- Taylor, P. E., Staff, I. A., Singh, M. B. & Knox, R. B.,1994. Localization of the two major allergens in rye-grass pollen using specific monoclonal antibodies and quantitative analysis of immunogold labelling. *Histochem J* 26, 392-401.
- Till, S., Durham, S., Dickason, R., Huston, D., Bungre, J., Walker, S., Robinson, D., Kay, A. B. & Corrigan, C.,1997. IL-13 production by allergen-stimulated T cells is increased in allergic disease and associated with IL-5 but not IFN-gamma expression. *Immunology* 91, 53-7.

Venge, J., Lampinen, M., Hakansson, L., Rak, S. & Venge, P.,1996. Identification of IL-5 and RANTES as the major eosinophil chemoattractants in the asthmatic lung. *J Allergy Clin Immunol* 97, 1110-5.

Vrtala, S., Fischer, S., Grote, M., Vangelista, L., Pastore, A., Sperr, W. R., Valent, P., Reichelt, R., Kraft, D. & Valenta, R.,1999. Molecular, immunological, and structural characterization of Phl p 6, a major allergen and P-particle-associated protein from Timothy grass (*Phleum pratense*) pollen. *J Immunol* 163, 5489-96.

Wark, P. A., Simpson, J., Hensley, M. J. & Gibson, P. G.,2002. Airway inflammation in thunderstorm asthma. *Clin Exp Allergy* 32, 1750-6.

Wright, S. M., Hockey, P. M., Enhorning, G., Strong, P., Reid, K. B., Holgate, S. T., Djukanovic, R. & Postle, A. D.,2000. Altered airway surfactant phospholipid composition and reduced lung function in asthma. *J Appl Physiol* 89, 1283-92.

3.3. ARTICLE 3

About the allergenic potential of *Phleum pratense* pollen cytoplasmic granules: new elements from a Brown Norway rat model.

World allergy organization Journal

ABOU CHAKRA Oussama R., SUTRA Jean-Pierre, ROGERIEUX Françoise,
PELTRE Gabriel, SÉNÉCHAL Hélène and LACROIX Ghislaine

Abstract

Background: Grass pollen is one of the most important aeroallergens vectors in Europe. Under some meteorological factors, pollen grains can release pollen cytoplasmic granules (PCG). PCG induce allergic responses. Several studies have shown that, during thunderstorm periods, the number of asthmatic patients increase because of higher PCG airborne concentrations.

Objective: The aims of the study were to assess the allergenicity of combined effects between pollen and PCG and to compare it with allergenicity of timothy grass pollen and PCG in Brown Norway rats.

Methods: Rats were sensitized (day 0) and challenged (day 21) with pollen grains and/or PCG. Four groups were studied: Pollen, PCG, Pollen-PCG and PCG-Pollen. Blood samples, Bronchoalveolar Lavage fluid (BALF) and bronchial lymph node were collected at day 25. IgE and IgG1 levels in sera were assessed by ELISA. Alveolar cells, total protein and cytokine concentrations were quantified in BALF. T-cell proliferation, in response to pollen or granules, was performed by lymph node assay.

Results: The combined effects between pollen and PCG increased IgE and IgG1 levels when compared to negative control. These increases were lower than those on pollen group but similar to the levels obtained by PCG group. Used in whatever the sensitization and/or challenge phase, PCG increased lymphocyte and Rantes levels compared to pollen group. The combined effects in the pollen-PCG and PCG-pollen groups increased IL-1 α and IL-1 β compared to only pollen and PCG groups.

Conclusion: A combination of allergic effects has been shown between pollen and PCG. For humoral and cellular allergic responses, the combined effects observed between the 2 aeroallergens, used in this study, seem to be driven mainly by PCG.

Keywords: Timothy grass pollen; Pollen Cytoplasmic Granules; Allergy; Inflammation.

Introduction

Grass pollen is one of the most important aeroallergen vectors in the world, inducing respiratory allergic diseases such as asthma and hay fever. These diseases are currently a major public health problem worldwide, in particular in industrialized countries. Over the last decades, epidemiological studies have shown that the prevalence of allergic diseases has dramatically increased, especially in the young people and those living in big cities. [1]

These atopic diseases are complex inflammatory disorders influenced by both genetic and environmental factors among which the atmospheric dispersion of pollen grains seems to take an important role. However, although the symptoms associated with these affections coincide with the pollination season, it is now well established that simple and direct relation does not exist between these two phenomena and that, in the same time, several other factors must be taken into account. [2]

In parallel, some studies have shown that, under specific meteorological factors such as thunderstorm or light rainfall and also contamination with airborne pollutants, pollen grains can release in the atmosphere several hundred of small particles called pollen cytoplasmic granules (PCG) [3, 4]. The likelihood that whole grass pollen grains (15 – 60 μm) will reach the deeper human airways is low, but PCG ($< 5 \mu\text{m}$) might penetrate into the lower respiratory tract and so induce symptoms of bronchial asthma and / or hay fever [5, 6]. In fact, several studies noted an exacerbation of the number of asthmatic patients after thunderstorm episode because of higher PCG airborne concentration after such meteorological episodes ([7, 8].

Experimental studies showed that PCG can induce allergic reaction in pollen and PCG sensitized animals [9, 10]. Moreover, PCG can elicit a positive skin prick test for allergic patients and may cause a bronchial obstruction, during thunderstorm for those suffering asthma [4].

Although most major allergens, Phl p 4 and Phl p 5 were present in the pollen grains (cytoplasmic matrix and in the membranes) and in their PCG [11, 12], other allergens, such as Phl p 6 and Phl p 13, were associated only with PCG [13, 14]. For these reasons, the goal of this study was to evaluate, with a rat allergy model, the allergenic potential of combined effects between pollen and PCG and to compare it with the allergenicity of whole timothy grass pollen and of PCG, separately. Humoral, cellular and inflammatory responses have been

assessed following intratracheally instillation of PCG and / or whole pollen in Brown Norway rats.

Methods

1. Animals

Six-week-old male Brown Norway (BN) rats were obtained from Charles River Laboratories (France). Animals were housed in the INERIS animal-care unit, a facility accredited by the Departmental Direction of Veterinary Services. They had free access to conventional laboratory feed and water. They were handled in accordance with French State Council guidelines for the care and use of laboratory animals (Decree 87-849, October 19th 1987) and experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Comity at the INERIS.

2. Pollen and PCG

Pollen grains from Timothy grass (*Phleum pratense*) were obtained from Allerbio AB (Varennes-en-Argonne, France).

PCG (0.6 - 5 μm) were isolated from *Phleum pratense* pollen by osmotic shock in pure water followed by filtration, centrifugation and two washes in distilled water. PCG were resuspended in saline solution. They were counted with a particle counter (Z3 multisizer, Beckman Coulter).

3. Sensitization and challenge of the rats

Animals were anesthetized by an intramuscular injection of a mixture of ketamine hydrochloride (0.5 mg/kg body weight), atropine (0.1 mg/kg body weight) and xylazine (1 mg/kg body weight).

Sensitization at day 0 and challenge at day 21 were performed by intratracheal instillation of 150 μL of pollen grains (0.5 mg/rat) and / or PCG (4.5×10^7 /rat) in aqueous suspension used as allergen sources.

For allergic combined effects, 2 groups were studied (Table 1). Rats of the “pollen-PCG” group were sensitized with pollen and challenged with PCG. Rats of the “PCG-pollen” group were sensitized with PCG and challenged with pollen. For a comparison to the previous groups, two other groups were also studied. In these groups, sensitization and challenge were

performed with the same aeroallergen: “Pollen group” rats sensitized and challenged with only pollen grains and “PCG group” rats sensitized and challenged with only PCG. A last group served as negative control (NC): animals received only saline solution (Table 1).

Table 1: Experimental design

| Group | N* | Allergen sources | |
|------------------|----|-----------------------|--------------------|
| | | Sensitization – day 0 | Challenge – day 21 |
| Negative Control | 6 | NaCl 0.9% | |
| Pollen | 6 | Pollen grains | |
| PCG | 6 | Isolated PCG | |
| Pollen-PCG | 6 | Pollen grains | Isolated PCG |
| PCG-Pollen | 6 | Isolated PCG | Pollen grains |

*: number of rats per group. Total rats studied: 30.

4. Autopsy

At day 25, rats were anaesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital (150 mg/kg body weight). They were exsanguinated by cutting the inferior *Vena Cava* after blood taking. Bronchoalveolar Lavage (BAL) fluids, blood samples and bronchial lymph nodes were collected.

5. Serum sample

After collection, blood was kept at 4 °C for about 2-4 h for clotting. The blood samples were then centrifuged for 10 min at 2000 x g at 4 °C. Serum was removed and stored in 500 µL aliquots at – 80 °C until use.

6. Bronchoalveolar Lavage fluid (BALF)

Lungs were washed 3 times with 10 ml of PBS (pH 7.2). Fluid collected from the BAL of each animal was centrifuged at 150 x g for 10 min.

Different parameters were studied in BALF:

BALF alveolar cells were counted and then isolated by centrifugation (300 rpm, 5 min). Cell differential counts were performed after May-Grünwald Giemsa cytospin slide preparation.

Cell-free BALF was concentrated using Amicon Ultra tubes® (Millipore) until the volume is equal to 1 ml and, after that, protein concentrations were determined by Lowry method (Lowry, 1951).

Cytokines were quantified in concentrated BALF, firstly, using bio-plex kit for IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN γ and TNF α (Cat n°: 171K11070, Biorad, France) and, secondly, rat cytokine multiplex immunoassay kit for IL-5, IL-13 and Rantes (Cat n° RCYTO-80k-04, Linko, Millipore, France) according to the manufacturer's instructions.

7. ELISA for specific anti-timothy pollen IgE and IgG1

The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed in serum according to previous studies of our team. [9, 10, 15]

8. Bronchial Lymph Node Cell Assay

The bronchial lymph node assay previously described [15] has been slightly modified. Briefly, isolated lymph nodes cells were incubated, with and without allergen sources (Pollen: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; PCG: 9×10^6 PCG/mL), for 3 days in humidified atmosphere. Then, cells were incubated 24 h with 10 $\mu\text{l}/\text{well}$ [^3H]-thymidine (Amersham, Buckinghamshire, UK, 37 kBq/ml) and harvested for scintillation counting in a β -plate counter (1205 Betaplate™ Wallac, Turku, Finland) to measure cell proliferation. T-cell reactivity was expressed as counts per minute (cpm).

9. Statistical analysis

The results of all studied parameters are expressed as means \pm SEM. For statistical analysis, the non-parametric tests (Kruskall-Wallis and Mann-Whitney) were used. The results were considered significant when a p-value < 0.05 was found.

Results

1. Pollen-specific IgE and IgG1 levels in rat sera

In contrast to NC group, pollen grains induced high increase of IgE and IgG1 levels in sera and PCG lower levels for these two immunoglobulins. In both cases, these increases were statistically significant. (Figure 1 A and B)

Compared to NC group, pollen-PCG rats' group had a significantly high IgE and IgG1 levels. Rats sensitized with pollen and challenged with PCG presented significantly lower IgE and IgG1 levels than pollen group. Pollen-PCG and PCG groups presented no significant difference for IgE and IgG1 levels. (Figure 1 A and B)

Compared to NC group, PCG-pollen rats' group had statistically significant high IgE and IgG1 levels. Rats sensitized with PCG and challenged with pollen presented significantly lower IgE and IgG1 levels than pollen group. IgE and IgG1 levels on rats sensitized with PCG (PCG-pollen and PCG groups) had no significant difference. (Figure 1 A and B)

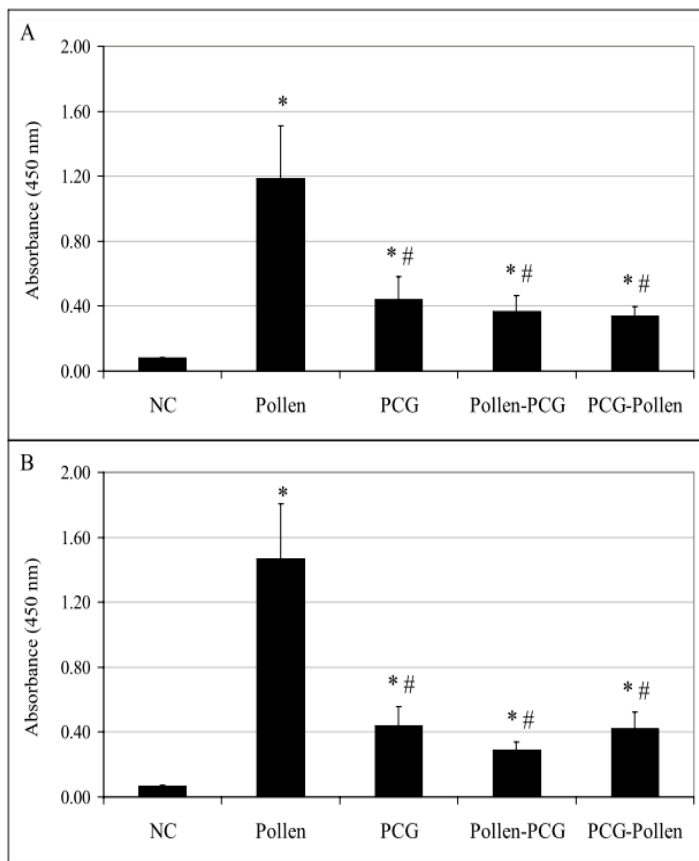


Figure 1: Timothy grass pollen specific IgE and IgG1 levels in sera (Mean \pm SEM). **NC**: negative control group; **pollen**: rats sensitized and challenged with 0.5 mg of pollen; **PCG**: rats sensitized and challenged with 4.5×10^7 PCG; **Pollen-PCG**: rats sensitized with 0.5 mg of pollen and challenged with 4.5×10^7 PCG; **PCG-pollen**: Rats sensitized with 4.5×10^7 PCG and challenged with 0.5 mg of pollen. *: significantly different to NC ($p < 0.05$); #: significantly different to pollen group ($p < 0.05$). (A): ELISA performed for IgE measures; (B): ELISA performed for IgG1 measures.

2. Protein concentrations in BALF

In contrast to NC group, pollen grains and PCG increased significantly the protein concentrations in BALF (Table 2). The ratio of this parameter between pollen and NC groups was 2.7/1 and it was 2.8/1 between PCG and NC groups.

Rats sensitized with pollen grains and challenged with PCG (pollen-PCG group) presented significantly higher protein concentrations in comparison of NC group. The ratio of protein concentrations between pollen-PCG and NC groups was 3.4/1. The protein concentrations on Pollen-PCG rats' group were higher than those obtained on pollen and PCG groups, but not statistically significant. (Table 2)

Identical results, concerning protein concentrations, were observed on PCG-pollen group. The protein concentrations on PCG-pollen group were significantly higher than those of NC group. The ratio of protein concentrations between PCG-pollen and NC groups was 3.7/1. In contrast to pollen and PCG groups, rats sensitized with PCG and challenged with pollen grains presented increases of protein concentrations, but these increases were no statistically significant.

3. Cytokines in BALF

Th1 cytokines studied were: IL-2, IL-6, IL-10, IFN γ and TNF α . (Table 2)

In contrast to NC group, pollen induced significantly increases of several Th1 cytokine levels: IL-6, IL-10, IFN γ and TNF α . Moreover, PCG increased these 4 Th1 cytokine levels compared to NC group, but the increase levels were statistically significant for IL-10 and TNF α only. For these two groups (pollen and PCG), the increase levels of IL-2 were not statistically significant.

Rats sensitized with pollen and challenged with PCG presented increases of all Th1 cytokine levels compared to NC group, but these increases were statistically significant for only IL-10 and TNF α levels. Although pollen-PCG group had lower IL-6 and IFN γ levels in BALF than those of pollen group, no statistically significant difference was showed. Pollen-PCG group had an identical Th1 cytokine profile than those of PCG group.

Compared to NC group, PCG-pollen group showed increases of all Th1 cytokine levels, but these increases were statistically significant for only IL-10 and TNF α levels. Rats sensitized with PCG and challenged with pollen grains presented lower IL-6 and IFN γ levels and higher IL-2 levels when compared to PCG group. But these differences were no statistically significant. Moreover, for the Th1 cytokine levels, no significant difference was observed between PCG-pollen and PCG groups.

Th2 cytokines studied were: IL-4, IL-5, IL-13 and Rantes. (Table 2)

In contrast to NC group, pollen grains induced increases of all Th2 cytokine levels, but the increases observed were not statistically significant. PCG let increase also all Th2 cytokine levels; significant increases were observed for IL-5, IL-13 and Rantes levels.

Pollen-PCG rats' group presented increases of all Th2 cytokine levels, but these increases were statistically significant for only IL-5 and Rantes levels. Pollen-PCG group presented significant increase of Rantes levels in BALF compared to those of pollen group. Although pollen-PCG group presented lower IL-5 and IL-13 levels than those obtained on PCG group, no statistically significant difference was showed.

Compared to NC group, PCG-pollen group presented increases of all Th2 cytokine levels. Significant increases were observed for IL-5, IL-13 and Rantes levels. Rats sensitized with PCG and challenged with pollen grains presented higher Th2 cytokine levels, but, for increase of Rantes, it was the only one to be statistically significant. PCG-pollen rats' group showed higher IL-5 levels than those obtained on PCG group, but this increase was not statistically significant.

The Th2/Th1 ratio, allowing a more synthetic appreciation between Th2 and Th1 cytokine levels, was calculated. (Table 2)

$$\text{Th2/Th1 ratio} = \frac{(\text{IL-4} + \text{IL-5} + \text{IL-13} + \text{Rantes})}{(\text{IL-2} + \text{IL-6} + \text{IL-10} + \text{IFN}\gamma + \text{TNF}\alpha)}$$

In contrast to NC group, pollen induced a small, not statistically significant, decrease of the Th2/Th1 ratio. However, PCG significantly increased this ratio compared to NC group.

Rats sensitized with pollen grains and challenged with PCG (pollen-PCG group) presented no significant difference of Th2/Th1 ratio in comparison of NC group. Th2/Th1 ratio on pollen-PCG group was higher, but no significant, in comparison to pollen group. Pollen-PCG group had significantly lower values of Th2/Th1 ratio in comparison to PCG group.

PCG-pollen group presented significantly higher Th2/Th1 ratio than those obtained in NC and pollen groups. PCG-pollen showed also a higher Th2/Th1 ratio than the PCG group, but this difference was no statistically significant.

Other cytokines were also studied: IL-1 α and IL-1 β . (Table 2)

Table 2: Protein concentrations and cytokine levels (Mean ± SEM) in BALF.

| | NC | Pollen | PCG | Pollen-PCG | PCG-Pollen |
|--------------------------------|-------------|---------------|----------------|----------------|----------------|
| Protein (mg/mL) | 0.66 ± 0.09 | 1.79 ± 0.19 * | 1.85 ± 0.27 * | 2.23 ± 0.18 * | 2.44 ± 0.30 * |
| Th1 cytokines (pg/mL) | | | | | |
| IL-2 | 1.3 ± 0.7 | 2.8 ± 1.0 | 2.2 ± 0.6 | 2.4 ± 0.7 | 4.4 ± 1.3 |
| IL-6 | 21 ± 8 | 98 ± 20 * | 55 ± 18 | 50 ± 10 | 74 ± 21 |
| IL-10 | 4.4 ± 2.7 | 17.0 ± 3.8 * | 18.6 ± 4.9 * | 17.7 ± 3.3 * | 18.4 ± 6.3 * |
| IFNγ | 6.9 ± 5.7 | 41.8 ± 11.9 * | 16.6 ± 6.0 | 18.2 ± 4.7 | 24.2 ± 9.4 |
| TNFα | 12 ± 8 | 71 ± 11 * | 72 ± 11 * | 69 ± 18 * | 86 ± 20 * |
| Th2 cytokines (pg/mL) | | | | | |
| IL-4 | 11.3 ± 7.3 | 18.4 ± 7.2 | 22.5 ± 9.6 | 17.7 ± 8.7 | (28.9) (I) |
| IL-5 | 13 ± 6 | 142 ± 51 | 316 ± 110 * | 131 ± 31 * | 655 ± 226 * |
| IL-13 | 14.5 ± 6.0 | 43 ± 9.6 | 61.0 ± 21.4 * | 32.7 ± 6.4 | 51.3 ± 14.7 * |
| Rantes | 6.8 ± 1.8 | 9.9 ± 2.2 | 22.4 ± 3.1 *# | 26.1 ± 2.2 *# | 31.4 ± 4.8 *# |
| Th2/Th1 ratio (2) | 1.00 ± 0.25 | 0.92 ± 0.23 | 2.57 ± 0.52 *# | 1.19 ± 0.01 + | 3.70 ± 0.32 *# |
| Other cytokines (pg/mL) | | | | | |
| IL-1α | 4.8 ± 1.9 | 8.4 ± 1.8 | 9.9 ± 1.5 | 19.9 ± 1.7 *#+ | 27.7 ± 6.1 *#+ |
| IL-1β | 120 ± 20 | 186 ± 31 | 257 ± 40 * | 627 ± 62 *#+ | 645 ± 114 *#+ |

NC: negative control group; **pollen:** rats sensitized and challenged with 0.5 mg of pollen; **PCG:** rats sensitized and challenged with 4.5×10^7 PCG; **Pollen-PCG:** rats sensitized with 0.5 mg of pollen and challenged with 4.5×10^7 PCG; **PCG-pollen:** Rats sensitized with 4.5×10^7 PCG and challenged with 0.5 mg of pollen. *: significantly different to NC ($p < 0.05$); #: significantly different to pollen group ($p < 0.05$); +: significantly different to PCG group ($p < 0.05$).

(1) In this group, a single rat presented IL-4 in BALF.

(2) $\text{Th2/Th1 ratio} = (\text{IL-4} + \text{IL-5} + \text{IL-13} + \text{Rantes}) / (\text{IL-2} + \text{IL-6} + \text{IL-10} + \text{IFN}\gamma + \text{TNF}\alpha)$.

Compared to NC group, pollen grains induced increases of IL-1 α and IL-1 β levels in BALF, but these increases were not statistically significant. Moreover, PCG group presented higher IL-1 α and IL-1 β levels than NC group and the increase was statistically significant only for IL-1 β .

Rats sensitized with pollen grains and sensitized with PCG (pollen-PCG group) presented a significantly higher IL-1 α and IL-1 β levels than those obtained on NC, pollen and PCG rats' groups.

Identical results were observed on the PCG-pollen group rats for which levels of IL-1 α and IL-1 β were significantly higher than those obtained on NC, pollen and PCG rats' groups.

4. Alveolar cells in BALF

Pollen and PCG groups presented a significantly higher macrophage, eosinophil and neutrophil numbers in BALF than the NC group. But for PCG group only, lymphocyte numbers was significantly higher than NC. (Figure 2)

Compared to NC group, pollen-PCG group had statistically significant high macrophage, eosinophil, lymphocyte and neutrophil numbers. Rats sensitized with pollen and challenged with PCG presented significantly higher lymphocyte number than those of the pollen group. Pollen-PCG and PCG groups presented no significant difference for all alveolar cell numbers in BALF. (Figure 2)

Compared to NC group, PCG-pollen group had significantly high macrophage, eosinophil, lymphocyte and neutrophil numbers. Rats sensitized with PCG and challenged with pollen presented significantly higher lymphocyte numbers than those of pollen group. All alveolar cell numbers on rats sensitized with PCG (PCG-pollen and PCG groups) had no statistically significant difference. (Figure 2)

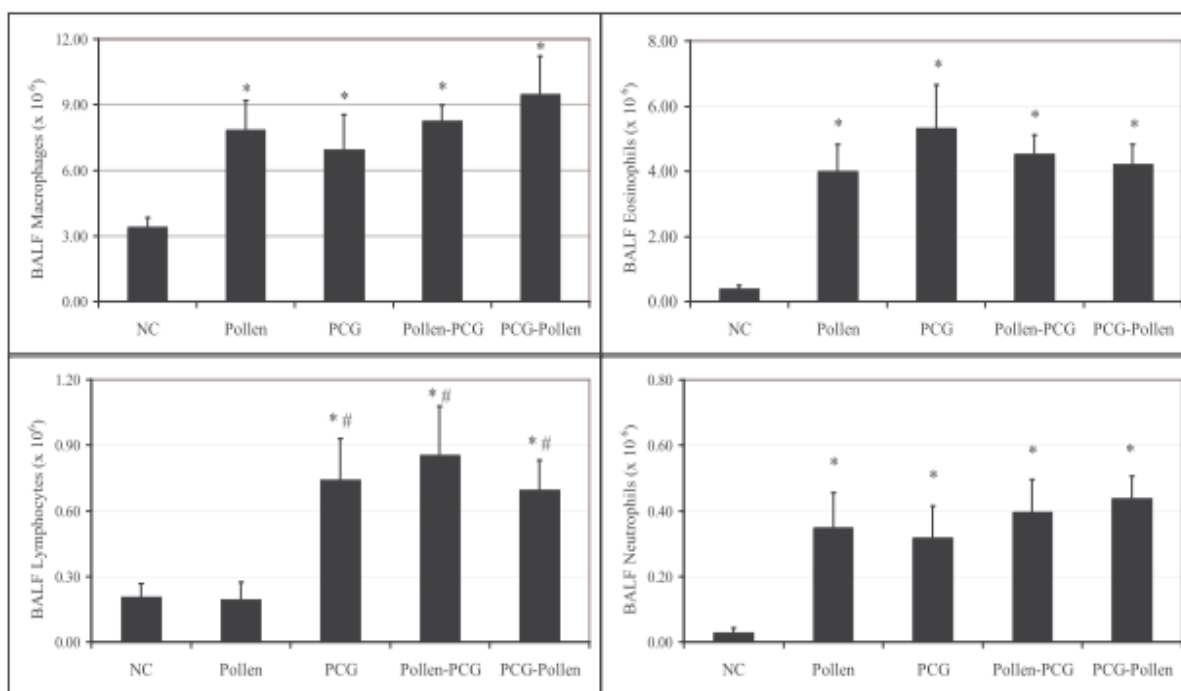


Figure 2: Alveolar cells (Mean ± SEM) in BALF. Macrophages, eosinophils, lymphocytes and neutrophils were counted. **NC**: negative control group; **pollen**: rats sensitized and challenged with 0.5 mg of pollen; **PCG**: rats sensitized and challenged with 4.5×10^7 PCG; **Pollen-PCG**: rats sensitized with 0.5 mg of pollen and challenged with 4.5×10^7 PCG; **PCG-pollen**: Rats sensitized with 4.5×10^7 PCG and challenged with 0.5 mg of pollen. *: significantly different to NC ($p < 0.05$); #: significantly different to pollen group ($p < 0.05$).

5. Lymph node cell proliferation induced by pollen or PCG

After *in vitro* addition of pollen grains pollen (100 μ g/mL; Figure 3 A) or PCG (9 x 10⁶ PCG/mL; Figure 3 B), rats sensitized and challenged with pollen grains (pollen group) presented a significantly higher lymph node cell proliferation than those of the NC group. Moreover, PCG group had significant increases of lymph node cell proliferation in comparison to NC group. (Figure 3)

In both cases, rats sensitized with pollen grains and challenged with PCG (pollen-PCG group) presented significantly higher proliferation than NC group's ones. The proliferative responses on pollen-PCG and pollen groups presented no significant difference. Identical proliferations of the lymph node cell were found between pollen-PCG and PCG groups. (Figure 3)

PCG-pollen group, after *in vitro* addition of pollen grains pollen or PCG, presented significantly higher proliferation than NC group. In contrast to the pollen-PCG group, the

PCG-pollen rats' group showed significantly lower lymph node cell proliferation than those obtained on pollen and PCG groups. (Figure 3)

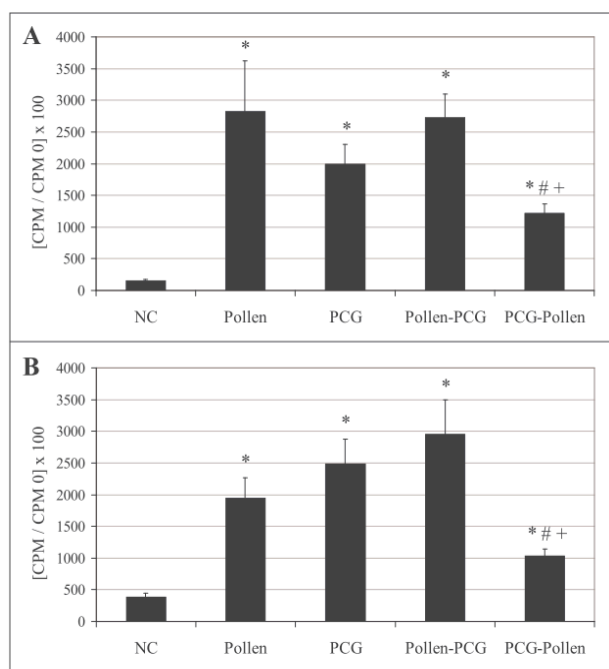


Figure 3: Pollen and PCG-induced proliferation of lymph node. Cells from NC, pollen or PCG-sensitized rats were cultured with [³H]-thymidine in the presence of 100 µg of pollen (A) and 9 x 10⁶ PCG (B). CPM: thymidine incorporation by antigen-stimulated cells; CPM0: thymidine incorporation in control cells. **NC**: negative control group; **pollen**: rats sensitized and challenged with 0.5 mg of pollen; **PCG**: rats sensitized and challenged with 4.5 x 10⁷ PCG; **Pollen-PCG**: rats sensitized with 0.5 mg of pollen and challenged with 4.5 x 10⁷ PCG; **PCG-pollen**: Rats sensitized with 4.5 x 10⁷ PCG and challenged with 0.5 mg

of pollen. *: significantly different to NC (p<0.05); #: significantly different to pollen group (p<0.05); +: significantly different to PCG group (p<0.05).

Discussion

In this study, combined allergic effects between timothy grass pollen grains and their PCG were performed by evaluation of allergy (humoral and cellular responses) and inflammatory parameters on Brown Norway rats, a good animal model for pollen allergy [16]. In parallel, allergic and inflammatory responses of these combined effects were compared to those obtained on rats sensitized and challenged with only one aeroallergen source, pollen grains or PCG.

Our finding showed that combined effects between pollen and PCG induce humoral responses. Previous studies showed that PCG as well as pollen grains induced humoral responses on Brown Norway rats [9, 10, 15], when each aeroallergen source was used for both sensitization and challenge. PCG can also trigger-IgE-mediated reactions in grass pollen-sensitive patients. [4]

Humoral responses on either allergic pollen-PCG and PCG-pollen groups were influenced mainly by PCG. On these groups (pollen-PCG and PCG-pollen groups), the IgE and IgG1

levels were not different to those obtained on PCG rats' group, but they were lower than those obtained on pollen group. The difference of the quantity and quality of allergens present on isolated PCG versus whole pollen grains could explain the difference between allergic combined effects groups and pollen group (Figure 4). Indeed, solution of whole pollen contains water-soluble and water-insoluble allergens from pollen grains, free-cytoplasmic pollen allergens and water-soluble and water-insoluble allergens from PCG [17, 18]. PCG solution contains mainly water-insoluble allergens from PCG with few water-soluble allergens of pollen grains and PCG.

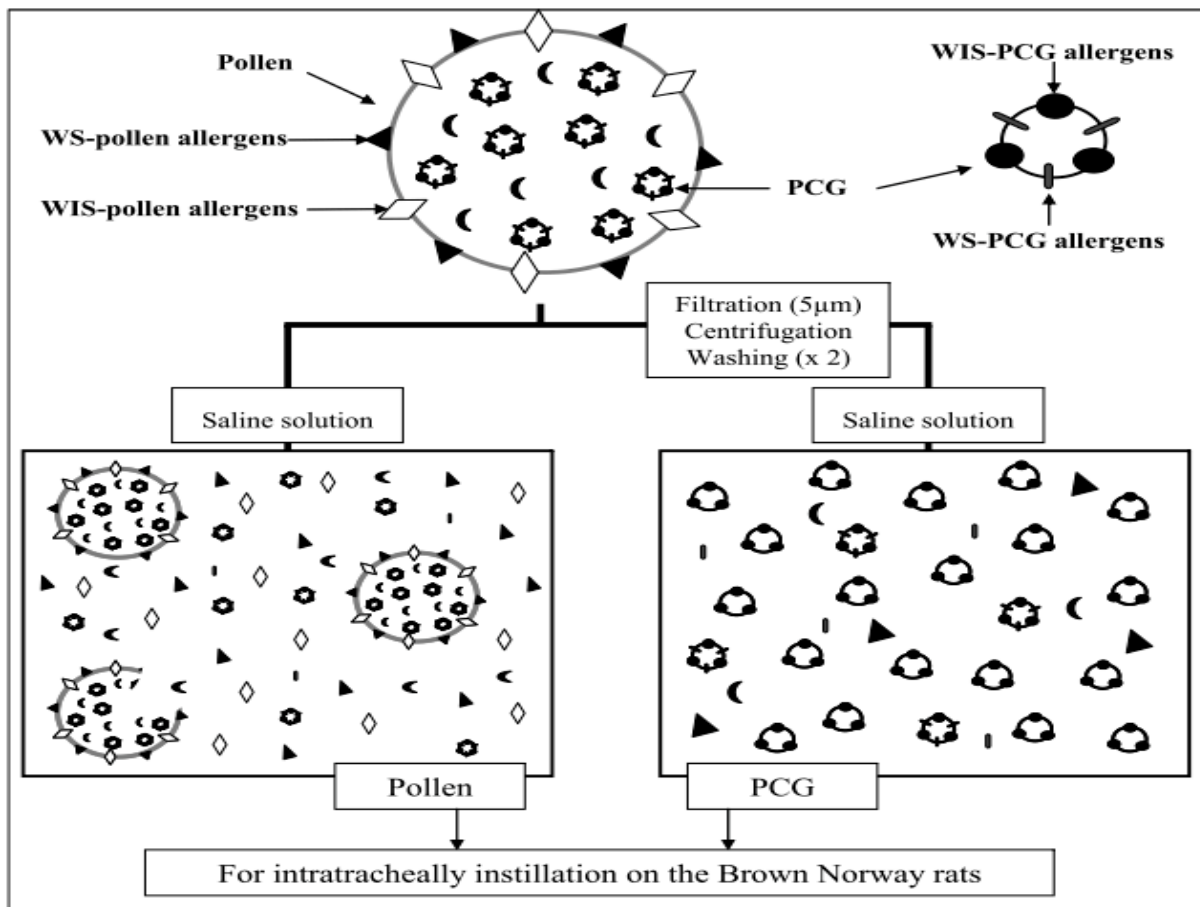


Figure 4: Schematic view summarizing the potential content and availability of water-soluble (WS) and water-insoluble (WIS) allergens from grass pollen grains and their PCG used to immunize Brown Norway rats by intratracheally instillation. \diamond Water-insoluble allergens of pollen; \blacktriangledown Water-insoluble allergens of pollen; \bullet Water-insoluble allergens of PCG; \blacksquare Water-soluble allergens of PCG; \blacktriangleleft Free-cytoplasmic pollen allergens.

Therefore, a loss of water-soluble allergens could arise from PCG washing steps (data not shown). We can also consider the fact that after one sensitization and a single challenge, humoral responses on combined effects' groups seem to be influenced by the aeroallergen

source that induced the lowest responses. In this study the allergen source inducing the lowest responses was PCG.

As humoral responses, combined effects between PCG and pollen induced cellular responses, but these responses varied according to the different parameters studied.

For all immunized animals on pollen grains and/or PCG, a higher proliferation of lymph node cells was observed when compared to those of NC group. In the present study, the T-mediated cell responses were non similar: the animals sensitized to pollen grains and challenged by PCG have globally an identical profile compared to the rats immunized only either to pollen or PCG. On the other hand, with the inverse protocol (meaning first sensitization by PCG and second step challenge by pollen grains), a less important lymph node cell proliferation was obtained than in only pollen or PCG groups. *In vitro*, after addition of PCG or pollen grains, our team already showed a similar proliferation of lymph node cell of pollen and PCG-sensitized rats. [9, 10, 15] Our finding reveals that both combined effects induce an increase of eosinophils and lymphocytes in BALF in contrast to NC group.

BALF eosinophil levels were similar on all immunized rats. Our results are similar on this point to other previous studies. Mice sensitized with pollen and challenged with PCG presented an accumulation of eosinophils in the peribronchial area [19]. Moreover, Wark et al [20] showed that thunderstorm asthmatic patients, for whom asthma is suspected to be caused by PCG, presented higher sputum eosinophils than the non-thunderstorm ones. On the other hand, in our study, sensitization and/or challenge with PCG (PCG, pollen-PCG and PCG-pollen groups) induce in BN rats a greater lymphocyte levels in BALF than for pollen group's ones. In humans, only patients with severe asthma and in asthma related deaths presented lymphocyte infiltrations in the bronchial walls [21].

In this study, among Th2 cytokines, IL-4 levels in sensitized rats were not significantly different to what has been obtained in NC group. In contrast to IL-4, the sensitization with PCG (PCG and PCG-pollen groups) induced an increase of IL-5 and IL-13 levels in BALF when compared to NC group, but rats sensitized with pollen (pollen and pollen-PCG groups) presented no significantly difference for IL-5 and IL-13 with NC group. Used in whatever sensitization and/or challenge (PCG, pollen-PCG and PCG-pollen groups), PCG increased Rantes levels in BALF. In allergic patients, some studies showed that, in BALF, IL-5 and IL-13, but not IL-4 levels were increased when compared to healthy patients [22-24]. Asthmatics

presented also an increase of Rantes level in BALF during the pollen season compared to their Rantes level measured before pollen season [25]. Moreover, asthmatic patients but not seasonal allergic rhinitis patients have increased levels of Rantes in sputum compared to healthy subjects. [26].

The increase of Th2 cytokines/Th1 cytokines ratio and the IL-5 and IL-13 levels in the BALF of rats that were sensitized with PCG (PCG and PCG-pollen groups) suggest that the sensitization step was an important factor in allergic reaction. As a matter of fact, the increase of Rantes and lymphocytes on rats sensitized and /or challenged with PCG suggests that cross-reaction groups seem to be influenced mainly by PCG. Moreover, PCG could induce asthma when, on the contrary, whole pollen is more implicated in hay fever triggering. This hypothesis is supported by other studies on allergic/asthmatic patients [4, 27].

Combined effects between pollen grains and PCG induced inflammation on Brown Norway rats.

Compared to pollen and PCG group, pollen-PCG and PCG-pollen groups presented identical macrophage and neutrophil numbers and Th1 cytokine levels in BALF. In this work, other inflammatory parameters, such as protein concentrations, IL-1 α and IL-1 β levels in BALF, lead to believe that combined effects between pollen grains and PCG induced a stronger inflammation than those obtained with pollen or PCG. The presence of NAD(P)H oxidase [19, 28] and (1 \rightarrow 3)- β -glucan [29], in pollen grains and PCG, could explain airways inflammation.

In conclusion, different elements of our study give several tracks for a better understanding of the allergic combined effects between pollen grains and PCG issued from *Phleum pratense*. Even if only currently based on timothy grass pollen grains, this new approach combining, for the first time, pollen and PCG for immunization allows seeing that multiple joint contacts with pollen and PCG can lead, at least on BN rats, to specific IgE responses and, more globally, inflammatory phenomena. For humoral and cellular allergic responses, combined effects between the 2 aeroallergens sources used in this study seem to be influenced mainly by PCG. But combined effects seem to induce a stronger inflammation than pollen or PCG when they are used for both sensitization and challenge.

Acknowledgements

The present study was supported by the French Ministry of Environment and Sustainable Development (BCRD-DRC-05-AP-2005). Several INERIS participants of this study have to be acknowledged: Anthony LECONTE, Emmanuelle MAILLOT-MARÉCHAL, Alice MARCHAND, Franck ROBIDEL and Olivier DUPONT.

References

- [1] Lacroix G. Allergies respiratoires, pollens et polluants = Respiratory allergy, pollen and pollutants. *Archives des maladies professionnelles et de l'environnement* 2005; 66: 584-91.
- [2] Guillaum MT, Ségala C. Pollens et effets sanitaires : synthèse des études épidémiologiques. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* 2008; 48: 14-9.
- [3] Motta AC, Marliere M, Peltre G, Sterenberg PA, Lacroix G. Traffic-related air pollutants induce the release of allergen-containing cytoplasmic granules from grass pollen. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 139: 294-8.
- [4] Suphioglu C, Singh MB, Taylor P, Bellomo R, Holmes P, Puy R, et al. Mechanism of grass-pollen-induced asthma. *Lancet* 1992; 339: 569-72.
- [5] Taylor PE, Flagan RC, Miguel AG, Valenta R, Glovsky MM. Birch pollen rupture and the release of aerosols of respirable allergens. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 1591-6.
- [6] Taylor PE, Flagan RC, Valenta R, Glovsky MM. Release of allergens as respirable aerosols: A link between grass pollen and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 51-6.
- [7] Suphioglu C. Thunderstorm asthma due to grass pollen. *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 116: 253-60.
- [8] Schappi 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: 478-83.
- [9] Motta A, Peltre G, Dormans JA, Withagen CE, Lacroix G, Bois F, et al. Phleum pratense pollen starch granules induce humoral and cell-mediated immune responses in a rat model of allergy. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 310-4.
- [10] Motta AC, Dormans JA, Peltre G, Lacroix G, Bois FY, Steerenberg PA, et al. Intratracheal instillation of cytoplasmic granules from Phleum pratense pollen induces IgE- and cell-mediated responses in the Brown Norway rat
Phleum pratense pollen starch granules induce humoral and cell-mediated immune responses in a rat model of allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 135: 24-9.
- [11] Fischer S, Grote M, Fahlbusch B, Muller WD, Kraft D, Valenta R. Characterization of Phl p 4, a major timothy grass (Phleum pratense) pollen allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 189-98.
- [12] Grote M, Dolecek C, Van Ree R, Valenta R. Immunogold electron microscopic localization of timothy grass (Phleum pratense) pollen major allergens Phl p I and Phl p V after anhydrous fixation in acrolein vapor. *J Histochem Cytochem* 1994; 42: 427-31.

- [13] Grote M, Swoboda I, Valenta R, Reichelt R. Group 13 allergens as environmental and immunological markers for grass pollen allergy: studies by immunogold field emission scanning and transmission electron microscopy. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 136: 303-10.
- [14] Vrtala S, Fischer S, Grote M, Vangelista L, Pastore A, Sperr WR, et al. Molecular, immunological, and structural characterization of Phl p 6, a major allergen and P-particle-associated protein from Timothy grass (*Phleum pratense*) pollen. *J Immunol* 1999; 163: 5489-96.
- [15] Abou Chakra OR, Rogerieux F, Peltre G, Sénéchal H, Lacroix G. Effects of pollen grains and their cytoplasmic granules on allergic humoral and cellular responses in the rat. *Open Allergy Journal* submitted;
- [16] Steerenberg PA, Dormans JA, van Doorn CC, Middendorp S, Vos JG, van Loveren H. A pollen model in the rat for testing adjuvant activity of air pollution components. *Inhal Toxicol* 1999; 11: 1109-22.
- [17] Godfrin D, Senechal H, Sutra JP, Busnel JM, Desvaux FX, Peltre G. A modified enzyme-linked immunosorbent assay adapted for immunodetection of low amounts of water-insoluble proteins. *J Immunol Methods* 2007; 326: 83-92.
- [18] Sénéchal H, Mayer C, Le Mao J, Desvaux FX, Wal M, Hennion MC, et al. Two-dimensional immunoblot analysis of non-water soluble grass pollen allergens. XXII Congress of the EAACI - Abstract Book 2003; 382.
- [19] Bacsı A, Choudhury BK, Dharajiya N, Sur S, Boldogh I. Subpollen particles: Carriers of allergenic proteins and oxidases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2006; 118: 844-50.
- [20] Wark PA, Simpson J, Hensley MJ, Gibson PG. Airway inflammation in thunderstorm asthma. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 1750-6.
- [21] Jeffery PK, Wardlaw AJ, Nelson FC, Collins JV, Kay AB. Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140: 1745-53.
- [22] Kim CK, Kim SW, Park CS, Kim BI, Kang H, Koh YY. Bronchoalveolar lavage cytokine profiles in acute asthma and acute bronchiolitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2003; 112: 64-71.
- [23] Till S, Durham S, Dickason R, Huston D, Bungre J, Walker S, et al. IL-13 production by allergen-stimulated T cells is increased in allergic disease and associated with IL-5 but not IFN-gamma expression. *Immunology* 1997; 91: 53-7.
- [24] Virchow JC, Jr., Walker C, Hafner D, Kortsik C, Werner P, Matthys H, et al. T cells and cytokines in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 960-8.
- [25] Venge J, Lampinen M, Hakansson L, Rak S, Venge P. Identification of IL-5 and RANTES as the major eosinophil chemoattractants in the asthmatic lung. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 1110-5.
- [26] Barczyk A, Sozanska E, Farnik M, Stepniak-Ziolkiewicz I, Nizio-Masior J, Pierzchala W. Increased levels of RANTES in induced sputum of chronic asthma but not in seasonal grass pollen-induced rhinitis. *Pneumonol Alergol Pol* 2006; 74: 191-6.

- [27] Badorrek P, Larbig M, Dick M, Kock W, Hecker H, Hofield J, et al. The role of pollen starch granules in bronchial inflammation. *Allergy* 2008; 63: 65.
- [28] Boldogh I, Bacsı A, Choudhury BK, Dharajiya N, Alam R, Hazra TK, et al. ROS generated by pollen NADPH oxidase provide a signal that augments antigen-induced allergic airway inflammation. *J Clin Invest* 2005; 115: 2169-79.
- [29] Rylander R, Fogelmark B, McWilliam A, Currie A. (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucan may contribute to pollen sensitivity. *Clin Exp Immunol* 1999; 115: 383-4.

3.4. ARTICLE 4

Role of water-soluble and water-insoluble allergens of pollen cytoplasmic granules in humoral and cellular allergic responses.

Compte-rendu de l'Académie des Sciences

Série Biologie

ABOU CHAKRA Oussama R., SUTRA Jean-Pierre, DESVAUX François -
Xavier, ROGERIEUX Françoise, PELTRE Gabriel, SÉNÉCHAL Hélène and
LACROIX Ghislaine

Abstract

Background: Pollen is one of the most important aeroallergens vectors in Europe. Under some atmospheric conditions, pollen grains can release pollen cytoplasmic granules (PCG). These particles could be washed or non-washed respectively with or without the effects of rainfall. Some studies showed that washed PCG might induce allergic responses, *in vivo* and *in vitro*. Alternatively, proteomic studies focused, till now, mainly on water-soluble proteins, but water-insoluble allergens could also cause allergic symptoms.

Objective: To assess allergenic potential of washed and non-washed PCG (w-PCG and nw-PCG, respectively), from *Phleum pratense* pollen grains, on Brown Norway rat, and to study IgE reactivity, of sensitized rats' sera, against water-soluble and water-insoluble extracts of PCG and pollen grains.

Methods: Rats were sensitized (day 0) and challenged (day 21) intratracheally with three sources: either w-PCG or nw-PCG or pollen grains. At day 25, blood, bronchial lymph node and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were collected. Using water-soluble and water-insoluble extracts of pollen grains and/or PCG, IgE ELISA and 1 D immunoblotting were performed with rats' sera. Proliferation of lymph node cells were monitored by [³H]-thymidine incorporation in a lymph node assay. Alveolar cells, proteins as well as Th1 and Th2 cytokines were quantified in BALF.

Results: Rats sensitized with nw-PCG presented higher sera IgE levels and higher IgE reactivity, against water-soluble and -insoluble proteins separated by IEF, than the 2 other sensitized groups. Lymph node cell proliferation presented different profiles, when adding *in vitro* pollen or both PCG types, with lower responses for cells from nw-PCG-sensitized rats. On the one hand, in BALF, the increase of eosinophils, lymphocytes and Th2 cytokines was notable on w-PCG sensitized rats, when, on the other hand, Th1 cytokines increased on both nw-PCG and pollen groups.

Conclusion: Allergic and inflammatory responses were induced by both grass pollen grains and their isolated PCG. Water-soluble and water-insoluble extracts of PCG, as well as whole pollen, were symptoms inducers and presented non-similar response patterns. Different groups of allergens might be involved in both humoral and cellular allergic responses.

Keywords: Allergenicity, Pollen Cytoplasmic Granules, pollen; water-soluble allergens; Water-insoluble allergens.

Introduction

Grass pollen is quantitatively one of the most important aeroallergens vectors in Europe. It is a major cause of allergic reactions including conjunctivitis, rhinitis and other upper as well as lower respiratory tracts problems occurring during the flowering season of different grasses. Since 40 years, the frequency of symptoms of allergic diseases has dramatically increased, especially for children and people living in urban areas. Several factors are contributing to such increase, among which airborne pollutants – from gaseous and particulate emissions – take now a growing place. (1)

Airborne pollen grains can release hundreds small particles called pollen cytoplasmic granules (PCG) (2, 3). These particles can be present in atmospheric samples taken during the pollen season, and some studies showed a 50-fold increase in atmospheric concentration on days following rainfall (3, 4). In the same way, airborne pollutants could modify the pollen grains structurally and so, could increase the release of PCG in atmosphere (5).

The small size of the PCG (less than 3 microns in diameter) and their atmospheric concentrations, in particular on days following rainfall, led several research groups to study the allergic potential of these particles. PCG elicited IgE-mediated responses in asthmatic patients and induced a bronchial constriction in patients with rainfall-associated asthma (6). *In vivo* studies showed that PCG induced, as well as pollen grains, humoral and cellular responses on animal models of allergy (7-11). Moreover, *in vitro*, PCG increased inflammatory responses on bronchial epithelial human cells and rat macrophages (9, 12). All these studies were performed with washed PCG in order to preserve only PCG allergens. But, in the real atmospheric conditions, washed or non-washed PCG could be present in the atmosphere respectively with or without rainfall.

In molecular allergy studies, several water-soluble pollen allergens have been found in PCG by immunogold labeling and western blot studies, such as Lol p 1b and Lol p 5 for rye grass, Phl p 4, Phl p 5, Phl p 6 and Phl p 13 for timothy grass (13-17). In pollen grains and PCG, present in the urban environments, some water-soluble proteins are extracted by rain. By the way, in such cases, most of the remaining proteins are water-insoluble. Furthermore, proteomic studies have focused mainly on water-soluble proteins, but water-insoluble proteins could be also responsible for allergy (18). It is known that some major allergens are water-insoluble proteins like those of rubber, Hev b 1 and Hev b 3, by instance (19).

For these different reasons, the purpose of our work was to provide results on the allergenicity of both washed and non-washed PCG from *Phleum pratense* pollen grains. From several decades, allergy responses have been studied on the Brown Norway rat, a good animal model of allergy (20-23). Brown Norway rats have been used since some years by our team (7, 8, 10, 11).

Among allergic responses, humoral and cellular responses were studied. Humoral signal has been performed by IgE ELISA and 1 D immunoblotting, using water-soluble and water-insoluble extracts of pollen grains and/or PCG. For assessing cellular responses, lymph node assay, BALF eosinophils and lymphocytes counting as well as BALF Th2 cytokine quantifications were used. Inflammation assessment was performed on other BALF parameters.

Methods

1. Animals

Six-week-old male Brown Norway (BN) rats were obtained from Charles River Laboratories (France). Animals were housed in the INERIS animal-care unit, a facility accredited by the Departmental Direction of Veterinary Services. They had free access to conventional laboratory feed and water. They were handled in accordance with French State Council guidelines for the care and use of laboratory animals and experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Comity at the INERIS.

2. Pollen and PCG

Pollen grains from Timothy grass (*Phleum pratense*) were obtained from Allerbio AB (Varenes-en-Argonne, France).

Pollen grains (15 - 60 μm , average $\varnothing \sim 31 \mu\text{m}$), suspended in saline solution, were used for rats' immunization. The water-soluble pollen extract (ws-Pol) was prepared according to Mahler et al (24) for using IgE ELISA or to Rogerieux et al (25) for using isoelectric focusing (IEF). The water-insoluble pollen extract (wi-Pol) was performed according to Godfrin et al (26).

Pollen Cytoplasmic Granules or **PCG** (0.6 - 5 μm , average $\varnothing \sim 1.1 \mu\text{m}$) were isolated from *Phleum pratense* pollen by osmotic shock in pure water. These PCG were called non-washed

PCG. Washed-PCG were also performed by filtration, centrifugation and twice washing in distilled water of the initial non-washed PCG. Washed and non-washed PCG were resuspended in saline solution. Size and counting of particles (pollen and PCG) were performed (Z3 multisizer, Beckman Coulter). Washed and non-washed PCG were used for rats' immunization.

The water-soluble PCG extract (ws-PCG) correspond to the supernatant of the second wash of PCG. Before IEF, this extract was 10 times concentrated. The water-insoluble PCG extract (wi-PCG) was performed after six extensive washes of PCG, followed by an addition of TUC mixture (2 mol l⁻¹ of thiourea, 7 mol l⁻¹ of urea and 5 % (w/v) CHAPS). PCG extracts (ws-PCG and wi-PCG) were used for IEF.

3. Sensitization, challenge and autopsy of the rats

Rats were immunized following the protocol already described (7) . Briefly, rats were anesthetized and, using a cannula, intratracheally instilled with a suspension of allergens at day 0. This was repeated at day 21 for the challenge. Allergen sources used were pollen grains (0.5 mg/rat), washed-PCG (4.5 x 10⁷/rat) or non-washed-PCG (4.5 x 10⁷/rat). Negative control animals (NC) were instilled with saline solution.

Rats were sacrificed 4 days after challenge. Blood samples, bronchoalveolar lavage (BAL) fluids and bronchial lymph nodes were collected.

4. Serum sample

After collection, blood samples were kept at 4 °C for clotting (2-4 h) and they were then centrifuged 10 min at 2000 x g at 4 °C. Serum was removed and stored in 500 µL aliquots at – 80 °C until use.

5. ELISA for specific anti-timothy pollen IgE

The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed in serum, using ws-Pol and wi-Pol, according to the pollen-DIG protocol previously described (11) with slight modifications. Briefly, 1:500 diluted mouse anti-rat IgE antibodies (Zymed) were used to coat 96-well microliter plates. After washing and saturation of the wells with 1 % (w/v) skimmed milk powder solution, rat sera were added to the wells (in duplicate) at the proper dilution (1:2), incubated for 1 h at 37 °C. After washing, wells were incubated with the pollen extracts

(ws-Pol and wi-Pol) (dilution 1:800) and after a next washing step, a horseradish peroxidase conjugated anti-DIG antibody was added (dilution 1:625, Roche Diagnostics). The amount of IgE and IgG1 was measured by adding peroxidase substrate and reading the absorbance values at 450 nm with a multichannel photometer (Tecan).

6. IEF and immunoblot

Pollen and PCG extracts were submitted to an isoelectrofocusing (IEF) separation performed in a polyacrylamide gel (CleanGel™ IEF, GE Healthcare) containing 5% v/v Servalyt® pH 2–11 (Serva, Heidelberg, Germany) in water or TU mixture (2 M of Thiourea, 7 M Urea) for, water-soluble and water-insoluble extracts, respectively. According to the manufacturer's instructions, the flat bed electrophoretic chamber (Multiphor II, GE Healthcare) was cooled at 15 °C for water soluble extracts (ws-Pol and ws-PCG) and 18 °C for water insoluble extracts (wi-Pol and wi-PCG). After the protein separation, a part of the gel was stained with Coomassie Blue. Isoelectric point standards (pI) from 4.45 to 9.6 (BioRad) were used as references.

After IEF separation, proteins of each extract were blotted by pressure (for 1 h at 22 °C) onto a PVDF sheet (pore size 0.2 µm; Immobilon™, Millipore), covered by several dry sheets of Whatman filter paper, a glass plate and a 1-kg weight. PVDF sheets were cut into strips (2.5 mm of width) to be used for the immunodetection. PVDF strips were saturated in milk powder solution (5 % w/v in PBS - Tween 0.1 %) for 1 h at room temperature. and then incubated 1 h with individual rats' sera. Three of them were used in each group (dilution 1:5 and an additional dilution 1:100 for wi-Pol). At the next steps, strips were incubated with a mouse anti-rat IgE antibody (dilution 1:500; Zymed) and then incubated with an alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (Sigma). Finally, strips were revealed, in the same time (2 x 30 min), with alkaline phosphatase substrates, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) and nitroblue tetrazolium (NBT) (Sigma Biochemicals). Three 5-min washes were performed with PBS - Tween between each incubation step.

7. Bronchoalveolar Lavage fluid (BALF)

Lungs were flushed *in situ* with 3 x 10 mL of a sterile PBS solution (phosphate buffer saline, pH 7.2). Fluid collected from the BAL of each animal was centrifuged at 150 x g for 10 min. Pellets were used for alveolar cells counting and supernatants were used for quantification of proteins and cytokines.

8. BALF alveolar cells

The collected alveolar cells (9–20 μm) were counted with Z2™ Coulter Counter® (Beckman Coulter) and applied to a slide by centrifugation using a Shandon Cytospin 2 (Pittsburgh, PA) at 150 g for 5 min. Cell differential counts were performed after May-Grünwald Giemsa staining and a minimum of 400 cells were counted per slide. Macrophages, eosinophils, lymphocytes, neutrophils were present in BALF.

9. Proteins and cytokines in BALF

Cell-free BALF was concentrated using Amicon Ultra tubes® (Millipore) until the volume was equal to 1 ml.

The protein concentrations were determined by Lowry method (27).

Cytokines were quantified in concentrated BALF, firstly, using bio-plex kit for IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, GM-CSF, IFN γ and TNF α (Cat n°: 171K11070, Biorad, France) and, secondly, rat cytokine multiplex immunoassay kit for IL-5, IL-13, Eotaxin and Rantes (Cat n° RCYTO-80k-04, Linko, Millipore, France) according to the manufacturer's instructions.

10. Bronchial Lymph Node Cell Assay

The bronchial lymph node assay previously described (11) has been slightly modified. Briefly, isolated lymph nodes cells were incubated, with and without allergen sources (Pollen: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; w-PCG: 9×10^5 PCG/mL and nw-PCG: 9×10^5 PCG/mL), for 3 days in humidified atmosphere at 37 °C. Then, cells were incubated 24 h with 10 $\mu\text{l}/\text{well}$ [^3H]-thymidine (Amersham, 37 kBq/ml) and harvested for scintillation counting in a β -plate counter (1205 Betaplate™) to measure cell proliferation. T-cell reactivity was expressed as counts per minute (cpm).

11. Statistical analysis

The results of all studied parameters are expressed as means \pm SEM. For statistical analysis, the non-parametric tests (Kruskall-Wallis and Mann-Whitney) were used. The results were considered significant when a p-value < 0.05 was found.

Results

1. Pollen-specific IgE levels in rats' sera

Water-soluble pollen extract: In contrast to NC group, w-PCG and nw-PCG induced significant increase of IgE levels in rats' sera. Compared to pollen group, w-PCG sensitized rats had a significantly low IgE level but nw-PCG group had a significantly high IgE level. Rats sensitized with nw-PCG present a significantly higher IgE level in sera than those sensitized with w-PCG. (Table 1)

Water-insoluble pollen extract: In contrast to NC group, w-PCG presented no significant difference, but nw-PCG induced increase of IgE levels in sera. Rats sensitized with nw-PCG presented a significantly higher IgE level than those of the pollen group, which presented higher IgE level than w-PCG group's ones. As for ws-Pol, nw-PCG increased more the IgE level than w-PCG. (Table 1)

Table 1: Timothy grass pollen specific IgE levels in rats' sera (Mean \pm SEM). IgE absorbance (at 450 nm) was measured by ELISA, using a water-soluble (ws) and water-insoluble (wi) pollen extracts.

| Treatment group | NC | w-PCG | nw-PCG | Pollen grains |
|-----------------|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| ws-Pol | 0.08 \pm 0.002 | 0.38 \pm 0.12 *# | 2.73 \pm 0.23 *# | 0.93 \pm 0.11 * |
| wi-Pol | 0.05 \pm 0.01 | 0.08 \pm 0.02 # | 0.44 \pm 0.06 * | 0.15 \pm 0.04 *# |

NC: negative control group; **w-PCG:** rats sensitized and challenged with 4.5×10^7 washed PCG; **nw-PCG:** rats sensitized and challenged with 4.5×10^7 non-washed PCG; **pollen:** rats sensitized and challenged with 0.5 mg of pollen. *: significantly different to NC ($p < 0.05$); #: significantly different to pollen group ($p < 0.05$).

IgE levels in ws-Pol were 5 and 6 times higher than those found in wi-Pol, for w-PCG and nw-PCG sensitized rats respectively. Pollen-sensitized rats presented the same ratio than the nw-PCG sensitized rats.

2. IgE reactivity against proteins from different extracts

2.1. Pollen extracts

Water-soluble pollen extract (Figure 1 A): This extract presented several IgE-binding proteins ($pI \sim 4.45 - 9.6$) with sera from w-PCG (strips n°4 to 6), nw-PCG (strips n°7 to 9)

and pollen (strips n°10 to 12) sensitized rats. Some patterns were similar for the three groups. But the intensity of IgE reactivity of each sera group was different. In fact, the highest IgE-binding protein reactivity was evidenced with the sera of nw-PCG sensitized rats. It presented a broad range of pI from acid to basic. Among the sensitized groups, the w-PCG-sensitized rats' one showed the lowest IgE-binding protein reactivity.

Water-insoluble pollen extract (Figure 1 B): Using the rats' sera diluted 1:5, as already done for the water-soluble extract, strips were so dark, because a very high reactivity for all sensitized rats' sera, that another sera dilution (1:100) was performed. For the w-PCG-sensitized rats' sera, several bands were revealed by their IgE, with pI ranging from 6.4 to 7.0 (strips n°4 to 6). As for proteins of ws-Pol, the nw-PCG-sensitized rats had a high IgE binding reactivity with proteins of this extract (strips n°7 to 9). In this group, the number of revealed protein bands is quite large, within a broad range of pI (4.45 – 9.6). Regarding the pollen-sensitized rats (strips n°10 to 12), the IgE binding reactivity was evidenced by a rather large number of bands (pI ~ 6.4 – 7.0).

For these 2 extract types obtained from whole pollen, an heterogeneity of rats' sera IgE responses was observed for each group, except for NC group, the only one for which no IgE binding reactivity was exhibited (figures 1 A & 1 B, strips n°1 to 3).

2.2. PCG extracts

Water-soluble PCG extract (Figure 1 C): Proteins of this extract did not bind any IgE of w-PCG sensitized rats' sera (strips n°4 to 6). Ten bands on the strips revealed by nw-PCG sensitized rats' sera were observed (strips n°7 to 9). The IgE binding protein pattern was similar for the 3 rats' sera used, except for the band with pI ~ 4.5 that was observed only on the strip n°8 and also for 3 acidic bands found on strip n°9. For the pollen sensitized rats (strips n°10 to 12), only one serum (strip n°10) showed a low IgE reactivity with proteins of this ws-PCG extract (protein bands with pI around <4.45, 5.1, 7 and 7.8).

Water-insoluble PCG extract (Figure 1 D): For w-PCG sensitized rats (strips n°4 to 6), only one strip (n°6) presented a low IgE binding reactivity against a protein with pI ~ 8.1. Using nw-PCG sensitized rats' sera (strips n°7 to 9), five IgE binding proteins (pI ~ 6.4, 6.9, 8, 8.2 and 9) of the wi-PCG extract were observed. For the pollen sensitized rats (strips n°10 to 12), only one strip (n°10) showed a low reactivity against a protein with pI ~ 8.0.

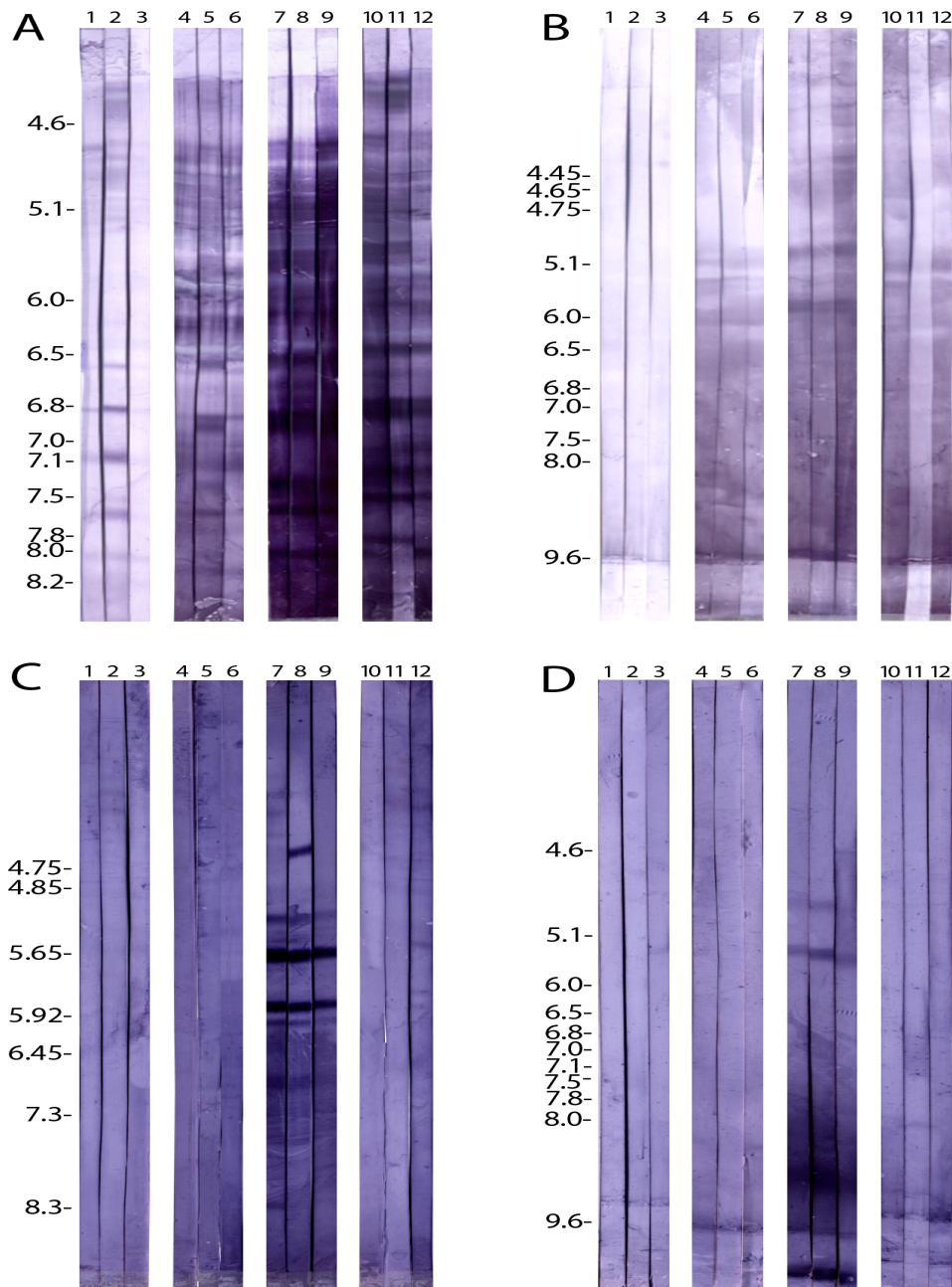


Figure 1: The IgE binding protein of pollen or PCG extracts separated by IEF followed by immunoblotting with rats' sera. **(A)** Water-soluble pollen extract (ws-Pol); **(B)** water-insoluble pollen extract (wi-Pol); **(C)** water-soluble PCG extract (ws-PCG); **(D)** water-insoluble PCG extract (wi-PCG). Each strip was incubated with rat serum: **strips n°1 to 3:** negative control group; **strips n°4 to 6:** rats sensitized and challenged with 4.5×10^7 w-PCG (w-PCG); **strips n°7 to 9:** rats sensitized and challenged with 4.5×10^7 nw-PCG (nw-PCG); **strips n°10 to 12:** rats sensitized and challenged with 0.5 mg of pollen (pollen).

Using both PCG extracts, nw-PCG-sensitized rats' sera presented higher reactivity than all other rats' sera groups. No IgE binding reactivity was observed for NC (figures 1 C & 1 D, strips n 1 to 3).

3. Protein and Cytokines in BALF

Protein concentrations: All sensitized rats presented protein concentrations in BALF, around 1.85 mg/mL. It means three times higher than what could be observed for the NC group (0.68 ± 0.09 mg/mL)

Pro-allergy cytokines (Figure 2): In contrast to NC group, w-PCG induced significant increases of IL-5 ($\sim x 17$), IL-13 ($\sim x 3$) and Rantes ($\sim x 3$) levels in BALF. Rats sensitized with nw-PCG presented significantly higher level of Rantes in BALF than NC group's rats. Compared to pollen group, w-PCG-sensitized rats presented high IL-5, IL-13 and Rantes levels in BALF, these increases were statistically significant for IL-5 ($\sim x 2.5$) and Rantes ($\sim x 2.5$) levels. Rats sensitized with nw-PCG presented significantly higher Rantes ($\sim x 2.5$) level than the pollen group, but lower IL-5 and IL-13 levels were observed. Levels of IL-5 and IL-13 on w-PCG-sensitized rats were higher than those on nw-PCG-sensitized rats, but statistically significant for IL-5 only ($\sim x 10$). Rats sensitized with w-PCG or nw-PCG presented the same level (around 20 pg/mL) for Rantes.

Pro-inflammatory cytokines (Figure 2): No signal was found for the NC group. On the contrary, w-PCG induced increases of IL-1 α ($\sim x 2$), IL-1 β ($\sim x 2$), IL-6 ($\sim x 2.5$) and TNF α ($\sim x 7$) levels in BALF; differences were statistically significant for IL-1 β and TNF α . Rats sensitized with nw-PCG presented higher levels of IL-1 α ($\sim x 3$), IL-1 β ($\sim x 2.5$), IL-6 ($\sim x 2.5$), IFN γ ($\sim x 8$), and TNF α ($\sim x 8$) than those obtained in the NC group; these increases were statistically significant except for IL-6. Compared to the pollen group, w-PCG-sensitized rats presented low IL-6 ($\sim x 0.5$) and IFN γ ($\sim x 0.2$) levels; the difference was statistically significant for IFN γ , only. Rats sensitized with nw-PCG presented high IL-1 α ($\sim x 1.7$) and IL-1 β ($\sim x 1.7$) levels and low IL-6 ($\sim x 0.5$) levels than those obtained on pollen-sensitized rats. In BALF, IFN γ levels were higher in nw-PCG-sensitized rats than that on w-PCG group (56.9 ± 18.5 vs. 10.8 ± 1.7 pg/mL, respectively).

The other cytokines, IL-2, IL-4, IL-10, Eotaxin and GM-CSF, were undetectable in the BALF of a great number of either NC or sensitized rats (data not shown).

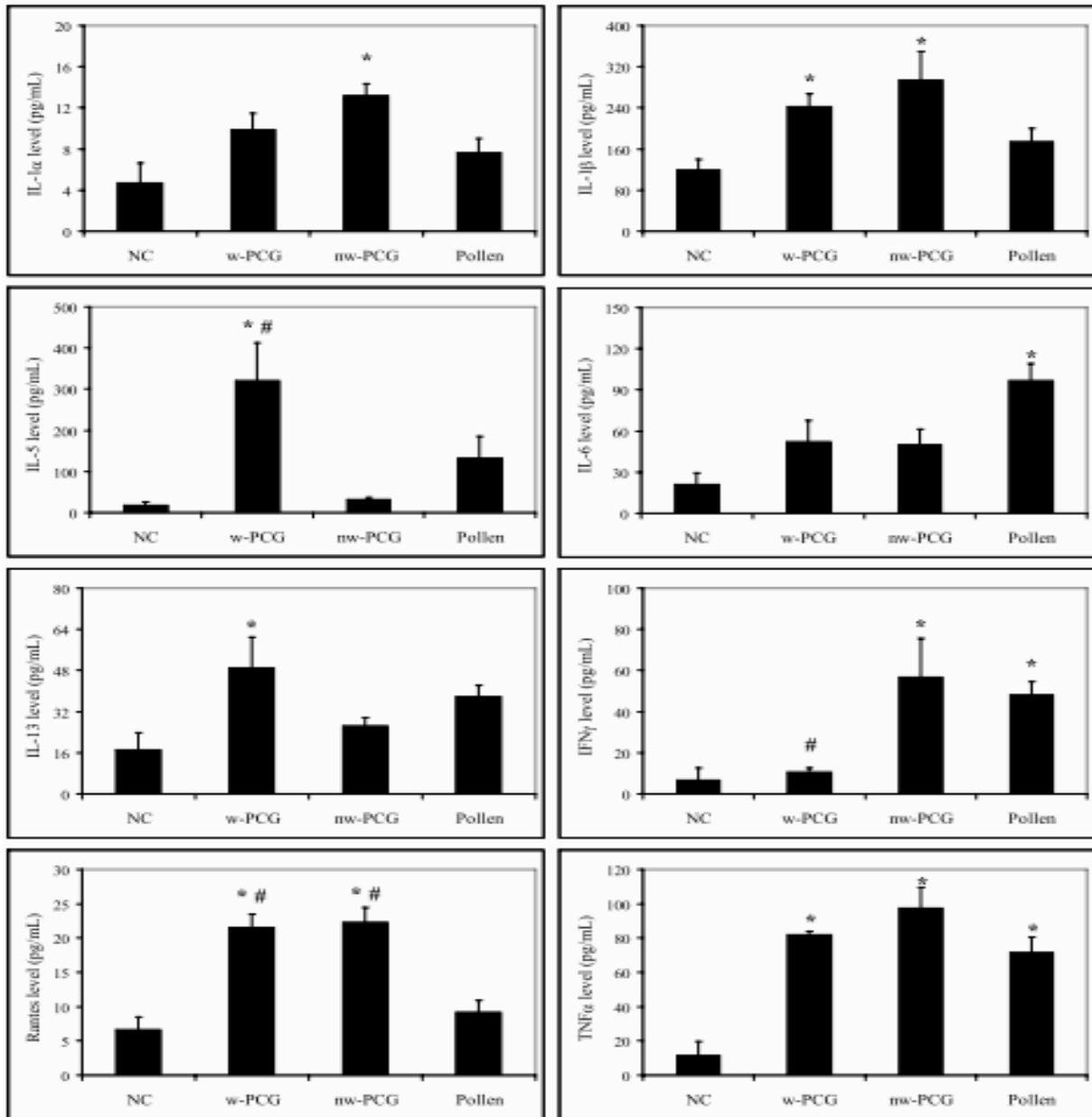


Figure 2: BALF cytokine levels (Mean ± SEM). Among pro-allergy cytokines, IL-5, IL-13 and Rantes were quantified. Among pro-inflammation cytokines, IL-1α, IL-1β, IL-6, IFNγ and TNFα were quantified. **NC:** negative control group; **w-PCG:** rats sensitized and challenged with 4.5 x 10⁷ w-PCG; **nw-PCG:** rats sensitized and challenged with 4.5 x 10⁷ nw-PCG; **pollen:** rats sensitized and challenged with 0.5 mg of pollen. *: significantly different to NC (p<0.05); #: significantly different to pollen group (p<0.05).

4. Alveolar cells in BALF

Pro-allergy alveolar cells (Table 2): Compared to NC group, w-PCG and nw-PCG significantly increased eosinophil and lymphocyte numbers in BALF. In contrast to pollen-sensitized rats, w-PCG presented high eosinophil and lymphocyte number in BALF, but these increases were significant only for BALF lymphocytes. In rats sensitized with nw-PCG,

eosinophil and lymphocyte numbers in BALF were higher, but not statistically different, than those obtained on pollen-sensitized rats. Rats sensitized with w-PCG had a greater BALF eosinophil and lymphocyte numbers than nw-PCG-sensitized rats, but these differences weren't statistically significant.

Pro-inflammatory alveolar cells (Table 2): Compared to NC group, w-PCG and nw-PCG significantly increased macrophage and neutrophil numbers in BALF. The 3 sensitized rat groups (w-PCG, nw-PCG and pollen) presented the same number of macrophages in BALF (around 7.5×10^6 cells/mL). In contrast to the pollen group, the number of BALF neutrophils from w-PCG-sensitized presented no significant difference. Rats sensitized with nw-PCG had higher, but no statistically significant, neutrophil numbers than those obtained on pollen group. Rats sensitized with w-PCG presented a lower number of neutrophils than those obtained on nw-PCG sensitized rats.

Table 2: Alveolar cells (Mean \pm SEM) in BALF. Alveolar cell counting was performed after May-Grünwald Giemsa staining.

| Treatment group | Pro-allergy cells ($\times 10^6$) | | Pro-inflammatory cells ($\times 10^6$) | |
|-----------------|-------------------------------------|--------------------|--|-------------------|
| | Eosinophils | Lymphocytes | Macrophages | Neutrophils |
| NC | 0.40 ± 0.09 | 0.21 ± 0.06 | 3.4 ± 0.4 | 0.03 ± 0.01 |
| w-PCG | $5.32 \pm 1.33 *$ | $0.63 \pm 0.21 *#$ | $7.0 \pm 1.6 *$ | $0.29 \pm 0.10 *$ |
| nw-PCG | $5.05 \pm 1.18 *$ | $0.35 \pm 0.12 *$ | $7.5 \pm 0.4 *$ | $0.55 \pm 0.21 *$ |
| Pollen | $4.00 \pm 0.83 *$ | 0.11 ± 0.09 | $7.9 \pm 1.3 *$ | $0.25 \pm 0.11 *$ |

NC: negative control group; **w-PCG:** rats sensitized and challenged with 4.5×10^7 washed PCG; **nw-PCG:** rats sensitized and challenged with 4.5×10^7 non-washed PCG; **pollen:** rats sensitized and challenged with 0.5 mg of pollen. *: significantly different to NC ($p < 0.05$); #: significantly different to pollen group ($p < 0.05$).

5. Lymph node cell proliferation induced by pollen or PCG

After *in vitro* addition of pollen grains, lymph node cells from w-PCG-sensitized rats presented a significant increase of the proliferation compared to NC group, but there was no cell proliferation with the cells from nw-PCG-sensitized rats. Compared to pollen group, cells

issued from w-PCG group presented significantly low cell proliferation. Lymph node cells on w-PCG sensitized presented higher proliferation than those obtained from nw-PCG-sensitized rats. (Figure 3 A)

After *in vitro* addition of nw-PCG, the proliferation of lymph node cells from w-PCG and nw-PCG-sensitized rats were significantly higher than those of NC group. Compared to the pollen group, lymph node cells on w-PCG and nw-PCG sensitized rats presented low proliferation, but the difference was statistically significant only for nw-PCG sensitized rats. Cells from w-PCG-sensitized rats presented a significantly higher proliferation than those from nw-PCG group. (Figure 3 B)

After *in vitro* addition of w-PCG, lymph node cells from w-PCG and nw-PCG-sensitized rats presented a significant increase of the cell proliferation compared to NC group. In contrast to the pollen group, the proliferation of lymph node cells from w-PCG-sensitized rats was significantly higher, but on nw-PCG group, the signal was lower. Lymph node cells of w-PCG-sensitized rats presented a significantly higher proliferation than those of nw-PCG group. (Figure 3 C)

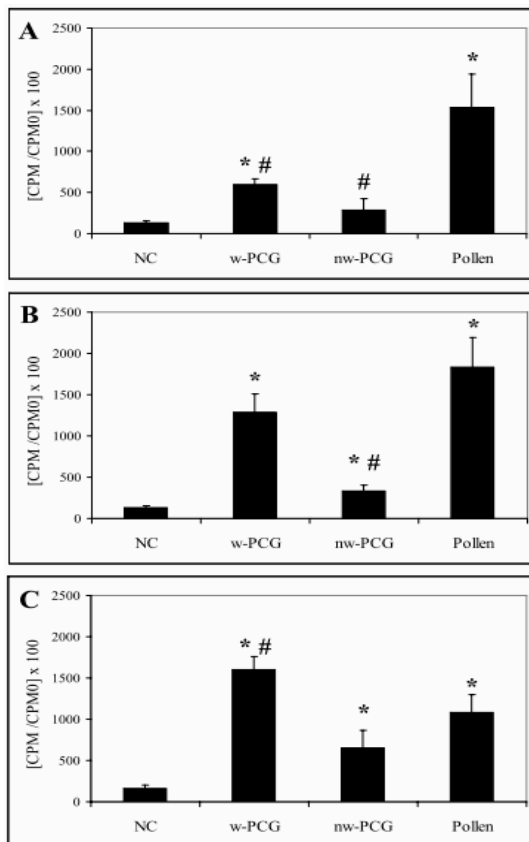


Figure 3: Pollen and PCG-induced proliferation of lymph node cells. Cells from NC, pollen or PCG-sensitized rats were cultured with [³H]-thymidine in the presence of 10 µg of pollen (A), 9 x 10⁵ nw-PCG (B) and 9 x 10⁵ w-PCG (C). NC: negative control group; w-PCG: rats sensitized and challenged with 4.5 x 10⁷ w-PCG; nw-PCG: rats sensitized and challenged with 4.5 x 10⁷ nw-PCG; pollen: rats sensitized and challenged with 0.5 mg of pollen. CPM: thymidine incorporation by antigen-stimulated cells; CPM0: thymidine incorporation in control cells. *: significantly different to NC (p<0.05); #: significantly different to pollen group (p<0.05).

Discussion

In this study, allergenicity of washed and non-washed cytoplasmic granules, from timothy grass pollen, were assessed on Brown Norway rats. The two types of PCG (w-PCG and nw-PCG) induced allergic (humoral and cellular) and inflammatory responses, but these responses depend to the quality and quantity of the allergens of these particles.

After two washes of PCG (w-PCG), the content of water-soluble allergens, among other water-soluble proteins, was low (7); indeed, the w-PCG suspension, used to instill rats, contained mainly water-insoluble PCG allergens. Reversely, the nw-PCG suspension, used to instill rats, probably contained water-soluble allergens of whole pollen grains, water-soluble and insoluble PCG allergens (8).

For humoral responses, IgE ELISA and IEF followed by an immunoblot were performed with rats' sera, using, as allergen sources, water-soluble and water-insoluble extracts of pollen and/or PCG.

In the IgE ELISA study, our findings showed that w-PCG and nw-PCG-sensitized rats had higher sera IgE levels than those of the NC group, with water-soluble pollen extract. But, when comparing to pollen-sensitized rats, humoral responses varied, w-PCG-sensitized rats had low sera IgE levels, but nw-PCG-sensitized rats presented high IgE levels. Likewise, a same pattern, with low values of ELISA absorbance, was observed with water-insoluble pollen extract. Our results, concerning the w-PCG, pollen and NC rats' groups, were similar to those obtained by previous studies performed on Brown Norway rats (7). Moreover, in grass pollen-sensitive patients, isolated granules could induce IgE-mediated reactions (6).

The lower induction of IgE levels on w-PCG-sensitized rats compared to what was obtained on nw-PCG and pollen-sensitized rats could be explained by the quantities of water-soluble proteins in the suspensions used to instill rats. In fact, water-soluble proteins, among which water-soluble allergens, were present in high concentration in the nw-PCG and pollen suspensions, used to instill rats, but in lower concentration in the w-PCG suspension. Abou Chakra et al (7) showed that the quantities of water-soluble proteins, contained in suspensions used to instill rat, were correlated with sera IgE levels of PCG-sensitized rats. Also, the quality of PCG allergens could explain the difference of the humoral responses between w-PCG and nw-PCG groups. Our results showed that water-soluble allergens of PCG seem to be the main source for the triggering of humoral responses.

Even if pollen and nw-PCG suspensions, used for rat instillation, contained the same water-soluble protein concentration (data not shown), a greater induction of IgE antibodies responses on nw-PCG-sensitized was observed in contrast to pollen-sensitized rats. Indeed, because of their small size, PCG might penetrate more easily into the lower respiratory tract than whole grass pollen grains. Furthermore, particles of the 4.5×10^7 PCG suspension had a contact area with alveolar cells twice than the one of the 0.5 mg pollen grains suspension, used to instill rat. Therefore, the accessibility of allergens in nw-PCG suspension could be higher than those of pollen suspension, and so, nw-PCG induce greater IgE responses than pollen grains.

Concerning immunoblotting, this work was the first study assessing the IgE binding reactivity of rats' sera against proteins of both water-soluble and water-insoluble allergens from pollen grains and PCG.

All sensitized rats' sera presented reactivity against proteins from water-soluble and water-insoluble pollen extract, with high reactivity for nw-PCG-sensitized rats' sera and lower reactivity for w-PCG-sensitized rats' sera. Motta et al in their 2004 study (11), when using pollen and PCG-sensitized rats' sera, showed similar immunoblot patterns for IgE binding proteins from water-soluble pollen extract. Our results, concerning immunoblotting, are in agreement with those obtained from IgE ELISA. Even if, for the water-insoluble pollen extract, rats' sera required a dilution 20 times higher than those needed for the water-soluble extract, the IgE binding proteins of the water-soluble extract appeared more heterogeneous than those obtained with the water-insoluble extract. However, for water-insoluble pollen extract, the IgE levels quantified by ELISA seem to be lower than those revealed by immunoblotting. This difference could be due to the IgE ELISA method used in this study. Indeed, Godfrin et al (26) used solvents, as ethanol, to quantify the water-insoluble proteins coated on the ELISA plates. Our findings showed that grass pollen contained, besides water-soluble allergens, several water-insoluble allergens. Water-insoluble allergens were also already observed in *Dactylis glomerata* pollen (28) and in weed pollen grains (29, 30).

Although IgE binding protein reactivities from PCG extracts were lower than those obtained from pollen extracts, however some allergen types were evidenced in the PCG extracts. In fact, using monoclonal antibodies, we could show that PCG extracts contained water-soluble allergens of group 1 but not those of groups 3 and 4 (data not shown). Reversely, water-soluble *Phleum pratense* pollen extracts contain these allergens as previously shown by

Rogerieux et al (25). Some other studies showed that several pollen allergens were present in PCG, among which Phl p 4, Phl p 5, Phl p 6 and Phl p 13 (13, 14, 17). As for pollen extracts, allergens of the water-soluble PCG extract appeared more heterogeneous than those obtained with the water-insoluble PCG extract, but basic proteins were mostly observed in the water-insoluble extract.

For the cellular responses, the majority of studied parameters, as lymph node cell proliferation, pro-allergic cytokines and alveolar cells in BALF, were induced on w-PCG and nw-PCG-sensitized rats. But, in contrast to the pollen group, these responses of w-PCG and nw-PCG groups presented different patterns depending to the studied parameter.

In our study, the lymph node cell proliferation presented a pattern non similar to the IgE levels. As a matter of fact, Würtzen et al (31) explained the absence of a correlation between T-cell proliferation and IgE levels results by the finding that patients, predominantly, produced IL-5 in response to Phl p 5, a major allergen, and IFN-gamma, predominantly, in response to pollen extract.

In a previous study of our research group, proliferation of lymph node cells from w-PCG-sensitized rats was lower, when adding *in vitro* pollen grains, or higher, when adding *in vitro* w-PCG, than what was obtained on cells from pollen-sensitized rats, but these differences were not statistically significant (7). However, in the present study, using lower concentrations of pollen or w-PCG than those used *in vitro* in the previous work, some similar trends showing significant differences could be highlighted.

Regarding the nw-PCG sensitized rats group, the proliferation was lower on lymph node cells than what was obtained for the 2 other sensitized rats groups (pollen and w-PCG). These differences could be linked, as for humoral responses, with the quality and the accessibility of allergens in nw-PCG suspension used for rat instillation. A fast kinetic of immunologic responses against allergens of nw-PCG suspension could trigger several of the differences found in cell proliferation between nw-PCG-sensitized rats and the 2 other sensitized groups. Some previous study already showed that different products, used to sensitize mice, presented different kinetics of *in vitro* cells proliferation (32).

For pro-allergy alveolar cells (eosinophils and lymphocytes), low increases were observed in the BALF of w-PCG-sensitized rats compared to what was obtained for the 2 other sensitized groups (nw-PCG and pollen). Similar results were obtained for mice sensitized with subpollen

particles (some other, rather close, denomination of PCG) (9). The great eosinophil and lymphocyte infiltrations in lungs seem to be provoked by the Th2 cytokines, like IL-4, IL-5 and IL-13, and chemokines like GM-CSF and Rantes (33-35). In our study, a clear increase of IL-5, IL-13 and Rantes levels in BALF is visible for the w-PCG-sensitized rats group. But nw-PCG and pollen induced only an increase of a single cytokine: Rantes for nw-PCG group and IL-5 for pollen group. Regarding the Th1 cytokines, our findings showed that pollen grains increased IL-6 and IFN γ levels in BALF and that nw-PCG induced a significant increase of IFN γ level. But w-PCG didn't induce any significant increase of Th1 cytokines. Our results are in accordance to previous studies showing that Th1 cytokines, as IFN γ and IL-12, inhibit Th2 cytokines, as IL-5 and IL-13, but not lymphocyte proliferation (36). Some other studies drew attention to the fact that the presence of eosinophils, lymphocytes and Rantes in the bronchoalveolar lavage fluid was often associated with asthma, especially with severe asthma (37-41). Badorrek et al (42) showed that PCG induced asthma symptoms when whole pollen is more implicated in hay fever triggering.

In the present study, inflammatory responses were performed in BALF by counting of pro-inflammation cells (macrophages and neutrophils), quantification of proteins and pro-inflammation cytokines (IL-1 α , IL-1 β and TNF α). All inflammatory parameters were induced on all sensitized rat groups. These responses could be explained by the presence of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced) (NAD(P)H) oxidase, fatty acids and (1 \rightarrow 3)- β -glucan that have already been detected in pollen grains and PCG (9, 43, 44). In fact, several studies showed that NAD(P)H oxidase generated reactive oxygen species providing a signal that enhances allergic airway inflammation. (43)

In conclusion, allergic and inflammatory responses were induced by both grass pollen grains and their isolated PCG. This work is the first one that could be completed with experiments using, in the same time, water-soluble and –insoluble PCG and also pollen extracts. The PCG allergens, here highlighted, might play an important role in allergic responses. On the one hand, cellular responses of sensitized rats' groups, presented different patterns depending to the studied parameter: water-soluble PCG allergen accessibility could play a role on the lymph node cell proliferation and other cellular responses performed in BALF seem to be enhanced by water-insoluble allergens of PCG. On the other hand, humoral responses could be influenced by the amount of water-soluble allergens and/or by the accessibility of these allergens.

Acknowledgements

The present study was supported by the French Ministry of Environment and Sustainable Development (BCRD-DRC-05-AP-2005). We acknowledged Franck ROBIDEL and Olivier DUPONT for their participation in this study.

References

1. Lacroix G. Allergies respiratoires, pollens et polluants = Respiratory allergy, pollen and pollutants. *Archives des maladies professionnelles et de l'environnement*. 2005;66(6):584-91.
2. Singh MB, Hough T, Theerakulpisut P, Avjioglu A, Davies S, Smith PM, et al. Isolation of cDNA encoding a newly identified major allergenic protein of rye-grass pollen: intracellular targeting to the amyloplast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Feb 15;88(4):1384-8.
3. Suphioglu C. Thunderstorm asthma due to grass pollen. *Int Arch Allergy Immunol*. 1998 Aug;116(4):253-60.
4. Schappi 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 May;54(5):478-83.
5. Motta AC, Marliere M, Peltre G, Sterenberg PA, Lacroix G. Traffic-related air pollutants induce the release of allergen-containing cytoplasmic granules from grass pollen. *Int Arch Allergy Immunol*. 2006;139(4):294-8.
6. Suphioglu C, Singh MB, Taylor P, Bellomo R, Holmes P, Puy R, et al. Mechanism of grass-pollen-induced asthma. *Lancet*. 1992 Mar 7;339(8793):569-72.
7. Abou Chakra OR, Rogerieux F, Peltre G, Sénéchal H, Lacroix G. Effects of pollen grains and their cytoplasmic granules on allergic humoral and cellular responses in the rat. *Open Allergy Journal*. submitted.
8. Abou Chakra OR, Sutra JP, Rogerieux F, Peltre G, Sénéchal H, Lacroix G. Cross-allergenicity between pollen grains and their cytoplasmic granules on Brown Norway rats. *World Allergy Organization Journal*. submitted.
9. Bacsı A, Choudhury BK, Dharajiya N, Sur S, Boldogh I. Subpollen particles: Carriers of allergenic proteins and oxidases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006;118(4):844-50.
10. Motta A, Peltre G, Dormans JA, Withagen CE, Lacroix G, Bois F, et al. Phleum pratense pollen starch granules induce humoral and cell-mediated immune responses in a rat model of allergy. *Clin Exp Allergy*. 2004 Feb;34(2):310-4.
11. Motta AC, Dormans JA, Peltre G, Lacroix G, Bois FY, Steerenberg PA, et al. Intratracheal instillation of cytoplasmic granules from Phleum pratense pollen induces IgE- and cell-mediated responses in the Brown Norway rat. *Int Arch Allergy Immunol*. 2004 Sep;135(1):24-9.
12. Currie AJ, Stewart GA, McWilliam AS. Alveolar macrophages bind and phagocytose allergen-containing pollen starch granules via C-type lectin and integrin receptors: implications for airway inflammatory disease. *J Immunol*. 2000 Apr 1;164(7):3878-86.
13. Fischer S, Grote M, Fahlbusch B, Muller WD, Kraft D, Valenta R. Characterization of Phl p 4, a major timothy grass (Phleum pratense) pollen allergen. *J Allergy Clin Immunol*. 1996 Jul;98(1):189-98.
14. Grote M, Dolecek C, Van Ree R, Valenta R. Immunogold electron microscopic localization of timothy grass (Phleum pratense) pollen major allergens Phl p I and Phl p V after anhydrous fixation in acrolein vapor. *J Histochem Cytochem*. 1994 Mar;42(3):427-31.

15. Grote M, Swoboda I, Valenta R, Reichelt R. Group 13 allergens as environmental and immunological markers for grass pollen allergy: studies by immunogold field emission scanning and transmission electron microscopy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2005 Apr;136(4):303-10.
16. Taylor PE, Staff IA, Singh MB, Knox RB. Localization of the two major allergens in rye-grass pollen using specific monoclonal antibodies and quantitative analysis of immunogold labelling. *Histochem J*. 1994 May;26(5):392-401.
17. Vrtala S, Fischer S, Grote M, Vangelista L, Pastore A, Sperr WR, et al. Molecular, immunological, and structural characterization of Phl p 6, a major allergen and P-particle-associated protein from Timothy grass (*Phleum pratense*) pollen. *J Immunol*. 1999 Nov 15;163(10):5489-96.
18. Bittner C, Grassau B, Frenzel K, Baur X. Identification of wheat gliadins as an allergen family related to baker's asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Mar;121(3):744-9.
19. Yeang HY, Arif SA, Yusof F, Sunderasan E. Allergenic proteins of natural rubber latex. *Methods*. 2002 May;27(1):32-45.
20. Bice DE, Seagrave J, Green FH. Animal models of asthma: potential usefulness for studying health effects of inhaled particles. *Inhal Toxicol*. 2000 Sep;12(9):829-62.
21. Boverhof DR, Billington R, Gollapudi BB, Hotchkiss JA, Krieger SM, Poole A, et al. Respiratory sensitization and allergy: current research approaches and needs. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008 Jan 1;226(1):1-13.
22. Steerenberg PA, Dormans JA, van Doorn CC, Middendorp S, Vos JG, van Loveren H. A pollen model in the rat for testing adjuvant activity of air pollution components. *Inhal Toxicol*. 1999 Dec;11(12):1109-22.
23. Szelenyi I. Animal models of bronchial asthma. *Inflamm Res*. 2000 Dec;49(12):639-54.
24. Mahler V, Diepgen TL, Kubeta O, Leakakos T, Truscott W, Schuler G, et al. Mutual boosting effects of sensitization with timothy grass pollen and latex glove extract on IgE antibody responses in a mouse model. *J Invest Dermatol*. 2000 May;114(5):1039-43.
25. Rogerieux F, Godfrin D, Sénéchal H, Motta AC, Marlière M, Peltre G, et al. Modifications of *Phleum pratense* Grass Pollen Allergens following Artificial Exposure to Gaseous Air Pollutants (O₃, NO₂, SO₂). *International Archives of Allergy and Immunology*. 2007;143(2):127-34.
26. Godfrin D, Senechal H, Sutra JP, Busnel JM, Desvaux FX, Peltre G. A modified enzyme-linked immunosorbent assay adapted for immunodetection of low amounts of water-insoluble proteins. *J Immunol Methods*. 2007 Sep 30;326(1-2):83-92.
27. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75.
28. Sénéchal H, Mayer C, Le Mao J, Desvaux FX, Wal M, Hennion MC, et al. Two-dimensional immunoblot analysis of non-water soluble grass pollen allergens. XXII Congress of the EAACI - Abstract Book. 2003 June 2003:382.
29. Su SN, Harris J, Lau GX, Han SH. Aqueous-organic solvent extraction of water-insoluble protein from ragweed pollen. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi*. 1987 May;20(2):104-12.
30. Su SN, Lau GX, Harris J. Isolation and characterization of a newly identified antigen from ragweed pollen by organic solvent extraction. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi*. 1985 Aug;18(3):157-68.
31. Wurtzen PA, van Neerven RJ, Arnved J, Ipsen H, Sparholt SH. Dissection of the grass allergen-specific immune response in patients with allergies and control subjects: T-cell proliferation in patients does not correlate with specific serum IgE and skin reactivity. *J Allergy Clin Immunol*. 1998 Feb;101(2 Pt 1):241-9.

32. Hope JC, Dearman RJ, Kimber I, Hopkins SJ. The kinetics of cytokine production by draining lymph node cells following primary exposure of mice to chemical allergens. *Immunology*. 1994 Oct;83(2):250-5.
33. Riffó-Vasquez Y, Spina D. Role of cytokines and chemokines in bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation. *Pharmacol Ther*. 2002 Jun;94(3):185-211.
34. Rosenberg HF, Phipps S, Foster PS. Eosinophil trafficking in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Jun;119(6):1303-10; quiz 11-2.
35. Takatsu K, Nakajima H. IL-5 and eosinophilia. *Current Opinion in Immunology*. 2008;20(3):288-94.
36. Till S, Durham S, Dickason R, Huston D, Bungre J, Walker S, et al. IL-13 production by allergen-stimulated T cells is increased in allergic disease and associated with IL-5 but not IFN-gamma expression. *Immunology*. 1997 May;91(1):53-7.
37. Barczyk A, Sozanska E, Farnik M, Stepniak-Ziolkiewicz I, Nizio-Masior J, Pierzchala W. Increased levels of RANTES in induced sputum of chronic asthma but not in seasonal grass pollen-induced rhinitis. *Pneumonol Alergol Pol*. 2006;74(2):191-6.
38. Jeffery PK, Wardlaw AJ, Nelson FC, Collins JV, Kay AB. Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis*. 1989 Dec;140(6):1745-53.
39. Venge J, Lampinen M, Hakansson L, Rak S, Venge P. Identification of IL-5 and RANTES as the major eosinophil chemoattractants in the asthmatic lung. *J Allergy Clin Immunol*. 1996 May;97(5):1110-5.
40. Wark PA, Simpson J, Hensley MJ, Gibson PG. Airway inflammation in thunderstorm asthma. *Clin Exp Allergy*. 2002 Dec;32(12):1750-6.
41. Wright SM, Hockey PM, Enhorning G, Strong P, Reid KB, Holgate ST, et al. Altered airway surfactant phospholipid composition and reduced lung function in asthma. *J Appl Physiol*. 2000 Oct;89(4):1283-92.
42. Badorrek P, Larbig M, Dick M, Kock W, Hecker H, Hofield J, et al. The role of pollen starch granules in bronchial inflammation. *Allergy*. 2008;63(Suppl. 88):65.
43. Boldogh I, Bacsı A, Choudhury BK, Dharajiya N, Alam R, Hazra TK, et al. ROS generated by pollen NADPH oxidase provide a signal that augments antigen-induced allergic airway inflammation. *J Clin Invest*. 2005 Aug;115(8):2169-79.
44. Rylander R, Fogelmark B, McWilliam A, Currie A. (1->3)-beta-D-glucan may contribute to pollen sensitivity. *Clin Exp Immunol*. 1999 Mar;115(3):383-4.

3.5. Conclusion

Le pollen de *Phleum pratense*, les granules cytoplasmiques (GCP) de ce pollen et l'interaction entre pollen et GCP induisent des réponses allergiques, humorales et cellulaires ainsi que des réponses inflammatoires chez le rat Brown Norway, le modèle animal que nous avons utilisé.

Des allergènes hydrosolubles et non-hydrosolubles ont été mis en évidence dans tous les extraits utilisés. Ces deux types d'allergènes semblent jouer un rôle dans les réactions allergiques.

Les réponses humorales obtenues expérimentalement ont été plus fortes chez les rats instillés par les suspensions contenant des allergènes hydrosolubles de pollen et GCP non-lavés. De plus, ces réponses semblent être également influencées par la source qui contient le moins d'allergènes hydrosolubles, les GCP lavés.

Contrairement aux réponses humorales, les réponses cellulaires obtenues ont présenté différents profils en fonction du paramètre étudié. D'un côté, les allergènes non-hydrosolubles de GCP semblent accroître les taux d'éosinophiles, de lymphocytes et de cytokines Th2 dans les LBA. D'autre part, D'un autre côté, l'accessibilité des allergènes hydrosolubles des GCP pourraient jouer un rôle dans la prolifération des lymphocytes ganglionnaires.

Enfin, des réactions inflammatoires identiques ont été observées chez les rats instillés par le pollen ou les GCP. Par contre, une réaction conjointe, dans le cas d'une interaction expérimentale entre pollen et GCP, semble renforcer la réaction inflammatoire pour les animaux sensibilisés à l'une des 2 sources allergéniques.

Chapitre 4



Étude analytique

4.1. Introduction

Dans la seconde partie, le pouvoir allergénique des GCP a été observé, suivant un modèle expérimental, chez le rat Brown Norway. Les études montrant que ces particules peuvent être responsables des crises d'asthme chez les sujets allergiques aux Graminées, notamment après des périodes d'orage ou de pluie fine, restent peu nombreuses. L'allergénicité de ces particules proviendrait en grande partie de leurs allergènes, que ceux-ci soient hydrosolubles et non-hydrosolubles.

Dans des conditions atmosphériques, impliquant plusieurs types de pollution, des modifications morphologiques des grains de pollen ainsi que de leur contenu en allergènes hydrosolubles ont été observées. Les grains de pollen intacts, les fragments de pollen et les GCP représentent une part significative des aérosols atmosphériques. Sous l'effet des précipitations, les allergènes hydrosolubles des grains de pollen entier, des fragments polliniques et des GCP peuvent être dissous, ce qui peut générer au sein de ces aérosols, une fraction non négligeable qui est alors constituée, en majeure partie, d'allergènes non-hydrosolubles.

Plusieurs auteurs, parmi lesquels, dans notre groupe, Alexandre Motta, ont montré que les grains de pollen n'expulsent pas leur contenu cytoplasmique en milieu isotonique. Ils en ont déduit que les GCP ne sont pas expulsés lorsque le pollen entre en contact avec le fluide nasal après avoir été inhalé. Ainsi le mécanisme *in vivo* d'exposition aux GCP semble être uniquement l'inhalation des granules en suspension dans l'air après que ceux-ci aient été relargués à la suite d'un contact avec de l'eau de pluie ou en raison de la destruction du grain de pollen par la pollution atmosphérique ou n'importe quel autre moyen.

De plus, jusqu'alors, les études allergomiques se sont intéressées principalement aux allergènes hydrosolubles. Cependant le potentiel allergique peut être associé, aussi, aux protéines non-hydrosolubles. Un profil allergomique complet tenant compte à la fois des allergènes hydrosolubles et non-hydrosolubles des pollen entiers et des GCP présenterait un intérêt médical et pourrait aider à l'amélioration du diagnostic des allergies polliniques.

Pour cela, l'objectif de cette partie de notre travail aura été de séparer et préparer l'identification des différents allergènes hydrosolubles et non-hydrosolubles des GCP et des grains de pollen entiers en utilisant comme modèle le pollen de *Phleum pratense*. Les

protéines des différents extraits de pollen et de leurs granules cytoplasmiques sont séparées par des iso-focalisation en présence d'ampholytes porteurs (IEF) et par des électrophorèses bidimensionnelles. L'immunodétection des immunoglobulines E spécifiques des allergènes est effectuée après empreinte sur des membranes incubées - PVDF ou nitrocellulose activée (porosité : 0,2 µm) - avec des sérums de patients allergiques au pollen de différentes Graminées. De même, des anticorps monoclonaux et polyclonaux - de lapin ou de souris - ont été utilisés pour identifier des allergènes spécifiques, tels que Phl p 1, Phl p 3 et Phl p 4, dans les extraits hydrosolubles des aéroallergènes étudiés.

Un article qui reprend les différents aspects de cette démarche analytique a été composé avec plusieurs membres du groupe. Il a été intitulé: « Towards an identification of water-soluble and water-insoluble allergens of pollen cytoplasmic granules ».

4.2. ARTICLE 5

Towards an identification of water soluble and water-insoluble allergens of pollen cytoplasmic granules.

Journal of Immunology

ABOU CHAKRA Oussama R., SUTRA Jean-Pierre, DESVAUX François -
Xavier, ROGERIEUX Françoise, PELTRE Gabriel, SÉNÉCHAL Hélène and
LACROIX Ghislaine

Abstract

Background: Grass pollen is quantitatively one of the most important vectors of aeroallergens in Europe. Under atmospheric conditions, pollen grains can release microparticles called pollen cytoplasmic granules or PCG. The allergens linked to these particles induce allergic and inflammatory responses on animals and asthmatic patients. Moreover, several studies showed that both water-insoluble allergens and water-soluble ones, can contribute to allergic diseases.

Objective: To identify water-soluble and water-insoluble allergens of pollen grains and their granules using grass pollen sensitized-patient sera.

Methods: From *Phleum pratense* pollen and PCG, water-soluble and water-insoluble proteins were extracted, respectively, with water and a mixture of thiourea, urea and CHAPS. Firstly, the proteins were submitted to IEF immunoblotting using 9 grass pollen-sensitized patient sera in order to reveal IgE-binding proteins. The second step was to submit pollen and PCG extracts to 2 D gel electrophoresis and immunoblotting revealed by 3 patients' sera.

Results: In the water-soluble extract of PCG, the Mr range of most of the protein spots is comprised between 14 and 77 and the pI range starts around 4.6 and reaches 10.0. In comparison to water-soluble extract of pollen grains, several water-soluble allergens, such as Phl p 1, Phl p 5 and Phl p 6, seem to be present also in PCG extract. However, immunoblotting of water soluble extract of PCG showed additional specific spots for these microparticles. On the other hand, the immunoblot of water-insoluble extract of PCG revealed that the majority of proteins had a Mr from 20 to 90 kDa and a pI between 5.1 and 9.5. As for water-soluble PCG allergens, specific allergens were observed in water-insoluble PCG extract that are not present in pollen extract.

Conclusion: In water soluble and water-insoluble extracts, whole pollen grains presented a greater spectrum of proteins than PCG. Moreover, although the majority of allergens seem to be common to PCG and whole pollen grains, other allergens seem to be associated only with PCG.

Key words: water-soluble allergens / water-insoluble allergens/ *Phleum pratense* pollen / pollen cytoplasmic granules / IgE-binding protein / 2 D electrophoresis/ immunoblotting.

Introduction

Since 40 years, the frequency of symptoms of allergic diseases, including rhinitis and asthma, has dramatically increased, especially for children and people living in urban areas. These atopic diseases are complex inflammatory disorders influenced by both genetic and environmental factors, including pollen grains, the main contributors to a massive diffusion of allergens in the atmosphere. However, although the symptoms associated with these affections coincide with the pollination season, it is now well established that simple and direct relation doesn't exist between these two phenomena and that many other factors, as airborne pollutants and westernized lifestyle, must be taken into account. [1]

In the atmosphere, pollen grains can release hundreds of small particles (less than 3 microns in diameter) called pollen cytoplasmic granules (PCG) [2, 3]. Airborne PCG are present in high concentrations on days following rainfall [3, 4]. Because of their size, compared to pollen grains, PCG could penetrate deeper in the humans' airways and so, they could increase allergic responses. In fact, some studies associated PCG to thunderstorm asthma [5, 6].

On the other hand, under polluted conditions, modifications have been reported in the shape and tectum morphologies of airborne pollen grains [7, 8] and on their water-soluble allergens content [9]. Undamaged pollen grains as well as fragmented pollen, PCG and proteins from different organic sources represent a significant part of atmospheric aerosols [10]. In fragmented pollen particles and PCG, present in the urban environment, some water-soluble proteins are extracted by rain, the consequence being that most of the remaining proteins are water-insoluble.

Furthermore, allergomic studies have been carried out mainly on water-soluble allergens, but allergenic potential may also be associated with water-insoluble proteins as already reported by several studies [11]. Complete allergomic profiles taking into account both water-soluble and insoluble allergens might be of interest for the medical profession and can help the improvement of diagnosis.

The aim of the present study was to identify water-soluble and water-insoluble allergens from grass pollen grains and their cytoplasmic granules (PCG) using *Phleum pratense* pollen as allergen source. Grass pollen-sensitized patients' sera were used as immunochemical reagents for the allergens detection after separation by 1- or 2-dimensional (1 D or 2 D) electrophoresis and immunoblots.

Material and Methods

1. Pollen and PCG

Pollen grains from Timothy grass (*Phleum pratense*) were obtained from Allerbio AB (Varennnes-en-Argonne, France).

Pollen Cytoplasmic Granules or PCG (0.6 - 5 μm , average $\varnothing \sim 1.1 \mu\text{m}$) were isolated from 400 mg of *Phleum pratense* pollen by osmotic shock in pure water. PCG were also performed by filtration, centrifugation and a washing cycle in distilled water.

2. Protein extractions

Water-soluble and water-insoluble proteins of pollen grains were performed according to Rogerieux et al [9] and Godfrin et al [12], respectively.

For water-soluble proteins of PCG, PCG issued of 400 mg of pollen were suspended in 4 mL of distilled water, incubated on a rotating drum for 1 h at room temperature. This extract was centrifuged for 10 min at 10,000 g, concentrated 10 times and then kept at -20 °C.

For water-insoluble proteins of PCG, PCG were incubated with distilled water on a rotating drum for 1 h at room temperature and then centrifuged for 10 min at 17,000 g. The supernatant was discarded and the remaining water-soluble proteins were removed by at least 6 washes in distilled water (2 mL for each wash). During these washing steps, the decrease in water-soluble protein remaining was monitored by OD at 280 nm (Hitachi spectrometer). The final pellet was dried overnight under vacuum using gel silica (VWR). Proteins of this pellet were extracted with 5mL of a solution of Thiourea (T) 2 mol.l⁻¹, urea (U) 7 mol.l⁻¹ (Sigma Aldrich) and 3-[(3-cholamidopropyl)dimethyl ammonio)-1-propanesulfonate] (CHAPS) (Sigma Aldrich), referred to here as TUC. Extraction was performed overnight in the rotating drum and centrifuged as described above. Supernatants were recovered and kept at -20 °C.

3. Patient sera

The human sera for this study were collected from medical laboratories and represent residues from IgE titer determinations. The anonymous information regarding patients who are the source of this serum collection is computerized using Microsoft Access software. From our bank of patient sera, 9 were selected from a group of 26 grasses pollen-allergic

donors for their ability to recognize a great number of grass pollen allergens after ELISA and blotting [13]. An added serum, from a non-atopic donor, was used as control. These 10 sera were used for IEF screening and 3 of these grass-pollen allergic patients' sera were used for 2 D immunoblotting.

4. One-dimensional analysis by IEF in carrier ampholytes

Pollen and PCG extracts were submitted to an isoelectrofocusing (IEF) separation performed in a polyacrylamide gel (CleanGel™ IEF, GE Healthcare) containing 5% v/v Servalyt® pH 2–11 (Serva, Heidelberg, Germany) in water or TU mixture (2 mol.l⁻¹ of Thiourea, 7 mol.l⁻¹ Urea) for, respectively, water-soluble and water-insoluble extracts. The water-soluble extracts were loaded on the anode side and the water-insoluble on the cathode side. According to the manufacturer's instructions, the flat bed electrophoretic chamber (Multiphor II, GE Healthcare) was cooled at 15 °C for water soluble extracts (ws-Pol and ws-PCG) and 18 °C for water insoluble extracts (wi-Pol and wi-PCG). After the protein separation, a part of the gel was stained with Coomassie Blue. Isoelectric point standards (pI) from 4.45 to 9.6 (BioRad) were used as references.

5. Two-dimensional electrophoresis separation

For the first dimension, proteins of water-soluble and water-insoluble extracts were separated by IEF with carrier ampholytes and immobilized pH gradient (IPG), respectively. IPG was performed according to Görg et al [14], Brodard et al [15] and Righetti & Bossi [16]. Briefly, the TUC-extract was ultracentrifuged for 1h at 350,000 g at 4 °C in an Optima TL Centrifuge (Beckman, USA) at 4 °C. Supernatant was then treated using the 2 D Clean-Up Kit according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare Biosciences) and the resulting pellet was dissolved in a TUC mixture. Prior to focusing, IPG strips (Immobiline™ DryStrip pH 3-10, GE Healthcare) were swollen overnight in the same TUC solution mixed with a given quantity of extract. IPG separation was performed with Ettan™ IPGphor 3 (GE Healthcare). After focusing, IPG strips were equilibrated, in 125 mmol l⁻¹ Tris-acetate buffer pH 8.6 containing 6 mol.l⁻¹ urea, 10 % SDS and 30 % glycerol (GE Healthcare). The strips were then incubated with 250 mmol l⁻¹ iodoacetamide (Sigma-Aldrich) in the same buffer and submitted to SDS-PAGE separation on a horizontal gel (ExcelGel gradient 8-18 %, GE Healthcare). In order to determine the molecular masses (Mr), a standard protein mixture from 220 to 14.3 kDa (GE Healthcare) was used.

Two adjacent 5-mm-IEF or IPG strips were submitted, side by side, to an SDS-PAGE separation on an 8-18 % gradient gel (ExcelGel, GE Healthcare), producing 2 quasi identical 2 D separations. One of the 2 D gel separation was silver stained according to Blum et al [17] and the other one used for immunoblotting.

6. Immunoblotting

1 D immunoblotting was performed according to Abou Chakra et al [18] with slight modifications. Briefly, after IEF separation, proteins of each extract were blotted by pressure (for 1 h at 22° C) onto a PVDF sheet (pore size 0.2 µm; Immobilon™, Millipore), covered by several dry sheets of Whatman filter paper, a glass plate and a 1 kg weight. PVDF sheets were then cut into strips (2.5 mm of width) to be used for the immunodetection. PVDF strips were saturated in defatted milk powder solution (5 % w/v in PBS - Tween 0.1 %) for 1 h at room temperature and then incubated 1 h with grass pollen-sensitized patient sera (dilution 1:10) in 5 % milk powder solution. At the next step, strips were incubated for 2 h with alkaline phosphatase (AP)-conjugated goat anti-human IgE (Sigma Aldrich). Finally, strips were revealed, in the same time (2 x 30 min), with alkaline phosphatase (AP) substrates, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) and nitroblue tetrazolium (NBT) (Sigma Aldrich). Three 5-min washes were performed with PBS - Tween between each incubation step. A mouse monoclonal antibody (mAb) directed against *Dactylis glomerata* allergen 4 (Dac g 4) and rabbit polyclonal antibody directed against r Dac g 3 were also used; the first one revealing also Phl p 4 and the second Phl p 3 [19-21]. For these last antibodies, the strips were incubated with AP-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Sigma Aldrich) or AP-conjugated mouse anti-rabbit IgG (Sigma Aldrich).

The 2 D immunoblotting was performed according to Rogerieux et al [9] with slight modifications. Briefly, after 2 D gel electrophoresis, proteins were electroblotted onto either a CNBr activated nitrocellulose (NcA) (Schleicher and Schuell) (ws-Pol) or a PVDF sheet (ws-PCG, wi-Pol and wi-PCG) (for both, pore size is 0.2 µm). The transfer was performed with a semi dry-Novablot apparatus, according to the manufacturer's instructions (1h 15 min, 1 mA/cm²). Sheets were blocked for 1 h with PBS – Tween 20 (w/v; 0.3 %) and incubated with grass pollen-allergic patient sera (1:10, except for serum n°6 with ws-Pol 1:20). After extensive washing, sheets were incubated for 2 h with AP-conjugated goat anti-human IgE (1:700; Sigma Aldrich) and revealed according to the conditions described previously.

Results

1. Patient sera screening after IEF separation

For ws-Pol (figure 1 A; table 1), all patient sera presented positive IgE reactivity. The IgE binding protein intensities were different from one serum to another. High intensity and heterogeneity of IgE from patient sera n°6 and 7 were showed, but a single IgE binding protein for patient sera n°4 was observed. In the same way, grass pollen-sensitized patient sera, except serum n°4, presented positive IgE reactivity against the ws-PCG (figure 1 B; table 1).

For wi-Pol (figure 1 C; table 1), IgE binding proteins were revealed by several allergic patient sera, except for the sera n°4 and 9. A high IgE heterogeneity and intensity were clearly visible for sera n°6 and 7. Furthermore, against wi-PCG (figure 1 D; table 1), patient serum n°6 presented higher IgE reactivity than those from the other allergic patients' sera. A very basic band was visible on the strip revealed with serum n°9. For sera n°1 and 4, no IgE binding protein could be detected.

Non-atopic patient serum (n°10) presented no IgE reactivity against all pollen and PCG extracts.

A lower heterogeneity of IgE against water-insoluble extracts was observed compared to those obtained against water-soluble extracts.

Table 1: IgE intensity and heterogeneity for atopic and non atopic patients' sera, against water-soluble and water-insoluble pollen and PCG allergens.

| Patient sera | Water-soluble | | Water-insoluble | |
|--------------|---------------|---------|-----------------|-------------|
| | Pollen | PCG | Pollen | PCG |
| 1 | + / h | + / h | + / 1 band | - |
| 2 | + / h | + / H | + / h | + / h |
| 3 | ++ / H | ++ / H | + / h | ++ / H |
| 4 | + / 1 band | - | - | - |
| 5 | ++ / H | ++ / H | ++ / h | ++ / H |
| 6 | +++ / H | +++ / H | +++ / H | +++ / H |
| 7 | +++ / H | +++ / H | +++ / H | ++ / H |
| 8 | + / h | + / h | + / h | + / 2 bands |
| 9 | + / h | + / h | - | ++ / h |
| 10 | - | - | - | - |

N°1 to 9: grass pollen allergic patient sera; n°10: non-atopic patient sera. - : no IgE reactivity; + : low IgE reactivity; ++ : moderate IgE reactivity; +++: high IgE reactivity; h: low IgE heterogeneity; H: high IgE heterogeneity.

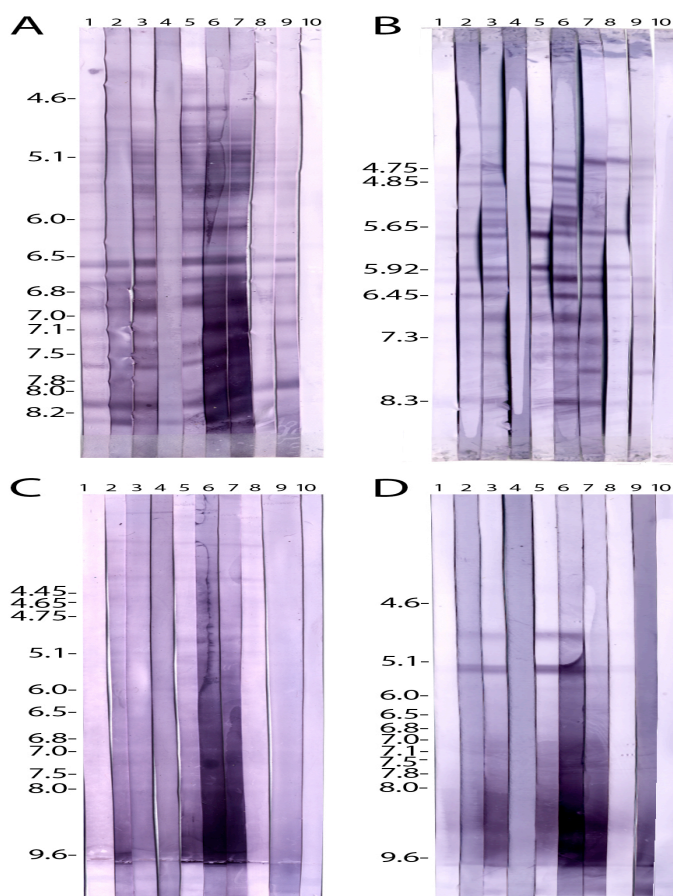


Figure 1: IEF-immunoblotting of IgE-binding proteins of pollen and PCG from *Phleum pratense*. Samples were subjected to IEF separation in polyacrylamide gel and immunoblotting on PVDF transfer membrane. Ten strips were incubated with individual sensitive patient sera (1:10): strips n°1 to 9: grass pollen allergic patient sera and strip n°10: non-atopic patient serum. A: water-soluble pollen extract; B: water-soluble PCG extracts; C: water-insoluble pollen extract; D: water-insoluble PCG extract.

2. 2 D gel analysis of *Phleum pratense* pollen water-soluble extract

The 2 D gel silver staining of ws-Pol (figure 2 A) revealed about 30 – 40 proteins with a large spectrum of relative molecular masses (M_r 14-90 kDa) and isoelectric points (pI 3.5-10.6).

The 2 D IgE binding protein patterns of this extract obtained using the 3 patients' sera presented some similarities (figure 2 B, C and D). The common allergens between allergic patients' sera were mainly located around 3 different M_r ranges: 17-24, 40-57 and 65-70 kDa, each of them showing a great pI variability. The IgE reactivities presented different intensities. Some spots at 65-70 kDa, pI 5.9 to 8.3 were revealed and could correspond to Phl p 13 isoforms. Two acidic allergen spots (pI 5.0-5.7) and 3 other acidic spots (pI 4.8-5.7), 6 neutral (pI 5.8-8.0) and a basic one (pI 10.0) were strongly revealed with M_r ranging from 40 to 57 kDa. They could correspond to Phl p 1, Phl p 5a, Phl p 5b and Phl p 1b, respectively. Acidic allergen spots (pI from 4.0 to 5.9) were also detected at M_r 17-24 kDa and probably correspond to Phl p 2. Moreover, at M_r 17-24 kDa, basic spots (pI from 7.0 to 9.0) were recognized by the anti-Dac g 3 antibodies, and should correspond to Phl p 3.

Patient sera n°6 and 8 presented other IgE binding proteins. Three spots, at 75-90 kDa, pI 3.2-3.9 (unknown high molecular mass allergen), can be regrouped and have already been named [a]. Acidic allergen spots (pI from 4.0 to 5.9) were also detected at Mr 25-26 kDa and correspond to Phl p 6.

Serum n°8 (figure 2 D) presented higher heterogeneity expressed by 2 additional allergens. It could, respectively, correspond to Phl p 4 and Phl p 12. When using a mAb against Dac g 4 which also reveals Phl p 4, a basic spot (around 70 kDa, pI 9.5-10.0) can be recognized (data not shown). This serum recognized also a very acidic allergen (pI around 3.0) with low Mr (14-20 kDa).

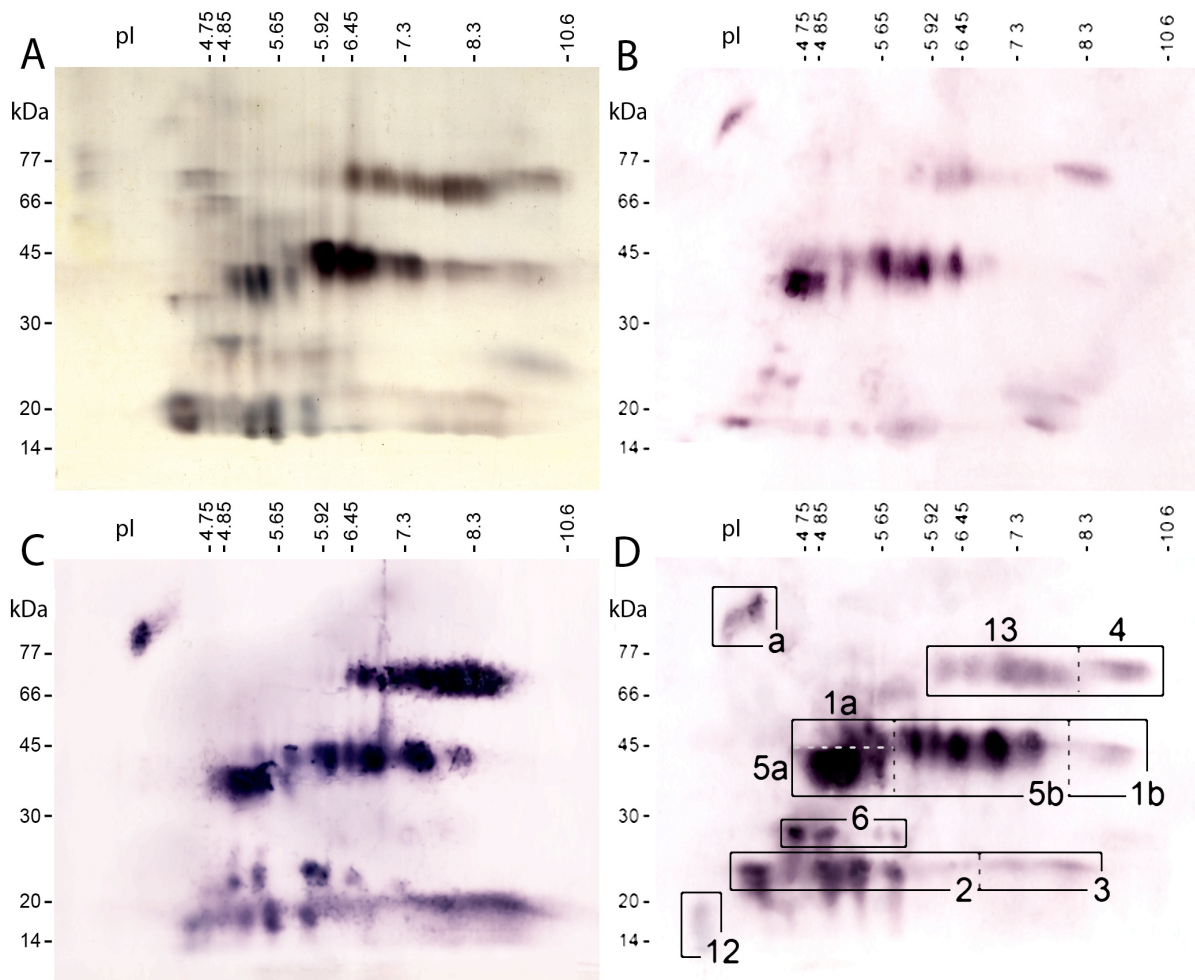


Figure 2: 2 D gel analysis of the water-soluble proteins from *Phleum pratense* pollen. Ws-Pol from *Phleum pratense* was subjected to IEF initial separation followed by SDS-PAGE separation. One of the 2 D gel separation was silver stained (A) and the other used for immunoblotting on NCA sheets using grass pollen-sensitive patient sera: serum n°1 (B); serum n°6 (C) and serum n°8 (D). Each *Phleum pratense* allergen (Phl p) is named (Allergome database) and shown in a squared area in serum n°8 blot (D). pI (at the top) and Mr (on the left) are indicated for each gel.

3. 2 D gel analysis of *Phleum pratense* PCG water-soluble extract

Thirty spots were revealed on the silver stained 2 D gel (figure 3 A). Most of these protein spots presented Mr ranging from 14 to 77 and pI ranges from 4.6 to 10.

The 3 patients' sera showed positive IgE reactivity against ws-PCG, but serum n°6 only presented a great heterogeneity (~ 30 spots) when compared to the 2 other sera (n°1 and 8; ~ 7 spots) (figure 3 B, C and D).

When using sera n°6 (figure 3 C), most allergens that were revealed showed a Mr range from 14 to 50 kDa with a pI ranging from 4.6 to 10.0. These allergens were mainly located around 3 different Mr ranges: 17-24, 25-26 and 30-45 kDa, each of them showing a great pI variability. Some spots at 30-45 kDa, pI 5.0 to 9.6 were revealed and could correspond to Phl p 1, Phl p 5a, Phl p 5b and Phl p 1b. Acidic allergen spots (pI from 4.6 to 5.9), detected at Mr 25-26 and 17-24 kDa, probably correspond to Phl p 6 and Phl p 2, respectively. Moreover, 6 neutral spots (pI from 6.0 to 7.3) were located around 2 different Mr ranges: 25-26 and 17-24 kDa.

Patient sera n°1 and 8 presented similar IgE binding protein patterns. Some allergens, revealed on serum n°6, were located around Mr range from 30 to 40 kDa, with pI ranging from 5.3 to 8.0. These allergens could correspond to several isoforms of Phl p 1 and Phl p 5. Moreover, acidic allergen spots (pI from 4.6 to 6.0) were also detected on a very low Mr (< 14 kDa).

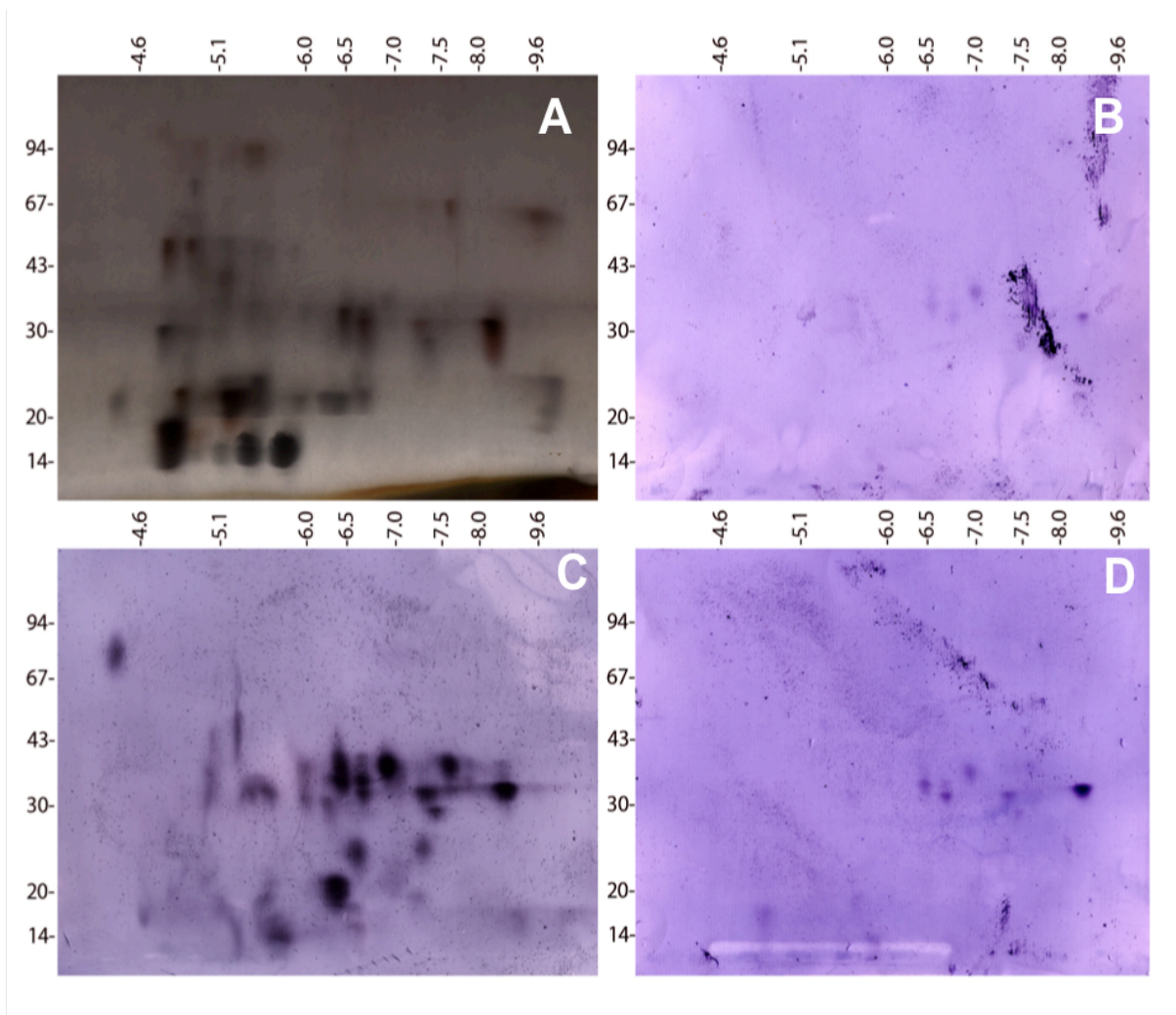


Figure 3: 2D gel analysis of the water-soluble proteins from *Phleum pratense* PCG. W_s-PCG from *Phleum pratense* was subjected to IEF initial separation followed by SDS-PAGE separation. One of the 2 D gel separation was silver stained (A) and the other blotted on PVDF sheets using grass pollen-sensitive patient sera: serum n°1 (B); serum n°6 (C) and serum n°8 (D). pI (at the top) and Mr (on the left) are indicated for each gel.

4. 2 D gel analysis of *Phleum pratense* pollen water-insoluble extract

The silver stained 2 D gel, partly hidden under a staining silver cloud, present a great number of protein spots, with Mr from 14 to over 94 kDa and pI from 2.8 to 10.3 (figure 4 A).

In the 3 PVDF immunoblots revealed with individual patients' sera, positive IgE reactivity against wi-Pol is visible. The heterogeneity and intensity of IgE from the 3 patients' sera were different: patient serum n°6 (figure 4 C) presented the highest IgE heterogeneity and intensity. The 2 other patients' sera (n°1 and 8, figure 4 B and D, respectively) presented similar IgE binding protein patterns.

Immunoblotting of serum n°6 showed several spots located around pI: 3.0-4.5, and 5.0-8.7, with a great Mr variability for each of them. Very acidic allergen spots (pI 3.0-4.5) were present on 2 different Mr ranges: 40-42 and 45-65 kDa. Some acidic, neutral and basic spots, with Mr range of 35-50 kDa, were strongly revealed. These allergen spots could correspond to Phl p 1, Phl p 1b, Phl p 5a and Phl p5b. Five neutral and basic spots (pI 7.0-8.5) were revealed at Mr 50-57 kDa. Moreover, 2 allergens, located at Mr 65-70 with pI 5.7-7.5 and pI 7.7-8.7, could correspond to Phl p 13 and Phl p 4, respectively.

With sera n°1 and 8, most allergens were mainly located at Mr 35-42 kDa, with a pI variability ranging from 5.0 to 8.7. In this area, Phl p 1, Phl p 1b, Phl p 5a and Phl p 5b could be present. Moreover, patient serum n°1 presented 2 basic spots located at Mr 15-16 and patient serum n°8 revealed a basic spot located at Mr 65-70 kDa. This last IgE binding protein could correspond to Phl p 4.

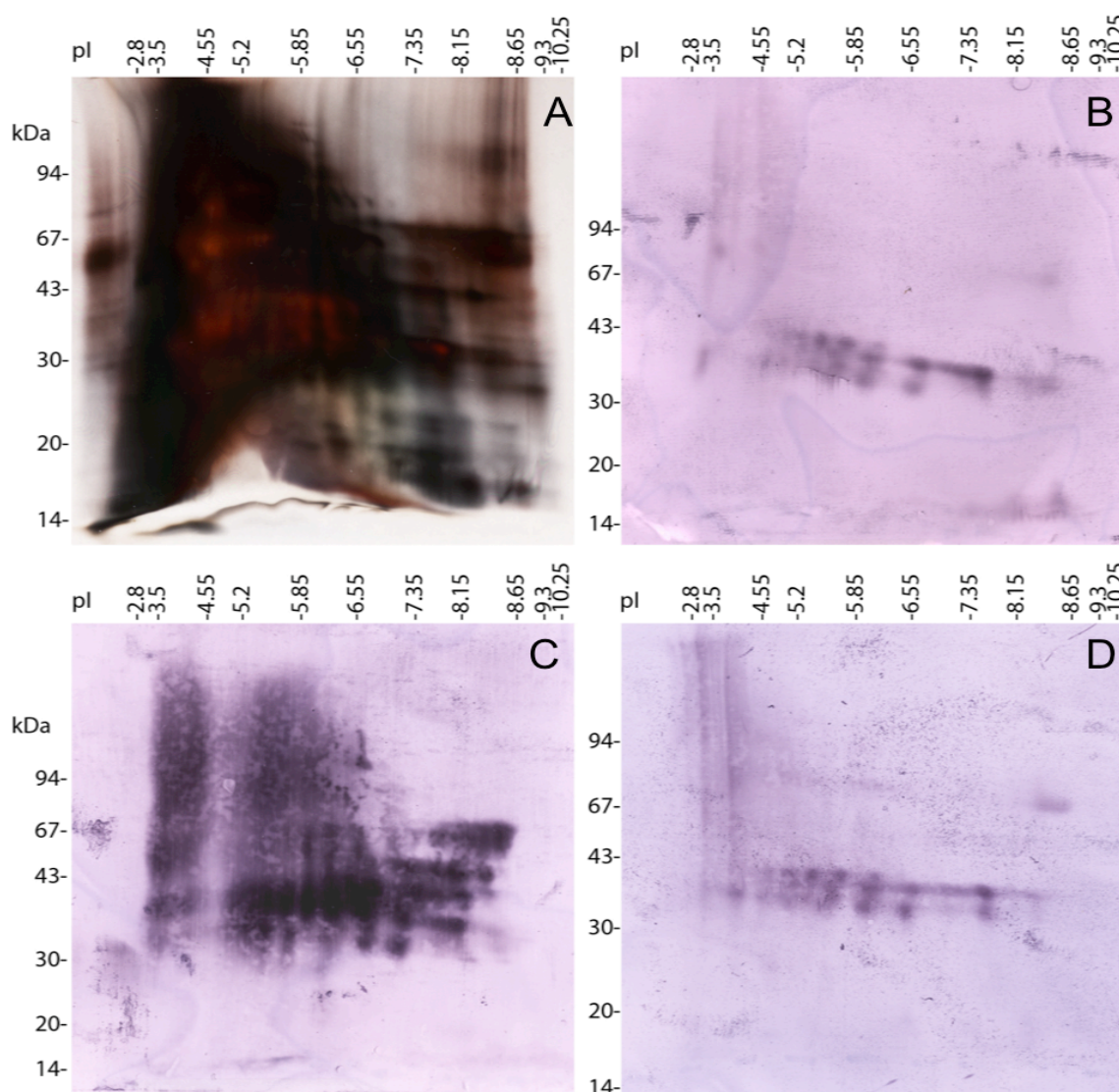


Figure 4: 2D gel analysis of the water-insoluble proteins from *Phleum pratense* pollen. Wi-Pol from *Phleum pratense* was subjected to IEF initial separation followed by SDS-PAGE separation. One of the 2 D gel separation was silver stained (A) and the other blotted on PVDF sheets using grass pollen-sensitive patient sera: serum n°1 (B); serum n°6 (C) and serum n°8 (D). pI (at the top) and Mr (on the left) are indicated for each gel.

5. 2 D gel analysis of *Phleum pratense* PCG water-insoluble extract

About thirty protein spots were revealed with the silver stained 2 D gel (figure 5 A). Most of these protein spots were mainly located at Mr 20-22, 35-40 and 65-90 kDa. Protein spots at Mr 35-40 kDa showed great pI variability (pI from 5.1 to 9.5).

The 3 PVDF immunoblots revealed with individual patient sera showed positive IgE reactivity against wi-PCG (figure 5 B, C and D). Against the wi-PCG, IgE from patient sera

n°1 and n°8 presented the same patterns. All IgE binding proteins (Mr 35-40, pI 5.3-8.6) revealed by these 2 sera were present on the PVDF revealed by patient serum n°6.

With serum n°6 (figure 5 C), allergens were mainly located at Mr 18-22, 35-45 and 65-80 kDa. Two acidic spots (pI 5.2-5.9) and 2 basic spots (pI 8.5- > 10.2) were revealed at Mr 18-22 kDa. Allergens spots at Mr 35-45 kDa were also visible on PVDF immunoblots revealed with sera n°1 and 8 and could correspond to Phl p 1 and Phl p 5 isoforms. Moreover, 3 acidic spots (pI 5.5-6.0) were present at Mr 65-80 kDa.

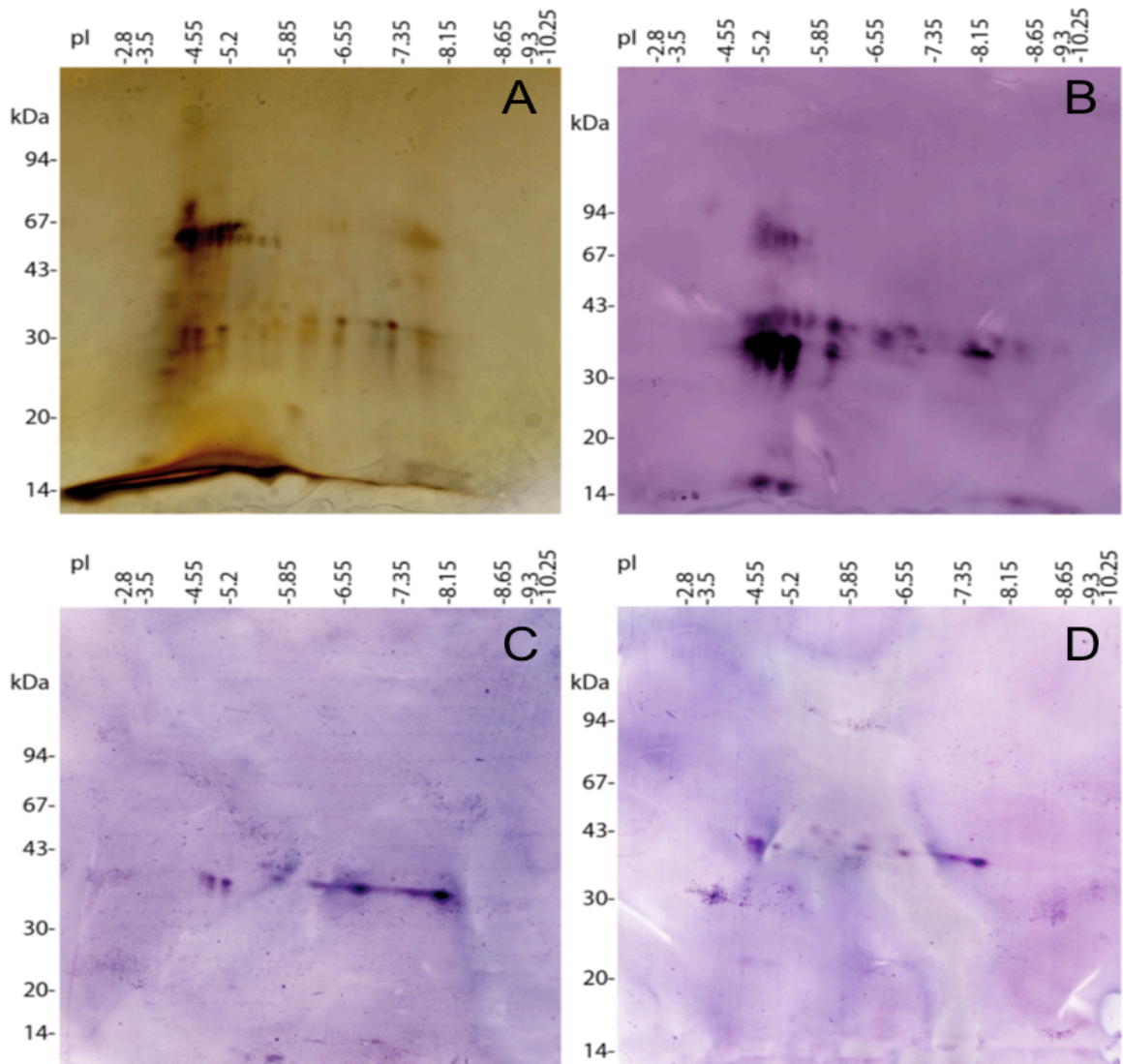


Figure 5: 2D gel analysis of the water-insoluble proteins from *Phleum pratense* PCG. Wi-PCG from *Phleum pratense* was subjected to IEF initial separation followed by SDS-PAGE separation. One of the 2 D gel separation was silver stained (A) and the other blotted on PVDF sheets using grass pollen-sensitive patient sera: serum n°1 (B); serum n°6 (C) and serum n°8 (D). pI (at the top) and Mr (on the left) are indicated for each gel.

Discussion

Up to now, allergomic studies have focused mainly on water-soluble proteins. Very few results are available on water-insoluble proteins, which nonetheless represent a large proportion of the protein content for a broad range of very diverse living organisms. We particularly focused, in this study, in the identification and characterization of water-soluble and water-insoluble allergens from pollen and PCG *Phleum pratense*. All these allergens could be potentially relevant in pollen allergy.

Our results showed that different *Phleum pratense* allergens were present in all extracts of pollen grains and PCG. These proteins could be responsible to the allergic potential of PCG. Several previous studies showed that, like pollen grains, PCG could, *in vivo*, induce allergic responses on different animal models of allergy, among which Brown Norway rats and BALB/c mice [18, 22-24] and could also, *in vitro*, increase the inflammatory responses on bronchial epithelial human cells and rat macrophages [23, 25]. Moreover, PCG elicited IgE-mediated responses in asthmatic patients and induced a bronchial constriction in patients with rainfall-associated asthma [6].

By 1 D gel immunoblotting, our findings showed that IgE heterogeneity and intensity of patients' sera could be correlated using different extracts. For each extract, the highest responses, from the results of the present study, were similar to those obtained of Brown Norway rats sera sensitized with non-washed PCG suspension, which contained water-soluble allergens of pollen, PCG and water-insoluble allergens of PCG [26]. Using the same patients' sera, Batard et al (1993) showed similar IgE binding protein reactivity against water-soluble extract from *Dactylis glomerata* pollen [13] except for patient sera n°8 and 9. For these sera, IgE reactivities were higher against the *Dactylis glomerata* than *Phleum pratense* pollen extracts.

In our work, patients' sera n°1 and n°6 were chosen for 2 D immunoblotting analysis because of their low and high IgE reactivity, respectively, against pollen and PCG extracts with IEF separation. The difference between IgE binding protein reactivities, against *Phleum pratense* and *Dactylis glomerata* pollen extracts, led us to choose also the sensitized-patient serum n°8. Patient serum n°6 was used as immunochemical reagent for 2 D gel immunoblotting in previous studies [15, 27] and showed a high IgE reactivity and heterogeneity against water-soluble extract from *Dactylis glomerata*.

In the present study, ws-Pol presented almost complete repertoire of known *Phleum pratense* allergens revealed by the 3 patient sera. When comparing the serum n°6 IgE binding protein spots obtained from water-soluble extract of *Dactylis glomerata* pollen [15] to those obtained from *Phleum pratense* pollen, similar patterns are visible.

In previous studies, water-insoluble allergens were observed in *Dactylis glomerata* pollen [28] and in weed pollen grains [29, 30]. Our findings showed also water-insoluble allergens in *Phleum pratense* pollen, but their repertoire was narrower than those of water-soluble allergens. On wi-Pol, some allergens could correspond to the major *Phleum pratense* allergens, like Phl p 1 and Phl p 5. Previously, Yeang et al [31] detected and characterized water-insoluble proteins that are major allergens like those of rubber (Hev b 1 and Hev b 3).

In our experiments using allergic patients' sera, the water-soluble pollen extract contained more allergens than the PCG extract. But, some major allergens, such as Phl p 1 and Phl p 5 isoforms, seem to be present in both extracts (pollen and PCG). Other allergens were present in ws-PCG and could correspond to Phl p 2 as well as Phl p 6. Moreover, the allergen called [a] [9] have been shown in both ws-Pol and ws-PCG. Previous studies, using immunoglod labeling and western blot techniques showed that several water-soluble grass pollen allergens were present in PCG. Among these, Phl p 5 as well as Phl p 6 were present in PCG from *Phleum pratense* pollen [32, 33]. The same thing is true for Lol p 1b and Lol p 5 from *Lolium perenne* pollen [2, 34]. In the present work, using monoclonal antibodies, we found that PCG contained water-soluble allergens of grass allergens group 1 but not those of groups 3 and 4 (data not shown). Moreover, in PCG extracts, there were no spots that might correspond to Phl p 13. Contrary to our results, Phl p 4 and Phl p 13 have been highlighted in the PCG by other studies [35, 36].

Up to now, water-insoluble allergens of PCG stayed unstudied. Our findings showed that some spots could correspond to *Phleum pratense* allergens, like Phl p 1, Phl p 2, Phl p 3 and Phl p 5 isoforms.

In silver stained 2 D gels, some proteins from PCG extracts could correspond to some known allergens, like Phl p 4 and Phl p 13. However, these allergens were not revealed by IgE of sensitized-patient sera. This could be explained by post-translational modifications, such as glycosylation [37] or deglycosylation [38]. It is known that these modifications can affect the IgE reactivities.

Although most of the content in allergens from PCG extracts was similar to those of pollen extracts, some allergens seem clearly specific to the PCG only. In order to assert the hypothesis of such a specificity, we plan- as perspectives - a characterization, performed by mass spectrometry (MS) analysis, of all allergens in ws-Pol, wi-Pol, ws-PCG and wi-PCG.

In conclusion, this study was the first complete assessing, by 1 D and 2 D gel immunoblotting, the IgE binding reactivity of grass pollen allergic and non-atopic patients' sera against ws-Pol, wi-Pol, ws-PCG and wi-PCG from *Phleum pratense*.

Acknowledgements

The present study was supported by the French Ministry of Environment and Sustainable Development (BCRD-DRC-05-AP-2005).

References

1. Davies RJ, Rusznak C, Devalia JL. Why is allergy increasing?--environmental factors. *Clin Exp Allergy*. 1998;28 Suppl 6:8-14.
2. Singh MB, Hough T, Theerakulpisut P, Avjioglu A, Davies S, Smith PM, et al. Isolation of cDNA encoding a newly identified major allergenic protein of rye-grass pollen: intracellular targeting to the amyloplast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:1384-8.
3. Suphioglu C. Thunderstorm asthma due to grass pollen. *Int Arch Allergy Immunol*. 1998;116:253-60.
4. Bellomo R, Gigliotti P, Treloar A, Holmes P, Suphioglu C, Singh MB, et al. Two consecutive thunderstorm associated epidemics of asthma in the city of Melbourne. The possible role of rye grass pollen. *Med J Aust*. 1992;156:834-7.
5. Schappi 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;54:478-83.
6. Suphioglu C, Singh MB, Taylor P, Bellomo R, Holmes P, Puy R, et al. Mechanism of grass-pollen-induced asthma. *Lancet*. 1992;339:569-72.
7. Chehregani A, Majde A, Moin M, Gholami M, Ali Shariatzadeh M, Nassiri H. Increasing allergy potency of Zinnia pollen grains in polluted areas. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2004;58:267-72.
8. Sénéchal H, Mislin-Bocquel C, Desvaux FX, Verhille AM, Peltre G. Pollen grains and urban air pollution: a three year study. *Allergy*. 2001;56:46.
9. Rogerieux F, Godfrin D, Senechal H, Motta AC, Marliere M, Peltre G, et al. Modifications of *Phleum pratense* grass pollen allergens following artificial exposure to gaseous air pollutants (O₃), NO₂, SO₂). *Int Arch Allergy Immunol*. 2007;143:127-34.
10. Jaenicke R. Abundance of Cellular Material and Proteins in the Atmosphere. *Science*. 2005;308:73-.

11. Bittner C, Grassau B, Frenzel K, Baur X. Identification of wheat gliadins as an allergen family related to baker's asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2008;121:744-9.
12. Godfrin D, Sénéchal H, Sutra J-P, Busnel J-M, Desvaux F-X, Peltre G. A modified enzyme-linked immunosorbent assay adapted for immunodetection of low amounts of water-insoluble proteins. *Journal of Immunological Methods*. 2007;326:83-92.
13. Batard T, Basuyaux B, Lambin P, Bremard-Oury C, Hamilton RG, David B, et al. Isotypic analysis of grass pollen-specific immunoglobulins in human plasma. 1. Specialization of certain classes and subclasses in the immune response. *Int Arch Allergy Immunol*. 1993;100:68-78.
14. Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. 2004;4:3665-85.
15. Brodard V, David B, Gorg A, Peltre G. Two-dimensional gel electrophoretic analysis with immobilized pH gradients of *Dactylis glomerata* pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 1993;102:72-80.
16. Righetti PG, Bossi A. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: an update. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1997;699:77-89.
17. Blum H, Beier H, Gross HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. 1987;8:93-9.
18. Abou Chakra OR, Sutra J-P, Desvaux FX, Peltre G, Lacroix G, Sénéchal H. Role of water-soluble and water-insoluble allergens of pollen cytoplasmic granules in humoral and cellular allergic responses. *Compte-rendu de l'Académie des Sciences*. submitted;
19. Andersson K, Lidholm J. Characteristics and immunobiology of grass pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 2003;130:87-107.
20. Guerin-Marchand C, Senechal H, Bouin AP, Leduc-Brodard V, Taudou G, Weyer A, et al. Cloning, sequencing and immunological characterization of Dac g 3, a major allergen from *Dactylis glomerata* pollen. *Mol Immunol*. 1996;33:797-806.
21. Leduc-Brodard V, Inacio F, Jaquinod M, Forest E, David B, Peltre G. Characterization of Dac g 4, a major basic allergen from *Dactylis glomerata* pollen. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;98:1065-72.
22. Abou Chakra OR, Rogerieux F, Peltre G, Sénéchal H, Lacroix G. Effects of pollen grains and their cytoplasmic granules on allergic humoral and cellular responses in the rat. *Open Allergy Journal*. submitted;
23. Bacsı A, Choudhury BK, Dharajiya N, Sur S, Boldogh I. Subpollen particles: Carriers of allergenic proteins and oxidases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006;118:844-50.
24. Motta AC, Dormans JA, Peltre G, Lacroix G, Bois FY, Steerenberg PA. Intratracheal instillation of cytoplasmic granules from *Phleum pratense* pollen induces IgE- and cell-mediated responses in the Brown Norway rat. *Int Arch Allergy Immunol*. 2004;135:24-9.
25. Currie AJ, Stewart GA, McWilliam AS. Alveolar macrophages bind and phagocytose allergen-containing pollen starch granules via C-type lectin and integrin receptors: implications for airway inflammatory disease. *J Immunol*. 2000;164:3878-86.

26. Abou Chakra OR, Sutra JP, Rogerieux F, Peltre G, Sénéchal H, Lacroix G. Cross-allergenicity between pollen grains and their cytoplasmic granules on Brown Norway rats. *World Allergy Organization Journal*. submitted;
27. Leduc-Brodard V, David B, Peltre G. Comparison of three horizontal two-dimensional electrophoretic techniques to separate grass pollen allergens. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 1994;40:1-8.
28. Sénéchal H, Mayer C, Le Mao J, Desvaux FX, Wal M, Hennion MC, et al. Two-dimensional immunoblot analysis of non-water soluble grass pollen allergens. XXII Congress of the EAACI - Abstract Book. 2003;382.
29. Su SN, Harris J, Lau GX, Han SH. Aqueous-organic solvent extraction of water-insoluble protein from ragweed pollen. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi*. 1987;20:104-12.
30. Su SN, Lau GX, Harris J. Isolation and characterization of a newly identified antigen from ragweed pollen by organic solvent extraction. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi*. 1985;18:157-68.
31. Yeang HY, Arif SAM, Yusof F, Sunderasan E. Allergenic proteins of natural rubber latex. *Methods*. 2002;27:32-45.
32. Grote M, Dolecek C, Van Ree R, Valenta R. Immunogold electron microscopic localization of timothy grass (*Phleum pratense*) pollen major allergens Phl p I and Phl p V after anhydrous fixation in acrolein vapor. *J Histochem Cytochem*. 1994;42:427-31.
33. Vrtala S, Fischer S, Grote M, Vangelista L, Pastore A, Sperr WR, et al. Molecular, immunological, and structural characterization of Phl p 6, a major allergen and P-particle-associated protein from Timothy grass (*Phleum pratense*) pollen. *J Immunol*. 1999;163:5489-96.
34. Taylor PE, Staff IA, Singh MB, Knox RB. Localization of the two major allergens in rye-grass pollen using specific monoclonal antibodies and quantitative analysis of immunogold labelling. *Histochem J*. 1994;26:392-401.
35. Fischer S, Grote M, Fahlbusch B, Muller WD, Kraft D, Valenta R. Characterization of Phl p 4, a major timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;98:189-98.
36. Grote M, Swoboda I, Valenta R, Reichelt R. Group 13 allergens as environmental and immunological markers for grass pollen allergy: studies by immunogold field emission scanning and transmission electron microscopy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2005;136:303-10.
37. Petersen A, Schramm G, Schlaak M, Becker WM. Post-translational modifications influence IgE reactivity to the major allergen Phl p 1 of timothy grass pollen. *Clinical & Experimental Allergy*. 1998;28:315-21.
38. Batanero E, Crespo JF, Monsalve RI, Martin-Esteban M, Villalba M, Rodriguez R. IgE-binding and histamine-release capabilities of the main carbohydrate component isolated from the major allergen of olive tree pollen, Ole e 1. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;103:147-53.

4.3. Conclusion

Cette étude constitue le premier travail complet évaluant, par des immunodétections 1 D et 2 D, la réactivité d'IgE sériques de patients allergiques au pollen de Graminées dirigées contre des extraits hydrosolubles et non-hydrosolubles de pollen entier de *Phleum pratense* et des granules cytoplasmiques issues de ce pollen.

Nos résultats montrent que tous les extraits contiennent des allergènes. Ces allergènes qu'ils soient hydrosolubles ou non hydrosolubles, semblent jouer un rôle marqué dans le développement des allergies polliniques.

En outre, si la plupart des allergènes semblent être communs au pollen entier et aux GCP, cependant, des allergènes sont associés uniquement aux GCP.

Conclusions & Perspectives



Au cours de cette étude, l'allergénicité des granules cytoplasmiques de pollen a été mise en évidence selon 3 axes : épidémiologique, expérimentale et analytique.

Dans la partie épidémiologique, nous avons pu montrer une corrélation entre pollen de Graminées et rhinites. Par contre, aucune corrélation entre pollen de Graminées et asthme n'a pu être mise en lumière. Cela peut être dû à la taille des grains de pollen. La présence de granules cytoplasmiques de pollen dans l'air pourrait expliquer l'interaction des différents paramètres atmosphériques et la corrélation positive établie entre le facteur « précipitations » et les consultations pour asthme.

Dans la partie expérimentale, nos résultats permettent de conclure que les GCP, lavés et non-lavés, induisent, dans le modèle animal utilisé, des réactions allergiques - humorales et cellulaires - comparables à celles obtenues avec le pollen entier. De même, l'effet conjoint entre ces 2 vecteurs d'aéroallergènes (pollen entier et GCP) induit aussi des réactions allergiques. Les allergènes hydrosolubles semblent être les principaux responsables des réponses humorales. Mais, concernant les réponses cellulaires, différents profils ont été observés en fonction du paramètre étudié. D'une part, les allergènes non-hydrosolubles de GCP semblent accroître les taux d'éosinophiles, de lymphocytes et de cytokines Th2 dans les LBA. D'autre part, l'accessibilité des allergènes hydrosolubles de GCP pourrait jouer un rôle dans la prolifération des lymphocytes ganglionnaires.

L'ensemble des expériences de la partie analytique nous amène à conclure que les allergènes hydrosolubles mais aussi non-hydrosolubles des GCP et du pollen entier pourraient être responsables de l'allergénicité de ces aéroallergènes, dont certains sont déjà répertoriés dans la littérature, alors que d'autres, isolés lors de nos expérimentations 2D, ne sont, vraisemblablement, pas encore décrits.

Si l'étude que nous présentons est incomplète par bien des aspects, il n'en reste pas moins, cependant, qu'elle ouvre différentes pistes pour des perspectives futures. Quelques-unes de ces perspectives, qui nous paraissent valides et pourraient être développées relativement facilement, seront maintenant abordées.

Dans le cadre du volet « épidémiologie », dans un premier temps, il serait utile de pouvoir mettre au point une méthode simple de comptage des granules cytoplasmiques de pollen par colorimétrie (nous pensons à l'utilisation d'un kit de détection d'amidon comme celui

développé par Megazyme ; Total starch (AA/AMG ; K-TSTA). Ensuite, si cette méthode est validée, pour au moins la partie 'amidon' des GCP, des campagnes de mesures seront à envisager. Les résultats devront être rapportés à des données d'admission aux urgences et de consultations de généralistes et de spécialistes pour allergie respiratoire, en incluant les symptômes asthmatiques.

Au niveau expérimental, nous pensons évaluer l'allergénicité des GCP par instillation intranasale et par inhalation chez le rat Brown Norway ainsi que chez le cobaye Hartley, les 2 modèles animaux utilisés dans notre étude. Il faudrait étudier, également, l'impact des polluants atmosphériques gazeux et particulaires sur les granules. Par ailleurs, afin de promouvoir les études alternatives à l'expérimentation animale, il est envisageable d'évaluer l'effet des GCP, purifiés et pollués, en utilisant des modèles cellulaires d'épithélium respiratoire humain reconstitué *in vitro* à partir de cellules de patients souffrant d'asthme (produits Epithelix).

Dans le cadre de la partie analytique, nous envisageons, d'une part, la caractérisation des allergènes hydrosolubles et non hydrosolubles des granules cytoplasmiques de pollen par spectrométrie de masse et, d'autre part, nous avons le projet de fabriquer des anticorps polyclonaux de lapins dirigés contre les GCP. Enfin, il faudrait développer une méthode pour éliminer le complexe thio-urée, urée et CHAPS, utilisé lors de l'extraction des protéines non-hydrosolubles (pollen et GCP), afin de pouvoir utiliser ce type d'extrait dans des tests de diagnostic pour allergies polliniques.

Annexes



Détection quantitative de l'amidon

Les granules cytoplasmiques de pollen contenant des granules d'amidon ou « starch granules », on peut obtenir, lors d'un ajout d'iodure de potassium iodée ou de lugol, une coloration en bleu.

Pour quantifier les granules, nous avons utilisé un spectrophotomètre (TECAN) afin de choisir une longueur d'onde optimale, à laquelle nous pensions pouvoir détecter la coloration bleue de l'amidon.

Nous avons utilisé différentes concentrations d'amidon pur avec la solution de lugol. Des grains « bleus » ont été observés à l'œil nu. Quantitativement, les spectres (230 – 800 nm) indiquent qu'il y a un pic avec une longueur d'onde de 350 nm, mais, dans l'expérience telle que nous l'avons menée, il n'y avait aucune dose réponse entre les concentrations d'amidon utilisées et l'amplitude du pic (figure 1 A). L'expérience a été répétée une seconde fois (en novembre 2007) et les résultats ont été semblables à la première expérience (figure 1 B).

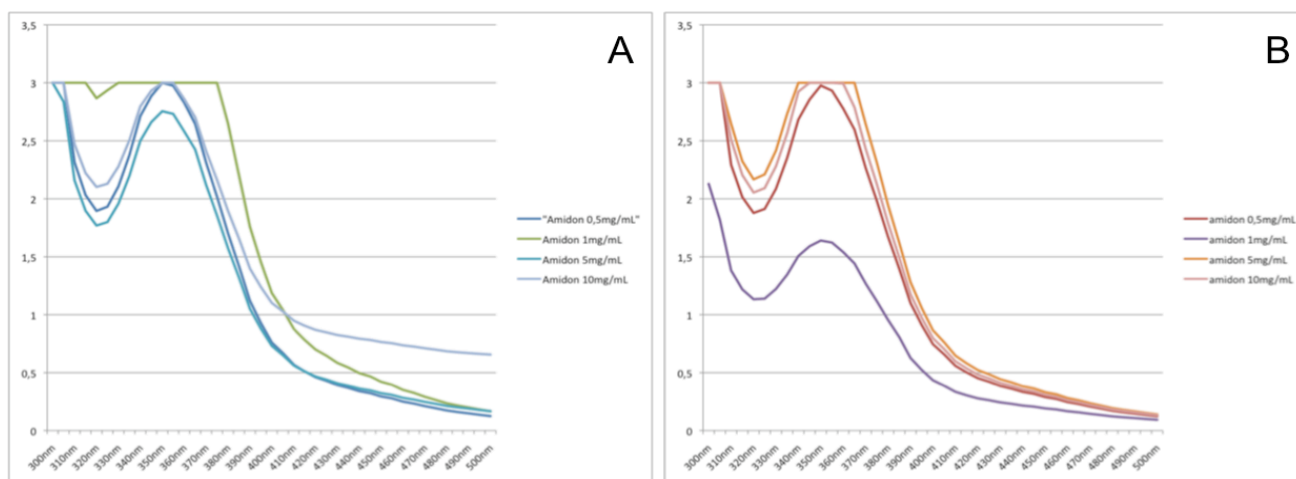


Figure 1 : Spectres de différentes concentrations d'amidon pur. Gauche : expérience réalisé en juillet 2007 ; B : expérience réalisée en novembre 2007. L'axe des abscisses représente la longueur d'onde et l'axe des ordonnées représente la densité optique.

Comme pour l'amidon pur, les granules d'amidon issus de pollen de *Phleum pratense* n'ont pas donné de bons résultats quantitativement (figure 2), bien que les granules de pollen aient pris une coloration bleue après l'ajout de la solution de lugol.

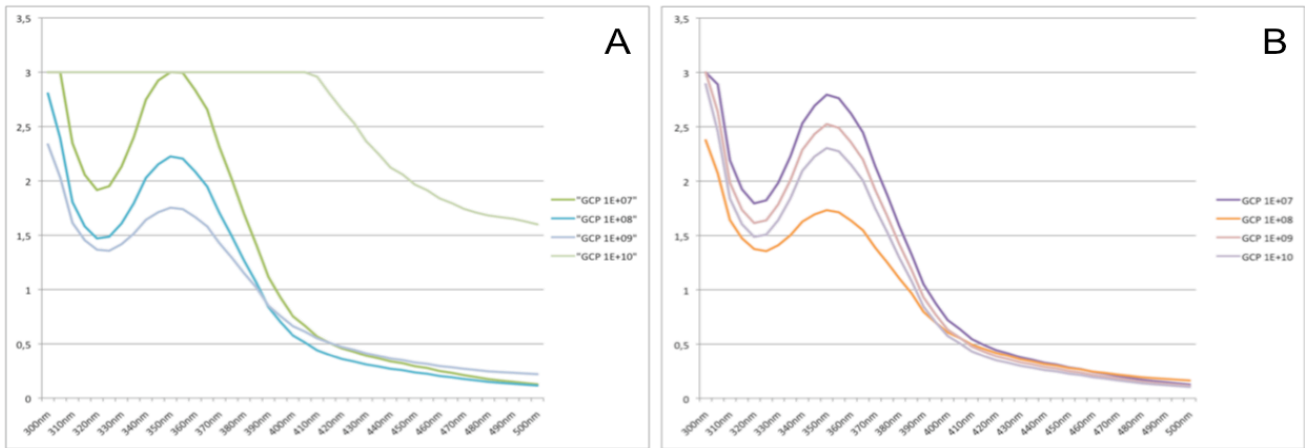


Figure 2 : Spectres de différentes concentrations de granules d'amidon issus de pollen de fléole des prés. A : expérience réalisé en juillet 2007 ; B : expérience réalisée en novembre 2007. L'axe des abscisses représente la longueur d'onde et l'axe des ordonnées représente la densité optique.

Les résultats obtenus peuvent être expliqués par le fait que seuls les grains et les granules d'amidon se colorent en bleu, alors que la solution ne change pas de couleur. Les pics observés peuvent être dus à la détection de quelques grains ou granules en suspension, après une agitation de la plaque.

ABOU CHAKRA Oussama R.¹, ROGERIEUX F.¹, ROBIDEL F.¹, MARCHAND A.¹, DUPONT O.¹, SENECHAL H.², PELTRE G.², LACROIX G.¹¹ INERIS - Parc Technologique ALATA - F 60500 Verneuil en Halatte / ² ESPCI - 10 rue Vauquelin - F 75231 Paris

BACKGROUND

- Grass pollen is quantitatively one of the most important aeroallergen, which can induce allergic diseases (asthma and hay fever).
- Most studies on the pollen allergenicity were carried out on commercialized pollen, collected 2 or 3 years before, which has undergone a standard treatment.
- A few works have pointed out that pollen evolved in time (for example in their germination capacity or in their resistance to an osmotic shock).

AIM of STUDY

- To compare chemical and physical characteristics of timothy grass pollen of 3 different harvests (2 commercialized harvests in 2003 and 2005 and one fresh in 2006).
- To compare allergenicity of timothy grass pollen of these 3 different harvests.

MATERIALS and METHODS

Characteristics

Chemical

Proteins level (Lowry)
water soluble proteins
water insoluble proteins

Physical

Number of pollen (in 10 mg)

Number of liberated PCG



Allergenicity



Intra - Tracheal
Instillation
(150 µL)

| Group | Year of Harvest | Order | Concentration |
|--------|-----------------|-------------------------------|---------------|
| NC | | NaCl 0.9 % (Negative Control) | |
| P-2003 | 2003 | Commercialized (Alespan) | 0.2 mg / rat |
| P-2005 | 2005 | Commercialized (Alespan) | 0.2 mg / rat |
| P-2006 | 07 / 2006 | Fresh | 0.2 mg / rat |

- Sera: pollen specific IgE and IgG1 antibodies by ELISA.
- BAL: cell differential counts on May Grünwald-Giemsa-stained cytoplasm slide preparation, protein concentration by Lowry.
- Bronchial lymph nodes: proliferation of lymph node cells by [³H]- thymidine incorporation.

RESULTS

Proteins' level



Water soluble proteins:

P-2005 > P-2006 = P-2003

Water insoluble proteins:

P-2003 = P-2005 > P-2006

Physical characteristics

| | Pollen ($\times 10^3$) | PCG/Pollen read 10/2006 | PCG/Pollen read 05/2008 |
|--------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|
| P-2003 | 6.5 (\pm 0.32) | 13 | 13 |
| P-2005 | 7.2 (\pm 0.02) | 17 | 16 |
| P-2006 | 5.4 (\pm 0.37) | 76 | 22 |

Pollen grains number (in 10 mg)

P-2005 > P-2003 > P-2006

PCG/Pollen:

P-2006 > P-2005 > P-2003

Humoral Responses

Pollen specific IgE in serum



P-2006 > P-2005 = P-2003 >>> NC

Pollen specific IgG1 in serum



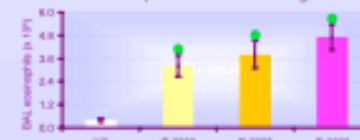
Cellular Responses

Lymphocytes proliferation in response to pollen



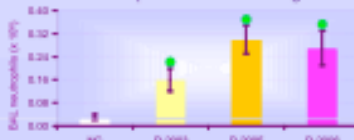
P-2006 > P-2005 > P-2003 >>> NC

Eosinophils infiltration in lungs



Inflammatory responses

Neutrophils infiltration in lung



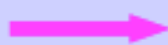
P-2006 = P-2005 = P-2003 >>> NC

Proteins level in BAL



The variation of pollen number may be due either to the size of pollen grains or to their humidity. Ageing pollen seems to lead to a loss of its ability to release cytoplasmic granules.

Fresh Pollen (without post-harvest treatment) have a higher allergic potential than commercialized pollen grain but the same inflammatory potential.



The behaviour of commercialized pollen is not necessarily representative of fresh pollen.

Résumé

Le pollen des Graminées est l'un des principaux vecteurs d'allergènes. Il contribue à l'apparition des allergies respiratoires comme l'asthme et la rhinite allergique. En contact avec l'eau de pluie ou des polluants atmosphériques, le pollen peut libérer des microparticules (<5 µm) dites granules cytoplasmiques de pollen. À cause de leur taille, ces granules peuvent pénétrer plus profondément dans l'appareil respiratoire que le pollen entier et induire ainsi des réactions allergiques.

L'objectif de ce travail est de caractériser l'allergénicité de ces granules selon 3 volets : épidémiologique, expérimental et analytique.

Les résultats de l'étude épidémiologique mettent évidence un effet éventuel des granules dans la survenue des allergies respiratoires, et plus particulièrement de l'asthme. Dans la partie expérimentale, les résultats obtenus permettent de montrer que les granules induisent des réactions allergiques, humorales et cellulaires ainsi que des réponses inflammatoires, comparables au pollen entier, chez le rat Brown Norway, le modèle animal d'allergie ici utilisé. Enfin, la partie analytique permet de conclure que l'allergénicité des granules dépend à la fois de leur contenu en allergènes hydrosolubles et non-hydrosolubles.

Mots clés : Granules cytoplasmiques de pollen ; pollen ; allergie ; allergénicité ; allergènes.

Abstract

Grass pollen is one of the most important aeroallergen vectors in Europe. It highly contributes to respiratory allergic diseases such as asthma or allergic rhinitis. In contact to water or airborne pollutants, pollen grains can release microparticles or pollen cytoplasmic granules. Because of their size (<5 µm), granules may penetrate deeper into the lungs than pollen grains and so, can induce stronger allergic responses.

The aim of this study was to characterized allergic potential of pollen cytoplasmic granules along 3 axes: epidemiological, experimental and analytical.

Results of the epidemiological study involve a possible effect of granules in the onset of allergic reparatory diseases, in particular asthma. In experimental part, the results show that granules induced allergic - both humoral and cellular - and inflammatory responses. These results are compared with whole pollen, on a good animal model of allergy, the Brown Norway rat. Finally, according to the results of the analytical study, both water-soluble and water-insoluble allergens of granules contribute to the allergenicity of these microparticles.

Keywords: Pollen cytoplasmic granules; pollen; allergy; allergenicity; allergens.

