

## COMPARAISON DE L'ALLERGENICITE ET DE LA FERTILITE ENTRE LE POLLEN DE BOULEAU DE DEUX METROPOLES FRANÇAISES

K. Vandebossche<sup>1</sup>, A. Vaneecloo<sup>1</sup>, H. Sénéchal<sup>2</sup>, P. Poncet<sup>2,3</sup>, P. de Nadaï<sup>4</sup>, F. Bray<sup>5</sup>, S. Flament<sup>5</sup>, N. Azarkan<sup>1</sup>, N. Pham-Thi<sup>6</sup>, G. Billon<sup>1</sup> et M. Choël<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univ. Lille, CNRS, UMR 8516 - LASIRE - Laboratoire de Spectroscopie pour les Interactions, la Réactivité et l'Environnement, F-59000, Lille, France

<sup>2</sup> Hôpital d'Enfants Armand-Trousseau AP-HP, groupe de recherche allergie & environnement, Paris, France

<sup>3</sup> Institut Pasteur, département d'immunologie, Paris, France

<sup>4</sup> Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 – UMR 9017 - CIIL – Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, F-59000, Lille, France

<sup>5</sup> Univ. Lille, UAR 3290 -MSAP - Miniaturisation pour la Synthèse, l'Analyse et la Protéomique, CNRS, F-59000, Lille, France

<sup>6</sup> Ecole Polytechnique de Palaiseau, Palaiseau, France. IRBA, Bretigny Sur Orge, France. Université Paris Cité, Paris, France

\*Courriel de l'orateur : klervi.vandebossche.etu@univ-lille.fr

### COMPARISON OF THE ALLERGENICITY AND FERTILITY OF BIRCH POLLEN BETWEEN TWO FRENCH METROPOLIS

#### ABSTRACT

This study compares the allergenicity and reproductive capacity of Betulaceae pollen between Paris and the European Metropolis of Lille. Samples from three birch species were collected from 36 trees in urban, suburban, and rural areas. Protein analyses reveal that Parisian pollen shows slightly higher concentrations of total proteins and Bet v 1 allergen, though without statistical significance. Protein profiles do not vary according to urbanization level, contradicting some previous studies. Germination and viability tests suggest moderate differences between sites. These findings contrast with existing literature establishing a link between urbanization and increased allergenicity.

#### RESUME

Cette étude compare l'allergénicité et la capacité reproductive du pollen de bouleau entre Paris et la Métropole Européenne de Lille. Des échantillons de trois espèces de bouleaux ont été prélevés sur 36 arbres dans des zones urbaines, périurbaines et rurales. Les analyses protéiques révèlent que le pollen parisien présente des concentrations légèrement supérieures en protéines totales et en allergène Bet v 1, mais sans différence statistiquement significative. Les profils protéiques ne varient pas selon l'urbanisation, contrairement à certaines études antérieures. Les tests de germination et viabilité suggèrent des différences modérées entre sites. Ces résultats contrastent avec la littérature établissant un lien entre urbanisation et augmentation de l'allergénicité.

**KEYWORDS:** Pollen, Birch, urbanization, pollution / **MOTS-CLES :** Pollen, Bouleau, urbanisation, pollution

#### 1. INTRODUCTION

La pollution atmosphérique issue des zones urbanisées et industrialisées contribue en partie à l'augmentation de la prévalence mondiale de l'allergie ainsi qu'à l'aggravation des symptômes de l'allergie au pollen (Burte *et al*, 2020). En France, la prévalence des allergies aux pollens est d'environ 18 % chez les adultes, toutes espèces d'arbres et de plantes anémophiles confondues. Cependant, les Bétulacées produisent les pollens les plus problématiques dans le quart nord-est du pays, en raison de leur présence endémique et de leur forte allergénicité (Lavaud *et al*, 2013). Entre 6,4 et 22,4% de la population européenne est sensibilisée aux allergènes du pollen de bouleau, et 95% des patients présentent des anticorps IgE spécifiques à l'allergène majeur du bouleau : Bet v 1 (Bauchau, 2004; Jarolim *et al*, 1989).

La littérature a largement documenté l'impact de la pollution sur les grains de pollen de bouleau (GPB) aéroportés. La pollution modifie les propriétés physiques (déformation du grain, coagulation avec des particules fines), chimiques (absorption de l'ozone, stress oxydant) et biologiques (diminution de la fertilité, modification des protéines et allergènes) des GPB (Sénéchal *et al*, 2015).

Si les GPB sont exposés et altérés durant leur dispersion, des études récentes suggèrent que des dommages surviennent déjà durant la maturation du pollen, avant la pollinisation. Ces travaux prennent en compte la pollution à laquelle l'arbre est soumis et qui pourrait modifier son pollen. Selon les auteurs, les arbres soumis à une pollution atmosphérique importante (NO<sub>x</sub>, O<sub>3</sub>, particules fines) ou implantés en milieu fortement urbanisé produiraient un pollen dont la concentration en allergènes serait plus élevée et dont les protéines seraient modifiées (Stawoska *et al*, 2023; Ziemianin *et al*, 2021).

Dans cette étude originale, nous comparons l'allergénicité et la capacité reproductive du pollen d'arbres de Bétulacées dans deux grandes villes françaises : Paris et la Métropole Européenne de Lille (MEL).

## 2. MATERIELS ET METHODES

### 2.1. Sites d'études et prélèvements des échantillons

L'étude a été menée à Paris et dans la MEL sur des sites urbains, périurbains ainsi que des sites ruraux. Les inflorescences de 9 arbres de *Betula papyrifera*, 4 arbres de *Betula pendula* 'Youngii' et 22 arbres de *Betula pendula* ont été prélevées au plus proche de la date de pollinisation et avant la déhiscence, du 30 mars au 7 avril 2025. Au total, 20 échantillons provenaient de Paris et 16 de la MEL. Les inflorescences ont été séchées puis tamisées afin de collecter uniquement le pollen.

### 2.2. Analyses de l'allergénicité du pollen

Les protéines ont été extraites à partir de 100 mg de pollen dans un tampon PBS (pH 7,5), après broyage mécanique avec des billes de verre (FastPrep-24), puis centrifugation à 14 200 tr/min et 4 °C pour isoler la fraction protéique soluble. Les protéines totales ont été quantifiées par la méthode BCA (Dosage protéique Pierce™ BCA).

Les extraits protéiques ont ensuite été séparés par SDS-PAGE afin de comparer les profils protéiques. Un test de reconnaissance des allergènes a été réalisé par western-blot à l'aide IgE issues d'un pool de sérums de patients allergiques au pollen de bouleau. La concentration en Bet v 1 a été mesurée par ELISA en utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques (kit ELISA pour Bet v 1, Indoor Biotechnologies). Les extraits ont été dilués de 1/10 à 1/100 000, et les résultats exprimés en ng de Bet v 1 pour 10 mg de pollen. Une analyse protéomique a été effectuée : les protéines ont été digérées selon la méthode eFASP, puis analysées par LC-MS/MS. L'identification des protéines et allergènes, ainsi que des modifications post-traductionnelles (MPTs), a été réalisée avec le logiciel PEAKS, en interrogeant les bases de données des protéines et des allergènes (Uniprot et IUIS).

### 2.3. Analyses de la capacité reproductive du pollen

La viabilité des grains de pollen est déterminée par coloration d'Alexander qui s'appuie sur des réactions liées à la présence du cytoplasme. Un grain viable aura une coloration fuchsia alors qu'un grain non viable ne sera pas coloré. Le taux de germination a été mesuré après réhydratation des grains et incubation sur un milieu nutritif gélosé à 23 °C pendant 4 h. La densité de grains étant l'un des principaux facteurs influençant la germination, un protocole de germination optimisé a été mis au point afin d'obtenir une densité contrôlée.

## 3. RÉSULTATS & DISCUSSION

### 3.1. Allergénicité du pollen

Comme le montre la Figure 1, le pollen prélevé à Paris montre des concentrations en protéines totales (Paris :  $409 \pm 113$  µg/mg, MEL :  $383 \pm 103$  µg/mg) et en allergène Bet v 1 supérieures au pollen de la MEL (Paris :  $150\,946 \pm 25\,227$  µg/10mg, MEL :  $102\,592 \pm 16\,459$  µg/10mg). Les résultats des tests de comparaison de moyenne de la concentration en protéines dans les pollens n'indiquent pas de différence significative entre à Paris et la MEL (p-value = 0.381). Aucune différence significative entre les deux sites n'est observée pour les concentrations en allergènes Bet v 1 (p-value = 0.139).

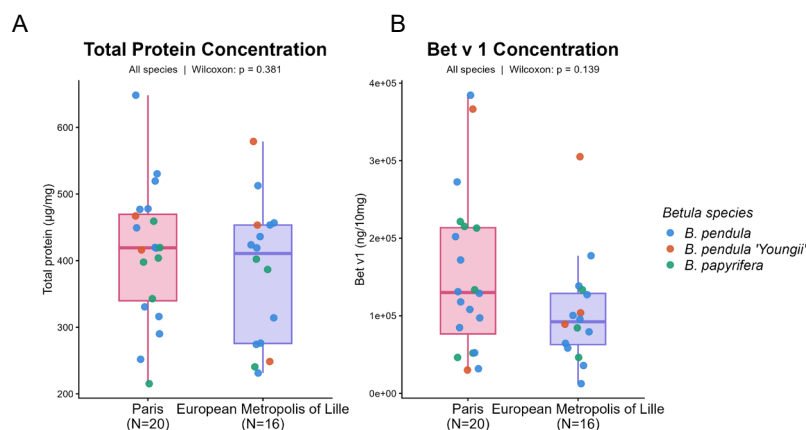


Figure 1 : A) Concentration moyenne en protéines totales selon le site d'étude. B) Concentration moyenne en allergène Bet v 1 selon le site d'étude.

L'analyse des extraits protéiques de pollen montre que les profils protéiques par SDS-PAGE diffèrent légèrement entre les espèces. *Betula papyrifera* présente un polymorphisme marqué autour de 28 kDa, avec une bande plus légère que l'homologue présent chez *B. pendula*. Le même polymorphisme est retrouvé dans l'article de Helander *et al*, (1997) sur la pollution au SO<sub>2</sub> dans le profil de deux espèces de bouleau à proximité d'une usine. En revanche, aucune variation majeure des profils protéiques n'est observée entre les sites situés en zone très urbaines ou rurales. Ces résultats contredisent certains résultats montrés dans la littérature où les auteurs mettent en évidence une modification du profil protéique par rapport au pollen des zones rurales (Bryce *et al*, 2010; Stawoska *et al*, 2023).

L'analyse protéomique approfondit ces observations : si *B. papyrifera* et *B. pendula* présentent des profils d'allergènes distincts, notamment pour Bet v 1 et ses isoformes (Figure 2), aucune différence liée au site n'a été détectée. De plus, l'analyse des MPTs a révélé une occurrence élevée de déamidations des protéines.

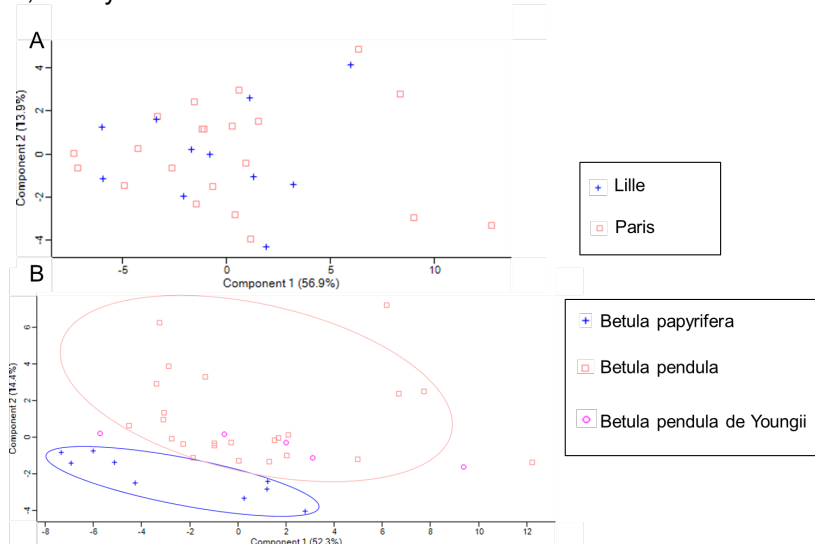


Figure 2 : A) Analyse en composante principale de l'expression de Bet v 1 et de ses isoformes mesurée par LC-MS/MS selon l'espèce et B) selon le site d'étude. Les groupes identifiés visuellement sur l'ACP ont été délimités manuellement afin d'en faciliter la lecture ; ces contours n'ont pas de valeurs statistiques.

En revanche, le test post-hoc de Tukey montre que certains isoformes de Bet v 1 mais aussi de Bet v 3, Bet v 6 et Bet v 8 sont surexprimés dans les échantillons de Paris. Cependant, au regard des tests d'immuno-détection, cette surexpression n'entraîne pas nécessairement une allergénicité supérieure. Effectivement, aucune différence de la liaison IgE pour les pollens collectés n'a été observée entre Paris et la MEL.

### 3.2. Capacité reproductive du pollen

Le protocole de germination mis au point, basé sur le contrôle de la densité des grains sur la gélose, a permis de réduire les biais expérimentaux, assurant une comparaison fiable entre échantillons. Les tests de germination ont été effectués avec la même masse de pollen utilisé pour chaque échantillon et la dispersion sur la lame a été standardisée à l'aide d'une colonne placée entre un tamis et le milieu nutritif. Chaque test de germination a été réalisé en trois réplicats. Les résultats obtenus indiquent un taux de grains viables de  $98 \pm 2\%$  dans la MEL et de  $96 \pm 5\%$  à Paris ( $p=0.36$ ). Ces taux de viabilité élevés indiquent une bonne conservation des échantillons après leur collecte. Le taux de germination observé est quant à lui de  $49 \pm 26\%$  à Paris et de  $58 \pm 24\%$  dans la MEL et indique une grande variabilité entre les échantillons. Aucune différence significative n'est observée ( $p=0.26$ ).

## 4. CONCLUSION

Concernant la capacité reproductive du pollen, les résultats obtenus sur la viabilité et la germination suggèrent une diminution de la capacité reproductive à Paris. Ces résultats rejoignent les travaux existants qui montrent que le pollen subit une réduction de sa capacité reproductive sous l'effet de la pollution, indépendamment du fait que l'exposition soit *in vitro* ou *in vivo*.

Bien que les travaux existants sur la modification du pollen en milieu urbanisé tendent à montrer une augmentation de l'allergène majeur du pollen de bouleau Bet v 1 (Stawoska *et al*, 2023; Žiarovská *et al*, 2013; Ziemianin *et al*, 2021) nos résultats contrastent avec leurs conclusions mais rejoignent ceux de Beck *et al*, (2016) et Bryce *et al*, (2010) qui n'ont pas constaté de corrélation entre la concentration en Bet v 1 et leur indice d'urbanisation. De plus, nous avons observé que la concentration en allergène Bet v 1 est supérieure à Paris par rapport à la MEL. Cependant, les résultats d'immuno-détection, qui détectent tous les

allergènes du pollen, ne mettent pas en évidence une augmentation de l'allergénicité globale entre Paris et la MEL.

Si nos résultats divergent de ceux rapportés dans plusieurs études, ils s'appuient sur un échantillonnage couvrant un grand nombre de sites de prélèvement. Un suivi interannuel sur les mêmes sites, ainsi que l'inclusion d'un plus large échantillon d'arbres et de permettrait d'enrichir les connaissances sur ces processus.

## 5. REMERCIEMENTS

Ce travail a été soutenu par le Conseil régional des Hauts-de-France, le ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche et le Fonds européen de développement régional (FEDER) pour leur soutien financier au programme CPER ECRIN. Ce travail a également bénéficié du soutien du « Laboratoire d'Excellence » (LABEX) CaPPA.

## 6. RÉFÉRENCES

- Bauchau, V. (2004). Prevalence and rate of diagnosis of allergic rhinitis in Europe. *European Respiratory Journal*, 24(5), Article 5. <https://doi.org/10.1183/09031936.04.00013904>
- Beck, P., Caudullo, G., de Rigo, D., & Tinner, W. (2016). *Betula pendula*, *Betula pubescens* and Other Birches in Europe : Distribution, Habitat, Usage and Threats. In J. San-Miguel-Ayanz, D. de Rigo, G. Caudullo, T. Houston Durrant, & A. Mauri (Éds.), *European Atlas of Forest Tree Species* (p. 70-73). Publication Office of the European Union. <https://w3id.org/mtv/FISE-Comm/v01/e010226>
- Bryce, M., Drews, O., Schenk, M., Menzel, A., Estrella, N., Weichenmeier, I., Smulders, M., Buters, J., Ring, J., Görg, A., Behrendt, H., & Traidl-Hoffmann, C. (2010). Impact of Urbanization on the Proteome of Birch Pollen and its Chemotactic Activity on Human Granulocytes. *International Archives of Allergy and Immunology*, 151(1), Article 1.
- Burte, E., Leynaert, B., Marcon, A., Bousquet, J., Benmerad, M., Bono, R., Carsin, A.-E., de Hoogh, K., Forsberg, B., Gormand, F., Heinrich, J., Just, J., Nieuwenhuijsen, M., Pin, I., Stempfelet, M., Sunyer, J., Villani, S., Künzli, N., Siroux, V., ... Jacquemin, B. (2020). Long-term air pollution exposure is associated with increased severity of rhinitis in 2 European cohorts. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 145(3), Article 3. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.11.040>
- Helander, M. L., Savolainen, J., & Ahlholm, J. (1997). Effects of Air Pollution and other Environmental Factors on Birch Pollen Allergens. *Allergy*, 52(12), Article 12.
- Jarolim, E., Rumpold, H., Endler, A. T., Ebner, H., Breitenbach, M., Scheiner, O., & Kraft, D. (1989). IgE and IgG antibodies of patients with allergy to birch pollen as tools to define the allergen profile of *Betula verrucosa*\*. *Allergy*, 44(6), Article 6. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1989.tb04169.x>
- Lavaud, F., Fore, M., Fontaine, J. F., Pérotin, J. M., & de Blay, F. (2013). Allergie au pollen de bouleau. *Revue Des Maladies Respiratoires*, 31(2), Article 2. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2013.08.006>
- Sénéchal, H., Visez, N., Charpin, D., Shahali, Y., Peltre, G., Biolley, J.-P., Lhuissier, F., Couderc, R., Yamada, O., Malrat-Domenge, A., Pham-Thi, N., Poncet, P., & Sutra, J.-P. (2015). A Review of the Effects of Major Atmospheric Pollutants on Pollen Grains, Pollen Content, and Allergenicity. *The Scientific World Journal*, 2015, 1-29. <https://doi.org/10.1155/2015/940243>
- Stawoska, I., Myszkowska, D., Oliwa, J., Skoczowski, A., Weselucha-Birczyńska, A., Saja-Garbarz, D., & Ziemianin, M. (2023). Air pollution in the places of *Betula pendula* growth and development changes the physicochemical properties and the main allergen content of its pollen. *PLOS ONE*, 18(1), e0279826. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0279826>
- Žiarovská, J., Labajová, M., Ražná, K., Bežo, M., Štefúnová, V., Shevtsova, T., Garkava, K., & Brindza, J. (2013). Changes in Expression of BetV1 Allergen of Silver Birch Pollen in Urbanized Area of Ukraine. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 48(12), Article 12. <https://doi.org/10.1080/10934529.2013.796788>
- Ziemianin, M., Waga, J., Czarnobilska, E., & Myszkowska, D. (2021). Changes in Qualitative and Quantitative Traits of Birch (*Betula pendula*) Pollen Allergenic Proteins in Relation to the Pollution Contamination. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13483-8>