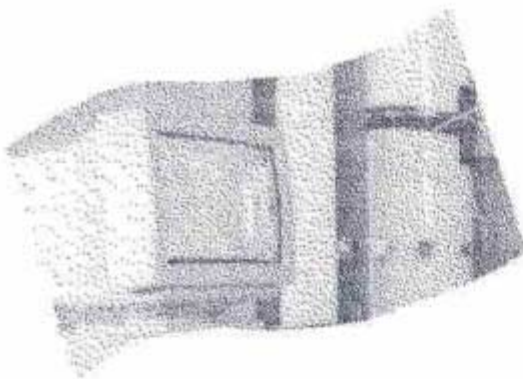


**L'expectoration induite
comme méthode non invasive
permettant d'augmenter
la sensibilité du diagnostic
d'asthme professionnel
en laboratoire hospitalier**

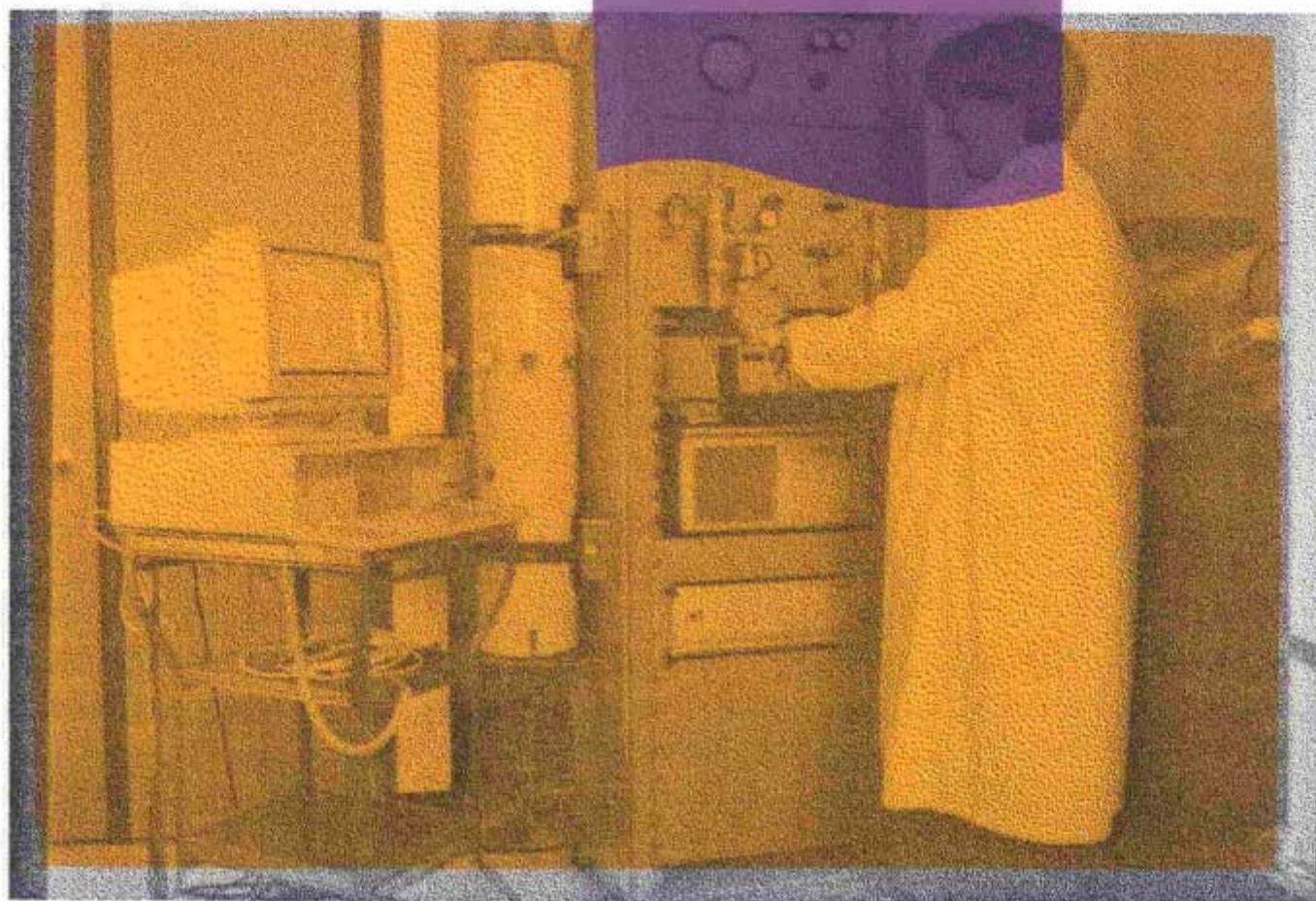


ÉTUDES ET RECHERCHES

Catherine Lemière

Septembre 2000 R-254

RAPPORT



IRSST
Institut de recherche
en santé et en sécurité
du travail du Québec

La recherche, pour mieux comprendre

L'Institut de recherche en santé et en sécurité du travail du Québec (IRSST) est un organisme de recherche scientifique voué à l'identification et à l'élimination à la source des dangers professionnels, et à la réadaptation des travailleurs qui en sont victimes. Financé par la CSST, l'Institut réalise et finance, par subvention ou contrats, des recherches qui visent à réduire les coûts humains et financiers occasionnés par les accidents de travail et les maladies professionnelles.

Pour tout connaître de l'actualité de la recherche menée ou financée par l'IRSST, abonnez-vous gratuitement au magazine *Prévention au travail*, publié conjointement par la CSST et l'Institut.

Les résultats des travaux de l'Institut sont présentés dans une série de publications, disponibles sur demande à la Direction des communications.

Il est possible de se procurer le catalogue des publications de l'Institut et de s'abonner à *Prévention au travail* en écrivant à l'adresse au bas de cette page.

ATTENTION

Cette version numérique vous est offerte à titre d'information seulement. Bien que tout ait été mis en œuvre pour préserver la qualité des documents lors du transfert numérique, il se peut que certains caractères aient été omis, altérés ou effacés. Les données contenues dans les tableaux et graphiques doivent être vérifiées à l'aide de la version papier avant utilisation.

Dépôt légal
Bibliothèque nationale du Québec

IRSST - Direction des communications
505, boul. de Maisonneuve Ouest
Montréal (Québec)
H3A 3C2
Téléphone : (514) 288-1 551
Télécopieur: (514) 288-7636
Site internet : www.irsst.qc.ca
© Institut de recherche en santé
et en sécurité du travail du Québec,

**L'expectoration induite
comme méthode non invasive
permettant d'augmenter
la sensibilité du diagnostic
d'asthme professionnel
en laboratoire hospitalier**

Catherine Lemière, M.D.M.Sc.
Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal

**ÉTUDES ET
RECHERCHES**

RAPPORT

Cliquez recherche
www.irsst.qc.ca



Cette publication est disponible
en version PDF
sur le site internet de l'IRSST.

Cette étude a été financée par l'IRSST. Les conclusions et recommandations sont celles de l'auteur.

Sommaire à caractère grand public

Le diagnostic d'asthme professionnel (AP) est parfois difficile. Un diagnostic erroné a des conséquences importantes non seulement sur la santé des travailleurs mais aussi économiques. Dès lors, améliorer les moyens diagnostiques actuels est un objectif prioritaire. L'inflammation des bronches et en particulier la présence d'éosinophiles au niveau de l'épithélium bronchique est une des caractéristiques majeures de l'asthme et de l'asthme professionnel. Une méthode récemment développée permet d'évaluer facilement l'inflammation des bronches en analysant les cellules contenues dans l'expectoration. L'expectoration est obtenue après inhalation d'eau salée. Cette méthode se nomme "expectoration induite".

L'étude pour laquelle nous avons obtenue une subvention de l'IRSST en 1998 visait à évaluer si cette nouvelle technique pouvait nous aider à améliorer le diagnostic d'AP dans les cas litigieux en mettant en évidence des changements précoces dans l'inflammation bronchique alors qu'il n'y avait pas de modifications de la fonction respiratoire.

Notre étude avait donc pour buts: 1) de déterminer s'il existe des modifications précoces de la cellularité de l'expectoration (éosinophilie), sans modification de la fonction respiratoire (volume expiratoire maximal seconde (VEMS), degré d'irritabilité des bronches) après exposition à un agent professionnel en laboratoire chez des sujets atteints d'AP 2) d'évaluer si ces modifications étaient plus précoces que les modifications d'irritabilité bronchique.

Pour répondre à ces questions, nous avons:

1. Sélectionné des sujets porteurs d'un AP à des agents de haut (protéines) et de bas (agents chimiques) poids moléculaire. Le diagnostic de cet asthme professionnel avait été effectué antérieurement dans notre centre par test de provocation bronchique spécifique (TPS). Les tests de provocation bronchique sont des tests qui consistent à exposer les sujets en laboratoire à l'agent responsable de leur asthme
2. Réexposé ces sujets à l'agent causal de leur asthme en augmentant progressivement les durées d'exposition. La première journée était un jour contrôle où les sujets n'étaient pas exposés à l'agent professionnel en cause, pour vérifier la stabilité de leur asthme. Les jours suivants, les sujets étaient exposés à des doses d'agent professionnel progressivement croissantes par TPS jusqu'à ce qu'une réaction asthmatique survienne et pour un maximum de deux heures.
3. Effectué à la fin de chaque journée, un test à la méthacholine mesurant la réactivité bronchique non spécifique (degré d'irritabilité des bronches) et une induction d'expectoration pour évaluer l'inflammation bronchique de ces sujets.

Les résultats que nous avons obtenus sont les suivants:

Nous avons recrutés 27 sujets. Parmi ces 27 sujets, six ont présenté une réaction asthmatique ou un changement significatif de leur VEMS lors du premier jour d'exposition, trois n'ont pas présenté de réaction asthmatique, deux avaient un asthme trop instable pour effectuer l'exposition, un sujet n'a pas souhaité poursuivre l'étude. Quinze sujets ont présenté une réaction asthmatique lors du dernier jour d'exposition et ont été retenus pour l'analyse finale. Parmi ces quinze sujets, huit étaient exposés à des agents de haut poids moléculaire, sept à des agents de bas poids moléculaire. Nous avons pu détecter une augmentation significative des éosinophiles en pourcentage (5.0 (30.5) vs 0.5(0.9) $p < 0.05$) et en nombre absolu dès la journée précédant la réaction asthmatique par rapport au jour contrôle, alors qu'il n'y avait pas de modification significative de la fonction respiratoire cette journée là.

Cependant, on constate que cinq sujets n'ont jamais présenté d'inflammation bronchique. La majorité des sujets (83%) ayant eu une augmentation d'éosinophiles étaient exposés à des agents de bas poids moléculaire (agents chimiques par opposition aux agents de haut poids moléculaire qui sont des agents protéiques comme la farine). Parmi les sujets exposés à des agents de bas poids moléculaire 83% d'entre eux avaient une augmentation précoce de l'inflammation bronchique.

Il existe une augmentation plus marquée de l'éosinophilie la journée précédant la survenue de la réaction asthmatique chez les sujets exposés à des agents de bas poids moléculaire par rapport aux sujets exposés à des agents de haut poids moléculaire.

Il existe une faible corrélation entre la différence d'éosinophilie entre jour contrôle et jour précédant la réaction asthmatique et la différence de réactivité bronchique non spécifique entre ces deux journées.

Conclusion. La méthode de l'expectoration induite permet de détecter des changements précoces dans l'inflammation bronchique après exposition à un agent professionnel sans qu'il y ait de modification significative de la fonction respiratoire. Ces changements sont présents essentiellement chez les sujets exposés à des agents de bas poids moléculaire et les modifications d'inflammation sont beaucoup plus marquées avec ces agents qu'avec les agents de haut poids moléculaire. La méthode de l'expectoration induite pourrait donc être ajoutée comme technique d'investigation dans les cas douteux d'asthme professionnels aux agents de bas poids moléculaire puisque on retrouve une augmentation significative d'inflammation bronchique dans la grande majorité des cas.

TABLES DES MATIÈRES

Introduction.....	1
Objectifs de recherche.....	1
Sujets et méthodes.....	2
Résultats.....	6
Discussion.....	7
Conclusion.....	8
Applicabilité des résultats.....	9
Références.....	10
Articles scientifiques.....	13
Tableaux.....	14

1. Introduction

L'asthme professionnel est actuellement la maladie professionnelle pulmonaire la plus fréquente dans les pays développés et au Québec (1;2). Compte tenu de la fréquence de cette pathologie respiratoire en milieu professionnel, des méthodes diagnostiques les plus spécifiques et sensibles possibles sont indispensables pour éviter d'exposer inutilement des sujets atteints d'AP ou de retirer du travail des sujets asthmatiques mais sans AP. Le moyen le plus fiable de confirmer un diagnostic d'AP est de pratiquer des tests de provocation bronchique spécifique en laboratoire hospitalier. Cependant, ces tests sont parfois faussement négatifs, en particulier si le sujet n'a pas été exposé depuis une longue période à l'agent professionnel en cause. Dès lors, améliorer les méthodes diagnostiques de l'AP devient prioritaire pour éviter les tests faussement négatifs. L'importance de faire un diagnostic exact d'AP n'est pas négligeable. En effet, si le diagnostic n'est pas posé et que le sujet reste exposé à l'agent en cause, le pronostic de son asthme empire et les chances de guérison diminuent (3). Le sujet peut ne plus être capable de travailler et devoir suivre une médication antiasthmatique importante et pour le reste de sa vie.

Une méthode non invasive (4), récemment développée, pourrait permettre d'améliorer la sensibilité des tests de provocation bronchique spécifique en révélant des modifications précoces de la cellularité de l'expectoration, reflet de l'inflammation caractéristique de la maladie asthmatique, alors qu'il n'y a pas encore de modifications fonctionnelles respiratoires (changement du VEMS ou de la réactivité bronchique non-spécifique à la méthacholine) lors des tests de provocation bronchique spécifique en laboratoire hospitalier.

L'objectif de notre projet est de déterminer s'il existe des modifications précoces de la cellularité dans l'expectoration induite (augmentation du pourcentage d'éosinophiles dans l'expectoration) après exposition à un agent professionnel sans modification significative des paramètres fonctionnels (spirométrie et réactivité bronchique non spécifique) chez des patients porteurs d'un AP diagnostiqué dans notre centre avant le début de l'étude.

2. Hypothèses de recherche et objectifs

2.1. Hypothèse

Notre hypothèse est que des modifications de la cellularité de l'expectoration caractérisées par une augmentation des éosinophiles peuvent apparaître précocement après exposition à un agent professionnel chez un patient atteint d'AP alors qu'il n'y a pas encore de modification de la réactivité bronchique non spécifique mesurée par la concentration de méthacholine induisant une chute de 20% du VEMS (CP_{20}) et que le sujet n'a pas présenté de chute significative ($> 10\%$) de son VEMS après exposition à l'agent en cause.

2.2. Buts

2.2.1. Déterminer s'il existe des modifications précoces de la cellularité dans l'expectoration induite (augmentation du pourcentage d'éosinophiles dans l'expectoration) après exposition à un agent professionnel sans modification des paramètres fonctionnels (spirométrie et réactivité bronchique non spécifique) chez des patients porteurs d'un asthme professionnel diagnostiqué dans notre centre avant le début de l'étude.

2.2.2. Déterminer si les changements de cellularité observés dans l'expectoration induite (augmentation du pourcentage d'éosinophiles dans l'expectoration) sont plus précoces que les changements de réactivité bronchique non spécifique (CP₂₀) après exposition à un agent professionnel chez des sujets avec AP sensibilisés à cet agent.

3. Sujets

3.1. Critères d'inclusion

Les sujets dont le diagnostic d'AP à des agents de haut ou de bas poids moléculaire a été posé par TPS en laboratoire dans notre centre ont été contactés. De préférence, nous avons testé des sujets où les TPS ont été effectués avec un appareil en circuit fermé permettant de mesurer précisément la dose d'agent administrée (5-7) mais, le nombre de sujets étant insuffisant, nous avons également demandé la participation des sujets ayant eu des tests de provocation avec une exposition de type dit "réaliste". Ces sujets n'avaient pas présenté une réaction asthmatique trop sévère lors des TPS ayant permis de porter le diagnostic (chute de VEMS < 50%). Leur VEMS de base était supérieur ou égal à 2 litres et les fluctuations du VEMS enregistrées lors du jour contrôle n'excédaient 10%. Tout traitement par un agent bêta-2 mimétique de courte durée d'action avait été interrompu au moins 8 heures avant les mesures effectuées. Les traitements par stéroïdes inhalés, si c'était le cas, étaient interrompus huit heures avant les tests de provocation bronchique et la dose totale était administrée à la fin de la journée de test. Les sujets étaient jugés en état clinique stable (absence de visite à l'urgence depuis au moins trois mois, absence d'éveils nocturnes à cause d'asthme) et n'avaient pas présenté d'infection bronchique ou d'exposition allergénique pertinente depuis au moins un mois.

3.2. Critères d'exclusion

Les patient(e)s présentant:

- un asthme nécessitant un traitement par corticothérapie par voie systémique;
 - une hyperréactivité bronchique non spécifique sévère (CP₂₀ < 0.25 mg/ml);
 - un asthme instable ayant nécessité une visite en salle d'urgence ou un séjour hospitalier dans les trois mois précédant l'étude
 - une maladie systémique évolutive significative: insuffisance cardiaque, maladie coronarienne, hépatique, rénale, hypertension artérielle non contrôlée.
 - une grossesse en cours
 - une incapacité à signer le consentement éclairé
- n'étaient pas inclus dans l'étude.

4. Méthodologie

4.1. Déroulement de l'étude

En moyenne quatre journées sont passées à l'hôpital du Sacré-Coeur pour les sujets atteints d'AP aux agents de bas poids moléculaire, 3 pour les sujets atteints d'AP à des agents de haut poids moléculaire.

4.2. Tests effectués

4.2.1. Tests de provocation bronchique spécifique (TPS)

Les tests de provocation bronchique spécifique à l'agent professionnel suspecté se sont déroulées de la façon suivante selon la méthodologie précédemment décrite (8):

Jour A :

Cette première journée consiste en une journée contrôle d'observation sans exposition pour s'assurer de la stabilité de l'asthme du patient. Le VEMS et la capacité vitale forcée (CVF) sont mesurés initialement à l'aide d'un spiromètre Collins (Collins Inc. USA). Chaque mesure du VEMS est pratiquée 3 fois consécutives et la meilleure de 2 valeurs reproductibles selon les critères de l'ATS conservée (9). Le VEMS est mesuré toutes les 10 min la première heure, toutes les 30 min la seconde heure et toutes les heures durant les 6 à 7 heures suivantes. La CVF est mesurée aux heures. Un test à la méthacholine est effectué en fin de journée avec mesure de la CP_{20} . Ce test est effectué selon une méthodologie standardisée (10) avec un nébuliseur de Wright (débit de 0,14 ml/min) avec une respiration à volume courant durant 2 minutes. Les concentrations de méthacholine administrées sont doublées de 0.03 à 16 mg/ml jusqu'à ce qu'une chute de 20% de VEMS se produise. Si, à la dernière dose, le VEMS n'a pas chuté de plus de 20%, le test est complété en administrant 3 doses supplémentaires de méthacholine, 32, 64 et 128 mg/ml. Une $CP_{20} \leq 16$ mg/ml est considérée comme le témoin d'une hyperréactivité bronchique non spécifique significative (11). Au décours du test à la méthacholine, une induction de l'expectoration à l'aide d'une solution saline est pratiquée. Au cours de cette journée, des questions concernant la symptomatologie respiratoire du patient lui sont posées.

Jour B :

Le sujet est exposé à la moitié de la dose d'agent qui avait été nécessaire à induire une réaction asthmatique lors de la première investigation. L'exposition se fait de façon progressive selon la méthode précédemment décrite (8). Le VEMS et la CVF sont mesurés avant le début de l'exposition. Après la fin de l'exposition, le VEMS est mesuré toutes les 10 minutes la première heure, toutes les 30 minutes la deuxième heure puis toutes les heures jusqu'à la septième ou huitième heure après la fin de l'exposition. La CVF sera mesurée aux heures. Le test de provocation bronchique sera considéré comme positif si l'on obtient une chute de VEMS d'au moins 20% après exposition. Le soir même, un test à la méthacholine sera effectué à nouveau afin d'évaluer la réactivité bronchique non spécifique après TPS. Un changement de CP_{20} est considéré comme significatif s'il est d'au moins 3.2 fois la CP_{20} initiale (12). Une induction de l'expectoration par sérum hypersalé est pratiquée au décours du test à la méthacholine. Si un sujet présentait une chute significative de son VEMS ($\geq 10\%$) au cours de cette journée, il était retiré de l'étude.

Jour C :

Le test est pratiqué dans les mêmes conditions que lors du diagnostic. La même dose d'agent est utilisée. La réactivité bronchique et le recueil de l'expectoration sont évalués en fin de journée. Si les sujets atteints d'AP ne présentaient pas de réaction asthmatique au cours de cette journée, une journée supplémentaire est réalisée : jour D

Jour D :

L'exposition à l'agent en cause est poursuivie pour une durée totale de deux heures. Le soir même ou le lendemain matin, un test à la méthacholine et une induction de l'expectoration sont pratiqués.

4.2.2. Induction de l'expectoration

Ce test est pratiqué à la fin de chaque jour de test au décours d'un test à la méthacholine. Il est effectué selon la technique précédemment décrite (13). Dix minutes après que les patients aient reçu 200 μ g de salbutamol (après le test à la méthacholine), une nouvelle mesure de VEMS et de CVF est pratiquée. La nébulisation de la solution saline est débutée et ces mesures sont répétées toutes les 7 minutes pendant l'inhalation de la solution saline hypertonique. La solution saline hypertonique (9 cc) est nébulisée avec un nébuliseur ultrasonique durant des périodes de 7 minutes pour un total de 21 minutes. Les concentrations de solution saline sont augmentées toutes les 7 minutes de 3% à 4% puis à 5%. Si le VEMS chutait à plus de 10% de la valeur post bronchodilatateur, la concentration saline n'était pas augmentée. Si le VEMS chutait à plus de 20%, la nébulisation était interrompue. Le recueil de l'expectoration se fait durant la nébulisation si le sujet exprime le désir d'expectorer, et après chaque nébulisation de 7 minutes: on demande aux sujets de se rincer la bouche et la gorge soigneusement puis d'essayer d'expectorer dans un pot stérile. La nébulisation est stoppée au bout de 21 minutes.

La technique utilisée ici pour traiter l'échantillon d'expectoration est celle développée par l'équipe du Dr FE Hargreave à Hamilton (4). La technicienne qui était en charge de cette analyse a suivi un entraînement spécifique dans ce même centre à Hamilton.

L'échantillon d'expectoration recueilli est transféré dans une boîte de Pétri où ses caractéristiques macroscopiques sont notées. Les portions qui semblent plus opaques et/ou denses et différentes de la salive macroscopiquement sont sélectionnées et placées dans un tube de 15ml de polystyrène et pesée. Ceci est traité avec 4 fois le volume de dithiothreitol (DTT) (Sputalysin 10%, Calbiochem Corp., San Diego, CA.), dilué fraîchement à 10% avec de l'eau distillée. Le mélange est mélangé au vortex pendant 15 secondes. Il est ensuite placé sur un agitateur (Dade Tube Rocker, Baxter Diagnostics Corporation, Miami, FA) pendant 15 minutes. Un autre volume égal à quatre fois le volume de solution saline tamponnée (Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS)) est ajouté. La suspension est filtrée à travers un textile de nylon de 48 μ m (BBSH Thompson, Scarborough, Ontario) pour ôter les débris cellulaires et le mucus persistant. Un compte cellulaire total est effectué dans un hémacymètre Neubauer et la viabilité cellulaire est déterminée simultanément en déterminant les cellules colorées par le bleu trypan. Le compte cellulaire total de cellules par mg d'expectoration traitée est calculé. Des lames sont préparées en plaçant 60 μ l de la suspension cellulaire dans une centrifugeuse Shandon III (Shandon Southern Instruments, Sewickley, PA). Les lames sont préparées par centrifugation à 450 tour/minute pendant 6 minutes. Les comptes différentiels des macrophages, des lymphocytes, polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et cellules épithéliales bronchiques, sont pratiqués en comptant 400 cellules nucléées sur les deux lames colorées avec du Wright. La suspension restante est centrifugée à 3000 tours/minutes pendant 4 minutes. Le surnageant est aspiré et 100 μ l seront placés dans des tubes Eppendorfs et congelés à -70°C pour des mesures ultérieures des marqueurs inflammatoires dans le surnageant Eotaxin, IL-5). Des lames sont congelées à -80°C en vue d'effectuer des mesures d'IL-5 par hybridation in situ, d'autres lames sont congelées à -20°C pour pratiquées des mesures par immunohistochimie d'éotaxin

et de MBP. dans le laboratoire du Dr Qutayba Hamid (Laboratoires Meakins-Christie, Montréal).

4.3. Variables étudiées

4.3.1. Fonctionnelles :

-La réactivité bronchique non spécifique est évaluée chaque jour de test et nous étudierons l'évolution de la CP₂₀ afin d'objectiver si l'on retrouve une modification précoce de réactivité bronchique non spécifique.

4.3.2. Biologiques :

L'analyse de l'expectoration évalue les paramètres suivants: 1) la cellularité: compte cellulaire total, compte d'éosinophiles, de neutrophiles, de macrophages et de lymphocytes en sachant que le compte d'éosinophiles est ici le plus fiable et le plus reproductible. Le taux d'éosinophiles sera notre principale variable étudiée sur laquelle nous nous sommes basés pour calculer notre échantillon. L'étude des médiateurs de l'inflammation pourra permettre d'évaluer des taux de MBP, d'éotaxin et d'IL-5. Nous comparerons les modifications de ces médiateurs avec celles des éosinophiles et celles de la CP₂₀. Ces mesures seront effectuées lors du jour contrôle et lors de chaque jour de test. Les résultats de ces analyses (mesures de MBP, d'IL-5 et d'éotaxin) ne sont pas encore disponibles et feront l'objet d'un complément de rapport.

5. Analyse des résultats :

Le degré de réactivité bronchique non-spécifique est évalué par la mesure de la CP₂₀. Un changement de CP₂₀ n'est pas considéré comme significatif si la CP₂₀ mesurée ne s'est pas modifiée de plus de 3.2 fois par rapport à la valeur précédente. Ceci correspond à l'écart reproductibilité interindividuelle d'un jour à l'autre avec une probabilité de 95 % dans notre laboratoire (12). On considérera qu'il existe un changement significatif dans le compte d'éosinophiles après exposition si leur compte s'est modifié de plus de deux fois par rapport à la valeur initiale, avec une augmentation d'au moins 5% ce qui reflétera une modification de l'inflammation bronchique. Les variables n'ayant pas une distribution normale seront transformées par des méthodes appropriées en vue de leur normalisation. Les données descriptives sont rapportées sous forme de moyenne et d'écart type sauf pour les données n'ayant pas une distribution normale qui sont rapportées sous forme de médiane et de rang interquartile. Les mesures de CP₂₀ ont subi une transformation logarithmique. Les taux de CP₂₀ lors du jour contrôle, de l'avant dernier jour de test et du dernier jour d'exposition ont été comparés utilisant une ANOVA pour mesures répétées. Les différences entre éosinophiles lors de l'avant dernier jour et du jour de la réaction asthmatique ont été comparées à l'aide d'un test de Wilcoxon. Les corrélations entre éosinophiles, réactivité bronchique non spécifique et chute maximale de VEMS ont été étudiées à l'aide d'un tests de Pearson.

Le niveau de significativité choisi sera un $p \leq 0.05$. Toutes les analyses seront effectuées à l'aide du logiciel statistique SPSS (Chicago IL).

6. Résultats

Nous avons exploré 27 sujets. Parmi ces 27 sujets, 6 ont présenté une réaction asthmatique ou un changement significatif de leur VEMS lors du premier jour d'exposition, 3 n'ont pas présenté de réaction asthmatique, 2 avaient un asthme trop instable pour effectuer l'exposition, un sujet n'a pas souhaité poursuivre l'étude après deux journées de test. Quinze sujets ont présenté une réaction asthmatique lors du dernier jour d'exposition et ont été retenus pour l'analyse finale. Il était prévu d'inclure initialement 31 sujets au total dans le protocole initial, nous en avons inclus 27 dans le temps imparti à l'étude. Sur les 31 sujets initialement prévus nous pensions en avoir 24 d'analysables malheureusement uniquement 15 de ces sujets l'ont été. Cependant, étant donné que les résultats obtenus sont significatifs avec les 15 sujets analysables, il n'était pas éthique de poursuivre plus avant en ayant d'ores et déjà obtenus les résultats recherchés. Le tableau 1 relate les caractéristiques des quinze sujets analysés.

Huit sujets furent exposés à des agents de haut poids moléculaire, 7 à des agents de bas poids moléculaire. Onze sujets eurent une réaction immédiate, 4 une réaction semi-retardée, ces sujets étaient tous exposés à des agents de bas poids moléculaire.

Il existe une augmentation significative des éosinophiles en pourcentage (5.0 (30.5) vs 0.5(0.9) $p < 0.05$) et en nombre absolu dès la journée précédant la réaction asthmatique par rapport au jour contrôle, alors que la chute moyenne de VEMS ce jour là était de 7.4% et qu'il n'y avait pas d'augmentation significative d'hyperréactivité bronchique globalement (Tableau 2) (Figure 1). Nous n'avons pas retrouvé de différence significative entre le niveau d'éosinophiles chez les sujets ayant eu deux jours d'exposition comparé aux sujets ayant eu trois jours d'exposition ni lors du jour précédant la réaction asthmatique (3.15(19.0) vs 8.0(56.3) $p = 0.3$) ni lors du jour de la réaction asthmatique (12(26.2) vs 7.0(19.0) $p = 0.7$).

Il n'y avait pas de changements dans les taux de neutrophiles aussi bien en pourcentage qu'en valeur absolue.

On constate que uniquement 9 sujets sur 15 avaient une inflammation bronchique significative après exposition et 7 d'entre eux avaient une augmentation significative de leur éosinophilie dès le premier jour d'exposition. Cinq sujets n'ont pas présenté d'inflammation bronchique significative malgré la survenue d'une réaction asthmatique. Un sujet avait une éosinophilie importante qui n'a pas augmenté après exposition. Parmi les 7 sujets qui avaient une augmentation précoce et significative d'éosinophilie, 5 étaient exposés à des agents de bas poids moléculaire. Ces 5 sujets avaient le même jour, une augmentation significative d'hyperréactivité bronchique. Aucun sujet exposé à des agents de haut poids moléculaire n'avait de changement de CP_{20} . Il apparaît donc que les changements constatés sont presque limités aux agents de bas poids moléculaires (Tableau 3). Nous n'avons constaté la survenue plus précoce d'inflammation bronchique que d'hyperréactivité bronchique que chez deux sujets exposés à des agents de haut poids moléculaire.

Il existe une augmentation plus marquée de l'éosinophilie chez les sujets exposés à des agents de bas poids moléculaire qu'à agents de haut poids moléculaire la journée précédant la réaction asthmatique (Tableau 3, Figure 2).

Il y existe une faible corrélation entre la différence d'éosinophilie entre jour contrôle et jour précédant la réaction asthmatique et la différence de réactivité bronchique non spécifique entre ces deux journées ($r = 0.51$, $p = 0.05$)(Figure 3).

Les résultats des dosages de MBP, d'éotaxin et d'IL-5 ne sont pas encore disponibles et feront l'objet d'un complément de rapport ultérieur.

7. Discussion

Les résultats obtenus montrent qu'il survient une augmentation d'éosinophiles dans l'expectoration alors que les sujets n'ont pas encore présenté de chute significative de VEMS. Cette augmentation d'éosinophilie survient essentiellement chez les sujets exposés à des agents de bas poids moléculaire. Chez ces sujets il existe dans la plupart des cas une augmentation simultanée de la réactivité bronchique non spécifique. L'augmentation des éosinophiles est plus marquée chez les sujets ayant été exposés à des agents de bas poids moléculaire.

Il a été précédemment démontré qu'il existait une apparition d'éosinophiles et d'IL-5 précocement après exposition à des faibles doses d'allergènes communs (14) sans chute de significative de VEMS. Les auteurs retrouvaient une augmentation plus marquée d'éosinophiles au troisième jour d'exposition comparé au premier jour d'exposition. Nous n'avons pas retrouvé de majoration significative d'inflammation bronchique avec l'augmentation du temps d'exposition. On pourrait penser que la survenue d'une réaction asthmatique est accompagnée d'une augmentation beaucoup plus substantielle d'inflammation que la seule exposition sans survenue d'une réaction asthmatique. Or nous n'avons pas constaté de différence significative entre le niveau d'éosinophiles lors de la journée précédant la réaction et le niveau d'éosinophiles lors de la journée de la réaction asthmatique. Trois sujets avaient d'ailleurs une éosinophilie plus marquée le jour précédant la réaction asthmatique que le jour même de la réaction. Les sujets qui présentaient une éosinophilie le faisaient dès le premier jour d'exposition. Il semble donc que l'apparition d'une inflammation bronchique isolée ne suffit pas à déclencher une réaction asthmatique. Ce concept est bien illustré par les patients qui présentent une bronchite éosinophilique (15).

Nous n'avons pas constaté une augmentation d'éosinophiles chez tous les sujets étudiés: cinq sujets n'ont pas présenté d'éosinophilie après exposition à un agent de haut ou de bas poids moléculaire. L'étude portant sur les TPS avec faibles doses d'allergènes communs (14) ne rapporte aucun résultat individuel, nous ne sommes donc pas en mesure de voir si dans cette étude les auteurs retrouvait une augmentation d'éosinophilie chez tous les patients. Dans notre étude nous avons constaté que l'augmentation des éosinophiles était plus fréquente et plus marquée chez les sujets exposés à des agents de faible poids moléculaire. L'augmentation plus marquée d'éosinophilie dans les réactions retardées par rapport aux réactions immédiates a déjà été démontrée(16). On pourrait donc penser que cette augmentation d'éosinophiles chez les sujets exposés aux agents de bas poids moléculaire est due au fait que ce type d'agent induit plus fréquemment une réaction retardée. Cependant, il existe une augmentation des éosinophiles alors que la réaction asthmatique n'a pas encore eu lieu. On peut donc penser que chez les sujets sensibilisés, les agents de bas poids moléculaire ont un effet par eux-même et pas uniquement par le type de réaction qu'ils entraînent. D'ailleurs trois des sujets exposés à des agents de bas poids moléculaire ont présenté une réaction immédiate avec une augmentation massive d'éosinophiles. Ces agents pourraient avoir une action beaucoup plus marquée sur l'épithélium

bronchique que les agents de haut poids moléculaire entraînant une libération de médiateurs et subséquemment un afflux d'éosinophiles.

Il avait été montré précédemment (17) qu'il existait une augmentation significative de réactivité bronchique précédant l'apparition de la réaction asthmatique chez certains sujets. Les auteurs concluaient que les changements d'hyperréactivité bronchique non spécifique étaient un marqueur sensible de la réactivité bronchique spécifique aux agents professionnels. Il semble que ces résultats ne soient applicables qu'aux agents de bas poids moléculaire. En effet, dans l'étude de Vandenplas et al.(17), les sujets ayant modifié précocement leur CP₂₀ étaient tous exposés à des agents de bas poids moléculaire. Cependant, dans cette étude on ignorait combien de patients étaient réellement porteurs d'un asthme professionnel, la fréquence de ce phénomène ne pouvait donc pas être évaluée. Dans notre étude 5 des 7 sujets exposés à des agents de bas poids moléculaire ont présenté un changement précoce d'hyperréactivité bronchique avant de présenter une réaction asthmatique. En revanche, aucun des sujets exposés aux agents de haut poids moléculaire n'a présenté de changement de réactivité bronchique précoce. L'augmentation de réactivité bronchique non spécifique semble être un marqueur précoce de la réactivité bronchique spécifique uniquement dans le cas des agents de haut poids moléculaire. Nous avons constaté chez deux sujets exposés à des agents de haut poids moléculaire une augmentation d'éosinophile sans changement de CP₂₀. Dans ces cas ci, l'apparition d'une inflammation bronchique était un marqueur encore plus précoce que la majoration d'hyperréactivité bronchique précédant la survenue d'une réaction asthmatique.

Certains auteurs ont rapporté une augmentation de neutrophiles après exposition aux isocyanates(18). Nous n'avons retrouvé d'augmentation de neutrophiles mais d'éosinophiles après exposition, ce qui est retrouvé dans la majorité des cas (19;20).

Il a été parfois rapporté qu'il y avait une bonne corrélation entre l'éosinophilie et la réactivité bronchique non spécifique laissant entrevoir que l'hyperéosinophilie pourrait précéder l'apparition d'une hyperréactivité bronchique et que l'inflammation bronchique pourrait être un des facteurs principaux expliquant l'hyperréactivité bronchique (21,22). Cependant, il y a de plus en plus d'évidence montrant qu'il n'y a que peu ou pas de corrélation entre hyperréactivité bronchique et hyperéosinophilie(15;23). Nous n' avons retrouvé dans cette étude qu'une faible corrélation entre réactivité bronchique non spécifique et éosinophilie.

8. Conclusion

Il existe des changements précoces dans l'inflammation bronchique chez les sujets exposés à des agents de bas poids moléculaire. On ne retrouve de tels changements uniquement chez quelques sujets exposés à des agents de haut poids moléculaire. L'augmentation de l'éosinophilie est également beaucoup plus prononcée chez les sujets exposés à des agents de bas poids moléculaire qu'aux agents de haut poids moléculaire. Les changements de CP₂₀ précèdent aussi la survenue de réaction asthmatique uniquement chez les patients exposés aux agents de bas poids moléculaire. Le type d'agent en cause semble être déterminant dans la capacité d'induire une inflammation bronchique et une majoration de l'hyperréactivité bronchique.

9. Applicabilité et retombées éventuelles

Bien que la présence d'éosinophiles dans l'expectoration ne soit pas assez spécifique pour nous permettre de poser le diagnostic d'asthme ou d'asthme professionnel, cette étude nous démontre que dans 80% des cas la présence d'une éosinophilie précédait l'apparition de la réaction asthmatique chez les sujets exposés à des agents de bas poids moléculaire. Chez ces patients les modifications de l'expectoration peuvent être un facteur prédictif de l'apparition d'une réaction asthmatique. L'expectoration induite pourrait alors être un outil diagnostique supplémentaire lors des TPS en laboratoire dans le cas des patients qui présentent un asthme à des agents de bas poids moléculaire. Il est bien entendu que même si l'on constate une éosinophilie dans l'expectoration le diagnostic d'AP devra être confirmé ultérieurement par des tests de référence tels les TPS.

L'étude de la cellularité de l'expectoration pourrait donc être pratiquée en routine dans notre laboratoire chez les patients ayant une possibilité d'asthme à des agents de bas poids moléculaire. Nous pratiquerions en routine une induction d'expectoration initialement chez ces patients lors de la journée contrôle après le test à la méthacholine. Si le dernier jour de l'investigation le TPS était négatif, nous préleverions un échantillon d'expectoration pour vérifier s'il y a ou non augmentation de l'inflammation bronchique. En cas d'augmentation des éosinophiles d'au moins deux fois la valeur initiale avec un taux supérieur à 5%, l'investigation serait complétée soit par un allongement de la période d'exposition en laboratoire soit par un retour au travail. Cette étude pourra donc mener à une modification de notre démarche diagnostique de l'AP, en ajoutant un nouvel outil non invasif et sécuritaire. L'expectoration induite pourra donc être un outil très précieux, en particulier dans les cas litigieux.

Références

- 1.Chan-Yeung M, Malo J. Occupational asthma. *N Engl J Med* 1995; 333:107-112.
- 2.Ross DJ, Keynes HL, McDonald JC. SWORD '97: Surveillance of work-related and occupational respiratory disease in the UK. *Occup Med* 1998; 48:481-485.
- 3.Chan-Yeung M, Lam S, Koerner S. Clinical features and natural history of occupational asthma due to western red cedar (*Thuja plicata*). *Am J Med* 1982; 72:411-415.
- 4.Pizzichini E, Pizzichini M, Efthimiadis A, Evans S, Morris M, Squillace D et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:308-317.
- 5.Cloutier Y, Lagier F, Cartier A, Malo J. Validation of an exposure system to particles for the diagnosis of occupational asthma. *Chest* 1992; 102:402-407.
- 6.Vandenplas O, Malo J, Cartier A, Perreault G, Cloutier Y. Closed-circuit methodology for inhalation challenge tests with isocyanates. *Am Rev Respir Dis* 1991; 145:582-587.
- 7.Lemière C, Cloutier Y, Perrault G, Drolet D, Cartier A, Malo J. Closed-circuit apparatus for specific inhalation challenges with an occupational agent, formaldehyde, in vapor form. *Chest* 1996; 109:1631-1635.
- 8.Cartier A. Definition and diagnosis of occupational asthma. *Eur Respir J* 1994; 7:153-160.
- 9.American Thoracic Society. Standardization of spirometry-1987 Update. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136:1285-1307.
- 10.Cockcroft D, Killian D, Mellon J, Hargreave F. Bronchial reactivity to inhaled histamine: a method and clinical survey. *Clinical Allergy* 1977; 7:235-243.
- 11.Malo J, Pineau L, Cartier A, Martin R. Reference values of the provocative concentrations of methacholine that cause 6% and 20% changes in forced expiratory volume in one second in a normal population. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128:8-11.

12. Dehaut P, Rachiele A, Martin R, Malo J. Histamine dose-response curves in asthma: reproducibility and sensitivity of different indices to assess response. *Thorax* 1983; 38:516-522.
13. Pin I, Gibson P, Kolendowicz F, Girgis-Gabardo A, Denburg J, Hargreave F et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992; 47:25-29.
14. Sulakvelidze I, Inman MD, Rerecich T, O'Byrne PM. Increases in airway eosinophils and interleukin-5 with minimal bronchoconstriction during repeated low-dose allergen challenge in atopic asthmatics [see comments]. *Eur Respir J* 1998; 11(4):821-827.
15. Gibson P, Dolovich J, Denburg J, Ramsdale E. Chronic cough: Eosinophilic bronchitis without asthma. *Lancet* 1989; 1346-1348.
16. Aalbers R, Kauffman H, Vrugt B, Smith M, Koeter G, Timens W et al. Bronchial lavage and bronchoalveolar lavage in allergen-induced single early and dual asthmatic responders. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147:76-81.
17. Vandenas O, Delwiche J, Jamart J, Weyer RVd. Increase in non-specific bronchial hyperresponsiveness as an early marker of bronchial response to occupational agents during specific inhalation challenges. *Thorax* 1996; 51:472-478.
18. Fabbri L, Boschetto P, Zocca E, Milani G, Pivrotto F, Plebani M et al. Bronchoalveolar neutrophilia during late asthmatic reactions induced by toluene diisocyanate. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136:36-42.
19. Maestrelli P, Calcagni P, Saetta M, Stefano AD, Hosselet J, Santonastaso A et al. Sputum eosinophilia after asthmatic responses induced by isocyanates in sensitized subjects. *Clin Exp Allergy* 1994; 24:29-34.
20. Obata H, Dittrick M, Chan H, Chan-Yeung M. Sputum eosinophils and exhaled nitric oxide during late asthmatic reaction in patients with western red cedar asthma. *Eur Respir J* 1999; 13:489-495.

21. Wardlaw A, Dunnette S, Gleich G, Collins J, Kay A. Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137:62-69.

22. Bradley B, Azzawi M, Jacobson M, Assoufi B, Collins J, Irani A et al. Eosinophil, T-lymphocytes, mast cells, neutrophils, and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects without asthma and normal control subjects and relationship to bronchial hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88:661-674.

23. Crimi E, Spanevello A, Neri M, Ind P, Rossi G, Brusasco V. Dissociation between airway inflammation and airway hyperresponsiveness in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:4-9.

Article scientifique

**C. Lemière, J. L'Archevêque, C Trudeau, N. Patry JG Martin, A. Cartier, JL Malo.
Usefulness of induced sputum in the investigation of occupational asthma using specific inhalation challenges. Am J Respir Crit Care Med 1999; 159:A233**

L'article concernant cette étude est en cours de rédaction

d

Tableau 1: Caractéristiques des sujets explorés:

No	Sexe	Age	Tabac	Atopie	Agent	Durée d'exposition	Dernière exposition	Traitement
1	F	29	F	A	Farine	4	3	CSI, β_2 agonistes
2	H	42	ex F	NA	Farine	5	1	CSI, β_2 agonistes
3	H	62	F	A	Farine	4	5	CSI, β_2 agonistes
4	H	50	N F	A	Farine	8	2	β_2 agonistes
5	H	55	ex F	A	Farine	10	2	CSI, β_2 agonistes
6	F	35	ex F	A	Cobaye	6	5	β_2 agonistes
7	H	57	N F	A	Farine	26	11	β_2 agonistes
8	F	35	N F	A	Latex	7	5	CSI, β_2 agonistes
9	F	55	ex F	NA	Thé	26	13	CSI, β_2 agonistes
10	H	63	N F	NA	HDI	35	5	β_2 agonistes
11	H	31	N F	A	HDI	5	5	CSI, β_2 agonistes
12	H	51	ex F	A	Cèdre rouge	15	10	Aucun
13	H	55	ex F	A	Cèdre rouge	14	11	β_2 agonistes
14	H	47	ex F	A	Cèdre rouge	3	3	CSI, β_2 agonistes
15	H	57	ex F	NA	MDI	0.2	3	CSI, β_2 agonistes
Moyenne		48.2(11.2)				11.2(10.2)	4.7(4.3)	

Légende: HDI: diisocyanate d'hexaméthylène,, MDI: diisocyanate de diphénylméthane, A:atopique, NA: non atopique, F: fumeur, NF:non fumeur, ex F: ex fumeur. CSI: cortico steroïdes inhalés

Tableau 2: Évolution de la réactivité bronchique et de l'inflammation bronchique lors des tests de provocation bronchique spécifique.

	Contrôle	J-1	J
n	15	15	15
chute maximum de VEMS (%)	2.4(2.4)	7.35(3.8)	22.1(3.3)
CP ₂₀ , mg/ml	8.9(7.8)	5.3(3.9)	4.7(4.1)*
TCC, 10 ⁶ /ml	3.4(6.7)	4.6 (12.6)	6.6(24.4)
Éosino, %	0.5(0.9)	5.0(30.5)*	9.0(24.5)*
Neu,%	56.2(20.5)	55.0(41.5)	53.2(20.5)

Légende: J-1: jour précédant la réaction asthmatique, J: jour de la réaction asthmatique. CCT: compte cellulaire total, Éosino: éosinophiles dans l'expectoration. Neu: neutrophiles dans l'expectoration. Les résultats sont exprimés comme médiane et rang interquartile sauf pour la CP₂₀, qui est exprimée comme moyenne géométrique. *: p<0.05.

Tableau 3: Caractéristiques biologiques et fonctionnelles des sujets étudiés en fonction de leur exposition à des agents de haut ou de bas poids moléculaire

Agents de haut poids moléculaire							
Jour contrôle			J-1		J		
No	CP ₂₀ mg/ml	Éosino %	CP ₂₀ mg/ml	Éosino %	CP ₂₀ mg/ml	Éosino %	Réaction asthmatique
1	0.56	1.0	0.43	1.0	0.26	3.0	immédiate
2	2.4	0.0	2.7	22.0	2.1	9.0	immédiate
3	5.6	0.5	7.4	0.5	5.0	3.0	immédiate
4	50.0	1.0	128	3.0	128	1.0	immédiate
5	0.26	0.0	1.05	1.0	0.27	3.0	immédiate
6	128.0	0.0	54.0	1.3	35	6.0	immédiate
7	5	0.5	6	12.5	6.3	27.5	immédiate
8	13.5	0.0	18.0	0.2	7.4	15.0	immédiate
5.5(4.6)		0.25(0.9)	7.1(16.1)	1.2(9.5)	4.45(3.9)	4.5(10.5)	
Agents de bas poids moléculaires							
Jour contrôle			J-1		J		
No	CP ₂₀ mg/ml	Eosino %	CP ₂₀ mg/ml	Eosino %	CP ₂₀ mg/ml	Eosino %	Réaction asthmatique
9	9.0	0.8	0.9	87.0	4.4	7.0	semi retardée
10	0.38	36.5	0.3	31.5	ND	30.8	semi retardée
11	12.5	0.0	2.6	8.0	0.36	20.0	immédiate
12	128.0	1.0	128.0	40.8	128.0	22.0	immédiate
13	89.0	0.7	10.0	57.3	3.4	62.6	immédiate
14	3.6	0.8	1.0	5.0	ND	42.8	semi retardée
15	128.0	0.5	16.0	1.0	6.0	1.0	semi retardée
15.6(13.8)		0.8(0.5)	3.9(3.4)	31.5(52.3)	5.3(4.6)	22(35.8)	

Légende: J-1: jour précédant la réaction asthmatique, J: jour de la réaction asthmatique. CCT: compte cellulaire total, Éosino: éosinophiles dans l'expectoration.

Articles scientifiques

**C. Lemière, J. L'Archevêque, C Trudeau, N. Patry JG Martin, A. Cartier, JL Malo.
Usefulness of induced sputum in the investigation of occupational asthma using specific
inhalation challenges. Am J Respir Crit Care Med 1999; 159:A233**

**L'article rapportant cette étude vient d'être accepté pour publication dans la revue "Journal of
Allergy and Clinical Immunology" sous le titre "Characterization of airway inflammation
following repeated exposures to occupational agents.**