



Substances chimiques et agents biologiques

# Études et recherches

■ RAPPORT R-574



## **Le syndrome d'irritation bronchique De la surveillance épidémiologique aux mécanismes**

*Jean-Luc Malo  
Denyse Gautrin  
Karim Maghni  
James Martin*



Solidement implanté au Québec depuis 1980, l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) est un organisme de recherche scientifique reconnu internationalement pour la qualité de ses travaux.

## NOS RECHERCHES

### Mission *travaillent pour vous !*

Contribuer, par la recherche, à la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles ainsi qu'à la réadaptation des travailleurs qui en sont victimes.

Offrir les services de laboratoires et l'expertise nécessaires à l'action du réseau public de prévention en santé et en sécurité du travail.

Assurer la diffusion des connaissances, jouer un rôle de référence scientifique et d'expert.

Doté d'un conseil d'administration paritaire où siègent en nombre égal des représentants des employeurs et des travailleurs, l'IRSST est financé par la Commission de la santé et de la sécurité du travail.

### Pour en savoir plus

Visitez notre site Web ! Vous y trouverez une information complète et à jour.

De plus, toutes les publications éditées par l'IRSST peuvent être téléchargées gratuitement. [www.irsst.qc.ca](http://www.irsst.qc.ca)

Pour connaître l'actualité de la recherche menée ou financée par l'IRSST, abonnez-vous gratuitement au magazine Prévention au travail, publié conjointement par l'Institut et la CSST. Abonnement : 1-877-221-7046

### Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales

2008

ISBN : 978-2-89631-286-3 (version imprimée)

ISBN : 978-2-89631-287-0 (PDF)

IRSST - Direction des communications

505, boul. De Maisonneuve Ouest

Montréal (Québec)

H3A 3C2

Téléphone : 514 288-1551

Télécopieur : 514 288-7636

[publications@irsst.qc.ca](mailto:publications@irsst.qc.ca)

[www.irsst.qc.ca](http://www.irsst.qc.ca)

Institut de recherche Robert-Sauvé

en santé et en sécurité du travail,

août 2008



Substances chimiques et agents biologiques

# Études et recherches

■ RAPPORT R-574

## Le syndrome d'irritation bronchique De la surveillance épidémiologique aux mécanismes

### Avis de non-responsabilité

L'IRSST ne donne aucune garantie relative à l'exactitude, la fiabilité ou le caractère exhaustif de l'information contenue dans ce document. En aucun cas l'IRSST ne saurait être tenu responsable pour tout dommage corporel, moral ou matériel résultant de l'utilisation de cette information.

Notez que les contenus des documents sont protégés par les législations canadiennes applicables en matière de propriété intellectuelle.

*Jean-Luc Malo, Denyse Gauthrin et Karim Maghni*  
*Axe de recherche en santé respiratoire, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal*

*James Martin*  
*Laboratoire Meakins Christie*

Cliquez recherche  
[www.irsst.qc.ca](http://www.irsst.qc.ca)



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

**CONFORMÉMENT AUX POLITIQUES DE L'IRSST**

Les résultats des travaux de recherche publiés dans ce document  
ont fait l'objet d'une évaluation par des pairs.

## SOMMAIRE

Le syndrome d'irritation bronchique (SIRB) est un type d'asthme professionnel où le travailleur exposé à un irritant non spécifique, généré à une forte concentration, développe une symptomatologie respiratoire asthmatique avec un risque d'atteinte fonctionnelle permanente. La plupart du temps, les travailleurs présentent des symptômes sans consulter au service de premiers soins ni faire de demandes d'indemnisation.

L'étude proposée comporte un volet épidémiologique qui fait le pont avec un volet portant sur les mécanismes, ce dernier étant exploré dans un modèle animal.

Dans le cadre du volet épidémiologique, notre objectif était d'identifier 1) les facteurs de risque – incluant le calibre et le degré d'excitabilité bronchique à l'embauche ainsi que le nombre et l'importance des inhalations accidentelles de chlore – pour le développement d'une atteinte fonctionnelle respiratoire trois et cinq ans après l'embauche chez des travailleurs à risque; 2) les caractéristiques d'inflammation et de remodelage bronchiques chez les participants présentant une atteinte fonctionnelle au suivi.

Nous avons recruté 115 nouveaux employés à l'embauche dans une industrie métallurgique. Ces travailleurs ont eu une évaluation fonctionnelle respiratoire et une évaluation de l'expectoration induite au moment du recrutement dans cette étude. Tel que prévu dans la soumission de notre projet, nous avons effectué un suivi en septembre 2003 chez ceux ayant trois ans d'ancienneté (n = 52,) puis en septembre 2005. Le recrutement de nouveaux employés dans notre étude s'est fait jusqu'en 2004, les dernières visites de suivi ont eu lieu en 2007. Dans cette industrie, il y avait des risques d'accidents inhalatoires dus à des émanations de chlore. L'évaluation était réalisée par questionnaires respiratoire et professionnel, la spirométrie et des tests de provocation bronchique à la méthacholine. Des comptes cellulaires différentiels des neutrophiles et des éosinophiles de l'expectoration induite ont été effectués. Les expectorations ont été centrifugées et les surnageants conservés à - 80°C pour l'analyse de médiateurs de l'inflammation et de marqueurs du remodelage bronchiques. La quantification de l'IL-8 (facteur chimiotactique des neutrophiles) et des métalloprotéinases MMPs a été réalisée par ELISA.

Pour la cohorte entière, nous n'avons pas noté de changements significatifs dans les paramètres de la fonction respiratoire ni de l'inflammation et du remodelage bronchiques tout au cours de l'étude. D'autre part, les travailleurs ayant eu des accidents inhalatoires n'ont pas eu de changements plus importants de leur fonction respiratoire. Un asthme diagnostiqué par un médecin, l'atopie et un rapport VEMS/CVF plus faible au début de l'étude sont des caractéristiques personnelles associées à la détérioration du VEMS.

Le plus souvent, des relations statistiquement significatives ont été observées entre les différents paramètres inflammatoires étudiés, c'est-à-dire le % de neutrophiles, l'IL-8, le MPO, le MMP-9, TIMP-1, le complexe MMP-9-TIMP-1 et le glutathion, mais ces relations étaient différentes à la visite initiale et au suivi, suggérant que les mécanismes de régulation de l'inflammation bronchique chez les travailleurs après 4 ans sont différents des mécanismes présents à l'embauche. Le statut initial de l'inflammation et du remodelage bronchique à l'embauche est déterminant et prédit le degré de l'inflammation et du remodelage bronchiques chez les travailleurs 4 ans après l'investigation initiale. De plus, les variations de VEMS entre la visite d'embauche et le suivi chez les travailleurs présentant une détérioration de leur fonction pulmonaire sont significativement corrélées à des concentrations plus élevées d'IL-8, de MMP-9 et de TIMP-1 mesurés à la visite d'embauche.

Le modèle animal quant à lui a été validé chez la souris selon un modèle de type dose-réponse en exposant les animaux à des concentrations de 100, 200 400 et 800 ppm de Cl<sub>2</sub>. Dans ce modèle, il est apparu que le stress oxydatif jouait un rôle significatif (Annexe 1).

Le décours de l'effet a été ensuite étudié jusqu'à 10 jours après une exposition de 800 ppm durant cinq minutes. Immédiatement après l'insulte inhalatoire, on trouve d'abord une desquamation épithéliale importante suivie d'une prolifération de l'épithélium de base, maximum cinq jours après l'atteinte, puis d'hyperplasie musculaire. Puis, nous avons remarqué que la présence d'un type de cellules T, celles portant le récepteur gamma delta T, était critique dans la médiation de l'hyperexcitabilité bronchique et la réponse inflammatoire. Finalement, nous avons montré qu'un agent antioxydant puissant, le diméthylthiourée, exerçait un effet protecteur sur l'atteinte, ouvrant la voie à des essais chez l'humain.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>1. INTRODUCTION ET OBJECTIFS .....</b>	<b>1</b>
<b>2. MÉTHODOLOGIE.....</b>	<b>3</b>
<b>3. RÉSULTATS ET DISCUSSION DES RÉSULTATS.....</b>	<b>5</b>
3.1 Nombre de travailleurs évalués.....	5
3.2 Caractéristiques fonctionnelles et physiologiques des travailleurs et leurs changements au cours de la période de suivi.....	6
3.3 Changements fonctionnels en relation avec des accidents inhalatoires (« puffs »).....	6
3.4 Changements significatifs du VEMS et de la réactivité bronchique et facteurs associés.....	8
3.5 Marqueurs d'inflammation et de remodelage dans l'expectoration induite .....	12
3.5.1 Signification des changements des pourcentages cellulaires (neutrophiles) et des niveaux des médiateurs inflammatoires et des marqueurs de remodelage bronchique .....	12
3.5.2 Marqueurs de l'inflammation et du remodelage à la Visite 1.....	12
3.6 Relation entre marqueurs cellulaires de l'inflammation (neutrophiles) et marqueurs de l'inflammation et du remodelage bronchiques dans le surnageant : interleukine-8 (IL-8), MPO, MMP-9, TIMP-1 complexe MMP-9/TIMP-1, glutathion (GSH) dans l'expectoration induite.....	14
3.6.1 Corrélation entre neutrophiles et médiateurs: IL-8, MPO, MMP-9, TIMP-1 et le complexe MMP-9/TIMP-1 dans l'expectoration induite (Visite 1) .....	14
3.6.2 Corrélation entre neutrophiles et médiateurs: IL-8, MPO, MMP-9, TIMP-1 et le complexe MMP-9/TIMP-1 dans l'expectoration induite (Visite 2). .....	17
3.6.2.1 Corrélations entre MMP-9, TIMP-1, et complexe MMP-9/TIMP-1 .....	18
3.6.2.2 Corrélations entre les différents marqueurs d'inflammation .....	18
3.6.3 Corrélation entre marqueurs de l'inflammation et du remodelage bronchiques dans l'expectoration induite mesurés à deux visites différentes .....	19
3.6.4 Corrélation entre glutathion et marqueurs de l'inflammation et du remodelage bronchiques dans l'expectoration induite mesurés chez les mêmes sujets à deux visites différentes durant le suivi.....	21

3.7	Relations entre mesures fonctionnelles et marqueurs de l'inflammation et du remodelage bronchiques .....	24
4.	CONCLUSION .....	29
5.	RÉFÉRENCES.....	31
	ANNEXE 1 .....	33

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 – Séquence des visites .....	3
Tableau 2 – Nombre de travailleurs évalués (total = 115).....	5
Tableau 3 – Caractéristiques fonctionnelles et physiologiques des travailleurs et leurs changements au cours de la période de suivi depuis le début de l'étude en 1995 (n = 72) .....	6
Tableau 4 – Pourcentage de changement du VEMS* entre la première et la dernière visite du suivi selon l'exposition rapportée aux puffs de chlore .....	7
Tableau 5 - Variation du VEMS (ml) par année entre la première et la dernière visite du suivi selon l'exposition aux puffs de chlore.....	7
Tableau 6 - Association entre les caractéristiques de base et l'exposition au chlore d'une part et la présence de détérioration du VEMS ( $(V_s - V_1)/V_1 \geq -0.12$ ) d'autre part.....	9
Tableau 7 - Association entre les caractéristiques de base et l'exposition au chlore d'une part et la présence d'une diminution de la CP20 (diminution au suivi de $\geq 2$ fois la CP20 de base) d'autre part.....	10
Tableau 8 - Association entre les caractéristiques de base et l'exposition au chlore, et la présence de détérioration de la CP20 (diminution au suivi de $\geq 2$ fois la CP20 à l'embauche) et/ou du VEMS (litre) ( $(V_s - V_1)/V_1 \geq -.12$ ) d'autre part .....	11
Tableau 9 - Marqueurs d'inflammation et de remodelage dans l'expectoration induite (à l'embauche et au suivi).....	13
Tableau 10 -Corrélation de Pearson entre neutrophiles et médiateurs : IL-8, MPO, MMP-9, TIMP-1 et le complexe MMP-9/TIMP-1 dans l'expectoration induite (Visite 1).....	14
Tableau 11 -Corrélation de Pearson entre neutrophiles et médiateurs : IL-8, MPI, MMP-9, TIMP-1 et le complexe MMP-9/TIMP-1 dans l'expectoration induite (Visite 2).....	18
Tableau 12 -Corrélation de Pearson entre marqueurs de l'inflammation et du remodelage bronchique dans l'expectoration induite mesurés à la Visite 1 et marqueurs mesurés à la Visite 2 .....	20

Tableau 13 -Corrélation entre le glutathion (GSH), les neutrophiles, les médiateurs : IL-8, MPO, MMP-9, TIMP-1 et le complexe MMP-9/TIMP-1 dans l'expectoration induite (à la Visite 1 et à la Visite 2).....	22
Tableau 14 -Corrélations entre mesures du VEMS (% de la valeur prédite) à la Visite 1 et variation du VEMS entre Visite 1 et Visite 2, et marqueurs de l'inflammation et du remodelage bronchiques dans l'expectoration induite mesurés à la Visite 1.....	25
Tableau 15 -Corrélations entre mesures du VEMS (% de la valeur prédite) à la Visite 2 et variation du VEMS entre Visite 1 et Visite 2, et marqueurs de l'inflammation et du remodelage bronchiques dans l'expectoration induite à la Visite 2.....	26
Tableau 16 -Comparaison des valeurs moyennes des marqueurs de l'inflammation et du remodelage bronchique dans l'expectoration induite à la Visite 2 chez les sujets présentant une détérioration du VEMS entre la Visite 1 et la Visite 2 et les autres.....	28

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 - Corrélations entre les niveaux de MMP-9 et les neutrophiles.....	15
Figure 2 - Corrélations entre les niveaux de MMP-9 et les niveaux d'IL-8 .....	15
Figure 3 - Corrélations entre les niveaux de MMP-9 et ceux de MPO .....	16
Figure 4 - Corrélations entre les niveaux de MMP-9 et de TIMP-1 .....	16
Figure 5 - Corrélations entre les niveaux de MMP-9 et ceux du complexe MMP-9/TIMP-1 .....	17
Figure 6 - Corrélation entre les niveaux de glutathion et le pourcentage de neutrophiles (A, D) et les niveaux du complexe MMP-9/TIMP_1 (C, F) à la Visite 1 et à la Visite 2.....	23
Figure 7 - Corrélation entre variation du VEMS de la Visite 1 à la Visite 2 et niveaux de glutathion dans l'expectoration induite à la Visite 1 .....	27



## 1. INTRODUCTION ET OBJECTIFS

Le syndrome d'irritation bronchique (SirB) est un type d'asthme professionnel où le travailleur exposé à un irritant non spécifique généré à une forte concentration développe une symptomatologie respiratoire asthmatique avec un risque d'atteinte fonctionnelle permanente. La plupart du temps, les travailleurs qui présentent ce type de symptômes ne consultent pas au service de premiers soins et ne font pas de demande d'indemnisation.

Dans une étude longitudinale effectuée de 1992 à 1994 chez 239 travailleurs à risque d'accidents inhalatoires de chlore, le niveau d'exposition au chlore a été estimé en considérant la présence et l'importance des symptômes respiratoires suivant la perception d'émanations accidentelles (symptômes suivis d'une visite au service de premiers soins; symptômes non suivis d'une telle visite; aucun symptôme). Nous avons observé alors des changements du calibre et de l'hyperexcitabilité bronchiques durant la période à l'étude (deux ans) qui étaient associés au nombre d'accidents inhalatoires ayant causé des symptômes légers (2). En conséquence, le nombre de travailleurs québécois qui font une demande d'indemnisation pour «syndrome d'irritation bronchique», un type d'asthme professionnel, auprès de la CSST ne reflète pas l'ampleur potentielle du problème puisque les émanations qui causent des symptômes mais ne causent pas d'absentéisme au travail ne sont pas tenues en compte.

Notre intérêt plus récent a porté sur l'évaluation des conséquences fonctionnelles et symptomatiques dans le cas d'accidents dits d'intensité faible à modérée. Les travailleurs ayant subi ces accidents de moindre intensité ne consultent généralement pas. Ils retournent ensuite dans leur milieu de travail après que l'on ait ventilé les locaux. De plus, de la même façon que le monitoring de l'asthme professionnel inclut maintenant non seulement des marqueurs de la fonction respiratoire mais aussi de l'inflammation bronchique (3), nous pensons que le monitoring des conséquences des accidents inhalatoires doit inclure une évaluation de l'inflammation et du remodelage bronchiques par l'expectoration induite.

L'objectif général **du présent projet** était d'identifier :1) les facteurs de risque, et 2) les caractéristiques d'inflammation et de remodelage bronchiques.

Nous voulions savoir spécifiquement si :1) le calibre et le degré d'excitabilité bronchiques à l'embauche sont des facteurs de risque, en sus du nombre et de l'importance des inhalations accidentelles, de développer une atteinte fonctionnelle respiratoire au suivi de trois et cinq ans après l'embauche; cette hypothèse s'appuie sur les données des études transversales **et** longitudinales effectuées par notre groupe (4) (2), et sur les résultats préliminaires du suivi d'un petit nombre de travailleurs (n = 32) (5); 2) des changements significatifs des neutrophiles et des médiateurs potentiellement responsables de leur recrutement (interleukin-8; IL-8) et indicateurs de leur activation (myéloperoxydase, MPO) ainsi que des marqueurs du remodelage bronchique (métalloprotéinases de la matrice (MMP-9), son inhibiteur (TIMP-1) et le complexe MMP-9/TIMP-1) seraient mis en évidence chez les sujets présentant une atteinte fonctionnelle au suivi; cette hypothèse se base sur les résultats préliminaires obtenus chez 22 sujets, la moitié ayant une atteinte fonctionnelle au suivi (5).



## 2. MÉTHODOLOGIE

Nous avons recruté 115 employés nouvellement embauchés dans une industrie métallurgique entre 1995 et 2004; ces travailleurs ont eu une première évaluation fonctionnelle respiratoire à l'embauche ou au cours des mois qui ont suivi. À partir de l'an 2000, une expectoration induite a été proposée à tous les nouveaux employés (n=83) ainsi qu'aux sujets recrutés antérieurement (n=32) lesquels avaient atteint de 3 à 5 ans d'ancienneté. La date de l'embauche est considérée comme le temps « 0 » et la première évaluation fonctionnelle respiratoire correspondant à l'embauche, la Visite 1 (V1). Tel que prévu au protocole, nous avons effectué un suivi en septembre 2003 chez ceux qui avaient trois ans d'ancienneté puis en septembre 2005. Le premier suivi (V2) comprenait des questionnaires, des tests fonctionnels respiratoires et une induction de l'expectoration; le deuxième suivi (V3) comprenait des questionnaires et des tests fonctionnels respiratoires. Dans ce rapport, la première évaluation fonctionnelle est désignée par V1 et la dernière visite de suivi (V2 ou V3) par Vs (ou V2) (Tableau 1) Les dernières visites de suivi ont eu lieu en 2007.

**Tableau 1 – Séquence des visites**

	Embauche Temps 0	V1	V2	V3	Vs (V2 ou V3)
Questionnaires		X	X	X	
Tests fonctionnels respiratoires		X	X	X	X
Expectoration induite		X	X		

Un questionnaire respiratoire standardisé (6) a été utilisé ainsi qu'un questionnaire sur l'histoire professionnelle portant sur les postes occupés et sur les inhalations accidentelles à des puffs de chlore. L'évaluation de l'exposition était faite de façon prospective entre les visites (nombre et intensité des symptômes aigus associés) et de façon rétrospective pour la période remontant à l'embauche chez les travailleurs dont la première évaluation fonctionnelle a eu lieu quelques mois après l'embauche. Dans ce rapport, la fenêtre d'exposition aux puffs de chlore se situe entre l'embauche et la fin du suivi. De plus, nous avons obtenu de l'information sur la survenue d'événements où uniquement des symptômes nasaux ont été ressentis. Nous avons accès à l'information concernant les visites aux premiers soins à cause d'inhalations accidentelles.

La spirométrie a été effectuée selon un protocole standardisé (7). Nous avons aussi procédé à l'évaluation de l'hyperexcitabilité bronchique non-allergénique par des nébulisations de méthacholine jusqu'à une dose maximale de 32 mg/ml selon une méthode standardisée (débit du nébuliseur = 0.14 ml/min) (8) (9). L'expectoration a été induite selon une méthode standardisée après nébulisation de solutions salines de concentration progressive (10).

Les échantillons d'expectoration induite ont été centrifugés et les surnageants conservés à – 80 degrés C pour l'analyse de médiateurs de l'inflammation et des marqueurs du remodelage bronchiques. Avant de mesurer ces médiateurs, les surnageants sont concentrés sur une colonne de type Centricon et la quantité de protéines totales de l'échantillon est déterminée (Kit de dosage BioRad). L'IL-8 (facteur chimiotactique des neutrophiles) et la myéloperoxydase

(marqueur d'activation des neutrophiles) ont été mesurées par la technique d'ELISA en utilisant des kits commercialement disponibles. Les métalloprotéinases MMP-9 furent déterminées en utilisant différentes techniques telles que la zymographie pour la détection des activités gélatinases (MMP-9) et la technique d'ELISA pour la quantification de ces métalloprotéinases et de leur inhibiteur (TIMP-1) ainsi que du complexe MMP-9/TIMP-1.

### 3. RÉSULTATS ET DISCUSSION DES RÉSULTATS

#### 3.1 Nombre de travailleurs évalués

Entre 1995 et 2004, 115 nouveaux employés ont été recrutés. Tous ont eu une première évaluation qui comprenait : un questionnaire médical et un questionnaire sur l'histoire professionnelle incluant des questions sur l'exposition à des puffs de chlore et la présence concomitante de symptômes respiratoires, des tests spirométriques et de provocation bronchique. Parmi eux 99 ont eu un test d'induction d'expectoration dont l'échantillon était interprétable pour 69 des cas. Le nombre de sujets revus aux visites de suivi est présenté au tableau 2. Soixante-douze (72) travailleurs ont eu au moins 2 visites, dont 48 ont eu trois visites ou plus. Quarante sujets avaient quitté l'usine au moment de la deuxième visite et quatre n'étaient pas disponibles. La durée moyenne entre la première et dernière visite était d'un peu plus de cinq ans.

**Tableau 2 – Nombre de travailleurs évalués (total = 115)**

Évaluation	Première visite à l'embauche (Ve)	Visites de suivi (Vs)		
		2 visites	3 visites	4 visites
Questionnaires	115	24	45	3
Spirométrie (VEMS)	115	24	45	3
Test de provocation bronchique à la méthacholine (CP20)	115	24	45	3
Expectoration induite	99†	43		
Échantillon valide	69	36		
Durée entre visite d'embauche et dernière visite, ans, moyenne. ± DS	5.8 ± 1.89			

Légende : † : Pour 32 sujets embauchés à l'usine avant l'an 2000, les premiers tests fonctionnels ont eu lieu à l'embauche (entre 1995 et 2000) alors que la première induction d'expectoration fut effectuée en 2000 lors de leur deuxième visite.

### 3.2 Caractéristiques fonctionnelles et physiologiques des travailleurs et leurs changements au cours de la période de suivi.

**Tableau 3 – Caractéristiques fonctionnelles et physiologiques des travailleurs et leurs changements au cours de la période de suivi depuis le début de l'étude en 1995 (n = 72)**

	Visite à l'embauche (V1)	Dernière visite du suivi (Vs)	Changement
VEMS (l), moy.± DS §	4.14 ± 0.58	3.95 ± 0.60	(Vs-V1/V1) X 100 -4.23% ± 9.40
VEMS (% pred), moy. ± DS	97.57 ± 11.86	96.94 ± 13.12	Vs-V1 -0.63 ± 9.27
CP20 (log CP20 mg/ml), moy. ± DS	4.68 ± 0.85	4.78 ± 0.81	
CP20 mg/ml <sub>V1</sub> / CP20 mg/ml <sub>Vs</sub>			
≥ 2, n(%)			7 (9.7)
≥ 3.2, n(%)			6 (8.3)
CP20 ≤ 16 mg/ml, n(%)	13 (11.3%)	4 (5.6%)	3 ont diminué 4 ont normalisé

Légende : V1 : 1ère visite (à l'embauche ou au cours des mois qui ont suivi) ; Vs : dernière visite du suivi; DS: déviation standard; VEMS: volume expiratoire maximum en 1 seconde ; % pred : % de la valeur prédite selon Knudson et coll. (11) ; CP20 concentration de méthacholine provoquant une chute de 20% du VEMS.

### 3.3 Changements fonctionnels en relation avec des accidents inhalatoires (« puffs »)

Les tableaux 4 et 5 montrent que les travailleurs qui ont eu des puffs (avec symptômes importants ou légers, ou de façon générale que ce soit avec/sans symptômes) à un moment ou à un autre depuis l'embauche jusqu'à leur dernière visite de suivi ont un VEMS qui ne chute pas davantage comparativement aux autres travailleurs.

Le déclin annuel du VEMS est pratiquement le même que les travailleurs aient eu ou pas des puffs de chlore depuis leur embauche, que les puffs soient accompagnés ou non de symptômes et est de l'ordre de -30 ml/an.

**Tableau 4 – Pourcentage de changement du VEMS\* entre la première et la dernière visite du suivi selon l'exposition rapportée aux puffs de chlore**

Tous	Pourcentage de changement du VEMS (litre)		
	N	Moyenne ± DS	p†
	72	-4.23 ± 9.40	-
Exposition au chlore entre l'embauche et la fin du suivi			
Puffs avec/sans symptômes	64	-4.57 ± 9.16	0.90
Aucun puff	8	-1.50 ± 11.44	
Puffs avec symptômes légers	35	-3.86 ± 9.97	0.59
Aucun puff ou puffs sans symptômes	36	-5.08 ± 8.52	
Puffs avec symptômes importants <sup>§</sup>	12	-1.98 ± 10.07	0.75
Aucun puff ou puffs sans symptômes	54	-4.34 ± 9.36	

Légende : \* : (VEMS (litre) dernière visite de suivi – VEMS (litre) Visite 1)/VEMS (litre) Visite 1; † : valeur de p dans un test *t* de Student; § : les travailleurs n'ayant rapporté que des symptômes légers ne sont pas représentés ici ;

**Tableau 5 - Variation du VEMS (ml) par année entre la première et la dernière visite du suivi selon l'exposition aux puffs de chlore**

Tous	Variation annuelle du VEMS (ml/an)		
	N	Moyenne ± DS	p†
	72	-31.64 ± 92.34	-
Exposition au chlore entre l'embauche et la fin du suivi			
Puffs avec/sans symptômes	64	-32.39 ± 84.18	0.85
Aucun puff	8	-25.60 ± 150.53	
Puffs avec symptômes légers	35	-27.31 ± 92.93	0.59
Aucun puff ou puffs sans symptômes	36	-39.26 ± 91.63	
Puffs avec symptômes importants <sup>§</sup>	12	-19.45 ± 93.84	0.75
Aucun puff ou puffs sans symptômes	54	-28.77 ± 89.57	

Légende : † : valeur de p dans un test *t* de Student ; § : les travailleurs n'ayant rapporté que des symptômes légers ne sont pas représentés ici.

### **3.4 Changements significatifs du VEMS et de la réactivité bronchique et facteurs associés**

Nous avons défini une baisse significative du VEMS comme une baisse  $\geq -12\%$  entre la visite correspondant à l'embauche (V1) et la dernière visite de suivi ((VEMS dernière visite de suivi – VEMS V1)/VEMS V1); ce qui correspond au changement moyen du VEMS + 1 DS, i.e.,  $-4.2 \pm 9.0$ ). Le nombre d'employés qui ont ainsi connu une baisse du VEMS est de 17/72 (23.6%). Par ailleurs, une augmentation significative de la réactivité bronchique est définie comme une diminution de 2 fois la concentration de méthacholine provoquant une chute de 20% du VEMS (i.e., une diminution de  $\geq 2$  fois la CP20 de base). Sept sujets sur 72 (9.72%) ont connu une telle baisse de la CP20 durant le suivi ; parmi ces sept travailleurs, aucun n'a démontré de détérioration du VEMS.

Si l'on considère les sujets ayant connu une baisse significative du VEMS et/ou de la CP20, 24 sujets correspondent à ces critères (tableau 8).

Les tableaux 6, 7 et 8 présentent les résultats des analyses pour identifier les déterminants de la baisse du VEMS et/ou de la CP20 parmi les caractéristiques personnelles de base et l'exposition au chlore.

**Tableau 6 - Association entre les caractéristiques de base et l'exposition au chlore d'une part et la présence de détérioration du VEMS ((Vs-V1)/V1  $\geq$  -0.12) d'autre part**

n (%) §	Détérioration du VEMS		Valeur de p*
	Présente 17	Absente 55	
Sujets recrutés avant v <sub>s</sub> à partir de 2000	13 (76.5)**	19 (34.5)	0.002
Intervalle entre évaluations (ans), moy. $\pm$ DS	5.84 $\pm$ 1.70	5.73 $\pm$ 2.01	0.85
Age (moy. $\pm$ DS)	32.53 $\pm$ 6.55	29.64 $\pm$ 6.32	0.11
Asthme diagnostiqué par un MD	3 (18.8)*	1 (1.9)	0.04†
Sillements	2 (12.5)	2 (3.7)	0.22†
Rhinite	4 (23.5)	14 (25.5)	1.0†
Tabac F/ExF/NF	5/3/9	9/11/35	0.49†
Atopie	11 (64.7)•	21 (38.9)	0.06
VEMS % préd, moy. $\pm$ DS	99.43 $\pm$ 13.20	97.0 $\pm$ 11.48	0.46
VEMS % préd. <80% de la prédite	1 (5.9)	3 (5.5)	- ‡
VEMS/CVF % préd., moy. $\pm$ DS	98.26 $\pm$ 7.64**	104.19 $\pm$ 6.89	0.003
VEMS/CVF % préd. <85% de la prédite	0	2 (3.6)	- ‡
CP20 $\leq$ vs > 16 mg/ml	1 (5.9)	4 (7.3)	1.0†
CP20 $\leq$ vs > 32 mg/ml	2 (11.8)	9 (16.4)	1.0†
Puffs avec/sans Sx	16 (94.1)	48 (87.3)	0.67†
Puffs avec Sx légers	10 (58.8)	25 (45.5)	0.37
Puffs avec Sx importants	2 (11.8)	10 (18.2)	0.72

**Légende :** § : nombres et pourcentages si non spécifié autrement ; \* : dans un test de *t* de Student ou un test de chi-deux ; † : test de Fisher ; Sx : symptômes ; ‡ : test non effectué, nombre de sujets trop petit ; DS: déviation standard; VEMS: volume expiratoire maximum en 1 seconde ; % pred : % de la valeur prédite selon Knudson et coll. (11); CVF : capacité vitale forcée ; CP20 concentration de méthacholine provoquant une chute de 20% du VEMS.

Un asthme diagnostiqué par un médecin et l'atopie, soit une réaction positive à au moins deux allergènes communs sont des caractéristiques personnelles, évaluées au moment du recrutement dans l'étude, associées à la détérioration du VEMS et ce, significativement pour ce qui est de l'asthme (tableau 6). On note également que les sujets qui connaissent une détérioration du VEMS avaient au départ un pourcentage du rapport VEMS/CVF prédit significativement plus faible que les autres.

Une histoire d'exposition à des puffs de chlore, accompagnés ou non de symptômes depuis l'embauche, n'est pas associée à la détérioration du VEMS.

**Tableau 7 - Association entre les caractéristiques de base et l'exposition au chlore d'une part et la présence d'une diminution de la CP20 (diminution au suivi de  $\geq 2$  fois la CP20 de base) d'autre part**

n (%) §	Diminution de la CP20		Valeur de p*
	Présente 7	Absente 65	
Sujets recrutés avant $v_s$ à partir de 2000	5 (71.4)	27 (41.5)	0.23†
Intervalle entre évaluations (ans), moy. $\pm$ DS	6.06 $\pm$ 3.6	5.78 $\pm$ 1.66	0.85
Age (moy. $\pm$ DS)	28.29 $\pm$ 7.48	30.54 $\pm$ 6.35	0.38
Asthme diagnostiqué par un MD	0	4 (6.3)	1†
Sillements	1 (14.3)	3 (4.8)	0.35†
Rhinite	5 (71.4)**	13 (20.0)	0.009†
Tabac F/ExF/NF	3/0/4	11/14/40	0.15
Atopie	2 (33.3)	30 (46.2)	0.68†
VEMS % préd., moy. $\pm$ DS	94.36 $\pm$ 16.47	97.32 $\pm$ 11.37	0.45
VEMS % préd. < 80% de la prédite	1 (14.3)	3 (4.6)	0.34†
VEMS/CVF % préd., moy. $\pm$ DS	98.37 $\pm$ 9.15•	103.27 $\pm$ 7.18	0.09
VEMS/CVF % préd. <85% de la prédite	1 (14.3)	1 (1.5)	-‡
CP20 $\leq$ vs > 16 mg/ml	1 (14.3)	4 (6.2)	0.4†
CP20 $\leq$ vs > 32 mg/ml	3 (42.9)•	8 (12.3)	0.07

**Légende :** § : nombres et pourcentages si non spécifiés autrement ; \* : dans un test de t de Student ou un test de chi-deux ; † : test de Fischer ; ‡ : test non effectué, nombre de sujets trop petit ; DS: déviation standard; VEMS: volume expiratoire maximum en 1 seconde ; % prédit : % de la valeur prédite selon Knudson et coll. (11) ; CVF : capacité vitale forcée ; CP20 concentration de méthacholine provoquant une chute de 20% du VEMS.

Une histoire de rhinite personnelle avant la première visite est significativement associée à une augmentation de la réactivité bronchique tel que reflété par une diminution de la CP20 (tableau 7). L'augmentation de la réactivité bronchique durant le suivi est associée de façon quasi significative à un plus faible rapport VEMS/CVF prédit et à une CP20  $\leq$  32 mg/ml à l'embauche.

Dans notre étude, la diminution de la CP20 durant le suivi n'est pas associée à l'histoire d'exposition à des puffs de chlore ; le faible nombre de sujets ayant rapporté des puffs parmi ceux qui ont connu une détérioration de la CP20 ne permet pas d'effectuer d'analyses statistiques à cet effet.

**Tableau 8 - Association entre les caractéristiques de base et l'exposition au chlore, et la présence de détérioration de la CP20 (diminution au suivi de  $\geq 2$  fois la CP20 à l'embauche) et/ou du VEMS (litre) ( $(V_s - V_1)/V_1 \geq -0.12$ ) d'autre part**

n (%) §	Détérioration de la CP20 et/ou du VEMS		Valeur de p*
	Présente 24	Absente 48	
Sujets recrutés avant vs à partir de 2000	18 (75.0)***	14 (29.2)	<0.001
Intervalle entre évaluations (ans), moy. $\pm$ DS	5.90 $\pm$ 2.32	5.69 $\pm$ 1.46	0.66
Age (moy. $\pm$ DS)	31.29 $\pm$ 6.95	29.83 $\pm$ 6.2	0.37
Asthme diagnostiqué par un MD	3 (13.0)•	1 (2.1)	0.1†
Sillements	3 (13.0)•	1 (2.1)	0.1†
Rhinite	9 (37.5)•	9 (18.8)	0.08
Tabac F/ExF/NF	8/3/13•	6/11/31	0.09
Atopie	13 (56.5)	19 (39.6)	0.18
VEMS % préd. moy. $\pm$ DS	97.95 $\pm$ 14.06	97.39 $\pm$ 10.76	0.85
VEMS % préd. <80% de la prédite	3 (12.5)	1 (2.1)	-†
VEMS/CVF % préd., moy. $\pm$ DS	98.29 $\pm$ 7.90***	105.04 $\pm$ 6.17	<0.001
VEMS/CVF % préd. <85% de la prédite	1 (4.2)	1 (2.1)	-‡
CP20 $\leq$ vs > 16 mg/ml	2 (8.3)	3 (6.3)	1†
CP20 $\leq$ vs > 32 mg/ml	5 (20.8)	6 (12.5)	0.49†
Puffs avec/sans Sx	22 (91.7)	42 (87.5)	0.71†
Puffs avec Sx légers	11 (45.8)	24 (51.1)	0.68
Puffs avec Sx importants	3 (14.3)	9 (20.0)	0.74†

**Légende :** § : nombres et pourcentages si non spécifié autrement ; \* : dans un test de t de Student ou un test de chi-deux ; † : test de Fischer ; ‡ : test non effectué, nombre de sujets trop petit ; Sx : symptômes ; DS: déviation standard; VEMS: volume expiratoire maximum en 1 seconde ; % prédit : % de la valeur prédite selon Knudson et coll. (11); CVF : capacité vitale forcée ; CP20 concentration de méthacholine provoquant une chute de 20% du VEMS.

Lorsque l'on considère comme issue (*outcome*) la détérioration du VEMS et/ou une diminution de la CP<sub>20</sub> (détérioration fonctionnelle) (tableau 8), l'asthme diagnostiqué par un médecin et la présence de rhinite à l'embauche sont des facteurs associés, quoique non significativement. Les sujets qui démontrent une détérioration fonctionnelle ont un rapport VEMS/CVF significativement plus faible à l'embauche comparativement aux autres. L'histoire d'exposition à des puffs de chlore depuis l'embauche, qu'ils soient ou non accompagnés de symptômes, n'est pas reliée à la détérioration fonctionnelle.

### **3.5 Marqueurs d'inflammation et de remodelage dans l'expectoration induite**

#### **3.5.1 Signification des changements des pourcentages cellulaires (neutrophiles) et des niveaux des médiateurs inflammatoires et des marqueurs de remodelage bronchique**

Dans le cadre de ce programme de recherche, nous n'avons mesuré dans le liquide de l'expectoration induite que le pourcentage des cellules inflammatoires tels les neutrophiles et les éosinophiles, un marqueur spécifique de l'induction de la neutrophilie, l'interleukin-8 (IL-8) et un marqueur d'activation des neutrophiles, la myéloperoxydase (MPO). Nous avons aussi déterminé les niveaux de marqueurs du remodelage bronchique telle la métalloprotéase de la matrice MMP-9, son inhibiteur naturel TIMP-1 (« *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1* ») et la formation du complexe MMP-9/TIMP-1. La formation du complexe entre MMP-9 et TIMP-1 provoque l'inhibition de l'activité enzymatique de la MMP-9 (12). Enfin, nous avons mesuré les concentrations de glutathion dans le liquide de l'expectoration induite comme indice du niveau de stress oxydatif bronchique (13).

#### **3.5.2 Marqueurs de l'inflammation et du remodelage à la Visite 1**

Nos résultats ont indiqué la présence d'une inflammation bronchique de degré variable entre les sujets de l'étude à la Visite 1 et pas de changements significatifs pour l'ensemble des travailleurs de la Visite 1 à la Visite 2. Cette inflammation bronchique est principalement caractérisée par une infiltration de neutrophiles et la présence de concentration variable d'IL-8 et de MPO et des marqueurs de remodelage MMP-9, TIMP-1 et du complexe MMP-9/TIMP-1. Les marqueurs du remodelage bronchique ont été aussi analysés par la technique de zymographie qui a confirmé la présence et l'activité de ces marqueurs.

Le tableau 9 présente les valeurs médianes et l'écart interquartile pour les pourcentages d'éosinophiles et de neutrophiles ainsi que pour les mesures des autres marqueurs. Les résultats sont présentés d'une part pour les sujets (N<sub>p</sub>) pour lesquels des paires d'échantillons d'expectoration (Visite 1 et Visite 2) étaient disponibles et valides, et d'autre part pour l'ensemble des sujets qui ont fourni un échantillon à la première visite seulement (N). Le nombre de sujets varie selon les marqueurs; ceci est dû à l'impossibilité dans certains cas d'effectuer les analyses en laboratoire à cause de la trop faible quantité de spécimen recueillie. Il est fréquent chez des sujets normaux (non asthmatiques par exemple) qu'il soit difficile de produire des crachats en quantité appréciable.

**Tableau 9 - Marqueurs d'inflammation et de remodelage dans l'expectoration induite (à l'embauche et au suivi)**

	Visite à l'embauche V1	Visite de suivi Vs	Changement Vs - V1 Moyenne† ± DS p‡
Eosinophiles, %, médiane (IQR) Np= 33 N=69	0 (0.7) 0 (0.5)	0.3 (0.5)	-0.69 ± 4.8 ns
Neutrophiles, %, médiane (IQR) Np= 33 N=69	19.8 (30.9) 19.8 (21.4)	20.8 ± (29.7)	5.0 ± 19.59 0.15
IL-8, ng/ml, médiane (IQR) Np=35 N=52	1008.10 (1706.20) 679.0 (1399.20)	618.0 (1787.0)	-314.69 ± 2144.26 ns
MPO, ng/ml, médiane (IQR) Np=26 N=48	1.26 (4.87) 0.29 (3.29)	2.35 (4.75)	5.48 ± 27.88 ns
MMP-9, ng/ml, médiane (IQR) Np=36 N=55	97.40 (340.93) 83.7 (298.90)	98.31 (201.53)	-22.83 ± 378.24 ns
TIMP-1, ng/ml, médiane (IQR) Np=31 N=49	5.74 (10.12) 2.58 (9.04)	3.96 (7.84)	-7.09 ± 24.40 0.12
Complexe MMP-9/TIMP-1, ng/ml, médiane (IQR) Np=36 N=49	1.06 (2.09) 0.5 (1.59)	0.45 (1.02)	-1.08 ± 2.45 0.007
Glutathion, moyenne ± DS, um Np=35 N=54	12.24 (17.52) 13.94 (15.4)	12.13 (16.63)	2.12 ± 14.77 ns

**Légende :** V1 : visite à l'embauche ; Vs : visite du suivi ; IQR : écart inter-quartiles ; \* : Np : nombre de sujets avec paires d'échantillons ; N : nombre de sujets avec au moins un échantillon ; le nombre de sujets peut varier selon les paramètres étudiés ; DS : déviation standard ; † : la distribution des différences étant normale, la moyenne et la DS ont été calculées ; ‡ : Valeur de p dans un test de t pairé ; ns p>0.2.

### 3.6 Relation entre marqueurs cellulaires de l'inflammation (neutrophiles) et marqueurs de l'inflammation et du remodelage bronchiques dans le surnageant : interleukine-8 (IL-8), MPO, MMP-9, TIMP-1 complexe MMP-9/TIMP-1, glutathion (GSH) dans l'expectoration induite

Les analyses de l'IL-8 et des MMP-9 dans le surnageant des échantillons d'expectoration induite recueillis à l'automne 2004 ont été effectuées à l'été 2005 par un étudiant récipiendaire d'une bourse de stagiaire d'été du Centre asthme et travail.

#### 3.6.1 Corrélation entre neutrophiles et médiateurs: IL-8, MPO, MMP-9, TIMP-1 et le complexe MMP-9/TIMP-1 dans l'expectoration induite (Visite 1)

Les analyses de corrélation de Pearson ont permis d'établir qu'il existe une corrélation significative du pourcentage de neutrophiles et les concentrations d'IL-8 ainsi qu'entre l'IL-8 et la MPO. Le résultat des ces analyses est cohérent avec le type d'inflammation observée chez les sujets de cette étude à savoir une inflammation de type neutrophilique associée à la présence d'IL-8 qui est une chimiokine responsable de la migration des neutrophiles de la circulation sanguine vers le site d'inflammation (14). Cependant, il n'existe pas de corrélation entre les neutrophiles et les niveaux de MPO. Ce résultat suggère que seule une proportion des neutrophiles présents dans la lumière bronchique est activée et que leur activation n'est pas attribuable exclusivement à l'IL-8 (15).

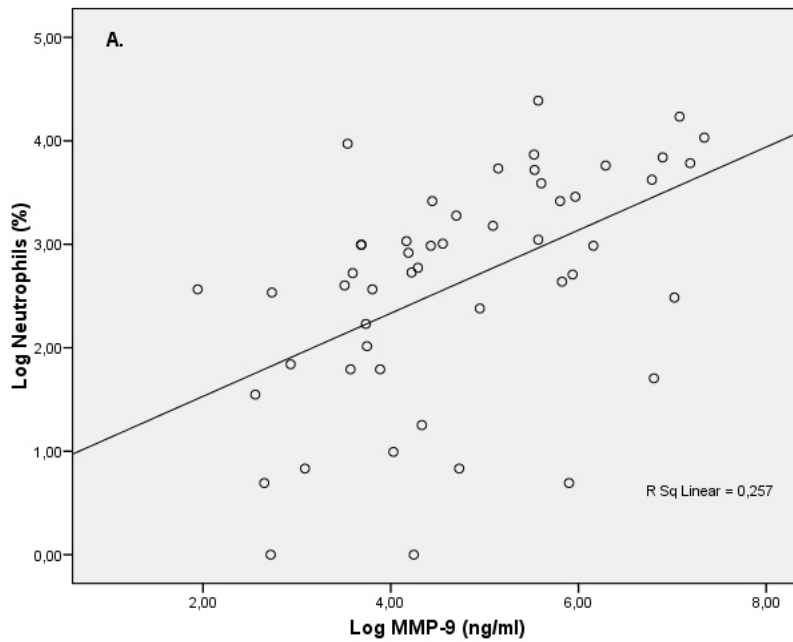
**Tableau 10 - Corrélation de Pearson entre neutrophiles et médiateurs : IL-8, MPO, MMP-9, TIMP-1 et le complexe MMP-9/TIMP-1 dans l'expectoration induite (Visite 1)**

Marqueurs		IL-8	MPO	MMP-9	TIMP-1	Complexe MMP-9/TIMP-1
Neutrophiles (%)	Corrélation de Pearson	.47*	-.12	.51***	.36*	.40**
	P	.001	.43	.000	.015	.004
	n	48	45	51	46	51
IL-8	Corrélation de Pearson		.40**	.79***	.56***	.46**
	P		.006	.000	.000	.001
	n		45	52	46	52
MPO	Corrélation de Pearson			.40**	.47**	.30*
	P			.005	.002	.04
	n			48	43	48
MMP-9	Corrélation de Pearson				.58***	.54***
	P				.000	.000
	n				49	55
TIMP-1	Corrélation de Pearson					.61***
	P					.000
	n					49

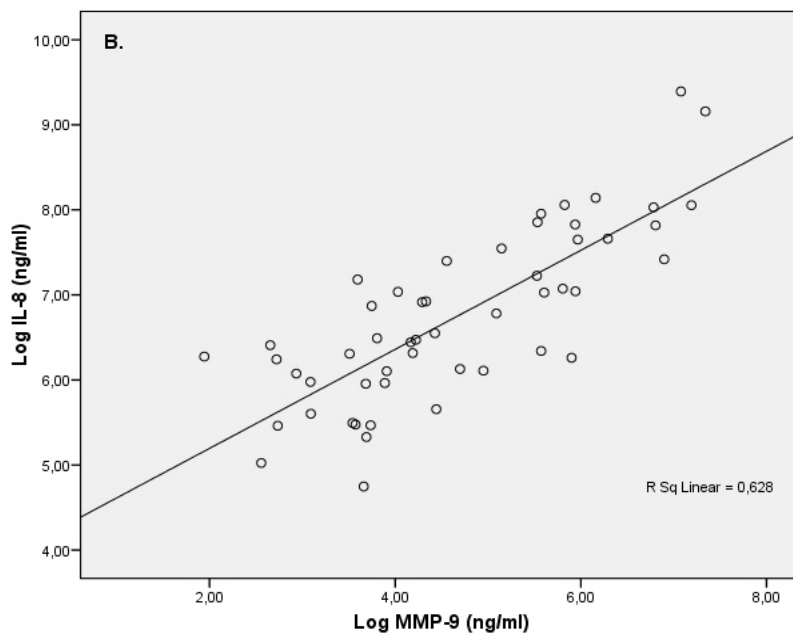
Légende : niveaux des marqueurs transformés en logarithme avant les analyses statistiques.

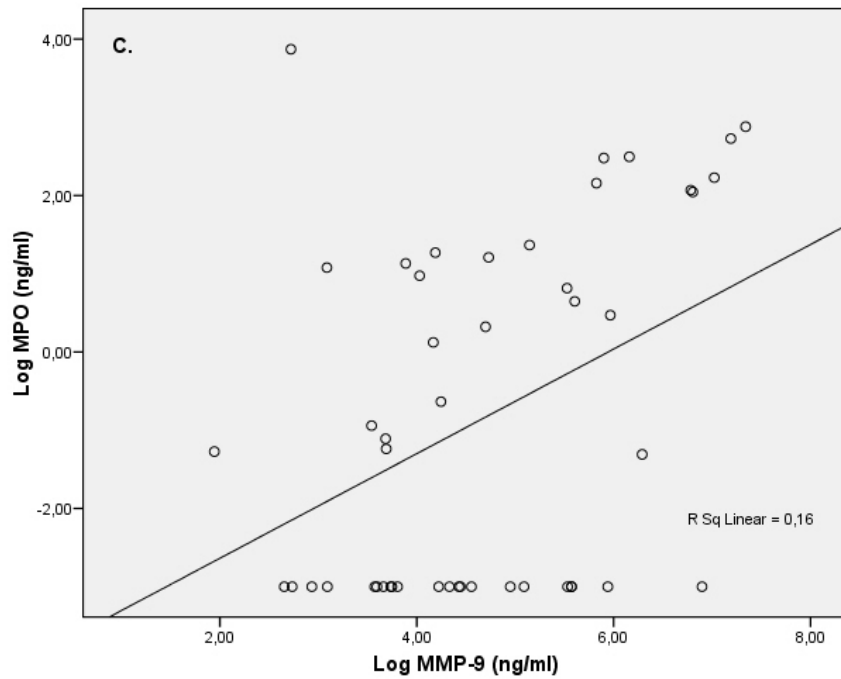
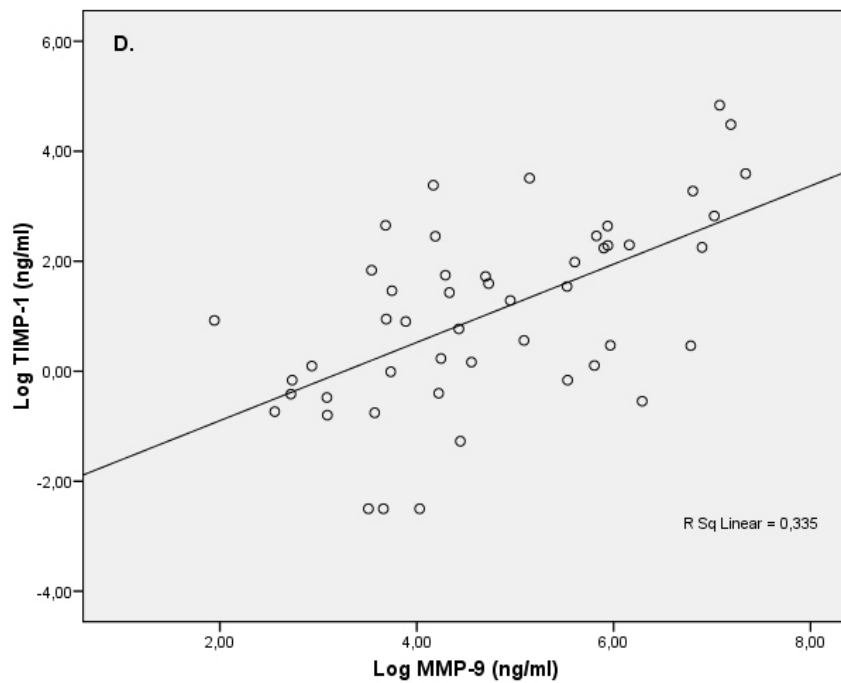
Le MMP-9 étant le marqueur du remodelage sélectionné pour cette étude, nous illustrons les corrélations entre cette métalloprotéinase d'une part et les autres marqueurs mesurés (neutrophiles, IL-8, MPO, TIMP1 et le complexe MMP-9/TIMP-1) d'autre part. La figure 1 présente les résultats des analyses des échantillons prélevés à la Visite-1.

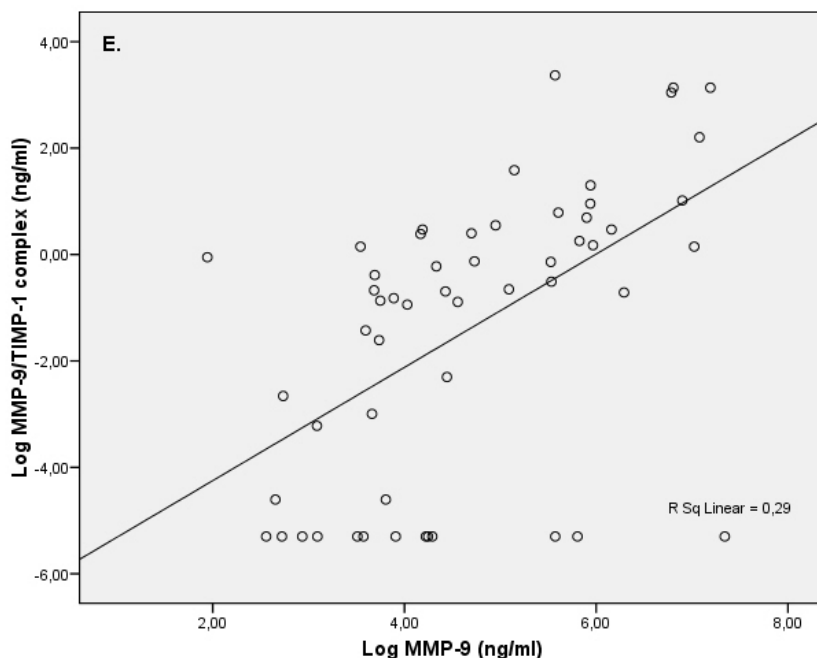
**Figure 1 - Corrélations entre les niveaux de MMP-9 et les neutrophiles**



**Figure 2 - Corrélations entre les niveaux de MMP-9 et les niveaux d'IL-8**



**Figure 3 - Corrélations entre les niveaux de MMP-9 et ceux de MPO****Figure 4 - Corrélations entre les niveaux de MMP-9 et de TIMP-1**

**Figure 5 - Corrélations entre les niveaux de MMP-9 et ceux du complexe MMP-9/TIMP-1**

### **3.6.2 Corrélation entre neutrophiles et médiateurs: IL-8, MPO, MMP-9, TIMP-1 et le complexe MMP-9/TIMP-1 dans l'expectoration induite (Visite 2).**

Les analyses de corrélation de Pearson ont permis d'établir qu'il existe une corrélation significative entre le pourcentage de neutrophiles et les concentrations d'IL-8. Le résultat de ces analyses suggère donc que les niveaux d'IL-8 présents dans les bronches seraient responsables, en partie, de la persistance de la neutrophilie bronchique chez les travailleurs montrant des pourcentages élevés de neutrophiles dans l'expectoration induite. Cependant, à l'opposé de la Visite 1, les analyses de corrélation montrent qu'il n'existe pas de corrélation entre les concentrations d'IL-8 et de MPO. De plus, de façon similaire à la Visite 1, il n'existe pas de corrélation entre les neutrophiles et les niveaux de MPO. Le résultat de ces analyses est surprenant car la MPO est spécifiquement sécrétées par les neutrophiles activés, et l'IL-8 est l'un des facteurs responsables de la sécrétion de MPO par les neutrophiles (10). Nous émettons donc l'hypothèse que les mécanismes de régulation de l'inflammation bronchique chez les travailleurs après 4 ans sont différents des mécanismes présents à la Visite 1. Ainsi, nous proposons que la sécrétion de MPO par les neutrophiles activés ne serait pas régulée par l'IL-8 dans les conditions immuno-inflammatoires bronchiques présentes à la Visite 2. Ces résultats sont présentés au tableau 11.

**Tableau 11 - Corrélation de Pearson entre neutrophiles et médiateurs : IL-8, MPI, MMP-9, TIMP-1 et le complexe MMP-9/TIMP-1 dans l'expectoration induite (Visite 2)**

Marqueurs		IL-8	MPO	MMP-9	TIMP-1	Complexe MMP-9/TIMP-1
Neutrophiles (%)	Corrélation de Pearson	.54**	.12	.58***	.32•	.05
	P	.001	.55	.000	.079	.78
	n	35	26	36	31	36
IL-8	Corrélation de Pearson		.08	.64***	.58**	.28
	P		.69	.000	.001	.103
	n		26	36	31	36
MPO	Corrélation de Pearson			.302	-0.13	.10
	P			.13	.54	.62
	n			27	25	27
MMP-9	Corrélation de Pearson				.39*	.15
	P				.03	.37
	n				32	36
TIMP-1	Corrélation de Pearson					.23
	P					.21
	n					32

Légende : niveaux des marqueurs transformés en logarithme avant les analyses statistiques; † : les sujets participant à la Visite 2 sont un sous-échantillon du group évalué à la Visite 1.

### 3.6.2.1 Corrélations entre MMP-9, TIMP-1, et complexe MMP-9/TIMP-1

L'analyse des échantillons des expectorations induites indique des concentrations variables de MMP-9 chez les sujets 4 ans après la première investigation. De manière similaire à la Visite 1, les analyses de corrélation ont révélé une corrélation significative entre les niveaux de MMP-9, et de son inhibiteur TIMP-1. Cependant, contrairement à la Visite 1, les niveaux de MMP-9 ne sont pas corrélés avec la formation du complexe MMP-9/TIMP-1. Les résultats de ces analyses indiquent que la production de MMP-9 est toujours en balance avec la production de son inhibiteur TIMP-1 mais non avec la formation du complexe MMP-9/TIMP-1. Ceci suggère fortement qu'il existe un processus actif de remodelage bronchique qui serait plus orientée vers une altération de la matrice extracellulaire (surproduction de MMP-9) chez certains travailleurs 4 ans après l'investigation initiale.

### 3.6.2.2 Corrélations entre les différents marqueurs d'inflammation

Les analyses de corrélation indiquent que les concentrations de MMP-9 et de TIMP-1 mesurées à la Visite 2 sont corrélées avec l'intensité de la neutrophilie, et les concentrations d'IL-8. Les résultats de ces analyses suggèrent fortement que l'inflammation de type neutrophilique observée chez certains travailleurs à la Visite 2 est associée au processus actif de remodelage bronchique. Il est intéressant de noter que, contrairement à la Visite 1, les concentrations de MMP-9 ne sont pas corrélées avec les niveaux de MPO. Les résultats de ces analyses renforcent notre hypothèse selon laquelle les mécanismes de régulation de l'inflammation bronchique chez les travailleurs après 4 ans sont différents des mécanismes présents à la Visite 1.

Il est intéressant de noter que, contrairement à la Visite 1, les niveaux du complexe MMP-9/TIMP-1 ne sont pas corrélés avec les niveaux des autres médiateurs inflammatoires et le pourcentage de neutrophiles. Le résultat de cette analyse est un élément de plus qui renforce notre hypothèse selon laquelle les mécanismes de régulation de l'inflammation bronchique chez les travailleurs après 4 ans sont différents des mécanismes présents à la Visite 1.

### ***3.6.3 Corrélation entre marqueurs de l'inflammation et du remodelage bronchiques dans l'expectoration induite mesurés à deux visites différentes***

Les résultats présentés au tableau 12 montrent qu'il existe une corrélation positive entre les concentrations d'IL-8 mesurées à la Visite 1 et à la Visite 2. Il existe aussi une corrélation positive entre les concentrations de MMP-9 mesurées à la Visite 1 et à la Visite 2. Il est intéressant à noter qu'il existe une corrélation positive entre les concentrations d'IL-8 mesurées à la Visite 1 et l'intensité de la neutrophilie bronchique mesurées à la Visite 2 ou les concentrations de MMP-9 mesurées à la Visite 2. De plus, il existe une corrélation positive entre les concentrations de MMP-9 mesurées à la Visite 1 et l'intensité de la neutrophilie bronchique mesurées à la Visite 2. L'ensemble de ces analyses de corrélation sont en cohérence avec l'évidence d'une persistance de l'inflammation et du remodelage bronchique chez certains travailleurs à la Visite 2. Fait très intéressant, ces analyses indiquent aussi que le statut initial de l'inflammation et du remodelage bronchique (Visite 1) est déterminant et prédit le degré de l'inflammation et du remodelage bronchique chez les travailleurs, 4 ans après l'investigation initiale.

Il est intéressant à noter que les concentrations d'IL-8, de MMP-9, de la MPO ou l'intensité de la neutrophilie mesurées à la Visite 1 ne sont pas corrélées aux concentrations de MPO mesurées à la Visite 2. Les résultats de ces analyses constituent aussi un élément supplémentaire qui renforce notre hypothèse selon laquelle les mécanismes de régulation de l'inflammation bronchique chez les travailleurs après 4 ans sont différents des mécanismes présents à la Visite 1. Cette hypothèse est aussi supportée par les analyses de corrélation indiquant l'absence de corrélation entre les niveaux du complexe MMP-9/TIMP-1 mesurés à la Visite 2 et le pourcentage de neutrophiles mesurés à la Visite 1. De plus les niveaux du complexe MMP-9/TIMP-1 mesurés à la Visite 2 ne sont pas corrélés avec les niveaux des autres médiateurs inflammatoires.

**Tableau 12 - Corrélation de Pearson entre marqueurs de l'inflammation et du remodelage bronchique dans l'expectoration induite mesurés à la Visite 1 et marqueurs mesurés à la Visite 2**

VISITE 1 (marqueurs)		VISITE 2 (marqueurs)					
		Neutrophiles(%)	IL-8	MPO	MMP-9	TIMP-1	Complexe MMP-9/TIMP-1
Neutrophiles(%)	Corrélation de Pearson	.51**	.54**	.26	.34•	.05	-0.01
	P	.002	.001	.24	.05	.81	.96
	n	33	32	23	33	28	33
IL-8	Corrélation de Pearson	.34*	.49**	-0.046	.43**	.47**	.04
	P	.049	.003	.82	.01	.008	.81
	n	35	35	26	36	31	36
MPO	Corrélation de Pearson	-0.17	-.03	.17	-0.02	.21	.14
	P	.37	.86	.42	.90	.31	.46
	n	29	29	26	30	26	30
MMP-9	Corrélation de Pearson	.35*	.42*	-0.20	.39*	.34•	-0.02
	P	.04	.01	.33	.02	.06	.91
	n	35	35	26	36	31	36
TIMP-1	Corrélation de Pearson	.40*	.40*	-0.25	.18	.53**	.36*
	P	.02	.02	.22	.30	.002	.03
	n	35	35	26	36	31	36
Complexe MMP-9/TIMP-1	Corrélation de Pearson	.45**	.29•	-0.13	.33•	.42*	.38*
	P	.006	.09	.54	.05	.02	.02
	n	35	35	26	36	31	36

Légende : niveaux des marqueurs transformés en logarithme avant les analyses statistiques; Visite 1 : visite à l'embauche; Visite 2 : dernière visite du suivi.

### **3.6.4 Corrélation entre glutathion et marqueurs de l'inflammation et du remodelage bronchiques dans l'expectoration induite mesurés chez les mêmes sujets à deux visites différentes durant le suivi**

Les résultats montrent des concentrations variables de glutathion dans le liquide de l'expectoration induite. Les résultats des analyses de corrélation présentés au tableau 13 indiquent qu'il existe une corrélation inverse significative entre les concentrations de glutathion mesurées à la Visite 1 et les concentrations de TIMP-1 et du complexe MMP-9/TIMP-1, ainsi que l'intensité de la neutrophilie bronchique mesurées à la Visite 1. Cependant il n'existe pas de corrélation entre les niveaux de glutathion à la Visite 1 et les concentrations d'IL-8 et de MMP-9. Ces résultats sont cohérents avec le fait que l'inflammation bronchique de type neutrophilique est caractérisée par un stress oxydatif qui se traduit, en autre chose, par une altération des niveaux de glutathion (8). Cependant, il existe une corrélation entre les concentrations de glutathion mesurées à la Visite 2 et les concentrations d'IL-8 et de MMP-9 mesurées à la Visite 2. Les résultats de ces analyses est un élément de plus qui renforce notre hypothèse selon laquelle les mécanismes de régulation de l'inflammation bronchique chez les travailleurs, après 4 ans, sont différents des mécanismes présents à la Visite 1.

Il est intéressant de noter qu'il n'existe pas de corrélation entre les concentrations de glutathion et de MPO mesurées à la Visite 1 ou la Visite 2. Nous n'avons pas pour l'instant d'éléments pouvant expliquer cette absence de corrélation.

**Tableau 13 - Corrélation entre le glutathion (GSH), les neutrophiles, les médiateurs : IL-8, MPO, MMP-9, TIMP-1 et le complexe MMP-9/TIMP-1 dans l'expectoration induite (à la Visite 1 et à la Visite 2)**

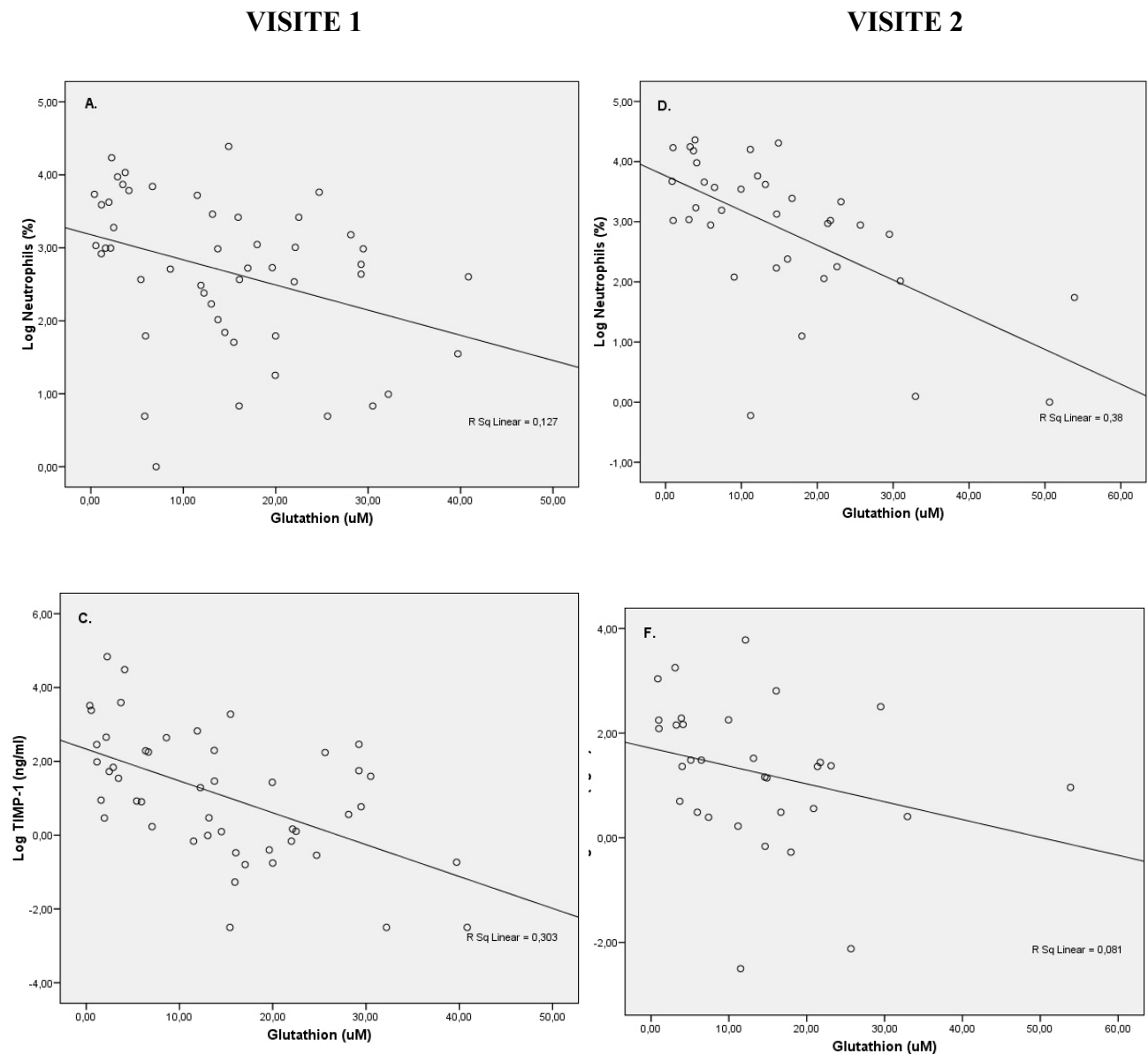
VISITE 1		
Marqueurs		GSH-V1
Neutrophiles	Corrélation de Pearson	-0.36*
	P	.01
	n	50
IL-8	Corrélation de Pearson	-0.18
	P	.22
	n	51
MPO	Corrélation de Pearson	-0.22
	P	.14
	n	47
MMP-9	Corrélation de Pearson	-0.21
	P	.14
	n	54
TIMP-1	Corrélation de Pearson	-0.55***
	P	.000
	n	34
Complexe MMP-9/TIMP-1	Corrélation de Pearson	-0.39**
	P	.003
	n	54

VISITE 2		
Marqueurs		GSH-V2
Neutrophiles	Corrélation de Pearson	-0.62***
	P	.000
	n	36
IL-8	Corrélation de Pearson	-0.37*
	P	.03
	n	36
MPO	Corrélation de Pearson	.15
	P	.45
	n	27
MMP-9	Corrélation de Pearson	-0.31•
	P	.07
	n	36
TIMP-1	Corrélation de Pearson	-0.29
	P	.11
	n	32
Complexe MMP-9/TIMP-1	Corrélation de Pearson	-0.02
	P	.93
	n	36

Légende : niveaux des marqueurs transformés en logarithme avant les analyses statistiques.

Les corrélations entre le glutathion et autres marqueurs mesurés dans les échantillons d'expectoration induite obtenus à la Visite 1 et à la Visite 2 sont illustrées aux figures 6.

**Figure 6 - Corrélation entre les niveaux de glutathion et le pourcentage de neutrophiles (A, D) et les niveaux du complexe MMP-9/TIMP\_1 (C, F) à la Visite 1 et à la Visite 2**



### 3.7 Relations entre mesures fonctionnelles et marqueurs de l'inflammation et du remodelage bronchiques

Le tableau 14 présente les résultats d'analyses de corrélation entre mesures du VEMS (% de la valeur prédite) à la **Visite 1** et le pourcentage de **variation du VEMS (litres) entre Visite 1 et Visite 2**, et marqueurs cellulaires de l'inflammation (neutrophiles), et marqueurs de l'inflammation et du remodelage bronchique dans le surnageant : interleukine-8 (IL-8), MPO, MMP-9, TIMP-1 complexe MMP-9/TIMP-1, glutathion (GSH) dans l'expectoration induite mesurés à la **Visite 1**.

L'existence d'une relation entre les niveaux d'expression des marqueurs de l'inflammation et du remodelage bronchiques et les changements fonctionnels respiratoires a été étudiée. Les analyses de corrélation ont indiqué qu'il n'existe pas de relation entre le VEMS à la Visite 1 et la réponse inflammatoire bronchique déterminée à la même visite. Ce résultat est cohérent avec le fait que la grande majorité des travailleurs présentait des valeurs normales du VEMS à la Visite 1, en effet seuls trois sujets (4.2%) avaient un VEMS en pourcentage de la valeur prédite de moins de 80%. De plus, les résultats de cette étude indiquent que la diminution du VEMS entre la Visite 1 et 2 n'est pas corrélée aux niveaux des marqueurs d'inflammation et de remodelage bronchique mesurée à la Visite 1. Ces résultats révèlent que les marqueurs de l'inflammation et du remodelage bronchique mesurés dans cette étude ne prédisent pas les changements du VEMS chez les travailleurs 4 ans après l'investigation initiale. Cependant, la corrélation négative entre les changements du VEMS et les niveaux de glutathion suggère fortement que le stress oxydatif serait impliqué dans le mécanisme responsable des changements fonctionnels observés chez les travailleurs 4 ans après l'investigation initiale.

Fait très intéressant, nos analyses indiquent aussi que les travailleurs qui ont des concentrations plus élevées de MPO mesurées à la Visite 2 présentent une plus faible détérioration de leur fonction pulmonaire (Tableau 15).

**Tableau 14 - Corrélations entre mesures du VEMS (% de la valeur prédite) à la Visite 1 et variation du VEMS entre Visite 1 et Visite 2, et marqueurs de l'inflammation et du remodelage bronchiques dans l'expectoration induite mesurés à la Visite 1**

Marqueurs mesurés à la Visite 1†		Tous les sujets	Sujets ayant eu des expectorations induites à ≥ 2 visites	
		VEMS (% de la valeur prédite) V-1	VEMS (% de la valeur prédite) V-1	Variation du VEMS§ entre V-1 et V-2
Neutrophiles(%)	Corr. de Pearson	-0.06	-0.09	0.23
	P (bilatéral)	0.96	0.66	0.25
	N	69	27	27
Eosinophiles(%)	Corr. de Pearson	0.009	-0.06	0.03
	P (bilatéral)	0.94	0.75	0.88
	N	69	27	27
IL-8	Corr. de Pearson	0.24	0.26	-0.29
	P (bilatéral)	0.09•	0.12	0.12
	N	52	29	29
MPO	Corr. de Pearson	0.18	.003	.005
	P (bilatéral)	0.21	0.99	0.98
	N	48	24	24
MMP-9	Corr. de Pearson	0.25•	0.17	-0.33•
	P (bilatéral)	0.06	0.37	0.08
	N	43	29	29
TIMP-1	Corr. de Pearson	0.21	0.22	0.17
	P (bilatéral)	0.14	0.26	0.37
	N	49	29	29
Complexe MMP-9/TIMP-1	Corr. de Pearson	0.14	0.22	0.06
	P (bilatéral)	0.32	0.25	0.76
	N	55	29	29
GSH¶	Corr. de Pearson	-0.11	0.03	-0.43*
	P (bilatéral)	0.42	0.89	0.02
	N	54	28	28

Légende : † niveaux des marqueurs transformés en logarithme avant les analyses statistiques; VEMS: volume expiratoire maximum en 1 seconde ; % de la valeur prédite selon Knudson et coll. (11) ; § : variation du VEMS = (VEMS (litres) Visite 2 – VEMS (litres) Visite 1)/VEMS (litres) Visite 1 ; ¶ : valeur en uM

Note : les résultats avec MPO doivent être interprétés avec précaution car 60% des niveaux sont non détectés et une valeur de 0.05 ng/ml leur a été attribuée.

**Tableau 15 - Corrélations entre mesures du VEMS (% de la valeur prédite) à la Visite 2 et variation du VEMS entre Visite 1 et Visite 2, et marqueurs de l'inflammation et du remodelage bronchiques dans l'expectoration induite à la Visite 2**

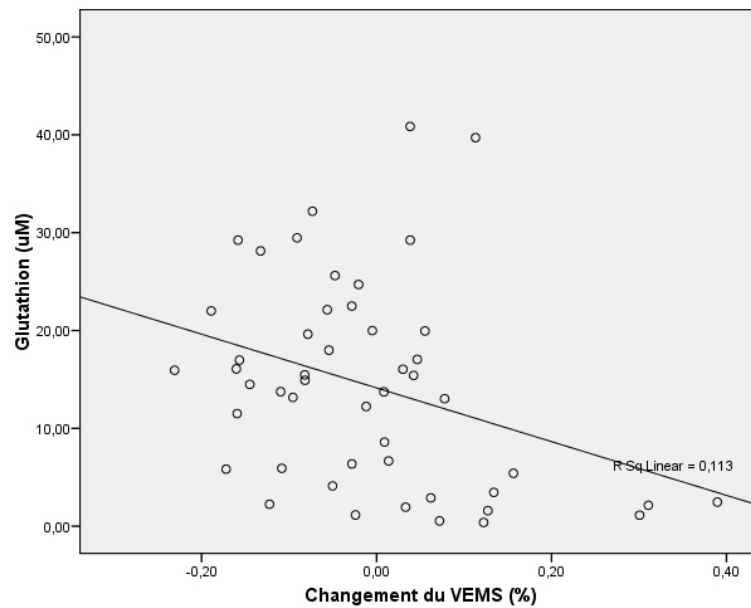
Marqueurs mesurés à la Visite 2†		VEMS (% de la valeur prédite) V-2	Variation du VEMS§ entre V-1 et V-2
Neutrophiles	Corrélation de Pearson	0.15	0.06
	P (bilatéral)	0.31	0.68
	N	51	51
Eosinophiles	Corrélation de Pearson	0.06	0.11
	P (bilatéral)	0.67	0.46
	N	51	51
IL-8	Corrélation de Pearson	0.06	-0.11
	P (bilatéral)	0.69	0.43
	N	51	51
MPO	Corrélation de Pearson	0.21	0.42**
	P (bilatéral)	0.19	0.005
	N	43	43
MMP-9	Corrélation de Pearson	0.06	-0.10
	P (bilatéral)	0.68	0.50
	N	51	51
TIMP-1	Corrélation de Pearson	0.19	0.01
	P (bilatéral)	0.22	0.94
	N	42	42
Complexe MMP-9/TIMP-1	Corrélation de Pearson	0.14	0.13
	P (bilatéral)	0.34	0.37
	N	51	51
GSH¶	Corrélation de Pearson	-0.003	-0.17
	P (bilatéral)	0.99	0.22
	N	51	51

**Légende :** † : niveaux des marqueurs transformés en logarithme avant les analyses statistiques ; VEMS: volume expiratoire maximum en 1 seconde ; % de la valeur prédite selon Knudson et coll. (11) ; § : variation du VEMS = (VEMS (litres) Visite 2 – VEMS (litres) Visite 1)/VEMS (litres) Visite 1 ; ¶ : valeur en uM

**Note :** les résultats avec MPO doivent être interprétés avec précaution, en effet 60% des niveaux sont non détectés et une valeur de 0.05 ng/ml leur a été attribuée.

La figure 7 illustre la corrélation significative entre niveaux de glutathion mesurés à la **Visite 1** et la variation du VEMS observées par la suite.

**Figure 7 -** Corrélation entre variation du VEMS de la Visite 1 à la Visite 2 et niveaux de glutathion dans l'expectoration induite à la Visite 1



Le tableau 16 montre les valeurs moyennes des marqueurs de l'inflammation et du remodelage dans l'expectoration induite chez les sujets ayant eu une détérioration du VEMS entre deux visites de suivi et les autres. Il est à noter qu'un seul sujet a démontré une baisse significative de la CP20 parmi ceux dont les marqueurs de l'expectoration induite ont été analysés.

**Tableau 16 - Comparaison des valeurs moyennes des marqueurs de l'inflammation et du remodelage bronchique dans l'expectoration induite à la Visite 2 chez les sujets présentant une détérioration du VEMS entre la Visite 1 et la Visite 2 et les autres.**

Marqueurs‡ (V-2)	Détérioration du VEMS§	Niveaux des marqueurs recueillis dans l'expectoration induite		
		Moyenne‡	Déviati on standard	p
Neutrophiles (%)	Oui n=11	2.72	0.95	0.68
	Non n=40	2.88	1.14	
IL-8	Oui n=10	6.85	1.15	0.52
	Non n=41	6.59	1.13	
MPO	Oui n=9	-2.54	1.39	0.001
	Non n=34	-0.25	2.24	
MMP-9	Oui n=10	4.39	1.52	0.46
	Non n=41	4.73	1.21	
TIMP-1	Oui n=7	0.96	2.12	0.83
	Non n=35	1.10	1.45	
Complexe MMP-9/TIMP-1	Oui n=10	-1.87	2.51	0.60
	Non n=41	-1.39	2.60	
GSH†	Oui n=10	14.93	7.36	0.99
	Non n=41	14.91	12.16	

Légende : VEMS: volume expiratoire maximum en 1 seconde ; § : détérioration du VEMS = (VEMS (litres) Visite 2 – VEMS (litres) Visite 1)/VEMS (litres) Visite 1)  $\geq$  12% ; † : valeur en  $\mu$ M; ‡ : niveaux des marqueurs transformés en logarithme avant les analyses statistiques.

Note : les résultats avec MPO doivent être interprétés avec précaution car 60% des niveaux sont non détectés et une valeur de 0.05 ng/ml leur a été attribuée.

Les niveaux de MPO sont significativement plus faibles chez les sujets ayant démontré une détérioration du VEMS entre les visites 1 et 2 comparativement aux autres.

## 4. CONCLUSION

Notre étude nous permet de conclure que:

Chez l'humain, dans une population de travailleurs ayant des accidents inhalatoires majoritairement légers par exposition à des puffs de chlore:

1. il n'existe pas d'atteinte de la fonction respiratoire à long terme
2. les changements fonctionnels des travailleurs sont reliés à l'inflammation bronchique de type neutrophilique, à l'altération des niveaux d'activité de glutathion au moment de l'embauche, ce qui suggère l'implication d'un stress oxydatif

Les prochaines études pourraient se concentrer :

Chez l'humain, sur la surveillance de l'état d'inflammation et de remodelage bronchiques au moment de l'embauche comme facteur pronostique aux changements fonctionnels; nous pourrions également concevoir des essais cliniques d'agents anti-oxydants administrés tôt après les accidents inhalatoires pour évaluer leur efficacité de concert avec les stéroïdes oraux et inhalés;



## 5. RÉFÉRENCES

1. Leroyer C, Malo JL, Infante-Rivard C, Dufour JG, Gautrin D. Changes in airway function and bronchial responsiveness after acute occupational exposure to chlorine leading to treatment in a first-aid unit. *Occup Med* 1998;55:356-359.
2. Gautrin D, Leroyer C, Infante-Rivard C, Ghezze H, Dufour JG, Girard D, Malo JL. Longitudinal assessment of airway caliber and responsiveness in workers exposed to chlorine. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1232-1237.
3. Girard F, Chaboillez S, Cartier A, Côté J, Hargreave FE, Labrecque M, Malo JL, Tarlo S, Lemièrre C. An effective strategy for diagnosing occupational asthma. Induced sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:845-850.
4. Gautrin D, Leroyer C, L'Archevêque J, Dufour JG, Girard D, Malo JL. Cross-sectional assessment of workers with repeated exposure to chlorine over a three year period. *Eur Respir J* 1995;8:2046-2054.
5. Gautrin D, Maghni K, Alles M, Lemièrre C, Martin JG, Malo JL. Determination of lung function changes, sputum neutrophilia and metalloproteinases (MPPs) activities in workers at risk of repeated accidental inhalations of chlorine. *Eur Respir J* 2002;20 (suppl.38):603s.
6. Burney PGJ, Luczynska C, Chinn S, Jarvis D. The European Community Respiratory Health Survey. *Eur Respir J* 1994;7:954-960.
7. Society American Thoracic. Standardization of spirometry. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1107-1136.
8. Sterk PJ, Fabbri LM, Quanjer PH, Cockcroft DW, O'Byrne PM, Anderson SD, Juniper EF, Malo JL. Airway responsiveness. Standardized challenge testing with pharmacological, physical and sensitizing stimuli in adults. Report working party standardization of lung function tests European Community for Steel and Coal. Official statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J* 1993;6, Suppl 16:53-83.
9. Troyanov S, Malo JL, Cartier A, Gautrin D. Frequency and determinants of exaggerated bronchoconstriction during shortened methacholine challenge tests in epidemiological and clinical set-ups. *Eur Respir J* 2000;16:9-14.
10. Pizzichini E, Pizzichini MMM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillace D, Gleich GJ, Dolovich J, Hargreave FE. 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.
11. Knudson RJ, Lebowitz MD, Holberg CJ, Burrows B. Changes in the normal maximal expiratory flow-volume curve with growth and aging. *Am Rev Respir Dis* 1983;127:725-34.

12. Cataldo DD, Gueders MM, Rocks N, Sounni NE, Evrard B, Bartsch P, Louis R, Noel A, Foidart JM. Pathogenic role of matrix metalloproteases and their inhibitors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease and therapeutic relevance of matrix metalloproteases inhibitors. *Cell Mol Biol* 2003;49:875-884.
13. Rahman I, Biswas SK, Kode A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur J Pharmacol* 2006;533:222-239.
14. Richman-Eisenstat JB, Jorens PG, Hebert CA, Ueki I, Nadel JA. Interleukin-8: an important chemoattractant in sputum of patients with chronic inflammatory airway diseases. *Am J Physiol* 1993;264:L413-418.
15. Holzer W, Petersen F, Strittmatter W, Matzku S, Heogen I von. A fusion protein of IL-8 and a Fab antibody fragments binds to IL-8 receptors and induces neutrophil activation. *Cytokine* 1996;8:214-221.

## **ANNEXE 1**

### **Irritant induced asthma secondary to acute airway injury by inhaled chlorine modelled in the mouse**

**James G. Martin,  
Stephanie Tuck,  
Toby McGovern,  
Holly Campbell,  
Hossein Koohsari,  
Hiroaki Iijima,  
William S. Powell,  
Meiyo Tamaoka,  
Karuthapillai Govindaraju,  
David H. Eidelman,  
Karim Maghni,  
Denyse Gautrin,  
Jean-Luc Malo.**

**Meakins Christie Laboratories,  
McGill University and Axe de recherché en santé respiratoire,  
Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, Montréal, Québec, Canada.**



Irritant induced asthma has been relatively little studied as to its mechanisms. A view of pathology held by the renowned French physiologist Claude Bernard is that disease is an extension of physiology. Although the distinction between health and disease is easier to make for certain pathologies such as infectious diseases and the consequences of genetic mutations, for example, such distinctions are not so easily made for complex diseases. It has indeed been argued that nothing is created in pathology that was not present to a greater or lesser extent in physiology. Such thinking has led to the examination of disease mechanisms through experimental models and these experimental approaches have enjoyed much popularity and have advanced our understanding of both physiology and pathology at the same time. Part of the lack of understanding of the pathophysiology of irritant induced asthma stems from the lack of animal models and partly from the focus of attention of the research community on asthma induced and triggered by high molecular weight sensitizing agents.

Features of irritant induced asthma may be triggered experimentally by chlorine exposure of the rat(1;2). For example, airway hyperresponsiveness to methacholine, a frequently used laboratory surrogate for asthma, is present and may persist for prolonged periods in some select animals after a high level of exposure. The rat is a popular species used for toxicological studies but the possibilities for the exploration of mechanisms of 'disease' is limited in this animal compared to the mouse. Although our group has previously described a suitable rodent model of Cl<sub>2</sub> induced airway disease(1) there are distinct advantages to a murine model. Not the least of the advantages is the fact that the dissection of mechanisms is rendered much easier by the availability of a panoply of reagents and also of genetically altered animals. The first objective of our studies was to establish a murine model of irritant induced asthma(3). Using a well-characterized delivery system we exposed mice to varying concentrations of Cl<sub>2</sub> ranging from 100 to 800 ppm. By 24 hours after the exposure to Cl<sub>2</sub> there were substantial changes in airway structure and function. Epithelial denudation occurs rapidly and is associated with changes in airway responsiveness to methacholine. We reasoned that the mechanism of the changes was likely attributable to the oxidant actions of Cl<sub>2</sub> since this gas is highly reactive. We evaluated oxidative stress in several ways and as anticipated there was striking evidence of oxidative stress following Cl<sub>2</sub> exposure. We assessed nitric oxide production through the analysis of bronchoalveolar lavage fluid for nitrite/nitrate and the findings were consistent with an increase in nitric oxide production. This phenomenon was further reflected in the finding of nitrosylated tissue proteins through immunoreactivity for the highly reactive species peroxynitrite. There was evidence of oxidation of proteins through carbonylation of certain amino acid residues detectable by western analysis (Oxyblot®). These results demonstrated that a murine model of irritant induced asthma could be produced by a single acute exposure to high concentrations of chlorine and that many of the functional changes were likely to be mediated by oxidative stress. The findings are also consistent with the previously published notion that Cl<sub>2</sub> is more toxic than hydrochloric acid.

Susceptibility to injury is an issue that will merit future investigations and the diverse factors that determine the host response will require to be understood. In order to be able to assess the time course of injury and repair we examined the changes in airway responsiveness and tissue injury and repair for a period up to 10 days after an exposure to Cl<sub>2</sub> at 800 ppm for five minutes of exposure. The regeneration of the epithelium was followed using immunoreactivity for proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Changes in airway smooth

muscle mass were also evaluated because of the importance of muscle remodeling for changes in airway responsiveness. Current understanding of airway hyperresponsiveness is that it is potentially explicable on the basis of increases in airway smooth muscle mass that occur with repeated cycles of airway injury and repair. Immediately following the inhaled injury there was evidence of profound epithelial desquamation. There was a lag period of more than 24 hrs prior to the finding of epithelial regeneration through proliferation. Initial covering of the denuded areas appears to result from spreading of epithelial cells that is apparent from the presence of a flat epithelial layer of cells. Shortly thereafter there is a period of an intense proliferative response of the epithelium that leads to its apparently full regeneration by 5 days.

Somewhat surprisingly there was an evident trend for a reduction in airway smooth muscle mass acutely after Cl<sub>2</sub>, followed by a proliferation of the muscle and its restoration to normal mass. The changes in airway responsiveness were less striking in this study, potentially because of extension of injury below the epithelial cell layer to the underlying smooth muscle. The proliferation of the subepithelial layer of smooth muscle is also evidence of a more profound damage to the airway wall. The presence of proliferating smooth muscle in the airway wall is likely to be associated with a reduction in its contractile properties, given the usually inverse relationship between the contractile and proliferative smooth muscle phenotype.

We were concerned about the role of possible host factors in modifying the response to Cl<sub>2</sub> induced airway injury. We chose to examine one of the T cell subsets, the so-called gamma-delta T cells that express the  $\gamma\delta$  T cell receptor, for which the natural ligand(s) have not been clearly identified. (4). This cell has important roles in protecting the host against invasive infection with intracellular organisms such as *Listeria*(5). The  $\gamma\delta$  T cell is associated with the epithelium and has trophic functions for the epithelium, facilitating its regeneration and maintaining the integrity of the barrier function(6). In order to investigate the role of  $\gamma\delta$  T cells in either providing protection from or facilitating regeneration of epithelium after Cl<sub>2</sub> induced injury we evaluated the effects of a single exposure to Cl<sub>2</sub> on the disruption of the epithelium and the changes in airway responsiveness. The T cells bearing the  $\gamma\delta$  T cell receptor were deficient in the gene-deleted mice, permitting the exploration of their role in Cl<sub>2</sub> induced airway injury. The injury as reflected in epithelial detachment was greater in the  $\gamma\delta$  deficient mice. The regeneration of the epithelium was delayed and the inflammatory response was blunted. Interestingly the changes in airway responsiveness induced by Cl<sub>2</sub> were not present in the  $\gamma\delta$  T cell deficient mice, suggesting that AHR may be an inevitable consequent of the recovery of airway epithelium and the associated airway inflammation following such an injury. The secretion of keratinocyte growth factor (KGF) by  $\gamma\delta$  T cells has been implicated in the intestine as the factor responsible for the effects of these cells in maintaining intestinal epithelial integrity, in particular in the prevention or limiting of damage caused in chemical colitis models(7). In our study KGF mRNA was not significantly different between the wild type and  $\gamma\delta$  T cell deficient mice, arguing that the effects of the epithelial  $\gamma\delta$  cells may be mediated by different mechanisms in the two sites. These results are consistent with the relative paucity of  $\gamma\delta$  cells in the airways compared to the bronchial tree(8).

Although the demonstration of oxidative stress following chlorine exposure was unequivocal the causal link to changes in airway responsiveness or inflammation required testing. In order

to test the possibility that an anti-oxidant might provide a measure of protection against the functional changes in this model we employed a potent hydroxyl radical scavenger, dimethylthiourea. This drug has been used in previous studies and has been shown to be an effective radical scavenger(9;10). Animals were exposed to 100ppm Cl<sub>2</sub> for 5 minutes so as to study the effects of anti-oxidant treatment on a submaximal injury. This level of exposure did not result in evidence of protein carbonylation in the bronchoalveolar lavage fluid nor was nitric oxide production increased. However, glutathione, in reduced form, was substantially affected by Cl<sub>2</sub>, showing an unexpected increase in level both intracellularly and extracellularly immediately after exposure. DMTU prevented these changes confirming a reversal of the redox changes caused by Cl<sub>2</sub>. In addition when the drug was administered immediately before Cl<sub>2</sub> exposure it provided substantial protection against all aspects of the airway damage. Inflammation was attenuated, the number of epithelial cells shed was reduced and airway responsiveness to methacholine was normalized. However, even the administration of dimethylthiourea one hour after the exposure to Cl<sub>2</sub> had a protective effect, although less than when administered before exposure, suggesting that secondary processes triggered by an initial oxidative injury caused by chlorine resulted in additional oxidative damage. These results suggest that rapid intervention with antioxidant treatment may have a place in the treatment of acutely exposed workers.

### Reference list

1. Demnati,R., Fraser,R., Ghezzi,H., Martin,J.G., Plaa,G., and Malo,J.L. 1998. Time-course of functional and pathological changes after a single high acute inhalation of chlorine in rats. *Eur. Respir. J.* 11:922-928.
2. Demnati,R., Fraser,R., Martin,J.G., Plaa,G., and Malo,J.L. 1998. Effects of dexamethasone on functional and pathological changes in rat bronchi caused by high acute exposure to chlorine. *Toxicological Sciences* 45:242-246.
3. Martin,J.G., Campbell,H.R., Iijima,H., Gautrin,D., Malo,J.L., Eidelman,D.H., Hamid,Q., and Maghni,K. 2003. Chlorine-induced injury to the airways in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168:568-574.
4. Koohsari,H., Tamaoka,M., Campbell,H.R., and Martin,J.G. 2007. The role of gamma delta T cells in airway epithelial injury and bronchial responsiveness after chlorine gas exposure in mice. *Respir. Res.* 8:21.
5. Born,W., Cady,C., Jones-Carson,J., Mukasa,A., Lahn,M., and O'Brien,R. 1999. Immunoregulatory functions of gamma delta T cells. *Adv. Immunol.* 71:77-144.
6. Chen,Y.P., Chou,K., Fuchs,E., Havran,W.L., and Boismenu,R. 2002. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:14338-14343.
7. Boismenu,R., and Havran,W.L. 1998. Gammadelta T cells in host defense and epithelial cell biology. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 86:121-133.

8. Wands,J.M., Roark,C.L., Aydintug,M.K., Jin,N.Y., Hahn,Y.S., Cook,L., Yin,X., Dal Porto,J., Lahn,M., Hyde,D.M. et al 2005. Distribution and leukocyte contacts of gamma delta T cells in the lung. *J. Leukoc. Biol.* 78:1086-1096.
9. Nam,H.Y., Choi,B.H., Lee,J.Y., Lee,S.G., Kim,Y.H., Lee,K.H., Yoon,H.K., Song,J.S., Kim,H.J., and Lim,Y. 2004. The role of nitric oxide in the particulate matter (PM<sub>2.5</sub>)-induced NFkappaB activation in lung epithelial cells. *Toxicol. Lett.* 148:95-102.
10. Lai,Y.L., Wu,H.D., and Chen,C.F. 1998. Antioxidants attenuate chronic hypoxic pulmonary hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 32:714-720.