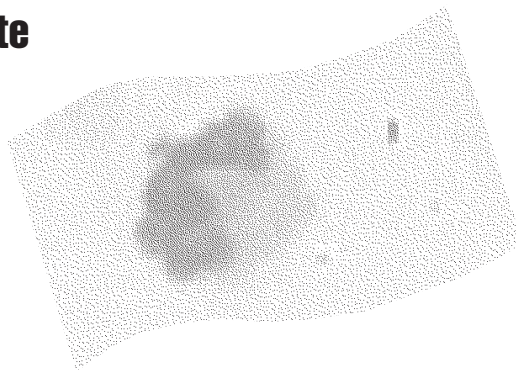


**Analyse de l'expectoration induite
dans la silicose et l'amiantose :
corrélation avec la fonction
pulmonaire**



**ÉTUDES ET
RECHERCHES**

Louis-Philippe Boulet
Philippe Prince
Marc Desmeules

R-450

RAPPORT





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 *travaillent pour vous !*

MISSION

- ▶ 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

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

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
www.irsst.qc.ca
Institut de recherche Robert-Sauvé
en santé et en sécurité du travail,
février 2006

Analyse de l'expectoration induite dans la silicose et l'amiantose : corrélation avec la fonction pulmonaire

Louis-Philippe Boulet, Philippe Prince et Marc Desmeules,
Centre de recherche, Hôpital Laval

avec l'assistance de :
Michel Laviolette, Marie-Ève Boulay, Mylène Bertrand et Nathalie Pagé
Centre de recherche, Hôpital Laval

ÉTUDES ET
RECHERCHES

RAPPORT

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.

Cliquez recherche
www.irsst.qc.ca



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

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

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.**

Rapport Final

Analyse de l'expectoration induite dans la silicose et l'amiantose : corrélation avec la fonction pulmonaire

Sommaire

Problématique de santé et sécurité du travail

L'amiantose et la silicose sont les pneumoconioses les plus fréquentes au Québec et sont souvent associées à une détérioration progressive de la fonction pulmonaire. Cependant, il est difficile de prédire qui, parmi les travailleurs, développera ces conditions ou, s'ils en sont atteints, quelle sera leur évolution clinique.

Objectifs

- 1) Évaluer le rôle de l'expectoration induite (EI), une technique non-invasive d'analyse des sécrétions bronchiques, en comparaison avec le lavage bronchoalvéolaire (LBA) dans l'évaluation de la sévérité de pneumoconioses.
- 2) Vérifier si certains marqueurs des processus inflammatoires ou de remodelage peuvent être mesurés dans l'EI et s'ils sont prédictifs de l'évolution de la fonction pulmonaire chez ces sujets.

Méthodes

Quinze travailleurs avec diagnostic d'amiantose, 17 avec silicose et 15 sujets normaux (témoins) ont été évalués. Leurs tests de fonction pulmonaire des dix dernières années ont été analysés. Tous les sujets se sont présentés pour de nouveaux tests de fonction respiratoire et une analyse de l'EI, en plus d'un LBA chez 8 sujets dans lesquels les cellules et certaines substances favorisant le développement de fibrose pulmonaire ont été analysées.

Résultats

Nos résultats suggèrent que l'analyse de l'EI peut être utile dans l'évaluation des processus inflammatoires et fibrogéniques présents dans la silicose et l'amiantose. Les quantités de certains médiateurs de l'EI tels la fibronectine, l'IL1- β et le ratio MMP-9/TIMP-1 présentent une corrélation significative avec la gravité de la maladie et le déclin de la fonction pulmonaire.

Retombées prévisibles

Cette étude nous procure des informations précieuses sur la contribution de l'analyse de l'EI, méthode simple et facilement répétable, dans l'évaluation de la sévérité des pneumoconioses et de la détérioration de la fonction pulmonaire. Le dosage des médiateurs et cytokines mentionnées ci-dessus pourrait aider à prédire l'évolution clinique de ces travailleurs. De plus, nos essais ont contribué à déterminer la méthode optimale de mesure de ces substances. Nos observations pourraient être vérifiées chez un nombre plus élevé de travailleurs mais en plus, il serait très intéressant d'évaluer ceux qui sont exposés à ces substances mais qui n'ont pas encore développé de maladie; ceci nous permettrait possiblement d'identifier les sujets plus à risque de développer une pneumoconiose et ainsi, d'anticiper le développement de la maladie.

Table des matières

Sommaire	p. i
Table des matières	p. ii
Introduction	p. 1
Problématique des pneumoconioses	p. 1
L'amiantose	p. 2
La silicose	p. 3
Prévalence et physiopathologie de l'amiantose et de la silicose	p. 3
Méthodes non-invasives (EI et LBA)	p. 4
Mécanismes ciblés par la présente étude	p. 5
Propriétés des médiateurs	p. 6
Hypothèses	p. 7
Objectifs généraux	p. 7
Objectifs spécifiques	p. 8
Méthodes de recherche	p. 8
Sujets	p. 8
<i>Critères d'inclusion</i>	p. 8
<i>Critères d'exclusion</i>	p. 8
Déroulement de l'étude	p. 9
Histoire médicale	p. 9
Fonction respiratoire	p. 9
Expectoration induite	p. 9
Lavage bronchoalvéolaire	p. 10
Analyses des médiateurs	p. 10
Analyses des changements de la fonction pulmonaire	p. 11
Analyses statistiques	p. 12
Résultats	p. 13
Caractéristiques des sujets	p. 13
Tests de fonction pulmonaire	p. 13
Expectorations induites :	p. 15
1) Médiateurs et cytokines dans l'EI	p. 16
2) Corrélations	p. 17
3) Comparaisons entre l'EI et le LBA	p. 20
Discussion	p. 21
Conclusion	p. 24
Applicabilité des résultats	p. 24
Retombées éventuelles et perspectives futures	p. 25
Liste des résumés de communication et articles produits dans le cadre de la présente subvention	p. 25
Références	p. 26

Introduction

Problématique des pneumoconioses

Les pneumoconioses sont définies comme des maladies du poumon causées par l'inhalation de particules minérales. Parmi les maladies professionnelles respiratoires, les pneumoconioses de type amiantose et silicose sont encore parmi les plus fréquemment rencontrées au Québec et sont habituellement causées par l'inhalation prolongée, sur plusieurs années, de particules d'amiante ou de silice. Même si des mesures d'assainissement des milieux de travail ont été établies au cours des dernières années, il existe néanmoins plusieurs travailleurs qui ont eu des expositions importantes dans le passé et certains sont encore exposés à de fortes concentrations de particules minérales, particulièrement pour ce qui est de la silice dans des travaux tels le nettoyage au jet de sable. Ces problèmes de santé constituent une source importante d'absentéisme au travail, d'invalidité et même de mortalité, et représentent un fardeau socioéconomique important. Pour la seule année 2000, 45 cas d'amiantose et 13 cas de silicose ont été rapportés à la CSST pour un coût total de 1 796 062\$. De 1993 à 2000, il en a coûté 32 726 165\$ pour 604 cas d'amiantose ou silicose, représentant 62 561 jours de travail manqués. Seize travailleurs sont décédés d'amiantose en 2000 et un total de 220 décès reliés à l'amiantose et la silicose ont été enregistrés à la CSST entre 1993 et 2000 (source : C.S.S.T., direction de la statistique et de la gestion de l'information).

Lorsque ces types de maladies se développent, elles peuvent progresser, même après retrait de l'exposition aux substances minérales, et être associées à une réduction importante et progressive de la fonction pulmonaire chez certains travailleurs. Nous pouvons émettre l'hypothèse que cette réduction est due à la persistance d'une grande quantité de particules minérales dans le poumon, avec inflammation secondaire et activation continue du processus de fibrose. Il n'existe, à ce jour, aucun traitement permettant de réduire la progression de cette perte de fonction pulmonaire chez les patients atteints. Cependant, de nouvelles molécules (anti-cytokines) sont à l'essai dans le traitement de la fibrose pulmonaire idiopathique et pourraient être prometteuses entre autres dans la silicose et l'amiantose.

La durée et l'intensité de l'exposition aux particules minérales sont considérées comme les principaux facteurs de risque de ces maladies. Généralement, plusieurs années d'exposition sont nécessaires avant l'apparition des premiers symptômes. Par conséquent, ces maladies se développent silencieusement et causent graduellement une fibrose pulmonaire irréversible pour laquelle il n'existe pas de traitement curatif. Il n'existe malheureusement aucun marqueur biologique nous permettant de confirmer de façon précoce le diagnostic de silicose ou d'amiantose ni de prédire l'évolution de ces maladies. La découverte d'un médiateur impliqué dans le développement précoce ou dans l'évolution rapide de ces maladies nous permettrait d'intervenir plus rapidement auprès des travailleurs afin de limiter, et possiblement prévenir, la progression de ces maladies. Les travailleurs qui sont exposés aux particules minérales pourraient être évalués régulièrement pour déterminer leur susceptibilité à développer ce type de maladie.

Quoique les biopsies pulmonaires, bronchiques, ou encore le lavage bronchoalvéolaire (LBA) aient grandement aidé à mieux comprendre la physiopathologie des maladies respiratoires, elles

se heurtent au fait d'être invasives et difficilement répétables. Des méthodes d'évaluation non-invasives des maladies pulmonaires ont été récemment développées. Parmi celles-ci, une des plus prometteuses et des mieux standardisées au point de vue technique est l'analyse de l'expectoration induite (EI). Cette technique est maintenant couramment utilisée pour évaluer l'inflammation bronchique dans l'asthme^{1,2} et la bronchite chronique³, et des données récentes suggèrent que l'EI pourrait également servir dans l'évaluation des maladies interstitielles pulmonaires⁴⁻⁶.

Par la présente étude, nous désirions non seulement améliorer nos connaissances sur la physiopathologie de la silicose et de l'amiantose, mais également évaluer l'expression de plusieurs marqueurs potentiels d'évolution clinique de ces maladies. La détérioration de la fonction pulmonaire chez certains travailleurs est probablement due à une réaction fibrosante persistante. La mesure de certains médiateurs et cytokines impliqués dans cette fibrose pourrait nous permettre d'identifier les travailleurs les plus à risque de développer une maladie professionnelle, à la suite de l'exposition aux fibres, et ainsi, de mieux cibler les mesures préventives. Nous pourrions possiblement détecter des signes précoces d'installation d'une pneumoconiose avant même l'apparition des symptômes et en prévenir les complications. Quoiqu'il en soit, nous croyons qu'il est important de vérifier la contribution possible de mesures simples, facilement répétables et non-invasives, telle l'EI dans l'évaluation des maladies professionnelles causées par les particules minérales.

L'amiantose

L'amiantose est une pneumoconiose causée par l'inhalation de fibres d'amiante. Cette maladie est caractérisée par une fibrose pulmonaire progressive diffuse et souvent invalidante⁷. Même si les mesures d'hygiène industrielle ont amené une réduction importante de l'exposition à ce type de fibres, ce problème persiste encore chez les sujets qui ont été exposés dans le passé à de fortes concentrations de ces particules. En effet, les patients peuvent demeurer asymptomatiques pour plusieurs années après l'exposition initiale puis développer des symptômes insidieux d'essoufflement consécutifs à une détérioration progressive et persistante de la fonction pulmonaire.

La dyspnée est le principal symptôme clinique et on peut, à l'auscultation, noter des râles crépitants aux bases pulmonaires dans 32% à 64% des cas⁷. Les tests de fonction pulmonaire démontrent habituellement une réduction des volumes pulmonaires et de la diffusion du monoxyde de carbone (CO), ainsi qu'une réduction de la compliance pulmonaire sans obstruction bronchique associée. La radiographie pulmonaire révèle des opacités parenchymateuses bilatérales et parfois des lésions pleurales, témoins de l'exposition à l'amiante⁸. Le diagnostic repose sur une histoire d'exposition prolongée à l'amiante et la présence d'infiltrations pulmonaires suggestives à la radiographie pulmonaire ou sur la tomodensitométrie, d'un syndrome restrictif pulmonaire avec ou sans diminution de la diffusion du CO ou à l'identification de quantités suffisantes de fibres ou de corps d'amiante dans le liquide de LBA ou sur des spécimens biopsiques, en présence de fibrose pulmonaire. Il n'y a pas de traitement spécifique pour l'amiantose. Le retrait du travail permet de réduire l'exposition aux

fibres minérales et ainsi d'en limiter les conséquences. Une insuffisance respiratoire progressive peut se développer chez ces travailleurs.

Différentes thérapies anti-inflammatoires et immunosuppressives ont été tentées avec plus ou moins de succès mais la détérioration des fonctions respiratoires se poursuit souvent, quoi que l'on fasse, chez plus de 30% des travailleurs atteints. Certains facteurs ont été associés à une réduction rapide et progressive de la fonction pulmonaire due à l'exposition à l'amiante. Parmi ceux-ci, on retrouve la durée de l'exposition, le type de fibres (les amphiboles sont les plus dangereuses) et leur concentration, le tabagisme associé, l'épaississement pleural diffus, la présence de « honeycombing » à la tomodensitométrie et une forte concentration de cellules inflammatoires (neutrophiles, éosinophiles) de même que de fibronectine dans le liquide de LBA^{9;10}.

La silicose

La silicose est aussi une maladie pulmonaire caractérisée par une fibrose nodulaire hyaline, causée par l'inhalation prolongée de fortes concentrations de poussière de silice¹¹. Parmi les milieux à risque, on retrouve les mines ou les carrières de pierre, la fabrication d'abrasifs, le nettoyage au jet de sable, les fonderies, les fabriques de porcelaine, de céramique et de verre, etc. Les patients atteints de silicose peuvent initialement ne présenter aucun symptôme respiratoire mais, avec le temps, développer une dyspnée progressive, le tout associé à la présence d'infiltrations pulmonaires souvent d'aspect nodulaire, qui prédominent au sommet des poumons. Il peut s'ensuivre une fibrose pulmonaire avec ou sans conglomérats et une atteinte progressive de la fonction pulmonaire. Il semble exister une relation dose-effet pour ce qui est de ce type de problème tout comme pour l'amiantose. Aucun traitement spécifique n'existe et il est difficile de prédire l'évolution de la fonction pulmonaire. La silicose classique n'est souvent détectée à la radiographie que plus de 20 ans après le début de l'exposition, bien qu'après une exposition de 5 ans, des dépôts microscopiques apparaissent déjà. L'inflammation pulmonaire se poursuit même après l'arrêt de l'exposition, probablement due à la persistance des particules minérales dans le poumon. La silicose peut aussi être de forme accélérée, détectée après moins de 10 ans d'exposition. Elle progresse alors plus rapidement et la fibrose est plus importante. On la retrouve surtout chez les mineurs ou chez les travailleurs effectuant du nettoyage au jet de sable. Une forme aiguë progressant très rapidement et souvent fatale, la silico-protéinose, peut aussi survenir après seulement quelques semaines d'exposition.

Prévalence et physiopathologie de l'amiantose et de la silicose

L'amiantose et la silicose constituent les deux pneumoconioses les plus fréquentes au Québec et affectent une proportion significative de travailleurs des mines ou d'autres métiers qui les exposent à l'amiante ou à la silice^{12;13}. Malheureusement, lorsque le diagnostic est établi, la fonction pulmonaire continue habituellement à se dégrader chez une forte proportion de ces patients malgré l'arrêt de l'exposition¹⁴. Dans ces conditions, la perte de fonction pulmonaire est souvent associée à la production de facteurs fibrogéniques et au développement d'une fibrose secondaire du poumon, à la suite d'un processus inflammatoire et de remodelage. Parmi les

médiateurs et cytokines qui contribuent potentiellement à l'inflammation et la fibrogénèse pulmonaire et bronchique, on retrouve le facteur de croissance tumoral (TGF)- β , le facteur nécrosant des tumeurs (TNF)- α , le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), l'interféron (IFN)- γ , l'interleukine (IL)-1 β , l'IL-2, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12, la fibronectine, la métalloprotéinase (MMP)-9, l'inhibiteur des métalloprotéinases (TIMP)-1 et l'endothéline.

Méthodes non-invasives d'évaluation des phénomènes d'inflammation et de changements structuraux bronchiques et pulmonaires: Analyse de l'EI vs LBA.

L'évaluation des maladies telles les pneumoconioses, tant au point de vue du diagnostic que pour étudier leur physiopathologie ou tenter de prédire leur évolution clinique, se heurte au fait qu'on a besoin de tissus ou de faire un LBA pour évaluer l'atteinte du poumon ou mesurer des marqueurs potentiels d'évolution clinique. Des études ont ainsi été effectuées pour mieux documenter les caractéristiques de la réaction inflammatoire des patients atteints de pneumoconioses. Plusieurs de ces études impliquent l'utilisation du LBA, une méthode invasive consistant à insérer un bronchoscope dans les bronches du sujet, d'instiller et d'aspirer une solution saline et d'analyser le fluide recueilli.

Monso et coll.¹⁵ ont démontré par microscopie électronique que des particules de silice peuvent être détectées dans le LBA, sans permettre cependant de discriminer les sujets avec silicose de ceux n'étant pas atteints. Teschler et coll.⁵ ont, de leur côté, quantifié des fibres d'amiante dans le LBA par microscopie optique et démontré une corrélation avec la durée d'exposition. Fireman et coll.⁴ ont aussi réussi à quantifier et qualifier (grosseur) les fibres d'amiante dans le LBA.

D'autres études se sont intéressées au dosage des cytokines dans le LBA des sujets atteints de pneumoconioses. Ainsi, Vanhee et coll.¹⁶ ont remarqué, chez les mineurs atteints de silicose et de pneumoconiose du charbon, la présence accrue de cytokines impliquées dans le processus inflammatoire pulmonaire tels l'IL-6, le TNF- α , la fibronectine et le facteur chémoattractant des neutrophiles, l'IL-8. Le même résultat a été obtenu par Vallyathan et coll.¹⁷ qui ont observé une augmentation des niveaux d'IL-1, IL-6, TGF- β , α_1 -antitrypsine, TNF- α et de fibronectine chez les mineurs du charbon atteints de pneumoconiose.

Des méthodes non-invasives d'évaluation de l'inflammation bronchique ont été récemment développées et « standardisées », particulièrement l'analyse de l'expectoration induite (EI) et la mesure de l'oxyde nitrique (NO) expiré. De plus, dans une étude récente, Fireman et coll.⁴ ont démontré que les fibres d'amiante pouvaient être retrouvées dans le liquide de LBA mais également, quoique moins fréquemment, au niveau de l'EI chez les patients exposés à l'amiante.

Teschler et coll.⁵ ont également comparé la concentration de fibres minérales dans le LBA et dans l'EI chez des sujets ayant été exposés à des niveaux variables d'amiante. Ils ont eux aussi observé que les fibres d'amiante étaient détectées tant dans le LBA que dans l'EI mais moins souvent dans cette dernière. Le nombre de fibres dans l'EI présentait cependant une corrélation positive avec la durée de l'exposition à l'amiante et leur présence indiquait une atteinte plus sévère du sujet.

D'autre part, Fireman et coll. ont démontré la présence d'ARNm pour l'IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , TGF- β , IL-6, IL-2 et IL-4 dans les spécimens d'EI chez des sujets exposés à des substances minérales telles l'amiante et la silice⁴. Il n'y avait pas de différence dans les profils d'ARNm entre le LBA et les échantillons d'EI. Malheureusement, cette étude ne comptait que 2 sujets par groupe, ce qui ne permet pas de tirer des conclusions valables. De plus, aucune mesure de ces facteurs, ni de particules n'ont été faites chez un groupe témoin (sujets normaux) en comparaison avec les sujets atteints.

L'utilité de l'EI a été démontrée pour l'évaluation de différentes conditions telles l'asthme et la bronchite chronique¹⁻³ mais son rôle reste encore à déterminer pour les pneumoconioses. Nous croyons qu'il est important de vérifier l'utilité de l'EI dans l'évaluation des pneumoconioses et d'identifier certains médiateurs d'évolution de ces maladies pour les utiliser à des fins diagnostiques. Nous pourrions ainsi évaluer et prédire la susceptibilité des travailleurs exposés à développer des problèmes respiratoires. Il ne s'agit pas nécessairement d'identifier un seul facteur pronostique mais bien un ensemble de marqueurs susceptibles de servir d'indicatif au pronostic clinique. L'analyse de l'EI pourrait nous indiquer l'intensité du phénomène de fibrose en présence et ainsi, possiblement, suggérer quelle sera l'évolution clinique. Au niveau cellulaire, il a été démontré que le pourcentage de macrophages recueillis par LBA est plus élevé que dans l'EI autant chez les travailleurs de l'amiante que de la silice⁴. Par le fait même, le pourcentage de neutrophiles est plus faible dans le LBA que dans l'EI. Aucun autre changement n'a été détecté pour les lymphocytes, les éosinophiles et les cellules métachromatiques. Ces différences, aussi observées chez les patients normaux et asthmatiques, sont normales compte tenu qu'un échantillon d'EI provient plutôt des voies aériennes supérieures de fort calibre, alors qu'un LBA fournit un échantillon provenant de l'espace alvéolaire distal¹⁸. Cependant, il a été démontré que les deux méthodes sont comparables dans l'évaluation des marqueurs inflammatoires et peuvent être utilisées au même titre dans l'asthme¹⁹.

Les données disponibles suggèrent également que, dans les pneumoconioses, il existe suffisamment d'anomalies caractéristiques au niveau des voies aériennes de moyen ou fort calibre pour rendre attrayantes des méthodes telle l'analyse de l'EI.

Mécanismes de développement des pneumoconioses ciblées par la présente étude

Notre compréhension de la physiopathologie des maladies respiratoires, dont certaines résultent de l'apparition d'une fibrose bronchique ou pulmonaire avec ou sans inflammation associée, a progressé dans les deux dernières décennies. Plusieurs cytokines participent au dommage et à l'inflammation tissulaire alors que d'autres sont impliquées dans la réparation tissulaire et la fibrose. Nous avons donc choisi, pour cette étude, des cytokines provenant de ces 2 catégories afin de mieux caractériser les processus impliqués dans l'amiantose et la silicose. Nous avons dosé l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12, la néoptérine et le TNF- α pour le premier groupe et le TGF- β , le facteur de croissance de base des fibroblastes (bFGF), MMP-9/TIMP-1, fibronectine et le PDGF pour le deuxième.

Propriétés des médiateurs et cytokines évaluées: rôle possible dans l'amiantose et la silicose

L'IL-1 β et le TNF- α sont des cytokines produites par les macrophages activés lors du processus d'inflammation. L'augmentation de ces deux cytokines dans le poumon a été associée à l'exposition à la silice et à l'amiante^{20;21}. L'IL-1 β a été associée à la déposition de collagène dans l'amiantose²¹ ainsi qu'à l'activation du PDGF, un facteur fibrosant. Il a aussi été démontré que le TNF- α est requis pour le développement de la fibrose pulmonaire induite par les particules de silice²².

L'IL-6 est une cytokine produite principalement par les fibroblastes, dans le poumon et les bronches. Dans la silicose, le TNF- α et le TGF- β agiraient sur les fibroblastes pour stimuler la production de l'IL-6²³. Il a aussi été rapporté que l'IL-6 est produite en plus grande quantité, *in vivo*, dans les macrophages alvéolaires des sujets exposés depuis longtemps à l'amiante que ceux des sujets non-exposés, ou exposés depuis moins longtemps²⁴.

La présence de fibres d'amiante stimule la production d'IL-8 par les cellules épithéliales bronchiques, contribuant ainsi à l'inflammation en augmentant le recrutement des neutrophiles²⁵. Broser et coll. ont aussi démontré que les macrophages alvéolaires produisent plus d'IL-8 en présence de fibres d'amiante²⁶.

Selon l'étude publiée par Davis et coll., le nombre de transcrits d'ARN messagers (ARNm) de l'IL-12 est augmenté dans les tissus silicotiques²⁷. Cette cytokine serait, elle aussi, produite par les macrophages lors de la réponse inflammatoire.

La néoptérine est un marqueur inflammatoire produit à la suite de l'activation des lymphocytes T. Elle permet d'étudier l'interaction entre les lymphocytes T et les macrophages. La néoptérine augmente de façon précoce dès qu'il y a une activation du système immunitaire. Dans la silicose, il a été démontré qu'elle était augmentée au niveau urinaire et sanguin, suite à une exposition aux particules de silice²⁸.

Le TGF- β et le PDGF sont bien connus comme des facteurs impliqués dans le développement de la fibrose, l'une des manifestations principales de l'amiantose et de la silicose. Le TGF- β stimule la production de collagène et de fibronectine par les fibroblastes et inhibe la dégradation de la matrice extracellulaire, en diminuant la sécrétion de protéases et en augmentant la sécrétion d'inhibiteurs de protéases^{29;30}. Il joue également un rôle dans la formation des nodules silicotiques³¹. Le PDGF est aussi impliqué dans la formation des lésions des nodules observés dans la silicose. Ces deux cytokines sont des médiateurs importants de modulation de la croissance des fibroblastes. Des études ont démontré qu'ils étaient tous deux augmentés dans le sérum et le LBA de patients atteints de silicose et d'amiantose^{32;33}.

La fibronectine est présente dans les lésions de silicose et d'amiantose³⁴. On a observé une augmentation de la fibronectine dans le LBA de sujets atteints de silicose ou d'amiantose par rapport à des sujets normaux³⁵. Elle possède une fonction fibrogénique et pourrait s'avérer particulièrement utile dans la détection précoce de l'amiantose.

Enfin, La MMP-9 est responsable, en partie, de la dégradation de la matrice extracellulaire. Son inhibiteur tissulaire, TIMP-1, empêche cette dégradation. Ces deux protéines sont sans cesse régulées par l'organisme et leur ratio changent selon le besoin. Un déséquilibre du ratio MMP-9/TIMP-1 a été rapporté dans la silicose^{36;37} et autres processus fibrogéniques et inflammatoires, et contribuerait à la fibrose.

Hypothèses et objectifs de recherche

Hypothèses:

1) Chez les travailleurs atteints d'amiantose et de silicose, il existe une corrélation positive entre l'état clinique et fonctionnel de même que le déclin de la fonction pulmonaire, et l'importance de la réaction inflammatoire bronchique et du processus de fibrogénèse induit par les fibres minérales. Ceci est reflété par une corrélation significative entre les paramètres cliniques ou physiologiques et les marqueurs inflammatoires et de remodelage dans le liquide d'EI et de BAL.

2) On observe une corrélation significative entre les changements retrouvés dans l'EI et le LBA pour le profil cellulaire et la quantité de médiateurs inflammatoires et de remodelage.

Objectifs généraux :

Évaluer la contribution de l'analyse de l'expectoration induite (EI) dans l'étude de la physiopathologie et la prédiction des changements de la fonction pulmonaire dans l'amiantose et la silicose :

1) Fournir des données utiles qui permettent de mieux documenter les mécanismes d'action des particules minérales sur le système respiratoire de travailleurs atteints d'amiantose et de silicose;

2) Identifier certains marqueurs biologiques susceptibles d'aider à prédire l'évolution de la fonction pulmonaire après le retrait de l'exposition aux fibres minérales;

3) Comparer une méthode non-invasive et facilement répétable d'évaluation des liquides bronchiques avec la technique du LBA dans l'évaluation des éléments précédents;

4) Aider à mieux cibler les mesures préventives de ces maladies par l'identification des travailleurs les plus à risque de les développer.

Objectifs spécifiques :

Chez des patients atteints de silicose ou d'amiantose à divers degrés:

- 1) Comparer entre les échantillons d'expectoration induite et de liquide de LBA, les divers types de cellules présentes et mesurer diverses substances impliquées dans l'inflammation, la fibrose et le remodelage tissulaire, principalement le TGF- β , le TNF- α , le PDGF, le bFGF, la néoptérine, l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12, la fibronectine, MMP-9 et TIMP-1.
- 2) Déterminer s'il existe une corrélation entre la présence et la quantité actuelle des diverses substances mentionnées ci-dessus et la diminution de la fonction pulmonaire, au cours des 10 dernières années.

Méthodes de recherche

Sujets

Nous évaluons régulièrement des travailleurs atteints d'amiantose et de silicose, à l'Hôpital Laval, en prévision de leur rencontre avec le comité des maladies respiratoires professionnelles. La Commission de la Sécurité et de la Santé au Travail (CSST) nous a autorisés à demander à ces patients s'ils acceptaient l'évaluation complémentaire suggérée et si nous pouvions avoir accès à leur dossier, principalement pour les tests de fonction respiratoire antérieurs. Suite à l'étude de plus de 250 dossiers, quinze sujets consécutifs avec un diagnostic d'amiantose et 17 autres atteints de silicose ont accepté de prendre part à l'étude. Un groupe de sujets normaux sans histoire d'exposition à l'amiante ou à la silice (n=15) a aussi été recruté dans la population générale, comme groupe-témoin pour les mesures des divers marqueurs. Tous les sujets participant à l'étude ont lu et signé un formulaire de consentement éclairé et approuvé par le comité d'éthique de l'Hôpital Laval.

Critères d'inclusion

- 1) Hommes ou femmes avec un diagnostic d'amiantose ou silicose reconnu par la CSST (comparés à 15 témoins non-exposés)
- 2) Capables d'effectuer les tests proposés (dont production d'expectoration)
- 3) Acceptent de signer le formulaire de consentement

Critères d'exclusion

- 1) Autre maladie respiratoire que l'amiantose ou la silicose, pouvant interférer avec les tests
- 2) Infection respiratoire récente (moins d'un mois)
- 3) Médication susceptible de modifier la réaction inflammatoire ou l'immunité
- 4) État général inadéquat

Déroulement de l'étude

Nous avons consulté les dossiers des ex-travailleurs évalués pour la CSST dans notre institution afin de documenter les éléments pertinents de l'histoire médicale, les tests de fonction respiratoire et les examens radiologiques (voir ci-bas). Ceux-ci ont été vérifiés lors d'une visite au laboratoire, au cours de laquelle des tests de fonction respiratoire incluant la mesure des débits expiratoires, des volumes pulmonaires et la diffusion du monoxyde de carbone (DLCO) ont été effectués. Lors de cette visite, une radiographie pulmonaire (gradée selon la classification utilisée par la CSST) a été faite (sauf si une radiographie datant de moins de 6 mois était disponible). Un échantillon d'expectoration induite (EI) a aussi été prélevé pour établir le profil cellulaire et quantifier les différentes cytokines à l'étude. Pour les patients qui acceptaient un LBA et n'avaient aucune contre-indication à ce test, il fut fait après un intervalle d'au moins deux semaines.

Histoire médicale

Les données des dix (10) dernières années concernant l'histoire clinique, l'histoire professionnelle incluant la durée d'exposition aux particules minérales, la symptomatologie, les co-morbidités associées, la médication et le tabagisme, de même que les tests de fonction pulmonaire ont été colligées à partir du dossier de la CSST et si nécessaire, les dossiers hospitaliers des travailleurs, en plus du questionnaire administré lors de leur visite.

Fonction respiratoire

La spirométrie fut effectuée selon les méthodes habituelles répondant aux spécifications de l'American Thoracic Society (ATS)³⁸. Les valeurs prédites de volumes expiratoires furent obtenues de Knudson³⁹. Le volume expiratoire maximal en une seconde (VEMS) de base fut calculé comme étant la meilleure de trois valeurs reproductibles. La spirométrie fut obtenue avec un spiromètre approuvé par l'ATS. Les volumes pulmonaires (par pléthysmographie) et la diffusion du monoxyde de carbone (DLCO) furent déterminés selon les méthodes usuelles⁴⁰. Le déficit anatomopathologique (DAP) des sujets atteints de pneumoconioses était déterminé en fonction de la capacité vitale forcée (CVF) (en pourcentage), du VEMS ou de l'indice de Tiffeneau (rapport VEMS/CVF), de la diffusion du monoxyde de carbone et de certains facteurs aggravants⁴¹. La détérioration de la fonction pulmonaire au cours des dernières années fut déterminée en établissant le niveau annuel de réduction des VEMS, capacité vitale et capacité pulmonaire totale (voir section Analyse).

Expectoration induite

L'échantillon d'expectoration fut obtenu et analysé selon la méthode de Pin *et al.*², modifiée par Pizzichini *et al.*⁴², par inhalation d'une solution de salin hypertonique (3, 4, 5%) pendant 7 minutes chacune pour un total de 21 minutes. Suite à chaque inhalation, les sujets se rinçaient la bouche et se mouchaient, afin d'éviter toute contamination de cellules épithéliales pavimenteuses ou toutes sécrétions nasales respectivement, avant d'essayer d'expectorer. L'échantillon fut

recueilli dans un pot stérile et le volume expiratoire maximal en une seconde (VEMS) vérifié après chaque période d'inhalation. Si le VEMS diminuait de 20% ou plus de la valeur de base, la procédure était arrêtée et le patient recevait une dose de bronchodilatateur.

L'échantillon d'expectoration induite (EI) fut analysé dans les deux heures suivant l'induction. Brièvement, le mucus fut séparé de la salive à l'aide de pinces, pesé et mélangé avec quatre fois son volume de dithiothreitol (DTT) (Sputolysin; Calbiochem Corp., La Jolla, CA, USA) pendant 15 min. La réaction fut arrêtée par l'ajout d'un volume égal de tampon phosphate salin 1X (D-PBS) (Life Technologies (Gibco BRL), Burlington, ON, Canada). Après filtration, la suspension cellulaire fut centrifugée à 450 g pour une période de 5 min, le surnageant récolté et congelé à -70°C pour analyses ultérieures. La viabilité fut déterminée par la méthode d'exclusion au bleu de trypan. Les lames furent préparées par cyto centrifugation (Cytospin 3, Shandon Scientific Ltd., Astmoor, Runcorn, Cheshire, England) et colorées par Diff-Quik (Dade Diagnostics of P.R. Inc., Aguada, USA) pour une différentielle cellulaire pour laquelle 400 cellules furent comptées. Tous les comptes et analyses d'expectoration furent effectués sur des lames codées par un technicien ignorant les données cliniques ou le groupe d'étude des sujets.

Lavage bronchoalvéolaire (LBA)

Le lavage bronchoalvéolaire fut réalisé selon les lignes directrices courantes⁴³. Les sujets recevaient de l'oxygène à raison de 4 litres par minute par un cathéter nasal pendant toute la durée de la bronchoscopie. Les signes vitaux, l'oxymétrie et l'électrocardiogramme furent surveillés pendant la procédure. Suite à l'anesthésie de la gorge, du larynx et des bronches avec de la xylocaïne 2% et 4%, le bronchoscope flexible était introduit dans l'arbre bronchique et doucement coincé dans une bronche segmentaire ou sous-segmentaire. Trois aliquots de 50 mL de soluté salin isotonique à 37°C étaient instillés et aspirés avec une seringue et le fluide de lavage recueilli était gardé sur glace. Le fluide fut filtré à l'aide d'une gaze stérile et combiné dans un même tube. Le nombre de cellules totales fut déterminé avec un hémacytomètre et des lames préparées par cyto centrifugation pour différentielle cellulaire. Quatre cent cellules furent comptées sur les lames colorées par Diff-Quik. Les facteurs mentionnés précédemment furent dosés dans le fluide de lavage pour comparaison avec l'EI.

Analyses des médiateurs

Les cytokines présentes dans les échantillons d'EI et de LBA furent dosées par ELISA ou EIA selon les recommandations du manufacturier pour chacun des groupes. Nous avons mesuré par ELISA le TGF- β (Amersham Biosciences, Baie d'Urfée, Qc, Canada), sensibilité : 4 pg/mL), PDGF (R&D, Minneapolis, MN, USA, sensibilité : 15 pg/mL), IL-1 β (R&D, sensibilité : 1 pg/mL), IL-6 (R&D, sensibilité : 0,7 pg/mL), IL-8 (R&D, sensibilité : 3,5 pg/mL), IL-12 (R&D, sensibilité : 5 pg/mL), TNF- α (R&D, sensibilité : 0,391 pg/mL), bFGF (R&D, sensibilité : 3 pg/mL), MMP-9 (Amersham Biosciences, sensibilité : 0,6 ng/mL), TIMP-1 (Amersham Biosciences, sensibilité : 1,25 ng/mL), et endothéline-1 (R&D, sensibilité : 1 pg/mL). La fibronectine (Fisher Scientific (Takara co.), Nepean, ON, Canada) et la néoptérine (American prod. Wyndham, NH, USA) furent dosées par EIA. Nous avons aussi vérifié s'il y avait

corrélation entre les changements de la fonction pulmonaire survenus au cours des dernières années et le niveau actuel des différentes cytokines chez les sujets atteints d'amiantose ou de silicose, en comparaison avec les sujets témoins.

Suite à des problèmes rencontrés pour le dosage de certaines cytokines dans l'EI (voir discussion), la technique d'immunocytochimie (ICC) a été utilisée pour évaluer les cytokines suivantes : IL-1 β , TGF- β , TNF- α , IL-12 et IL-6. L'ICC consiste à détecter sur lame la cytokine d'intérêt à l'aide d'anticorps. Un premier anticorps reconnaît la cytokine et s'y fixe. Par la suite, un deuxième anticorps, couplé à la biotine, vient se fixer sur le premier anticorps. On ajoute par la suite, un complexe streptavidineAvidineBiotine, lié à la phosphatase alcaline (une enzyme), qui vient se lier à la biotine. L'action de cette enzyme sur le substrat (FastRed) ajouté au milieu fait apparaître une couleur rouge. Après contre-coloration à l'hématoxyline, il est facile de voir les cellules qui expriment la cytokine à l'étude car celles-ci sont de coloration rouge.

Pour résumer brièvement la procédure, après avoir bloqué le marquage non-spécifique avec une goutte de *Protein Block Serum Free* (DakoCytomation Inc, Mississauga, ON, Canada), l'anticorps primaire a été ajouté et incubé pour la nuit à 4°C dans une chambre humide. Le jour suivant, l'anticorps primaire a été lavé et l'anticorps secondaire a été ajouté. La détection a été faite par la méthode *ABCComplex/AP* (DakoCytomation Inc). Les lames ont été colorées à l'aide du *Fast-Red* (DakoCytomation Inc) et contre-colorées par l'hématoxyline de Mayer (DakoCytomation Inc).

Tous les anticorps ont été dilués avec du *Antibody Diluting Buffer* (DakoCytomation Inc).

Les contrôles ont été réalisés avec des anticorps isotypiques appropriés. Quatre cents cellules ont été comptées, lorsque possible, avec l'aide d'un microscope, afin de déterminer le pourcentage de cellules exprimant le marqueur de surface étudié.

Analyses des changements de la fonction pulmonaire

Nous avons vérifié s'il existait des corrélations entre les niveaux des cytokines étudiées et le niveau de base ainsi que le changement de la fonction pulmonaire (VEMS, CVF, capacité pulmonaire totale (CPT) et DLCO) dans le temps, ainsi que le déficit anatomopathologique (DAP). Nous avons aussi corrélé ces données avec les analyses cellulaires de l'EI. De plus, une comparaison a aussi été effectuée pour chaque variable entre chaque groupe.

Les changements de fonction pulmonaire ont été vérifiés de 3 façons différentes. Pour calculer le déclin annuel, la formule suivante fut utilisée :

$$\frac{\text{Test initial-final}}{\text{Nombre d'années}}$$

Le test initial représentait un test antérieur de fonction pulmonaire (le plus près possible de 5 ans lorsque disponible) alors que le test final représentait le test de fonction réalisé le jour de la visite du sujet au laboratoire. Le nombre d'années représente la différence dans le temps entre les deux tests. Nous obtenions donc le changement des fonctions par année.

Les changements en pourcentage ont été calculés comme suit :

$$\frac{\text{Test initial-final}}{\text{Test initial}} \times 100$$

Les changements annuels en pourcentage des tests de fonction ont été calculés selon l'équation suivante:

$$\left[\frac{\text{Test initial-final}}{\text{Test initial}} \times 100 \right] \div \text{Nombre d'années}$$

Pour ce qui est de la mesure du Déficit Anatomico-Physiologique (DAP) accordé par la CSST aux patients atteints de pneumoconioses, celui-ci est dépendant d'un barème pré-établi basé sur le VEMS, La valeur de la Diffusion du CO et la CVF ou rapport VEMS/CVF, en % des valeurs prédites ou valeur absolue pour ce dernier. Certains facteurs d'aggravation peuvent venir moduler cet estimé.

Analyses statistiques

Les mesures de tendance centrale et de variabilité des différents paramètres des données à l'étude sont représentées en utilisant les moyennes avec leur écart-type. Le coefficient de corrélation de Spearman a été utilisé pour mesurer le degré d'association entre les paramètres des tests de fonctions et les variables décrivant les cytokines. Dans la majorité des cas, les coefficients de corrélations obtenues étaient relativement bas. Par ailleurs, un modèle d'analyse de variance (ANOVA) à un facteur a été utilisé pour comparer les différents groupes de sujets. La comparaison *a posteriori* s'est faite à l'aide de la méthode de comparaisons multiples de Tukey. Pour s'assurer de la validité des résultats obtenus des différents modèles statistiques de l'ANOVA, des tests de normalité et d'homogénéité des variances ont été effectués. Tout seuil observé inférieur à 0.05 était considéré significatif. L'ensemble des résultats a été produit à l'aide du logiciel SAS version 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Résultats

Caractéristiques des sujets

Les caractéristiques des sujets sont résumées au tableau 1. Parmi les travailleurs, il n'y avait que des hommes. Les sujets atteints d'amiantose étaient un peu plus âgés que les 2 autres groupes. Ils étaient diagnostiqués depuis une période de temps plus courte que ceux atteints de silicose mais avaient un DAP plus élevé que ces derniers.

La plupart étaient des ex-fumeurs et le nombre de paquets-année était faible à modéré pour la majorité. Tous les sujets étaient reconnus porteurs d'une pneumoconiose par la CSST et le DAP était relativement élevé pour la plupart, particulièrement pour les sujets avec amiantose.

Tableau 1

CARACTÉRISTIQUES DES SUJETS

<i>Paramètres</i>		Témoin	Amiantose	Silicose
<i>Nombre de Sujets (tous masculins)</i>		15	15	17
<i>Âge</i>	moyenne (DS)	63 (7)	71 (8)*	64 (9)
<i>Tabac</i>				
<i>Non fumeurs</i>	nombre	0	3	2
<i>Ex-fumeurs</i>	nombre; P-A (DS)	15; 34 (20)	10; 23 (11)	13; 26 (25)
<i>Fumeurs</i>	nombre; P-A (DS)	0	2; 48 (14)	2; 28 (4)
<i>Temps depuis le diagnostic</i>	moyenne; année (DS)	N/A	4 (3)*	13 (7)
<i>DAP</i>	moyenne; % (DS)	N/A	49 (30)*	25 (19)

DS = Déviation standard

P-A= nombre de paquets-année

DAP = Déficit anatomopathologique

* = $p < 0,05$ comparativement au groupe silicose et témoin (lorsque applicable)

Tests de fonction pulmonaire

Tous les sujets ont effectué des tests de fonction pulmonaire comprenant la mesure des paramètres suivants : VEMS, CVF, indice de Tiffeneau (VEMS/CVF), débit expiratoire moyen/median (DEMM), capacité pulmonaire totale (CPT), volume résiduel (VR), DLCO et le rapport DLCO/volume alvéolaire (KCO). Le résumé de ces mesures se retrouve au tableau 2. Les valeurs en litres de VEMS, CVF et DEMM étaient significativement plus faibles chez les sujets avec pneumoconioses que chez les témoins. Le VEMS et la CVF en pourcentage étaient aussi diminués chez les pneumoconioses par rapport aux témoins. Les sujets avec amiantose avaient

une CPT et une DLCO plus faibles que les sujets avec silicose et les témoins. L'indice de Tiffeneau était significativement plus faible en présence de silicose que d'amiantose ou par rapport aux témoins.

Tableau 2

TESTS DE FONCTION PULMONAIRE

Paramètres	Témoin	Amiantose	Silicose
VEMS (L)	3,4 (0,7)	1,7 (0,5)*	2,3 (0,7)*
(% préd)	109 (17)	69 (24)*	77 (24)*
Déclin % par année	N/A	5,1 (5,9)	4,5 (3,0)
CVF (L)	4,3 (0,7)	2,3 (0,6)†	3,5 (0,7)†
(% préd)	103 (14)	65 (16)†	87 (14)†
Déclin % par année	N/A	5,0 (6,6)	2,9 (1,6)
VEMS/CVF (%)	80 (11)	83 (19)	66 (14)†
DEMM (L)	3,3 (1,2)	1,9 (1,3)*	1,6 (1,0)*
(% préd)	113 (39)	83 (60)	58 (39)*
CPT (L)	6,5 (0,9)	4,3 (0,9) †	5,9 (1,2)
(% préd)	96 (11)	69 (16) †	87 (17)
Déclin % par année	N/A	0,9 (5,2)	3,0 (6,9)
VR (L)	2,0 (0,5)	1,9 (0,5)	2,1 (0,6)
(% préd)	84 (20)	77 (18)	88 (27)
DLCO(L)	25,9 (4,8)	14,1 (3,7)†	23,2 (6,6)
(% préd)	105 (17)	73 (27) †	99 (26)
Déclin % par année	N/A	5,5 (3,1)	3,0 (5,3)
KCO (L)	4,5 (0,6)	4,0 (1,2)	4,6 (0,7)
(% préd)	124 (21)	130 (47)	131 (22)

Moyenne (DS)

* = Différence statistiquement significative par rapport au groupe témoin (p<0,05)

† = Différence statistiquement significative par rapport aux 2 autres groupes (p<0,05)

Pour les données de DEMM, CPT, VR, DLCO et KCO, il manquait 6 données chez les amiantoses, 5 chez les silicoses et aucune chez les témoins.

Expectorations induites

Tous les sujets ont réussi à fournir un échantillon d'expectoration induite. Les résultats des comptes cellulaires sont résumés dans le tableau 3.

Quoique généralement nous retrouvons un peu plus de cellules inflammatoires chez les patients avec pneumoconiose, il n'y avait aucune différence statistiquement significative entre les 3 groupes au niveau de la composition cellulaire des échantillons.

Tableau 3

EXPECTORATION INDUITE – COMPTES CELLULAIRES

Paramètres	Témoin	Amiantose	Silicose
Nombre de cellules totales (X10⁶)	1,7 (1,4)	3,8 (4,8)	3,5 (4,4)
Eosinophiles (%)	1,4 (2,0)	2,4 (4,3)	0,9 (2,0)
(Nbre X10⁶)	0,03 (0,05)	0,07 (0,12)	0,09 (0,3)
Neutrophiles (%)	55,1 (22,8)	59,3 (17,7)	58,9 (21,8)
(Nbre X10⁶)	0,9 (0,8)	2,4 (3,2)	2,5 (3,7)
Lymphocytes (%)	1,3 (1,0)	1,61 (1,96)	2,2 (1,8)
(Nbre X10⁶)	0,02 (0,02)	0,03 (0,04)	0,09 (0,2)
Macrophages (%)	40,7 (21,8)	31,9 (20,4)	36,3 (20,3)
(Nbre X10⁶)	0,7 (0,9)	1,2 (1,7)	0,8 (0,9)
Bronchiques (%)	1,5 (2,4)	2,0 (2,4)	1,8 (2,6)
(Nbre X10⁶)	0,05 (0,12)	0,05 (0,1)	0,01 (0,01)

Moyenne (DS)

Chez les amiantoses, il y avait une donnée manquante pour le % des cellules et 2 pour le nombre; chez les silicoses, il y avait 3 données manquante pour le % des cellules et 4 pour le nombre; chez les témoins, il y avait 2 données manquante pour le % des cellules et 3 pour le nombre.

Médiateurs et cytokines dans l'expectoration induite

Plusieurs médiateurs inflammatoires et fibrotiques ont été mesurés soit par ELISA, EIA ou immunocytochimie. Le résumé de ces mesures se retrouve au tableau 4. Nos expérimentations ont permis d'observer que le bFGF et le PDGF ne pouvaient être mesurés dans l'expectoration induite par ELISA car le DTT nuisait à la détection. Chez les sujets atteints d'amiantose, les niveaux d'IL-1 β étaient cependant significativement plus élevés que chez les sujets témoins.

Tableau 4

MESURES DES MÉDIATEURS

Médiateur mesuré	Méthode	Témoin	Amiantose	Silicose
Fibronectine (ng/mL)	EIA	571,3 (223,8) n=8	314,5 (177,3) n=8	305,5 (249,5) n=8
Néoptérine (nmol/mL)	EIA	2,6 (0,3) n=7	2,8 (0,6) n=6	2,9 (1,0) n=9
MMP-9 (ng/mL)	ELISA	600,5 (404,9) n=9	444,8 (427,4) n=8	544,6 (752,6) n=11
TIMP-1(ng/mL)	ELISA	134,5 (128,3) n=9	108,1 (87,9) n=8	87,2 (78,4) n=11
MMP-9/TIMP-1	ELISA	13,2 (15,7) n=9	3,8 (4,6) n=8	5,2 (5,9) n=11
IL-6 (pg/mL)	ELISA	34,5 (31,3) n=9	77,6 (80,8) n=8	139,6 (243,2) n=11
IL-8 (pg/mL)	ELISA	5914,0 (2749,6) n=9	5155,3 (5166,0) n=8	3618,3 (2925,1) n=11
TNF-α (% cell positives)	Immunocytochimie	57,9 (18,4) n=8	60,8 (34,3) n=6	72,6 (27,3) n=6
TGF-β (% cell positives)	Immunocytochimie	97,6 (0,7) n=9	96,6 (2,3) n=8	97,4 (1,4) n=8
IL-1β (% cell positives)	Immunocytochimie	57,9 (18,4) n=8	82,4 (4,1)* n=6	72,6 (27,3) n=7
IL-12 (% cell positives)	Immunocytochimie	46,1 (19,7) n=5	30,1 (15,3) n=5	35,6 (14,7) n=5

Moyenne (DS)

* Significativement différent du groupe témoin (p = 0,02)

Corrélations

De nombreuses corrélations de Spearman ont été mesurées entre plusieurs paramètres incluant les fonctions pulmonaires, les déclin du VEMS, CVF et DLCO, les cellules de l'EI et les différentes cytokines étudiées. Les sujets témoins ne présentaient aucune corrélation entre leur fonction pulmonaire et les cytokines de l'EI. Un résumé de ces corrélations se retrouve en Annexe 1.

DAP et autres paramètres

Le DAP des sujets atteints de pneumoconiose présentait une relation inverse avec la DLCO (en litres, -0,68 et en % de la valeur prédite, -0,58, $p < 0,05$), la CPT (en litres, -0,66 et en %, -0,61, $p < 0,05$) et un peu plus faiblement avec la capacité résiduelle fonctionnelle (CRF) (en litres, -0,36 et en %, -0,38, $p < 0,05$). Il existait aussi un lien avec le déclin annuel de la DLCO (0,6), du VEMS (0,51) et de la CVF (0,39) ($p < 0,05$).

Médiateurs, cytokines et paramètres cliniques dans l'amiantose

Au niveau des cytokines, certaines corrélations intéressantes ont aussi été remarquées. En effet, chez les sujets atteints d'amiantose, la quantité de **fibronectine** présente dans l'EI démontre une corrélation inverse avec le VEMS en litres (-0,88, $p = 0,004$, figure 1). Elle est aussi fortement associée au pourcentage de déclin annuel du VEMS (0,90, $p = 0,002$, figure 2). C'est donc dire que plus il y a de fibronectine dans l'EI de ces sujets, plus leur VEMS est faible et plus celui-ci décline fortement par rapport aux valeurs de départ. On remarque aussi une association entre les niveaux élevés de fibronectine chez les sujets atteints d'amiantose et leur DAP (0,70, $p = 0,05$). Il faut noter que même si le niveau de base de la fibronectine semble plus élevé chez les témoins, les différences intergroupes ne sont pas significatives.

Le déclin du VEMS en pourcentage de la valeur prédite est aussi fortement corrélé avec la présence de **TIMP-1**, un médiateur impliqué dans la fibrogénèse (0,88, $p = 0,004$).

Le taux d'**IL-1 β** , quant à lui, était fortement corrélé avec le déclin du VEMS (0,90, $p = 0,04$) et inversement relié au VEMS en litres (-0,94, $p = 0,004$), toujours chez ces mêmes sujets. L'IL-1 β était aussi inversement proportionnelle à la CFV en litres (-0,77) mais cette tendance n'était pas significative ($p = 0,07$).

La CVF en pourcentage chez ces sujets était aussi fortement corrélée inversement avec la présence de **TNF- α** dans l'EI (-0,83, $p = 0,04$).

Médiateurs, cytokines et paramètres cliniques dans la silicose

Le **ratio MMP-9/TIMP-1** était environ 3 fois plus grand chez notre groupe témoin que chez nos sujets atteints de pneumoconiose, mais cette donnée n'était pas significative ($p = 0,07$). Chez les sujets atteints de silicose, le niveau de **MMP-9** était associé à un VEMS en litres et en pourcentage plus élevé (0,61, $p = 0,05$ et 0,62, $p = 0,04$ respectivement) ainsi qu'à une valeur de CVF plus élevée (0,66, $p = 0,03$). Le **ratio MMP-9/TIMP-1** était aussi fortement corrélé avec le

déclin en pourcentage de la CVF (0,90, p=0,04). **L'IL-8** était corrélée avec le VEMS en litres (0,66, p=0,03) ainsi qu'avec la CVF en litres (0,67, p=0,03) et en pourcentage (0,80, p=0,003).

L'IL-1 β était corrélée avec l'indice de Tiffeneau à une valeur de 0,89 (p=0,007).

Médiateurs, cytokines et paramètres cliniques pour l'ensemble des sujets

En considérant l'ensemble des sujets, nous pouvions remarquer une forte relation entre **l'IL-1 β** et le DAP (0,70, p=0,001) et une relation inverse entre cette cytokine et la CVF en litres (-0,47, p=0,03) et en pourcentage (-0,45, p=0,04). MMP-9, pour sa part, corrélait avec le déclin annuel du VEMS (0,48, p=0,04), plus faiblement avec les valeurs de VEMS en pourcentage (0,40, p=0,04) et avec l'indice de Tiffeneau (0,39, p=0,05).

Le ratio de **MMP-9/TIMP-1** montrait une relation significative avec le VEMS en litres (0,49, p=0,02) et en pourcentage (0,52, p=0,01), la CVF en litres (0,42, p=0,04) et en pourcentage (0,42, p=0,04) ainsi qu'avec l'indice de Tiffeneau (0,42, p=0,04).

La **néoptérine**, pour sa part, était inversement corrélée avec le KCO (-0,57, p=0,05) et le KCO en % de la prédite (-0,61, p=0,04).

Quant à **l'IL-12**, en considérant l'ensemble des sujets, elle était inversement corrélée avec le déclin annuel du VEMS en pourcentage (-0,75, p=0,04) et avec le déclin annuel de la CVF (-0,72, p=0,04).

En résumé, malgré le nombre restreint d'échantillons pour certaines mesures, certaines corrélations étaient hautement significatives pour certains marqueurs tels la fibronectine, l'IL-1 β et le ratio MMP-9/TIMP-1 en regard de la gravité de la maladie et du déclin de la fonction pulmonaire.

Pour les figures 1 et 2, il faut noter que le nombre de mesures utilisées pour déterminer les corrélations est inférieur à celui du nombre total des patients en raison de certaines données manquantes pour certains sujets, soit dû à des problèmes techniques de mesure ou à des données insuffisantes au niveau des tests de fonction pulmonaires.

Figure 1

CORRÉLATION ENTRE LA MESURE DE LA FIBRONECTINE ET LE VEMS CHEZ LES SUJETS AVEC AMIANTOSE

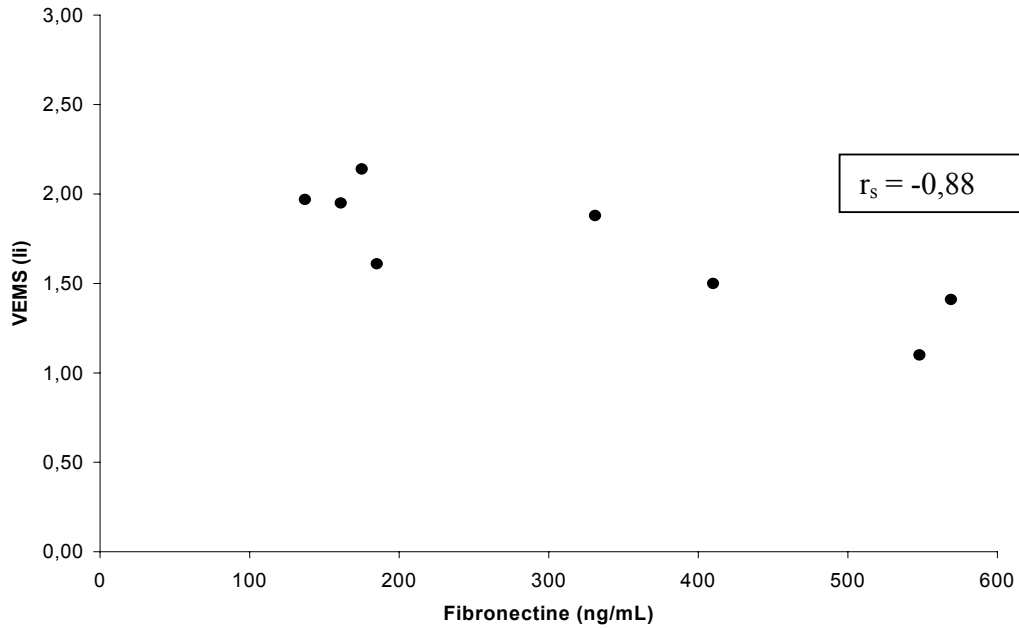
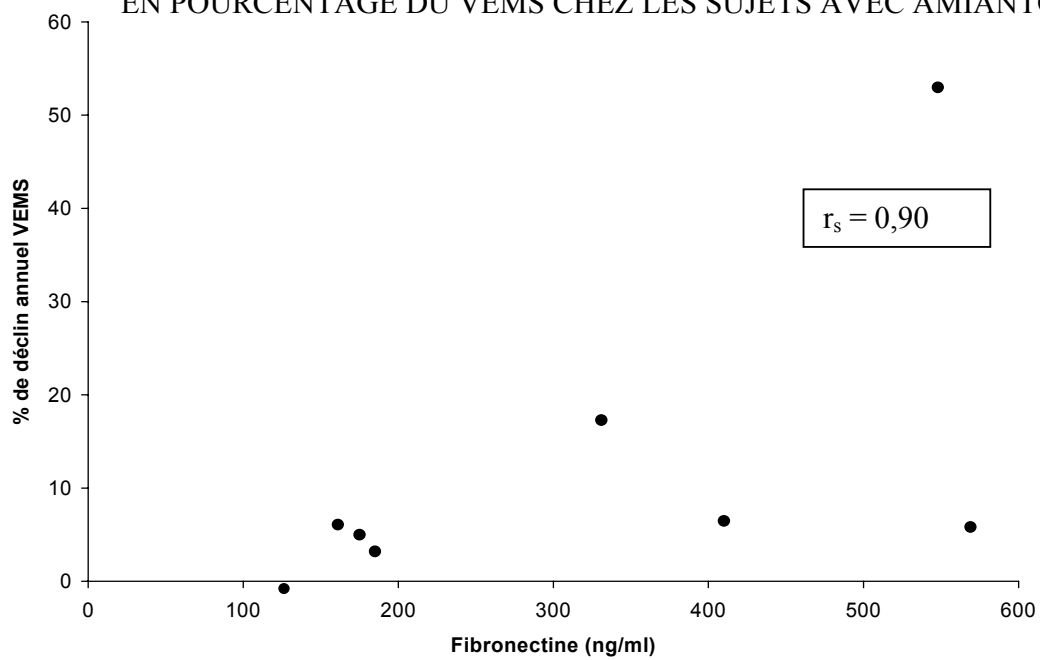


Figure 2

CORRÉLATION ENTRE LA FIBRONECTINE ET LE DECLIN ANNUEL EN POURCENTAGE DU VEMS CHEZ LES SUJETS AVEC AMIANTOSE



Mesures des cellules inflammatoires de l'EI et paramètres cliniques

En analysant le profil cellulaire des expectorations induites par rapport aux fonctions pulmonaires, nous avons remarqué chez les sujets atteints de silicose une corrélation significative entre les pourcentages de **neutrophiles** et les déclin annuel du VEMS et de la CVF (0,7, $p=0,03$, et 0,9, $p=0,0002$, respectivement).

Chez ces mêmes sujets, La néoptérine était corrélée avec le nombre total de neutrophiles, de lymphocytes et de macrophages (0,95, $p=0,01$; 0,86, $p=0,02$; 0,76, $p=0,04$, respectivement). Une relation entre les déclin annuel du VEMS et de la CVF et le nombre total de neutrophiles était aussi présente chez les sujets avec amiantose (0,65, $p=0,03$) et 0,61, $p=0,05$, respectivement). En considérant tous les sujets, nous avons observé une relation entre le nombre total de neutrophiles et le déclin annuel de la CVF (0,46, $p=0,02$) mais aussi une certaine corrélation entre le nombre total d'**éosinophiles** de l'EI et les déclin annuel du VEMS et de la CVF (0,5 $p=0,01$ et 0,47, $p=0,02$, respectivement). Une corrélation était aussi présente entre la néoptérine et le nombre total de **lymphocytes** (0,51, $p=0,03$).

Comparaisons entre l'expectoration induite et le lavage bronchoalvéolaire

Plusieurs sujets n'ont pu subir un LBA soit par refus de leur part, soit parce que leur état général était jugé trop détérioré par le médecin. Nous n'avons donc pas suffisamment de données pour établir une comparaison entre les profils de cytokines de l'EI et du LBA, puisque seulement 8 sujets ont accepté ce test, tous groupes confondus.

Discussion

Nature et portée des observations rapportées

Le but de cette étude était d'explorer le potentiel des mesures des sécrétions bronchiques obtenues par l'analyse de l'EI dans l'évaluation des processus inflammatoires et fibrogéniques présents dans la silicose et l'amiantose. Nous avons démontré que tel était le cas et que même si l'analyse du profil cellulaire était peu révélatrice, celle de diverses cytokines et médiateurs, particulièrement celles reflétant le processus fibrotique pulmonaire, pouvaient fournir des informations précieuses. En effet, les quantités de certains médiateurs de l'EI tels la fibronectine, l'IL1- β et le ratio MMP-9/TIMP-1 présentaient une corrélation fort significative avec la gravité de la maladie et le déclin de la fonction pulmonaire, et ce, malgré le fait que pour certaines mesures, le nombre de sujets pouvant être inclus dans l'analyse était limité.

Cette étude nous procure donc des données sur la contribution de l'analyse de l'EI, méthode simple et facilement répétable, dans l'évaluation de la sévérité des pneumoconioses et de la détérioration de la fonction pulmonaire. Le dosage des médiateurs ci-dessus mentionnés pourrait possiblement aider à déterminer l'état clinique de ces travailleurs et pourrait être intégré à l'évaluation initiale de ceux-ci, de même qu'à leur suivi clinique. De plus, il serait très intéressant d'évaluer les travailleurs qui sont exposés à ces substances mais qui n'ont pas encore développé de maladie afin d'identifier les sujets plus à risque de développer une pneumoconiose et ainsi, d'anticiper ou prévenir le développement de la maladie.

Les travailleurs exposés à l'amiante et à la poussière de silice ne développeront pas tous une pneumoconiose. L'apparition de ces conditions dépend de la durée et de l'intensité de l'exposition mais également de certains facteurs de susceptibilité individuelle, dont, fort possiblement, de la tendance à développer une fibrose pulmonaire suite à l'inhalation des fibres minérales. Quoique divers éléments sont habituellement présents chez ceux qui souffrent de la maladie (ex: exposition intense et de longue durée, tabagisme, épaississement pleural diffus, image en "nid d'abeille" à la tomodensitométrie, et haut taux de fibronectine dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire), il est pratiquement impossible de prévoir lesquels de ces travailleurs développeront une amiantose ou une silicose.

Le déclin de la fonction pulmonaire qu'on observe chez les patients atteints semble associé à la présence d'un processus fibrosant lentement évolutif. En effet, les fibres d'amiante ou les particules de silice persistant dans le poumon contribuent probablement à entretenir ce processus. La cytotoxicité de ces particules provoque l'activation de cellules, entre autres les macrophages et les fibroblastes, en plus d'induire la sécrétion de plusieurs médiateurs fibrogéniques qui agiront au niveau des tissus pulmonaires. Le LBA est une méthode fréquemment utilisée dans l'investigation des pneumoconioses. On peut y doser des médiateurs, mesurer la quantité de fibres minérales, etc., mais cette technique est invasive et difficilement répétable à intervalles réguliers. Il serait donc intéressant de développer des tests non invasifs permettant d'identifier les sujets les plus à risque et ainsi, d'anticiper le développement de la maladie. De plus, il est fort probable que l'évaluation de l'expression de médiateurs associés à l'intensité du «processus fibrogénique» du système respiratoire d'un travailleur puissent prédire l'évolution des pneumoconioses.

L'expectoration induite (EI) est une méthode récente, simple, peu coûteuse et non invasive qui permet l'analyse des sécrétions bronchiques. Plusieurs études démontrent l'utilité de l'EI dans l'étude du profil inflammatoire des patients asthmatiques. Elle s'avère utile pour le diagnostic d'asthme professionnel en laboratoire hospitalier. Par conséquent, notre projet consistait à évaluer l'utilité de l'EI dans l'étude de la silicose et de l'amiantose. Nous voulions également vérifier s'il était possible de détecter et quantifier des médiateurs inflammatoires et fibrogéniques dans les EI. Nous avons démontré qu'il était possible de doser certains marqueurs inflammatoires et fibrogéniques d'importance dans l'EI de patients souffrant de pneumoconiose. De plus, il a été possible d'établir des corrélations intéressantes entre l'expression de certains médiateurs et de cellules inflammatoires et le déclin des fonctions pulmonaires. Par exemple, dans les cas d'amiantose, on note une corrélation entre l'expression de l'IL-6 et du TIMP-1 avec le déclin du VEMS et une corrélation inverse entre l'IL-1 β et la fibronectine avec le VEMS.

Chez les sujets atteints de silicose, on note une corrélation entre des niveaux élevés de TNF- α et une augmentation du déclin du VEMS. La présence de ces médiateurs inflammatoires dans les expectorations induites des sujets atteints de pneumoconioses suggère qu'ils ont un rôle à jouer dans la réduction de la fonction respiratoire, quoique leur effet sur le mécanisme de fibrogénèse secondaire est probable, plus qu'un effet direct. Ceci est supporté par les augmentations de cytokines (ex : IL8) associées à l'activation de cellules impliquées dans les changements structuraux pulmonaires tels les fibroblastes.

Même si le processus fibrotique caractéristique des pneumoconioses est surtout localisé au niveau alvéolaire, il nous semblait possible que l'analyse des sécrétions bronchiques puisse fournir des informations précieuses sur les mécanismes impliqués dans ces maladies. L'inhalation des fibres minérales peut possiblement causer une réaction inflammatoire et fibrogénique au niveau bronchique tout comme dans le poumon profond. Il est possible également que les cytokines libérées dans le tissu pulmonaire puissent être détectées au niveau bronchique, et refléter la sévérité de la maladie, et l'intensité de la réaction inflammatoire et fibrogénique pulmonaire. Dans notre étude, nous pouvions remarquer un ratio MMP-9/TIMP-1 environ 3 fois plus grand chez notre groupe témoin que chez nos sujets atteints de pneumoconiose. C'est donc dire qu'il y a beaucoup plus de TIMP-1 (ou moins de MMP-9) chez les sujets atteints, ce qui est reconnu pour favoriser les réactions fibrosantes tissulaires.

Des études précédentes ont révélé la présence de facteurs inflammatoires et fibrogéniques tels l'IFN- γ , l'IL-2, le TGF- β , l'ET-1 et le PDGF dans le LBA et le sérum, mais aussi plus récemment dans l'EI, chez les sujets atteints de pneumoconioses^{27;29;30;44-48}. Il était donc possible qu'on puisse les retrouver en plus grande quantité dans l'expectoration induite de travailleurs avec amiantose et silicose, surtout chez ceux avec une plus forte détérioration de la fonction respiratoire. Notre étude a cependant démontré que ce n'est pas seulement le niveau de base des marqueurs de fibrogénèse qui peut prédire l'évolution mais probablement son évolution dans le temps. La fibronectine est généralement considérée comme un bon marqueur de l'évolution de la maladie puisqu'elle est non seulement présente dans le LBA des patients avec pneumoconiose mais qu'elle peut, comme le suggère notre étude, être un marqueur de progression du processus fibrotique^{34;35}.

Contrairement à l'étude de Fireman et coll.⁴ décrite précédemment, qui ne comprenait aucun groupe contrôle, notre étude comparait les données à des sujets sains, mais nous nous sommes heurtés au même problème qu'eux quant au nombre de LBA que nous avons pu effectuer. Ceci dit, notre intérêt était surtout de vérifier les performances de l'analyse de l'EI et à cet égard, nous avons obtenu les réponses à nos questions. De plus, les trouvailles de l'analyse de l'EI sont en conformité avec ce qui a été démontré antérieurement dans d'autres études pour ce qui est des échantillons de LBA.

La présente étude confirme qu'il est possible d'obtenir, chez des travailleurs atteints de pneumoconiose fibrosante, des échantillons d'expectoration induite de bonne qualité et facilement analysables. Tous les patients ont été en effet capables de produire des spécimens valables d'expectoration et aucun effet indésirable n'a été noté chez ces travailleurs, même chez ceux qui avaient une fonction pulmonaire fortement abaissée.

Parmi les limitations de notre analyse, outre le nombre restreint de sujets, on peut considérer le fait que plusieurs étaient ex-fumeurs. Cependant, les profils de mesures de cytokines retrouvés chez les fumeurs sont différents de ceux que nous avons mis en évidence, suggérant que le tabac n'a pas significativement influencé nos mesures. Le tabac induit habituellement une réaction inflammatoire bronchique neutrophilique avec augmentation des lymphocytes CD8⁺ et du ratio CD8⁺/CD3⁺⁴⁹. On sait moins de choses du remodelage induit par le tabac, Takizawa et al. ont démontré que les niveaux d'ARNm pour le TGF- β_1 étaient en corrélation avec l'intensité du tabagisme⁵⁰. On sait peu de choses des facteurs de remodelage, mais la fibrose pulmonaire ou bronchique ne sont pas typiques des atteintes tabagiques et contribuent probablement peu au processus fibrotique induit par les fibres minérales, quoique ceci reste à étudier.

Bien que tous nos sujets soient parvenus à produire un échantillon d'expectoration induite, la quantité de matériel obtenu était très variable. Il nous a été impossible de doser chaque cytokine pour tous les sujets. Certaines moyennes et corrélations obtenues l'ont donc été avec un nombre restreint de données.

Contribution de cette étude à l'analyse des facteurs inflammatoires et fibrogéniques de l'EI

Au cours de cette étude, nous avons exploré divers aspects de la mesure des marqueurs inflammatoires et fibrogéniques des spécimens d'EI. Nous avons entre autres découvert, au fil de l'étude, que le DTT utilisé pour libérer les cellules de l'EI pouvait interférer dans certains tests ELISA, particulièrement pour le TGF- β , TNF- α , bFGF, PDGF et IL-12. Pour ces marqueurs, il a donc fallu utiliser une autre méthode de détection, en l'occurrence l'immunocytochimie. Nous avons dû mettre au point cette méthode pour les lames d'EI de nos sujets, et ce, pour chaque anticorps utilisé. Par cette méthode, nous avons ainsi réussi à évaluer l'IL-1 β , le TGF- β , le TNF- α et l'IL-12. Nous avons dû renoncer au dosage de l'IL-8, bFGF et PDGF par immunocytochimie car les anticorps n'étaient pas disponibles. La méthode d'ELISA nous a tout de même permis de doser l'IL-6, l'IL-8, la MMP-9 et TIMP-1, alors que la fibronectine et la néoptérine ont été dosées par EIA. Ces données sont donc importantes pour déterminer le mode optimal de mesure de ces diverses cytokines.

Ces difficultés ont cependant ralenti la progression de nos analyses et l'étude a ainsi nécessité plus de temps que prévu initialement. Par contre, ce délai nous a permis de bien mettre au point les techniques de détection des médiateurs, un élément clé dans l'analyse des données. Ces divers essais procurent ainsi des données importantes pour les études futures. Nous avons été à même de constater que le DTT, un agent réducteur puissant, peut nuire à la détection ainsi qu'à l'évaluation de plusieurs médiateurs. Nous croyons qu'il serait plus avisé et pertinent pour des études futures, d'étudier l'expression des cytokines par RT-PCR (ARNm) et immunobuvardage (Western Blot) (protéines). Nous avons déjà mis au point les techniques d'isolation et de purification de l'ARNm des cellules de l'EI et procédons actuellement à l'analyse de cytokines par RT-PCR et Western Blot. Les analyses préliminaires semblent prometteuses.

Autres difficultés rencontrées au cours de cette étude

Outre les difficultés de mesure de certains médiateurs indiquées précédemment, le principal problème rencontré lors de cette étude fut incontestablement le recrutement. Nous avons relevé les noms de plus de 250 patients avec amiantose ou silicose et analysé autant de dossiers. Un grand nombre de patients n'ont pu être recrutés pour plusieurs raisons : présence de pathologies associées invalidant les tests, refus de l'investigation, mauvaise condition générale, impossibilité de les rejoindre, lieu de résidence trop éloigné (les coûts de transport auraient été trop élevés). Ayant pratiquement épuisé toutes les listes de patients vus à l'Hôpital Laval, nous avons décidé de communiquer avec les Présidents des 3 autres comités de la CSST pour leur demander leur collaboration dans le recrutement des sujets avec pneumoconiose. Ceux-ci ont été très réceptifs à nos demandes et un processus de recrutement et de performance des tests requis a pu être mis en place à Montréal, mais ces arrangements ont finalement peu contribué au recrutement en raison des délais encourus dans l'établissement de ce processus.

Malgré les difficultés rencontrées, nous avons réussi à recruter les 15 sujets témoins initialement prévus, 15 sujets atteints d'amiantose et 17 atteints de silicose, ce qui s'est avéré suffisant pour effectuer des analyses valables.

Conclusion

La technique de l'expectoration induite est utile pour déterminer le profil des cytokines présentes chez les sujets atteints de silicose ou d'amiantose. Certaines de ces cytokines, telles la fibronectine, l'IL-1 β , le TNF- α , l'IL-6 et TIMP-1, pourraient être associées à une détérioration accrue de la fonction respiratoire chez ces sujets. L'expectoration induite pourrait donc être utilisée pour l'évaluation des travailleurs et le suivi des sujets à risque.

Applicabilité des résultats

Les résultats présentés dans cette étude suggèrent qu'il serait possible d'utiliser l'EI, une méthode simple, fiable, non-invasive et facilement répétable pour analyser le profil des cytokines chez les travailleurs de l'amiantose et de la silice, mais aussi chez d'autres sujets à risque de développer une pneumoconiose. Si les niveaux de ces cytokines s'avéraient élevés ou augmentaient, le travailleur pourrait être considéré à risque de développer une pneumoconiose et des mesures préventives mises de l'avant pour l'éviter. Ces mesures pourraient également aider à

mieux évaluer les conséquences physiopathologiques de l'exposition aux fibres minérales et leur répercussion sur l'évolution de la maladie.

Retombées éventuelles et perspectives futures

Nous avons démontré que l'analyse de certains marqueurs fibrogéniques pouvait procurer des indices intéressants sur l'état clinique des travailleurs atteints d'amiantose et de silicose. Pour les travailleurs atteints, même s'il n'y a aucun traitement efficace actuellement pour ces maladies et que la prévention est absolument nécessaire, nous pourrions améliorer le "ciblage" des mesures préventives par l'identification de marqueurs d'activité fibrogénique. L'utilité de la mesure des marqueurs étudiés serait cependant d'autant plus grande si on les effectuait chez des travailleurs exposés mais n'ayant pas encore la maladie. Un suivi prospectif des marqueurs biologiques et des tests physiologiques de travailleurs exposés pourrait nous suggérer une susceptibilité plus grande chez certains et la nécessité d'un retrait plus précoce, même sans critères francs de maladie. Une étude prospective serait donc très utile en ce sens.

D'autre part, il serait intéressant de voir si les marqueurs d'évolution retrouvés dans ce « modèle » de maladie fibrosante pourraient être applicables aux autres maladies fibrosantes non-occupationnelles, telle l'alvéolite fibrosante.

Cette étude démontre donc que même dans les maladies parenchymateuses, on peut obtenir des informations utiles de mesures de spécimens de sécrétions bronchiques par mesure non-invasive. Ceci ouvre la porte à de nombreuses possibilités et pourrait permettre de développer des tests diagnostiques et prédictifs fort utiles pour ces maladies.

Liste des résumés de communication et articles produits dans le cadre de la présente subvention

Aucune publication n'a encore été réalisée suite à cette étude. Cependant, un article scientifique ainsi qu'un résumé de communication (et une présentation) sont en cours de préparation. L'article sera soumis pour publication et des résumés de communication seront soumis pour présentation à divers congrès, dont celui de l'American Thoracic Society (ATS), qui aura lieu à San Diego, Californie, en 2006.

Références

- (1) Pizzichini E, Pizzichini MMM, Hargreave FE. Induced sputum in the management of asthma. *Seminars in respiratory and critical care medicine* 1998; 19(6):581-592.
- (2) Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992; 47(1):25-29.
- (3) Peleman RA, Rytala PH, Kips JC et al. The cellular composition of induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1999; 13(4):839-843.
- (4) Fireman E, Greif J, Schwarz Y et al. Assessment of hazardous dust exposure by BAL and induced sputum. *Chest* 1999; 115(2):1720-1728.
- (5) Teschler H, Thompson AB, Dollenkamp R et al. Relevance of asbestos bodies in sputum. *Eur Respir J* 1996; 9(4):680-686.
- (6) Olivieri D, D'Ippolito R, Chetta A. Induced sputum: diagnostic value in interstitial lung disease. *Curr Opin Pulm Med* 2000; 6(5):411-414.
- (7) Mossman BT, Gee JB. Asbestos-related diseases. *N Engl J Med* 1989; 320(26):1721-1730.
- (8) Fraser RG, Pare JAP, Pare PD. Pleuropulmonary disease caused by inhalation of inorganic dust (pneumoconiosis). In: Fraser RG, Genereux GP, editors. *Diagnosis of diseases of the chest*. 1990: 2346.
- (9) Becklake MR. Asbestos and other fiber-related diseases of the lungs and pleura. Distribution and determinants in exposed populations. *Chest* 1991; 100(1):248-254.
- (10) Schwartz DA, Davis CS, Merchant JA et al. Longitudinal changes in lung function among asbestos-exposed workers. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150(5 Pt 1):1243-1249.
- (11) Hughes JM, Weill H. Asbestos and man-made fibers. In: Samet JM, editor. *Epidemiology of lung cancer*. New York: Marcel Dekker, 1994: 185.
- (12) Diseases associated with exposure to silica and nonfibrous silicate minerals. Silicosis and Silicate Disease Committee. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112(7):673-720.
- (13) Ziskind M, Jones RN, Weill H. Silicosis. *Am Rev Respir Dis* 1976; 113(5):643-665.
- (14) Weill H, Jones RN, Parkes WR. Silicosis and related diseases. In: Parkes WR, editor. *Occupational lung disorders*. London: Butterworth Heinemann, 1994: 285.
- (15) Monso E, Carreres A, Tura JM et al. Electron microscopic microanalysis of bronchoalveolar lavage: a way to identify exposure to silica and silicate dust. *Occup Environ Med* 1997; 54(8):560-565.

- (16) Vanhee D, Gosset P, Boitelle A et al. Cytokines and cytokine network in silicosis and coal workers' pneumoconiosis. *Eur Respir J* 1995; 8(5):834-842.
- (17) Vallyathan V, Goins M, Lapp LN et al. Changes in bronchoalveolar lavage indices associated with radiographic classification in coal miners. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162(3 (Pt 1)):958-965.
- (18) Grootendorst DC, Sont JK, Willems LNA et al. Comparison of inflammatory cell counts in asthma: induced sputum vs bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies. *Clin Exp Allergy* 1997; 27:769-779.
- (19) Keatings VM, Evans DJ, O'Connor BJ et al. Cellular profiles in asthmatic airways: a comparison of induced sputum, bronchial washings, and bronchoalveolar lavage fluid. *Thorax* 1997; 52(4):372-374.
- (20) Srivastava KD, Rom WN, Jagirdar J et al. Crucial role of interleukin-1beta and nitric oxide synthase in silica-induced inflammation and apoptosis in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165(4):527-533.
- (21) Zhang Y, Lee TC, Guillemin B et al. Enhanced IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha release and messenger RNA expression in macrophages from idiopathic pulmonary fibrosis or after asbestos exposure. *J Immunol* 1993; 150(9):4188-4196.
- (22) Piguet PF, Collart MA, Grau GE et al. Requirement of tumour necrosis factor for development of silica-induced pulmonary fibrosis. *Nature* 1990; 344(6263):245-247.
- (23) Arcangeli G, Cupelli V, Giuliano G. Effects of silica on human lung fibroblast in culture. *Sci Total Environ* 2001; 270(1-3):135-139.
- (24) Perkins RC, Scheule RK, Hamilton R et al. Human alveolar macrophage cytokine release in response to in vitro and in vivo asbestos exposure. *Exp Lung Res* 1993; 19(1):55-65.
- (25) Simeonova PP, Luster MI. Asbestos induction of nuclear transcription factors and interleukin 8 gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 15(6):787-795.
- (26) Broser M, Zhang Y, Aston C et al. Elevated interleukin-8 in the alveolitis of individuals with asbestos exposure. *Int Arch Occup Environ Health* 1996; 68(2):109-114.
- (27) Davis GS, Holmes CE, Pfeiffer LM et al. Lymphocytes, lymphokines, and silicosis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2001; 20 Suppl 1:53-65.
- (28) Altindag ZZ, Baydar T, Isimer A et al. Neopterin as a new biomarker for the evaluation of occupational exposure to silica. *Int Arch Occup Environ Health* 2003; 76(4):318-322.
- (29) Kips JC, Pauwels RA. Airway wall remodelling: does it occur and what does it mean? *Clin Exp Allergy* 1999; 29:1457-1466.

- (30) Vignola AM, Riccobono L, Mirabella A et al. Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1945-1950.
- (31) Jagirdar J, Begin R, Dufresne A et al. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) in silicosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154(4 Pt 1):1076-1081.
- (32) Vanhee D, Gosset P, Wallaert B et al. Mechanisms of fibrosis in coal workers' pneumoconiosis. Increased production of platelet-derived growth factor, insulin-like growth factor type I, and transforming growth factor beta and relationship to disease severity. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150(4):1049-1055.
- (33) Brandt-Rauf PW, Smith S, Hemminki K et al. Serum oncoproteins and growth factors in asbestosis and silicosis patients. *Int J Cancer* 1992; 50(6):881-885.
- (34) Wagner JC, Burns J, Munday DE et al. Presence of fibronectin in pneumoconiotic lesions. *Thorax* 1982; 37(1):54-56.
- (35) Begin R, Martel M, Desmarais Y. Fibronectin and procollagen 3 levels in bronchoalveolar lavage of asbestos-exposed human subjects and sheep. *Chest* 1986; 89(2):237-243.
- (36) Perez-Ramos J, de LS-V, Vanda B et al. Matrix metalloproteinases 2, 9, and 13, and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 in experimental lung silicosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(4):1274-1282.
- (37) Pardo A, Perez-Ramos J, Segura-Valdez L et al. Expression and localization of TIMP-1, TIMP-2, MMP-13, MMP-2, and MMP-9 in early and advanced experimental lung silicosis. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 878:587-589.
- (38) ATS statement. Standardization of spirometry-1987 update. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136:1285-1298.
- (39) Knudson RJ, Lebowitz MD, Holberg CJ et al. Changes in the normal maximal expiratory flow-volume curve with growth and aging. *Am Rev Respir Dis* 1983; 127:725-734.
- (40) Clausen JL. Prediction of normal values in pulmonary function testing. *Clin Chest Med* 1989; 10(2):135-143.
- (41) CSST. Règlement annoté sur le barème des dommages corporels. 2000.
- (42) Pizzichini E, Pizzichini MMM, Efthimiadis A 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.
- (43) Workshop Summary Guidelines: Investigative use of bronchoscopy, lavage, and bronchial biopsies in asthma and other airways diseases. *Clin Exp Allergy* 1991; 21:533-540.

- (44) Teder P, Noble PW. A cytokine reborn? Endothelin-1 in pulmonary inflammation and fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23(1):7-10.
- (45) Davis GS, Pfeiffer LM, Hemenway DR. Expansion of interferon-gamma-producing lung lymphocytes in mouse silicosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20(4):813-824.
- (46) Robinson BW, Rose AH, Hayes A et al. Increased pulmonary gamma interferon production in asbestosis. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138(2):278-283.
- (47) Tinkle SS, Kittle LA, Schumacher BA et al. Beryllium induces IL-2 and IFN-gamma in berylliosis. *J Immunol* 1997; 158(1):518-526.
- (48) Mutsaers SE, Harrison NK, McAnulty RJ et al. Fibroblast mitogens in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid from asbestos-exposed subjects with and without clinical evidence of asbestosis: no evidence for the role of PDGF, TNF-alpha, IGF-1, or IL-1 beta. *J Pathol* 1998; 185(2):199-203.
- (49) Miller L.G., Goldstein G, Murphy M, Ginns C. Reversible alterations in immunoregulatory T cells in smoking. *Chest* 1982;5:526-529.
- (50) Takizawa H, Tanaka M, Takami K, Ohtoshi T, Ito K, Satoh M, Okada Y, Yamasawa F, Nakahara K, Umeda A. Increased expression of transforming growth factor- β 1 in small airway epithelium from tobacco smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1476-.

Abréviations

ARNm	ARN messagers
ATS	American Thoracic Society
bFGF	Facteur de croissance de base des fibroblastes
CO	Monoxyde de carbone
CPT	Capacité pulmonaire totale
CSST	Commission de la Sécurité et de la Santé au Travail
CVF	Capacité vitale forcée
DAP	Déficit anatomopathologique
DEMM	Débit expiratoire moyen/median
DLCO	Diffusion du monoxyde de carbone (DLCO)
D-PBS	tampon phosphate salin
DTT	Dithiothreitol
EI	Expectoration induite
EIA	Essai immuno-enzymologique
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ICC	Immunocytochimie
IFN- γ ,	Interféron- γ ,
IL-1 β	Interleukine-1 β
IL-2	Interleukine-2
IL-6	Interleukine-6
IL-8	Interleukine-8
IL-12	Interleukine-12
KCO	Rapport DLCO/volume alvéolaire
LBA	Lavage bronchoalvéolaire
MMP-9	Métalloprotéinase-9
NO	Oxyde nitrique
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
TGF- β	Facteur de croissance tumoral- β
TIMP-1	Inhibiteur des métalloprotéinases-1
TNF- α	Facteur nécrosant des tumeurs- α
VEMS	Volume expiratoire maximal en une seconde
VR	Volume résiduel

ANNEXE 1

Corrélations entre les déclin du VEMS, CVF et DCO avec différents paramètres étudiés.

Tableau de corrélations pour les silicoses

		Neutrophiles (%)	Lymphocytes (%)	Macrophages (%)	MMP/TIMP	TNF- α
Déclin annuel	VEMS	0.7	NS	-0.68	NS	NS
	CVF	0.91	NS	-0.94	1	NS
	DCO	NS	-0.65	NS	NS	NS
% de Déclin	VEMS	NS	NS	NS	NS	-0.9
	CVF	NS	NS	NS	0.9	NS
	DCO	NS	NS	NS	NS	NS
% de Déclin annuel	VEMS	NS	NS	NS	NS	NS
	CVF	0.77	NS	-0.83	NS	NS
	DCO	NS	NS	NS	NS	NS

NS : Corrélation statistiquement non-significative

Tableau de corrélation pour les amiantoses

		Neutrophiles (%)	Fibronectine	MMP-9	TIMP-1	IL-6	IL-1 β
Déclin annuel	VEMS	0.65	NS	NS	NS	NS	0.9
	CVF	0.61	NS	NS	NS	NS	NS
	DCO	NS	NS	NS	NS	NS	NS
% de Déclin	VEMS	NS	0.9	NS	0.88	NS	NS
	CVF	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	DCO	NS	NS	NS	NS	NS	NS
% de Déclin annuel	VEMS	NS	NS	0.71	0.61	0.76	0.9
	CVF	NS	NS	NS	NS	NS	0.9
	DCO	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS : Corrélation statistiquement non-significative