

Intérêt des expectorations induites dans l'exploration de l'asthme

R. Louis¹, J. Bettiol¹, D. Cataldo¹, F. Bureau², G. Seumois², M. Radermecker¹, P. Bartsch¹, R. Djukanovic³

¹ Département de Pneumologie, CHU Sart-Tilman, Université de Liège, Belgique.

² Département de Physiologie, Faculté Vétérinaire, Université de Liège, Belgique.

³ Unité Respiratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Université de Southampton, Grande-Bretagne.

Résumé

Introduction La technique des expectorations induites consiste à générer des expectorations par inhalation de liquide salin hypertonique. Par son caractère non invasif, sa simplicité, sa relative innocuité, sa bonne rentabilité et sa bonne reproductibilité, cette technique, apparue au début des années 90, s'est rapidement imposée comme une technique de choix dans l'investigation de l'inflammation bronchique de l'asthme.

Etat des connaissances Nous présentons ici les résultats de nos recherches qui ont contribué à valider la technique sur le plan méthodologique et à exploiter tant la phase cellulaire que la phase fluide des expectorations dans le but de caractériser l'inflammation bronchique des asthmatiques et d'en appréhender certains mécanismes. Nos résultats confirment chez les asthmatiques une infiltration des voies aériennes par des éosinophiles qui apparaît proportionnelle à la sévérité de la maladie. Nous évaluons l'impact des corticoïdes inhalés et de la théophylline sur l'éosinophilie des expectorations et l'hyperréactivité bronchique et discutons le rôle des éosinophiles dans l'hyperréactivité bronchique. Enfin nous discutons l'intérêt des expectorations induites en pratique clinique chez les asthmatiques.

Perspectives L'analyse des expectorations induites pourrait bien devenir un instrument intéressant dans l'évaluation et le monitoring clinique de l'asthme au même titre que les symptômes et les anomalies fonctionnelles respiratoires.

Conclusions Les expectorations induites ont certainement contribué au progrès dans la connaissance des mécanismes cellulaires et moléculaires de l'asthme ainsi qu'à la clarification du rôle de l'inflammation bronchique dans l'expression clinique de la maladie.

Mots-clés: Asthme • Expectorations induites • Méthodologie • Eosinophiles.

Induced expectoration in the investigation of asthma

Summary

Introduction The technique of induced expectoration generates sputum by the inhalation of hypertonic saline. On account of its non-invasive character, its simplicity, its relative harmlessness, its cost effectiveness and its reproducibility this technique, that appeared in the early 1990's, has rapidly established itself as the technique of choice in the investigation of bronchial inflammation in asthma.

State of the art We present the results of our studies that have contributed to the validation of the technique at the methodological level and to the exploitation of the cellular contents as much as the fluid phase of the expectorations in characterising bronchial inflammation in asthmatics. Our results confirm an infiltration of the airways of asthmatics with eosinophils that appears to be proportional to the severity of the illness. We evaluate the effect of inhaled steroids and of theophylline on sputum eosinophilia and bronchial reactivity and discuss the role of eosinophils on bronchial hyperreactivity. Finally we discuss the use of induced expectoration in clinical practice in asthma.

Perspectives The analysis of induced sputum could well become a valuable tool in the clinical evaluation and monitoring of asthma in the same way as symptoms and abnormalities of lung function.

Conclusions Induced expectoration has certainly contributed to the understanding of the cellular and molecular mechanisms of asthma as well as the role of bronchial inflammation in the clinical manifestations of the disease.

Key-words: Asthma · Induced Expectoration · Methodology · Eosinophils.

INTRODUCTION

L'analyse des pièces autopsiques de patients décédés lors d'état de mal asthmatique a permis de démontrer dès le début du siècle précédent que l'asthme sévère était caractérisé sur le plan histologique par une infiltration massive des parois et de la lumière bronchique par des éosinophiles. La composante inflammatoire de la maladie asthmatique dans ces formes légères à modérées a, quant à elle, été établie dans les années 80 grâce à la technique de la fibroscopie permettant de réaliser des lavages bronchoalvéolaires et des biopsies bronchiques [1]. Le caractère invasif de la bronchoscopie ne pouvait cependant que limiter son utilisation en tant qu'outil de recherche et confiner son application à certains centres spécialisés. C'est au début des années 90 qu'est apparue la technique des expectorations induites comme technique d'exploration de l'inflammation bronchique chez les patients atteints d'asthme [2]. Par la relative simplicité et le caractère non invasif de la procédure d'induction, la technique des expectorations induites s'est rapidement imposée comme une technique de choix dans l'exploration de l'inflammation des voies aériennes. La technique a été bien validée tant pour le volet concernant l'induction des expectorations que pour celui concernant le traitement des échantillons récoltés. Les études se sont multipliées visant à caractériser l'inflammation bronchique, à en élucider certains mécanismes et à en appréhender le rôle dans l'expression clinique de la maladie asthmatique. Enfin cette technique permet aussi d'évaluer l'efficacité anti-inflammatoire de certains médicaments anti-asthmatiques.

Nous présentons ici les travaux que nous avons menés concernant l'utilité de l'analyse des expectorations induites dans l'exploration physiopathologique et clinique de l'asthme bronchique. Ils abordent un volet méthodologique concernant la validité de la mesure de médiateurs et protéines dans la phase fluide des expectorations. Les travaux révèlent l'utilité de la technique en tant qu'outil d'étude de l'inflammation bronchique et de ses mécanismes. Ils démontrent le potentiel de la technique pour apprécier le degré d'inflammation chez des asthmatiques de sévérité différente et évaluer l'effet anti-inflammatoire de médicaments anti-asthmatiques.

METHODOLOGIE

Induction des expectorations

Le principe repose sur la stimulation de la production d'expectorations par inhalation de liquide salé hypertonique.

En procédant de la sorte on arrive à récolter des expectorations chez des sujets incapables d'en produire spontanément en quantité suffisante. En pratique les sujets inhalent du NaCl 4,5 % à l'aide d'un nébuliseur ultrasonique dont le débit est situé entre 1 et 3ml/min pendant une période variable selon les sujets allant de 10 à 20 min. Les sujets sont invités à tousser et à produire des expectorations après chaque période de 5 minutes après avoir au préalable rincé leur bouche avec de l'eau courante de façon à minimiser le nombre de cellules squameuses provenant de la cavité buccale [3]. Il est important de standardiser le temps d'induction car la composition cellulaire est différente entre les expectorations recueillies après 5 min et celles obtenues après 10 à 20 min [4]. Dans notre expérience il est rare que les sujets n'arrivent pas à produire des expectorations après 20 minutes. Le taux d'échec est voisin de 10 % chez des sujets sains et des asthmatiques légers à modérés mais peut atteindre 20 à 30 % chez des asthmatiques sévères. Etant donné le pouvoir bronchoconstricteur du liquide hypertonique chez l'asthmatique, un monitoring de la fonction respiratoire est nécessaire durant l'induction. La mesure du volume expiratoire maximal seconde (VEMS) est recommandée [5] mais le débit expiratoire de pointe (DEP) est une alternative valable [3]. Une chute du VEMS de plus de 20 % ou une valeur de DEP < 250 l/min est une contre-indication à la poursuite de l'inhalation de liquide hypertonique. Afin de prévenir, ou du moins de limiter le bronchospasme, une prémédication avec inhalation de 400 µg de salbutamol est recommandée à moins que la réactivité bronchique au liquide hypertonique ne soit une variable de l'étude. Moyennant cette prémédication l'inhalation de liquide hypertonique est généralement assez bien tolérée même chez les asthmatiques sévères bien que des chutes de VEMS ou de DEP de plus de 20 % puissent s'observer [3,6]. Aussi avons nous comparé le liquide salin isotonique et le liquide hypertonique en tant qu'inducteur d'expectorations chez des asthmatiques modérés à sévères rapportant une histoire clinique de toux productive [7]. Il est apparu que le liquide isotonique nébulisé à l'aide d'un nébuliseur ultrasonique était capable d'induire une production suffisante d'expectorations chez ce type de patients même si le volume d'expectorations était inférieur à celui obtenu avec le liquide hypertonique. L'observation intéressante de cette étude était que les compositions cellulaires et biochimiques (ECP, gélatinase B, albumine) des expectorations induites par ces deux types de stimuli n'étaient pas significativement différentes alors que la chute du DEP était clairement plus marquée lors de l'induction avec du liquide hypertonique. Ceci démontre que le liquide salin isotonique peut représenter une alternative sécurisante au liquide hypertonique chez les patients modérés à sévères ayant une histoire de toux productive. Ceci montre également que l'inhalation de liquide hypertonique en elle-même n'est pas cause de

variations significatives de la cellularité ni de la biochimie de la phase fluide des expectorations.

Traitement des expectorations (« processing »)

Les expectorations collectées dans des boîtes de Petri ou des récipients en plastique sont transvasées dans des tubes en polypropylène de 50 ml, pesées et incubées pendant 30 min à température du laboratoire avec un volume équivalent d'un agent mucolytique fournisseur de groupe SH qui peut être soit du dithioerytritol (DTE, 0,01M) soit son isomère le dithiothreitol (DTT). Cette incubation permet d'homogénéiser les expectorations grâce à la rupture des ponts disulfures présents entre les protéines du mucus bronchique. Après incubation avec le DTE, les expectorations sont centrifugées à 1 500 rpm pendant 10 min à 4 °C de façon à séparer la phase cellulaire de la phase fluide. La phase cellulaire est utilisée pour le comptage du nombre total de cellules à l'aide d'un hémocytomètre manuel tandis que la phase fluide est conservée à -20 °C (ou -70 °C) en vue de procéder à des analyses biochimiques. Lorsqu'elle est comparée à celle du PBS (phosphate buffered saline), un tampon cellulaire, l'utilisation de DTE (ou DTT) augmente la récupération cellulaire et la qualité des lames utilisées pour le comptage cellulaire sans modifier la proportion des différentes cellules inflammatoires recueillies [8]. Elle accroît également la récupération de larges molécules tels que la tryptase, l'« eosinophil cationic protein » (ECP) ou les immunoglobulines A sans en modifier l'immunoassay [8]. L'histamine, un médiateur inflammatoire classique de la réaction allergique est, quant à lui, retrouvé en quantité réduite, mais toujours détectable, dans les échantillons traités par DTE sans que cette réduction ne puisse être imputable à une perturbation de l'immunoassay [8]. La détection de cytokines dans les échantillons traités par DTE ou DTT apparaît nettement plus hasardeuse et moins reproductible [3]. Il est conseillé de ne pas traiter les échantillons avec des agents mucolytiques lorsqu'on envisage de mesurer les cytokines. Dans ces conditions pour obtenir un surnageant suffisamment fluide et débarrassé d'amas de mucus il faut recommander soit une ultra-centrifugation [9], soit une dilution de l'échantillon d'expectorations par un facteur 10 avec du PBS [10].

La température à laquelle l'échantillon des expectorations est incubé avec l'agent mucolytique, 37 °C vs 22 °C, n'influence pas significativement la quantité de cellules récupérées, ni la formule cytologique. De plus les taux d'ECP ou d'histamine apparaissent similaires dans les deux circonstances. Néanmoins le DTE, à des concentrations telles qu'utilisées pour homogénéiser les expectorations, est capable d'activer *in vitro* certaines cellules tels que les basophiles et les mastocytes pulmonaires lorsque les expériences sont conduites à 37 °C [8]. Dès lors il paraît raisonnable de recommander que l'incubation se fasse à température de laboratoire plutôt qu'à 37 °C si on veut éviter d'éventuels phénomènes d'activation cellulaire durant la procédure d'homogénéisation.

L'EXPECTORATION INDUITE COMME OUTIL DE RECHERCHE POUR CARACTÉRISER L'INFLAMMATION BRONCHIQUE ET EN APPRÉHENDER SES MÉCANISMES

Cytologie

En comparant 22 asthmatiques atopiques légers à modérés 14 sujets sains non atopiques nous avons confirmé que les asthmatiques étaient caractérisés par une augmentation de la proportion et du nombre absolu d'éosinophiles dans leurs expectorations allant de pair avec une réduction des macrophages [3]. Nous avons ensuite étudié la distribution de l'éosinophilie de l'expectorant dans une population de 118 asthmatiques non fumeurs légers à modérés et nous l'avons comparée à celle retrouvée dans une large série de sujets sains non atopiques non fumeurs. Chez ces derniers la proportion d'éosinophiles dépassait exceptionnellement 2 %. La proportion d'éosinophiles chez les asthmatiques non traités par corticoïdes variait de 0 à 75 %. La moitié des ces sujets avait une éosinophilie > 5 % et qui dépassait 20 % dans 17 % des cas. A l'inverse 31 % des asthmatiques légers à modérés non traités par corticostéroïdes n'avaient pas d'éosinophilie significative (> 2 %) dans leurs expectorations [11]. Globalement nos résultats confirment les données des biopsies [12] et du lavage broncho-alvéolaire [12]. Ainsi l'éosinophilie est présente dans tous les compartiments des voies aériennes chez la plupart des asthmatiques attestant que l'asthme est une bronchite et une bronchiolite à éosinophiles.

Au contraire de la fraction granulocytaire (neutrophiles et éosinophiles), la fraction lymphocytaire est peu représentée dans les expectorations puisque la proportion de lymphocytes est voisine de 1-2 % et dépasse rarement 5 % [8]. Bien que la proportion de lymphocytes dans les expectorations soit inférieure à celle du lavage broncho-alvéolaire les lymphocytes sont cependant analysables par cytométrie de flux. Ainsi, par une analyse détaillée en cytométrie de flux sur les cellules des expectorations, nous avons démontré que les asthmatiques étaient caractérisés par une proportion accrue de lymphocytes T CD4 et de lymphocytes T exprimant le récepteur CD54 (ICAM-1) alors que la proportion de cellules NK était diminuée [3]. Ces résultats s'accordent avec le concept selon lequel l'asthme est une maladie inflammatoire bronchique contrôlée par des lymphocytes CD4 activés [13]. L'augmentation de la proportion de lymphocytes T exprimant ICAM-1 et la réduction de cellules

NK pourraient favoriser les infections virales à rhinovirus dont on sait qu'elles précipitent les exacerbations asthmatiques [14]. D'autres auteurs ont retrouvé une augmentation de la proportion de lymphocytes B CD 19 corrélée à l'éosinophilie des expectorations [15].

Le taux de neutrophiles n'est généralement pas accru dans une population d'asthmatiques non sélectionnée mais devient supérieur à celui de sujets sains si on en exclut les asthmatiques ayant des signes d'activation mastocytaire [16].

Enfin des cellules recueillies dans les expectorations peuvent être cultivées *in vitro* et leurs propriétés fonctionnelles étudiées. Ainsi nous avons montré des variations significatives de la production de cytokines après inhalation d'allergène chez les asthmatiques atopiques sensibilisés. Ceux-ci démontraient un accroissement de la production spontanée d'interleukine-4 et d'interleukine-6 à partir des cellules de l'expectorant obtenues 6 heures après l'inhalation d'allergène. De plus la production d'interleukine-4 apparaissait proportionnelle au degré d'éosinophilie des expectorations et à l'intensité de la phase bronchospastique tardive [17].

Tableau I. : Marqueurs biochimiques évalués dans la phase fluide des expectorations.

Marqueurs biochimiques	Situation dans l'asthme
« Eosinophil cationic protein »	—
Tryptase	—
Myeloperoxidase	N
Histamine	—
Pièce sécrétoire	N
Immunoglobulines A	—
Albumine	—
Interleukine-8	N
Interleukine-8/IgA	—
RANTES	DT
Interleukine-5	DT
GM-CSF	DT
sICAM-1	—
MMP-2	—
MMP-9	—

— : Augmenté. N : Valeurs normales. DT : Difficilement détectable.

Marqueurs biochimiques de la phase fluide

De nombreux marqueurs biochimiques peuvent être mesurés dans la phase fluide des expectorations (*tableau I*) [3]. Ainsi nous avons montré que les asthmatiques étaient caractérisés par une augmentation du taux d'ECP et de tryptase indiquant une activation des éosinophiles et des mastocytes. De plus le taux d'albumine était aussi accru reflétant une augmentation de l'exsudation plasmatique dans les voies aériennes. Ce n'était par contre pas le cas du taux de myéloperoxydase (MPO), un marqueur d'activation des neutrophiles.

Les immunoglobulines A dont la synthèse est locale et dépendante des lymphocytes B de la muqueuse respiratoire sont retrouvées en quantité accrue dans les expectorations des asthmatiques ce qui peut sans doute favoriser la dégranulation des éosinophiles et la libération consécutive de protéines toxiques telles que l'ECP. De façon intéressante ces immunoglobulines peuvent se complexer à des cytokines telle que par exemple l'interleukine-8 [3].

Reflétant une accentuation de la libération à partir des membranes cellulaires (« shedding »), les asthmatiques montrent dans leurs expectorations, une élévation des taux de la fraction soluble de l'« intercellular adhesion molecule-1 » (sICAM-1). Les cellules à partir desquelles cette protéine est relarguée sont probablement multiples et la signification physiologique de cette augmentation de la fraction soluble de ICAM-1 reste mal comprise.

Les asthmatiques ont aussi une augmentation des taux de certaines protéases dans leurs expectorations et notamment des métalloprotéases matricielles 2 (MMP-2) et 9 (MMP-9 ou encore gélatinase B) révélées par leurs activités gélatinolytiques [18]. De plus les taux de MMP-9, mais pas ceux de son inhibiteur naturel le TIMP-1 (tissu inhibitor metalloprotease-1), sont encore davantage accrus après exposition à un allergène chez les asthmatiques sensibilisés [19]. En vertu de leurs propriétés lyriques mais aussi trophiques sur les structures conjonctive et musculaire lisse ces métalloprotéases pourraient jouer un rôle critique dans le remodelage des voies aériennes des asthmatiques [20].

Mécanismes impliqués dans l'éosinophilie bronchique

La migration transendothéliale des éosinophiles à partir du torrent circulatoire est la première étape conduisant au recrutement d'éosinophiles. Cette migration est favorisée par l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales qui interagissent avec des récepteurs à la surface des leukocytes. Parmi les molécules d'adhésion la « *vascular intercellular adhesion molecule-1* » (VCAM-1) a la particularité de se lier au VLA-4 (very late antigen-4) présent à la surface des éosinophiles mais pas des neutrophiles. L'expression de VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales est fortement stimulée par l'interleukine-4 [21]. Nous avons cherché à préciser le profil de production en cytokines à partir des leukocytes circulants provenant d'asthmatiques et des sujets sains. Il est apparu que les asthmatiques atopiques produisaient davantage d'interleukine-4 que les sujets sains que ce soit spontanément ou après stimulation avec de l'endotoxine. De plus nous avons retrouvé une corrélation entre la production d'interleukine-4 par les leukocytes circulants et le degré d'éosinophilie dans les voies aériennes accréditant l'hypothèse d'une contribution de l'interleukine-4 à l'éosinophilie bronchique [22]. Une fois passé la membrane endothéliale les éosinophiles doivent migrer vers les tissus en réponse à des agents chimio-tactiques. Nous avons montré que la phase fluide des expectorations contenait une activité chimiotactique pour les éosinophiles non retrouvée chez les sujets normaux non atopiques [3]. Ainsi notre observation complète celle démontrant que les expectorations d'asthmatiques contiennent des facteurs s'opposant à l'apoptose des éosinophiles et en particulier du GM-CSF et de l'interleukine-5 [23]. La caractérisation de ces facteurs chimiotactiques reste à établir par des expériences d'inhibition sélective. Néanmoins on peut proposer certains candidats en se basant sur leurs propriétés chimiotactiques démontrées *in vitro* et sur la bonne corrélation entre leur taux respectif et le nombre d'éosinophiles retrouvés dans les expectorations. Ainsi la tryptase [16] et les complexes IL-8/IgA [3] pourraient expliquer une partie de l'activité chimiotactique pour les éosinophiles contenue dans les expectorations d'asthmatiques. L'association entre l'activation mastocytaire reflétée par un taux élevé de tryptase et l'éosinophilie des expectorations a également été observée dans un groupe de patients atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive post tabagique [24].

La démonstration de l'existence d'une activité chimiotactique dans la phase fluide des expectorations était l'opportunité d'en évaluer sa modulation par des traitements antiasthmatiques. Ainsi nous avons montré qu'un traitement par théophylline réduisait l'activité chimiotactique contenue dans les expectorations des asthmatiques en même temps qu'il abaissait modérément le taux d'éosinophiles dans les expectorations [25]. Cette propriété n'était pas partagée par les corticostéroïdes inhalés à doses modérées qui, bien que capables de réduire le taux d'éosinophiles de l'expectorat de plus de 50 %, ne diminuaient pas l'activité chimiotactique [26]. Ceci suggère que le principal mécanisme par lequel les corticostéroïdes abaissent le taux d'éosinophiles dans les voies aériennes est un effet pro-apoptotique [27]. Cette absence d'effet des corticoïdes sur l'activité chimiotactique pourrait expliquer la persistance d'une éosinophilie bronchique significative chez certains patients traités par corticoïdes [28]. Ces observations suggèrent une complémentarité d'action entre la théophylline et les corticostéroïdes quant aux mécanismes respectifs par lesquels ils s'opposent à l'hyperéosinophilie dans les voies aériennes des asthmatiques.

Le ralentissement de l'apoptose des éosinophiles chez les asthmatiques n'est pas exclusivement lié à l'interleukine-5 et au GM-CSF. Ainsi nous avons montré que la fixation du CD40 ligand au CD40 exprimé à la surface des éosinophiles en culture induisait l'expression intracellulaire d'une protéine anti-apoptotique CIAP2 (cellular inhibitor apoptosis protein-2). De plus nous avons montré que les asthmatiques exprimaient bien davantage que les sujets sains le CD40 et le CIAP2 à la surface et dans les cellules de leurs expectorations. De façon intéressante l'expression de CIAP2 était étroitement corrélée au degré d'éosinophilie des expectorations, suggérant que ce mécanisme anti-apoptotique pourrait être opérant *in vivo* chez les asthmatiques [29].

SIGNIFICATION CLINIQUE DE L'INFLAMMATION BRONCHIQUE

Si l'existence d'une inflammation bronchique à éosinophiles dans l'asthme est un fait incontestable, le rôle qu'elle joue dans l'expression symptomatique et les désordres fonctionnels respiratoires reste mal précisé. Les études transversales permettent de rechercher des associations entre degré d'inflammation des voies aériennes et la sévérité de la maladie asthmatique. Les données obtenues à partir des biopsies bronchiques ou du lavage bronchoalvéolaire ont fourni des résultats contradictoires vraisemblablement parce que le nombre de sujets étudiés dans chaque série était limité en raison du caractère invasif de l'endoscopie [30]. La technique des expectorations induites nous a donné l'opportunité d'évaluer l'inflammation bronchique dans une large série de sujets asthmatiques atopiques incluant 78 sujets dont la maladie était de sévérité très différente [28]. Dans ce travail nous avons adopté les critères GINA (Global Initiative for Asthma) pour classer les sujets en fonction de la sévérité de leur asthme. Ainsi avons nous distingué des asthmes intermittents, des asthmes légers à modérés et des asthmes sévères. Cette classification s'est basée uniquement sur les symptômes, les paramètres de spirométrie et la variabilité diurne du débit expiratoire de pointe (DEP). Les sujets ont été observés pendant 2 semaines avant l'induction d'expectorations sans modifier leur traitement de fond habituel. Durant cette période les patients ont consigné dans un carnet leurs symptômes, leurs valeurs de DEP et leur consommation de bronchodilatateurs. Leur réactivité bronchique à la métacholine a aussi été évaluée par une mesure de la PC20M (concentration de métacholine nécessaire à faire chuter le VEMS de 20 % par rapport à sa valeur de base). Les résultats ont montré que les asthmatiques présentaient des taux d'éosinophiles et d'ECP dans leurs expectorations proportionnels à la sévérité de leur maladie [28] (*fig. 1*). Ainsi le degré d'éosinophilie et le taux d'ECP dans les expectorations étaient d'autant plus élevés que l'asthme était sévère. Il existait toutefois un chevauchement non négligeable entre les différents groupes d'asthme. Il était dès lors impossible d'assigner un asthmatique à une classe particulière en fonction de son taux d'éosinophiles dans les expectorations. Le degré d'exsudation plasmatique dans les voies aériennes reflété par le taux d'albumine était aussi proportionnel à la sévérité de la maladie. En revanche le taux de tryptase, indice de l'activation mastocytaire, était essentiellement augmenté dans l'asthme léger à modéré. Les taux de neutrophiles et de MPO de l'expectorat étaient proportionnels à la sévérité de la maladie chez les asthmatiques mais pas significativement différents de ceux de la population contrôle.

Lorsque nous avons raffiné l'analyse et établi les corrélations entre l'éosinophilie de l'expectorat et les différents paramètres qui contribuent à la définition d'une classe d'asthme, il est apparu que la variabilité du débit expiratoire de pointe et le score symptomatique étaient davantage corrélés au nombre d'éosinophiles et au taux d'ECP que ne l'était le VEMS de base.

Chez des patients non traités par stéroïdes inhalés et ayant un VEMS > 70 % nous avons retrouvé une corrélation inverse entre le taux d'éosinophiles dans les expectorations et la réactivité bronchique à la métacholine évaluée par la mesure de la PC20M (*fig. 2*). Après régression multiple tenant compte des autres cellules des expectorations et du calibre bronchique de base, il est apparu que l'éosinophilie de l'expectorat rendait compte de 16 % de la variation de la PC20 méthacholine [11]. La relation entre éosinophilie de l'expectorat et réactivité bronchique a été également étudiée dans des essais longitudinaux évaluant l'impact de médicaments sur ces deux variables. Ainsi les corticoïdes inhalés administrés pendant 4 semaines (800 µg/J de budésonide) réduisent le taux d'éosinophiles de l'expectorat et diminuent le degré de réactivité bronchique [26]. Par contre la théophylline (7 µg/ml), si elle réduit le taux d'éosinophiles des expectorations, est incapable d'atténuer l'hyperactivité bronchique [25] (*fig. 3*). La dissociation entre le changement du taux d'éosinophiles et la variation de la réactivité bronchique a été très récemment confirmée par une étude avec des anticorps monoclonaux anti-interleukine-5. Ceux-ci réduisent de façon drastique le taux d'éosinophiles dans le sang et les expectorations mais sont inopérants pour abaisser le niveau de réactivité bronchique à l'histamine ou prévenir l'émergence d'un bronchospasme tardif après inhalation d'allergène [31]. A l'inverse les patients atteints de maladie de Crohn peuvent avoir des taux accrus d'éosinophiles et d'ECP dans leurs expectorations sans symptôme d'asthme ni hyperactivité bronchique marquée [32]. Ces observations mettent en doute le rôle déterminant des éosinophiles dans l'expression clinique de la maladie asthmatique.

Fig. 1. : Taux d'éosinophiles dans les expectorations induites de sujets sains et d'asthmatiques de sévérité variable classés en fonction des critères du GINA (Global Initiative for Asthma) [28].

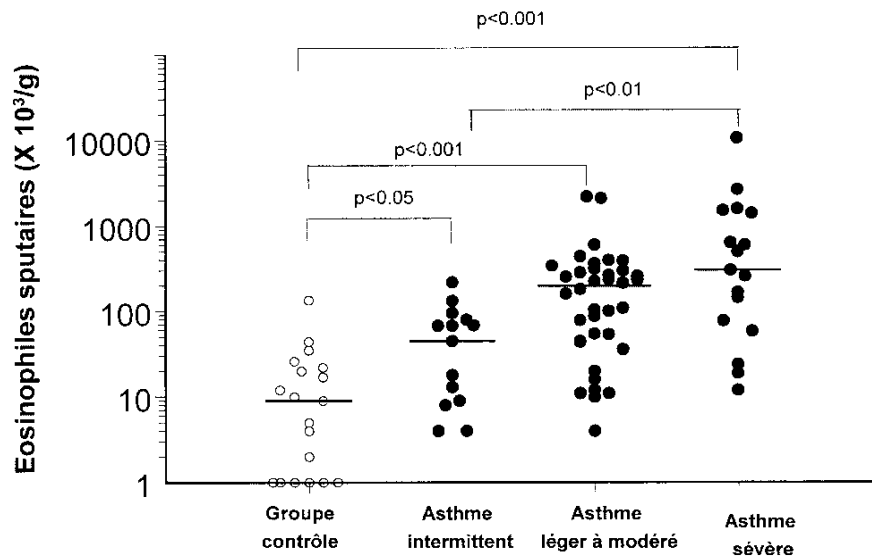
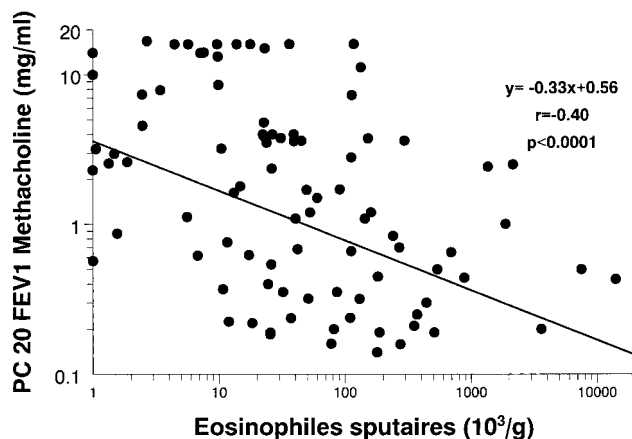


Fig. 2. : Corrélation inverse entre le taux d'éosinophiles dans les expectorations et la réactivité bronchique à la méthacholine évaluée par la mesure de la PC₂₀ chez des asthmatiques légers à modérés dont le VEMS était > 70 % des valeurs prédites [11].

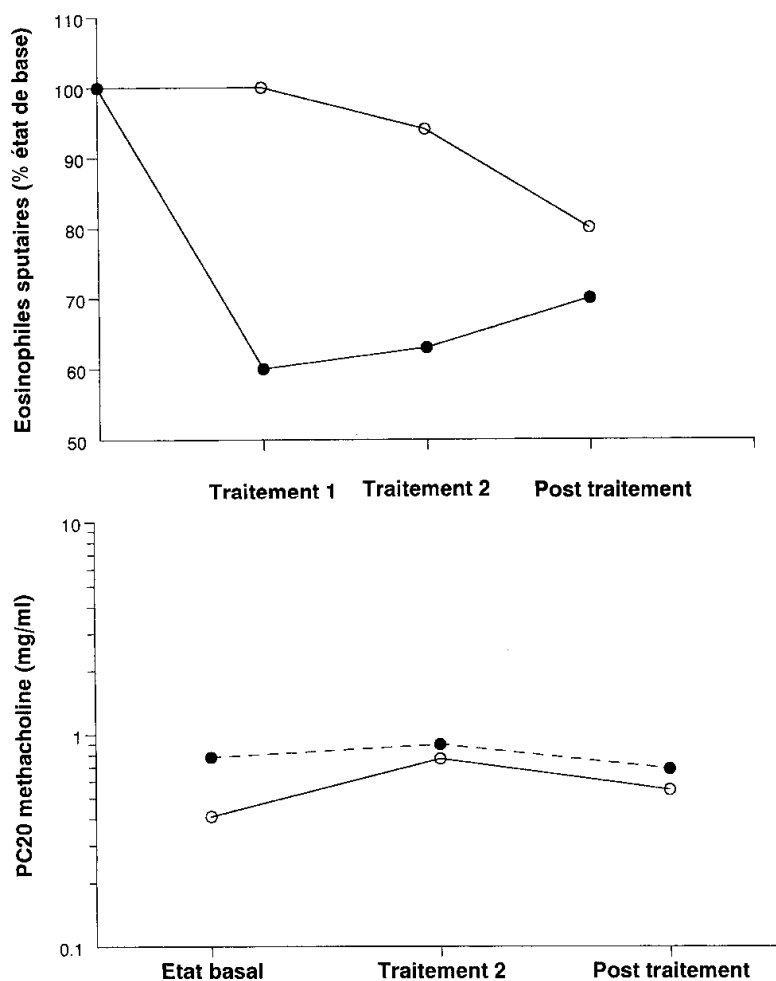


PERSPECTIVES D'AVENIR EN PRATIQUE CLINIQUE

La possible dissociation entre les troubles fonctionnels respiratoires et les taux d'éosinophiles dans les expectorations n'exclut néanmoins pas que l'évaluation du taux d'éosinophiles dans les voies aériennes puisse être un élément clinique appréciable. En effet, il semble, qu'après la mesure de l'hyperréactivité bronchique non spécifique, la détermination du taux d'éosinophiles dans les expectorations soit le test le plus valide pour diagnostiquer un asthme [32]. En cela le taux d'éosinophiles des expectorations surpasse l'enregistrement de la variabilité des débits expiratoires de pointe, le degré de réversibilité à un bronchodilatateur ou encore le taux d'éosinophiles circulants [32, 33]. L'éosinophilie des expectorations semble aussi constituer un marqueur intéressant comme élément prédictif de la réponse aux corticostéroïdes inhalés dans l'asthme. Ainsi un haut degré d'éosinophiles dans les expectorations prédit une bonne réponse clinique et fonctionnelle respiratoire aux corticoïdes inhalés. Par contre les asthmes sans éosinophile dans les voies aériennes semble résister à ce type de traitement [34]. La confirmation de cette observation pourrait avoir des conséquences considérables sur l'attitude thérapeutique des cliniciens dans un avenir proche car elle signifierait qu'environ un tiers des asthmatiques ne tirerait pas bénéfice d'un traitement par corticoïdes inhalés. La variabilité de la réponse aux corticoïdes inhalés chez les asthmatiques a d'ailleurs été récemment confirmée dans une étude américaine multicentrique [35]. Par

ailleurs chez les asthmatiques traités et stabilisés par corticoïdes inhalés, la persistance d'un taux d'éosinophiles élevés dans les expectorations est un facteur prédictif d'exacerbation lors de l'arrêt [36] ou de la réduction progressive des doses [37]. Une étude récente a quantifié la valeur prédictive de l'éosinophilie des expectorations concernant l'émergence d'une exacerbation lors d'une réduction progressive des doses de stéroïdes inhalés. Ainsi un taux d'éosinophiles de 6,3 % a une sensibilité de 90 % alors qu'un taux de 13 % a une spécificité de 90 % [38]. A ce titre la valeur prédictive du taux d'éosinophiles semble supérieure à celle du taux NO dans les gaz expirés [38], qui représente également un marqueur non invasif de l'inflammation des voies aériennes chez les asthmatiques [39]. Les valeurs respectives du taux d'éosinophiles dans les expectorations et de celui de NO dans les gaz expirés comme éléments prédictifs d'une réponse au traitement et comme outils de surveillance de la maladie asthmatique méritent d'être comparés davantage dans de nouvelles études prospectives [40].

Fig. 3. : Evolution contrastée du taux d'éosinophiles dans les expectorations (haut de la figure) et de la PC20 méthacholine (bas de la figure) chez des asthmatiques traités par théophylline (2×300 mg/J) (signes pleins) vs placebo (signes creux). Traitement 1 signifie après 2 semaines de traitement tandis que traitement 2 signifie après 4 semaines de traitement. Les points représentent les valeurs moyennes [25].



CONCLUSIONS

La technique des expectorations induites s'est récemment imposée comme une technique de choix dans l'exploration de l'inflammation bronchique dans l'asthme. Elle a permis de mieux situer le rôle véritable de celle-ci dans l'expression clinique de la maladie et pourrait se révéler un instrument intéressant dans l'évaluation et le monitoring de l'asthme en pratique clinique au même titre que les symptômes et les anomalies fonctionnelles respiratoires [41, 42].

Références

- 1 Djukanovic R, Roche WR, Wilson JW, Beasley C, Twentymen O, Howarth P, Holgate S : Mucosal inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1990 ; 142 : 434-57.
- 2 Pin I, Gibson P, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg J, Har-greave F, Dolovich J : Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992 ; 47 : 25-9.
- 3 Louis R, Shute J, Biagi S, Stanciu L, Marelli F, Tenor H, Hidi R, Djukanovic R : Cell infiltration, ICAM-1 expression, and eosinophil chemotactic activity in asthmatic sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 1997 ; 155:466-72.
- 4 Holz O, Jörres RA, Koschyk S, Speckin P, Welker L, Magnussen H : Changes in sputum composition during sputum induction in healthy and asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy* 1998 ; 28 : 284-92.
- 5 Wong H, Fahy JV : Safety of one method of sputum induction in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1997 ; 156 : 299-303.
- 6 Delafuente P, Romagnoli M, Godard P, Bousquet J, Chanez P : Safety of inducing sputum in patients with asthma of varying severity. *Am J Respir Crit Care Med* 1998 ; 157: 1127-30.
- 7 Cataldo D, Foidart JM, Lau L, Bartsch P, Djukanovic R, Louis R : Induced sputum : comparison between isotonic and hypertonic saline in asthma. *Chest* 2001 ; 120: 1815-21.
- 8 Louis R, Shute J, Goldring K, Perks B, Lau L, Radermecker M, Djukanovic R : The effect of processing on inflammatory markers in induced sputum. *Eur Respir J* 1999 ; 13 : 660-7.
- 9 Keatings V, Barnes P : Differences in interleukin-8 and Tumor Necrosis factor- α in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996 ; 153 : 530-4.
- 10 Kono S, Gonokami Y, Kurokawa M, Kawazu, Asano K, Okamoto K, Adachi M : Cytokine concentrations in sputum of asthmatic patients. *Int Arch Allergy Immunol* 1996 ; 109 : 73-8.
- 11 Louis R, Sele J, Henket M, Cataldo D, Bettiol J, Bartsch P : Sputum eosinophil counts in a large population of mild to moderate steroid naïve asthmatics : distribution and relationship with methacholine bronchial hyperresponsiveness. *Allergy* 2002 ; 57: 907-12.
- 12 Bousquet J, Chanez P, Lacoste J, Barneon G, Chavarian N, Enander I, Venge P, Alhstedt S, Simony-Lafontaine, Godard F, Michel F : Eosinophilic inflammation in asthma. *New Engl J Med* 1990 ; 323 : 1033-9.
- 13 Kay AB : Allergy and allergic diseases : Part I. *New Engl J Med* 2001 ; 344:30-7.
- 14 Johnston S, Pattermore P, Sanderson G, Smith S, Lampe F, Josephs L, Symington P, Toole S, Mynt S, Tyrell D, Holgate S : Community study of rôle of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *Brit Med J* 1995 ; 310 : 1225-8.
- 15 Kidney J, Wong AJ, Efthimiadis A, Morris M, Sears M, Dolovich J, Hargreave F : Elevated B cells in sputum of asthmatics. Close correlation with eosinophils. *Am J Respir Crit Care Med* 1996 ; 153 : 540-4.
- 16 Bettiol J, Radermecker M, Sele J, Henket M, Cataldo D, Louis R : Airway mast cell activation in asthmatics is associated with selective sputum eosinophilia. *Allergy* 1999 ; 54 : 1118-93.
- 17 Bettiol J, Sele J, Henket M, Louis E, Malaise M, Bartsch P, Louis R : Cytokine production from sputum cells after allergenic challenge in atopic asthmatics. *Allergy* 2002 ; 57: 1145-50.
- 18 Cataldo D, Munaut C, Noel A, Frankenne F, Bartsch P, Foidart JM, Louis R : MMP-2 and MMP-9-linked gelatinolytic activity in the sputum from patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Int Arch Allergy Immunol* 2000 ; 123 : 259-67.
- 19 Cataldo D, Bettiol J, Foidart JM, Noël A, Bartsch P, Louis R : MMP-9, but not TIMP-1, increases in sputum from asthmatics after allergen challenge. *Chest* 2002 ; 122 : 1553-9.
- 20 Bousquet J, Chanez P, Lacoste J et coll. : Asthma: a disease remodelling the airways. *Allergy* 1992 ; 47 : 3-11.
- 21 Nickel R, Beck L, Stellato C, Shleimer R : Chemokines and allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 1999 ; 104 : 723-42.
- 22 Bettiol J, Degroote D, Gevaerts Y, Louis E, Malaise M, Bartsch P, Louis R : Cytokine production from peripheral whole blood in atopic and non atopic asthmatics : relationship with blood and sputum eosinophilia and serum IgE levels. *Allergy* 2000 ; 55 : 1134-41.
- 23 Adachi T, Moijima S, Hirata A, Fukuda T, Makino S : Eosinophil viability-enhancing activity in sputum patients with bronchial asthma. Contributions of interleukin-5 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Am J Respir Crit Care Med* 1995 ; 151 : 618-23.

- 24 Louis R, Cataldo D, Buckley M, Sele J, Henket M, Bartsch P, Djukanovic R : Evidence of mast cell activation in a subset of patients with eosinophil chronic obstructive lung disease. *Eur Respir J* 2002 ; 20 : 325-31.
- 25 Louis R, Bettiol J, Cataldo D, Sele J, Henket M, Radermecker M : Effect of a 4 week treatment with theophylline on sputum eosinophilia and sputum eosinophil chemotactic activity in steroid naive asthmatics. *Clin Exp Allergy* 2000 ; 1151-60.
- 26 Louis R, Shute J, Quaden C, Cataldo D, Radermecker M, Djukanovic R : Effect of inhaled corticosteroids on sputum eosinophil counts and sputum eosinophil chemotactic factors in mild to moderate steroid naive asthmatics. *Eur Respir J* 1998 ; 12, Suppl 28 : 437s.
- 27 Wooley K, Gibson P, Carty K, Wilson A, Twadell S, Wooley M : Eosinophil apoptosis and the resolution of airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996 ; 154 : 237-43.
- 28 Louis R, Lau L, Bron A, Roldaan A, Radermecker M, Djukanovic R : The relationship between airways inflammation and asthma severity. *Am J Respir Crit Care Med* 2000 ; 16 : 9-16.
- 29 Bureau F, Seumois G, Jaspard F, Vanderplasschen A, Detry B, Pastoret PP, Louis R, Lekeux P : CD40 engagement enhances eosinophil survival through induction of cellular inhibitor of apoptosis protein 2 expression : possible involvement in allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2002 ; 110:443-9.
- 30 Brusasco V, Crimi E, Pellegrino R : Airway hyperresponsiveness in asthma : not just a matter of airway inflammation. *Thorax* 1998 ; 53 : 992-8.
- 31 Leckie M, ten Brincke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor B, Walls CM, Mathur AK, Cowley H, Chung KF, Djukanovic R, Hansel T, Holgate S, Sterck P, Barnes P : Effects of interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyperresponsiveness and the late asthmatic response. *lancet* 2000 ; 356 : 2144-8.
- 32 Louis E, Louis R, Shute J, Lau L, Franchimont D, Lamproye A, Radermecker M, Djukanovic R, Belaiche J : Bronchial eosinophilic infiltration in Crohn's disease in the absence of pulmonary disease. *Clin Exp Allergy* 1999 ; 29 : 660-6.
- 33 Hunter C, Brightling C, Woltmann G, Wardlaw A, Pavord I : A comparison of the validity of different diagnostic tests in adults with asthma. *Chest* 2002 ; 121 : 1051-7.
- 34 Pizzichini E, Pizzichini M, Efthimiadis A, Dolovich J, Hargreave F : Measuring airway inflammation in asthma : eosinophils and eosinophilic cationic protein in induced sputum compared with peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol* 1991 ; 99 : 539-44.
- 35 Pavord I, Brightling C, Woltman G, Wardlaw A : Non eosinophilic corticosteroid unresponsive asthma. *lancet* 1999 ; 353 : 2213-4.
- 36 Szeffler S, Martin R, Sharp King T, Boushey H, Cherniack R, Chinchilli V, Craig T, Dolovich M, Drazen J, Fagan J, Fahy J, Fish J, Ford J, Israel E, Kiley J, Kraft M, Lazarus S, Lemanske R, Mauger E, Peters S, Sorkness C : Significant variability in response to inhaled corticosteroids for persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002 ; 109 : 410-8.
- 37 Giannini D, Di Franco A, Cianchetti S, Bacci E, Dente F, Vaggagini B, Paggiaro P : Analysis of induced sputum before and after withdrawal of treatment with inhaled corticosteroids in asthmatic patients. *Clin Exp Allergy* 2000 ; 30 : 1177-84.
- 38 Jatakanon A, Lim S, Barnes P : Changes in sputum eosinophils predict loss of asthma control. *Am J Respir Crit Care Med* 2000 ; 161 : 64-72.
- 39 Leuppi J, Salome G, Jenkins G, Anderson S, Xuan W, Marks G, Koskela H, Brannan J, Freed R, Andersson M, Chan HK, Woolcock A :
Predictive markers of asthma exacerbation during stepwise dose reduction of inhaled corticosteroids. *Am J Respir Crit Care Med* 2001 ; 163 : 406-12.
- 40 Kharitonov S, Barnes P : Exhaled markers of pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001 ; 163 : 1693-722.
- 41 Chanez P, Godard P : L'analyse de l'expectoration induite dans l'asthme. *Rev Mai Respir* 1999 ; 19 : 689-92.
- 42 Boniface S, Donati Y, Romanet-Manent S, Lorec AM, Dupuy P, Ma-messier E, Badier M, El Blaze M, Koscher V, Vervloet D, Magnan A : L'analyse de l'expectoration induite dans l'asthme permet une nouvelle approche de l'inflammation. *Rev Mai Respir* 2002 ; 19 : 747-59.