

CATHERINE LAPRISE

**RÔLE DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX ET GÉNÉTIQUES DANS LE
DÉVELOPPEMENT DE L'ATOPIE, DE L'HYPERRÉACTIVITÉ BRONCHIQUE
ET DE L'ASTHME SYMPTOMATIQUE**

Thèse
présentée
à la Faculté des études supérieures
de l'Université Laval
pour l'obtention
du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

NOVEMBRE 1997

© Catherine Laprise, 1997



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-25430-5

Canada

*À Manu,
sa simple présence rend le monde meilleur...*

RÉSUMÉ

L'asthme est un problème de santé majeur au Québec et l'hyperréactivité bronchique (HRB) est la principale caractéristique physiologique de cette affection. L'atopie contribue au développement de l'HRB et de l'asthme. Les relations qui existent entre l'atopie, l'HRB et les symptômes asthmatiques sont encore à préciser. Au cours de ces études, nous avons tenté d'évaluer le rôle de certains facteurs environnementaux et héréditaires dans la physiopathologie de l'atopie, de l'HRB et de l'asthme en plus de préciser les interrelations entre ces conditions. Nos observations ont confirmé le rôle important de la sensibilisation aux allergènes domestiques dans le développement de l'asthme symptomatique. Nous avons documenté les caractéristiques cliniques, fonctionnelles et morphologiques de l'HRB asymptomatique. Nous avons déterminé que, chez le sujet atopique, l'HRB asymptomatique peut être une étape préliminaire au développement de l'asthme et les facteurs de risque associés au développement des symptômes d'asthme dans ce sous-groupe. Finalement, nous avons validé l'association et démontré une liaison significative entre l'atopie, l'HRB et le polymorphisme Glu237Gly de la sous-unité β du récepteur à haute affinité pour les IgE (Fc ϵ RI- β), suggérant la présence d'un allèle de susceptibilité pour ces affections sur le chromosome 11q. Ces travaux permettent d'envisager diverses interventions qui pourraient aider à prévenir le développement de l'asthme.

RÉSUMÉ (Version longue)

L'asthme est un des principaux problèmes de santé au Québec et on estime que 5 à 10% de la population présenteront cette affection. L'asthme est une maladie chronique caractérisée par une augmentation de la sensibilité de l'arbre trachéobronchique face à divers stimuli. Au niveau histopathologique, l'asthme est considéré comme une affection inflammatoire chronique. Il a été suggéré que le développement de cette inflammation résulterait de l'influence de certains facteurs environnementaux chez les individus génétiquement prédisposés. Les multiples facteurs prédisposant à l'asthme et les interrelations entre l'hyperréactivité bronchique (HRB), l'atopie et l'asthme demeurent à préciser. Ce programme de recherche visait à mieux caractériser les associations entre l'HRB, l'atopie et la symptomatologie asthmatique et à préciser l'implication de certains paramètres environnementaux et héréditaires dans l'expression phénotypique de l'asthme.

Nous avons évalué le type de sensibilité aux allergènes en association avec le phénotype respiratoire des individus. L'analyse des tests cutanés d'allergie de 3371 sujets a permis de démontrer que la sensibilisation aux allergènes domestiques est en étroite association avec l'asthme tandis que la sensibilisation aux allergènes extérieurs est principalement associée à la rhinite. Ces résultats suggèrent que la sensibilisation aux allergènes domestiques est un facteur déterminant dans le développement de l'asthme.

Nous avons également évalué les facteurs associés au développement des symptômes d'asthme dans un groupe de sujets considéré à risque de développer cette affection, soit les sujets avec une HRB asymptomatique, comparativement à des sujets asthmatiques et des sujets normoréacteurs. Le suivi des symptômes et de la fonction pulmonaire sur une période de trois

ans et le prélèvement de biopsies bronchiques après une période de 1 et de 3 ans a permis de démontrer que l'histoire familiale d'asthme et/ou d'atopie ainsi qu'une histoire clinique d'atopie sont des facteurs déterminants dans le développement de l'asthme chez les sujets atopiques avec une HRB asymptomatique. L'analyse des biopsies bronchiques a permis d'observer que les hyperréacteurs présentent un remodelage bronchique et un infiltrat de cellules inflammatoires similaires à ce que l'on observe chez les asthmatiques, quoique moins marqués. Ces travaux décrivent les étapes du développement de l'asthme symptomatique et permettent de cibler une population à haut risque de développer cette affection.

Pour terminer, nous avons évalué l'implication de certains allèles de susceptibilité dans l'expression phénotypique de l'HRB et de l'atopie. Deux polymorphismes du récepteur à haute affinité pour les immunoglobulines E (FcεRI-β) furent testés au sein d'une cohorte de sujets de la région du Québec métropolitain. Les résultats obtenus ont démontré l'association de Gly237 dans l'expression de l'HRB et de l'atopie, suggérant la présence d'un allèle de susceptibilité pour ces affections sur le chromosome 11q.

ABSTRACT

Asthma is regarded as a chronic inflammatory disorder of the airways, involving the release of inflammatory mediators, epithelial desquamation, smooth muscle and microvascular proliferation and altered extracellular matrix. Asthma is a major health problem in Quebec and the prevalence of this disorder in the population is estimated to range from 5% to 10%. The relationships between airway hyperresponsiveness (AHR), atopy and asthma are still to document. The main objective of the present research program is to establish the associations between AHR, atopy and the symptomatology associated with asthma.

First, we evaluated the type of sensitization to common allergens related the respiratory phenotype of the subjects. The analysis of the allergy skin prick tests to common airborne allergens in 3371 consecutive patients showed that indoor allergen sensitization is strongly associated with asthma, while exclusive sensitization to pollens is associated primarily with rhinitis. These results suggest the role of indoor allergens in the development of asthma and shows the variability of allergic manifestations according to the type of sensitization.

We evaluated clinical, physiologic and immunologic characteristics of adult subjects with asymptomatic airway hyperresponsiveness (AHR) in comparison with asthmatic subjects and normoresponsive controls over a period of three years and we performed bronchial biopsies at year 1 and 3. We demonstrated that asymptomatic AHR is a preliminary stage of allergic asthma. The subjects with asymptomatic AHR showed mild airway inflammatory and structural changes similar in nature to those observed in asthmatic subjects, although of a lesser magnitude. Allergen exposure in sensitized subjects and

a genetic predisposition seem to be the main risk factors that contribute to the development of symptomatic asthma in asymptomatic AHR over time.

We finally evaluated the association and performed a linkage analysis between conditions related to asthma (atopy and AHR) and two sequence variants of the β -subunit of the high affinity immunoglobulin E (IgE) receptor (Fc ϵ RI- β) in the French-Canadian population. We reported a strong association between atopy, AHR and the Glu237Gly Fc ϵ RI- β variant. We also observed evidence of linkage between AHR and atopy and the Glu237Gly Fc ϵ RI- β variant. Our data suggest the presence of a susceptibility locus for these affections on chromosome 11q13.

AVANT-PROPOS

Les mots paraissent parfois anodins en relation aux sentiments que l'on désire partager... J'espère de tout coeur que les quelques lignes qui suivent sauront témoigner de ma gratitude. En fait, je désire exprimer ma reconnaissance à plusieurs personnes qui ont participé à la réalisation de ce travail, soit par leur encouragement et leur soutien, soit par leur aide technique et/ou leurs précieux conseils. Ainsi, elles ont contribué à ma formation et à mon bien-être et je tiens vivement à les remercier.

Ce doctorat n'aurait certes pu voir le jour sans la précieuse implication du Dr Louis-Philippe Boulet, mon directeur de recherche depuis le début de mes études aux cycles supérieurs. Ses conseils judicieux, son esprit scientifique vigoureux, son enthousiasme et son habileté à s'émerveiller ont su me transmettre le goût de la recherche et, je l'espère, un certain humour et courage face aux multiples événements auxquels le chercheur est confronté. Sa grande disponibilité, sa compétence, sa confiance et son soutien ont fortement contribué à enrichir le contenu de la présente thèse. Je le remercie chaleureusement pour le respect qu'il a prodigué envers mes idées et pour m'avoir permis de participer à de nombreux congrès d'envergure. Je lui dois ma formation scientifique et je lui en serai toujours reconnaissante.

Je tiens à exprimer ma gratitude au Dr Michel Laviolette qui m'a ouvert toutes grandes les portes de l'Unité de recherche en pneumologie de l'Hôpital Laval. Son aide considérable au projet dans son ensemble, les conseils qu'il n'a cessé de me transmettre, son expérience et ses remarques constructives ont grandement contribué à la matérialisation de ce projet. Son amitié et sa confiance me sont précieuses et n'ont pas de prix. Je tiens également à le

remercier pour avoir effectué la prélecture de cet ouvrage.

Je remercie sincèrement le Dr Vincent Raymond d'avoir assuré la codirection de mes études doctorales et pour son apport considérable en ce qui concerne la génétique. J'espère, à son contact, avoir pu et pouvoir encore acquérir par osmose une faible portion de son large savoir dans ce domaine qu'est la génétique humaine. Je ne peux passer sous silence l'aide incalculable de Jean Morissette, Éric Winstall et Micheline Plante qui m'ont conseillée aux niveaux technique et théorique. En plus de leur appui constant, ils m'ont aidée par leur expertise à accomplir certaines parties du travail.

Je désire remercier l'ensemble des co-auteurs des articles scientifiques inclus dans ce document. De plus, je désire remercier de façon particulière les évaluateurs de ma thèse, les Drs Louis-Philippe Boulet, Vincent Raymond, Michel Laviolette, Jamila Chakir et Thomas Hudson pour avoir pris si généreusement le temps de réviser l'ensemble du manuscrit et pour les commentaires et suggestions constructifs apportés.

Je profite de cette occasion pour exprimer toute ma reconnaissance à Louise Pike, Francine Gauvin et Charles Bussièrès qui, par l'exercice de leur fonction respective, m'ont apporté une aide précieuse. De plus, de sincères remerciements sont dirigés à Serge Simard pour sa chaleureuse contribution lors de l'analyse des résultats. Je remercie également Mariette Veillette pour la révision grammaticale de ce document.

Les membres du laboratoire ont tous contribué à embellir les années de mes études aux cycles supérieurs. Un merci particulier à tous mes compagnons de l'Unité de recherche en pneumologie parce qu'ils ont su créer un lieu d'échanges et de travail agréable et dynamique. Plus particulièrement, à Jamila

Chakir qui est devenu avec le temps une amie précieuse et également un exemple d'acharnement et d'organisation au travail. À Sophie Lavigne pour son amitié et sa sensibilité. À Claudine Ferland pour son dynamisme et sa bonne humeur. À Marc Bossé, un ami, un collaborateur hors pair et un modèle d'imagination scientifique. Puis, à Jean Dubé qui a débuté ses études de doctorat à peu près au même moment que moi et avec qui des liens d'amitié se sont développés.

Je voudrais ici transmettre mon appréciation à plusieurs personnes exceptionnelles qui, par leur générosité de coeur, m'ont aidée à cheminer au cours de ces quelques années, non seulement par leur soutien et leur présence, mais parce qu'elles ont su créer une atmosphère familiale où il fait bon de se retrouver. Mes pensées se tournent particulièrement vers Marthe Bélanger qui fut pour moi comme une mère, pour son énergie et sa disponibilité à mon égard. À Francine Deschesnes et Joanne Milot pour les compétences qu'elles ont bien voulu me partager, pour leurs qualités humaines et pour leurs amitiés. À Luce Trépanier, la "belle grande dame", pour son affection, sa confiance et son amitié sincère. Enfin, à Caroline Duchaine, une consœur et une complice, pour les innombrables heures passées à discuter et pour ses nombreux témoignages d'amitié.

Un merci bien spécial à ma famille, la distance n'a pas eu raison de leur apport moral, de leur amour inconditionnel et de leur encouragement constant et soutenu. Un merci immense à ma mère pour le don généreux de sa personne et sa confiance sans borne à mon égard ; merci à Pierrot pour sa disponibilité de coeur et sa joie de vivre ; une pensée envers Marie-Noëlle pour sa confiance en moi et sa force de caractère. Je désire exprimer ma profonde gratitude et tout mon amour à ceux qui partagent ma vie, premièrement à mon compagnon de vie, Denis Harvey, pour son appui sans borne, son amour, sa présence et sa confiance en moi. Puis à mon fils Emmanuel qui représente ce que nous

avons de plus précieux au monde et à qui je désire dédier l'ensemble de ce travail pour sa capacité d'adaptation, sa détermination et son immense joie de vivre.

Je m'en voudrais d'oublier de remercier cordialement l'ensemble des personnes qui ont si généreusement participé à tous ces programmes de recherche en tant que volontaires. Cette collaboration a rendu ce travail possible et je leur en suis très reconnaissante.

Pour terminer, je désire remercier les *Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche* (FCAR) du Québec de m'avoir octroyé une bourse d'études lors de mes études doctorales.

La recherche est un peu comme une rivière.

Petite au début, étroitement resserrée par endroits,

Et s'élançant avec passion

Au-delà des désillusions et des désenchantements

Graduellement, son champ d'action devient plus large,

Les visions s'accroissent,

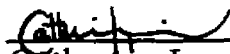
Les objectifs deviennent réalité

Et, petit à petit,

Au hasard des événements, sans rupture évidente

L'ensemble des résultats forment un tout

Comme la rivière se fond dans la mer



Catherine Laprise

Auteure

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	ii
RÉSUMÉ (Version longue)	iii
ABSTRACT	v
AVANT-PROPOS.....	vii
TABLE DES MATIÈRES	xii
LISTE DES FIGURES.....	xviii
LISTE DES TABLEAUX.....	xx
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xxii
CHAPITRE 1 - Introduction générale.....	1
Effort de recrutement ; liens entre les participants aux diverses études.....	8
CHAPITRE 2 - Revue de la littérature	10
2.1 L'hyperréactivité bronchique	10
2.1.1 Définition.....	10
2.1.2 Facteurs modulant l'HRB.....	12
2.1.2.1 Facteurs individuels.....	12
2.1.2.2 Facteurs environnementaux.....	14
2.1.3 Épidémiologie de l'HRB : Prévalence observée dans certains phénotypes respiratoires.....	14
2.1.4 Association entre l'HRB et les symptômes cliniques d'asthme.....	17
2.1.4.1 Étude longitudinale de cohortes de sujets atteint d'une HRB.....	18
2.1.5 Inflammation des voies aériennes dans l'asthme.....	20
2.1.5.1 Bases pathologiques de l'inflammation dans l'asthme	21
2.1.5.2 Cellules inflammatoires.....	24
2.1.5.3 Desquamation de l'épithélium bronchique.....	36
2.1.5.4 Déposition de collagène sous-épithéliale.....	37
2.1.6 HRB asymptomatique et inflammation bronchique.....	38
2.2 L'atopie.....	39
2.2.1 Définition.....	39
2.2.2 Relation entre l'atopie et l'HRB.....	39
2.2.3 Inflammation bronchique et atopie.....	40
Figure 2.1.....	43

2.3	Génétique de l'atopie et de l'HRB.....	44
2.3.1	Le gène, élément de la transmission héréditaire.....	45
2.3.1.1	La cartographie du génome.....	45
	Table 2.1.....	49
	Figure 2.2.....	50
2.3.2	Technique de détection d'un facteur héréditaire par l'étude familiale ou par l'étude de couples de jumeaux.....	51
2.3.3	Analyse de ségrégation.....	52
2.3.3.1	Rétrospective des principales études de ségrégation faites sur la génétique de l'atopie.....	53
2.3.4	Marqueurs génotypiques ou polymorphismes.....	55
2.3.4.1	Les microsatellites.....	55
2.3.4.2	Procédés d'identification des gènes à l'aide des marqueurs génotypiques.....	56
	Figure 2.3.....	57
2.3.4.3	Description succincte des étapes du clonage positionnel.....	57
2.3.5	Rétrospective des principales études de clonage positionnel faites sur la génétique de l'atopie.....	58
	Figure 2.4.....	59
2.3.5.1	Chromosome 11.....	59
2.3.5.2	Chromosome 5.....	63
2.3.5.3	Autres chromosomes.....	64
2.3.5.4	Antigènes des leucocytes humains et atopie.....	66
CHAPITRE 3 - Relation entre le type de sensibilisation aux aéro-allergènes communs et l'expression phénotypique de la rhinite allergique et de l'asthme.....		68
	Mise en contexte de l'étude et contribution des auteurs.....	69
	Résumé.....	72
	Abstract.....	74
	Introduction.....	76
	Subjects.....	77
	Classification of subjects.....	78
	Methods.....	78
	Evaluation and definitions.....	78
	Allergy skin-prick tests.....	79
	Data analysis.....	79
	Results.....	80
	Prevalence of sensitization to common allergens in the studied population.....	80
	Prevalence and degree of sensitization to indoor and outdoor allergens.....	81
	Prevalence and type of sensitization according to gender and age.....	81
	Distribution of subjects according to diagnosis.....	82
	Prevalence and degree of sensitization to allergens according to diagnosis.....	82
	Prevalence and degree of sensitization according to age category.....	83
	Discussion.....	84
	References.....	88

Figures legends.....	93
Figure 3.1.....	94
Figure 3.2.....	95
Figure 3.3.....	96
Table 3.1.....	97
Table 3.2.....	98
Table 3.3.....	99
Table 3.4.....	100

CHAPITRE 4 - Caractéristiques cliniques et physiologiques des sujets avec hyperréactivité bronchique asymptomatique et suivi de 3 ans : corrélation entre l'apparition des symptômes et les changements de fonction respiratoire 101

Mise en contexte de l'étude et contribution des auteurs.....	102
Résumé.....	105
Abstract.....	107
Introduction.....	109
Methods.....	110
Subjects.....	110
Definitions.....	111
Initial clinical assessment and pulmonary function tests.....	112
Statistical Analysis.....	113
Results.....	114
Clinical parameters.....	114
Physiologic and immunologic parameters.....	114
A) Baseline.....	114
B) Two- and 3-yr follow-up.....	116
Onset of asthma symptoms.....	118
Discussion.....	119
Acknowledgments.....	123
References.....	124
Figure legend.....	130
Figure 4.1.....	131
Table 4.1.....	132
Table 4.2A.....	133
Table 4.2B.....	134
Table 4.2C.....	135
Table 4.3.....	136

CHAPITRE 5 - Suivi de 3 ans de sujets avec hyperréactivité bronchique asymptomatique : corrélation entre l'apparition des symptômes et les changements structuraux et inflammatoires bronchiques..... 137

Mise en contexte de l'étude et contribution des auteurs.....	138
Résumé	141
Abstract.....	143
Introduction	144
Methods	145
Subjects.....	145
Definitions.....	147
Design.....	147
Clinical evaluation.....	147
Bronchoscopy and bronchial biopsies	148
Histology.....	148
Electron microscopy.....	149
Immunocytochemistry.....	149
Statistical analysis.....	151
Results.....	151
Subjects' characteristics	151
Comparative histopathological analysis.....	152
Asymptomatic AHR subjects: follow-up.....	154
Discussion.....	156
Acknowledgments	161
References.....	162
Figures legends.....	170
Figure 5.1.....	173
Figure 5.2.....	174
Figure 5.3.....	175
Figure 5.4.....	176
Figure 5.5.....	177
Table 5.1.....	178
Table 5.2.....	179

CHAPITRE 6 - Association entre l'atopie, l'hyperréactivité bronchique et le polymorphisme Glu237Gly de la sous-unité β du récepteur à haute-affinité pour les IgE 180

Mise en contexte de l'étude et contribution des auteurs.....	181
Résumé	184
Abstract.....	186
Introduction	188

Subjects, material and methods.....	191
Clinical assessment.....	191
DNA testing.....	192
Data analysis.....	194
Results.....	194
Association between atopy, AHR and the Glu237Gly FcεRI-β variant.....	194
Linkage studies.....	196
Discussion.....	197
Acknowledgments.....	200
References.....	201
Figures legends.....	207
Figure 6.1.....	209
Figure 6.2.....	210
Table 6.1.....	211
Table 6.2.....	212
CHAPITRE 7 - Discussion générale et conclusion.....	213
Figure 7.1.....	229
RÉFÉRENCES.....	233
ANNEXE I : Questionnaire d'évaluation de la condition respiratoire.....	269
ANNEXE II: Prevalence of airway responsiveness and atopy in asthmatic families.....	279
Mise en contexte de l'étude et contribution des auteurs.....	280
Résumé.....	283
Abstract.....	284
Abbreviations.....	285
Introduction.....	286
Methods.....	287
Subjects.....	287
Definitions.....	288
Evaluation.....	288
Statistical Analysis.....	290
Results.....	290
Subjects' characteristics.....	290
Prevalence of atopy and airway hyperresponsiveness.....	291
Comparison of atopic and asymptomatic AHR subjects in group A and C.....	291
Probability of presenting asymptomatic AHR and atopy according to parental history.....	292
Correlations between serum IgE level, PC20 methacholine and eosinophil count.....	293
Sensitization to common allergens.....	293
Discussion.....	293

Acknowledgments	297
References.....	298
Figure legend	304
Figure 1	305
Table 1.....	306
Table 2.....	307
Table 3.....	308
Table 4.....	309
Table 5.....	310

LISTE DES FIGURES

FIGURE	TITRE	PAGE
Figure 2.1	Schéma de l'histopathologie de l'asthme	43
Figure 2.2	A) Représentation schématique d'une cellule et de la structure de l'ADN; B) Formation d'un YAC recombinant; C) Association des séquences d'ADN	50
Figure 2.3	Profil d'identification des gènes associés à diverses pathologies. A) Génétique classique; B) Clonage positionnel	57
Figure 2.4	Cartographie des loci morbides impliqués dans l'atopie	59
Figure 3.1	Number of allergic and non-allergic subjects within groups of subjects with asthma and/or rhinitis	94
Figure 3.2	Associations among diagnoses of asthma, rhinitis, and both, according to the type of allergen	95
Figure 3.3	Mean atopic index and mean wheal diameter compared among subjects with diagnosis of asthma, asthma and rhinitis, or rhinitis	96
Figure 4.1	Variability of PC ₂₀ methacholine over three years in different groups (A), intra-group according to the atopic status (B) and intra-group according to the presence of at least one first-degree relative with asthma (C)	131
Figure 5.1	Histopathological features of bronchial biopsies	173
Figure 5.2	Inflammatory cell counts in bronchial biopsies of normal control, asymptomatic AHR and asthmatic subjects	174
Figure 5.3	PC ₂₀ methacholine at baseline and follow-up evaluations in asymptomatic AHR sub-groups : those who developed asthma symptoms and those who did not	175
Figure 5.4	Relationship between the increase in airway responsiveness and (A) airway subepithelial fibrosis and (B) variation of CD4/CD8 ratio over the 2-year follow-up	176
Figure 5.5	Inflammatory cell counts in bronchial biopsy of asymptomatic AHR subjects at baseline and follow-up	177
Figure 6.1	Autosomal dominant-like familial atopy pedigrees	209

FIGURE	TITRE	PAGE
Figure 6.2	A) Testing for the Glu237Gly FcεRI-β variant in atopic families ; B) Sequence of genomic DNA	210
Figure 7.1	Principaux éléments qui sous-tendent le développement de l'asthme allergique	229
Annexe II (figure 1)	Characteristics of control and asthmatic families	305

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU	TITRE	PAGE
Tableau 2.1	Découvertes importantes concernant l'identification des déterminants génétiques, plus particulièrement en relation avec l'atopie	49
Tableau 3.1	Prevalence of sensitization to common allergens according to diagnosis	97
Tableau 3.2	Number and percentage of allergic subjects sensitized to indoor, outdoor or both indoor and outdoor allergens	98
Tableau 3.3	Percentage of subjects sensitized to each allergen according to age	99
Tableau 3.4	Mean atopic index and mean wheal diameter according to age	100
Tableau 4.1	Comparison of questionnaire analysis between the subjects with asymptomatic AHR, asthma or no AHR (controls)	132
Tableau 4.2A	Subjects' characteristics	133
Tableau 4.2B	Subjects' characteristics according to atopic status	134
Tableau 4.2C	Subjects' characteristics according the first-degree relatives with asthma	135
Tableau 4.3	Development of asthma symptoms in relation to severity of airway hyperresponsiveness (A), first degree relatives with asthma (B) and clinical history of respiratory viral infection (C)	136
Tableau 5.1	Subjects' characteristics	178
Tableau 5.2	Variability of the immunophysiological parameters in asymptomatic AHR group over the 2-year follow-up	179
Tableau 6.1	Physiological and immunological parameters associated with the presence of the Glu237Gly variant of the FcεRI-β	211
Tableau 6.2	Association between atopy and environmental exposure to animal danders with the Glu237Gly variant of the FcεRI-β	212

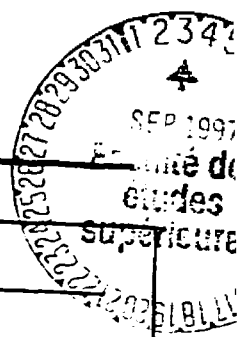
TABLEAU	TITRE	PAGE
Annexe II (Tableau 1)	Subjects' characteristics	306
Annexe II (Tableau 2)	Prevalence of AAHR in population according to age and gender of subjects	307
Annexe II (Tableau 3)	Likelihood to present symptomatic and asymptomatic airway hyperresponsiveness and atopy according to the parental history of these affections	308
Annexe II (Tableau 4)	Correlations between serum IgE level and different parameters	309
Annexe II (Tableau 5)	Percentage of children sensitized to a given allergen according to parent sensitization to this category of allergen	310

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARMS	Méthode d'amplification spécifique aux allèles
C	Cytosine
CP₂₀	Concentration provoquant une chute de 20% du VEMS
DEP	Débits expiratoires de pointe
ECP	Protéine cationique de l'éosinophile
EDN	Neurotoxine dérivée de l'éosinophile
FcεRI-β	Sous-unité β du récepteurs à haute affinité pour les IgE
G	Guanine
Glu	Acide glutamique
Gly	Glycine
GM-CSF	"Granulocyte macrophage colony stimulating factor"
HLA	Antigènes des leucocytes humains
HRB	Hyperréactivité bronchique
ICAM	"Intercellular adhesion molecule"
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
Ile	Isoleucine
INF	Interféron
l	Litre
LBA	Lavage bronchoalvéolaire
Leu	Leucine
LT	Leucotriène

MBP	Protéine majeure de l'éosinophile
mg	Milligramme
ml	Millilitre
mm	Millimètre
MPOC	Maladie pulmonaire obstructive chronique
PAF	Facteur activateur des plaquettes
PCR	Amplification polymérisique
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PG	Prostaglandine
T	Thymine
TCR	Récepteurs des lymphocytes
TNF	Facteur nécrosant des tumeurs
µg	Microgramme
µm	Micromètre
VCAM	"Vascular adhesion molecule"
VEMS	Volume expiratoire maximale en une seconde
YAC	Chromosome artificiel de levure

Autorisation de co-auteur(s) pour un article inclus dans le mémoire ou la thèse



NOM DE L'ÉTUDIANT-E Catherine Laprise

NOM DU PROGRAMME Doctorat en médecine expérimentale

TITRE DU MÉMOIRE OU DE LA THÈSE ROLE DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX ET GENETIQUES DANS LE DEVELOPPEMENT DE L'ATOPIE, DE L'HYPERREACTIVITE BRONCHIQUE ET DE L'ASTHME SYMPTOMATIQUE

Par la présente, le(s) soussigné(s), co-auteur(s) d'un article intitulé :

Comparative degree and type of sensitization to common indoor and outdoor allergens in subjects with allergic rhinitis and/or asthma

faisant partie du mémoire de maîtrise ou de la thèse de doctorat présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval, autorise(nt) l'insertion de l'article dans ce mémoire ou cette thèse et l'éventuel microfilmage selon les règles de la Bibliothèque nationale du Canada (Service des thèses canadiennes).

SIGNATURE	NOM EN CARACTÈRE D'IMPRIMERIE	DATE
	Louis-Philippe Boulet, MD	97-8-15
	*Hélène Turcotte, M.Sc	97-9-2
	*Caroline Lavertu, B.Sc	97-9-2
	*Pierre-Michel Bédard, MD	26.8.97.
	*Aubert Lavoie, MD	97.8.25
	*Jacques Hébert, MD	97-8-20

Ce formulaire doit être remis à la Faculté des études supérieures au moment du dépôt initial.

Autorisation de co-auteur(s) pour un article inclus dans le mémoire ou la thèse

NOM DE L'ÉTUDIANT-E Catherine Laprise

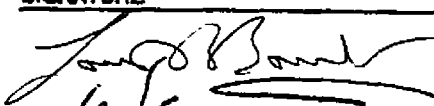


NOM DU PROGRAMME Doctorat en médecine expérimentale

TITRE DU MÉMOIRE OU DE LA THÈSE ROLE DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX ET GENÉTIQUES DANS
LE DÉVELOPPEMENT DE L'ATOPIE, DE L'HYPERREACTIVITÉ
BRONCHIQUE ET DE L'ASTHME SYMPTOMATIQUE

Par la présente, le(s) soussigné(s), co-auteur(s) d'un article intitulé :

**Asymptomatic airway hyperresponsiveness :
Relationships with airway inflammation and remodeling**

faisant partie du mémoire de maîtrise ou de la thèse de doctorat présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval, autorise(nt) l'insertion de l'article dans ce mémoire ou cette thèse et l'éventuel microfilmage selon les règles de la Bibliothèque nationale du Canada (Service des thèses canadiennes).

<u>SIGNATURE</u>	<u>NOM EN CARACTÈRE D'IMPRIMERIE</u>	<u>DATE</u>
	Louis-Philippe Boulet, MD	14 août
	Michel Laviolette, MD	14 août
	Michel Boutet, MD	14 août

Ce formulaire doit être remis à la Faculté des études supérieures au moment du dépôt initial.

Autorisation de co-auteur(s) pour un article inclus dans le mémoire ou la thèse

NOM DE L'ÉTUDIANT-E

Catherine Laprise

NOM DU PROGRAMME

Doctorat en médecine expérimentale

TITRE DU MÉMOIRE OU DE LA THÈSE

ROLE DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX ET GENÉTIQUES DANS
LE DÉVELOPPEMENT DE L'ATOPIE, DE L'HYPERREACTIVITÉ
BRONCHIQUE ET DE L'ASTHME SYMPTOMATIQUE

Par la présente, le(s) soussigné(s), co-auteur(s) d'un article intitulé :

**Asymptomatic airway hyperresponsiveness :
A three-year follow-up**

faisant partie du mémoire de maîtrise ou de la thèse de doctorat présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval, autorise(nt) l'insertion de l'article dans ce mémoire ou cette thèse et l'éventuel microfilmage selon les règles de la Bibliothèque nationale du Canada (Service des thèses canadiennes).

SIGNATURE



NOM EN CARACTÈRE D'IMPRIMERIE

Louis-Philippe Boulet, MD

DATE

14 août

Ce formulaire doit être remis à la Faculté des études supérieures au moment du dépôt initial.

Autorisation de co-auteur(s) pour un article inclus dans le mémoire ou la thèse

NOM DE L'ÉTUDIANT-E Catherine Laprise

NOM DU PROGRAMME Doctorat en médecine expérimentale

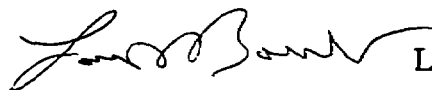
TITRE DU MÉMOIRE OU DE LA THÈSE ROLE DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX ET GENETIQUES DANS LE DEVELOPPEMENT DE L'ATOPIE, DE L'HYPERREACTIVITE BRONCHIQUE ET DE L'ASTHME SYMPTOMATIQUE

Par la présente, le(s) soussigné(s), co-auteur(s) d'un article intitulé :

**Prevalence of airway responsiveness and atopy
in asthmatic families**

faisant partie du mémoire de maîtrise ou de la thèse de doctorat présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval, autorise(nt) l'insertion de l'article dans ce mémoire ou cette thèse et l'éventuel microfilmage selon les règles de la Bibliothèque nationale du Canada (Service des thèses canadiennes).

SIGNATURE _____ NOM EN CARACTÈRE D'IMPRIMERIE _____ DATE _____



Louis-Philippe Boulet, MD

14 août

Autorisation de co-auteur(s) pour un article inclus dans le mémoire ou la thèse

NOM DE L'ÉTUDIANT-E Catherine Laprise

NOM DU PROGRAMME Doctorat en médecine expérimentale

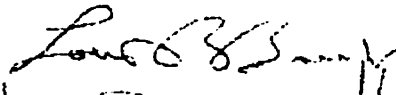



TITRE DU MÉMOIRE OU DE LA THÈSE ROLE DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX ET GÉNÉTIQUES DANS LE DÉVELOPPEMENT DE L'ATOPIE, DE L'HYPERREACTIVITÉ BRONCHIQUE ET DE L'ASTHME SYMPTOMATIQUE

Je, présente, le(s) soussigné(s), co-auteur(s) d'un article intitulé :

Association and linkage between atopy, airway hyperresponsiveness and the Glu237Gly variant β subunit of the high-affinity receptor for immunoglobulin E in the French-Canadian population

faisant partie du mémoire de maîtrise de l'étudiant docteur inscrit à la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal. Je certifie que le contenu de ce document est conforme au contenu de la thèse et l'éventuel microfilmage selon les règles de la Bibliothèque nationale du Canada (Service des thèses canadiennes).

SIGNATURE **NOM EN CARACTÈRE D'IMPRIMERIE** **DATE**

	Louis-Philippe Boulet, MD	14 août
	Jean Morissette, M.Sc	14 août
	Eric Winstall, M.Sc	14 août
	Vincent Raymond, MD, Ph.D	14 août

Ce formulaire doit être remis à la Faculté des études supérieures au moment du dépôt initial.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'asthme affecte de plus en plus de gens dans la population québécoise tout comme pour les autres pays industrialisés et on estime que 5 à 10% des individus présenteront au cours de leur vie un asthme symptomatique. L'atopie, dont le phénotype est caractérisé par une tendance à produire des anticorps de type immunoglobuline E (IgE) contre des allergènes communs, est en étroite association avec l'hyperréactivité bronchique (HRB), propriété qu'ont les voies aériennes à répondre de façon exagérée à divers stimuli, et l'asthme. Depuis quelques années, l'asthme et l'atopie sont reconnus comme des affections multifactorielles ayant une composante héréditaire importante. Les principaux objectifs de ce programme de recherche visent à mieux caractériser les interrelations entre l'HRB, l'atopie et la symptomatologie asthmatique. Nous désirions également valider l'implication de certains polymorphismes du récepteur à haute affinité pour les IgE ($Fc\epsilon RI-\beta$) dans l'expression de ces anomalies.

L'asthme est caractérisé par une obstruction bronchique variable, cette dernière étant en étroite association avec une hyperréactivité bronchique (HRB) que l'on croit secondaire à un processus inflammatoire des voies aériennes. À ce jour, les interrelations entre cette inflammation et l'HRB sont encore imprécises. Il existe, habituellement une certaine association entre la réponse des voies aériennes aux stimuli et les symptômes relatifs à l'asthme. Cependant, certains individus présentent une HRB sans symptômes respiratoires associés. On parlera alors d'HRB asymptomatique. Cette observation remet en question la nature de la relation entre l'HRB et les symptômes d'asthme.

Une rétrospective des divers travaux qui ont tenté d'évaluer la sensibilité du test de provocation bronchique à la métacholine, utilisé dans l'évaluation de la réactivité bronchique, a permis de conclure qu'en général le degré de cette réactivité correspond à la sévérité de l'asthme et au besoin en médication. Toutefois, ceci n'est pas toujours le cas. Cette absence de correspondance entre la réactivité bronchique et les symptômes d'asthme pourrait s'expliquer par un manque de standardisation des techniques de provocation et/ou par le fait que la réactivité bronchique se modifie avec le temps. Les individus ayant une HRB asymptomatique pourraient également être de "faux positifs" puisque les zones limites de la réactivité bronchique ont été établies arbitrairement. De plus, puisque le phénotype d'asthme comporte de nombreux paramètres, il est possible que certains sujets asymptomatiques soient en fait des asthmatiques qui s'ignorent, soit en raison d'une faible perception des symptômes ou par la négation de ceux-ci. Toutefois, il demeure difficile de déterminer les raisons qui expliquent pourquoi certains individus avec la même concentration de métacholine provoquant une chute de 20% du volume expiratoire maximal en une seconde (CP_{20} -VEMS) ont des symptômes et d'autres n'en ont pas.

Ces dernières années, diverses équipes de chercheurs ont décrit les altérations structurales des voies aériennes et la nature du processus inflammatoire observé dans l'asthme. En ce qui concerne l'HRB asymptomatique, la physiopathologie est encore imprécise. La démonstration d'une relation entre les symptômes respiratoires et l'intensité des altérations bronchiques observées dans les biopsies de sujets avec une HRB demeure non-concluante.

L'atopie est associée à l'asthme et environ 75% des patients asthmatiques ont au moins une réaction positive immédiate au test cutané d'allergie. Plusieurs études suggèrent que l'expression des symptômes d'asthme est partiellement attribuable à la sensibilité des voies aériennes aux allergènes communs. Cependant, l'intensité de la réaction allergique cutanée ne correspond pas nécessairement à la sévérité clinique de l'asthme. Un processus inflammatoire et diverses altérations structurales ont également été observés dans les voies aériennes des sujets atopiques non asthmatiques. Ainsi, les interactions entre l'atopie, l'HRB et l'asthme sont loin d'être clairement définies.

Par ailleurs, l'asthme et l'atopie s'observent dans les familles, d'une génération à l'autre, et les études de concordance de jumeaux mono- et dizygotes suggèrent l'implication de facteurs héréditaires. Les nouvelles techniques de biologie moléculaire constituent un outil privilégié permettant de mieux décrire la pathogénèse de l'HRB et de l'atopie, et plus précisément, d'identifier les génotypes impliqués dans le développement de ces anomalies. Si l'on fait une rétrospective des nombreux travaux qui ont cherché à identifier le locus morbide de l'atopie, on constate que les chromosomes 11 et 5 semblent contenir des gènes de susceptibilité spécialement impliqués dans ces affections.

À la lumière de ces énoncés, nous désirions évaluer l'implication de l'exposition environnementale dans l'expression de l'asthme et de la rhinite allergique. Ainsi, à partir d'une étude épidémiologique portant sur le degré et le type de sensibilisation aux allergènes communs, nous désirions évaluer :

1- LA PRÉVALENCE RESPECTIVE DE LA SENSIBILISATION AUX ALLERGÈNES EXTÉRIEURS ET INTÉRIEURS DANS LA RHINITE ALLERGIQUE ET DANS L'ASTHME AU SEIN DE LA POPULATION QUÉBÉCOISE? (CHAPITRE 3)

- a) **Quelle est la prévalence d'atopie mesurée dans la cohorte étudiée?**

- b) **Quels sont les prévalences et les degrés de sensibilisation aux allergènes intérieurs et extérieurs dans la cohorte étudiée?**

- c) **Est-ce que la prévalence et la sévérité de l'atopie varie en fonction de l'âge et du sexe des sujets?**

- d) **Quels sont la prévalence et le degré de sensibilisation aux allergènes intérieurs et extérieurs selon le diagnostic clinique des sujets évalués?**

Afin de répondre à ces questions, nous avons analysé les tests cutanés d'allergie de 3371 patients, lesquels furent répartis en trois groupes selon leur diagnostic clinique, soient : les asthmatiques allergiques, les rhinitiques allergiques et les patients avec asthme associé à une rhinite allergique. Pour les trois groupes de sujets, la prévalence de sensibilisation aux allergènes intérieurs (animaux, acariens et certaines moisissures) et extérieurs (pollens et certaines moisissures) a été évaluée, de même que l'index atopique (le nombre de réponses positives aux tests cutanés d'allergie sur les 8 aéroallergènes testés) et la moyenne des

diamètres des réponses positives.

Nous nous sommes également interrogés sur l'HRB et son implication dans l'expression de l'asthme. Ainsi, l'étape suivante de ce programme portait sur l'HRB asymptomatique. Nous désirions clarifier :

2- QUELS SONT LES PARAMÈTRES CLINIQUES, PHYSIOLOGIQUES ET IMMUNOHISTOPATHOLOGIQUES IMPLIQUÉS DANS L'HRB ASYMPTOMATIQUE? (CHAPITRES 4 ET 5)

- a) **Quels sont les antécédents respiratoires de même que les facteurs cliniques et environnementaux pouvant contribuer au développement de l'asthme?**
- b) **Est-ce que l'HRB asymptomatique représente une étape préliminaire au développement de l'asthme?**
- c) **Quels sont les sujets présentant une HRB asymptomatique les plus susceptibles de développer un asthme symptomatique?**
- d) **Quelle est l'évolution des paramètres cliniques, physiologiques et immunologiques des individus présentant une HRB asymptomatique au cours des années suivant ce diagnostic?**
- e) **Quelles sont les relations entre l'HRB asymptomatique, les symptômes cliniques, l'atteinte inflammatoire et les changements morphologiques de la paroi bronchique?**

f) Est-ce que les paramètres immunohistologiques mesurés dans la muqueuse bronchique des sujets avec une HRB asymptomatique se modifient au fil des ans?

g) Quelles sont les relations entre l'évolution des changements cliniques et physiologiques en regard des modifications immunohistopathologiques mesurées dans ce groupe d'individus?

La première étape de cette section a donc porté sur l'évaluation clinique et physiologique des sujets avec une HRB. Trois groupes de sujets furent étudiés : 30 sujets avec une HRB asymptomatique ont été pairés pour l'âge, le sexe et la CP₂₀ métacholine avec 30 sujets asthmatiques, et pairés pour l'âge et le sexe avec 30 sujets normoréacteurs. Les sujets furent évalués annuellement, à la même période de l'année, pour trois ans. Afin de répondre aux questions a à d inclusivement, l'évaluation des sujets comportait un questionnaire détaillé sur la condition respiratoire (version modifiée du questionnaire de l'*American Thoracic Society* [ATS], annexe I), un test de provocation bronchique à la métacholine avec mesure de la perception du bronchospasme, un test cutané d'allergie, un prélèvement sanguin pour le dosage des IgE sériques et un décompte des éosinophiles sanguins ainsi qu'une mesure de la fluctuation circadienne des débits de pointe pour une période de deux semaines.

Afin de caractériser les sujets avec une HRB asymptomatique au niveau histopathologique, 10 sujets avec HRB furent enrôlés dans une seconde étude. Cette dernière s'échelonna sur une période de deux ans et la même évaluation clinique et physiologique que dans la première étape fut réalisée annuellement. L'évaluation des sujets avec une HRB comportait également des prélèvements bronchiques lors de l'évaluation initiale et à la troisième évaluation, soit deux ans plus tard. Afin de répondre aux questions e à g, les biopsies bronchiques de l'évaluation initiale furent comparées à celles de sujets témoins et à des sujets

asthmatiques. L'analyse répétée de l'aspect histopathologique bronchique chez les sujets avec une HRB asymptomatique a permis d'analyser l'évolution des paramètres choisis.

Pour terminer, nous désirions évaluer, l'association entre l'atopie, l'HRB et certains polymorphismes de la sous-unité β du récepteur à haute affinité pour les IgE (Fc ϵ RI- β) au sein de la population québécoise. Nous désirions déterminer:

3- S'IL EXISTE UNE ASSOCIATION ENTRE L'ATOPIE, L'HRB ET LES POLYMORPHISMES Ile181Leu ET Glu237Gly DE Fc ϵ RI- β ? (CHAPITRE 6)

- a) Est-ce que le fait d'être hétérozygote ou homozygote pour les allèles de susceptibilité module l'expression phénotypique (sévérité) de l'atopie et de l'HRB?**

- b) Quels sont les risques relatifs associés à l'exposition environnementale et à la présence de l'allèle de susceptibilité testé?**

- c) Quel est le profil de transmission de l'atopie (analyse de ségrégation) et de l'HRB au sein des familles enrôlées?**

- d) Est-ce qu'il y a une liaison entre l'atopie, l'HRB et les polymorphismes testés?**

Une étude cas-témoin comportant 100 individus avec un statut d'atopie sévère, tel que démontré par une élévation anormale des IgE sériques et une forte réaction aux tests cutanés d'allergie, pairés pour l'âge et le sexe avec 100 sujets non-atopiques et une étude familiale comportant 4 familles totalisant 106 sujets, ont permis de répondre à ces interrogations. La caractérisation du

phénotype a comporté un questionnaire, un test cutané d'allergie, un test de provocation bronchique à la métacholine et une ponction veineuse pour le dosage des IgE, le décompte des éosinophiles et l'extraction de l'acide désoxiribonucléique (ADN), et ce, pour tous les participants. La méthode d'amplification polymérasique spécifique aux allèles (ARMS) a été utilisée pour évaluer la présence des allèles de susceptibilité testés.

Effort de recrutement ; liens entre les participants aux diverses études

L'ensemble de mon projet de maîtrise a porté sur une étude familiale de la prévalence d'asthme, d'atopie et d'hyperréactivité bronchique (HRB) asymptomatique chez les proches parents de sujets asthmatiques (annexe II). Les 244 sujets participants ont été caractérisés à l'aide d'un questionnaire portant sur l'état de santé général et respiratoire et sur les antécédents familiaux, en plus de certains tests immunologiques (taux d'IgE sériques, éosinophiles sanguins et tests d'allergie) et de fonctions respiratoires (VEMS, variabilité des DEP, CP₂₀ métacholine). Ce protocole représentait le premier programme de recherche du genre dans la province de Québec. Les résultats ont montré une prévalence accrue d'atopie, d'HRB et de hauts taux sériques d'IgE au sein des familles d'asthmatiques. Ces conclusions suggèrent une concentration familiale de ces affections suggérant l'implication de facteurs héréditaires.

Le présent programme d'études doctorales représente la suite logique de mes travaux de maîtrise et vise, comme vu précédemment, à définir l'implication de l'HRB, de l'exposition environnementale et de certains paramètres héréditaires dans l'expression phénotypique de l'asthme au sein de la population québécoise. Dans le chapitre 3, les données proviennent des dossiers cliniques de 3371 patients ayant fréquenté l'un ou l'autre des deux centres hospitaliers impliqués. Les volontaires ayant participé aux études des chapitres 4 et 5 ont été recrutés à partir de la cohorte familiale (56 familles)

ayant participé à mon projet de maîtrise. Puisque chaque sujet était bien caractérisé en ce qui concerne le phénotype respiratoire, le recrutement des sujets hyperréacteurs (n=30 sujets; 23 apparentés à un asthmatique et 7 sans antécédents familiaux) pairés à des asthmatiques (pour l'âge, le sexe et la CP₂₀ métacholine) et à un groupe de normaux (pour l'âge et le sexe) a été possible. Il est important de noter que 5 des 10 hyperréacteurs incluent dans l'étude du chapitre 5 présentaient de l'atopie et une histoire familiale d'asthme. L'étude du chapitre 6 comporte une analyse de type cas-témoin où 100 sujets atopiques non-apparentés ont été pairés pour l'âge et le sexe à 100 sujets sans atopie non-apparentés. Certains de ces individus ont été recrutés à partir de notre étude de prévalence (annexe II) et les autres à l'aide d'annonces parues à la radio et dans les journaux. Une analyse de liaison comportant quatre familles sur trois générations a également été faite dans le cadre de cette étude. Ces familles ont été recrutées à l'aide de quatre des 100 individus atopiques enrôlés dans l'analyse cas-témoin.

CHAPITRE 2

REVUE DE LA LITTÉRATURE

2.1 L'HYPERRÉACTIVITÉ BRONCHIQUE

2.1.1 Définition

La notion d'hyperréactivité bronchique (HRB) fait partie intégrante de la définition de l'asthme. En fait, la définition de l'asthme proposée par l'American Thoracic Society (ATS) inclut deux principaux paramètres : 1) une obstruction bronchique réversible soit spontanément, soit après l'utilisation d'un bronchodilatateur et 2) une HRB symptomatique (sifflements, toux, oppression bronchique) suite à l'exposition à des irritants respiratoires et/ou à des allergènes (ATS, 1962). La révision plus récente de cette définition inclut maintenant la notion d'inflammation bronchique (1987). Ainsi, l'HRB est l'une des principales caractéristiques de l'asthme. Cependant, il est clairement établi que l'HRB peut se retrouver sans asthme ou autres affections

respiratoires associées; on parlera alors d'HRB asymptomatique.

L'HRB asymptomatique est un état de sensibilité anormale de l'arbre trachéo-bronchique à une grande diversité de stimuli, tels certains agonistes (exemple : la métacholine), de même que diverses autres substances chimiques, ou stimuli physiques tels l'hyperventilation, l'exercice et l'air froid. La réponse des bronches est alors une bronchoconstriction aiguë (Snashall et coll. 1987). Cette définition est descriptive et ne renseigne pas cependant sur l'origine de l'obstruction des voies aériennes, ni sur les modifications de la structure et des propriétés mécaniques de la paroi bronchique qui seraient impliquées dans cette réponse accrue des bronches.

L'HRB se mesure habituellement à l'aide d'un test à l'histamine ou à la métacholine (Juniper et coll. 1991) et le degré de réponse bronchique à ces agents suit une distribution logarithmique normale au sein de la population (Cockcroft et coll. 1983). Les premières études faites sur l'HRB ont d'abord déterminé le niveau de réactivité bronchique observable chez les sujets normaux et chez les sujets asthmatiques (Curry 1946; Curry 1947). Les études de Cockcroft et ses collaborateurs ont ensuite permis de définir arbitrairement les limites de la concentration de métacholine provoquant une chute de 20% du volume expiratoire maximal en 1 seconde (CP_{20} -VEMS) généralement retrouvé chez les asthmatiques (< 8 mg/ml) et chez les sujets normaux (> 20 mg/ml) (Cockcroft et coll. 1982), une "zone grise" existant entre ces deux valeurs. Le résultat du test de provocation bronchique à la métacholine aide donc au diagnostic d'asthme, particulièrement lorsque le débit expiratoire ou les fluctuations circadiennes des débits de pointe sont normaux ou peu altérés. Juniper et ses collaborateurs ont également suggéré que le résultat des tests de provocation bronchique pouvait aider à déterminer les besoins en médication requis par la personne asthmatique, bien que la correspondance ne soit pas

parfaite (Juniper et coll. 1981).

2.1.2 Facteurs modulant l'HRB

2.1.2.1 Facteurs individuels

Origine ethnique

La réactivité bronchique peut varier selon la population étudiée. Diverses études soulignent que l'origine ethnique est un facteur à considérer dans les études épidémiologiques sur l'HRB. Ainsi, aux États-Unis on note une fréquence deux fois plus grande de sujets hyperréacteurs dans la population noire. Une étude réalisée à Baltimore a permis de déterminer une prévalence d'HRB de 12% chez les enfants noirs par rapport à 7,9% chez les jeunes blancs (Mark et coll. 1982). Une autre étude de ce genre réalisée à Nhanes rapporte une prévalence d'HRB pour les enfants noirs et pour les enfants blancs de 9,4% et 6,2% respectivement (Gergen et coll. 1988). Cette différence raciale souligne l'importance de l'implication de facteurs environnementaux (habitudes de vie et environnement immédiat) et de facteurs héréditaires dans l'expression du phénotype. Par contre, une prévalence d'HRB similaire (entre 15 et 18%) a été mesurée chez des jeunes provenant d'ethnies diverses (Européens, Africains et Indiens) résidant à Londres dans un environnement commun (Johnston et coll.). Une étude faite en Nouvelle-Zélande a permis d'évaluer une prévalence d'HRB similaire pour un groupe de sujets européens (13,5%) et un groupe de Maori (10,8%) résidant dans le même environnement (Harisson et coll. 1986). Dans le but de vérifier l'importance relative de l'origine ethnique et de l'exposition environnementale, Waite et ses collaborateurs ont relocalisé un groupe d'enfants de l'île Tokelauan présentant un phénotype sévère d'atopie et d'HRB en Nouvelle-Zélande. Les enfants ainsi relocalisés (nouvelles conditions environnementales et nouveau régime alimentaire) ont vu la

sévérité de leur HRB réduite et après un certain temps, la valeur moyenne d'HRB de ces enfants était approximativement la même que celle mesurée au sein des jeunes néo-zélandais de souche européenne (Waite et coll. 1980).

Calibre des voies aériennes

Chez les jeunes enfants, la prévalence d'HRB est plus élevée chez les garçons que chez les filles et cette augmentation est attribuée au calibre des voies aériennes plus petit chez les garçons dans les premières années de la vie (Hopp et coll. 1986). La prédominance d'HRB retrouvée chez les garçons diminue graduellement de sorte qu'à la puberté la prévalence d'HRB est similaire chez les filles et les garçons (Martin et coll. 1980) et est supérieure chez les sujets féminins à l'âge adulte (20 ans et plus) (Kelly et coll. 1987). Le travail de Kanner et ses collaborateurs a aussi démontré un degré d'HRB plus important chez les sujets féminins adultes et cette observation est fort probablement en relation avec le calibre des voies aériennes, lequel est plus petit chez les femmes que chez les hommes (Kanner et coll. 1994).

Atopie, rhinite et tabagisme

Trigg et ses collaborateurs ont évalué une cohorte de sujets âgés entre 18 et 75 ans avec HRB. Leur travail a permis de montrer une augmentation de la réactivité bronchique chez les femmes par rapport aux garçons, confirmant les travaux précédents. De plus, leur étude a démontré que dans la cohorte testée, 30% des sujets avec une HRB étaient atopiques, 45% avaient une histoire clinique de rhinite allergique et 32% étaient fumeurs. Ils n'ont pas observé de stratification de l'HRB selon l'âge des sujets (Trigg et coll 1990). Dans une autre étude de ce genre, Britton et ses collaborateurs ont évalué une cohorte de 2415 adultes âgés entre 18 et 70 ans où ils ont mesuré une incidence d'HRB de 13% (314 sujets) (Britton et coll. 1994). L'évaluation a permis de déterminer que

L'HRB asymptomatique est associée au calibre des voies aériennes, à l'âge des individus et à la présence d'atopie.

2.1.2.2 Facteurs environnementaux

L'exposition aux allergènes ainsi que l'exposition professionnelle à des agents sensibilisants peuvent augmenter considérablement la réactivité bronchique. En effet, la réactivité bronchique peut augmenter après une exposition à des allergènes environnementaux (Boulet et coll. 1983), suite à une provocation allergénique en laboratoire (Cartier et coll. 1982), ou suite à l'exposition à des agents professionnels (Malo et coll. 1990), chez des sujets sensibilisés. De plus, chez certains sujets asthmatiques allergiques, une réponse bronchique retardée peut être observée dans les 3 à 8 heures suivant l'exposition aux allergènes. Cette réaction s'accompagne généralement d'une augmentation de la réactivité bronchique. Par ailleurs, il semble que les infections des voies aériennes supérieures peuvent entraîner une augmentation de la réponse bronchique à l'histamine pour une période pouvant aller jusqu'à 6 semaines suivant le début de cette infection (Empey et coll. 1976).

2.1.3 Épidémiologique de l'HRB : Prévalence observée dans certains phénotypes respiratoires

De nombreuses études cliniques ont montré que l'HRB n'est pas toujours associée à l'asthme. Ainsi, on a retrouvé une HRB dans certaines maladies pulmonaires obstructives chroniques (MPOC) tabagiques, dans les bronchiectasies et certaines pneumopathies où il peut y avoir une atteinte interstitielle telles la sarcoïdose et les alvéolites d'hypersensibilité. De plus, la prévalence d'HRB est accrue chez les sujets présentant une rhinite allergique. Certains sujets atopiques, sans asthme, présentent une augmentation de la

réactivité bronchique lors de provocation allergénique ou durant les expositions allergéniques saisonnières (Boulet et coll. 1989 ; Muller et coll. 1993). Finalement, une HRB se rencontre également chez une proportion variable de sujets sans problème respiratoire apparent selon la population étudiée et le phénotype attribué à l'HRB.

De nombreux sujets sans symptômes d'asthme passés ou présents ont une HRB à la métacholine. Certaines études indiquent que la prévalence d'HRB au sein de sujets non asthmatiques apparentés à un ou plusieurs individus asthmatiques peut atteindre jusqu'à 75% et que cette HRB peut persister de nombreuses années sans l'apparition d'une symptomatologie asthmatique (Hopp et coll. 1987; Hopp et coll. 1988; Hopp et coll. 1992). Dans une étude récente où l'on comparait la prévalence d'asthme, d'atopie et d'HRB asymptomatique au sein de familles asthmatiques et témoins, nous avons observé une prévalence accrue d'HRB asymptomatique et d'atopie chez les sujets apparentés à un ou plusieurs asthmatiques (Laprise et Boulet 1996, annexe 2). Ces observations suggèrent l'implication de facteurs héréditaires dans l'expression de l'HRB, de l'atopie et de l'asthme (Konig et coll. 1973).

Cockcroft et ses collaborateurs (1984) ont mesuré une prévalence de 9,2% d'HRB asymptomatique dans une cohorte de sujets adultes atopiques et non asthmatiques. Laprise et Boulet (1996, annexe 2) ont évalué une prévalence d'HRB de 34% au sein de sujets atopiques apparentés à un asthmatique et cette prévalence était de 13% au sein de sujets atopiques sans histoire familiale d'asthme. Braman et ses collaborateurs (1987) ont obtenu une prévalence de 40% d'HRB, sans symptômes d'asthme associés, dans un groupe de sujets rhinitiques allergiques. Ces chercheurs ont également démontré que 3 des 16 sujets testés ont développé des symptômes d'asthme sur une période de 4 à 5 ans. Récemment, Leynaert et ses collaborateurs (1997) ont rapporté une prévalence d'HRB de 33% chez un groupe de sujets rhinitiques. De plus,

Salob et ses collaborateurs (1993) ont démontré que 78% des enfants ayant une dermatite atopique sans asthme avait une HRB associée.

Finalement, on a noté la présence d'une HRB chez certains individus ayant une condition respiratoire dite normale, ne présentant aucun symptôme d'asthme ou autre condition respiratoire. Dans une étude faite par Casale et ses collaborateurs (1988), les auteurs ont évalué que 18 adultes non atopiques sur 50 (28%) sujets évalués avaient une CP_{20} métacholine inférieure ou égale à 25 mg/ml. De plus, dans cette étude, 10% de la population sans symptômes respiratoires avait une CP_{20} métacholine dans la zone associée à la condition asthmatique, c'est-à-dire inférieure ou égale à 8 mg/ml. Malo et ses collaborateurs (1983) ont évalué que 3% de la population adulte dite normale présentaient une CP_{20} métacholine inférieure ou égale à 8 mg/ml et que 8% de cette même population avaient une CP_{20} métacholine inférieure ou égale à 16 mg/ml. Hopp et ses collaborateurs (1984) ont observé une prévalence d'HRB plus élevée (37%) dans un groupe de sujets âgés entre 5 et 21 ans. Au cours de la même période, Weiss et ses collaborateurs (1984) ont noté une prévalence d'HRB asymptomatique de 19% au sein d'un groupe de 213 enfants. Casale et ses collaborateurs (1987) ont évalué que 30% des fumeurs sans symptôme respiratoire et sans atopie avaient une HRB. L'étude faite par Gerrard et ses collaborateurs (1980), dans un groupe de sujets adultes fumeurs et de non-fumeurs, présente des résultats similaires d'HRB asymptomatique ($CP_{20} \leq 20$ mg/ml) de 64% chez les fumeurs comparativement à 6% pour les non-fumeurs. Cependant, certains investigateurs ont évalué des valeurs moyennes de la CP_{20} métacholine similaires au sein d'un groupe de fumeurs et de non-fumeurs adolescents (Cockcroft et coll. 1983).

La prévalence d'HRB asymptomatique rapportée varie d'une étude à l'autre selon le phénotype associé et les techniques utilisées pour évaluer cette HRB. À ce jour, il n'y a pas de critères diagnostiques établis de façon précise par les

cliniciens permettant de définir si un sujet est hyperréacteur ou non. Le niveau de réactivité bronchique déterminant qu'un sujet est atteint d'une HRB est fixé de manière arbitraire par l'investigateur selon les études antérieures puisqu'il n'existe pas encore une uniformité dans la définition de l'HRB.

2.1.4 Association entre l'HRB et les symptômes cliniques d'asthme

Juniper et ses collaborateurs ont observé une corrélation entre les paramètres cliniques associés à l'asthme et le degré de réactivité bronchique mesurée. Ils ont noté une association entre l'augmentation de la réactivité bronchique et celle des fluctuations circadiennes des débits de pointe, de la réponse aux bronchodilatateurs et du besoin en médication (Juniper et coll. 1981; Ryan et coll. 1982).

Si l'on fait une rétrospective des diverses études qui ont tenté de déterminer la relation entre l'HRB et la sévérité clinique de l'asthme on remarque qu'il est parfois difficile d'établir un lien direct (Rijcken et coll. 1989; Josephs et coll. 1989; Josephs et coll. 1990). De plus, chez certains individus asthmatiques, l'HRB mesurée en période d'exacerbation des symptômes peut disparaître en période de rémission (Josephs et coll. 1989; Josephs et coll. 1990).

Dans le but de définir les relations entre l'asthme symptomatique et l'HRB asymptomatique, Gibson et ses collaborateurs (1995) ont évalué une cohorte d'enfants comprenant un groupe avec une HRB asymptomatique, pairés à un groupe de sujets asthmatiques (pour le sexe, l'âge et la CP₂₀ métacholine) de même qu'à un groupe témoin (pour le sexe et l'âge). Ils ont retrouvé une variabilité des débits expiratoires chez les sujets avec une HRB asymptomatique similaire à celle des sujets asthmatiques et ils ont démontré que les sujets avec HRB asymptomatique sont capables de percevoir les symptômes associés à la

bronchoconstriction. Les résultats de leur étude suggèrent que, chez les enfants avec une HRB asymptomatique, les stimuli sont probablement insuffisants pour entraîner une obstruction bronchique, laquelle est proportionnelle aux symptômes d'asthme ressentis.

Dans le but de définir les associations entre le degré d'HRB, les données de fonction pulmonaire (spirométrie et variation des débits de pointe) et l'inflammation bronchique, Power et ses collaborateurs (1993) ont évalué une cohorte de 27 sujets sans histoire d'asthme ou autres affections respiratoires. Trente pourcent (9/27) des sujets présentaient une HRB asymptomatique ($CP_{20} < 8$ mg/ml, sans symptômes d'asthme). Les sujets avec une HRB asymptomatique avaient les mêmes valeurs de fonction pulmonaire que les sujets normaux et les biopsies bronchiques ne révélaient pas les éléments inflammatoires propres aux bronches de sujets asthmatiques. Les résultats obtenus par Power et ses collaborateurs suggèrent que l'HRB pourrait exister sans évidence d'inflammation bronchique, et que les symptômes relatifs à l'asthme seraient en étroite association avec l'inflammation éosinophilique et lymphocytaire.

Une meilleure caractérisation de la physiopathologie de l'HRB asymptomatique pourrait donc nous renseigner sur l'importance de ce paramètre physiologique dans l'expression clinique du phénotype asthmatique.

2.1.4.1 Étude longitudinale de cohortes de sujets atteint d'une HRB

Hopp et ses collaborateurs (1985) ont rapporté qu'une cohorte d'enfants âgés entre 5 et 10 ans avaient une réactivité bronchique supérieure à celle d'un groupe de jeunes sujets âgés entre 15 et 20 ans. Sur une période de deux ans, Backer et Ulrik (1992) ont noté une diminution de la réactivité bronchique chez

un groupe d'individus atopiques âgés entre 8 et 18 ans. Lors d'un suivi de 4 ans, Burrows et ses collaborateurs (1995) ont démontré une diminution de l'HRB asymptomatique au fil des ans. Ainsi, les sujets évalués présentaient une HRB plus importante à 9 ans que celle notée à 13 ans lors de la dernière évaluation. Dans cette étude, ils ont retrouvé une plus grande réactivité bronchique chez les garçons (47% par rapport à 27% chez les filles) et ont montré que la différence entre les deux sexes diminue avec l'âge. De plus, les résultats qu'ils ont obtenus suggèrent qu'il existe une étroite association entre l'HRB et l'atopie puisque les sujets présentant un index atopique et un taux d'IgE sériques élevés avaient une plus grande réactivité bronchique et présentaient une plus grande variabilité (augmentation) de cette réactivité bronchique au cours du suivi. Ces auteurs proposaient également que la diminution de l'HRB asymptomatique avec l'âge pourrait être attribuable à l'augmentation du calibre des voies aériennes.

Par ailleurs, dans un suivi sur une période de 18 ans, Hopp et ses collaborateurs (1992) ont tenté de déterminer la variabilité de l'HRB de sujets âgés initialement de 6 et 21 ans, selon leur antécédents familiaux. Ainsi, ils recrutèrent 25 sujets apparentés à au moins un asthmatique, 37 jumeaux dont le frère ou la soeur était asthmatique et 28 sujets non apparentés à un asthmatique. Ils ont observé une augmentation de l'HRB chez les sujets provenant de familles sujets asthmatiques et chez les frères jumeaux de sujets asthmatiques comparativement aux sujets sans histoire familiale d'asthme. Cette diminution de la CP_{20} métacholine persistait avec le temps et ne semblait pas influencée par le degré d'atopie des sujets évalués.

Visant à déterminer si l'HRB asymptomatique est une étape préliminaire à l'asthme, Zhong et ses collaborateurs (1992) ont évalué des étudiants présentant une HRB sur une période de deux ans. Sur une cohorte de 3 067 étudiants, 81 sujets (2,6%) avaient une CP_{20} métacholine inférieure à 8 mg/ml et 31 de

ceux-ci présentaient des symptômes relatifs à l'asthme. Ces sujets (48 M et 40 F ; de 11 à 17 ans) ont été pairés pour l'âge et le sexe avec des sujets normaux. Il n'y avait pas de différence significative entre les deux groupes en ce qui concerne les antécédents familiaux d'asthme ou la prévalence et la sévérité d'atopie. À la fin du suivi, 58 sujets avec HRB avaient toujours ce phénotype et 40% de ceux-ci avaient développé des symptômes d'asthme comparativement à 2% dans le groupe contrôle. Des sujets qui développaient de l'asthme symptomatique, 80% rapportaient une affection respiratoire dans la petite enfance («early respiratory illness»), ce qui suggère un rôle des infections en bas âge dans le développement de l'asthme.

L'association entre la présence d'une HRB asymptomatique et le développement de l'asthme a également été démontrée dans une étude faite par Jones (1994) sur un groupe de jeunes âgés entre 4 et 11 ans pour une période de six ans.

Somme toute, il semble que l'HRB ait un rôle important dans l'apparition de l'asthme. Toutefois, seule, elle ne permet pas toujours de prédire le degré de sévérité de l'asthme, ni la médication requise pour maîtriser les symptômes. Les relations précises entre l'inflammation, l'HRB, l'atopie et l'asthme sont donc à documenter plus à fond.

2.1.5 Inflammation des voies aériennes dans l'asthme

L'inflammation des voies aériennes retrouvée dans l'asthme a été bien caractérisée. Au niveau histopathologique, l'asthme est considéré comme une affection inflammatoire chronique impliquant une infiltration de cellules telles les mastocytes, les éosinophiles et les lymphocytes, ces diverses cellules pouvant libérer divers médiateurs chimiques tels les leucotriènes et les

cytokines. Divers modifications de la structure bronchique peuvent également être observées, tels une desquamation épithéliale, un épaississement apparent de la membrane basale (en relation avec une déposition sous-épithéliale de collagène), un épaississement de la zone musculaire lisse et une altération de la matrice extracellulaire (Figure 2.1, p. 43).

2.1.5.1 Bases pathologiques de l'inflammation dans l'asthme

La première mention de la présence d'une l'inflammation des voies aériennes dans l'asthme à été notée par Osler en 1892, puis par Houdson et ses collaborateurs en 1953. Ces chercheurs ont remarqué des altérations importantes des voies aériennes de patients décédés d'asthme. Toutefois, ces études ne permettaient pas de mettre en parallèle la sévérité clinique de l'asthme des patients et les changements morphologiques observés post-mortem. Dans la plupart des cas, la sévérité clinique de l'asthme n'était pas clairement établie, ce qui compliquait l'association entre les changements morphologiques et le statut clinique (Ciba symposium 1959). Cette première étape de la caractérisation des modifications morphologiques bronchiques a cependant permis d'associer l'asthme à la présence de bouchons muqueux, d'une desquamation épithéliale, d'un épaississement de la membrane basale et d'un infiltrat cellulaire important de la muqueuse par des cellules comprenant des lymphocytes, des éosinophiles et des mastocytes. En 1960, les travaux de Dunnill ont également démontré ces altérations de la muqueuse bronchique en plus d'une réduction significative du nombre de cils à la surface des cellules épithéliales. Lors d'une étude anatomique quantitative, Dunnill et ses collaborateurs (1969) ont également démontré une augmentation du nombre de glandes à mucus et du tissu musculaire dans les bronches de sujets asthmatiques par rapport à des sujets normaux. Par la suite, Cutz et ses collaborateurs en 1978 ont analysé les biopsies bronchiques d'enfants asthmatiques, décédés ou non d'une exacerbation de leur asthme. Cette

recherche a permis de déterminer que les altérations bronchiques étaient similaires, bien que moins prononcées sur les prélèvements bronchiques des sujets non décédés d'asthme.

Le développement des techniques endoscopiques a permis d'avoir un accès direct aux voies aériennes *in vivo* et d'accroître nos connaissances sur les anomalies histologiques rencontrées dans l'asthme. Beasley et ses collaborateurs (1989) ont observé un nombre accru d'éosinophiles et de mastocytes activés dans les spécimens bronchiques de sujets asthmatiques en comparaison aux sujets normoréacteurs, ce qui confirmait l'implication de ces cellules inflammatoires dans l'asthme. De plus, ces chercheurs ont montré que les changements morphologiques décrits dans l'asthme étaient également présents dans l'asthme léger ainsi que sur des spécimens bronchiques de sujets avec asthme en rémission. Une déposition de collagène sous-épithélial, créant un épaissement apparent de la membrane basale a également été associée à l'asthme au cours de la même période (Roche et coll. 1989).

Au cours des dernières années, l'utilisation de la bronchoscopie flexible a permis d'évaluer les différents phénomènes inflammatoires et structuraux présents dans l'asthme permettant ainsi l'analyse du liquide de lavage bronchoalvéolaire et des biopsies bronchiques chez les sujets asthmatiques. Malgré le fait que les techniques de prélèvements biopsiques peuvent engendrer certains artefacts dont un détachement de l'épithélium bronchique, l'expérience acquise au cours des années a permis d'évaluer de façon relativement adéquate les différents dommages présents au niveau de la muqueuse bronchique dans l'asthme. Les techniques de microscopie optique, électronique et également immunohistochimiques, en plus de celles plus telles l'hybridation *in situ*, etc. ont permis l'analyse détaillée des spécimens bronchiques prélevés chez les sujets asthmatiques.

Les effets de différents médicaments sur l'inflammation et la structure bronchique ont également été rapportés. Selon divers travaux, il semble que l'inflammation soit réduite suite à un traitement aux corticostéroïdes, telle que démontré par la réduction du nombre d'éosinophiles, de mastocytes et de lymphocytes activés dans les voies aériennes (Juniper et coll. 1990; Djukanovic et coll. 1991; Power et coll. 1993).

Un traitement aux corticostéroïdes pourrait également rétablir l'intégrité de l'épithélium bronchique des sujets asthmatiques, bien que ceci n'entraîne pas de rémission complète de la symptomatologie asthmatique (Laitinen et coll. 1993). Ces observations sont en accord avec les études de Haahtela et ses collaborateurs (1993) portant sur des sujets avec asthme de sévérité variable récemment diagnostiqué. Ces auteurs ont évalué l'effet de différents traitements tels l'utilisation de β -2 agonistes ou de corticostéroïdes inhalés en période d'exacerbation des symptômes, de même qu'après une provocation bronchique allergénique au sein du même groupe de sujets. Leurs travaux ont confirmé la présence d'une inflammation bronchique dans l'asthme, et ce, indépendamment de la sévérité de cette affection. De plus, ils ont noté une certaine association entre l'augmentation de l'HRB et l'augmentation d'oedème bronchique (perméabilité vasculaire accrue). Ils ont également indiqué un rétablissement de l'épithélium bronchique en plus d'une réduction importante du nombre de cellules inflammatoires suite au traitement stéroïdien. Finalement, ils ont démontré que quatre heures après la provocation allergénique, le nombre de cellules inflammatoires augmentait significativement dans la muqueuse et la sous-muqueuse bronchiques. Jeffery et ses collaborateurs (1992) ont démontré qu'une thérapie aux corticostéroïdes ne réduisait pas le dépôt de collagène sous-épithélial. Cette observation suggère que, malgré un traitement aux corticostéroïdes, le remodelage des voies aériennes de l'asthmatique est en grande partie irréversible chez les sujets atteints depuis plusieurs mois ou années. La diminution de la réactivité

bronchique sous corticostéroïdes est probablement associée à la réduction d'éléments inflammatoires dans les bronches, tandis que la persistance de l'HRB est possiblement associée aux altérations structurales irréversibles des voies aériennes (fibrose sous-épithéliale) de l'asthmatique. Cette hypothèse est supportée par les travaux de Lungren (1977) réalisés sur des spécimens bronchiques de sujets asthmatiques sous traitement stéroïdien, où il a démontré une diminution de l'inflammation conjointement à une persistance de l'HRB et de la déposition de collagène sous la membrane basale.

Somme toute, il semble que l'on note une diminution de l'inflammation suite au traitement stéroïdien bien que ce dernier ait peu d'effet sur le remodelage bronchique en cause dans la persistance de l'HRB. Il est possible que le remodelage bronchique soit réversible par l'application précoce d'un traitement anti-inflammatoire (avant l'apparition des symptômes d'asthme) mais ceci reste à étudier (Gautrin et coll. 1994).

2.1.5.2 Cellules inflammatoires

Tel qu'indiqué précédemment, les biopsies bronchiques de sujets asthmatiques révèlent un infiltrat de cellules inflammatoires, principalement composé d'éosinophiles, de mastocytes, de macrophages, de monocytes et de lymphocytes (Figure 2.1, p.43). Contrairement à ce que l'on observe chez les sujets normaux, ces cellules sont non seulement présentes dans les voies aériennes des sujets asthmatiques mais sont également activées. Cet infiltrat cellulaire s'observe même chez les asthmatiques légers (Beasley et coll. 1989) et précocement dès les premiers symptômes d'asthme (Laitinen et coll. 1983).

L'éosinophile

L'accumulation d'éosinophiles dans la muqueuse et la sous-muqueuse bronchiques semble un phénomène important dans la physiopathologie de l'asthme (Beasley et coll. 1989; Jeffery et coll. 1989; Azzawi et coll. 1990; Bousquet et coll. 1990). Cette infiltration d'éosinophiles et leur activation semblent en effet contribuer à l'obstruction des voies aériennes et à l'augmentation de la réactivité des bronches à certains stimuli chez les sujets asthmatiques.

Bien qu'un nombre considérable d'éosinophiles activés soit donc présent dans les bronches de sujets asthmatiques, certaines études rapportent l'absence d'association entre le nombre d'éosinophiles et l'HRB (Kelly et coll. 1988; Beasley et coll. 1989). Cependant, d'autres auteurs ont observé une relation étroite entre ces deux paramètres (Wardlaw et coll. 1988; Azzawi et coll. 1990; Walker et coll. 1991; Ackerman et coll. 1994). Wardlaw et ses collaborateurs (1988) ont noté une corrélation négative entre la PC_{20} et le nombre d'éosinophiles lorsque les sujets ayant une CP_{20} inférieure à 8 mg/ml étaient soustraits des analyses statistiques. Walker et ses collaborateurs (1991) ont rapporté que dans un groupe de sujets asthmatiques légers, le nombre d'éosinophiles était associé avec la CP_{20} métaboline et au VEMS. Dans une étude visant à caractériser la morphologie bronchique des sujets asthmatiques atopiques, asthmatiques non atopiques et de sujets témoins, Azzawi et ses collaborateurs (1990) ont retrouvé une relation entre le nombre d'éosinophiles et le degré de réactivité bronchique. Les travaux d'Ackerman et ses collaborateurs (1994) ont également démontré une relation entre ces deux paramètres. De plus, selon ces derniers, il semble que le nombre d'éosinophiles activés soit supérieur chez les sujets avec un asthme symptomatique comparativement aux sujets asthmatiques en phase de rémission et que leur nombre est négligeable chez les sujets normaux.

Les éosinophiles présents dans la muqueuse de sujets asthmatiques ont la caractéristique d'être activés, comme l'indique l'aspect dégranulé des cellules en microscopie électronique (Beasley et coll. 1989) et la libération de médiateurs originant de leurs granules (Figure 2.1, p.43). La protéine cationique de l'éosinophile (ECP), la protéine majeure (MBP) et la neurotoxine dérivée de l'éosinophile (EDN) sont des protéines basiques, riches en arginine, retrouvées dans les granules éosinophiliques. Ces protéines sont relarguées en grande quantité dans les tissus bronchiques des individus asthmatiques. Plusieurs études ont démontré une certaine corrélation entre la concentration de ces protéines et la sévérité clinique de l'asthme (Bousquet et coll. 1990; Bousquet et coll. 1991) ou, plus précisément avec le niveau d'HRB (Wardlaw et coll. 1988).

La protéine cationique de l'éosinophile (ECP) et la MBP contribuent à la dénudation de l'épithélium observée chez les sujets asthmatiques, tel que démontré *in vitro* et lors d'études expérimentales utilisant un modèle animal (Gleich et coll. 1979). ECP et MBP sont donc des protéines cytotoxiques pour l'épithélium bronchique. Les sujets asthmatiques présentent une élévation significative du nombre d'éosinophiles et de la MBP dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire (LBA), et la quantité de protéines évaluée est proportionnelle au nombre d'éosinophiles présents (Wardlaw et coll. 1988). La réaction asthmatique allergique tardive s'accompagne d'ailleurs d'une accumulation d'éosinophiles activés positifs pour l'EG2, un anticorps reconnaissant un antigène de l'ECP sécrétée, et de la présence de produits de dégranulation dans le liquide de LBA (Kay 1991). Lam et ses collaborateurs (1987) suggèrent aussi une association entre l'HRB et le nombre d'éosinophiles et de leurs produits. Ils proposent que les dommages épithéliaux, causés par les médiateurs éosinophiliques, seraient à l'origine de l'HRB. Les études faites par Flavahan et ses collaborateurs (1988) appuient cette hypothèse. En effet, ces auteurs ont démontré, *in vitro* sur un modèle d'anneaux trachéaux exposés à un milieu contenant de la MBP, que l'augmentation de la réactivité bronchique était

dépendante de la présence de tissu épithélial. Ces résultats indiquent que l'association entre l'HRB et la présence de la MBP dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire est peut-être la résultante de l'action de la MBP sur les cellules épithéliales. Donc, il semble évident que les éosinophiles retrouvés dans la muqueuse et la sous-muqueuse bronchiques soient en partie responsables de l'HRB de l'asthmatique, probablement par leur effet cytotoxique sur l'épithélium. En ce sens, des études ont démontré une certaine corrélation entre l'intensité de l'infiltrat éosinophilique de la sous-muqueuse et l'augmentation des espaces intercellulaires des cellules épithéliales (Ohashi et coll. 1992). ou encore l'accroissement de l'intensité de la desquamation de l'épithélium (Wardlaw et coll. 1988; Bousquet et coll. 1990). On a démontré, chez les primates, qu'une instillation intratrachéale de MBP purifiée cause une HRB à la métacholine dont le degré sera directement en relation avec la quantité de MBP instillée (Gundel et coll. 1991).

En plus des protéines énoncées ci-dessus, les éosinophiles sécrètent une quantité considérable de médiateurs phospholipidiques qui agissent aussi dans la pathogénèse de l'asthme. Les éosinophiles sécrètent le leucotriène C4 (LTC₄), qui est un puissant agent bronchoconstricteur, à l'état basal (Wardlaw et coll. 1989) et suite à une provocation bronchique induite par inhalation d'allergènes (Diaz et coll. 1989). Ils peuvent aussi sécréter de grandes quantités de facteur activateur des plaquettes (PAF) possédant des propriétés vasodilatatrices, chimiotactiques pour les éosinophiles et d'augmentation de l'adhésion aux cellules endothéliales (Kimani et coll. 1988), en plus d'augmenter la production de mucus et l'HRB mesurés suite à l'inhalation (Cuss et coll. 1986). Cependant, quoique Cuss et ses collaborateurs en 1986 aient démontré une augmentation de la réactivité bronchique suite à l'inhalation de PAF, la plupart des études faites à ce jour ne permettent pas d'attribuer un rôle majeur aux PAF dans l'expression clinique de l'asthme. Ceci est bien sûr exploré de façon plus

extensive, particulièrement en évaluant l'effet de nouvelles générations d'inhibiteurs du PAF.

Le mécanisme de recrutement préférentiel des éosinophiles plutôt que de neutrophiles dans les voies aériennes d'individus asthmatiques est l'objet de plusieurs études. L'un des phénomènes observés est la migration transvasculaire des éosinophiles et des médiateurs impliqués dans ce phénomène. Vignola et ses collaborateurs (1993) ont montré le rôle important des molécules d'adhérence ICAM-1, ELAM-1 et VCAM dans le recrutement des éosinophiles au site de l'inflammation. Leur l'expression est amplifiée à la surface des cellules endothéliales des asthmatiques en réponse à différentes cytokines. Plus précisément, les éosinophiles sont activés au contact des cellules endothéliales et leur adhérence aux intégrines spécifiques pourrait expliquer la concentration de ces cellules au site inflammatoire. Ces observations sont en accord avec les travaux réalisés sur les primates par Gundel et ses collaborateurs (1991 et 1992) où ils montraient une diminution de l'éosinophilie bronchique suite à l'utilisation d'anti-ELAM-1 et d'anti-ICAM-1. Par ailleurs, chez l'humain, les analyses de biopsies bronchiques de sujets asthmatiques en comparaison à des sujets normaux n'ont pas permis d'établir de distinction entre le nombre de cellules endothéliales bronchiques (CAM-1 et ELAM-1), évalué par marquage immunologique (Montefort et coll. 1992). Cette étude a toutefois permis de démontrer que l'inhalation de corticostéroïdes réduit considérablement l'éosinophilie bronchique, sans toutefois modifier l'expression des molécules d'adhérence.

Les nombreux médiateurs produits par les lymphocytes T tiennent un rôle important dans la maturation des éosinophiles et certains d'entre eux affectent les éosinophiles matures. Ainsi, on a démontré *in vitro* que le GM-CSF et l'interleukine-5 (IL-5) interviennent dans la maturation des éosinophiles en augmentant les métabolismes cytotoxique et oxydatif en plus de prolonger la

durée de vie des éosinophiles (Lopez et coll. 1988; Yamaguchi 1988). En 1990, Walsh et ses collaborateurs ont démontré que l'IL-5 crée une hyperadhérence éosinophilique (sans affecter les neutrophiles) par des mécanismes impliquant des glycoprotéines d'adhésion de la famille des CD11/CD18 (Walsh et coll. 1990). ICAM-1 est un des ligands pour l'une de ces glycoprotéines d'adhésion (Rothlein et coll. 1986). Ces observations démontrent que l'utilisation d'anti-ICAM-1 réduit l'éosinophilie bronchique et l'HRB, suggérant que l'ICAM-1 joue un rôle important dans l'inflammation bronchique des sujets asthmatiques. Ces résultats suggèrent qu'une approche thérapeutique visant à réduire l'adhésion éosinophilique pourrait réduire l'inflammation observée dans les bronches d'individus asthmatiques et donc, la symptomatologie associée.

Certains autres facteurs ont été documentés comme agissant sur l'endothélium bronchique en augmentant l'adhésion des granulocytes. Lamas et ses collaborateurs (1989) ont démontré que l'IL-1 accroît la durée de vie des éosinophiles dans le tissu bronchique et que ce processus est inhibé par l'action des corticostéroïdes.

Les mastocytes

Les mastocytes sont des cellules résidentes des voies aériennes. On les retrouve dans l'épithélium bronchique, dans la sous-muqueuse et dans le parenchyme pulmonaire. On retrouve deux types de mastocytes, lesquels sont différenciés suivant leur contenu protéique. Il s'agit du mastocyte T (tryptase-positif et chymase-négatif) et du mastocyte TC (positif pour la tryptase et la chymase) (Irani et coll. 1989). Les mastocytes présents dans le tissu bronchique sont, en majeure partie, de type muqueux et contiennent de la tryptase mais pas de chymase (Gibson et coll. 1993).

Beasley et ses collaborateurs (1989) ont démontré que les mastocytes de sujets asthmatiques allergiques sont dégranulés comparativement à ce que l'on observe sur les biopsies bronchiques de sujets normaux, ce qui rend difficile leur identification par la mise en évidence des protéines contenues dans les granules. Jeffery et ses collaborateurs (1989) ont évalué une plus grande proportion de mastocytes dans les biopsies bronchiques de sujets rhinitiques par rapport à un groupe de sujets normaux. Djukanovic et ses collaborateurs (1990) et Bradley et ses collaborateurs (1991) ont tenté de décrire les différences entre les mastocytes observés dans la muqueuse bronchique de sujets asthmatiques allergiques, atopiques et normaux et ont obtenu des résultats similaires pour les trois groupes de sujets. Néanmoins, il semble que l'activité des mastocytes des sujets asthmatiques soit plus importante que celle observée chez les sujets atopiques ou normaux. Cette augmentation de l'activité est confirmée par la mise en évidence de concentrations accrues de médiateurs des granules tels l'histamine (Gordon et coll. 1990), la prostaglandine D2 (PGD2) (Bentley et coll. 1992), le LTC4 et la tryptase (Bousquet et coll. 1991) chez les asthmatiques par rapport aux sujets normaux. Cependant, il n'existe aucune association significative entre la concentration de ces médiateurs et le degré d'HRB (Bousquet et coll. 1991). Les mastocytes recueillis chez les sujets asthmatiques ont de plus, une augmentation significative de leur capacité à dégranuler spontanément ou sous l'effet d'anticorps anti-IgE (Wardlaw et coll. 1988).

Le principal rôle du mastocyte semble être dans l'initiation et le soutien de l'inflammation asthmatique. Les études de Lee et ses collaborateurs suggèrent un effet bronchoconstricteur des mastocytes dans l'asthme provoqué par l'exercice, l'air froid ou l'hyperventilation (Lee et coll. 1983). Les mastocytes jouent un rôle fondamental dans la réponse immédiate aux allergènes et il est probable que ces cellules jouent en plus un rôle dans la persistance de la réaction inflammatoire. En effet, ces cellules libèrent des médiateurs chimiotactiques comme le LTB4 et elles ont la capacité de sécréter des

cytokines comme l'IL-1, l'IL-3, l'IL-5, l'IL-8, le facteur nécrosant des tumeurs (TNF) et le facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF), qui peuvent recruter et activer les éosinophiles, les monocytes et les neutrophiles (Gordon et coll. 1990).

Les neutrophiles

L'implication des neutrophiles dans l'asthme est discutable. Une augmentation de neutrophiles dans le liquide de LBA a été rapportée dans certains types d'asthme professionnel, dans quelques cas de réaction asthmatique allergique et dans l'asthme à l'exercice (O'Byrne et coll. 1995). Le neutrophile sécrète plusieurs médiateurs tels les prostaglandines, les thromboxanes, le LTB₄ et le PAF. La présence d'un nombre important de neutrophiles dans les biopsies bronchiques de sujets asthmatiques et dans le liquide de LBA laisse cependant croire qu'il contribue aux réactions asthmatiques (O'Byrne et coll. 1995).

Les macrophages et les monocytes

Les macrophages sont présents tout le long de l'arbre bronchique et ils constituent le principal moyen de défense cellulaire du poumon. Plusieurs éléments indiquent que les macrophages et les monocytes sont impliqués dans l'asthme (Lee et coll. 1992). La densité macrophagique est augmentée dans les biopsies bronchiques de sujets asthmatiques (Poston et coll. 1992) et les macrophages sont activés, tel que démontré par la sécrétion accrue de cytokines (Gosset et coll. 1991) et la présence d'un pourcentage augmenté de macrophages hypodenses dans le LBA de sujets asthmatiques (Chanez et coll. 1991). Ces cellules contiennent des récepteurs de faible affinité pour les IgE (FcεR II) (Melewicz et coll. 1982). Les macrophages sont capables de sécréter un large spectre de médiateurs lipidiques dont le PAF, le leucotriène B₄, la PGF₂α et la thromboxane B₂. Ces médiateurs agiraient en synergie avec ceux du mastocyte

pour amplifier la réaction asthmatique immédiate. Le macrophage semble également impliqué dans la réaction asthmatique tardive par la sécrétion de médiateurs et de cytokines proinflammatoires tels l'IL-1, l'IL-6, le GM-CSF, le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le TNF- α , et des facteurs de libération de l'histamine (Kelley 1990; Lacoste et coll. 1991; Pin 1994). Les monocytes influencent également le processus inflammatoire des voies aériennes chez les asthmatiques puisqu'ils libèrent divers médiateurs impliqués dans la cascade inflammatoire (IL-1, IL-8, TNF, GM-CSF, etc.).

Les macrophages alvéolaires seraient impliqués dans la réaction asthmatique allergique (Diaz et coll. 1989). Kay et ses collaborateurs ont démontré une augmentation de la concentration en monocytes chez les sujets atteints d'un asthme sévère résistant aux corticostéroïdes (Kay et coll. 1981).

À l'heure actuelle, la contribution exacte des macrophages et des monocytes dans la physiopathologie de l'asthme et leur implication respective dans la modulation de l'effet des autres cellules et médiateurs impliqués demeurent incertaines. Puisque les macrophages semblent manifester divers phénotypes fonctionnels, il est difficile de déterminer leur rôle réel dans l'asthme.

Les lymphocytes

Les lymphocytes-T ont un rôle considérable dans la cascade inflammatoire impliquée dans l'asthme et l'allergie (Figure 2.1, p.43). L'importance de leur rôle est attribuable à leur capacité à reconnaître directement les antigènes présentés par les cellules accessoires et à sécréter une grande quantité de cytokines (IL-4, IL-5, interféron- γ [INF- γ], etc.) agissant sur l'ensemble des cellules impliquées dans le processus inflammatoire bronchique. Les lymphocytes-T sont les principaux lymphocytes retrouvés dans la muqueuse

bronchique. On remarque deux sous-classes de lymphocytes-T : les lymphocytes-T «helpers» (CD4⁺) et les lymphocytes-T «suppresseurs» (CD8⁺).

L'implication des lymphocytes-T dans la réponse inflammatoire dans l'asthme a été d'abord mis en évidence lors d'études post-mortem. En effet, dans une étude comparant la morphologie bronchique de sujets en *status-asthmaticus* à des sujets normaux, Dunnill et ses collaborateurs (1969) ont retrouvé un nombre supérieur de lymphocytes chez les sujets asthmatiques. Les études de Roche et ses collaborateurs (1989) ont par la suite démontré lors de l'analyse de biopsies bronchiques, une augmentation du nombre de lymphocytes dans la muqueuse bronchique des sujets asthmatiques. Plusieurs observations suggèrent que les lymphocytes-T de sujets asthmatiques et allergiques sont différents de ceux observés chez les sujets normaux. En ce sens, Azzawi et ses collaborateurs (1990) ont démontré que le nombre de lymphocytes-T n'est pas différent chez les sujets asthmatiques par rapport aux sujets normaux; cependant, les sous-populations de lymphocytes observés seraient différentes, tel que démontré par l'augmentation des CD3⁺ et CD4⁺ dans la muqueuse bronchique des sujets asthmatiques. Ces résultats indiquent que le ratio CD4/CD8 est plus élevé chez les asthmatiques que chez les normaux.

Les lymphocytes activés ont probablement un rôle à jouer dans l'élaboration de la réaction asthmatique chronique, et ce grâce à différentes modalités de sécrétion des lymphokines. Il existe deux principaux clones de lymphocytes T helper (Th). Les Th1 sont responsables de la sécrétion de l'IL-2 et de INF- γ et les Th2, de la sécrétion de l'IL-3, de l'IL-4, de l'IL-5 et du GM-CSF (Plaut et coll. 1989; Gerblich et coll. 1984; Wilson et coll. 1994; Robinson et coll. 1992). L'IL-4, l'IL-5 et l'INF- γ agissent dans la régulation de la production des IgE (Leung et coll. 1987). L'IL-3 (Sanderson et coll. 1985), l'IL-5 (Campbell et coll. 1987) et le GM-CSF (Metcalf et coll. 1986) sont des cytokines impliquées dans le recrutement et la survie des éosinophiles, tandis que l'IL-3, l'IL-4 et l'IL-5 sont d'importants

régulateurs de différenciation des éosinophiles et des mastocytes (Ihle et coll. 1983; Hamaguchi et coll. 1987). La recherche des cytokines *in vivo* est difficile en raison de leur faible concentration et de leur courte durée de vie. Utilisant les techniques d'hybridation *in situ*, il a été possible de montrer une expression accrue d'ARN messager (ARN_m) pour l'IL-5 dans les biopsies bronchiques de sujets asthmatiques allergiques comparés à des sujets non asthmatiques, et cette expression corrèle avec le nombre d'éosinophiles activés et la sévérité de l'asthme (Hamid et coll. 1991). Il est probable que l'IL-5 soit une cytokine très importante dans la régulation des éosinophiles, l'injection de cette cytokine dans différents modèles animaux entraînant une éosinophilie importante, son blocage empêchant la réponse bronchique à l'allergène et l'apparition des éosinophiles (Gulbenkian et coll. 1992). Dans le LBA, les lymphocytes-T de sujets asthmatiques expriment plus le gène de l'IL-2, l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5 et le GM-CSF alors que l'expression du gène de l'INF- γ est similaire chez les sujets asthmatiques et normaux (Robinson et coll. 1992). L'IL-4 paraît être une importante cytokine dans la régulation des IgE et de surcroît dans la réaction allergique. En effet, Finkelman et ses collaborateurs (1986) ont traité des souris infectées par *Nippostrongylus brasiliensis* à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la production d'IL-4, ce qui a eu pour effet d'inhiber la production d'IgE sans affecter la synthèse des IgG. Le résultat a été une réduction de la réaction allergique.

Dans une autre étude utilisant un modèle murin, il a été démontré *in vivo* que les CD8⁺ peuvent également être importants dans la régulation des IgE (Kemeny et coll. 1995). En effet, à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la production de CD8⁺, une réponse accrue des IgE a été notée, ce qui suggère que les CD8⁺ pourraient peut-être prévenir le développement la réaction allergique par des mécanismes indéterminés. Chez l'humain, Gonzalez et ses collaborateurs (1987) ont mesuré les taux de CD4⁺ et CD8⁺ dans le sang périphérique et dans le liquide de LBA de sujets asthmatiques

allergiques suite à une provocation antigénique; ils ont démontré une diminution des CD4⁺ et une augmentation des CD8⁺ dans le liquide de BAL chez les sujets ne présentant que la réaction allergique immédiate. En fait, ils ont observé que le ratio CD4/CD8 était inférieur chez les sujets ayant une réaction allergique immédiate par rapport aux sujets ayant une réaction allergique immédiate et retardée. Ces résultats suggèrent que les CD8⁺ pourraient possiblement prévenir le développement de la réaction retardée par des mécanismes encore à préciser.

D'autre part, une diminution des CD8⁺ a été démontrée chez les asthmatiques résistants aux corticostéroïdes (Poznansky et coll. 1985). D'autres travaux ont trouvé une baisse des CD8⁺ associée à l'atopie (Hwang et coll. 1985). De plus, les asthmatiques non traités produisent une quantité importante d'IL-2 en réponse aux antigènes d'acariens par rapport à des asthmatiques sous corticostéroïdes (Hsieh 1985) et cette production est supprimée après médication aux corticostéroïdes parallèlement à la réduction du nombre de cellules CD4⁺ (Hsieh 1984).

La contribution relative des cellules CD4⁺ (Th1 et Th2) et CD8⁺ dans l'asthme est encore à documenter. Malgré la sécrétion de cytokines par le mastocytes et les fibroblastes dans la réaction asthmatique tardive, l'activation et l'augmentation du nombre de lymphocytes T de type Th2 privilégient cette cellule comme principal modulateur de l'inflammation asthmatique (Robinson et coll. 1992; Holgate et coll. 1993). Le développement d'un clone de type Th2 et l'effet de leur cytokines sur les autres cellules inflammatoires et les cellules constituantes de la muqueuse bronchique pourraient expliquer l'apparition de l'inflammation chronique et de l'HRB retrouvées dans l'asthme.

L'implication et le rôle des lymphocytes-T dans les mécanismes inflammatoires associés à l'asthme et à l'atopie sont loin d'être précisés. Cependant, il est évident que ces cellules et les cytokines qu'elles sécrètent sont importantes

dans la génèse et l'entretien de l'inflammation observée dans l'asthme et l'atopie. La possibilité de nouvelles interventions thérapeutiques axées sur l'activité lymphocytaire est une optique intéressante.

2.1.5.3 Desquamation de l'épithélium bronchique

La desquamation de l'épithélium bronchique dans l'asthme est un phénomène reconnu (Figure 2.1, p.43). Cette altération de la matrice bronchique a été mise en évidence par l'analyse cytologique de l'expectoration puis par les études pathologiques post-mortem de sujets asthmatiques (Houston et coll. 1953). Dans le liquide de LBA de sujets asthmatiques, le nombre de cellules épithéliales est augmenté par rapport à ce que l'on mesure chez les individus normaux (Beasley et coll. 1989). Sur les coupes de biopsies bronchiques de sujets asthmatiques, la membrane basale est souvent dénudée et les couches de cellules épithéliales restantes sont désorganisées. Le nombre de cils à la surface des cellules épithéliales est également réduit de façon significative (Sodeberg et coll. 1990). Sodeberg et ses collaborateurs attribuent une partie de la desquamation épithéliale observée dans l'asthme au geste biopsique, l sant artificiellement l'épithélium. L'ensemble des travaux réalisé sur l'épithélium bronchique s'accorde à reconnaître une fragilisation de l'épithélium chez l'asthmatique. Le mécanisme expliquant cette fragilité de l'épithélium n'est pas clair; l'oedème de la muqueuse bronchique est probablement impliqué dans la desquamation des cellules épithéliales bronchiques.

Les études de Roche et ses collaborateurs (1993) ont permis de mieux déterminer l'organisation des cellules épithéliales bronchiques, en effet, ces auteurs ont indiqué que l'épithélium bronchique présente une structure stratifiée formée d'une couche de cellules basales servant d'ancrage aux couches de cellules qui s'y rattachent. Suite à ces travaux, Montefort et ses collaborateurs (1993) ont proposé que la fragilité de l'épithélium chez

l'asthmatique est possiblement occasionnée par la perte de ces cellules d'assemblage épithéliales.

Plusieurs études démontrent que la desquamation épithéliale bronchique est en relation directe avec l'HRB chez les sujets asthmatiques. Ainsi, les travaux de Beasley et ses collaborateurs (1989) ont mis en évidence une étroite corrélation entre le nombre de cellules épithéliales dans le premier recueil de liquide de LBA et l'HRB. L'étude de Jeffery et ses collaborateurs (1989) va dans la même direction et indique qu'il y a une corrélation entre le degré d'HRB et la longueur de membrane basale dénudée. Ceci n'est cependant pas retrouvé dans d'autres études (Boulet et coll. 1997).

2.1.5.4 Déposition de collagène sous-épithéliale

L'épaississement de la membrane basale (Figure 2.1, p.43), qui est en fait une déposition de collagène sous l'épithélium bronchique, a été observé dans des études autopsiques (Houston et coll. 1953) et dans diverses études de biopsies bronchiques (Beasley et coll. 1989; Roche et coll. 1989). Roche et ses collaborateurs (1989) ont démontré que l'aspect d'épaississement serait causé principalement par la déposition de collagène de types I, III, V et de fibronectine. Par la suite, Brewster et ses collaborateurs (1990) ont observé une corrélation positive entre le nombre de myofibroblastes retrouvé dans la muqueuse bronchique et le degré de fibrose, ce qui porte à croire que ces cellules seraient responsables de la fibrose subépithéliale observée dans l'asthme.

La relation entre ce dépôt de collagène et l'asthme est encore indéterminée. Boulet et ses collaborateurs (1997) ont, tout comme Jeffery et ses collaborateurs (1989), montré une corrélation entre la déposition de collagène sous-épithélial et le degré d'HRB. Toutefois, les études de Brewster et ses collaborateurs (1990)

n'indiquaient pas d'association entre l'épaisseur du dépôt de collagène et la sévérité de l'HRB, la sévérité clinique de l'asthme ou encore le degré de desquamation de l'épithélium bronchique. Il semble que ce dépôt de collagène ne soit pas influencé par la prise de corticostéroïdes inhalés pendant une courte période (Djukanovic et coll. 1992). De plus, dans une investigation où l'on a comparé les biopsies bronchiques de sujets asthmatiques avant et dix ans après un traitement aux corticostéroïdes inhalés, il n'y avait pas de réduction significative de l'épaisseur de la fibrose sous-épithéliale tandis que l'infiltrat cellulaire était résorbé (Lungren et coll. 1988). Les sujets évalués suite à la thérapie aux corticostéroïdes inhalés présentaient un asthme cliniquement stable bien qu'ils présentaient toujours une HRB à la métacholine. Ces résultats suggèrent que ce dépôt de collagène serait impliqué dans la persistance de l'HRB.

Les travaux de Chakir et ses collaborateurs (1996) ont également démontré la présence d'une fibrose sous-épithéliale dans les biopsies bronchiques de sujets rhinitiques non asthmatiques. Selon cette étude, la fibrose sous-épithéliale observée chez les sujets rhinitiques allergiques est principalement constituée par le dépôt de collagène de type I et de type III ainsi que de fibronectine, probablement produits par les myofibroblastes bronchiques. L'ensemble de leurs résultats suggère que les altérations structurales bronchiques des sujets avec rhinite allergique sont similaires, quoique de degré moindre, à ce que l'on observe dans l'asthme.

2.1.6 HRB asymptomatique et inflammation bronchique

L'étude de sujets présentant une HRB sans symptômes respiratoires associés constitue un moyen intéressant de préciser le rôle de changements structuraux et de l'inflammation bronchique dans le développement et l'entretien de cette réactivité bronchique accrue. À date cependant, il y a très peu d'études à ce

sujet. Pin et ses collaborateurs (1993) ont précédemment évalué des enfants avec une HRB à la métacholine sans symptôme d'asthme comparativement à un groupe d'enfants asthmatiques présentant une HRB à la métacholine identique et des enfants témoins sans HRB. Le profil cellulaire de l'expectoration provoquée était semblable chez les sujets avec une HRB asymptomatique et chez les sujets normaux, et donc différent des sujets asthmatiques. Les travaux de Power et ses collaborateurs (1993), portant sur une cohorte de sujets adultes, ont démontré que les sujets avec une HRB asymptomatique ne présentaient aucune évidence d'inflammation bronchique. Ces résultats suggèrent que la présence de cellules inflammatoires est probablement essentielle au développement des symptômes et que des mécanismes distincts seraient en cause dans la persistance d'une HRB.

2.2 L'ATOPIE

2.2.1 Définition

L'atopie est une affection généralement définie par la tendance à développer des anticorps de type IgE contre des allergènes communs. Phénotypiquement, l'atopie se caractérise par une ou plusieurs réponses positives aux tests cutanés d'allergie conjointement à une élévation des IgE sériques totaux (Pepys 1975). Montgomery (1988) a évalué qu'environ 75% des sujets asthmatiques sont atopiques, ce qui suggère une étroite association entre ces anomalies.

2.2.2 Relation entre l'atopie et l'HRB

Diverses études démontrent l'importance de l'atopie dans l'expression de l'HRB et de l'asthme. Ces études épidémiologiques ont établi une relation étroite entre le degré de cette HRB et l'intensité de la réponse cutanée aux tests

d'allergie à l'aide d'allergènes communs (Cockcroft et coll. 1984) ou la concentration des IgE totaux (Sears et coll. 1991). L'atopie semble être le facteur prédictif le plus important pour la présence d'une HRB. Les travaux de Dowse et ses collaborateurs (1985) ont en effet suggéré que la présence d'atopie pourrait être un facteur déterminant dans le développement d'une HRB. Les travaux de Sporik et ses collaborateurs (1990) vont dans la même direction et ont démontré que l'exposition aux acariens dans la petite enfance est un facteur déterminant dans le développement d'un asthme subséquent. De même, Boulet et ses collaborateurs (1983) ont montré que l'exposition naturelle aux aéroallergènes communs augmente le degré de réactivité bronchique tandis que l'étude de Platts-Mills et ses collaborateurs (1982) démontre que l'éviction prolongée de ceux-ci réduit le degré de cette réactivité bronchique.

2.2.3 Inflammation bronchique et atopie

Dans l'étude des interrelations entre l'HRB et l'atopie, le modèle de la provocation bronchique allergénique est fort intéressant. Ce dernier peut nous permettre d'induire une réponse bronchique à un allergène donné et à mesurer ses conséquences sur la réactivité bronchique. À cet effet, l'exposition en laboratoire à un allergène auquel la personne asthmatique est sensibilisée peut s'accompagner d'une réponse immédiate dans l'heure suivant cette provocation, et dans environ 50% des cas d'une réponse tardive soit entre 3 et 8 heures après l'exposition. Ce dernier type de réaction s'accompagne également fréquemment d'une augmentation de la réactivité bronchique non allergénique dans les jours qui suivent.

Au niveau des voies aériennes, la réponse allergique immédiate est associée à la dégranulation rapide des mastocytes, avec libération de médiateurs bronchoconstricteurs tels l'histamine, la PGD₂ et la tryptase (Wenzel et coll. 1988; Sedwick et coll. 1991; Pesci et coll. 1993). Lors de cette réponse

immédiate, il ne semble pas y avoir de modification majeure du profil cellulaire ou du degré d'activation des cellules au niveau des voies aériennes. Cependant, lorsqu'une réponse tardive survient, on peut observer un infiltrat de cellules inflammatoires composé principalement d'éosinophiles, de lymphocytes et de mastocytes (Sedwick et coll. 1991).

Quand une réaction tardive survient, les éosinophiles représentent la majorité des cellules récupérées dans le liquide de LBA (Sedwick et coll. 1991; De Monchy et coll. 1985) ou récupérées de l'expectoration provoquée (Pin et coll. 1992). Certains auteurs ont démontré qu'il existe une corrélation entre l'éosinophilie et l'apparition d'une réponse bronchique tardive, ainsi qu'avec l'importance de l'augmentation de la réactivité bronchique à l'histamine évaluée 30 heures après l'inhalation d'allergènes (Brusasco et coll. 1990; Pin et coll. 1992).

En ce qui concerne les mastocytes, la situation est moins précise. Diaz et ses collaborateurs ont trouvé une diminution du nombre de mastocytes à la 6^e heure chez les sujets présentant une réponse immédiate et tardive (Diaz et coll. 1989) alors que d'autres auteurs ont décrit une augmentation de ces cellules après la 24^e heure dans le liquide de LBA ou dans l'expectoration forcée (Pin et coll. 1992). Quoi qu'il en soit, il est possible que la dégranulation des mastocytes rende leur mise en évidence difficile par les techniques immunohistochimiques actuelles.

Les lymphocytes tiennent également un rôle prépondérant dans le processus inflammatoire associé à la réponse aux allergènes. Gonzalez et ses collaborateurs (1987) ont indiqué une diminution du nombre de lymphocytes CD4⁺ dans le sang simultanément à une augmentation significative de ces cellules dans le liquide de LBA lors de la réaction semi-retardée. Tel que mentionné précédemment (p.34), il est probable que les sous-populations lymphocytaires activées soient différentes selon qu'il existe une réponse

immédiate seule ou associée à une réponse tardive. Les travaux de Broide et ses collaborateurs (1991) ont également démontré l'importance de la sécrétion de cytokines d'origine lymphocytaire (IL-5, GM-CSF, etc.) dans les voies aériennes de sujets atopiques.

Les travaux de Djukanovic et ses collaborateurs (1992) ont rapporté une inflammation des voies aériennes chez les sujets atopiques sans asthme associé. Ils ont observé la présence d'éosinophiles et de mastocytes en plus d'une fibrose sous-épithéliale. En fait, ils ont démontré la présence d'altérations structurales de la muqueuse bronchique en plus du recrutement de cellules proinflammatoires dans les voies aériennes de sujets atopiques non asthmatiques et ces observations sont similaires à ce que l'on observe chez les asthmatiques quoique de degré moindre. Des résultats similaires ont été obtenus par Boulet et ses collaborateurs (1995) dans les voies aériennes de sujets rhinitiques.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'augmentation de la réactivité bronchique induite par une exposition allergénique chez un sujet sensibilisé résulte d'un phénomène inflammatoire survenant principalement lors de la réponse tardive. Ils confirment que l'infiltration de cellules inflammatoires est un facteur déterminant dans l'augmentation de l'HRB. De plus, l'ensemble de ces résultats suggère que dans des cas de stimulations allergéniques répétées, comme c'est le cas pour les allergies aux acariens, une inflammation chronique sévère peut s'installer et ainsi entretenir une HRB permanente.

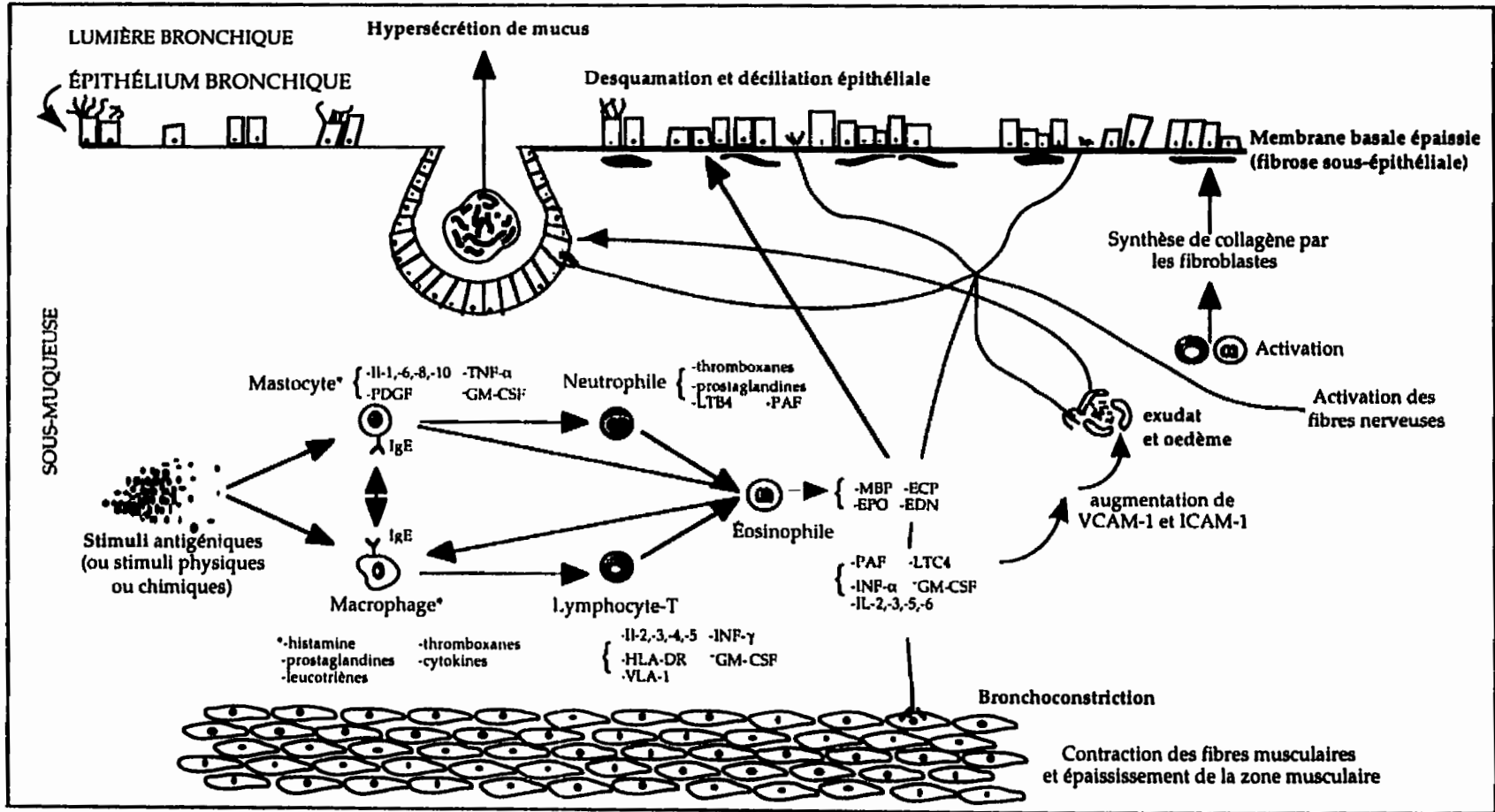


Figure 2.1 Schéma de l'histopathologie de l'asthme. L'interaction des cellules inflammatoires avec les cellules constitutives de la paroi bronchique et la matrice extracellulaire provoque probablement des changements morphologiques et fonctionnels qui contribueront à l'HRB et aux symptômes d'asthme lorsque ces altérations seront devenues assez importantes et chroniques. L'hyperplasie du muscle lisse (quoique contesté par certains) et la déposition de fibres de collagène dans la sous-muqueuse, ainsi que l'altération de la matrice extracellulaire de la muqueuse bronchique, constituent des altérations potentiellement liées à la genèse de l'asthme.

2.3 GÉNÉTIQUE DE L'ATOPIE ET DE L'HRB

Il y a déjà plus de quarante ans, soit en 1953, la découverte de la double hélice par Watson et Crick a révolutionné notre vision de la biologie moléculaire et de la génétique. Nous voici maintenant à l'ère du clonage positionnel, technique permettant la reconnaissance de gènes anormaux. Cette technique a permis de confirmer la présence d'anomalies d'un gène majeur dans plusieurs affections telles la mucoviscidose, la myopathie de Duchenne et la chorée de Huntington. Par ailleurs, l'atopie, cette tendance à produire des anticorps de type IgE contre des allergènes communs et à provoquer des affections comme l'asthme, semble être sous l'influence combinée de facteurs génétiques et environnementaux. Jusqu'à aujourd'hui, de nombreux travaux furent réalisés afin d'identifier le ou les gènes impliqués dans cette pathologie.

Au cours des années 1970, avec la naissance du génie génétique, l'analyse des gènes des organismes tant simples que complexes est devenue réalisable. Cette nouvelle pratique a donné à la génétique une dimension moléculaire extraordinaire, ce qui a permis aux chercheurs de définir la «constitution génétique» des êtres vivants, en plus d'établir les distinctions qui séparent les sujets normaux et les sujets atteints d'une maladie particulière. L'évolution rapide des méthodes de la biologie moléculaire a rendu possibles des améliorations notables de nos connaissances, dont plusieurs ont eu des applications médicales. La compréhension, le diagnostic, le traitement et la prévention de diverses maladies ont progressé substantiellement. L'avènement du génie génétique a profité également aux sciences fondamentales, dont la biologie, ainsi qu'à la médecine clinique.

2.3.1 Le gène, élément de la transmission héréditaire

La science de la génétique a évolué à partir de la mise en évidence des gènes, qui sont les éléments contenant l'information héréditaire. Un gène est une unité d'information génétique qui détermine l'expression d'un caractère. Avant la découverte de l'acide désoxyribonucléique (ADN) par Avery en 1944, le gène était une notion abstraite. En fait, ce sont les travaux de Watson et Crick (1953) qui ont permis de définir clairement la structure de l'ADN, double hélice constituée de deux chaînes polynucléotidiques appariées par des liaisons de bases complémentaires : couples adénine-thymine (A-T) et cytosine-guanine (C-G). En 1960, Jean Dausset découvrait les antigènes des leucocytes humains (HLA), qui constituent un ensemble de gènes codant des protéines à la surface des cellules. La configuration des HLA est variable d'un individu à l'autre ce qui permet de les distinguer.

2.3.1.1 *La cartographie du génome*

En raison de l'importante complexité des génomes, leur étude passe nécessairement par l'établissement de cartes, qui permettent de se repérer le long des chromosomes à l'aide de marqueurs. Ces marqueurs sont des fragments d'ADN isolés et clonés à partir du génome étudié et que l'on va ordonner sur celui-ci. Il existe essentiellement deux types de cartes, qui diffèrent par le type de fragments que l'on cherche à ordonner, par la méthode employée pour dresser les cartes, et par l'unité utilisée pour mesurer les distances qui séparent ces fragments : les cartes génétiques et les cartes physiques.

Les cartes génétiques

Les cartes génétiques sont construites à partir de marqueurs qui correspondent le plus souvent à de courts fragments d'ADN génomique définissant chacun un locus unique. Ces cartes indiquent les positions relatives des marqueurs les uns par rapport aux autres. Une fois établies, elles servent de référence pour localiser tout autre marqueur ou gène dans le génome. Pour une carte génétique, les marqueurs sont ordonnés grâce à l'analyse de leur ségrégation au cours des générations (Bernot 1996).

À ce jour, la densité des marqueurs obtenue permet d'entreprendre la localisation des gènes responsables de toute maladie génétique monogénique, avec une probabilité de succès et une rapidité importantes. Il faut aujourd'hui quelques mois pour localiser un gène morbide, alors que des années étaient nécessaires avant la disponibilité des cartes. La densité des marqueurs permet également d'envisager la cartographie de régions impliquées dans les maladies multifactorielles (Bernot 1996).

En ce qui concerne le point de vue plus fondamental, les cartes génétiques permettront d'étudier certaines particularités de la méiose, telles que la variation de fréquence des recombinaisons en fonction du sexe ou pour quelles raisons certaines régions du génome recombinent plus fréquemment que d'autres. Enfin, les marqueurs ordonnés de la carte génétique représentent un outil très important pour l'établissement de la carte physique du génome (Bernot 1996).

Les cartes physiques

Les chromosomes sont des molécules immenses, constituées d'une molécule d'ADN de 20 angströms de diamètre et de plusieurs centimètres de long. Ils constituent un matériel à la fois trop complexe et trop difficile à purifier pour être utilisable tel quel. La carte physique d'un génome doit rendre disponible toute région désirée de celui-ci sous la forme d'un fragment d'ADN cloné, aisément manipulable. L'établissement d'une telle carte passe d'abord par la construction d'une banque d'ADN représentative du génome considéré. Cette étape est relativement facile à accomplir, même pour des génomes de grande taille comme celui de l'homme. L'ordonnement des clones est cependant beaucoup plus complexe : il suppose que chaque clone soit individuellement identifié, que la position par rapport au chromosome dont il est dérivé soit déterminée, ainsi que sa position par rapport aux autres clones de la banque. L'établissement de la carte physique est le préalable indispensable au travail de séquençage : c'est à partir de cette carte que sera choisi l'ensemble minimal de clones génomiques qui seront séquencés. L'établissement d'une carte physique utilise les données de la carte génétique. Dans une carte physique, les distances sont mesurées en paire de bases (mesures absolues) et matérialisent des distances physiquement mesurables le long des chromosomes (Bernot 1996).

L'établissement d'une carte physique passe donc en premier lieu par la construction d'une banque génomique. La capacité du vecteur choisi est un paramètre très important : il déterminera, en fonction de la taille du génome étudié, le nombre de clones à analyser.

En 1987, un pas important était franchi par Burke, Carle et Olson avec la découverte d'un nouveau vecteur pouvant se propager dans la levure : le mini-chromosome artificiel de levure (YAC: Yeast Artificial Chromosome)(Burke et coll. 1987). Ce vecteur, comportant toutes les caractéristiques d'un

chromosome de levure, permettait l'incorporation de fragments d'ADN exogène de plus d'une mégabase. Ainsi, en positionnant les fragments d'ADN humain contenus dans les YACs, il est devenu possible de dessiner la carte physique du génome humain (Figure 2.2, p.50). La plus récente carte physique de ce génôme a été réalisée au Whitehead à partir de 33 000 YACs. Par ailleurs, même si les YACs constituent un outil indispensable à la cartographie du génome humain, leur utilisation exige beaucoup de prudence en raison du taux élevé de chimères. Il est ainsi possible d'analyser la structure interne du gène. C'est certainement la médecine qui a retiré le plus d'avantages de cette nouvelle science. On trouvera dans le tableau 2.1 les dates importantes qui ont marqué le développement du génie génétique, particulièrement en relation avec la recherche sur les déterminants génétiques de l'atopie (modifié de Kaplan et Delpech 1993).

Table 2.1

Découvertes importantes concernant l'identification des déterminants génétiques, plus particulièrement en relation avec l'atopie

<u>Année</u>	<u>Découvertes</u>
1944	- ADN
1953	- Structure en double hélice de l'ADN
1960	- Mise au point du mécanisme de codage génétique - Système HLA («Antigènes des leucocytes humains»)
1972	- ADN recombinant <i>in vitro</i>
1973	- Élaboration de la technique du clonage génétique avec bactéries
1975	- Description de la méthode de Southern
1977	- Découverte des introns - Clonage d'un gène humain - Localisation chromosomique d'un gène humain par hybridation
1978	- Polymorphisme de restriction humain (RFLP) - Banque génomique humaine
1979	- Oligonucléotides synthétiques utilisés comme sonde
1982	- Localisation génomique d'un locus morbide inconnu (myopathie de Duchenne) par analyse de liaison avec un RFLP
1983	- Localisation chromosomique d'un locus morbide autosomique à gène inconnu (chorée de Huntington)
1985	- Découverte des sondes minisatellites (empreintes génétiques) - Diagnostic prénatal d'une maladie à gène inconnu à l'aide des RFLP génétiquement liés (myopathie de Duchenne) - Amplification polymérasique (PCR)
1986-1987	- YACs (chromosomes artificiels de levure) - Projet «Génome Humain»
1988	- Automatisation de la méthode PCR grâce à la Taq polymérase - Application du PCR à la méthode des transcrits
1989	- Découverte du polymorphisme des microsatellites
1990	- Tentatives de thérapie génétique humaine
1992	- Première carte physique d'un bras de chromosome humain - Localisation génomique de l'atopie sur le chromosome 11q
1994	- Établissement d'une association génétique entre le chromosome 5q et la régulation du taux d'IgE sériques
1995	- Publication de la carte physique du génome humain par Généthon
1997	- Plus récente carte physique du génome humain par le Whitehead

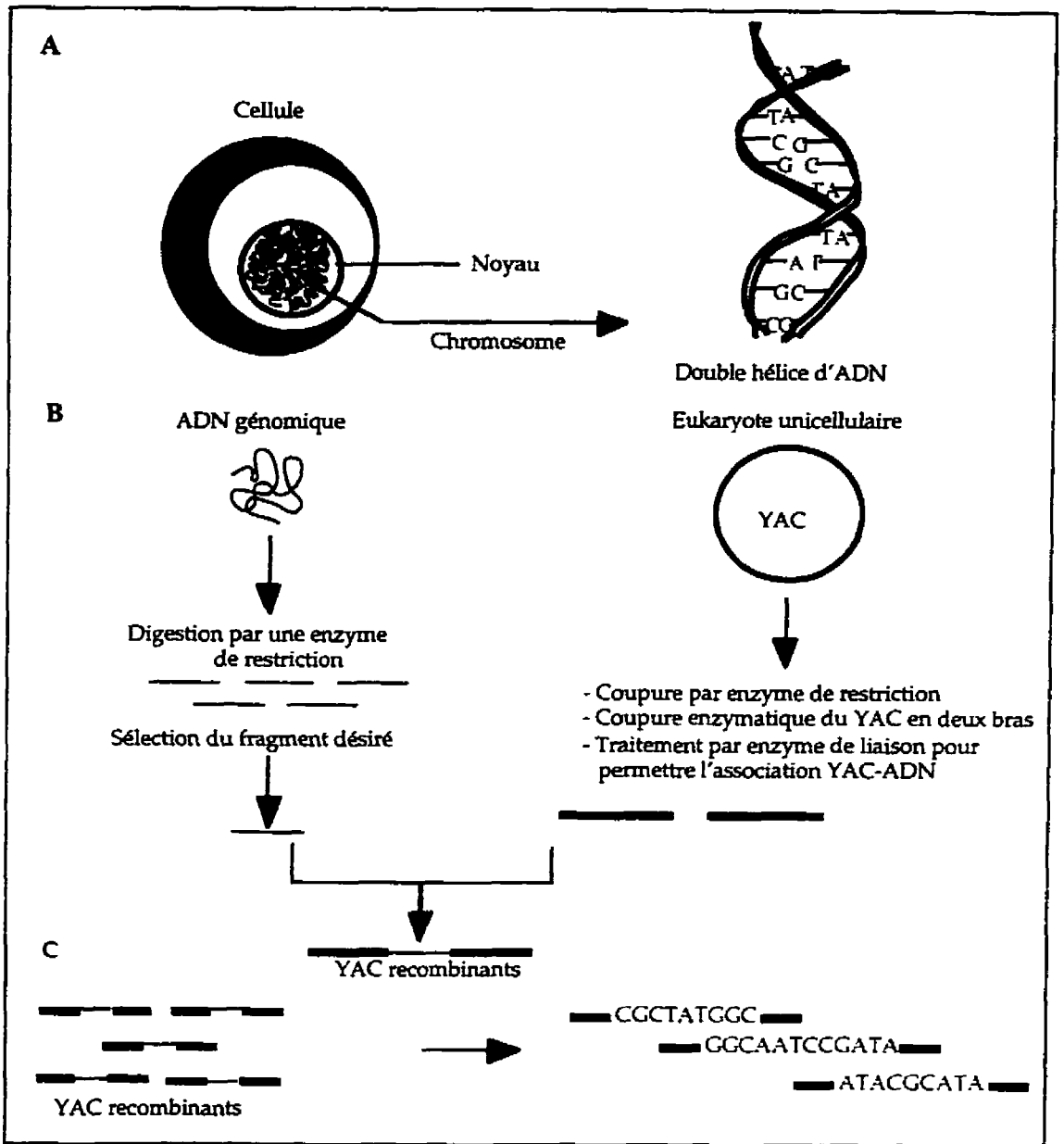


Figure 2.2 A) Représentation schématique d'une cellule et de la structure de l'ADN; b) Formation d'un YAC recombinant; C) Association des séquences d'ADN. L'inclusion de portions d'ADN de plusieurs centaines de nucléotides dans les YAC permet la réalisation de la cartographie du génome humain. En fait, par superposition des séquences on reproduit des portions de plus en plus importantes du génome humain.

2.3.2 Technique de détection d'un facteur héréditaire par l'étude familiale ou par l'étude de couples de jumeaux

Lorsqu'on soupçonne que la mutation d'un gène est responsable d'une maladie, il faut d'abord s'assurer que cette maladie est héréditaire avant de rechercher le locus morbide. Deux types d'études permettent de confirmer s'il s'agit d'une maladie héréditaire. Premièrement, celle de la prévalence familiale, qui permet de comparer la prévalence d'une maladie chez les apparentés de sujets atteints à celle observée chez les apparentés de sujets non atteints. Une concentration familiale de l'affection suggère l'effet de facteurs génétiques, mais, elle peut également s'expliquer par l'effet d'un environnement partagé. L'étude de couples de jumeaux représente le second type d'analyse, et permet de comparer le taux de concordance d'une maladie entre les jumeaux mono- et dizygotes. En effet, les couples de jumeaux monozygotes sont génétiquement identiques tandis que des couples de jumeaux dizygotes se ressemblent génétiquement comme frères ou soeurs, c'est-à-dire qu'il y a environ 25% de ressemblance pour le génome entier. On peut supposer que la ressemblance pour l'exposition à l'environnement est la même entre les jumeaux mono- et dizygotes. Ainsi, un taux de concordance pour la maladie plus élevé chez les couples de jumeaux monozygotes que chez les couples de jumeaux dizygotes permet de conclure à l'implication de facteurs héréditaires. Par ailleurs, si le trait étudié ne dépend que de facteurs génétiques, on attend un taux de concordance de 100% chez les jumeaux monozygotes. Un taux de concordance inférieur à 100% permet alors de conclure à l'effet de facteurs environnementaux surajoutés.

Diverses études familiales et de couples de jumeaux furent réalisées visant à déterminer l'importance relative des composantes environnementales et génétiques impliquées dans l'allergie. Les études faites par Edfors-Lubs (1972)

ont montré qu'il existe une concentration familiale des manifestations cliniques de l'allergie. Plus encore, l'étude effectuée par ce même chercheur sur 7000 couples de jumeaux a permis de confirmer une composante génétique (Edfors-lubs 1971). Hanson et ses collaborateurs (1980) ont comparé les prévalences respectives d'asthme, de rhinite saisonnière et de hauts taux d'IgE sériques au sein de jumeaux monozygotes et dizygotes. Dans le cas de l'asthme, les prévalences au sein des deux groupes étaient trop faible pour comparer les concordances avec une précision statistique intéressante. En ce qui à trait à la rhinite saisonnière, la concordance entre jumeaux monozygotes et dizygotes rassemblés n'était pas statistiquement différente de celles observées lorsque les groupes de jumeaux étaient pris séparément. Pour le taux d'IgE, des études ont montré une corrélation de 82% chez les jumeaux monozygotes et de 46% chez les jumeaux dizygotes. Ceci suggère que l'implication de facteurs héréditaires dans les concordances observées chez les jumeaux serait une composante majeure et que l'effet de l'environnement serait une composante secondaire dans l'expression de l'atopie. Puisque l'atopie est une affection très complexe et cliniquement hétérogène, la mise en évidence du locus morbide constitue une tâche ardue.

2.3.3 Analyse de ségrégation

L'analyse de ségrégation est utilisée dans le but de déterminer le modèle génétique le plus simple expliquant le mieux la répartition du caractère observée dans une cohorte de familles (Kaplan et Delpech 1993). En occurrence, un gène autosomal dominant sera transmis environ à 50% de la descendance lorsqu'un parent est atteint et approximativement à 75% de la descendance dans le cas où les deux parents sont atteints. Ces proportions seront réduites de façon considérable dans le cas d'un gène autosomal récessif.

En fait, l'analyse de ségrégation nous permet d'observer le phénotype de l'ensemble des individus composant une famille et d'émettre une hypothèse en ce qui à trait au mode de transmission du caractère étudié.

Dans le cas de l'atopie, les diverses études de ségrégation réalisées n'ont pas donné un profil unique; ceci s'explique par certains facteurs. Premièrement, l'expression clinique de l'atopie est influencée par une composante environnementale en plus de la composante génétique. Puis, la pénétrance (pourcentage de sujets porteurs d'un gène dominant et qui exprime la maladie) de l'atopie varie avec l'âge et le genre des individus ce qui complique également les analyses de ségrégation. Pour terminer, certaines études ont suggéré que l'atopie serait une affection héréditaire où les anomalies siègeraient simultanément sur plusieurs gènes, concourant ainsi au déterminisme de la maladie (affection polygénique).

2.3.3.1 Rétrospective des principales études de ségrégation faites sur la génétique de l'atopie

L'hypothèse de départ sur la transmission génétique de l'atopie, émise en 1916 par Cook et Van der Veer (1916), était que le gène impliqué serait autosomal dominant. Cette hypothèse fut rapidement remise en question par le fait que des parents non atopiques pouvaient avoir des enfants atopiques. En 1952, Schwartz proposa une explication en suggérant que ce gène dominant pourrait avoir une pénétrance incomplète (Schwartz 1952).

Utilisant spécifiquement le taux d'IgE comme phénotype de l'atopie, de nombreuses équipes ont suggéré divers profils de transmission. Gerrard et ses collaborateurs (1974) ont proposé que le taux d'IgE serait un caractère autosomal dominant, un model récessif fut proposé par Marsh et ses collaborateurs (1981)

tandis que l'équipe de Borecki (1985) a suggéré une codominance. Par ailleurs, dans des études faites par Blumenthal et ses collaborateurs (1981 et 1986), l'accent fut mis sur l'implication de plusieurs gènes dans la transmission de l'atopie. En effet, une première étude suggérait un mode dominant (1981) de la transmission de hauts taux d'IgE, tandis que l'étude d'un autre groupe de familles suggérait un mode récessif (1986). Les travaux de Meyers et ses collaborateurs portant sur une cohorte de sujets asthmatiques (1987) et sur une population d'Amish (1991) concluait également en ce sens ainsi que ceux de Hassstedt et ses collaborateurs (1983) faite dans une population de Mormons de l'Utah. Selon les travaux de Meyers et ses collaborateurs (1987), il semble qu'environ 36% des variations de ce phénotype s'expliquent par un ou plusieurs facteurs génétiques. De plus, suivant les études faites par Freidhoff et ses collaborateurs le taux des IgE sériques est également influencé par l'environnement, l'âge, le sexe, le groupe ethnique et le tabagisme, ce qui complique la caractérisation du phénotype et, de surcroît les analyses d'association (Freidhoff et coll. 1984; Freidhoff 1990).

Récemment, Panhuysen et ses collaborateurs ont proposé que l'hyperréactivité bronchique serait un caractère autosomal dominant associé à une pénétrance de 0.93 et qu'un taux anormalement élevé d'IgE sériques serait sous l'influence de facteurs héréditaires indépendants (Panhuysen et coll. 1997).

Une fois que les études de ségrégation sont faites, on procède à la localisation chromosomique de la mutation responsable de l'affection. Les marqueurs génétiques sont des outils moléculaires très utiles dans la localisation du locus morbide.

2.3.4 Marqueurs génotypiques ou polymorphismes

Dès qu'il a été possible d'isoler l'ADN des cellules, on a noté des variations entre les espèces de même qu'entre les individus d'une même espèce à certains loci donnés. Le locus étant un emplacement d'un segment d'ADN sur un chromosome, lequel segment est défini par sa séquence, qu'elle soit polymorphe ou non (Kaplan et Delpech 1993). Ces variations d'un individu à l'autre, transmises selon les lois de Mendel, forment ce que l'on appelle : le polymorphisme génotypique. On notera qu'un polymorphisme est arbitrairement défini comme une variation génétique mesurée chez au moins 1 pourcent des individus d'une population donnée. Les marqueurs génotypiques les plus fréquemment utilisés sont les microsatellites.

2.3.4.1 Les microsatellites

En 1987, Mullis et Falcoona ont décrit le processus d'amplification polymérasique («polymerase chain reaction»), lequel repose sur la répétition des cycles de dénaturation/hybridation/extension qui assure la reproduction exponentielle de chaque brin d'ADN (Mullis et Falcoona. 1987). Cette technique a permis l'accès aux «microsatellites», une nouvelle catégorie de marqueurs hautement polymorphiques où le motif de base en tandem qui est répété est court, ne dépassant pas quelques nucléotides et donc très informatif (Weber et May 1989; Litt et Luty 1989; Edwards et Caskey 1991). De façon générale, le nombre de nucléotides formant le motif de base varie de 1 à 4. Notons que les marqueurs les plus fréquents et les plus employés sont les microsatellites à 2 ou à 4 nucléotides, par exemple les répétitions $(CA)_n$ et les répétitions $(TATA)_n$. Les motifs CA et GT sont les plus abondants, soit 35 000 à 130 000 pour le génome humain, et les plus uniformément distribués.

La mise en évidence du polymorphisme des microsatellites est faite par amplification polymérisique à l'aide d'amorces oligonucléotidiques placées sur des séquences flanquantes. La section amplifiée est ensuite transférée sur gel de polyacrilamide dénaturant, gel de séquence pouvant détecter des variations de l'ordre d'un seul nucléotide.

Les microsatellites sont les marqueurs génotypiques les plus utilisés puisqu'ils comportent plusieurs avantages considérables : ils sont en effet multi-alléliques, nombreux et généralement bien répartis sur l'ensemble du génome (Kaplan et Delpech 1993).

2.3.4.2 Procédés d'identification des gènes à l'aide des marqueurs génotypiques

En ce moment, plus de 16 000 gènes humains sont connus (Schuler et coll. 1997). Avant l'avènement du clonage positionnel, on devait préalablement identifier et caractériser la protéine avant de pouvoir isoler le gène. Une fois identifiée, on devait faire le clonage de la protéine, ce qui permettait de déduire la taille de l'ARNm. Ensuite, il fallait produire des anticorps et construire des sondes oligonucléotidiques d'après la séquence polypeptidique pour enfin identifier le gène en cause.

L'arrivée des microsatellites a rendu possible la réalisation de la carte génomique humaine, en plus de permettre la découverte relativement rapide de nouveaux gènes. Le procédé consiste d'abord à isoler des séquences clonées de l'ADN génomique impliqué dans une affection héréditaire. Ensuite, on recherche l'information sous forme de séquences nucléotidiques codantes pour en déduire la séquence protéique. Cette démarche qui va du gène à la protéine est celle du clonage positionnel (figure 2.3, p.57) (Kaplan et Delpech 1993).

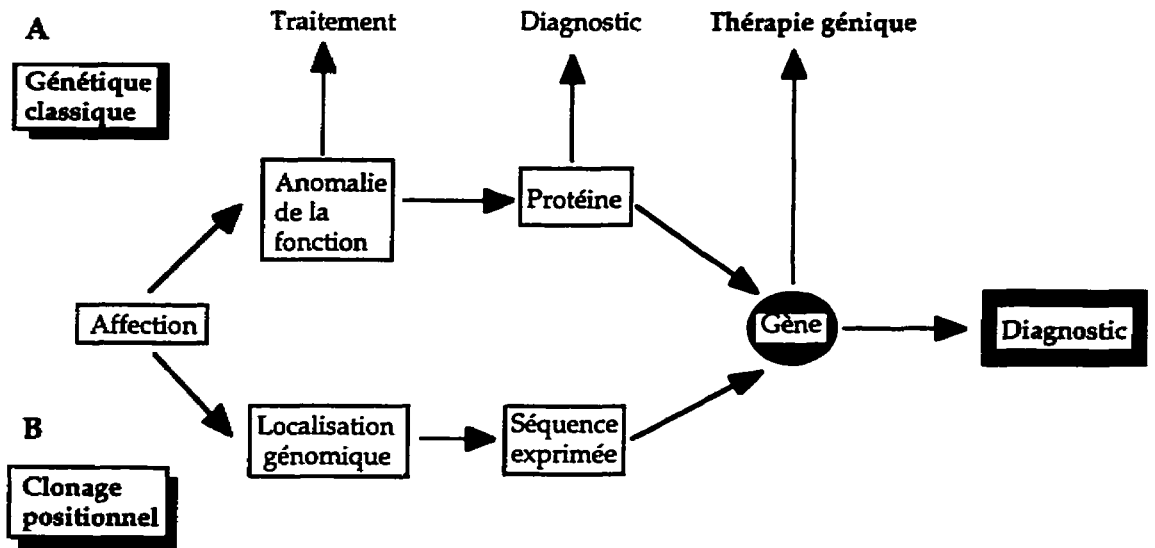


Figure 2.3 Profil d'identification des gènes associés à diverses pathologies. A) Génétique classique (de la protéine au gène); b) Clonage positionnel (du gène à la protéine).

Le clonage positionnel permet d'identifier plus rapidement le gène «responsable» et de préciser le diagnostic clinique. Il offre la possibilité d'effectuer un diagnostic génotypique avant la naissance ou l'apparition de symptômes ainsi que chez les porteurs et donc d'élaborer de nouvelles interventions thérapeutiques.

2.3.4.3 Description succincte des étapes du clonage positionnel

La première étape consiste à trouver une liaison génétique entre un locus morbide et un marqueur génotypique. À l'heure actuelle, la prolifération considérable des marqueurs génotypiques sur tous les chromosomes fournit le moyen d'explorer méthodiquement chaque chromosome à l'aide de sites polymorphes régulièrement espacés. Cette première étape présente des difficultés variables selon le mode de transmission de la maladie.

Idéalement, il faut identifier tous les sujets porteurs du gène anormal. Ceci est possible dans toutes les maladies, à condition qu'il y ait une expressivité complète du gène (Kaplan et Delpech 1993).

Une fois la liaison établie, on s'efforce de multiplier les marqueurs de polymorphisme dans la région afin de se rapprocher du locus morbide et, autant que possible, de le flanquer (Burke et coll. 1987).

2.3.5 Rétrospective des principales études de clonage positionnel faites sur la génétique de l'atopie

Plusieurs travaux à caractère épidémiologique réalisés au sein de cohortes diverses ont montré, comme nous l'avons vu précédemment, que l'allergie est une affection héréditaire liée à l'anomalie d'un gène majeur. Si l'on fait une rétrospective des nombreux travaux qui ont cherché à identifier le locus morbide de l'atopie, on constate que le chromosome 11 et le chromosome 5 (Figure 2.4, p.59) semblent contenir des gènes spécialement impliqués dans cette affection (Chandrasekharappa et coll. 1990; Van Leeuwen et coll. 1989; Boulay et Paul 1992; Kelleher et coll. 1991; McKenzie et coll. 1993; Cookson et coll. 1989; Young et coll. 1992). De plus, les HLA semblent tenir un rôle de premier ordre dans l'expression de l'atopie (Young et coll. 1994).

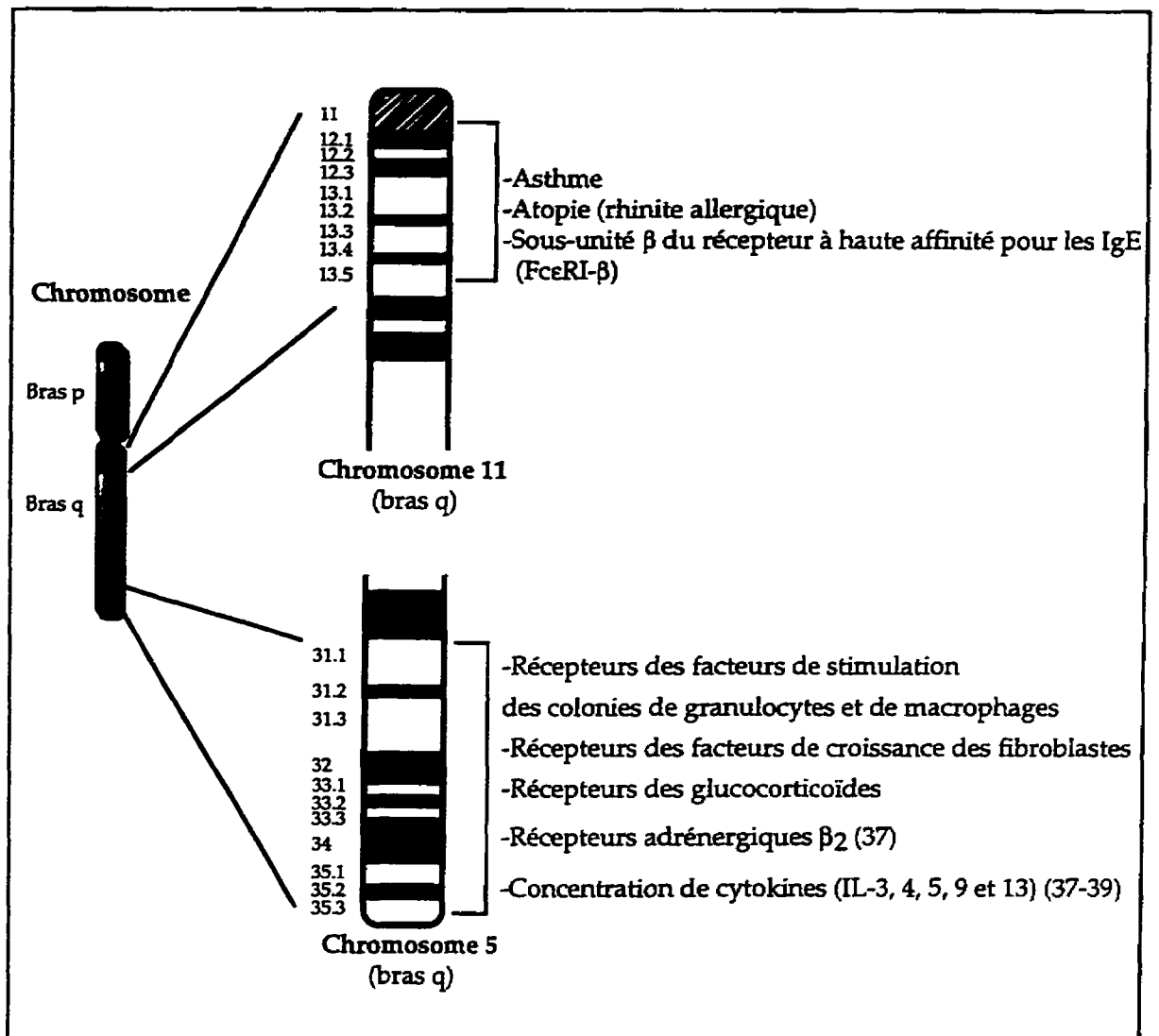


Figure 2.4 Cartographie des loci morbidés impliqués dans l'atopie. La localisation des gènes candidats impliqués dans l'HRB et l'atopie est indiquée de manière approximative.

2.3.5.1 Chromosome 11

L'identification du ou des gènes impliqués dans le développement de l'atopie a débuté par une étude faite par Cookson et ses collaborateurs en 1989 portant sur sept familles où plusieurs individus présentaient le phénotype de l'atopie.

Suivant le profil des familles, on a émis l'hypothèse que cette affection serait transmise par un gène dominant ; l'analyse moléculaire faite avec le marqueur génétique MS.51 a permis de confirmer cette hypothèse et de situer le locus morbide de l'atopie sur le chromosome 11 dans la région D11S97 (Cookson et coll. 1989). La suite de leurs travaux, publiée en 1992, suggèrent que cette association entre l'atopie et un marqueur du chromosome 11 serait transmis spécifiquement par voie maternelle (Cookson et coll. 1992). En fait, ils ont noté que le phénotype de l'atopie se manifestait uniquement chez les enfants dont le locus morbide avait été transmis par la mère. Ce phénomène, appelé l'empreinte parentale s'explique par la non-équivalence d'expression de certains gènes selon qu'ils sont situés sur le chromosome d'origine maternelle ou paternelle (Kaplan et Delpech 1993).

Cette association avec le chromosome 11 suggérée par l'équipe de Cookson a été confirmée par trois équipes de chercheurs : Young et ses collaborateurs en 1992, Collé et ses collaborateurs en 1993 et Shirakawa et ses collaborateurs en 1994. Dans chacune de ces études, la liaison a été observée au sein de familles où les sujets atteints souffraient d'atopie importante. Il semble par ailleurs que l'atopie peut avoir différents déterminants génétiques selon le degré d'atteinte des individus. Par la suite, plusieurs équipes de chercheurs ont tenté sans succès de reproduire ces résultats dont l'équipe de Lympany à Londres (1992). Ils ont utilisé le marqueur p lambda-MS.51 mais ils n'ont pu confirmer une association significative entre l'atopie et la région D11S97 du chromosome 11. À la même époque (1992), l'équipe d'Hizawa a étudié la population japonaise. La configuration des arbres généalogiques des familles étudiées faisait penser à un mode de transmission autosomique dominant. L'analyse des résultats n'a pas permis d'établir une association significative entre l'atopie et le locus 11q13. Dans un troisième rapport où la même méthode a servi à analyser trois grandes familles, Rich et ses collaborateurs (1992) n'ont pu mettre en évidence une association significative entre le marqueur et l'affection. Enfin, une dernière

étude utilisant le même protocole et portant sur un échantillon de 20 familles (de deux ou trois générations) n'a révélé aucune association entre le polymorphisme et la maladie (Amelung et coll. 1992).

Le récepteur à haute affinité pour les immunoglobulines E

Les récepteurs à haute affinité pour les IgE (FcεRI) se retrouvent à la surface des mastocytes et des basophiles. Lors d'une exposition aux allergènes, des associations se forment entre les sites de liaisons sur les IgE et ces allergènes, les agrégations qui en résultent sont responsables de la libération de médiateurs qui engendrent les symptômes d'allergie (Blank et coll. 1989). Pour cette raison, FcεRI situé sur le chromosome 11 dans la région q13 est un gène candidat intéressant dans l'asthme et l'allergie. Ce récepteur est un complexe tétramérique composé d'un attachement de sous-unité lié de manière non covalente, soit : une chaîne α, une chaîne β et un dimère de liens disulphide γ. La séquence des acides aminés de FcεRI a été décrite par Dorrington et ses collaborateurs en 1978. Ils ont déterminé les sites de liaisons à l'aide de produits protéolytiques pour le clivage de FcεRI en fragments. Après ce clivage, aucun des sites isolés n'est apparu actif, ce qui suggère que la jonction entre certains sites pourrait tenir un rôle important en ce qui concerne les liaisons aux récepteurs. Ainsi, la fixation des IgE sur les récepteurs est probablement la clé du processus allergique. Ces dernières années, certains polymorphismes de la chaîne β du récepteur, composée de 7 exons et de 4 domaines transmembranaires, ont été décrits et certains auteurs ont démontré une association entre ces allèles de susceptibilité et l'atopie.

Ainsi, dans un travail publié en juin 1994 dans la revue *Nature Genetics*, Shirakawa et ses collaborateurs ont présenté les résultats d'une étude portant sur les associations entre l'atopie et un polymorphisme de la sous-unités β du récepteur à haute affinité des IgE (FcεRI-β). Le gène FcεRI -β est un candidat

intéressant parmi les altérations génétiques impliquées dans les manifestations de l'atopie en raison de son implication dans la réaction allergique. La prévalence des résidus Leu181 de FcεRI-β et leur relation avec l'atopie sont mis en évidence par la technique d'amplification allélique spécifique (ARMS). L'analyse a montré qu'environ 15% des individus étaient porteurs de la substitution d'une Ile181Leu au niveau du 6^e exon. Une étude similaire a été faite en Australie et les auteurs ont mesuré que cet allèle de susceptibilité se rencontrait chez 4,2 % des individus testés. Hizawa et ses collaborateurs (1995) et Shirakawa et ses collaborateurs (1995) ont également démontré cette association. Cependant, dans une étude cas-témoins faite au sein de la population japonaise, aucun sujet n'avait l'allèle Leu181 et de surcroît, aucune association n'a pu être démontrée entre l'atopie et/ou l'HRB et cet allèle (Shirakawa et coll. 1996). De plus, une étude réalisée au sein de la population italienne incluant une cohorte de 45 familles et un groupe de 42 enfants non apparentés, aucune association ou liaison significative entre l'atopie, l'asthme et ce marqueur n'a été démontrée (Martinati et coll. 1996).

Récemment, Hill et Cookson (1996) ont évalué l'implication d'un nouveau polymorphisme de FcεRI-β dans l'expression de l'HRB et de l'atopie. Ce polymorphisme est caractérisé par le changement d'un acide aminé au niveau du 7^e exon transformant un acide glutamique 237 en glycine. Dans une étude de cohorte menée auprès de la population australienne, ces auteurs ont évalué une fréquence allélique de 5,3% pour le polymorphisme Glu237Gly de FcεRI-β. Ils ont également démontré que la présence de cet allèle de susceptibilité était associée au statut atopique et à la présence d'une HRB au sein de la population australienne. Shirakawa et ses collaborateurs (1996) ont également obtenu une association significative entre cet allèle de susceptibilité et la présence d'atopie dans une étude cas-témoins qu'ils ont effectuée au sein de la population japonaise. Par contre, dans une étude de liaison réalisée par Amelung et ses collaborateurs (1997) sur une cohorte de 83 familles hollandaises, aucun sujet

n'avait l'allèle Gly237 et de surcroît, aucune liaison n'a pu être démontrée entre l'atopie et/ou l'asthme et cet allèle. De plus, Sandford et ses collaborateurs (1997) ont démontré dans une étude récente une fréquence allélique pour le Gly237 de 4% d'individus asthmatiques sévères, 7% des individus asthmatiques modérés et de 12% des sujets non asthmatiques et non atopiques. Ces résultats indiquent que le polymorphisme Glu237Gly n'est pas associé à l'atopie ou à l'asthme et que le fait d'avoir cet allèle n'augmente pas le risque de présenter l'une ou l'autre de ces conditions.

L'ensemble de ces résultats indique que l'association entre l'atopie et la sous-unité β des récepteurs à haute affinité (Fc ϵ RI- β) pour les IgE, située sur le chromosome 11 demeure controversée. De plus, la faible fréquence allélique de Gly237 observée dans les diverses populations étudiées indique que l'atopie et l'asthme ne sont pas uniquement associée à ce polymorphisme mais qu'elle pourrait représenter un allèle de susceptibilité considérable.

2.3.5.2 *Chromosome 5*

Marsh et ses collaborateurs (1994) ont proposé un mode de transmission récessif des taux élevés d'IgE. Dans une étude d'association récente effectuée au sein de familles Amish, les auteurs ont insisté sur l'identification du gène de l'IL-4, en raison de son rôle dans la production d'IgE. La région génétique soupçonnée a été la région q31.1 du chromosome 5, où l'on a mis en évidence une association avec l'IL-4 et certaines autres cytokines impliquées dans l'allergie. Une étude de liaison récente effectuée sur la population de Southampton (comprenant 60 familles) indique l'absence de liaison entre l'atopie, l'asthme et certains marqueurs de la région 5q31-33 (régions codantes pour le gène de l'IL-4 et l'IL-9) (Thomas et coll. 1997). Une autre étude portant sur le polymorphisme du gène de l'IL-9 (région 5q31-33) et réalisée auprès de 26 familles hollandaises a permis de montrer une incidence d'environ 20% de ce polymorphisme dans ce

groupe de sujets (Meyers et coll. 1997). Toutefois, il fut impossible d'établir une liaison entre le phénotype clinique des sujets testés et la présence de cet allèle. Ces résultats suggèrent que ce gène de l'IL-9 n'est pas un facteur de susceptibilité dans le développement de l'asthme et/ou de l'atopie.

En juin 1994, Meyers et ses collaborateurs ont mis en évidence une liaison entre le taux sérique d'IgE et certains polymorphismes du chromosome 5q concernant un complexe mettant en cause plusieurs cytokines. Dernièrement, Postma et ses collaborateurs (1995) ont recherché une association génétique entre l'hyperréactivité bronchique, ainsi que la présence de taux élevés d'IgE sériques et les marqueurs situés sur les régions q31-q33 du chromosome 5. Cette étude a permis de montrer que les taux d'IgE sériques et la réactivité bronchique sont probablement sous l'influence de déterminants héréditaires communs. Les auteurs ont également formulé l'hypothèse que le gène majeur de l'hyper-réactivité bronchique est localisé près de celui qui régularise le taux des IgE sériques sur le chromosome 5q. En ce sens, l'analyse de ségrégation effectuée par Panhuysen et ses collaborateurs (1997) a récemment démontré que l'HRB est un trait héréditaire autosomal dominant et que sa transmission est indépendante des facteurs héréditaires impliqués dans la transmission des hauts taux d'IgE. Ces résultats permettent de croire que la tendance à faire de l'asthme serait sous l'influence de plusieurs facteurs héréditaires dont un ou plusieurs gènes seraient situés sur le chromosome 5q31-q33.

2.3.5.3 Autres chromosomes

Les sujets allergiques ne réagissent pas tous à la même catégorie d'allergènes. La réponse des IgE spécifiques face aux allergènes est probablement déterminée par des composantes héréditaires différentes de celles impliquées dans la réponse non spécifique (IgE totaux). En fait, il semble que le taux d'IgE spécifiques serait modulé par la variation des HLA ou des protéines du

récepteur des lymphocytes T (de l'anglais T-cell receptors : TCR), molécules maîtresses dans la reconnaissance des antigènes. À ce jour, le rôle des TCR est indéterminé. Ces récepteurs sont formés d'une chaîne α et d'une chaîne β associées respectivement aux chromosomes 14 et 7. Moffat et ses collaborateurs (1994) ont tenté de démontrer une association entre des taux élevés d'IgE spécifiques et les complexes génétiques des chaînes α et β de TCR situés sur les chromosomes 14 et 7 au sein de la population australienne. Les résultats n'ont pas permis d'établir une association entre les hauts taux d'IgE spécifiques et TCR β , tandis qu'ils ont observé une association significative entre les taux élevés d'IgE spécifiques et TCR α . Ces travaux suggèrent qu'un gène de TCR pourrait modifier la réponse des IgE spécifiques.

Une étude faite à Southampton portant sur une cohorte de 685 individus a permis de mettre en évidence certains loci qui seraient associés à l'atopie (Wilkinson et coll. 1996). En effet, ce programme de recherche a permis d'établir une association entre la sous-unité β du récepteur à haute affinité pour les IgE et certains polymorphismes du chromosome 11 (régions : q13.1, q13.5 et q13), entre l'IL-4 et le chromosome 16 (p12.1-11.2) et 5 (q23-31), entre l'INF- α et le chromosome 9 (p22) ainsi qu'entre le TNF- α et le chromosome 6 (p21.3). Les travaux récents de Moffat et ses collaborateurs (1997) effectués auprès d'une cohorte de 1020 individus ont permis de montrer une association entre l'HRB, l'asthme et un polymorphisme d'un gène codant pour le TNF sur le chromosome 6p.

Une analyse multicentrique effectuée sur la population des États-Unis a permis de mettre en évidence une liaison entre l'asthme et divers marqueurs polymorphiques de régions génétiques diverses. Ainsi, selon ce programme de recherche, l'asthme serait lié avec certains polymorphismes des chromosomes 5p15 et 17p11.1-q11.2 au sein de la population afro-américaine, avec certains polymorphismes des chromosomes 11p15 et 19q13 pour les individus cauca-

siens et avec certains polymorphismes des chromosomes 2q33 et 21q21 pour les personnes hispaniques. Une liaison significative entre l'atopie et les régions 5q23-31, 6p21.3-23, 12q14-24, 13q21.3, 14q11.2-13 a été démontrée dans la cohorte de sujets caucasiens. Chez les hispaniques, les régions 12q14-24.2 semblent être associées avec l'atopie (Ober et coll. 1997).

2.3.5.4 Antigènes des leucocytes humains et atopie

Divers travaux portant sur l'évidence d'une association entre les HLA et l'atopie ont été publiés. Une étude d'association entre les haplotypes de classe I en ce qui concerne l'allergie aux acariens et les HLA suggère un mode de transmission récessif pour le taux d'IgE spécifiques aux acariens (Ishikawa et Kitao 1985). Selon cette étude, les HLA-B8 seraient la principale catégorie impliquée dans l'atopie, comme il avait été démontré par Turner et ses collaborateurs (1977) et Marsh et ses collaborateurs (1981). Une seconde étude a montré qu'un certain HLA (DQB1*0301) était présent en quantité moindre chez les sujets atopiques en comparaison à un groupe témoin (Perichon et Krishnamoorthy 1991). Blumenthal et ses collaborateurs (1992) ont étudié une cohorte de sujets rhinitiques démontrant une réponse positive au test cutané d'allergie pour *Amb aV*. Ils ont observé différents haplotypes (assortiment d'allèles à des loci différents, mais proches, sur un même chromosome) selon que le sujet était asthmatique ou non. En 1994, Young et coll. démontrèrent l'importance du rôle des HLA dans l'atopie. Les travaux effectués par Aron et ses collaborateurs (1996) ont démontré une association entre l'atopie et les HLA-DR de classe II, plus précisément entre les allèles HLA-DR 4 et HLA-DR 7 et l'atopie. Cependant, une étude faite par Li et ses collaborateurs (1995) suggère qu'il n'y a pas d'association entre l'asthme et les HLA-DQ et HLA-DR au sein de la population chinoise. Une étude de liaison récente effectuée sur une cohorte de 22 familles d'Angleterre indique l'absence de liaison entre l'atopie et certains polymorphismes génétiques des HLA de classe II (HLA-DRB1, DQA1, DQB1 et

DPB1) impliqués dans la sensibilisation aux allergènes d'acariens (*Dermatophagoides pteronyssinus* and *D. farinae*) (Hollaway et coll. 1996).

À ce jour, il existe donc une grande incertitude sur la composante génétique de l'asthme. Une seule certitude est que le déterminisme génétique de l'asthme et de l'atopie ne correspond pas à un modèle de transmission simple et monogénique. Pour progresser, il serait important de déterminer les parts respectives des facteurs environnementaux et héréditaires. Il serait également important de préciser les facteurs génétiques propres et communs dans l'asthme, l'hyperréactivité bronchique et l'atopie. De ce fait, l'étude des anomalies génétiques possiblement liées à l'asthme et à l'atopie est à poursuivre mais déjà, il semble évident que plusieurs voies de recherche se présentent. L'une de ces voies est de confirmer l'existence d'une liaison génétique entre l'allergie et un polymorphisme, une seconde tentera de chercher des marqueurs génétiques associés à l'hyperréactivité bronchique. Par la suite, l'exercice logique sera d'effectuer des études fonctionnelles tentant de préciser les mécanismes moléculaires que sous-tendent ces anomalies héréditaires.

CHAPITRE 3

RELATION ENTRE LE TYPE DE SENSIBILISATION AUX AÉRO-ALLERGÈNES COMMUNS ET L'EXPRESSION PHÉNOTYPIQUE DE LA RHINITE ALLERGIQUE ET DE L'ASTHME

Article publié sous une forme modifiée (Modifications mineures) dans
Clinical and Experimental Allergy vol. 27, p 52-59, 1997

MISE EN CONTEXTE DE L'ÉTUDE ET CONTRIBUTION DES AUTEURS

L'asthme et la rhinite sont deux affections communes qui affectent de plus en plus de Québécois. Chez certains sujets, la principale manifestation allergique sera une rhinite tandis que chez d'autres, on pourra observer une symptomatologie asthmatique. Les facteurs associés au développement de l'une ou l'autre de ces affections ne sont pas clairement définis, mais l'exposition aux allergènes est considéré un facteur de risque important. Ce chapitre présente une étude dont le but était de déterminer s'il existe un lien entre le type de sensibilisation aux allergènes et le développement de l'une ou l'autre de ces affections.

Cette étude permet de déterminer que le profil de sensibilisation aux allergènes est un facteur déterminant dans l'expression clinique associée au statut atopique. En fait, nous avons démontré que l'expression clinique de l'allergie est différente selon le type d'allergènes auxquels le sujet est sensibilisé, ainsi, une sensibilisation aux pollens est associée principalement au développement d'une rhinite tandis que celle aux allergènes domestiques (animaux et acariens) semble un puissant facteur étiologique dans l'asthme allergique.

Le Dr Louis-Philippe Boulet a élaboré l'ensemble de ce protocole expérimental et il a assuré la direction de cette étude, en plus d'effectuer la mise au point de l'article scientifique. Madame Hélène Turcotte a collaboré à la rédaction de cet article. Ma contribution à ces travaux a été de participer à la rédaction de l'article ainsi qu'à l'analyse et la présentation des résultats. Madame Caroline Lavertu, étudiante en stage d'été, a effectué le transfert des données relatives au phénotype des sujets dans un dossier «Excel» pour fin d'analyse statistique. Puisqu'il s'agit d'une étude multicentrique, certaines données proviennent des dossiers cliniques des Drs Pierre-Michel Bédard, Aubert Lavoie et Jacques

Hébert de l'Unité de recherche en inflammation, immuno-allergie et rhumatologie du Centre Hospitalier de l'Université Laval, ces derniers ayant également participé à la revision de cet article. L'analyse des données recueillies a été faite par M. Serge Simard.

TITLE: **Comparative degree and type of sensitization to common indoor and outdoor allergens in subjects with allergic rhinitis and/or asthma**

AUTHORS: Louis-Philippe Boulet, MD, FRCP(C)¹
 Hélène Turcotte, M.Sc.¹
 Catherine Laprise, M.Sc.¹
 Caroline Lavertu, B.Sc.¹
 Pierre-Michel Bédard, MD²
 Aubert Lavoie, MD²
 Jacques Hébert, MD²

ADDRESS: ¹Unité de recherche,
 Centre de Pneumologie de l'Hôpital Laval
 Université Laval, Sainte-Foy, Québec.

²Unité de recherche en inflammation,
Immunoallergie et Rhumatologie,
Centre Hospitalier de l'Université Laval
Sainte-Foy, Québec, Canada.

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE:
Dr. Louis-Philippe Boulet
Hôpital Laval
2725, Chemin Ste-Foy, Sainte-Foy
Québec, Canada, G1V 4G5
Tel: (418) 656-4747
Fax: (418) 656-4762
EMAIL: MEDLPB@HERMES.ULVAL.CA

KEY WORDS : Asthma, rhinitis, atopy, indoor and outdoor allergens.

RÉSUMÉ

Les facteurs impliqués dans le développement des diverses manifestations cliniques de l'atopie, telles la rhinite et l'asthme, sont encore indéterminés. Cette étude visait à définir si le profil de sensibilisation aux allergènes communs peut moduler le développement de la rhinite ou de l'asthme. Ce travail avait également comme objectif de déterminer la prévalence et l'intensité de la sensibilisation aux allergènes de la population atopique québécoise, et ce, en fonction de l'âge et du sexe des participants. Les données recueillies dans les dossiers cliniques de 3371 patients entre les années 1990 et 1995, ont été regroupées suivant le phénotype atopique des sujets soit: les sujets avec asthme, ceux avec rhinite et ceux avec ces deux conditions. Le nombre d'allergènes auxquels les sujets étaient sensibilisés sur les 8 aéroallergènes testés (index atopique) et la moyenne de la somme des diamètres (mm) des réponses positives aux tests cutanés d'allergie (mean wheal diameter = MWD) ont été compilées pour l'ensemble des individus étudiés. La prévalence, l'index atopique et la sévérité (MWD) de l'atopie étaient plus importants chez les sujets âgés entre 16 et 25 ans. Les indices d'atopie étaient plus marqués chez les hommes que chez les femmes au sein des sujets âgés de plus de 18 ans. Pour l'ensemble des sujets atopiques, les prévalences de sensibilisation aux diverses catégories d'allergènes étaient : 84,2% pour la poussière, 76,5% pour le chat, 63,0% pour le chien, 54,2% pour les acariens, 51,9% pour les pollens d'herbacées, 47,2% pour les pollens d'arbres, 44,9% pollens d'herbe à poux et 25,4% pour les moisissures (*Alternaria*). Parmi les sujets présentant uniquement une réponse positive aux allergènes extérieurs (n = 195), 73,8% présentaient une rhinite, 11,8% avaient un asthme symptomatique et 14,4% présentaient ces deux diagnostics ; pour les sujets uniquement sensibilisés aux allergènes intérieurs (n = 710), ces valeurs deviennent respectivement 48,6, 24,5 et 26,9% et lorsque les sujets étaient sensibilisés à ces deux groupes d'allergènes (n = 1793), ces

valeurs étaient de 55,5, 14,6 et 29,9 %. Les données obtenues de cette cohorte de sujets indiquent que la catégorie d'allergènes auxquels le sujet est sensibilisé est un facteur déterminant dans l'expression clinique de l'atopie. Ainsi, les allergènes domestiques (animaux et acariens) semblent fortement associés à la manifestation phénotypique de l'asthme tandis que la sensibilisation aux pollens semble principalement associée à la rhinite. La proportion de sujets sensibilisés aux allergènes intérieurs est supérieure comparativement aux individus sensibilisés aux allergènes extérieurs. De plus, la prévalence et le degré de sensibilisation aux allergènes sont les plus élevés chez les jeunes adultes pour diminuer ensuite avec l'âge. Finalement, cette étude démontre l'importance de l'exposition aux allergènes intérieurs dans le développement de l'asthme et démontre la variabilité de l'expression phénotypique associée au statut atopique selon la catégorie d'allergènes auxquels l'individu est sensibilisé.

ABSTRACT

Background and objectives

The determinants of variability in the clinical expression of atopy are still to be documented. The goals of this study were to determine, in subjects with a clinical diagnosis of symptomatic asthma or rhinitis, what is the possible contribution of different types of indoor and outdoor allergens to the development of their disease, by looking at the prevalence and degree of sensitization to these allergens according to age and gender.

Subjects and methods

We analyzed allergy skin-prick tests to common airborne indoor and outdoor allergens in 3371 consecutive patients, grouped according to diagnosis of allergic asthma, rhinitis, or both. For each of these 3 groups, we calculated the prevalence of sensitization to indoor/outdoors allergens, the atopic index (AI), the number of positive responses to allergy skin-prick test and the mean wheal diameter (MWD) of these responses.

Results

The prevalence of atopy and the values of AI and MWD peaked in subjects aged 16 to 25 years, declining afterwards ; in subjects ≥ 18 year old, atopic indices were slightly higher in men than in women. In atopic subjects, the prevalence of sensitization was, in decreasing order : housedust (84.2%), cat hair-epithelium (76.5%), dog hair-dander (63.0%), housedust mite (54.2%), grasses (51.9%), trees (47.2%), ragweed pollens (44.9%) and finally, molds (25.4%). Among subjects sensitized only to outdoor allergens (n = 195), 73.8% had a rhinitis, 11.8% had asthma and 14.4% had both diagnoses ; for those sensitized only to indoor allergens (n = 710), these values were respectively 48.6, 24.5 and 26.9% and for

those sensitized to both indoor and outdoor allergens (n = 1793), the comparable values were 55.5, 14.6 and 29.9 %.

Conclusion

These data show that in our population of subjects with respiratory allergic symptoms, indoor allergen sensitization is strongly associated with asthma, while exclusive sensitization to pollens is associated primarily with rhinitis. The % sensitization was more prevalent for indoor allergens than for outdoor allergens in all groups determined according to diagnosis or age. Indices of atopy were higher in men in the group ≥ 18 yr old. Prevalence and degree of sensitization were shown to peak in young adults, regardless of the allergen, and to diminish with age. This study stresses the role of indoor allergens in the development of asthma and shows the variability of allergic manifestations according to the type of sensitization.

INTRODUCTION

Asthma and rhinitis of allergic origin are two common respiratory conditions in North America, and their prevalence and severity seem to have increased in industrialized countries over the last few years (1,2,3). These diseases are believed to result from an allergen-induced inflammatory process of the upper or lower respiratory mucosa of sensitized subjects (4,5). It is, however, unknown why some subjects develop only an allergic rhinitis while others develop asthma as well. Several factors are involved in determining the pattern of respiratory symptoms following exposure to allergens (6-9). Subjects with allergic rhinitis and pulmonary symptoms, when compared with individuals with rhinitis alone, express a greater sensitivity to allergens both at skin and bronchial levels, higher specific IgE levels and increased mediator release during allergen challenge (10). Additional factors may also be important in determining the pattern of respiratory symptoms after environmental exposure to allergens. These factors include the degree of bronchial lability, the type of allergen to which a subject becomes sensitized, the duration or intensity of sensitization and/or exposure and, possibly, the subject's genetically determined response to the allergic stimulus. However, the relative importance of the various factors remains to be documented.

A large proportion of asthmatic and rhinitic subjects are sensitized to common allergens of indoor or outdoor origin (11-13). Sensitization to these allergens seems to be influenced by different factors, including genetic susceptibility, age at which the exposure begins and the degree and type of allergen exposure (13,14,15). Recent improvements in the insulation of houses and buildings have led to increased awareness of the role of indoor allergens in the development of allergic respiratory diseases (16,17). As most city dwellers

spend the bulk of their time indoors, exposure to indoor allergens may have a strong influence on the development of allergic diseases.

This study was therefore set to determine the comparative prevalence of sensitization to indoor and outdoor allergens in subjects who reside in Quebec City Metropolitan area, and to determine if the prevalence and degree of sensitization to these allergens was different in the presence of asthma, rhinitis or both diagnoses. The type and degree of sensitization according to age group and gender were also examined.

Subjects

Data were obtained from subjects referred to the asthma and allergy clinics of 2 university-affiliated hospitals, the Centre Hospitalier de l'Université Laval and Laval Hospital, Sainte-Foy, Quebec. A total of 3371 computerized data files of subjects with diagnoses of asthma or/and rhinitis were sufficiently complete to allow the present analysis (Table 3.1). Subjects included 1932 women (57.3%) and 1439 men (42.7%); 72.6% of the women and 56.2% of the men were > 18 year old. Of those, 82.7% of the men and 78.1% of the women were atopic, as defined by at least one positive response to the allergens tested (mean wheal diameter of 3 mm or more, according to previously published guidelines (18,19)).

Inclusion criteria were : 1) a clinical diagnosis of allergic rhinitis and/or asthma made by the consulting allergist or chest physician, based on symptoms and pulmonary function tests (including methacholine challenge for some of the subjects), and 2) submission to a battery of allergy tests for various common airborne allergens, using the skin-prick test technique.

Files of subjects with uncertain diagnoses were excluded, as were those of subjects who had a negative response to the histamine skin-test control (wheal diameter < 3 mm). Also excluded were subjects who had used antihistamines within a week (one month for astemizole) of the allergy skin test.

Classification of subjects

The subjects were divided into 3 groups according to the diagnosis of asthma, rhinitis or both. All subjects were also sub-divided into 3 sub-groups according to their sensitization to exclusively indoor, exclusively outdoor or both indoor and outdoor allergens. Finally, data were analyzed according to age group : 0 to 5, 6 to 15, 16 to 25, 26 to 45, 46 to 65, over 66 yr old (adapted from ref. 20).

METHODS

Evaluation and definitions

The following parameters were obtained : age, sex, diagnosis, specialist-confirmed diagnosis of asthma or rhinitis (allergic or non-allergic) and results of allergy skin-prick tests from a battery of 8 airborne allergens. The atopy index (AI) represents the total number of allergens out of the eight tested to which the subject had a positive response. The mean wheal diameter (MWD) of responses was calculated. The data were obtained from 2 computerized databases using the program "4th dimension" (MacIntosh).

Allergy skin-prick tests

The skin tests were done by the allergist or chest physician, using the prick-test method, as described in reference 18. Interpretation was according to current guidelines (19). For all subjects, the wheal response was read at 10 minutes and reported as an absolute value in mm (mean of the largest diameter and the largest perpendicular to it). The response to the following 8 allergens, grouped to reflect indoor and outdoor exposure, was noted : 1) indoor allergens: housedust (weight/volume 1:10), cat hair-epithelium and dog hair-danders (both 1:10) and *Dermatophagoides farinae* (housedust mite; 30 000 PNU/ml), 2) outdoor allergens: mixed grasses (1:20), mixed trees (1:20) or ragweed pollens (1:20), 3) indoor/outdoor allergens: molds (*Alternaria* 1:10). We obtained each specific from a consistent source, either Bencard (Montreal, Que.) or Omega (Montreal, Que.). Other allergens could have been tested in these subjects, but a subject was considered non-atopic only if the skin response to all allergens tested was negative. As allergens used for prick tests came from different batches over time, we regularly verified their potency by skin-test end-point titration in a group of control atopic subjects.

Data analysis

Analysis has been done both including and excluding housedust, as it is an uncharacterized allergen extract which is likely to contain a mixture of both indoor and outdoor allergens. The atopic index has also been calculated both including and excluding housedust.

Values are given as mean \pm one standard deviation. We used the chi-square test to compare the different percentages and T-tests to look at means. We compared the different groups and age classes using an analysis of variance

(ANOVA) with a Tukey test to determine which groups were significantly different from each other ($p < 0.05$). For graphical representation of the data, results of representative measures were expressed as mean values \pm sem. For figure 3.2, the correspondence analysis (21) was used to represent graphically a contingency table (data matrix) of association between the type of allergen and diagnoses of asthma, rhinitis or both. This technique makes it possible to represent the frequency of sensitization to each type of allergen according to the diagnosis. When two points representing diagnosis are close, they must have similar proportions in types of allergen sensitization. In the same manner, if two points representing 2 types of allergen are close, they must have the same frequency distribution for diagnosis. When these 2 points are opposed along a straight line, that means they have opposite profiles. The origin of the axes corresponds to the average profile of diagnosis and type of allergen.

For table 3.4, we used parametric analysis with no transformation on data, as the normality and homogeneity of variance assumptions were not rejected. We performed the Tukey's comparison technique to compare mean values.

RESULTS

Prevalence of sensitization to common allergens in the studied population

Eighty percent of the subjects included in the study were allergic, reflecting the fact that those subjects were referred to specialized asthma and respiratory allergy clinics.

Prevalence and degree of sensitization to indoor and outdoor allergens

The majority of allergic subjects were sensitized to indoor allergens (92.7%), but many (66.4%) were also sensitized to at least one outdoor allergen. Among the population studied, 21.1% were sensitized exclusively to indoor allergens, 5.8% exclusively to outdoor allergens and 53.2% to both types of allergens.

In subjects sensitized to indoor allergens only ($n = 710$), the atopic index was significantly higher than in those sensitized exclusively to outdoor allergens ($n = 205$) or to both indoor and outdoor allergens ($n = 1793$) (respectively 2.6 ± 1.0 , 1.7 ± 0.9 and 5.5 ± 1.5 , $p < 0.0001$). When housedust was excluded, leaving 3 different allergens in either indoor or outdoor category, the mean atopic index was 1.9 ± 0.8 in subjects sensitized to indoor allergens only ($n = 656$), similar to the index measured in subjects sensitized to outdoor allergens only (1.80 ± 0.9 , $n = 272$, $p > 0.05$). The mean wheal diameter of the response to prick tests was significantly higher in the group of subjects sensitized to both types of allergens (3.9 ± 1.6 mm), followed by the group sensitized exclusively to indoor allergens (2.7 ± 2.3 mm), and finally by the group sensitized to outdoor allergens alone (2.3 ± 1.4 mm, $p < 0.0001$); when housedust was excluded from the analysis, the Tukey comparison showed no significant difference between the mean wheal diameter of the groups sensitized exclusively to indoor or outdoor allergens (respectively 1.5 ± 0.9 and 1.5 ± 1.0 mm).

Prevalence and type of sensitization according to gender and age

Among allergic subjects, the atopic index was slightly higher in men than in women (4.6 ± 2.0 and 4.3 ± 2.0 , $p = 0.0003$), as was the mean wheal diameter (3.3 ± 1.8 and 3.1 ± 1.7 mm, $p = 0.002$). Looking at subjects $<$ and $>$ 18 yr old

separately, we found that all indexes were similar in men (n = 511) and women (n = 418) under 18 yr old, while for those \geq age 18, the atopic index was 4.76 in men, and 4.30 in women, and the mean wheal diameter was 3.53 in men and 3.11 in women, with p values all < 0.0001 .

Distribution of subjects according to diagnosis

The 3371 subjects included 1403 with allergic (n = 1214) or non-allergic (n = 189) asthma. In all patients with asthma, 582 had no diagnosis of rhinitis (allergic = 459, non-allergic = 123). A total of 2789 subjects had a rhinitis, either allergic (n = 2239) or not (n = 550) ; 2068 of the subjects with rhinitis, either allergic (n = 1484) or not (n = 484), had no associated asthma (Figure 3.1).

Prevalence and degree of sensitization to allergens according to diagnosis

In atopic subjects, indoor allergens were the most significant source of sensitization. The overall prevalence of sensitization for this group was, in decreasing order : housedust (84.2%), cat hair-epithelium (76.5%), dog hair-dander (63.0%), housedust mite (54.2%), grasses (51.9%), trees (47.2%), ragweed pollens (44.9%) and finally, molds (25.4%, Table 3.1).

The mean ages of allergic and non-allergic subjects in the groups with both asthma and rhinitis were respectively : 25.18 ± 0.02 and 41.75 ± 0.31 yr ($p < 0.0001$) ; in the group with asthma, they were 28.45 ± 0.04 and 46.95 ± 0.15 ($p < 0.0001$) ; and in the group with rhinitis, they were 26.68 ± 0.01 and 26.30 ± 0.04 ($p > 0.05$).

Of the 3371 subjects studied, the proportions sensitized to indoor and/or outdoor allergens were, respectively, 68.1/57.9% in non-asthmatic rhinitic

subjects and 88.6/68.7 and 74.9/49.9 % in asthmatic subjects with, and without rhinitis. Among those subjects who were sensitized, the percentages sensitized exclusively to indoor allergens, exclusively to outdoor allergens, and to both are given in table 3.2. As shown in figure 3.2, asthma was strongly associated with indoor allergens and rhinitis with outdoor ones.

Among subjects sensitized only to outdoor allergens (n = 195), the incidence of rhinitis only was 73.8%, of asthma only 11.8%, and of both diagnoses 14.4% ; among those sensitized only to indoor allergens (n = 710), these values were 48.6, 24.5 and 26.9% ; for those sensitized to both types (n = 1793), they were 55.5, 14.6 and 29.9 %.

The atopic index was significantly higher in the group with both asthma and rhinitis (4.8 ± 2.0) than in those with exclusively asthma (4.0 ± 2.0) or rhinitis (4.4 ± 2.0 , $p < 0.0001$; figure 3.3), but it remained in the same proportions among the 3 groups when housedust was excluded from the analysis (asthma : 3.1 ± 1.8 , asthma and rhinitis: 3.9 ± 1.8 and rhinitis : 3.6 ± 1.9 , $p < 0.0001$).

The mean wheal diameter was significantly greater in the group with asthma and rhinitis (3.5 ± 1.9 mm) than in the groups with either asthma (2.9 ± 1.8 mm) or rhinitis (3.0 ± 1.7 mm, $p < 0.0001$) ; these latter two groups showed no statistically significant difference ; when housedust was excluded, the changes were minimal.

Prevalence and degree of sensitization according to age category

The age distribution of subjects was for category 0-5 yr : 2.5%, 6-15 yr : 27.0%, 16-25 yr : 21.6%, 26-45 yr : 34.1%, 46-65 yr : 12.6% and over 66 yr : 2.2%. The prevalence of sensitization to common allergens increased with age from

category 0 to 5 yr to category 16 to 25 yr, and then decreased progressively. The maximal prevalence was in age category 16-25 yr, with 80.1% of subjects being sensitized to at least one common allergen ; it then decreased to 42.1% in the age category over 66 yr. It was in age category 16-25 yr that we observed the highest percentage of subjects sensitized to both indoor and outdoor allergens ; in this same age category we also noted the lowest percentage of subjects sensitized exclusively to either indoor or outdoor allergens.

The relative proportion of allergens to which subjects were sensitized remained the same in all age categories, with indoor allergens being the most frequent, (housedust, cat hair-epithelium, dog hair-dander and housedust mite) (Table 3.3). The mean atopic index and mean wheal diameter are expressed on Table 3.4.

DISCUSSION

We should first point out that this study was not a survey of a representative sample of the whole population of the Quebec metropolitan area, but rather an evaluation of a specific population presenting with symptoms of respiratory allergy and referred to one of the 2 asthma and allergy tertiary centers. Therefore, our conclusions should be restricted to this particular population, although these observations provide us with useful information on the type of sensitization observed and the clinical expression of the allergic status.

Furthermore, we realize that many atopic subjects have no respiratory symptoms, but the present evaluation is restricted to those who have symptoms of either asthma and/or rhinitis, where we looked at the comparative prevalence and degree of sensitization to relevant indoor/outdoor allergens.

We found that the majority of the subjects we studied, with asthma and/or with rhinitis, were sensitized to indoor aeroallergens. Sensitization to this last category of allergens seemed to contribute to both allergic rhinitis and asthma, while exclusive sensitization to pollens was found most commonly in subjects with rhinitis. Prevalence of atopy and atopic indices peaked at 16-25 yr, regardless of the type of allergen, and thereafter, decreased progressively with age.

Allergy plays an important role in the development of asthma and rhinitis. Increased exposure to indoor allergens has been suggested as a potential explanation for the recently described increase in the prevalence of allergic diseases (1,2). However, while the duration of exposure, intensity, allergenic particle size and type of allergen to which the subject is sensitized can influence the development of some types of allergic manifestation, it is still unclear why some subjects develop only a rhinitis while others develop asthma.

Rhinitis is closely associated with asthma, and subjects with allergic rhinitis, when compared with non-rhinitic subjects, have an increased airway responsiveness (22). The nose is usually considered a protective barrier against inhalants, contributing to the reduction of allergen load to the airways. It is possible that the upper airway inflammatory reaction per se influences the development of bronchial inflammation and hyperresponsiveness, for example by the release of inflammatory mediators.

The type of allergen may influence the type of allergic manifestation, which may be related to its size or other properties. For example, pollen particles are somewhat larger than those of housedust or animal origin and are more easily trapped in the nose, inducing a local allergic response. We cannot, however, exclude the possibility that intensity and duration of exposure may also explain the observed differences in clinical expression of these types of allergy. In

cold climates, pollen exposure is more limited than exposure to indoor allergens. Geographical distribution of allergens can also influence allergic manifestations.

Our observations are in keeping with those of Gergen and Turkeltaub (23), who showed that the prevalence of asthma and rhinitis increased with the increasing number of positive allergen skin tests. Asthma was associated with sensitization to allergens such as housedust and *Alternaria* ; allergic rhinitis without asthma was associated with ragweed, ryegrass and housedust. Burrows *et al.* also showed that in allergy skin tests performed on 13-yr-old New Zealand children, the size of the response to housedust mite, cat, dog and *Aspergillus* species was significantly related to the bronchial responsiveness index (24).

Regarding the relationship between atopy and age, an increased prevalence of sensitization to common allergens with age up until adulthood has been described, and this is in keeping with our findings (25,26). There seems, however, to be a decreased effect of atopy on airway responsiveness with increasing age (27).

According to the previous publications by Sears *et al.*, atopy and current asthma were significantly more common among boys in early life than in girls (28,29). In fact, the increase in asthma prevalence was explained by the higher incidence of atopy; these gender differences disappeared when controlled for atopic status. A roughly equivalent prevalence of asthma and atopy was found in both genders at adulthood (30-32). In our study, in subjects < 18 yr old, atopic indices were similar in both genders, while > 18 yr old, they were slightly higher in males.

Different measures have been suggested to reduce the indoor antigen load and prevent outdoor antigen exposure (33-34). The efficacy of allergen load reduction at home has led to significant improvement in allergic asthmatic children (35). Furthermore, some recent studies report that the fact that sensitization developed, rather than the subsequent level of exposure of sensitized subjects, is more closely related to asthma (32) ; this suggests that to prevent sensitization to indoor allergens, one should begin avoidance of exposure to those allergens early .

Finally, one cannot rule out the effects of the use of different batches of allergens with time on the outcome but the standardization of the skin test material should have kept these effects to a minimum.

In conclusion, this study shows that the clinical expression of allergy is different according to the type of allergen to which subjects are sensitized, with sensitization to pollens being more closely related to rhinitis, while sensitization to indoor allergens seems a major determinant of allergic asthma. Our findings highlight the role of indoor allergen sensitization in the development of asthma and rhinitis. Early preventive measures, particularly for indoor allergens, could be the best way to reduce the prevalence and severity of allergic asthma.

REFERENCES

1. Bousquet J, Blumenthal M, Burney P, Burr M, Bryan S. Evidence for an increase in atopic disease and possible causes. *Clin Exper Allergy* 1993; 23: 484-92.
2. Gergen PJ, Weiss KB. The increasing problem of asthma in the United States. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 823-4.
3. Marsh DG, Meyers DA, Bias WB. The epidemiology and genetics of atopy allergy. *N Engl J Med* 1981; 305: 1551-.
4. Naclerio RM. Allergic rhinitis. *N Engl J Med* 1991; 325: 860-69.
5. Kay AB. Asthma and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 1991;87: 893-910.
6. Weiner H, Atkins P, Zweiman B, Altose M. A prospective classification of the respiratory manifestations of pollen sensitivity. *Ann Allergy* 1979; 43: 146-50.
7. Bruce CA, Rosenthal RR, Lichtenstein LM, Norman PS. Quantitative inhalation bronchial challenge in ragweed hay fever patients: a comparison with ragweed-allergic asthmatics. *J Allergy Clin Immunol* 1975; 56: 331-7.

8. Cockcroft DW, Ruffin RE, Frith PA, Cartier A, Juniper EF, Dolovich J, Hargreave FE. Determinants of allergen-induced asthma, dose of allergen, circulating IgE antibody concentration and bronchial responsiveness to inhaled histamine. *Am Rev Respir Dis* 1979;120: 1053-8.
9. Fish JE, Ankin MG, Kelly JF, Peterman VI. Comparison of responsiveness to pollen extract in subjects with allergic asthma and non asthmatic subjects with allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1980; 65: 154-61.
10. Atkins PC, Bédard RM, Zweiman B, Dyer J, Kaliner MA. Increased antigen-induced local and systemic mediator release in rhinitis subjects with pulmonary symptoms in the pollen season. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 73: 341-7.
11. Sears MR, Herbison GP, Holdaway MD, Hewitt CJ, Flannery EM, Silva PA. The relative risks of sensitization to grass pollen, house dust mite and cat dander in the development of childhood asthma. *Clin Exper Allergy* 1989; 19: 419-24.
12. Barbee RA, Lebowitz MB, Thompson HC, Burrows B. Immediate skin test reactivity in a general population. *Ann Intern Med* 1976; 84: 129-33.
13. Platts-Mills TAE, Solomon WR. Aerobiology and inhalant allergens. *In* : *Allergy, Principles and Practice*, Middleton EJr, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW, Busse WW, Editors, Mosby, St-Louis, 1993: 469-528.

14. Bjorksten F, Suoniemi I, Koski V. Neonatal birch pollen contact and subsequent allergy to birch pollen. *Clin Allergy* 1980; 10: 581-91.
15. Platts-Mills TAE, Hayden ML, Chapman MD, Wilkins SR. Seasonal variation in dust mite and grass pollen allergens in dust from the house of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 79: 781-91.
16. Call RS, Smith TF, Morris E, Chapman MD, Platts-Mills TAE. Risk factors for asthma in inner city children. *J Pediatr* 1992; 121: 862-6.
17. Luczynska CM. Risk factors for indoor allergen exposure. *Respiratory Medicine* 1994; 88: 723-9.
18. Pepys J. Skin testing. *Br J Hosp Med* 1975; 14: 412-7.
19. Dreborg S, Backman A, Basomba A, et al. Skin tests used in type I allergy testing. Position paper of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 1989; 44 (Suppl.10); 1- 59.
20. U.S. Dept. Of Health and Human Services. PHS Resources Administration. Prevalence of selected chronic respiratory conditions. U.S. 1970. *Vital Health Stat Series 10, No. 84*. September 1973.
21. Lebart L, Morineau A, Warwick KM. Multivariate descriptive statistical analysis: correspondence analysis and related techniques for large matrices. Wiley, N.Y., 1984. Chap. 2.

22. Cockcroft DW, Berscheid BA. Unimodal distribution of bronchial responsiveness to inhaled histamine in a random population. *Chest*, 1983; 83: 751-4.
23. Gergen PJ, Turkeltaub PC. The association of individual allergen reactivity with respiratory disease in a national sample: Data from the second National Health and Nutrition Examination Survey, 1976-80 (NHANES II). *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 579-88.
24. Burrows B, Sears MR, Flannery EM, Herbison GP, Holdaway MD. Relations of bronchial responsiveness to allergy skin tests reactivity, lung function, respiratory symptoms, and diagnoses in thirteen-year-old New Zealand children. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 548-56.
25. Platts-Mills TAE, Chapman MD. Dust mites: immunology, allergic diseases and environmental control. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 80: 755-75.
26. Kuehr J, Frischer T, Meinert R, et al. Sensitization to mite allergens is a risk factor for early and late onset of asthma and for persistence of asthmatic signs in children. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 655-62.
27. Barbee RA, Brown G, Kaltenborn W. Allergy skin test reactivity in a community population sample: correlation with age, histamine skin reactions, and total serum IgE. *J Allergy Clin Immunol* 1981; 68: 15-9.
28. Sears MR, Burrows B, Flannery EM, Herbison GP, Holdaway MD. Atopy in childhood. I. Gender and allergen related risks for development of hay fever and asthma. *Clin Exp Allergy* 1993; 23: 941-8.

29. Sears MR, Burrows B, Herbisson GP, Holdaway MD Flannery EM. Atopy in childhood. II. Relationship to airway responsiveness, hay fever and asthma. *Clin Exp Allergy* 1993; 23: 949-56
30. McNicol KN, Williams HB. Spectrum of asthma in children-I. Clinical and physiological components. *Br Med J* 1973; 4: 7-11.
31. Martin AJ, McLennan, Landau LI, Phelan PD. The natural history of childhood asthma to adult life. *Br Med J* 1980; 280: 1397-400.
32. Kelly WJW, Hudson I, Phelan PD, Pain MCF, Olinski A. Childhood asthma in adult life: a further study at 28 years of age. *Br Med J* 1987; 294: 1059-62.
33. Platts-Mills TAE. How environment affects patients with allergic disease: Indoor allergens and asthma. *Ann Allergy* 1994; 72: 381-4.
34. Colloff MJ, Ayres J, Carswell F, et al. The control of allergens of dust mites and domestic pets: a position paper. *Clin Exper Allergy* 1992; 22 (Suppl.): 1-28.
35. Platts-Mills TAE, Mitchell EB, Nock P, Tovey ER, Moszoro H, Wilkins SR. Reduction of bronchial hyperreactivity during prolonged allergen avoidance. *Lancet* 1982, 2: 675-678.

FIGURES LEGENDS

Figure 3.1

Number of allergic and non-allergic subjects within groups of subjects with asthma and/or rhinitis.

Figure 3.2

Associations among diagnoses of asthma, rhinitis, and both, according to the type of allergen. These reflect the potential contribution that sensitization to the different allergens makes to the clinical expression of allergy.

Figure 3.3

Mean atopic index (4.0 ± 2.0 , 4.8 ± 2.0 , 4.4 ± 2.0) and mean wheal diameter (2.9 ± 1.8 mm, 3.5 ± 1.9 mm, 3.0 ± 1.7 mm) compared among subjects with diagnosis of asthma, asthma and rhinitis, or rhinitis. *Tukey's test : groups with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

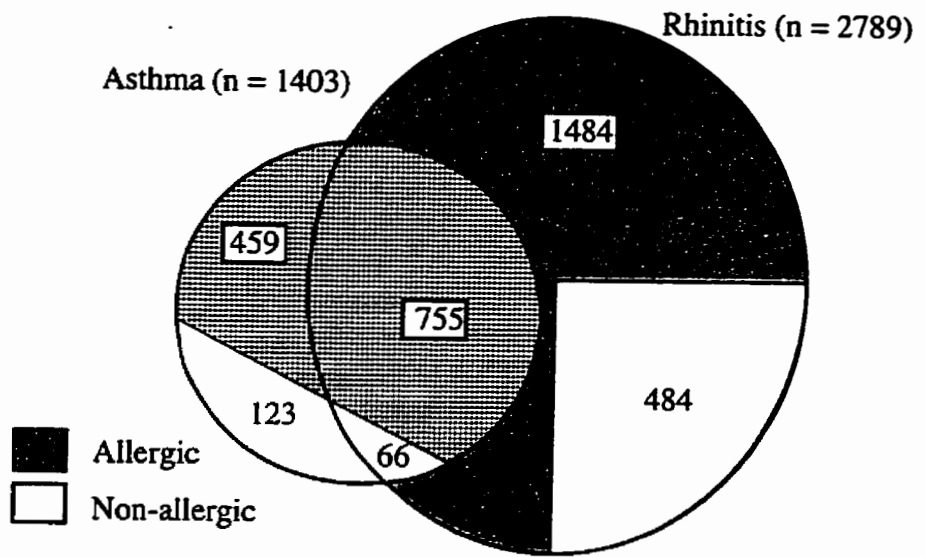


Figure 3.1

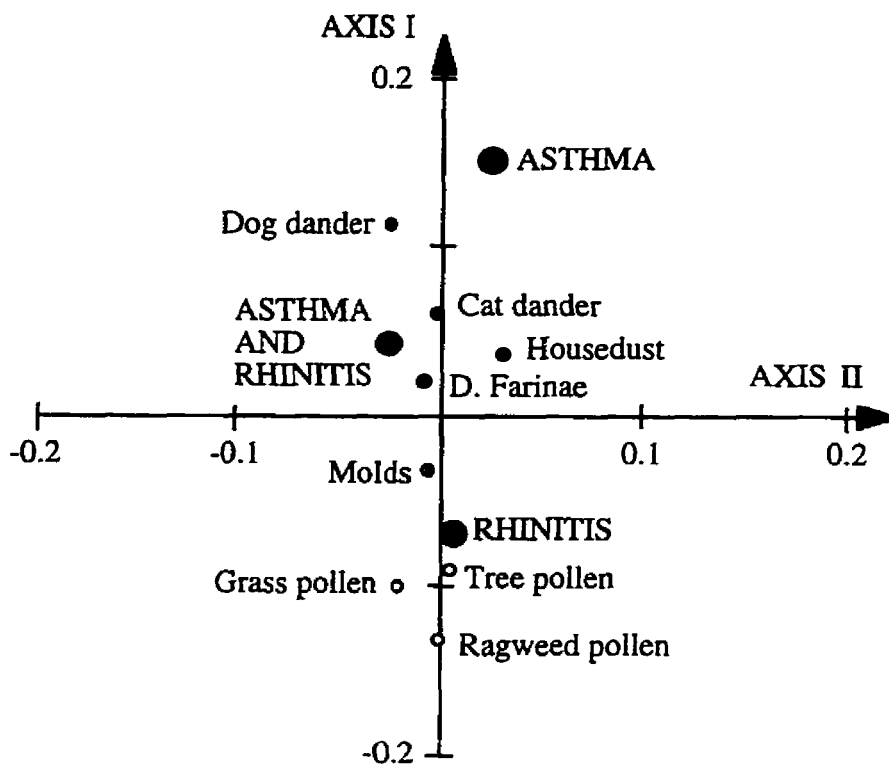


Figure 3.2

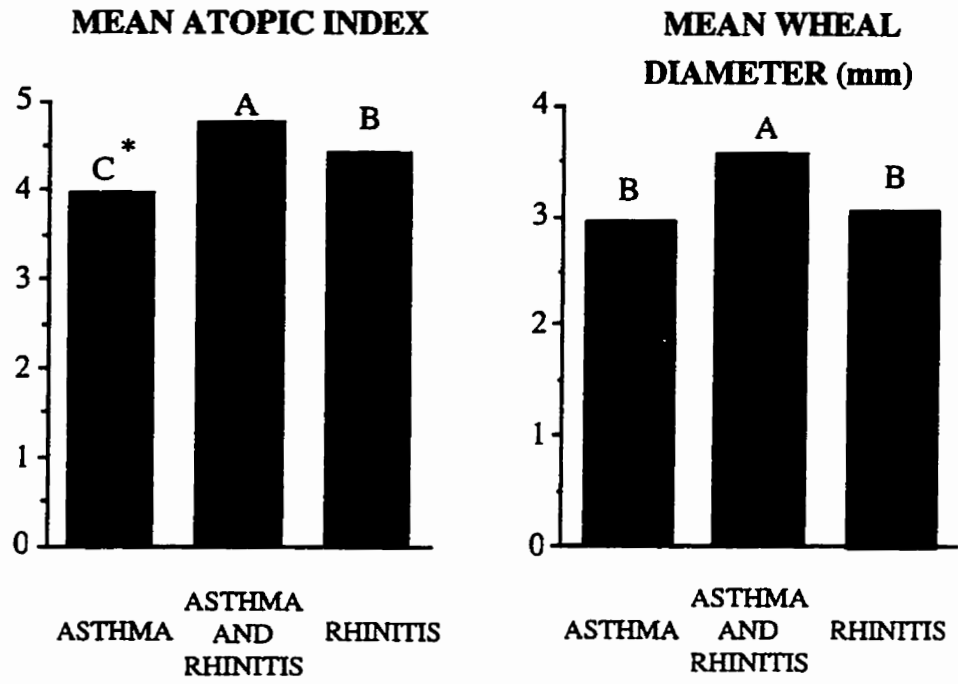


Figure 3.3

Table 3.1

**Prevalence of sensitization to common allergens
according to diagnosis**

	Asthma (%)	Rhinitis + Asthma (%)	Rhinitis (%)
INDOOR ALLERGENS			
<i>Housedust</i>	83.2	88.6	82.2
<i>Cat hair-epithelium</i>	75.4	86.0	72.1
<i>Dog hair-dander</i>	65.6	75.2	56.0
<i>Housedust mite</i>	49.5	60.0	52.6
OUTDOOR ALLERGENS			
<i>Grass pollen</i>	36.2	54.5	55.5
<i>Tree pollen</i>	35.1	48.5	50.3
<i>Ragweed pollen</i>	29.9	45.2	49.3
INDOOR and OUTDOOR ALLERGENS			
<i>Molds (Alternaria)</i>	20.9	27.4	25.8

Table 3.2

Number (n) and percentage (%) of allergic subjects sensitized to indoor, outdoor or both indoor and outdoor allergens

		Asthma	Rhinitis + Asthma	Rhinitis	TOTAL (100%)
INDOOR-ALLERGENS	A)	174	191	345	710
	B)	37.9%	25.3%	23.3%	
	C)	24.5%	26.9%	48.6%	
OUTDOOR-ALLERGENS	A)	23	28	144	195
	B)	5.0%	3.7%	9.7%	
	C)	11.8%	14.4%	73.8%	
INDOOR and OUTDOOR ALLERGENS	A)	262	536	995	1793
	B)	57.1%	71.0%	67.0%	
	C)	14.6%	29.9%	55.5%	
TOTAL (100%)		459	755	1484	2698

A) Number of subjects

B) Percentage of sensitized subjects from each group

Example: 37.9% (174/459) of asthmatic subjects were sensitized only to indoor allergens.

C) Percentage of sensitized subjects belonging to each group

Example: 24.5% (174/710) of subjects sensitized only to indoor allergens belong to the asthma group.

Table 3.3**Percentage of subjects sensitized to each allergen according to age**

ALLERGENS	Age category (yr)					
	I 0-5	II 6-15	III 16-25	IV 26-45	V 46-65	VI ≥66
<i>House dust</i>	(1)40.0	(1)68.4	(1)80.1	(1)70.5	(1)46.8	(1)42.1
<i>Cat hair-epithelium</i>	(2)37.7	(2)64.2	(2)74.9	(2)63.3	(2)36.1	(3)31.9
<i>Dog hair-danders</i>	(3)30.6	(3)47.0	(3)62.1	(3)54.7	(3)34.2	(4)27.1
<i>D.Farinae</i>	(4)20.0	(4)46.7	(4)54.2	(7)41.0	(4)30.6	(2)32.7
<i>Grass pollen</i>	(6)12.9	(5)39.8	(5)53.9	(4)45.2	(6)24.6	(6)21.5
<i>Tree pollen</i>	(4)20.0	(6)31.9	(6)50.4	(5)42.9	(7)22.6	(7)16.8
<i>Ragweed pollen</i>	(8)7.1	(7)29.4	(7)46.5	(6)41.0	(5)24.9	(5)23.4
<i>Molds (Alternaria)</i>	(7)10.6	(8)19.9	(8)26.7	(8)21.3	(8)11.4	(8)9.4

* Rank order of allergens according to the percentage of sensibilization (from 1 = highest to 8 = lowest %)

Table 3.4**Mean atopic index and mean wheal diameter according to age**

AGE (yr)	Mean atopic index	Turkey's	Mean wheal diameter (mm)	Turkey's
0-5	2.9 ± 1.6 (2.4 ± 1.3)*	C**	2.0 ± 1.2 (1.9 ± 1.1)	D**
6-15	4.4 ± 1.9 (3.6 ± 1.7)	B	2.9 ± 1.5 (2.7 ± 1.4)	C
16-25	4.9 ± 2.0 (4.1 ± 1.8)	A	3.6 ± 1.8 (3.5 ± 1.8)	A
26-45	4.5 ± 2.0 (3.8 ± 1.8)	B	3.3 ± 1.9 (3.2 ± 1.9)	B
46-65	3.7 ± 2.1 (3.0 ± 1.8)	C	2.5 ± 1.7 (2.4 ± 1.7)	D
≥66	3.0 ± 1.7 (2.5 ± 1.5)	C	2.1 ± 1.4 (2.0 ± 1.4)	D

* In brackets, data when housedust is not included.

** Tukey's test: groups with different letters are significantly different (p<0.05).

Statistics were similar when housedust was excluded from the analysis.

CHAPITRE 4

CARACTÉRISTIQUES CLINIQUES ET PHYSIOLOGIQUES DES SUJETS AVEC HYPERRÉACTIVITÉ BRONCHIQUE ASYMPTOMATIQUE ET SUIVI DE 3 ANS : CORRÉLATION ENTRE L'APPARITION DES SYMPTÔMES ET LES CHANGEMENTS DE FONCTION RESPIRATOIRE

Article publié sous une forme modifiée (modifications mineures) dans
l'*American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* vol 156, p 403-409, 1997

MISE EN CONTEXTE DE L'ETUDE ET CONTRIBUTION DES AUTEURS

Le but des travaux présentés dans ce chapitre était de déterminer les caractéristiques cliniques et physiologiques de sujets avec une hyperréactivité bronchique (HRB) asymptomatique en comparaison à un groupe d'asthmatiques et de normoréacteurs de même qu'évaluer les changements de ces paramètres sur une période de trois ans.

Cette étude, comportant une évaluation annuelle, permet de déterminer que l'histoire familiale d'asthme et/ou d'atopie ainsi qu'une histoire clinique d'atopie sont des facteurs déterminants dans le développement des symptômes reliés à l'asthme. Il s'agit de la première étude où les paramètres respiratoires sont mesurés avant et après l'apparition des symptômes reliés à l'asthme chez les sujets adultes, permettant ainsi d'évaluer la variabilité de paramètres physiologiques directement impliqués dans ce processus.

Ma contribution à ces travaux a été de participer à la mise sur pied du protocole expérimental. J'ai élaboré un questionnaire détaillé sur les symptômes respiratoires et conditions associés (Annexe 1), inspiré de celui de l'*American Thoracic Society*, visant à caractériser la condition clinique des sujets le plus clairement possible de même que leur degré de perception des symptômes associés à la bronchoconstriction (afin d'éliminer les sujets avec faible perception). J'ai effectué le recrutement (à partir d'une étude comparative de prévalence d'HRB et d'atopie au sein de familles sujets asthmatiques et de familles témoins : Annexe 2) et l'évaluation clinique annuelle qui incluait un questionnaire, des tests de fonction respiratoire, des tests d'allergie et un test à la métacholine avec mesure de perception des symptômes pour l'ensemble des volontaires. J'ai compilé les données recueillies, analysé l'ensemble des

résultats et rédigé l'article scientifique.

Le Dr Louis-Philippe Boulet a assuré la direction des travaux en plus d'effectuer les corrections et la mise au point de l'article scientifique.

TITLE: **Asymptomatic airway hyperresponsiveness :
A three-year follow-up**

AUTHORS: Catherine Laprise, M.Sc.
 Louis-Philippe Boulet, MD, FRCP(C)

ADDRESS: Unité de recherche,
 Centre de Pneumologie de l'Hôpital Laval
 Université Laval, Sainte-Foy, Québec.

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE:
 Dr. Louis-Philippe Boulet
 Hôpital Laval
 2725, Chemin Ste-Foy, Sainte-Foy
 Québec, Canada, G1V 4G5
 Tel: (418) 656-4747
 Fax: (418) 656-4762
 EMAIL: MEDLPB@HERMES.ULaval.CA

KEY WORDS : Airway hyperresponsiveness, asthma, atopy.

RÉSUMÉ

Visant à mieux définir les implications cliniques de l'hyperréactivité bronchique (HRB) asymptomatique, nous avons comparé les caractéristiques cliniques, physiologiques et immunologiques de 30 sujets avec HRB asymptomatique (absence de symptôme respiratoire et CP_{20} métacholine < 8 mg/ml) à celles de 30 sujets asthmatiques, pairés pour l'âge, le sexe et la CP_{20} métacholine, et 30 sujets normoréacteurs, pairés pour l'âge et le sexe (âge moyen = $31,9 \pm 1,4$ ans). L'évaluation comportait un questionnaire sur l'état de santé respiratoire, la mesure des débits expiratoires de pointe, des tests cutanés d'allergie, le dosage des IgE sériques, le décompte des éosinophiles sanguins et un test d'inhalation à la métacholine, et ce, annuellement pour une période de trois ans. Comparativement aux sujets normoréacteurs, les sujets avec une HRB asymptomatique avaient une plus grande réactivité bronchique ($p = 0,001$), une fluctuation des débits (DEP) plus importante ($p = 0,02$) ainsi qu'une plus grande prévalence d'atopie ($p = 0,02$). Les sujets avec une HRB asymptomatique, en comparaison aux sujets asthmatiques, avaient un nombre moyen d'éosinophiles sanguins et une réponse aux bronchodilatateurs inférieure ($p = 0,004$ et $p = 0,02$, respectivement), une valeur moyenne des VEMS supérieure ($p = 0,006$) ainsi qu'une plus grande perception de leur bronchoconstriction ($p < 0,001$). Après 3 ans, chez les sujets présentant une HRB asymptomatique, la CP_{20} était réduite ($p < 0,0001$) et, sur les 28 sujets toujours enrôlés, 4 (14,3%) ont développé des symptômes d'asthme. En conclusion, ce suivi de 3 ans a permis de déterminer que les sujets avec une HRB asymptomatique ont une augmentation de la réactivité bronchique plus marquée ainsi qu'une fréquence accrue de développement d'un asthme symptomatique comparativement aux normoréacteurs. De plus, les sujets avec une HRB asymptomatique qui sont atopiques et sont quotidiennement exposés à un ou plusieurs animaux domestiques en plus d'avoir des antécédents

familiaux d'asthme et/ou d'atopie forment un sous-groupe à haut risque de développer un asthme symptomatique.

ABSTRACT

The physiopathology and significance of asymptomatic airway hyperresponsiveness (AHR) are still to be defined. Over a 3-yr period, we compared clinical, immunologic and physiologic features of 30 subjects who had asymptomatic AHR with those of 30 symptomatic asthmatic subjects and 30 normoresponder subjects (age = 31.9 ± 1.4 yr [mean \pm SEM]; n = 90). Each subject completed a respiratory questionnaire and underwent spirometry, measurement of bronchodilator response and peak expiratory flows, allergy skin-prick test, blood eosinophil count, assay for total serum IgE level, and methacholine challenge. These tests were repeated annually, at the same period of the year, for 3 yr. Subjects with asymptomatic AHR had greater bronchodilator responses ($p = 0.001$), variability of peak expiratory flow rate (PEFR) ($p = 0.02$), and prevalence of atopy ($p = 0.02$) than did the normoreactive subjects. Compared with asthmatic subjects, subjects with asymptomatic AHR had a lower blood eosinophil count ($p = 0.004$), higher mean FEV₁ ($p = 0.006$), and weaker bronchodilator response ($p = 0.02$), but an even greater perception of bronchoconstriction ($p < 0.001$). After 3 yr, the concentration of methacholine provoking a 20% decrease in FEV₁ (PC₂₀) had decreased significantly in the asymptomatic AHR subjects ($p < 0.0001$) as compared with the other two groups, and of the 28 studied at this time, four (14.3%) had developed asthma symptoms. These last four subjects were atopic and exposed to animals when they developed asthma, had a familial history of asthma, and had an increased baseline AHR as compared with the subjects who did not develop symptoms. In conclusion, this study shows that over a 3-yr period, subjects with asymptomatic AHR had a greater increase in airway responsiveness and frequency of development of asthma symptoms than did normoresponsive subjects. Allergen exposure in sensitized subjects at the time of the study, and genetic predisposition, seemed the main risk factors for the development of

symptomatic asthma in this population.

INTRODUCTION

Airway hyperresponsiveness (AHR) describes the tendency of the bronchi to narrow too much and too easily in response to provocative stimuli (1). The relationship between AHR and respiratory symptoms is not strong; about 50% of subjects with AHR reporting no respiratory symptoms (1, 2). AHR seems to follow a normal distribution among the general population, and it has been reported that about 20% of subjects with no evidence of asthma or other respiratory disease show mild AHR, although this varies considerably from one study to another (2, 3). The physiopathology and significance of asymptomatic AHR are, however, still uncertain.

Several previous studies have identified a familial history of asthma and atopy (4) and a personal history of allergy (5-7) as risk factors in the development of AHR. These factors may play a role in promoting the development of airway inflammation, generally considered to be a major mechanism in the pathogenesis of AHR and symptomatic asthma (8-11). On the other hand, both AHR and atopy have been associated with high total serum IgE levels (12-14).

Although asymptomatic AHR can be found in nonatopic subjects, it seems to occur more frequently in the presence of atopy. In this regard, many patients with allergic rhinitis have increased airway responsiveness and, as observed in asthma, their airway response may increase upon natural exposure to allergens to which they are sensitized (15-18).

Previous investigations suggested that individuals with AHR who have absolutely no thoracic symptoms may be in a latent phase of asthma that may become clinically active over the course of time (19-22). However, to date, both

the physiopathology of asymptomatic AHR and the clinical outcome of subjects with this physiologic abnormality remain unclear.

The present study therefore examined the clinical, immunologic, and physiologic characteristics of adult subjects with asymptomatic AHR in comparison with subjects with symptomatic asthma and normoresponsive controls, and focused specifically on changes in these features over a period of 3 yrs. We investigated whether asymptomatic AHR is a preliminary stage of asthma, and whether certain conditions or subject characteristics could contribute to the development of asthma in the population with AHR.

METHODS

Subjects

Ninety subjects aged 14 to 65 years (mean \pm SEM = 31.9 ± 1.4) were recruited after a study of the prevalence of AHR and atopy in families of asthmatic subjects as compared with control families. Within this cohort, a group of subjects denied any past symptoms compatible with asthma (including recurrent cough), but showed AHR to methacholine. Of these, the first consecutive 30 subjects (14 women and 16 men) who agreed to take part in the present study were enrolled, regardless of their atopic status. Ten of these subjects were from asthmatic families and 20 from control families (mean age = 31.6 ± 2.8 yrs).

A second group of subjects, with symptoms of asthma (asthmatic group; n =30 ; 26 from asthmatic families and four from control families), was matched for the concentration of methacholine provoking a 20% decrease in forced expiratory volume in one second (PC_{20} - FEV₁), age (mean age = 30.3 ± 2.7 yrs),

and gender with subjects having asymptomatic AHR. These subjects had stable asthma at the time of the study, and required only intermittent inhaled bronchodilator to control their symptoms. In the prior month, they had had no respiratory infection nor any asthma exacerbation.

A third group of normoreactive subjects denied any past symptoms of asthma and had normal airway responsiveness ($n = 30$; nine from asthmatic families and 21 from control families); these subjects were matched for age (mean age = 32.1 ± 3.0 yrs) and gender with asymptomatic AHR subjects.

All subjects signed informed consent form, and the study was approved by the Laval Hospital Ethics Committee.

Definitions

Asthma was defined according to the criteria suggested by the American Thoracic Society (23). Asymptomatic AHR was defined as a $PC_{20} < 8$ mg/ml in the absence of symptoms suggestive of asthma in subjects who never required any asthma medication (24). To avoid including subjects with "borderline" AHR in the normoreactive control group, subjects had to have a $PC_{20} > 20$ mg/ml in the absence of any respiratory symptoms. Atopy was defined as the presence of at least one positive response (wheal diameter ≥ 3 mm at 10 minutes) to skin-prick tests with a battery of 26 common airborne allergens (25). Atopic index was calculated as the number of aeroallergens to which the patient showed a positive response and atopic score as the mean wheal diameter of all allergic responses to allergy skin tests.

Initial clinical assessment and pulmonary function tests

A) First visit

Each subject completed a general questionnaire on respiratory health and family history of asthma and/or atopy. Measurements of expiratory flows were done with a Vitalograph PFT II spirometer (Vitalograph Medical Instrumentation, Lenexa, Kan.) according to ATS recommendations (26). The best of three FEV curves was used to determine forced vital capacity (FVC) and FEV₁. Bronchodilator response was measured as the increase in FEV₁ at 15 min after a 200 µg dose of inhaled salbutamol. Lung volumes were measured through standard whole-body plethysmography (27). Functional residual capacity (FRC), total lung capacity (TLC) and residual volume (RV) were determined for each subject. Peak expiratory flow rates (PEFRs) were measured with a mini-Wright peak-flow meter (Armstrong Medical, Scarborough, Ont.) in the morning and evening over a period of two wks. The best of 3 repeated measurements was noted on the diary card.

Skin-prick tests were done with a battery of 26 inhalant allergens, which were divided into the six main categories of animal danders, dust, house dust mite, tree pollen, grass pollen and molds. Serum IgE was measured with enzyme immunofluorometry. Blood eosinophils were counted on a Coulter STKS (Coulter STKS, Hialeah, Fla.).

B) Second visit

Methacholine inhalation tests were done according to the method described by Juniper and colleagues (28). Briefly, aerosols were generated from a Wright nebulizer (Roxon Medi-tech, Montreal, Que.) with an output of 0.13

ml/min. After the initial control saline inhalation, increasing doubling concentrations of methacholine from 0.03 to 128 mg/ml, were inhaled by tidal mouth breathing for 2 min at intervals of 5 min. The response, as the percent decrease in FEV₁, was measured at 30 s and 90 s, and then at 2-min intervals if necessary, to record to the lowest value after each inhalation. The test was stopped when the FEV₁ had fallen by $\geq 20\%$ or when the maximum concentration of methacholine had been inhaled. The results were expressed as the PC₂₀ of methacholine. During this test, chest symptoms were scored on a modified Borg scale from 0 = nothing to 10 = maximum.

Subjects were reexamined in February-March (in order to avoid the pollen season) at 2 and 3 yrs after their baseline evaluation, undergoing the same tests as in the baseline evaluation.

Statistical Analysis

Results were expressed as mean \pm SEM values for FEV₁, variability of PEF, atopic score and eosinophil counts. Total serum IgE level and PC₂₀ were expressed as the geometric mean \pm SEM. For continuous variables, a one-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare mean values between groups of subjects. In order to identify significant differences among the three groups (subjects with AHR, subjects with asthma, and normoresponders), we compared means using Scheffe's method. The analysis of paired results (at 1 and 3 yr) was done with a repeated measures design. Categorical variables were analyzed with Fisher's exact test to determine the association between different variables. Significance was accepted at the 95% level.

RESULTS

Clinical parameters

In the asthmatic, asymptomatic AHR, and normoresponsive control groups, the number of subjects with a personal history of any atopic condition were, respectively, 24 (80.0%), 21 (70.0%) and 10 (33.3%, $p = 0.0005$). More subjects in the asymptomatic AHR group ($n = 5$, $p = 0.01$; Table 4.1) reported having seasonal rhinoconjunctivitis than did subjects in the normoresponsive control group ($n = 1$). For eczema and urticaria, however, the proportions in the two groups were similar (23.3% and 16.6%, and 26.6% and 26.6%, respectively, both $p > 0.05$). The number of asymptomatic AHR subjects with a history of respiratory infection of possible viral origin within the 5 yrs preceding the study, other than common cold (bronchitis or sinusitis), was significantly higher than in the normoresponsive group (26.67% and 0%, respectively, $p = 0.005$). The number of smokers was similar in all three groups, and the number of subjects exposed to second-hand smoke was also similar (Table 4.1).

Physiologic and immunologic parameters

A) Baseline

The subjects with asymptomatic AHR did not differ significantly from normoresponders in regard to FEV₁, perception of symptoms, serum IgE level, or eosinophil count (Table 4.2A). A significantly greater degree and/or severity of atopy (atopic index: 2.2 ± 0.4 versus 0.6 ± 0.2 , $p = 0.0003$; atopic score: 40.3 ± 8.4 versus 8.4 ± 2.2 , $p < 0.0001$) was found in the asymptomatic AHR group than in the normoresponsive control group (Table 4.2A). In asymptomatic AHR group,

variability of PEFR was greater than that observed in the normoresponsive control group (5.1 ± 0.5 versus 3.4 ± 0.2 , $p = 0.002$), as was the bronchodilator response (6.3 ± 0.6 versus 3.5 ± 0.4 , $p = 0.0003$; Table 4.2A).

Subjects with asymptomatic AHR had a higher baseline FEV₁ (% predicted = 104.0 ± 2.6 versus 89.8 ± 2.0 , $p < 0.0001$) and weaker bronchodilator response (% change in FEV₁ = 6.3 ± 0.6 versus 9.7 ± 1.1 , $p = 0.008$) than did asthmatic subjects (Table 4.2A). Subjects with asymptomatic AHR perceived methacholine-induced bronchoconstriction more acutely than did asthmatic subjects (perception score = 3.0 ± 0.1 and 1.2 ± 0.1 , respectively, $p < 0.0001$). In subjects with asymptomatic AHR, the eosinophil count was lower than in the asthmatic group ($p = 0.004$, Table 4.2A); the atopic index and atopic score were similar in these 2 groups (Table 4.2A).

Sixty-one percent of the subjects included in the study were atopic (33.3% of the controls, 70.0% of the asymptomatic AHR group, and 80.0% of the asthmatic group [$p = 0.0005$]).

Relationship between AHR, and gender

In this study, 64.4% of the subjects were women. Gender comparisons for the different parameters showed no significant differences except for atopic index and atopic score, both of which were slightly higher in men than in women, with respective values of 2.8 ± 0.5 and 1.9 ± 0.3 ($p=0.09$) for atopic index, and 49.1 ± 11.2 and 28.7 ± 5.2 ($p = 0.06$) for atopic score. In subjects with AHR ($n = 56$, asymptomatic AHR and asthmatic groups), we noted that the PC₂₀ methacholine was slightly lower in women than in men, although this difference was not statistically significant (3.3 ± 1.2 mg/ml for women and 3.9 ± 1.1 mg/ml for men, $p = 0.07$).

Relationship between AHR and atopy, and between AHR and familial history of asthma

In comparison with non-atopic asthmatic subjects, those with asthma and atopy had a higher degree of airway responsiveness, with respective PC₂₀ values for methacholine of 4.9 ± 1.1 and 2.7 ± 1.1 , $p = 0.01$ (Table 4.3). They also had higher eosinophil counts and serum IgE levels, with respective values of $0.1 \pm 0.03 \times 10^9/L$ and $0.4 \pm 0.04 \times 10^9/L$ ($p = 0.01$) and $7.3 \pm 1.3 \mu\text{g}/L$ and $157.8 \pm 1.2 \mu\text{g}/L$ ($p < 0.0001$; Table 4.2B).

Among subjects with asymptomatic or symptomatic AHR ($n = 60$), 75% were atopic (Table 4.2B).

When we examined the normoresponsive and asymptomatic AHR groups according to the presence of asthma in first-degree relatives, we found that the subjects with at least one first-degree relative with asthma had a higher prevalence and severity of atopy, as well as higher serum IgE levels (Table 4.2C).

B) Two- and 3-yr follow-up

With regard to the variability of the study parameters over the 3-yr total follow-up period, we observed no increase, and even a slight reduction, of bronchodilator response (Table 4.2A) in the normoreactive control group.

In the asthmatic group, we observed a reduction of FEV₁ ($p = 0.01$), bronchodilator response ($p = 0.01$), and blood eosinophil counts ($p = 0.0009$). In addition, airway responsiveness ($p = 0.001$), atopic score ($p = 0.001$), and mean of serum IgE levels ($p < 0.0001$) were mildly increased. The subjects with first-degree relatives with asthma had a more marked increase in airway

responsiveness at 3 yr than the subjects without first-degree relatives with asthma ($p = 0.01$).

In asymptomatic AHR subjects, FEV₁ was significantly decreased ($p < 0.0001$); this reduction was strongly associated with atopic status. In fact, over the 3-yr follow-up period, the reduction in FEV₁ in asymptomatic AHR subjects was $5.5 \pm 0.7\%$ for subjects with atopy, and $2.4 \pm 0.9\%$ for nonatopic hyperresponders ($p = 0.01$). In comparison with hyperresponders who did not develop asthma symptoms, those who developed such symptoms had greater decreases in FEV₁, with values of $3.6 \pm 0.6\%$, for the asymptomatic group and $9.3 \pm 1.3\%$ for those who developed symptomatic asthma ($p = 0.0007$). In addition, in those subjects who developed asthma symptoms, the mean pre-methacholine FEV₁ at Year 3 became similar to that observed in the asthmatic group ($87.0 \pm 1.6\%$ predicted versus $88.5 \pm 1.8\%$ predicted, $p = 0.94$).

In the asymptomatic AHR group, PC₂₀ methacholine was significantly reduced at 3 yr compared with the values for control and asthmatic groups, with a change in the number of doubling methacholine concentrations of 0.90 ± 0.61 mg/ml, 0.13 ± 0.04 mg/ml and 0.02 ± 0.002 mg/ml ($p < 0.0001$; Figure 4.1A). The reduction of PC₂₀ methacholine from baseline to Year 3 was more marked in subjects with atopy (Figure 4.1B) and in subjects with first-degree relatives who had asthma (Figure 4.1C); this held true for all groups. At 3 yr, four of the asymptomatic AHR subjects had developed asthma symptoms (none of the normoresponsive control group had done so, $p = 0.11$). These symptoms included wheezing and exercise-induced cough in all four subjects, and wheezing and chest tightness upon exposure to relevant allergens in three of the four. These four subjects also developed a $> 15\%$ increase of FEV₁ after bronchodilator therapy (mean = $17.2 \pm 2.1\%$), and a greater variability (increase) in their FEV₁ response to bronchodilator than did the 24 other asymptomatic AHR subjects ($5.0 \pm 2.1\%$ versus $-0.2 \pm 0.6\%$, $p = 0.003$). The asymptomatic

AHR subjects who developed asthma symptoms did not differ significantly from the 24 other asymptomatic AHR subjects with regard to changes in the circadian variation of their PEFR over the course of the 3-yr follow-up ($0.44 \pm 0.3\%$ and $0.55 \pm 0.4\%$, respectively, $p = 0.94$). Although the four asymptomatic AHR subjects who developed asthma symptoms had a mean daily PEFR fluctuation of less than 15%, they had occasional fluctuations of more than 15%, indicating the development of variable airflow obstruction (according to most current criteria). All were atopic and from families with asthmatic members. No change in these patients' environment was noted, but each was exposed to an animal, as were other subjects with asymptomatic AHR.

Onset of asthma symptoms

Analysis of the relationship between the incidence of newly diagnosed asthma and the severity of AHR (Table 4.3) showed that the more severe the AHR, the more likely the subjects were to develop symptomatic asthma ($p = 0.01$). About 40% of the subjects with an initial $PC_{20} < 4$ mg/ml developed asthma within the 3-yr follow-up period. Furthermore, about 40% of the subjects with asymptomatic AHR and a familial history of asthma developed asthma within the 3-yr follow-up period, whereas none of the subjects without first-degree relatives with asthma did so ($p = 0.01$; Table 4.3).

Among those asymptomatic AHR subjects reporting a history of viral respiratory tract infection within the previous 5 yr, 44.4% developed asthma; in contrast, among the subjects of this group not reporting such infection, none developed asthma ($p = 0.006$; Table 4.3).

DISCUSSION

This study shows that subjects with AHR to methacholine, but no current or past symptoms of asthma or other respiratory disease, exhibit a diurnal variability in PEF and prevalence or degree of atopy greater than those of normoresponder subjects and similar to those of asthmatic subjects. Furthermore, over a period of 3 yr, subjects with asymptomatic AHR tended to have a higher incidence of symptomatic asthma than did normoresponders. All subjects who developed symptomatic asthma were atopic, had a history of respiratory viral infection, and had a first-degree relative with a diagnosis of asthma; they also had higher baseline AHR than those who did not develop asthma. Perception of bronchoconstriction-induced symptoms was not deficient in asymptomatic AHR subjects; in fact, it was even greater than in the asthmatic group.

Our observations suggest that asymptomatic AHR may be an intermediate stage between normality and asthma, although the reason why this AHR does not translate into respiratory symptoms is unclear. Subjects with asymptomatic AHR had features suggesting increased variation in airway caliber, as observed previously (15, 29, 30), although this finding differs from the observations of Power and colleagues, who found no differences in spirometric values between subjects with asymptomatic AHR and normoresponders (31). Furthermore, our asymptomatic AHR subjects had greater bronchodilator responses than that of normal subjects.

Why then, if subjects with asymptomatic AHR have such variability in airflow obstruction, do they have no symptoms? In addition to the possibility that the airway caliber changes in our subjects with asymptomatic AHR were not great enough to induce symptoms, we considered the possibility that the subjects'

asymptomatic AHR was due to a reduction in their ability to recognize airway constriction. We did note, however, that the mean perception scores of the asymptomatic AHR subjects and normoresponders were similar, and were higher than those of the asthmatic group. This observation suggests that in general, subjects with asymptomatic AHR have no significant impairment in their ability to recognize bronchoconstriction-related symptoms. This agrees with the data reported by Pin and coworkers (32) and Gibson and colleagues (29). Conversely, Brand and associates (33) reported that subjects with asymptomatic AHR were less likely to report symptoms during a methacholine challenge. These contradictory results may be explained by several factors. For example, in Brand's study, the challenge was stopped when FEV_1 fell by 10% or more, a fact that accounts for the smaller decreases in their subjects' expiratory flows. Another explanation for inconsistent findings in studies of subjects with asymptomatic AHR could be that the definitions and methods used for symptom evaluation are not standardized.

Additionally, our subjects had not previously experienced the symptoms they developed during the challenges, making it unlikely that the previous absence of any report of asthma symptoms was due to the failure to recognize these symptoms as being asthma symptoms.

Our observations show that subjects with asymptomatic AHR are at greater risk for developing asthma than are normoresponders. It would be worthwhile to determine which individuals among those with asymptomatic AHR are at greater risk for developing symptomatic asthma within the succeeding few years. Previous observations in children have led to useful information on the prevalence and determinants of the development of symptomatic asthma in these subjects. Jones (21) reported that among a cohort of children with asymptomatic AHR, eight of 60 subjects developed asthma symptoms by the end of a 5-yr follow-up period (21). On the other hand, Sears and colleagues

found a tendency for airway responsiveness to decrease with age in a cohort of children aged 9 to 15 yrs (22). This change in AHR was closely related to the skin-test index, with a higher allergy skin-test reactivity being associated with a less reduction in airway responsiveness. Differences between these other studies and ours probably reflect the effects of different influences on children than in adults, such as endocrine or other types of factors and changes in airway caliber with growth.

One of the major findings of the present study was that all of the hyperresponsive asymptomatic subjects who developed symptomatic asthma were atopic and had a first-degree relative with asthma. This strongly suggests that genetic influences, in conjunction with atopy, play a role in the development of AHR and symptomatic asthma. We also found that in comparison with normal subjects, those with asymptomatic AHR had higher atopic indexes and atopic scores. In our study, two thirds of the subjects with AHR were atopic, as compared with one third of the control group. This is consistent with previous studies showing that atopic nonasthmatic subjects have a higher prevalence of methacholine-induced AHR than do nonatopic subjects (15). In addition, our results showed an increase in the prevalence of atopy in subjects with a family history of asthma.

Zhong and associates (34) reported that, among a group of students without respiratory symptoms, those with the more severe AHR developed asthma in the 2 yr following initial study, and that 80% of these subjects had a history of early respiratory illness. Hegele and coworkers (35) reported that viral respiratory tract infections are associated with an acute increase in airway responsiveness in both normal subjects and patients with asthma. Our results are in keeping with those observations. Asymptomatic AHR subjects who developed asthma had more marked AHR, and all of them reported an episode of respiratory viral infection within the previous 5 yrs (Table 4.3). The

mechanisms by which respiratory viral infections can increase airway responsiveness remains unclear. The viral infection may induce airway epithelial damage and/or airway inflammation, but it may also trigger an airway repair process, these phenomena resulting in acute or sometimes persistent changes in airway function.

We should also point out that asymptomatic hyperresponders and asthmatic subjects in our study had a similar degree of AHR, but that asthmatic subjects had a lower FEV₁. Furthermore, those subjects with asymptomatic AHR who developed asthma experienced a reduction in FEV₁ to the level seen in asthma. This suggests that clinical asthma may not be related only to the presence of hyperresponsive airways, but also to the combined effect of airflow obstruction and hyperresponsiveness, both of which are secondary to the underlying airway inflammatory process or its structural consequences.

In conclusion, asymptomatic AHR appears to be an intermediate stage between normality and symptomatic asthma, and even as adults, individuals with AHR seem to be at greater risk of developing symptomatic asthma than the general population. Subjects in the asymptomatic AHR subgroup who are at greater risk of developing symptomatic asthma are atopic and have a first-degree relative with asthma, are currently exposed to indoor allergens such as animal danders, and more frequently report a history of respiratory viral infection in previous years. Preventive measures such as avoiding allergen exposure, and possibly other measures to reduce airway inflammation, should therefore be emphasized, particularly in this last subgroup, in order to minimize the chance of development of chronic symptomatic asthma. On the other hand, the mechanisms by which the asymptomatic phase of AHR becomes overtly symptomatic asthma remain to be documented.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all subjects for their participation in this study and we are grateful to Lori Schubert for reviewing the manuscript. Catherine Laprise was supported by the Fonds pour la formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) du Québec.

REFERENCES

1. Woolcock, A.J. 1993 What is bronchial hyperresponsiveness from the clinical standpoint? *In* C.P. Page, P.J. Gardiner, editors. Airway hyperresponsiveness : is it really important for asthma? Blackwell Scientific Publication, Oxford. Ch. 1.
2. Cockcroft, D.W., B.A. Berscheid, K.Y. Murdock. 1983. Unimodal distribution of bronchial responsiveness to inhaled histamine in a random population. *Chest* 83 : 751-754.
3. Yan, K., C. Salmone and A.J. Woolcock. 1983. Rapid method for measurement of bronchial responsiveness. *Thorax* 38: 760-765.
4. Weiss, S.T., I.B. Tager, F.E. Speizer and B. Rosner. 1980. Persistent wheeze : its relation to respiratory illness, cigarette smoking and level of pulmonary function in a population sample of children. *Am Rev Respir Dis.* 122 : 697-707.
5. Sherman, C.B., T.D. Tosteson, I.B. Tager, F.E. Speizer and S.T. Weiss. 1990. Early predictors of asthma. *Am J Epidemiol.* 132 : 83-95.
6. Burrows, B.F., D. Martinez, M. Halonen, R.A. Barbee and M.G. Cline. 1989. Association of asthma with serum IgE levels and skin test reactivity to allergens. *N Engl J Med.* 320 : 271-277.

7. Sears, M.R., B. Burrows, E.M. Flannery, G.P. Herbison, C.J. Hewitt and M.D. Holdaway. 1991. Relation between airway responsiveness and serum IgE in children with asthma and in apparently normal children. *N Engl J Med.* 325 : 1067-1071.
8. Barnes, P.J. 1989. New concepts in the pathogenesis of bronchial hyperresponsiveness and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 83: 1013-1026.
9. Kay, A.B. 1991. Asthma and inflammation. *J Allergy Clin. Immunol.* 87(5): 893-910.
10. Hargreave, F.E., E.H. Ramsdale, J.G. Kirby and P.M. O'Byrne. 1986. Asthma and the role of inflammation. *Eur J Respir Dis.* 69 (suppl 147): 16-21.
11. Djukanovic, R., C.K.W. Lai, J.W. Wilson, K.M. Britten, S.J. Wilson, W.R. Roche, P.H. Howarth and S.T. Holgate. 1992. Bronchial mucosal manifestations of atopy: a comparison of markers of inflammation between atopic asthmatics, atopic nonasthmatics and healthy controls. *Eur Resp J.* 5: 538-44.
12. Grainger, D.N., S.C. Stenton, A.J. Avery, M. Duddridge, E.H. Walters and D.J. Hendrick. 1990. The relationship between atopy and non-specific bronchial responsiveness. *Clin. Exp Allergy* 20: 181-187.
13. Lam, S., F. Tan, H. Chan and M. Chan-Yeung. 1983. Relationship between types of asthmatic reaction, nonspecific bronchial reactivity, and specific IgE antibodies in patients with red cedar asthma. *J Allergy Clin. Immunol.* 72; 134-139.

14. O'Connor, G.T., D Sparrow, M.R. Segaland S.T. Weiss. 1989. Smoking, atopy, and methacholine airway hyperresponsiveness among middle-aged and elderly men: the Normative Aging Study. *Am Rev Respir Dis.* 140: 1520-1526.
15. Cockcroft, D.W., K.Y. Murdock and R.A. Berscheid. 1984. Relationship between atopy and bronchial hyperresponsiveness to histamine in a random population. *Ann Allergy* 53 : 26-29.
16. Townley, R.G., U.Y. Ryo, B.M. Kolotkin and B. Kang. 1975. Bronchial sensitivity to methacholine in current and former asthmatic and allergic rhinitis patients and control subjects. *J Allergy Clin. Immunol.* 56: 429-442.
17. Cockcroft, D.W., R.E. Ruffin, J. Dolovich and F.E. Hargreave. 1977. Allergen induced increase in non-allergic bronchial reactivity. *Clin Allergy* 7: 503-513.
18. Boulet, L.P., D. Morin, J. Milot and H. Turcotte. 1989. Bronchial responsiveness to methacholine increases during seasonal exposure in non-asthmatic subjects with pollen-induced rhinitis. *Ann Allergy* 63: 114-119.
19. Hopp, R.J., R.G. Townley, R.E. Biven, A.K. Bewtra and M.L. Nair. 1990. The presence of airway reactivity before the development of asthma. *Am Rev Respir Dis.* 141: 2-8.
20. Carrey, V.J., S.T. Weiss, I.B. Tager, S.R. Leeder and F.E. Speizer. 1996. Airways responsiveness, wheeze onset, and recurrent asthma episodes in young adolescents. *Am Respir Crit Care Med.* 153 : 356-361.

21. Jones, A. 1994. Asymptomatic bronchial hyperreactivity and the development of asthma and other respiratory tract illnesses in children. *Thorax* 49: 757-761.
22. Burrows, B., M.R. Sears, E.M. Flannery, G.P. Herbison, M.D. Holdaway and P.A. Silva. 1995. Relation of the course of bronchial responsiveness from age 9 to age 15 to allergy. *Am J Respir Crit Care Med.* 152 : 1302-1308.
23. American Thoracic Society. 1987. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. *Am Rev Respir Dis.* 136 : 225-244.
24. Malo, J.L., L. Pineau, A. Carrier and R.R. Martin. 1983. Reference values of the provocative concentrations of methacholine that cause 6% and 20% changes in forced expiratory volume in one second in a normal population. *Am Rev Respir Dis.* 128 : 8-11.
25. Sub-Committee on Skin Tests of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. 1989. Skin tests used in type I allergy testing. Position paper. *Deborgs, Ed. Allergy* 44 (Suppl.) : 1-59.
26. American Thoracic Society. 1994. Standardization of spirometry. *Am J Respir Crit Care Med.* 152 : 1107-1136.
27. Dubois, A.B., S.Y. Bothelho, G.N. Bedell, R. Marshall and J.H. Comroe Jr. 1956. A rapid plethysmographic method for measuring functional residual capacity. *J Clin Invest.* 35 ; 322-326.

28. Juniper, E., D.W. Cockcroft and F.E. Hargreave. 1991. Histamine and methacholine inhalation tests : Tidal breathing method. *In* Laboratory procedure and standardization. Canadian Thoracic Society. AB Draco, Lund, Sweden.
29. Gibson, P.G., S. Mattoli, M.R. Sears, J. Dolovich and F.E. Hargreave. 1995. Increased peak flow variability in children with asymptomatic hyperresponsiveness. *Eur Respir J.* 8: 1731-1735.
30. Ramsdale, E.H., M.M. Morris, R.S. Robert, F.E. Hargreave. 1985. Asymptomatic bronchial hyperresponsiveness in rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* 75: 573-577.
31. Power, C., S. Streenan, B. Hurson, C. Burke, L.W. Poulter. 1993. Distribution of immunocompetent cells in the bronchial wall of clinically healthy subjects showing bronchial hyperresponsiveness. *Thorax* 48: 1125-1129.
32. Pin, I., S. Radford, R. Kolendowicz, B. Jennings, J.A. Denburg, F.E. Hargreave, J. Dolovich. 1993. Airway inflammation in symptomatic and asymptomatic children with methacholine airway hyperresponsiveness. *Eur Respir J.* 6: 1249-1256.
33. Brand, P., B. Rijcken, J.P. Schouten, G.H. Koeter, S.T. Weiss, D.S. Postma. 1992. Perception of airway obstruction in a random population sample. *Am Rev Respir Dis.* 146: 396-401.

34. Zhong, N.S., R.C. Chen, M.O. Yang, Z.Y. Wu, J.P. Zheng, Y.F. Li. 1992. Is asymptomatic bronchial hyperresponsiveness an indication of potential asthma? *Chest* 102 (4): 1104-1109.

35. Hegele, R.G., S. Hayashi, J.C. Hogg, P.D. Paré. 1995. Mechanisms of airway narrowing and hyperresponsiveness in viral respiratory tract infections. *Am J Respir Crit Care Med.* 151: 1659-1664.

FIGURE LEGEND

Figure 4.1

Variability of PC₂₀ methacholine over three years in different groups (A), intra-group according to the atopic status (B) and intra-group according to the presence of at least one first-degree relative with asthma (C).

* Significant difference between groups ($p < 0.05$)

† Asymptomatic airway hyperresponsiveness

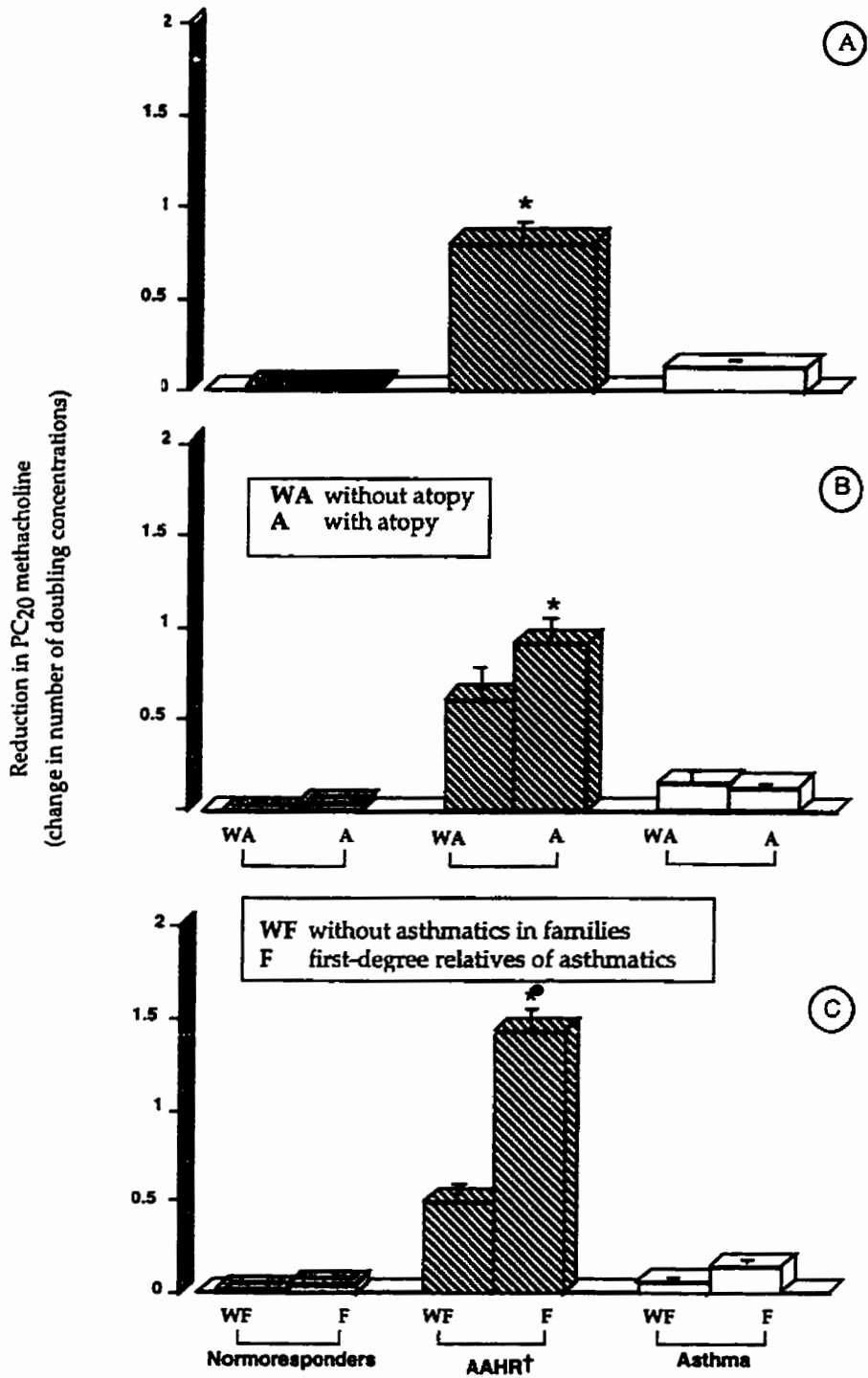


Figure 4.1

Table 4.1

Comparison of questionnaire analysis between the subjects with asymptomatic AHR, asthma or no AHR (normoresponders)

	Normoresponders (30)	Asymptomatic AHR (30)	Asthma (30)	p value
PERSONAL HISTORY				
Eczema	5 (16.6)*	7 (23.3)	6 (20)	0.9
Urticaria	8 (26.6)	8 (26.6)	7 (23.3)	1.0
Hay fever	1 (3.3) ^a	5 (16.6) ^{ab}	10 (33.3) ^b	0.01
Respiratory viral infection † (within the last 5 yr)	0 (0) ^a	8 (26.67) ^b	4 (13.33) ^b	0.005
FAMILY HISTORY				
Asthma	7 (23.3) ^a	23 (76.7) ^{bc}	27 (90.0) ^b	<0.001
Eczema	10 (33.3)	12 (40.0)	14 (46.7)	0.3
Urticaria	4 (13.3) ^a	3 (10) ^a	13 (43.3) ^b	0.007
Hay fever	9 (30.0)	10 (33.3)	11 (36.7)	0.5
Chronic bronchitis	0 (0) ^a	2 (6.7) ^{bc}	7 (23.3) ^b	0.009
Emphysema	3 (10.0)	3 (10.0)	6 (20.0)	0.6
SMOKING HISTORY				
Smoker	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1.0
Ex smoker, >5 yr	5 (16.6)	7 (23.3)	4 (13.3)	0.7
Non smoker	25 (75.8)	23 (76.7)	26 (86.7)	1.0
Smoking exposure	10 (33.33)	11 (36.67)	11 (36.67)	1.0
ALLERGEN EXPOSURE				
Domestic animals	10 (33.33)	16 (53.33)	8 (26.67)	0.08

At comparison of each group, baseline values identified by a different letter are different ($p < 0.05$).

* Number of subjects (percentage)

† Excluding common cold

Table 4.2A

Subjects' characteristics

PARAMETERS	NORMORESPONDERS			ASYMPTOMATIC AHR			ASTHMA		
	Baseline	Year 2	Year 3	Baseline	Year 2	Year 3	Baseline	Year 2	Year 3
Respiratory symptoms (n. of subjects)	0/30	0/28	0/28	0/30	1/28	4/28	30/30	28/28	28/28
FEV ₁ (% of pred.)	103.2±1.6	102.5±1.6	103.8±1.9	104.1±2.1	103.1±2.2	99.7±2.0 *†	89.8±2.0	89.3±1.9	88.5±1.8 †
Bronchodilator response (% change in FEV ₁)	3.5±0.4 ^a	3.0±0.3	2.5±0.3 *	6.3±0.6 ^b	6.5±0.7	6.7±1.1	9.7±1.1 ^c	9.0±1.2	8.7±1.2 *
Methacholine PC ₂₀ (mg/ml)	57.8±1.1 ^a	57.4±1.2	57.3±1.2	4.3±1.1 ^b	3.3±1.1 *	2.5±1.1 *†	3.2±1.1 ^c	3.0±1.1	2.9±1.1 *
Perception score (0 to 10)	2.9±0.1 ^a	2.9±0.1	2.8±0.1	3.0±0.1 ^a	3.0±0.2	3.0±0.2	1.2±0.1 ^b	1.2±0.1	1.1±0.1
PEF variability (mean daily %)	3.4±0.2 ^a	2.8±0.4	2.9±0.6	5.1±0.5 ^b	5.4±0.7	5.6±0.7	5.8±0.7 ^b	7.4±0.7 *	6.3±0.5 †
Atopic index †	0.6±0.2 ^a	0.6±0.2	0.6±0.2	2.2±0.4 ^b	2.2±0.4	2.3±0.4	3.3±0.4 ^b	3.2±0.4	3.2±0.4
Atopic score (mm) ‡	8.4±2.2 ^a	8.5±2.3	8.7±2.4	40.3±8.4 ^b	40.3±8.2	41.7±8.4 *†	49.7±7.9 ^b	50.3±7.9	51.1±8.0 †
IgE (µg/l)	59.7±1.3	45.6±1.3	43.4±1.3	83.8±1.3	76.7±1.4	79.4±1.4	94.2±1.3	97.7±1.3	101.2±1.3 †
Blood eosinophils (10 ⁹ /l)	0.15±0.02 ^a	0.14±0.02	0.16±0.01	0.19±0.02 ^a	0.18±0.02	0.20±0.02	0.34±0.04 ^b	0.27±0.03	0.25±0.04 *

For group comparisons, baseline values identified by a different letter are different (p<0.05)
Similar results were obtained at years 2 and 3

* Different from baseline (p<0.05)

† Year 2 different from year 3 (p<0.05)

‡ Number of main categories of allergens presenting at least one positive response (total of 6 categories)

§ Cumulative of all positive responses in mm

Table 4.2B

Subjects' characteristics according to atopic status

PARAMETERS	NORMORESPONDERS		ASYMPTOMATIC AHR		ASTHMA	
	with atopy	without atopy	with atopy	without atopy	with atopy	without atopy
Number of subjects (%)	10 (33.3)	20 (66.7)	21 (70)	9 (30.0)	24 (80)	6 (20)
FEV ₁ (% of pred.)	105.8±2.3	101.8±2.2	106.9±2.8	98.9±3.0	91.4±2.3	83.5±2.8*
Bronchodilator response (% change in FEV ₁)	4.6±0.5	2.8±0.4	6.7±0.9	5.5±0.9	10.4±1.3	6.9±1.8*
Methacholine PC ₂₀ (mg/ml)	49.4±1.2	63.7±1.2	3.8±1.1	5.3±1.1	2.7±1.1	4.9±1.1*
PEF variability (mean daily %)	2.7±0.2	3.6±0.3	5.5±0.7	4.4±0.8	5.8±0.5	5.9±0.8
Atopic index †	1.6±0.15	-	3.5±0.4	-	4.1±0.3	-
Atopic score (mm) ‡	20.5±3.47	-	61.8±7.0	-	63.1±8.0	-
Serum IgE (µg/l)	171.4±1.2*	30.2±1.3	193.2±1.2*	17.1±1.3	157.8±1.2*	7.3±1.3
Blood eosinophil count (10 ⁹ /l)	0.17±0.03	0.14±0.02	0.22±0.03	0.14±0.02	0.40 ±0.04	0.1±0.03*

* Significant difference between atopic and non atopic subjects (p<0.01)

† Number of main categories of allergens presenting at least one positive response (total of 6 categories)

‡ Cumulative of all positive responses in mm

Table 4.2C

Subjects' characteristics according the first-degree relatives with asthma

PARAMETERS	NORMORESPONDERS		ASYMPTOMATIC AHR		ASTHMA	
	with F	without F	with F	without F	with F	without F
Number of subjects (%)	9 (30.0)	21 (70.0)	10 (33.3)	20 (66.7)	26 (86.7)	4 (13.3)
FEV ₁ (% of pred.)	105.4±2.8	102.3±2.0	107.6±5.0	102.4±2.2	90.3±2.1	86.8±5.3
Bronchodilator response (% change in FEV ₁)	3.6±0.9	3.4±0.3	6.4±0.8	6.0±1.1	10.2±1.2	6.4±2.0
Methacholine PC ₂₀ (mg/ml)	49.0±1.2	62.4±1.1	4.4±1.2	4.3±1.1	3.0±1.1	3.6±1.3
PEF variability (mean daily %)	3.4±0.4	3.4±0.3	5.6±1.0	4.8±0.6	5.7±0.5	6.6±0.7
Atopic index †	1.2±0.3*	0.3±0.1	3.6±0.9*	1.5±0.4	3.5±0.4	1.8±1.0
Atopic score (mm) ‡	17.1±5.1*	4.5±1.7	63.3±13.1*	28.4±6.8	54.4±8.7	25.0±14.3
Serum IgE (µg/l)	126.8±1.6*	41.9±1.3	170.6±1.6*	57.7±1.4	100.7±1.3	46.0±1.8
Blood eosinophil count (10 ⁹ /l)	0.20±0.04	0.13±0.02	0.23±0.05	0.17±0.02	0.35±0.04	0.16±0.03

* Significant difference between subjects with first-degree relatives with asthma and subjects without first-degree relatives with asthma

† Number of positive responses on allergy test (6 main categories of allergens)

‡ Cumulative diameters of positive responses in mm

Table 4.3

Development of asthma symptoms in relation to severity of airway hyperresponsiveness (A), first degree relatives with asthma (B) and clinical history of respiratory viral infection (C)

	Subjects*	Subjects which develop asthma symptoms *	%	p †
A) PC₂₀ methacholine				
PC ₂₀ < 4 mg/ml	10	4	40.0	
PC ₂₀ 4-8 mg/ml	18	0	0	0.01
B) First degree relatives with asthma				
with first degree relatives	10	4	40.0	
without first degree relatives	18	0	0	0.01
C) Clinical history of respiratory viral infection				
with clinical history	9	4	44.4	
without clinical history	19	0	0	0.006

* Number of subjects

† Fisher's exact test

CHAPITRE 5

SUIVI DE 3 ANS DE SUJETS AVEC HYPERRÉACTIVITÉ BRONCHIQUE ASYMPTOMATIQUE : CORRÉLATION ENTRE L'APPARITION DES SYMPTÔMES ET LES CHANGEMENTS STRUCTURAUX ET INFLAMMATOIRES BRONCHIQUES

Article soumis à l'American Respiratory and Critical Care Medicine
(le 4 août 1997)

MISE EN CONTEXTE DE L'ETUDE ET CONTRIBUTION DES AUTEURS

Ce travail permis de démontrer que les sujets avec une hyperréactivité bronchique (HRB) asymptomatique présentent une fibrose sous-épithéliale, une desquamation épithéliale ainsi qu'une déciliation des cellules épithéliales intermédiaires à ce que l'on observe chez les sujets asthmatiques et normoréacteurs. Parallèlement aux changements physiologiques mesurés dans l'étude précédente, les travaux présentés dans ce chapitre visaient à évaluer les changements structuraux ("remodeling") et inflammatoires retrouvés au niveau des voies aériennes suite à l'analyse de biopsies bronchiques de sujets présentant une HRB asymptomatique en comparaison à un groupe de sujets asthmatiques et de normoréacteurs, sur une période de trois ans. Des biopsies bronchiques ont été prélevées chez dix sujets dans chaque groupe (hyperréacteurs, asthmatiques et normoréacteurs) à l'année 1 et répétées dans le groupe des hyperréacteurs (8 sujets) à l'année 3, permettant ainsi d'observer les altérations de la structure bronchique sur une période de deux ans au sein de ce groupe. L'analyse des biopsies permet de noter que des changements structuraux et inflammatoires existaient déjà au niveau des voies aériennes des sujets avec une HRB asymptomatique quoique moindres que ce que l'on retrouve chez les sujets asthmatiques. Quatre des dix sujets hyperréacteurs fortement atopiques et exposés aux allergènes auxquels ils sont sensibilisés ont développé des symptômes d'asthme. Leur biopsies montraient une augmentation de la fibrose sous-épithéliale et du nombre de cellules inflammatoires dans la muqueuse bronchique était évidente. Ces travaux (chapitres 4 et 5) sont d'une importance capitale puisqu'ils offrent une description détaillée des étapes du développement de l'asthme symptomatique, qu'ils permettent de cibler la population à haut risque de développer cette affection et ainsi, permettent de suggérer des mesures préventives.

J'ai participé à l'élaboration du protocole expérimental, au recrutement, à l'évaluation des volontaires et à l'analyse immunohistologique. Ma contribution se concrétise également par la compilation, l'analyse des résultats et la rédaction de l'article scientifique pour des fins de publication.

Les bronchoscopies et les biopsies bronchiques ont été faites par le Dr Michel Laviolette. Madame Michèle Bélanger a fixé les biopsies bronchiques dans le GMA et la paraffine, elle a ensuite fait les coupes et monté les lames histologiques. Le Dr Boutet a supervisé les analyses immunohistochimiques. Le Dr Louis-Philippe Boulet a assuré la direction des travaux et a effectué, avec l'aide précieuse du Dr Michel Laviolette, les corrections et la mise au point de cet article scientifique.

TITLE: **Asymptomatic airway hyperresponsiveness:
Relationships with airway inflammation and
remodeling.**

AUTHORS: Catherine Laprise, M.Sc.¹
 Michel Laviolette, MD, FRCP(C)¹
 Michel Boutet, MD, Ph.D., FRCP(C)²
 Louis-Philippe Boulet, MD, FRCP(C)¹

ADDRESS: Unité de recherche,
 ¹Centre de Pneumologie de l'Hôpital Laval
 ²Laboratoire de Pathologie de l'Hôpital Laval
 Université Laval, Sainte-Foy, Québec.

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE:
 Dr. Louis-Philippe Boulet
 Hôpital Laval
 2725, Chemin Ste-Foy, Sainte-Foy
 Québec, Canada, G1V 4G5
 Tel: (418) 656-4747
 Fax: (418) 656-4762
 EMAIL: MEDLPB@HERMES.ULAVAL.CA

KEY WORDS : Airway hyperresponsiveness, asthma, atopy,
 immunoglobulin E.

RÉSUMÉ

Visant à mieux définir la physiopathologie de l'hyperréactivité bronchique (HRB) asymptomatique, nous avons comparé les caractéristiques cliniques et les paramètres immunohistopathologiques de 10 sujets avec HRB asymptomatique (8 femmes et 2 hommes, sans symptôme respiratoire et présentant une CP_{20} méthacoline < 8 mg/ml), à celles de 10 sujets asthmatiques, pairés pour l'âge, le sexe et la CP_{20} méthacoline, et 10 sujets non-asthmatiques, non-atopiques (groupe témoin), pairés pour l'âge et le sexe. Un suivi de ces paramètres à également été fait sur une période de deux ans pour les sujets avec une HRB asymptomatique. Lors de l'évaluation initiale, la valeur moyenne d'éosinophiles sanguins, des IgE sériques, de l'index atopique, du VEMS et du niveau de desquamation bronchique observée au sein du groupe de sujets avec une HRB asymptomatique était similaire aux valeurs observées dans le groupe de sujets asthmatiques. Les biopsies bronchiques de sujets avec une HRB asymptomatique présentaient une fibrose sous-épithéliale focalisée (alternance de régions épaissies et de régions minces) comparativement à l'uniformité de la fibrose observée dans les biopsies de sujets asthmatiques. Dans les biopsies bronchiques de sujets avec une HRB asymptomatique, les nombres de cellules positives pour les CD3, CD4, CD25, EG1 et EG2 évalués au niveau de la muqueuse bronchique étaient intermédiaires aux nombres retrouvés dans les groupes témoin et asthmatique. Après un suivi de deux ans, quatre des dix sujets avec une HRB asymptomatique ont développé des symptômes associés à l'asthme. À ce stade, les biopsies bronchiques des sujets avec une HRB asymptomatique présentaient une augmentation et une distribution uniforme de la fibrose sous-épithéliale ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules positives pour les CD25 et CD4 conjointement à une diminution des $CD8^+$, et ce particulièrement chez les sujets ayant développé des symptômes d'asthme. L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'HRB asymptomatique est associée à

un certain degré d'inflammation et de remodelage des voies aériennes et que l'augmentation de certains paramètres tels la fibrose sous-épithéliale et le changement du rapport CD4/CD8, sont associés au développement des symptômes d'asthme. Ainsi, cette étude permet de clarifier les interrelations entre l'HRB asymptomatique, l'inflammation des voies aériennes, les changements structuraux et le développement d'un asthme symptomatique.

ABSTRACT

To study the physiopathology and significance of asymptomatic airway hyperresponsiveness (AHR), we compared clinical and bronchial immunohistological parameters of subjects with asymptomatic AHR (8W/2M, no respiratory symptoms, $PC_{20} \leq 8\text{mg/ml}$ and no treatment) evaluated over a 2-year period with those of asthmatic subjects paired for age, gender and methacholine PC_{20} , and with those of nonatopic, nonasthmatic controls paired for age and gender. At first evaluation, the mean blood eosinophil count, total serum IgE level, atopic index, baseline FEV_1 and the degree of bronchial epithelial desquamation of the asymptomatic AHR subjects were similar to those of asthmatic subjects. However, they presented a focal fibrosis, rather than the continuous bronchial subepithelial fibrosis observed in asthmatics. Their mucosal CD3, CD4, CD25, EG1 and EG2 positive cell counts were intermediate between controls' and asthmatics' values. At the end of the 2-year follow-up, four of them had developed asthma symptoms. At this time, bronchial biopsies revealed an increase in the extent of subepithelial fibrosis and in the number of CD25 and CD4 positive cells, and a decrease in the number of CD8⁺ cells, particularly in subjects who developed asthma symptoms. These data suggest that asymptomatic AHR is associated with airway inflammation and remodeling, and that the appearance of asthma symptoms is associated with an increase in these features, particularly CD4/CD8 ratio and airway fibrosis. Consequently, this study proposes an association between asymptomatic AHR and airway inflammation, structural changes and asthma.

INTRODUCTION

Airway hyperresponsiveness (AHR), a characteristic feature of asthma, describes the tendency of the bronchi to narrow too much and too easily in response to provocative stimuli.^{1,2} However, the relationship between AHR and respiratory symptoms is not always strong: about 50% of subjects with AHR report no respiratory symptoms.^{1,3} AHR may precede asthma and seems to be a risk factor in the development of this disease in children.⁴ The clinical significance of asymptomatic AHR and its relationship with asthma remain, however, to be further documented. Previous studies showed that, in first-degree relatives with asthma, the prevalence of AHR may exceed 75% and persist for several years without symptoms,⁵⁻⁷ suggesting a familial trait.⁸ A significant association between the degree of airway responsiveness and the severity of atopy was also found in nonasthmatic atopic subjects.^{9,10} Cockcroft and coworkers¹¹ found that 9.2% of young atopic nonasthmatic adult subjects presented AHR, while Braman and associates¹² reported AHR in 40% of nonasthmatic subjects with rhinitis (aged 12 to 54 years). In a recent study,¹³ we observed that 4 out of 28 of the asymptomatic AHR subjects (age mean = 31.6 ± 2.8 years) developed asthma symptoms over a 3-year period. These four subjects were exposed to allergens to which they were sensitized (high atopic score) and had at least one first-degree relative with asthma, suggesting that atopy and heredity were implicated in the development of asthma symptoms.

Airway inflammation is considered to be the main pathogenetic mechanism of asthma.¹⁴ Compared to those of normal subjects, bronchial biopsies of asthmatics typically show mucosal oedema, desquamation of the epithelium, subepithelial fibrosis, and infiltration by mast cells, eosinophils and lymphocytes.¹⁵ In this regard, several studies using bronchial biopsies to explore basic mechanisms leading to asthma showed signs of damage to the

surface epithelium,^{16, 17} subepithelial fibrosis^{17, 18} and an increase in the number of airway wall inflammatory cells early in the evolution of the disease.^{17, 19, 20} In addition, immunohistological studies showed increased activation of lymphocytes and eosinophils, suggesting that these cells play an important role in the inflammatory and structural changes observed.²⁰⁻²²

Although the role of inflammation in the development of asthma symptoms seems well established, the importance of resulting structural changes is also increasingly recognized. The situation, however, is more controversial with asymptomatic AHR. Power and colleagues previously reported that there was no evidence of airway inflammation in subjects with asymptomatic AHR.²³ However, some of these subjects may show a progressive increase in airway responsiveness and may develop asthma symptoms. It is possible that these asymptomatic subjects already had some airway inflammation and remodeling and that a progression of these early processes will eventually result in the development of symptomatic asthma.

It was therefore of interest to look at airway inflammatory and structural changes in our group of subjects with asymptomatic AHR, specifically in relation to atopy and heredity. The purpose of this study was to evaluate the presence of airway inflammation and/or remodeling in asymptomatic AHR, and the evolution of these three components over time.

METHODS

Subjects

A total of 30 subjects volunteered for this study. First, ten subjects with asymptomatic AHR were recruited from a cohort of twenty-eight subjects with

asymptomatic AHR identified during a recent study on the prevalence of AHR and atopy in families of asthmatic subjects, compared with control families.¹³ Ten subjects with asymptomatic AHR (2M, 8W) who agreed to have bronchoscopies with bronchial biopsies were enrolled in this study; 5 of these were highly atopic and 5 nonatopic. All denied any past symptoms suggestive of asthma (including recurrent cough) and had a provocative concentration of methacholine inducing a 20% fall in forced expiratory volume in one second ($PC_{20} FEV_1$) ≤ 8 mg/ml. They had had no respiratory infection in the month preceding this study.

A second group of subjects with current mild symptoms of asthma ($n = 10$), receiving only intermittent inhaled bronchodilator, was recruited from the Laval Hospital asthma clinic; these were matched for PC_{20} , age and gender to the subjects with asymptomatic AHR. Asthmatic subjects were stable at the time of the study and had not used inhaled corticosteroids in the previous 3 months. In the month preceding this study, they had had neither respiratory infection nor asthma exacerbation.

A control group of 10 subjects, also matched for age and gender to asymptomatic AHR subjects, was also studied. Selection criteria for this group were: $PC_{20} \geq 20$ mg/ml, no current or past symptoms suggesting asthma or other respiratory disease, no medication and no respiratory infection in the prior month.

The study was approved by the Laval Hospital Ethics Committee and all subjects signed informed consent forms.

Definitions

Asthma was defined according to the criteria suggested by the American Thoracic Society.²⁴ We defined asymptomatic AHR as a $PC_{20} < 8$ mg/ml in the absence of symptoms suggestive of asthma in subjects who never required any asthma medication.²⁵ Atopy was defined as the presence of at least one positive response (wheal diameter ≥ 3 mm at 10 minutes) to skin-prick tests with a battery of 26 common airborne allergens.²⁶

Design

All three groups of subjects were evaluated once at baseline (first visit). The asymptomatic AHR subjects were reevaluated at the end of one- and two-year periods in February-March (in order to avoid the pollen season), repeating the same tests as on baseline evaluation. Bronchoscopy was performed at the baseline evaluation in each group and repeated at the end of second year follow-up in the asymptomatic AHR group.

Clinical evaluation

Expiratory flows were measured with a Vitalograph PFT II spirometer according to ATS recommendations.²⁷ The best of 3 forced expiratory volume curves was used to determine forced vital capacity (FVC) and FEV_1 . Bronchodilator response was measured as the increase in FEV_1 , 15 min after 200 μ g of inhaled salbutamol.

Subjects underwent skin-prick tests with a battery of airborne allergens divided into six main categories: animal danders, dust, housedust mite, tree pollen, grass pollen and molds. The atopic index was the number of aeroallergen

categories (0 to 6) to which the subject showed at least one positive response. Immunoenzymofluorometry was used to measure serum IgE, and blood eosinophils were counted on a Coulter STKS (Coulter STKS, Hialeah, Florida.).

Methacholine inhalation tests were carried out according to the method described by Juniper and colleagues²⁸ The results were expressed as the PC₂₀ by intrapolation from the dose-response curve.

Bronchoscopy and bronchial biopsies

Before the bronchoscopy, asthmatic subjects received a 200 µg dose of inhaled salbutamol via a metered-dose inhaler. For all subjects, the procedure was done with supplement to oxygen given at 5 l.min⁻¹ by nasal catheter. After local anesthesia with 2 % and 4 % xylocaine, a flexible bronchoscope (Olympus OES 10 fiberscope, Olympus, Optical Go Ltd, Japan) was introduced into the bronchial tree and tissue samples were taken from the carinae of lobar and segmental bronchi using conventional forceps. Vital signs, electrocardiograph and oximetry were recorded throughout the procedure.

Histology

Tissue processing

For histological analysis, biopsies were fixed in phosphate-buffered formalin, dehydrated in alcohol and embedded in paraffin. Four-micron-thick sections were stained with hematoxyline-eosin (H-E), Giemsa and Weigert-Masson trichrome.

Electron microscopy

Samples for electron microscopy analysis were fixed by immersion in Karnovsky's fluid, washed in cacodylate buffer, osmicated, dehydrated in alcohol and embedded in Epon.²⁹ Half of the samples were treated "en bloc" with uranyl acetate. All sections were stained with lead citrate and analyzed using a Jeol 100 CX electron microscope. Electron microscopic studies evaluated cellular alterations of epithelial and connective tissue cells as well as the presence of myofibroblasts; they were also used to assess degranulation of eosinophils and mast cells. No counts were made from electron microphotographs.

Immunochemistry

Tissue processing

Biopsies were immediately placed in acetone containing the protease inhibitors phenylmethylsulfonyl fluoride (2 mM) and iodoacetamide (2 mM) (Sigma Chemical. Co, St-Louis, MI, USA) and cooled rapidly to -20°C. They were then immersed in acetone at room temperature for 15 min and transferred to methylbenzoyl for another 15 min. Thereafter the biopsies were immersed in glycolmethacrylate (GMA) monomer (Polyscience, Warrington, PA, USA) at 4°C for 7 h. During this time, the GMA solution was changed 3 times. Finally, bronchial biopsies were embedded in GMA resin prepared by mixing GMA monomer and N, N-dimethylalanine in PGE 400 and benzol peroxide, and polymerized overnight at 4°C.³⁰ Samples embedded in GMA were stored at -20°C in an airtight container. Two µm sections were cut on an ultramicrotome (Leica Reichert Ultracut S, Austria) and floated on water containing 0.02 % ammonia until fixed on poly-L-lysine-coated slides.³¹

Immunohistochemical staining

The following monoclonal antibodies (dilutions) were used: CD4 (1/25), CD8 (1/50) (Becton Dickinson, San Jose CA); CD3 (undiluted), CD25 (1/25), HLA-DR (1/200), CD45 (1/100), CD45Ro (1/50) (DAKO from Dimension Laboratories, Mississauga, Ont); EG1 (1/100), EG2 (1/200) (Kabi Pharmacia Diagnostics, Baie D'Urfé, Canada); AA1 (1/400) (Kindly provided by Dr Stephen T. Holgate, Southampton). Expression of these markers (monoclonal antibody staining) was detected by the avidine biotine complex (ABC method) using amino ethyl carbazole (AEC) as chromogen (Vectastain Elite ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Briefly, samples were blocked for background peroxydase activity with 0.3 % H₂O₂ and 1 % sodium azide in tris buffer saline (TBS) for 30 min and blocked with normal serum for 30 min. The samples were then incubated overnight with primary antibody (4°C), 1 h with a biotinylated secondary antibody (23°C) and 30 min with the ABC method (23°C). The slides were washed 3 times between each step with TBS. Revelation was made with AEC substrate until coloration was visible on the microscope. Reaction was stopped by washing in water, and Mayer hematoxylin was used for counterstaining. Slides were mounted with Crystal mount (Biomedex, Foster City, CA). Negative controls were included in each staining run by omission of the primary antibody.

Cell quantification

Biopsy area was measured with a calibrated image analyzer (Mocha image analysis Software: Jandel Scientific, San Raphael, California), and tissue cell counts were expressed per square millimeter of subepithelial connective tissue excluding smooth-muscle cells and mucous glands. Cells were counted only if nuclei were present, as previously described.³¹

Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm SEM values for FEV₁, atopic score and blood eosinophil counts. Total serum IgE level and PC₂₀ were expressed as the geometric mean \pm SEM. If PC₂₀ was >256 mg/ml, it was considered to be 256 mg/ml for analysis. In the asymptomatic AHR group, the change in number of double concentrations of PC₂₀ was calculated with the following formula: $\Delta PC_{20} = \log_{10} PC_{20}$ at year 1 - $\log_{10} PC_{20}$ at year 3 / $\log_{10} 2$. For continuous variables, a one-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare mean values between groups of subjects. In order to identify significant differences between groups of subjects -asymptomatic AHR, asthma and control- we compared means using Scheffe's method. We analyzed paired results (at one and three years) using a repeated measures design. Categorical variables were analyzed with Fisher's exact test to determine the association between various variables. All tests were performed at 0.05 level of significance.

RESULTS

Subjects' characteristics

Asymptomatic AHR subjects were aged 18 to 52 years (mean = 25.1 ± 3.2) and, as determined by inclusion criteria, had methacholine PC₂₀ similar to asthmatic subjects (geometric mean PC₂₀ = 3.6 ± 1.1 mg/ml and 3.0 ± 1.1 mg/ml, respectively). Their mean atopic index was similar to the one of asthmatic groups (2.8 ± 0.8 mg/ml and 3.6 ± 0.8 mg/ml respectively, Table 5.1). Six asymptomatic AHR subjects were currently exposed to domestic animals (3 to cats, 2 to dogs and one to cat and dog). Five (50 %) of those had positive allergic skin tests to indoor allergens (house dust, cat hair-epithelium, dog hair-danders and *Dermatophagoides farinae*) and the mean of atopic index for those five

subjects was: 4.7 ± 0.6 . Three of these five subjects were also sensitized to outdoor allergens (mixed trees, mixed grasses and/or ragweed pollens). These five subjects, unlike the other asymptomatic AHR subjects, had a family history of asthma and atopy.

Mild asthmatic subjects were aged 20 to 52 years (mean = 26.4 ± 3.2). They had normal expiratory flows (mean $FEV_1 = 89.1 \pm 4.5$ % of pred.) (Table 5.1). Six (60 %) had positive allergic skin-prick tests to housedust mite and five of these to animal danders and tree, grass and/or ragweed pollens. The mean atopic index of these subjects was 5.3 ± 0.3 . All had a family history of atopy and nine had a first-degree relative with asthma. None was exposed to animals.

Normal controls were aged 19 to 51 years (mean = 25.9 ± 2.7) and had a geometric mean PC_{20} of 104.5 ± 1.7 mg/ml (Table 5.1). None had a family history of asthma or atopy, and 7 were exposed to domestic animals.

Comparative histopathological analysis

Airway histological changes

On light microscopy, bronchial biopsies of the control group showed normal pseudostratified ciliated epithelial cells with goblet cells and basal triangular cells. Epithelial cells were regularly distributed, and had numerous ciliae (mean % epithelial desquamation = 17.7 ± 3.5). The basement membrane was thin (mean value = 4.4 ± 0.1 μ m) and a few scattered inflammatory cells; mostly lymphocytes, eosinophils and mast cells, were observed in subepithelial connective tissue. No subepithelial fibrosis could be observed in control subjects (Figure 5.1A). Electron microscopy of the epithelial layer (Figure 5.1E) showed numerous ciliae at the apical portion of cylindrical cells. Numerous goblet cells were present and the basement membrane was thin and devoid

of reticulo-collagen fibers (subepithelial fibrosis). Lymphocytes were sparse, and eosinophils and non-degranulated mast cells were rarely seen.

Biopsies of asthmatic subjects showed epithelial desquamation (mean epithelial desquamation of 54.4 ± 3.7 %), but basal cells remained attached to basement membrane (Figure 5.1B). Subepithelial fibrosis was noted in asthmatic subjects as shown by a regular deposition of collagen fibers under the basement membrane (mean thickness = 7.0 ± 2.2 μm). Oedema of connective tissue was associated with vascular congestion and an inflammatory cell infiltrate, mostly of lymphocytes (Figure 5.1B). On electron microscopy analysis, the remaining cylindrical cells presented decreased formation of ciliae, swollen mitochondriae and dilatation of smooth endoplasmic reticulum. Mast cells and eosinophils were often seen and were frequently degranulated.

In the asymptomatic AHR group, the mean percent epithelial desquamation was similar to the asthmatic group (54.7 ± 4.6 % and 54.4 ± 3.7 %, respectively). Subepithelial fibrosis was observed, although it was focal and irregularly distributed; however, due to the presence of normal zones alternating with thicker zones, the apparent thickness of basement membrane was not statistically different from that of normal controls, with mean values of 4.6 ± 0.1 μm and 4.4 ± 0.1 μm , respectively ($p > 0.05$). The histological appearance of airway subepithelial area was similar to normal controls in regard to the number of inflammatory cells (Figure 5.1C). On electron microscopy, the basement membrane and subepithelial connective tissue were, most of the time, similar to control subjects, although we noted a focal fibrosis. A correlation was found between PC_{20} methacholine and % epithelial desquamation ($r_s = -0.8$, $p = 0.0001$) in this group.

Airway inflammation: immunohistochemical analysis

Biopsies of subjects with asymptomatic AHR showed increased numbers of CD3⁺, CD8⁺ and CD25⁺ T lymphocytes and of eosinophils (EG1⁺ and EG2⁺) compared with normal controls (Figure 5.2). The CD4/CD8 ratio of asymptomatic AHR subjects (0.9 ± 0.3) was lower than the one observed in asthmatic (2.8 ± 0.9 , $p = 0.07$) and in normal control subjects (4.7 ± 1.3 , $p = 0.003$). The subjects with asymptomatic AHR did not differ significantly from controls in regard to number of AA1, HLA-DR, CD45 or CD45Ro positive cell counts. In the asymptomatic AHR group, the mean CD45Ro⁺ and CD8⁺ cell counts were higher in atopic than in nonatopic subjects (CD45Ro⁺ : 110.4 ± 15.0 and 49.7 ± 13.0 , respectively [$p = 0.02$], CD8⁺ : 54.4 ± 10 and 13.9 ± 2.7 , respectively [$p = 0.004$]).

Asymptomatic AHR subjects: follow-up

Clinical and physiological parameters

At 2-year follow-up, four out of 10 subjects with asymptomatic AHR had developed asthma symptoms, including wheezing and exercise-induced cough in all 4, and wheezing and chest tightness when exposed to relevant allergens in 3. All four were atopic (mean atopic index = 5 ± 0.7 in asymptomatic AHR subjects who developed asthma symptoms, compared with 1.3 ± 0.9 in the others, $p = 0.02$), sensitized to indoor allergens and came from families with asthmatics. All asymptomatic AHR subjects who developed asthma symptoms were currently exposed to a domestic animal. Of the subjects in the asymptomatic AHR subgroup who did not develop asthma symptoms, only one was sensitized to indoor allergens, and this subject was exposed to an animal. In regard to the variability of the parameters in asymptomatic AHR subjects over the 2-year period, FEV₁ tended to decrease ($p = 0.07$), serum IgE levels

increased ($p = 0.03$) and airway responsiveness increased ($p = 0.002$) (Table 5.2). The asymptomatic AHR subjects who developed asthma symptoms ($n = 4$) had a higher reduction of the PC_{20} methacholine than those who did not ($\Delta PC_{20} = 2.7 \pm 1.3 \mu\text{g/ml}$ and $1.4 \pm 1.2 \mu\text{g/ml}$, respectively, $p = 0.04$) (Figure 5.3).

Airway histological changes

As one subject refused the second bronchoscopy at year 2, a total of nine asymptomatic AHR subjects completed the study. After 2 years, asymptomatic AHR subjects who developed asthma symptoms showed an airway morphological appearance similar to that of the asthmatic subjects; the extent of epithelial desquamation was then similar in these two groups: $54.7 \pm 4.6 \%$ and $60.7 \pm 3.5 \%$, respectively ($p = 0.2$). Subepithelial fibrosis increased from a mean thickness of $4.6 \pm 0.1 \mu\text{m}$ to $5.9 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ($p = 0.001$) and became uniformly distributed (Figure 5.1D). This increase in subepithelial fibrosis was closely associated with the atopic status. In fact, this increase in subepithelial fibrosis went respectively from $4.5 \pm 0.4 \mu\text{m}$ to $6.5 \pm 0.6 \mu\text{m}$ ($p = 0.002$) for atopic asymptomatic AHR, compared with $4.3 \pm 0.2 \mu\text{m}$ to $5.2 \pm 0.5 \mu\text{m}$ ($p = 0.12$) for nonatopic asymptomatic AHR ($p = 0.06$). Furthermore, this increase in subepithelial fibrosis was correlated with the reduction in PC_{20} methacholine ($r_s = 0.78$, $p = 0.03$, Figure 5.4A). Inflammatory cells were numerous in the airway wall connective tissue and eosinophils and mast cells were often degranulated (see immunohistochemistry for quantification). On electron microscopy, the remaining epithelial cells showed incomplete cilia genesis (Figures 5.1D and 5.1F). Many cells were completely devoid of cilia. Compared to control subjects (Figure 5.1E), mitochondrial swelling was evident as well as dilatation of smooth endoplasmic reticulum (Figure 5.1F). Subepithelial fibrosis was also obvious.

Airway inflammation: immunohistochemistry

In the asymptomatic AHR group, the numbers of CD4⁺ and CD25⁺ cells increased significantly over the 2-year period ($p < 0.05$), whereas CD8⁺ cell counts decreased ($p = 0.06$, figure 5.5). CD4/CD8 ratio increased from 0.9 ± 0.3 to 2.1 ± 0.5 ($p = 0.06$). The number of EG1⁺ and EG2⁺ eosinophils also increased ($p = 0.07$ and $p = 0.08$, respectively), whereas AA1⁺, HLA-DR⁺, CD45⁺, CD45Ro⁺ cell counts were unchanged over the 2-year follow-up.

The changes in CD4⁺, CD25⁺ and CD8⁺ observed over follow-up were more pronounced in subjects developing symptoms of asthma who also presented a significant increase of CD3⁺ cells (Figure 5.5). The concomitant increase of CD4⁺ cells and decrease of CD8⁺ cells in the subjects who developed asthma symptoms resulted in a significant increase of the CD4/CD8 ratio from 0.3 ± 0.1 to 3.8 ± 0.5 ($p = 0.01$), and this ratio became similar to the one observed in the asthmatic group (3.8 ± 0.5 and 2.8 ± 0.9 , respectively, $p = 0.52$). This ratio did not change in the subjects who did not develop asthma symptoms (1.2 ± 0.5 to 0.9 ± 0.2 ; $p = 0.47$). Furthermore, in the nine subjects who had two bronchoscopies, we observed a correlation between the degree of change in PC₂₀ methacholine and the increase in CD4/CD8 ratio ($r_s = 0.75$, $p = 0.03$, Figure 5.4B).

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study evaluating changes in bronchial immunohistological parameters before and after the appearance of asthma symptoms in a group of subjects at high-risk of developing symptomatic asthma: those with asymptomatic AHR. At the initial evaluation, these asymptomatic AHR subjects had evidence of mild airway inflammatory and structural changes similar in nature to those observed in asthmatic subjects, although of a lesser magnitude. Their bronchial biopsies showed epithelial

damage, increased number of activated lymphocytes and eosinophils, and focal deposition of collagen under the epithelial basement membrane suggesting an active airway remodeling process. Over the 2-year follow-up, four out of ten subjects developed asthma symptoms. Compared with the 6 subjects who did not develop asthma symptoms, they presented a greater increase in numbers of bronchial mucosa CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺ cell counts and subepithelial fibrosis, and a greater reduction in numbers of CD8⁺ cells and PC₂₀ methacholine. Interestingly, these phenomena occurred in subjects who were sensitized and continuously exposed to indoor allergens and who came from asthmatic families.

Airway inflammatory and structural changes have been observed in very mild asthma and asthma-related conditions. Beasley and colleagues¹⁹ reported an increased infiltration of the mucosa by inflammatory cells in subjects with mild allergic asthma, and even in some with little or no current asthma symptoms. Djukanovic and coworkers³² demonstrated that bronchial inflammation and fibrosis occurred in atopic subjects without overt clinical asthma. Chakir and associates^{33, 34} reported an elevation in inflammatory CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45Ro⁺, EG1⁺ and IL-5⁺ numbers and focal subepithelial fibrosis in nonasthmatic subjects with allergic rhinitis during natural allergen exposure. In this study, the asymptomatic AHR subjects, matched for the degree of airway responsiveness to asthmatic subjects, had increased epithelial desquamation, subepithelial deposition and numbers of inflammatory cells, especially eosinophils and lymphocytes, compared with normal control subjects. The histological features were relatively close to the ones previously described in nonasthmatic atopic subjects without, or with only, borderline AHR,³⁴ and they were less intense than those observed in asthmatics.

Azzawi and coworkers²⁰ and, more recently, Sont and colleagues³⁵ showed that the degree of airway responsiveness to methacholine was closely related to

the numbers of activated eosinophils, mast cells, and lymphocytes in bronchial biopsy specimens of atopic asthmatic subjects treated with inhaled corticosteroids. However, other authors found no correlation between AHR and airway cellular infiltrate in asthmatic subjects.³⁶⁻⁴⁰ In our subjects with asymptomatic AHR, we found no association between the inflammatory cell counts and the degree of AHR. This however does not eliminate the possibility that airway inflammation is a significant determinant of AHR.

On the other hand, Laitinen and associates¹⁶ proposed that the epithelial damage could contribute to the development of AHR. Jeffery and colleagues⁴¹ found an association between the intensity of epithelial damage and AHR. A similar association was observed in our asymptomatic AHR group. We recently reported a correlation between the extent of subepithelial fibrosis and the presence of AHR in groups of subjects with asthma and related diseases,⁴² suggesting that another aspect of airway remodeling, airway fibrosis, was a potential determinant or marker of a process that leads to the development of AHR.^{42,43} At baseline, in asymptomatic AHR subjects, we found no correlation between the degree of AHR and that of the observed focal subepithelial fibrosis.

The asymptomatic AHR subjects with atopy had an higher bronchial CD45Ro⁺ cell counts than nonatopic asymptomatic AHR subjects at baseline; this supports a previous finding by Ackerman and coworkers,⁴⁴ which observed an increase of memory T-cells in atopic subjects. The atopic asymptomatic AHR subjects also had an higher number of CD8⁺ cells (Figure 5.2). Azzawi and colleagues²⁰ reported a predominance of CD4⁺ over CD8⁺ cells in the subepithelial area of asthmatic, nonasthmatic atopic and control biopsies, as we observed in our control and asthmatic groups. Gonzalez et associates,⁴⁵ however, observed a low CD4/CD8 ratio in the bronchoalveolar lavage of single early responders compared to dual (early and late) responders after allergen challenge. Their results suggested that CD8⁺ cells could prevent the

development of the late-phase reactions by a mechanism yet to be defined. These observations suggest the possibility that an increase in CD8⁺ cell counts in asymptomatic AHR subjects may prevent, at least temporarily, or minimize, the cascade of events leading to the development of symptomatic asthma.

This hypothesis is further strengthened by the fact that subjects with asymptomatic AHR who developed asthma symptoms presented a significant increase of inflammatory cells with a decreased number of CD8⁺ cells, their CD4⁺/CD8⁺ ratio becoming similar to the one of the asthmatic group. Hence, the development of asthma symptoms in subjects with asymptomatic AHR appears to be associated with a specific modification in T-cell subsets, although the mechanisms involved in these changes remain unclear. The appearance of asthma symptoms was also temporarily associated with an increased of AHR and subepithelial fibrosis. Consequently, it seems plausible that the increased collagen deposition underneath the basement membrane may potentiate airway narrowing in response to a stimulus or prevent reflex bronchodilatation after maximal inspiratory manoeuvre.⁴⁶ It seems possible that in subjects with a genetic predisposition, the presence of atopy and continuous exposure to indoor allergens modifies the inflammatory process, increasing inflammatory cells (particularly CD4⁺ lymphocytes and eosinophils), decreasing CD8⁺ lymphocytes, inducing structural changes and progressive collagen deposition and enhancing AHR (Figures 5.4A and B).

We cannot rule the role of intercurrent viral infections in the changes in the lymphocytes sub-population observed in our subjects. There is now epidemiological and clinical evidence to suggest that viral infections are involved in asthma pathophysiology.⁴⁷ In vitro, Coyle and colleagues⁴⁸ demonstrated that IL-4 combined with viral peptide stimulation could switch the cytokine profile of CD8⁺ from INF- γ to IL-5 production. The production of IL-5 by lung CD8⁺

would amplify eosinophil infiltration into the airway and eventually induce asthma symptoms, as suggested previously by Hamid and associates⁴⁹ and Alwan and coworkers⁵⁰. The role of viral infection in this setting should therefore be further explored.

In our study, the importance of atopy and allergen exposure in the development of asthma is further stressed by the fact that the only atopic subject in the asymptomatic AHR subgroup who did not develop asthma symptoms after two years presented PC₂₀ fall and inflammation changes similar to those found in the subjects who did develop asthma symptoms (Figure 5.5). He was also sensitized, and exposed on a daily basis, to indoor allergens. These data seem to suggest that this subject will develop clinical asthma in the near future. Although the follow-up is short, we did not observe appearance of asthma symptoms among nonatopic subjects who had first-degree relatives with asthma. However, these subjects could develop asthma symptoms over a longer follow-up. They probably present other genetic and/or environmental predisposing factors to developed AHR and eventually asthma symptoms.

A major strength of this study is the fact that the subjects with asymptomatic AHR with and without atopy were evaluated over a 2-year follow-up before and after four of them developed asthma symptoms. Although the number of subjects is not large, we could nevertheless observe significant modifications of clinical, physiological and histological parameters, allowing us to evaluate the potential role of airway inflammation and structural changes in the development of symptomatic asthma. These results have major clinical relevance, as they identify the basic mechanisms involved in asymptomatic AHR and in the development of symptomatic asthma in atopic subjects with asymptomatic AHR.

In conclusion, airway inflammation and airway remodeling were observed in bronchial biopsy specimens of asymptomatic AHR subjects. This inflammation is characterized by eosinophil and T-lymphocyte infiltration. Atopy and familial history of asthma are associated with a higher risk of developing symptomatic asthma over a short-term follow-up, and this supports earlier findings on the role of these environmental and genetic factors in the pathogenesis of asthma. The mechanisms by which this asymptomatic phase of AHR becomes overt symptomatic asthma remain to be documented, but the associated increased inflammatory cell infiltrate and subepithelial fibrosis over the years suggest that these bronchial alterations are involved in this phenomenon. Further studies are needed to define the role of the cells and mediators involved in these changes. This study moreover suggests that in asymptomatic AHR subjects with atopy and a familial history of asthma, preventive measures, such as avoidance of sensitizing substances, may reduce airway inflammation and prevent the increase in airway remodeling; as a result, such measures may well prevent the development of symptomatic asthma in this subgroup. Further works should be done to determine the influence of such measures on the natural history of asthma.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all subjects for their participation in this study. We especially acknowledge the nurses for collaboration in gathering blood samples and helping with the bronchoscopies. Catherine Laprise was supported by the "Fonds pour la formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) du Québec."

REFERENCES

1. Woolcock AJ : What is bronchial hyperresponsiveness from the clinical standpoint? *In* C.P. Page, P.J. Gardiner, editors. Airway hyperresponsiveness : is it really important for asthma? (chapter 1) Blackwell Scientific Publication, Oxford, 1993.
2. Hargreave FE, Thompson NC, O'Byrne PM, Latimer K, Juniper EF, Dolovich J : Bronchial responsiveness to histamine in asthma : measurement and clinical significance. *J Allergy Clin Immunol* 1981, 63 : 347-55.
3. Cockcroft DW, Berscheid BA, Murdock KY : Unimodal distribution of bronchial responsiveness to inhaled histamine in a random population. *Chest* 1983, 83 : 751-754.
4. Hopp RJ, Townley RG, Biven RE, Bewtra AK, Nair NM : The presence of airway reactivity before the development of asthma. *Am Rev Respir Dis* 1990, 141 :2-8.
5. Hoop RJ, Bewtra AK, Nair NM, Biven R, Townley RG : Pattern of methacholine-induced bronchial reactivity in siblings of asthmatic subjects. *Pediatr Asthma Allergy Immunol* 1987, 1: 103-109.
6. Hopp RJ, Bewtra AK, Biven R, Nair NM, Townley RG : Bronchial reactivity pattern in nonasthmatic parents of asthmatics. *Ann Allergy* 1988, 61: 18406.

7. Hopp RJ, Brennan B, Degan J, Biven RE, Bewtra AK, Townley RG : Longitudinal measurement of nonspecific bronchial hyperresponsiveness in non-allergic children and adolescents. *Pediatr Allergy Immunol* 1992, 3: 84-90.
8. König P, Godfrey S : Prevalence of exercise-induced bronchial lability in families of children with asthma. *Arch Dis Child* 1973, 48: 513-8.
9. Salob SB, Lavery A, Atherton DJ : Bronchial hyperresponsiveness in children with atopic dermatitis. *Pediatrics* 1993, 91: 13-6.
10. Muller BA, Leick CA, Smith RM, Suelzer MT, Richerson HB : Comparisons of specific and non-specific bronchoprovocation in subjects with asthma, rhinitis, and healthy subjects. *J Allergy Clin Immunol* 1993, 91: 758-72.
11. Cockcroft DW, Murdock KY, Berscheid BA : Relationship between atopy and bronchial responsiveness to histamine in a random population. *Ann Allergy* 1984, 53: 26-9.
12. Braman SS, Burrows AA, DeCotiis BA, Settupane GA, Corrao WM : Airway hyperresponsiveness in allergic rhinitis : a risk factor for asthma. *Chest* 1987, 91: 671-74.
13. Laprise C, Boulet L-P : Asymptomatic airway hyperresponsiveness : a 3-year follow-up. *Am J Respir Crit Care Med* 1997, 156: 1-7.
14. Hargreave FE, Ramsdale EH, Kirby JG, O'Byrne PM : Asthma and the role of inflammation. *Eur J Respir Dis* 1986, 69 (suppl 147): 16-21.

15. Reid LM, Gleich GJ, Hogg J, Kleineremann J, Laitinen LA : Pathology. *In* : Holgate ST, ed. The role of inflammatory process in airway responsiveness. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1989, pp. 36-79.
16. Laitinen LA, Heino M, Laitinen A, Kava T, Haahtela T : Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. *Am Rev Respir Dis* 1985, 131: 559-606.
17. Jeffery PK, Wardlaw AJ, Nelson FC, Collins JV, Kay AB : Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 1989, 140: 1745-53.
18. Roche WR, Beasley R, William JH, Holgate ST : Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* 1989, 1: 520-3.
19. Beasley R, Roche WR, Roberts JA, Holgate ST : Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. *Am Rev Respir Dis* 1989, 139: 806-17.
20. Azzawi M, Bradley B, Jeffery PK, Frew AJ, Wardlaw AJ, Knowles G, Assoufi B, Collins JV, Durham S, Kay AB : Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. *Am Rev Respir Dis* 1990, 142: 1407-13.
21. Kay AB : Asthma and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 1991, 87 : 893-910.

22. Walker C, Virchow JC Jr, Bruijnzeel PLB, Blaser K : T cell subsets and their soluble products regulate eosinophilia in allergic and non-allergic asthma. *J Immunol* 1990, 146 : 1829-36.
23. Power CS, Streenan B, Hurson C, Burke LW. Poulter : Distribution of immunocompetent cells in the bronchial wall of clinically healthy subjects showing bronchial hyperresponsiveness. *Thorax* 1993, 48: 1125-1129.
24. American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. *Am Rev Respir Dis* 1987, 136 : 225-244.
25. Malo JL, Pineau L, Carrier A, Martin RR : Reference values of the provocative concentrations of methacholine that cause 6% and 20% changes in forced expiratory volume in one second in a normal population. *Am Rev Respir Dis* 1983, 128 : 8-11.
26. Sub-Committee on skin tests of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. Skin tests used in type I allergy testing. Position paper. *Deborgs, Ed. Allergy* 1989, 44 Suppl. : 1-59.
27. American Thoracic Society. Standardization of spirometry. *Am J Respir Crit Care Med* 1994, 152 : 1107-1136.
28. Juniper E, Cockcroft DW, Hargreave FE : Histamine and methacholine inhalation tests : Tidal breathing method. Laboratory procedure and standardization. Canadian Thoracic Society. AB Draco, Lund, Sweden, 1991.

29. Karnovsky MJ : A formaldehyde-glutaraldehyde fixative for high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 1965, 27: 137A.
30. Britten KM, Howarth PH, Roche WR : Immunochemistry on resin sections : A comparison of resin embedding. *Technique for mucosal biopsies. Biotech Histochem* 1993, 68: 271-80.
31. Boulet LP, Turcotte H, Boutet M, Laviolette M : Influence of antigenic exposure on expiratory flows, methacholine responsiveness and airway inflammation in mild allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1993, 91: 883-93.
32. Djukanovic R, Lai CKW, Wilson JW, Britten KM, Wilson SJ, Roche WR, Howarth PH, Holgate ST : Bronchial mucosal manifestations of atopy : a comparison of markers of inflammation between atopic asthmatics, atopic nonasthmatics and healthy controls. *Eur Respir J* 1992, 5: 538-44.
33. Chakir J, Boutet M, Laviolette M, Boulet L-P. Airway inflammation and IL-5 production in bronchial mucosa of nonasthmatic subjects with allergic rhinitis. *Allergy* 1996 (Suppl. 30): 94.
34. Chakir J, Laviolette M, Boutet M, Laliberté R, Dubé J, Boulet L-P. Lower airways remodeling in nonasthmatic subjects with allergic rhinitis. *Lab Invest* 1996, 75: 1-10.
35. Sont JK, Van Krieken JHJM, Evertse CE, Hooijer R, Willems LNA, Sterk PJ : Relationship between the inflammatory infiltrate in bronchial biopsy specimens and clinical severity of asthma in patients treated with inhaled steroids. *Thorax* 1996, 51: 496-502.

36. Djukanovic R, Roche WR, Wilson JW, Beasley CR, Twentyman OP, Howarth RH, Holgate ST : Mucosal inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1990, 142: 434-57.
37. Bradley BL, Azzawi M, Jacobson M, Assoufi B, Collins JV, Irani AM, Schwartz LB, Durham SR, Jeffery PK, Kay AB : Eosinophils, T lymphocytes, mast cells, neutrophils, and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects with asthma : comparison with biopsy specimens from atopic subjects without asthma and normal control subjects and relationship to bronchial hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 1991, 88: 661-74.
38. Djukanovic R, Wilson JW, Britten KM, Wilson SJ, Walls AF, Roche WR, Howarth PH, Holgate ST : Quantitation of mast cells and eosinophils in the bronchial mucosa of symptomatic atopic asthmatics and healthy control subjects using immunohistochemistry. *Am Rev Respir Dis* 1990, 142: 863-71.
39. Lozewicz S, Gomez E, Fergusson H, Davies RJ : Inflammatory cells in the airways in mild asthma. *Brit Med J* 1988, 297: 1515-6.
40. Ollerenshaw SL, Woolcock AJ : Characteristics of the inflammation in biopsies from large airways of subjects with asthma and subjects with chronic airflow limitation. *Am Rev Respir Dis* 1992, 145: 922-7.
41. Jeffery PK, Wardlaw AJ, Nelson FC, Collins JV, Kay AB : Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 1989 ; 140 : 1745-53.

42. Boulet LP, Laviolette M, Turcotte H, Milot J, Côté J, Cartier A, Dugas M, Malo JL, Boutet M : Bronchial subepithelial fibrosis correlates with airway responsiveness to methacholine. *Chest* 1997. *in press*.
43. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, White R, Vic P, Godard P, Michel FB. Asthma : A disease remodeling the airways. *Allergy* 1992; 47: 3-11.
44. Ackerman V, Marini M, Vittori E, Bellini A, Vassali G, Mattoli S. Detection of cytokines and their cell sources in bronchial biopsy specimens from asthmatic patients : relationship to atopic status, symptoms, and level of airway hyperresponsiveness. *Chest* 1994; 105: 687-696.
45. Gonzalez MC, Diaz P, Galleguillos FR, Ancic P, Cromwell O, Kay AB. Allergen-induced recruitment of bronchoalveolar helper (OKT4) and suppressor (OKT8) T-cells in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136: 600-604.
46. Skloot G, Permutt S, Togias A. Airway Hyperresponsiveness in Asthma: A Problem of Limited Smooth Muscle Relaxation with Inspiration. *J Clin Invest*. 1995: 2393-2403.
47. Calhoun WJ, Reed HE, Stevens CA, Busse WW. Experimental rhinovirus 16 infection potentiate airway inflammation only in allergic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: A147.
48. Coyle JA, Erard F, Bertrand C, Walti S, Pircher H, Le Gros G. Virus-specific CD8+ cells can switch to interleukine 5 production and induce airway eosinophilia. *J Exp Med* 1995: 181: 1229-33.

49. Hamid Q, Azzawi M, Ying S, Moqbel R, Wardlaw AJ, Corrigan CJ, Bradley B, Durham SR, Collins JV, Jeffrey PK, et al. Expression of mRNA for interleukin-5 in mucosal biopsies from asthma. *J Clin Invest* 1992; 87: 1541-46.
50. Alwan WH, Kozłowska WJ, Openshaw PMJ. Distinct types of lung disease caused by functional subsets of antiviral T cells. *J Exp Med* 1994; 179: 81-9.

FIGURES LEGENDS

Figure 5.1

Histopathological features of bronchial biopsies

A-D : Light micrographs (Weigert-Masson trichrome, original magnification X 375). **A.** Biopsy from a normal control subject showing a pseudostratified ciliated epithelium with goblet cells. Note a thin subepithelial collagen layer in blue (arrow). Inflammatory cells are very few. **B.** Biopsy of asthmatic patient showing desquamated epithelial cell recovered with mucous material. The arrow indicates a thick layer of subepithelial fibrosis in blue. The subepithelial connective tissue is oedematous and contains numerous inflammatory cells, mainly lymphocytes. Two congested capillaries are observed. **C.** Biopsy of asymptomatic AHR subject showing epithelial cells covering a subepithelial fibrosis layer of variable thickness (arrow). The subepithelial area shows few inflammatory cells and little oedema. **D.** Biopsy of the same asymptomatic AHR subject (C) 2 years later. Note the epithelial cell desquamation, a thick and regular subepithelial collagen layer (arrow) and subepithelial oedema with inflammatory cells. There is a deposition of collagen fibers around smooth muscle cells. **E and F** : Electron micrograph (Lead citrate and uranyl acetate, original magnification X 2700). **E.** Biopsy of normal control subject with numerous ciliated cells (small arrow) and goblet cells (large arrow). Note normal mitochondria. **F.** Biopsy of the same asymptomatic AHR subject (D)(2 years biopsy) showing impaired cilia genesis with basal corpuscles devoided of ciliae (small arrow). Note the dilatation of smooth endoplasmic reticulum (large arrow).

Figure 5.2

Inflammatory cell counts in bronchial biopsies of normal control, asymptomatic AHR and asthmatic subjects. The number of cells is expressed per square millimeter of connective tissue (see method section). Atopic ○ and non-atopic ● subjects.

Figure 5.3

PC₂₀ methacholine at baseline and follow-up evaluations in asymptomatic AHR sub-groups : those who developed asthma symptoms and those who did not. Atopic ○ and non-atopic ● subjects.

* p values on comparison between baseline and year 2 follow-up for the 10 subjects.

† p values on comparison between baseline and 2 year follow-up in each sub-group, the ones without symptoms and those who developed asthma symptoms over the follow-up period.

Figure 5.4

Relationship between the increase in airway responsiveness and (A) airway subepithelial fibrosis and (B) variation of CD4/CD8 ratio over the 2-year follow-up. Atopic ○ and non-atopic ● subjects. One subject did not agree for a second bronchoscopy.

Figure 5.5

Inflammatory cell counts in bronchial biopsy of asymptomatic AHR subjects at baseline and follow-up. One subject did not complete study (in subgroup which developed asthma symptoms). Atopic ○ and non-atopic ● subjects.

* p values on comparison between baseline and year 2 follow-up for the 9 subjects.

† p values on comparison between baseline and 2 year follow-up in each subgroup. The ones without symptoms and those who developed asthma symptoms over the follow-up period.

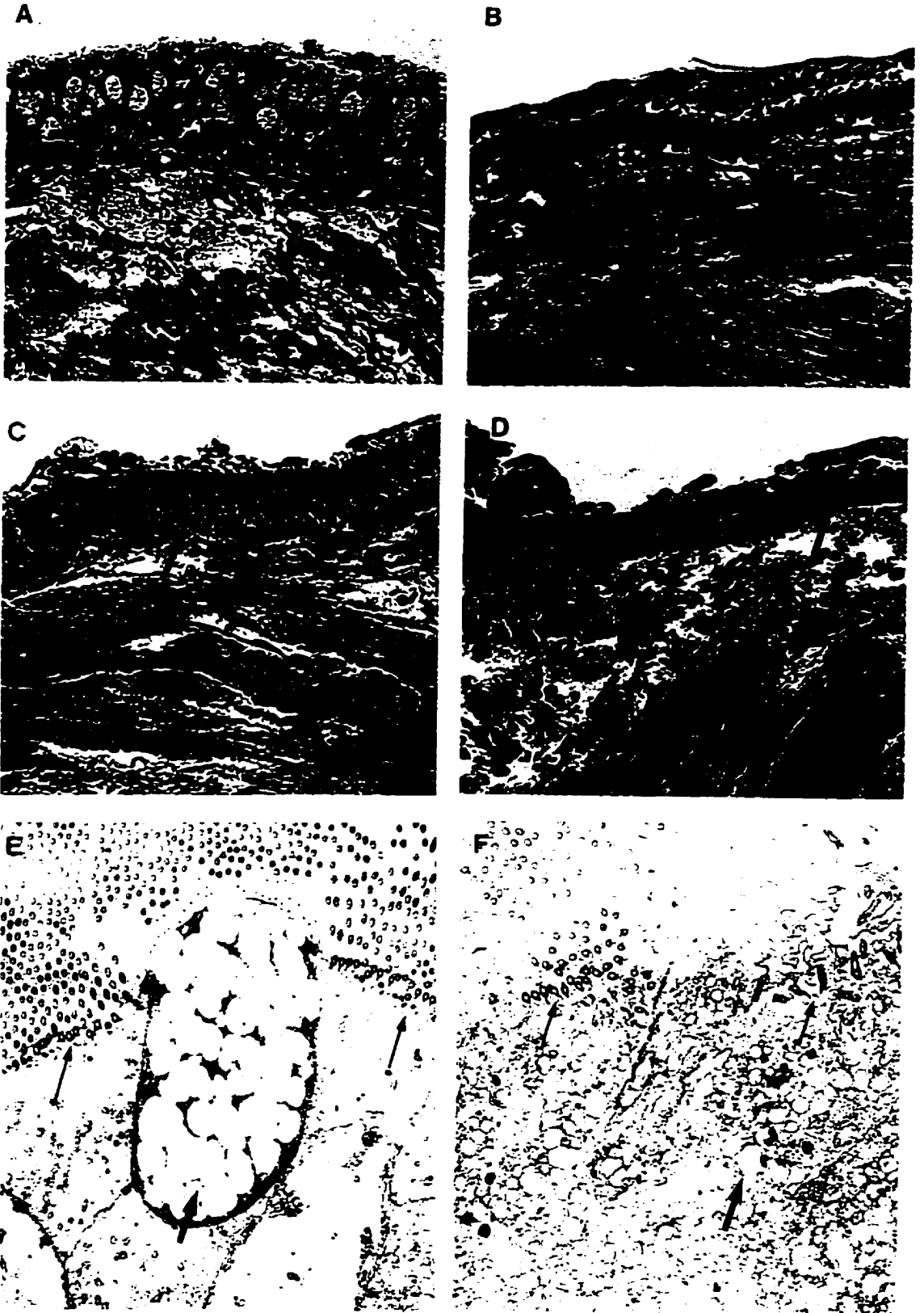


Figure 5.1

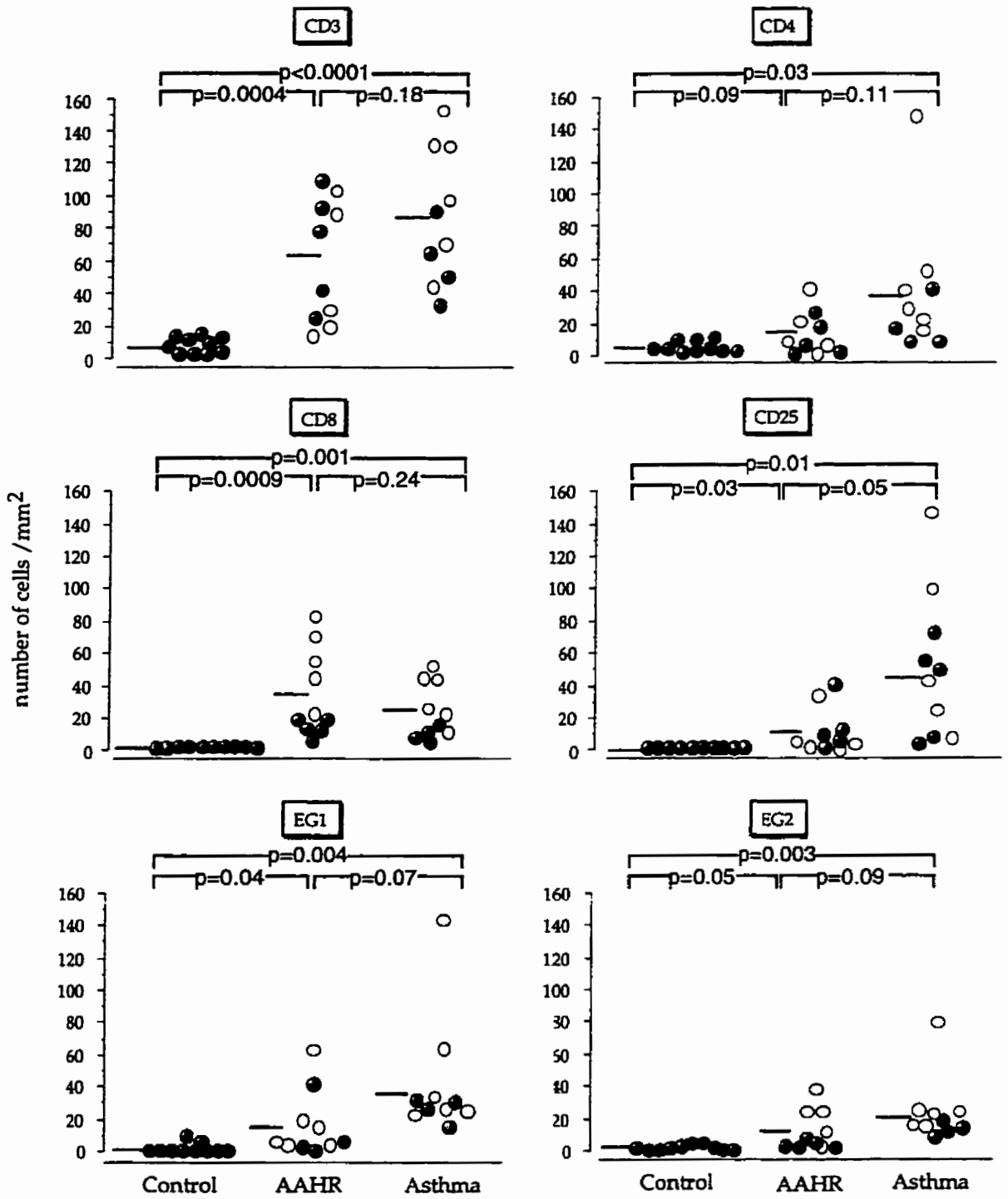


Figure 5.2

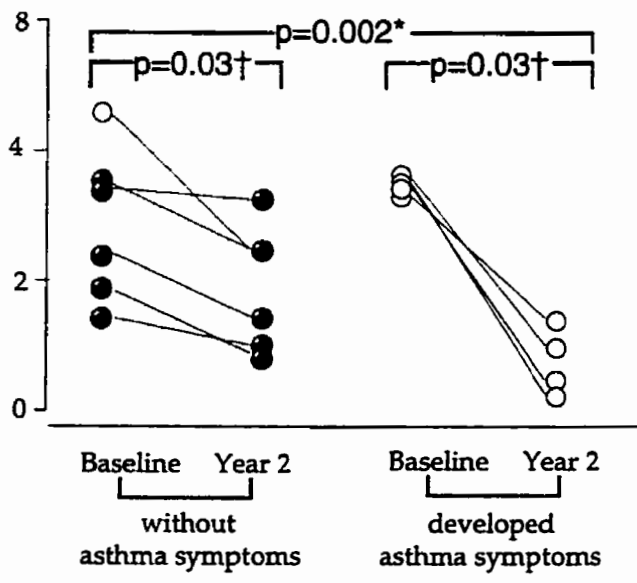


Figure 5.3

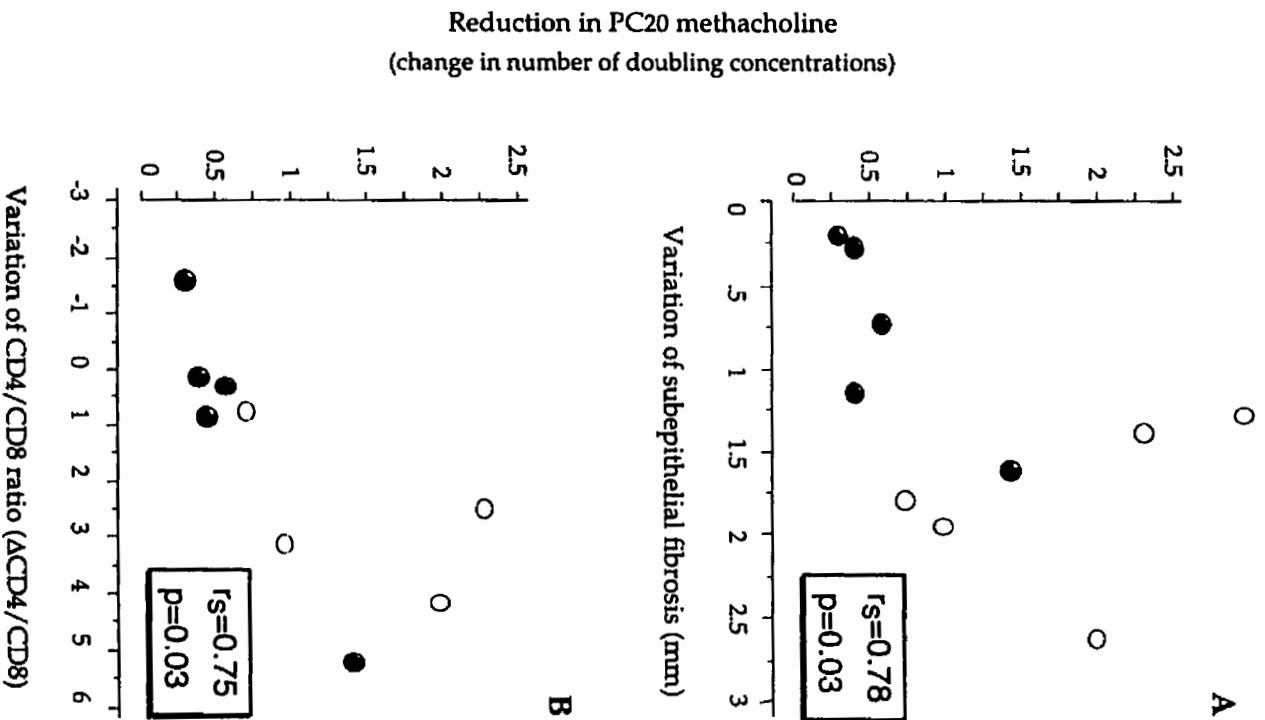


Figure 5.4

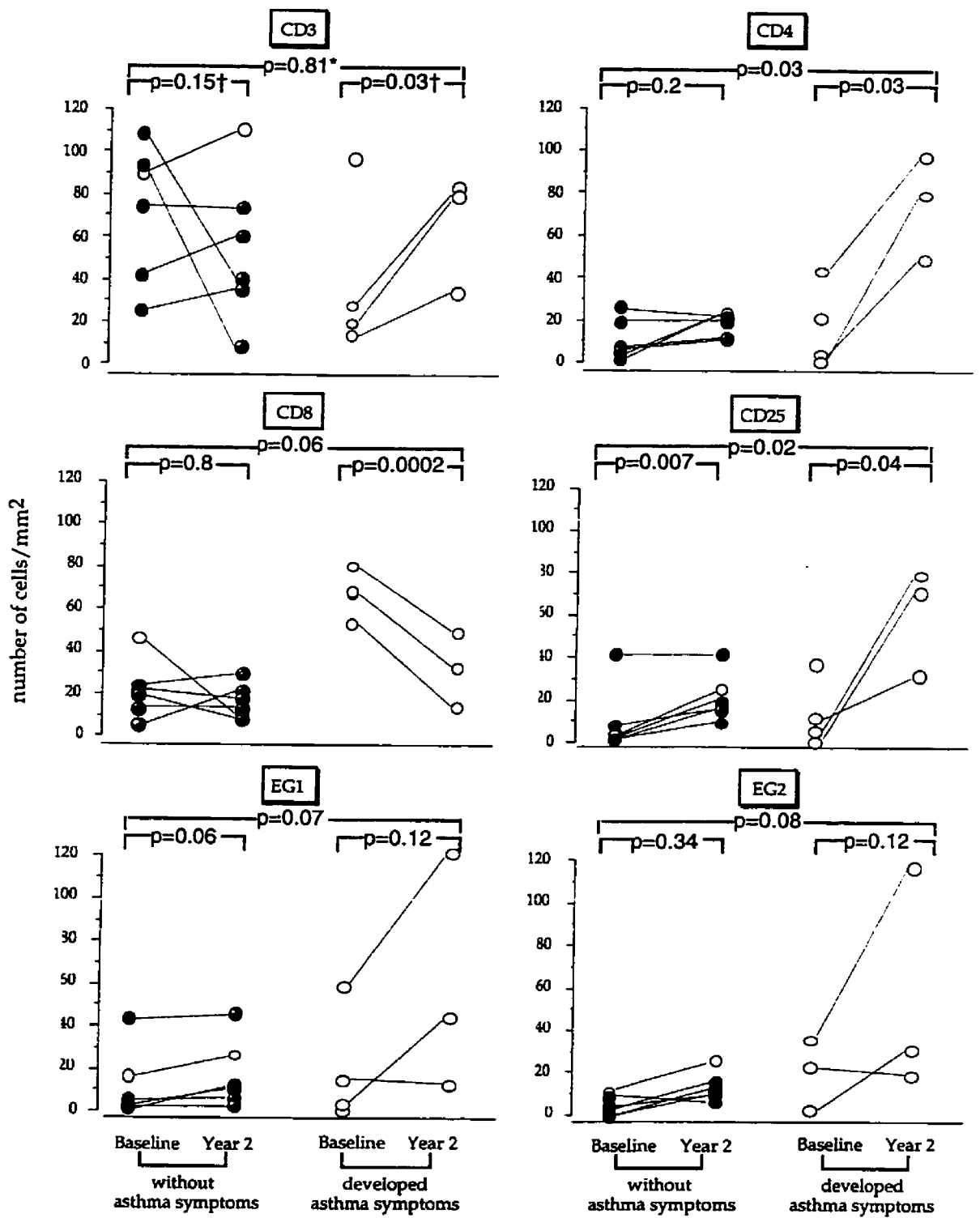


Figure 5.5

Table 5.1

Subjects' characteristics

Groups	Gender (F/M)	Age (years)†	Eosinophils ($\times 10^9/L$)†	IgE ($\mu g/L$)‡	Atopic index (/6)†§	FEV ₁ (% pred)†	PC ₂₀ (mg/ml) ‡
Controls	8/2	26 ± 2.7	0.06 ± 0.02 ^a	25.7 ± 1.7 ^a	0 ± 0 ^a	107.3 ± 2.5 ^a	104.5 ± 1.7 ^a
AAHR*	8/2	25 ± 3.2	0.23 ± 0.04 ^b	178.7 ± 1.3 ^b	2.8 ± 0.8 ^b	95 ± 2.4 ^b	3.6 ± 1.1 ^b
Asthma	8/2	26 ± 3.2	0.20 ± 0.04 ^b	129.1 ± 1.3 ^b	3.6 ± 0.8 ^b	89.1 ± 4.5 ^b	3.0 ± 1.1 ^b

For group comparisons, values identified by a different letter are different ($p < 0.05$).

* Asymptomatic AHR

† Expressed as mean ± SEM

‡ Expressed as geometric mean ± SEM

§ Number of main categories of allergens presenting at least one positive response (total of 6 categories)

Table 5.2

Variability of the immunophysiological parameters in asymptomatic AHR group over the 2-year follow-up

	Eosinophils ($\times 10^9/L$)*	IgE ($\mu g/L$)†	Atopic index (/6)‡	FEV ₁ (% pred)*	PC ₂₀ (mg/ml)†
Baseline (n=10)	0.23 \pm 0.04	178.7 \pm 1.3	2.8 \pm 0.8	95 \pm 2.4	3.6 \pm 1.1
Year 2 (n=10)	0.33 \pm 0.11	257.0 \pm 1.3	2.8 \pm 0.8	92.1 \pm 1.9	2.0 \pm 1.2
p value	>0.05	0.03	>0.05	0.07	0.003

* Expressed as mean \pm SEM (n=10)

† Expressed as geometric mean \pm SEM

‡ Number of main categories of allergens presenting at least one positive response (total of 6 categories)

CHAPITRE 6

ASSOCIATION ENTRE L'ATOPIE, L'HYPERRÉACTIVITÉ BRONCHIQUE ET LE POLYMORPHISME GLU237GLY DE LA SOUS-UNITÉ β DU RÉCEPTEUR À HAUTE AFFINITÉ POUR LES IgE

Article soumis à l'American Journal of Human Genetics
(le 14 août 1997)

MISE EN CONTEXTE DE L'ÉTUDE ET CONTRIBUTION DES AUTEURS

Le but des travaux présentés dans ce chapitre était de vérifier s'il existe une association et une liaison entre l'atopie, l'HRB et certains polymorphismes de la sous-unité β du récepteur à haute affinité pour les IgE (Fc ϵ RI- β) au sein de la population québécoise. Ce travail, comportant une étude de type cas-témoin en plus d'une analyse familiale, a permis de déterminer que le polymorphisme Glu237Gly de Fc ϵ RI- β est un allèle de susceptibilité associé à l'expression phénotypique de l'atopie et de l'HRB. Il s'agit de la première étude du genre réalisée au sein de la population québécoise. De plus, il s'agit de la première étude sur la génétique de l'atopie et de l'asthme où l'évaluation du phénotype est clairement définie et évaluée par le même investigateur pour l'ensemble des personnes enrôlées.

Ma contribution à ces travaux a été de participer à la mise sur pied du protocole expérimental. J'ai effectué le recrutement, l'évaluation phénotypique (questionnaire, tests de fonction respiratoire, tests d'allergie et test à la métacholine, dosage des IgE sériques et des éosinophiles sanguins) et l'évaluation du génotype (test d'amplification polymérasique spécifique aux allèles : ARMS test) pour l'ensemble des volontaires. J'ai compilé les données recueillies, participé à l'analyse des résultats et rédigé l'article scientifique.

Monsieur Jean Morissette m'a dirigé dans l'analyse et la présentation des résultats en plus de réaliser les analyses de liaisons. Monsieur Éric Winstall a collaboré à la mise au point des conditions expérimentales pour les amplifications polymérasiques et a collaboré à la réalisation de la séquence génomique de certains échantillons d'ADN.

Le Dr Louis-Philippe Boulet a élaboré le protocole expérimental et révisé l'article scientifique. Le Dr Vincent Raymond a assuré la direction des travaux et il a effectué les corrections et la mise au point de l'article scientifique.

TITLE: Association and linkage between atopy, airway hyperresponsiveness and the Glu237Gly variant β subunit of the high-affinity receptor for immunoglobulin E in the French-Canadian population

RUNNING TITLE : Association between atopy, AHR and Glu237Gly Fc ϵ RI- β

AUTHORS: Catherine Laprise, M.Sc.¹
Louis-Philippe Boulet, MD¹
Jean Morissette, M.Sc.²
Éric Winstall, M.Sc.²
Vincent Raymond, MD, Ph.D.²

FROM: ¹Unité de recherche,
Centre de pneumologie de l'Hôpital Laval,
and
²Centre de recherche du CHUL;
Université Laval,
Sainte-Foy (Québec), Canada.

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE:

Louis-Philippe Boulet
Hôpital Laval
2725, Chemin Ste-Foy, Sainte-Foy
Québec, Canada, G1V 4G5

Tel: (418) 656-4747

Fax: (418) 656-4762

EMAIL: LPBOULET@med.ulaval.ca

Keys words = atopy, airway hyperresponsiveness, asthma, Fc ϵ RI- β

RÉSUMÉ

L'atopie est une affection définie par la tendance à produire des anticorps de type IgE contre des allergènes communs. De nombreuses études familiales, incluant également des études comparatives entre jumeaux monozygotes et dizygotes, ont démontré qu'il existe une prédisposition génétique au développement de l'atopie. En 1994, Shirakawa et ses collaborateurs (Shirakawa et coll. 1994) ont démontré qu'il y avait une association entre l'atopie et la sous-unité β du récepteur à haute affinité pour les IgE (Fc ϵ RI- β) située sur le chromosome 11. Ces derniers ont en fait observé une association significative entre l'atopie et la substitution d'une isoleucine par une leucine au résidu 181 (Ile181Leu) de Fc ϵ RI- β . Dans cette optique, ces mêmes chercheurs (Shirakawa et coll.) ont récemment démontré une association significative entre l'atopie et le polymorphisme Glu237Gly de Fc ϵ RI- β . Afin de valider ces associations entre l'atopie, l'hyperréactivité bronchique (HRB) et certains polymorphismes de Fc ϵ RI- β dans la population québécoise, nous avons effectué une étude cas-témoins et une analyse de liaisons. Fc ϵ RI- β a été évaluée pour l'ensemble des sujets par la méthode d'amplification spécifique aux allèles (ARMS). Parmi les 200 sujets caucasiens non apparentés inclus dans l'étude cas-témoins, quatre grandes familles ont été recrutées pour l'analyse de liaison ($n = 106$ sujets). L'évaluation du phénotype comportait des tests cutanés d'allergie, une provocation bronchique à la métacholine, le dosage des IgE sériques et le décompte des éosinophiles. Nos résultats démontrent que, pour la cohorte étudiée, la substitution Ile181Leu de Fc ϵ RI- β n'est pas associée de façon significative avec l'atopie. Cependant, parmi les 200 participants à l'étude cas-témoins, 22 sujets ont présenté le polymorphisme Glu237Gly de Fc ϵ RI- β dont 20 sujets atopiques (19 hétérozygotes et 1 homozygote) comparativement à 2 sujets (hétérozygotes) non atopiques avec un «odd ratio» de 12,25. Nos analyses familiales ont démontré une liaison significative entre l'HRB et le polymorphisme Glu237Gly de Fc ϵ RI- β ($Z_{\max} = 3.12$), et suggèrent également,

une association entre l'atopie et ce même polymorphisme ($Z_{\max} = 2.11$). Nos résultats suggèrent la présence d'un locus de susceptibilité pour l'atopie et l'HRB sur le chromosome 11q.

ABSTRACT

Following detection of linkage between atopy and microsatellite markers on chromosome 11q13, several studies in the British, Australian and Japanese populations observed an association between the disorder and two sequence variants of the β subunit of the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc ϵ RI- β), a candidate gene for asthma related-conditions co-localized within the same region. In many other ethnic groups, investigations failed, however, to replicate these observations. Due to the complexity in defining intermediate phenotypes associated with asthma, detection of such associations may have been hampered by clinical misclassifications. To assess whether the Fc ϵ RI- β gene was involved in atopy and airway hyperresponsiveness (AHR) in the French-Canadian population, we first conducted a case-control study in 200 subjects using strict criteria for asthma and related-conditions determined by allergy skin prick tests, total serum IgE level, total blood eosinophil count and methacholine challenge. The Ile181Leu and Glu237Gly Fc ϵ RI- β sequence variants were tested exploiting the amplification refractory mutation system. We report, herein, that no association was detected between atopy or AHR and the Ile181Leu Fc ϵ RI- β variant. However, a very strong association was observed between atopy and the Glu237Gly Fc ϵ RI- β variant in the French-Canadian population (odd ratio = 12.25). Four large Eastern Quebec families were next recruited to perform a genetic linkage study. We then observed presence of linkage between AHR and the Glu237Gly Fc ϵ RI- β variant (Z_{\max} = 3.12) and suggestive evidence of linkage between atopy and the same variant (Z_{\max} = 2.11). Our data support previous observations showing that the Glu237Gly Fc ϵ RI- β variant is associated with atopy. Furthermore, this study is the first to detect a linkage between AHR and the Glu237Gly variant. These findings strongly suggest the presence of a susceptibility locus for asthma related-

conditions on chromosome 11q13 in the French-Canadian population.

INTRODUCTION

Asthma is an heterogeneous disorder encompassing several symptoms and is characterized by increased responsiveness of the tracheobronchial tree to a variety of stimuli (airway hyperresponsiveness). Among these symptoms, we recognized paroxysms of dyspnea, wheezing, and cough, which may vary from mild and almost undetectable to severe and unremitting status asthmaticus (ATS 1987). Airway hyperresponsiveness (AHR) which may occur in asymptomatic individuals (Zhong *et al.* 1992), represents an important risk factor for the disorder (Laprise et Boulet 1997). A second risk factor in the development of asthma is atopy (Burrows *et al.* 1989) defined by the presence of positive responses to skin prick tests with common allergens and by an increase in total serum immunoglobulin E (IgE) level (Pepys 1973). It is not yet known whether atopy, AHR and asthma are variable expressions of the same primary defect or whether they represent common pathological pathways caused by distinct etiologies.

Twin, family and population studies have demonstrated evidence of genetic components implicated in susceptibility to either asthma and/or atopy (Edfors-Lubs 1971 ; Sibbald *et al.* 1980 ; Duffy *et al.* 1990). Many investigations recently reported linkage of AHR and atopy with several chromosomal regions (for a review see Sandford *et al.* 1996). Following demonstration of linkage between atopy and polymorphic markers located on chromosome 11q13 (Cookson *et al.* 1989), the β -subunit of the high affinity immunoglobulin E (IgE) receptor (Fc ϵ RI- β) gene, which was mapped within the same region, became a candidate gene for the disorder (Shirakawa *et al.* 1994). Indeed, the Fc ϵ RI- β is a tetrameric complex ($\alpha\beta_2$) found on the surface of mast cells (Stevenson *et al.* 1996) and basophils (Blank *et al.* 1989). The β chain contains four transmembrane segments and long cytoplasmic domains that are thought to play an

important role in intracellular signaling. The gene spans approximately 10 kilobases and contains seven exons (Küster et coll. 1992). Binding of allergen to receptor-bound IgE leads to cell activation and the release of mediators responsible for the manifestation of allergy (Küster et coll. 1992). Stimulation of this receptor on mast cells induces the release of interleukin-4 and other cytokines that may increase the synthesis of IgE and inflammatory processes (Plaut *et al.* 1989).

Shirakawa and colleagues (Shirakawa, Dubowitz et al. 1994) have identified a FcεRI-β variant harboring a two nucleotide substitution in the sixth exon of the gene, converting isoleucine 181 to leucine (Ile181Leu) within the fourth transmembrane domain of the receptor. In their study of the British population, the Ile181Leu variant was found in 15% of a random asthmatic patient sample compared to a value of 4.5% in the general population of Great Britain (Hill *et al.* 1995). The variant was maternally inherited in the asthmatic group and showed a significant association with atopy and AHR. This association between atopy and chromosome 11q13 was confirmed in a Japanese population (Shirakawa, Hashimoto *et al.* 1994; Hizawa *et al.* 1995). On the other hand, Duffy and coworkers (Dyffy *et al.* 1995) and Martinati and associates (Martinati *et al.* 1996) were unable to find the Ile181Leu mutation in the Australian and Italian populations, respectively.

A second coding variant of the FcεRI-β was recently identified in exon seven of the FcεRI-β gene (Hill et Cookson 1996). An adenine to guanine substitution resulted in a glutamic acid to glycine conversion at residue 237 (Glu237Gly), in the cytoplasmic tail of the protein. The Glu237Gly FcεRI-β variant was found in 5% of the Australian population suffering of atopy and AHR. In a subsequent study using a Japanese population and diagnostics of asthma made by local physicians, the Glu237Gly variant was found in 18% of asthmatic-atopic

subjects, and in 45% of the subjects with very high IgE level, compared to a value of 6% in the general population of Japan (Shirakawa *et al.* 1996).

These results showing that associations between atopy, AHR, and the Ile181Leu or Glu237Gly variants of the FcεRI-β may vary amongst different ethnic groups, further demonstrated genetic heterogeneity of the disorder, as previously suggested by many authors (for a review see Sandford *et al.* 1996). On the other hand, misclassification of asthma and/or asthma-related phenotypes may lead to positive or negative bias in the estimation of odds ratios and other measures of association (Rothman 1986).

The population of the province of Quebec is particularly well suited for genetic investigations. Due to social and linguistic reasons, this population has maintained for the last three centuries a demographic growth with minimal immigration and, until recently, a high birth rate with large sibships averaging 10-15 sibs per generation (Bouchard and De Braekeleer 1991, pp 281-321). We exploited this particularities to test for association and linkage between atopy and AHR and these two FcεRI-β sequence variants in the French-Canadian population. To counteract the discrepancies that may result from the lack of standardisation in the approaches used to classify atopy and/or AHR phenotypes (Weiss *et al.* 1996), we used strict criteria for asthma and asthma-related conditions determined by allergy skin prick tests, total serum IgE level, total blood eosinophil count and methacholine challenge. The present study showed an association between atopy and the Glu237Gly FcεRI-β variant and detected a linkage between AHR and the same mutation.

SUBJECTS, MATERIAL AND METHODS

Clinical assessment

All subjects were residents of the Quebec City metropolitan area aged 6 to 61 years (mean = 29 ± 4 years). Two groups of subjects were evaluated. A random sample of 100 patients with high atopic status paired for age and gender with 100 nonatopic subjects. After identification of subjects with Gly237 variant, the subjects' family was recruited, in total, 4 unrelated nuclear families comprising 106 subjects were included. The study was approved by our local ethics committee and all subjects confirmed their willingness to take part in this study and signed an informed-consent form.

Each persons completed a general questionnaire on respiratory health and family history of asthma and/or atopy. Atopy is defined as the presence of at least one positive response (wheal diameter ≥ 3 mm at 10 minutes) to skin-prick tests with a battery of 26 common airborne allergens by the Sub-committee on skin tests of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology (1989), in addition to a total serum IgE $> 280 \mu\text{g/ml}$. To assure proper phenotypic classification in our case-control study, we selected only patients who fulfilled our high atopic status inclusion criteria. These criteria were positive responses to skin-prick tests to 3 of the 6 allergens categories in addition to a total serum IgE level $> 280 \mu\text{g/ml}$. Subjects underwent skin-prick tests with a battery of airborne allergens which were divided into six main categories : animal danders, dust, housedust mite, tree pollen, grass pollen and molds. The atopic index was the number of aero-allergen categories (0 to 6) to which the subject showed at least one positive response. The atopic score was the cumulative of all positive responses in millimeters. The determination of

serum IgE was performed by immunoenzymo-fluorometry. Blood eosinophils were counted on a Coulter STKS (Coulter STKS, Hialeah, Fla.).

Asthma was defined according to the criteria suggested by the American Thoracic Society (ATS, 1987). We defined asymptomatic AHR as a concentration of methacholine provoking a 20% decrease in forced expiratory volume in one second (FEV_1) (PC_{20}) < 8 mg/ml in the absence of symptoms suggestive of asthma in subjects who never required any asthma medication (Laprise *et al.* 1997). Measurements of expiratory flows were done with a Vitalograph PFT II spirometer (Vitalograph Medical Instrumentation, Lenexa, Kan.) according to ATS recommendations (1987). The best of 3 forced expiratory volume curves was used to determine forced vital capacity (FVC) and FEV_1 . Bronchodilator response was measured 15 min after inhalation of 200 μ g of inhaled salbutamol. Peak expiratory flow rates (PEFRs) were measured with a mini-Wright peak-flow meter (Armstrong Medical, Scarborough, Ont.) in the morning and evening over a period of two weeks. Methacholine inhalation tests were carried out according to the method described by Juniper *et al.* (1991). Briefly aerosols were generated by a Wright nebulizer (Roxon Medi-Tech, Montreal, Que.) with an output of 0.13 mL per minute. After the initial control saline inhalation, subjects inhaled, by tidal mouth breathing for 2 minutes, concentrations of methacholine that doubled at intervals of 5 minutes, increasing from 0.03 to 256 mg/mL. The resulting percentage fall in FEV_1 was measured at 30 and 90 seconds, and then at 2-minute intervals, if necessary. The results were expressed as the PC_{20} , intrapolated from the dose response curve.

DNA testing

Twenty ml of blood were drawn by venipuncture in heparinized tubes from each person enrolled in the study. DNA was extracted using the guanidine

hydrochloride-proteinase K method (Jeanpierre 1987). Associations between atopy and the FcεRI-β 181 or 237 residue substitution were assessed using the amplification refractory mutation system (ARMS) (Newton et al. 1989). For testing the presence of the Ile181Leu variant of the FcεRI-β gene, the ARMS test was carried out as described by Shirakawa and colleagues (Shirakawa, Dubowitz *et al.* 1994). As positive control for the Leu181Ile sequence, ARMS was performed with DNA obtained from a person homozygote kindly provided by Dr. Cookson (Shirakawa, Dubowitz *et al.* 1994). Four primers were used to detect either Glu237Gly variant or its wild-type counterpart (Hill and Cookson 1996). The first two primers B7FA1 and B7FA2 amplified the control fragment giving a 446 bp band. The third primer, B7W2, was used to detect the wild-type sequence (280 bp band) in conjunction with primer B7FA1 whereas the fourth primer, B7M1, was used in conjunction with B7FA2 to detect the Glu237Gly variant giving a 238 bp band. PCR was performed in a Perkin Elmer Cetus DNA thermal cycler using a preliminary cycle (94°C denaturation for 5 min and a hot start at 80°C while adding taq), 35 cycles (94°C denaturation for 1 min, 60°C annealing for 2 min and 72°C extension for 2 min) and 1 cycle (72°C extension for 10 min). Amplification products were electrophoresed in 3% agarose gels before ethidium staining (run for two hours at 60V) and scoring by two independent observers. Genotyping and phenotyping were carried out in a randomized double blind fashion. The atopy phenotype was evaluated prior to the ARMS test. All DNA samples were coded. The ARMS analysis was performed in duplicate with positive and negative controls. The presence of the FcεRI-β Glu237Gly variant was tested and confirmed by DNA sequencing in 5 atopic subjects and in at least one subject in each family, except in the family of the homozygote where all first degree relatives were sequenced.

Data analysis

Phenotypes and genotypes were entered in Statview database (version 4.51) for Macintosh. Results were expressed as mean \pm SEM values for FEV₁, variability of PEF, atopic score and eosinophil counts. Total serum IgE level and PC₂₀ were expressed as the geometric mean \pm SEM. Significance was accepted at the 95% level. Odds ratio and ANOVA were calculated using the Statview database (version 4.51). For linkage analysis, data were transferred from Macintosh to a Sun Sparc 4 workstation on an Ethernet network, using the unix Appleshare server CAP. Linkage computation was done with FASTLINK (version 3.0P) (Cottingham *et al.* 1993; Schaffer *et al.* 1994), a optimized C version of the LINKAGE PACKAGE (Lathrop and Lalouel 1984; Lathrop *et al.* 1985). Z_{\max} and θ_{\max} were estimated by the lodscore program using an autosomal dominant model and one liability class. Penetrance of atopy and AHR for linkage analysis was adjusted to the prevalence of these diseases in French-Canadian population : 12% for AHR (Boulet *et al.* 1989) and at 25% for atopy (Holford *et al.* 1984). We used the same allelic frequency for Glu237Gly variant of the FcεRI-β gene as that observed in one Australian population (0.05) (Shirakawa *et al.* 1996). An odds ratio and its 95% confidence interval were calculated as a measure of the strength of association.

RESULTS

Association between atopy, AHR and the Glu237Gly FcεRI-β variant

It is well recognized that penetrance of atopy varies with age, with a peak of incidence between 20 and 45 years of age (Barbee 1987 ; Boulet *et al.* 1996). To assure maximum expression of the disease in our population, we therefore recruited 100 French-Canadian unrelated subjects (41W/59M), aged between

18 and 35 (mean = 27 ± 2 years) who fulfilled our inclusion criteria for high atopic status. They were paired for age and gender with 100 non-atopic unrelated individual. All subjects were non-smokers.

Twenty-five atopic subjects had a diagnosis of asthma in comparison to none in the non atopic subjects ($p < 0.0001$). Fourteen atopic subjects had asymptomatic AHR, compared to 10 in the nonatopic group ($p = 0.5$). A significantly greater degree of AHR was found in the atopic group (geometric mean of PC_{20} of 12.7 ± 1.2 mg/ml) as compared to the non atopic control group (geometric mean of PC_{20} of 30.9 ± 1.1 , $p < 0.0001$). As expected, in the atopic group, mean value of serum IgE level was higher than that observed in the non atopic control group (611 ± 82.6 μ g/l and 53 ± 7.1 μ g/l respectively, $p < 0.0001$), as was the mean blood eosinophil count ($0.3 \pm 0.02 \times 10^9$ /l and $0.1 \pm 0.01 \times 10^9$ /l respectively, $p < 0.0001$). There was no significant difference in regard to FEV_1 and bronchodilator response. In atopic subjects, sensitization to allergens was, in decreasing order of prevalence, 85% to housedust, 71% to animal danders, 57% to housedust mite, 42% to tree pollens, 36% to grass pollens and 22% to molds.

We first assessed for an association between atopy and the Ile181Leu $Fc\epsilon RI-\beta$ variant. Out of the 200 participants who were tested, none harbored the 181Leu allele. To confirm these results, we sequenced genomic DNA obtained from five severe atopic subjects. None carried the polymorphism. On the other hand, the Glu237Gly $Fc\epsilon RI-\beta$ variant was found in 20 of our 100 atopic subjects (20%). Only 2 of 100 nonatopic subjects (2%) have this mutation, this give an odd ratio (OR) of 12.25. Interestingly, one of these carriers was homozygous for this variant (Figure 6.2A) and, as depicted on Table 1, this mutant homozygote displayed a clinical status of atopy and asthma that was clearly more severe than his/her heterozygotic counterparts. As expected, heterozygotic subjects

had a higher airway responsiveness and a significantly greater degree of atopy than normal individuals who carried the Glu237 allele on both chromosomes with respective values of $3.7 \pm 1.3 \mu\text{g/ml}$ and $25.6 \pm 1.1 \mu\text{g/ml}$ for PC₂₀ methacholine, and 4.4 ± 0.4 and 1.9 ± 0.2 for the atopic index.

Table 2 gives the relative risk of atopy associated with the Glu237Gly FcεRI-β variant and exposure to animal danders. In our case-control group of subjects exposure to animal danders represented a low risk to develop atopy (OR= 1.19). The presence of the Glu237Gly FcεRI-β variant increased the risk to develop atopy by an odd ratio of 10.29. When subjects harboring the Glu237Gly variant were exposed to allergens, this odd ratio increased even more to a value of 15.43. These results clearly demonstrated that the association of the Glu237Gly variant with exposure to animal danders greatly increased the risk to develop atopy in our French-Canadian population.

Linkage studies

The four families including a total of 106 persons participated in our genetic linkage studies (Figure 6.2). These persons were aged between 6 to 61 years old (mean = 30 ± 4 years). In children below age 12 (n = 5 children), the asthma phenotype was determined by a respiratory questionnaire, mean daily of PEFs fluctuation and medical history. Methacholine test was performed on persons aged above 12 years. Twenty-seven (25.5%) subjects had the asthma phenotype, fifty-one (48.1%) were atopic and six (5.7%) had asymptomatic AHR (Figure 6.1). In atopic subjects, sensitization to allergens was, in decreasing order of prevalence to housedust (88%), animal danders (80%), house dust mite (78%), tree pollens (72%), grass pollens (52%) and molds (11%). As shown in Figure 6.1, airway hyperresponsiveness and atopy appeared to segregate in these families as an autosomal dominant trait with 35% of subjects carrying the Glu237Gly variant of the FcεRI-β. This was confirmed by DNA sequencing

of at least one subjects in each family (Figure 6.2B). No members in these kindreds harbored the Ile181Leu variant of the FcεRI-β. We observed a total of 14 (54%) affected sib pairs who shared their maternal allele. Fourteen persons (52%) shared their paternal allele (Figure 6.1).

A two-point linkage analysis were done using the computer program LODSCORE to estimate the maximum value of recombinaison frequency and its corresponding lod score. As atopic and AHR did not manifest a clear pattern of expressivity, we assumed only one liability class. Penetrance value of the Glu237Gly FcεRI-β variant in our atopic population was estimated at 76%, as 29 persons out of 38 carriers of the variant were affected by the disorder. In the AHR individuals, this value was estimated at 55%, as only 21 subjects out of 38 carriers were diagnosed AHR. The phenocopy rate was evaluated at 22% and 9% for atopy and AHR, respectively, as we found 20 atopic subjects and 15 AHR subjects who did not harbor the Glu237Gly variant in these families. The results of the two-point linkage analysis for the Glu237Gly variant to the AHR phenotype showed a maximal lod score (Z_{\max}) value of 3.12 ($\theta_{\max} = 0$). The lod score values for atopy and positive skin prick test to animal danders were respectively measured at 2.11 and 2.30 ($\theta_{\max} = 0$). These results clearly demonstrated linkage between the AHR condition and the Glu237Gly FcεRI-β variant and suggestive evidence of linkage between atopy and this same mutation.

DISCUSSION

In the present study, inheritance of the Glu237Gly variant of the FcεRI-β gene was found associated with an increased risk of having atopy as well as AHR, two asthma related-conditions. Regarding the atopic status, we also

demonstrated that the Glu237Gly variant was associated with sensitisation to animal danders.

The Oxford group on asthma research reported that the Ile181Leu variant of the FcεRI-β was associated with atopy in a British and an Australian population (Sirakawa, Dubowitz *et al.* 1994; Hill *et al.* 1995). In the Quebec population, however, the Ile181Leu mutation of the FcεRI-β is rare allele, as we have been unable to detect any carrier in the 200 subjects who participated in our case-control study.

Hill and colleagues (Hill *et al.* 1996) detected the Glu237Gly variant in 5.3% of Australian population sample (n= 1004 individuals). According to their results, the «odd ratio» of individuals with Glu237Gly having atopy and asthma compared to the subjects without the variant was 2.3. Interestingly, we found 20% of atopic subjects and 2% of non-atopic control subjects with the FcεRI-β Glu237Gly variant, therefore suggesting an even stronger association between this variant and atopy with an «odd ratio» of 12.25 in our case-control population. Furthermore, our results clearly show that the animal danders sensitization was associated with the Glu237Gly variant. In agreement with these findings, we have recently demonstrated that subjects with asymptomatic AHR sensitized to animal danders allergens recruited in asthmatic families have a much higher risk to develop asthma symptoms (Laprise *et al.* 1997).

Atopy is the strongest known risk factor for developing AHR and asthma. The details of how inflammation induced by exposure of a sensitized lung to allergens leads to AHR are yet not clear. However, it is well recognized that AHR can develop following natural allergen exposures (Cockcroft 1983; Laitinen and Laitinen 1991; Platts-Mills 1991). However, the distinction between genetic influences on sensitization to allergens and on AHR remains

unclear. A major strength of this study is the evaluation influence of genetic and environmental exposure on atopy phenotype.

In order to assess the segregation and linkage of atopy and AHR in family of subjects carrying the FcεRI-β Glu237Gly variant, four families were tested using ARMS. The families were characterized by severe atopy and respiratory symptoms (asymptomatic AHR and asthma). In each family, the transmission of airway hyperresponsiveness and atopic status occurred vertically suggesting autosomal dominant inheritance of the trait (Figure 6.1). Cookson and coworkers (Cookson *et al.* 1992), by counting alleles shared by affected sib-pairs, suggested that transmission of atopy at this locus was mainly through the maternal lineage. In the present study, we did not observe a significant difference between the alleles inherited from either the mother or the father in affected children.

Atopic individuals continuously exposed to allergens, and more specifically those exposed to animal danders are at risk of developing airway inflammation and subsequently AHR (Laprise *et al.* 1997). AHR is usually associated with symptomatic asthma, although it may occur without symptoms. However, overlap between the subsets of atopy and AHR (asthma-related conditions) in our cohort population may possibly confound genetic analysis. It is difficult to evaluate if the FcεRI-β variant is specifically associated with AHR or if our results only reflect the fact that a large proportion of hyperresponsive subjects are atopic (75%).

Atopy has a highly pleiotropic clinical expression, and the pattern of transmission is not completely understood. In our cohort, there is strong evidence of association between atopy and Glu237Gly variant of the FcεRI-β. Additive genetic factors may also be implicated in this affection. Environmental exposure contributes to the final clinical manifestation of

atopy and eventually asthma. Studies on the function of the FcεRI-β and on other susceptibility genetic component involved in atopy and asthma will contribute to our understanding of these illnesses.

ACKNOWLEDGMENT

We thank all subjects for their participation in this study. We thank the respiratory research unit nurses for their help in gathering blood samples. We thank Dr. William Cookson for the ARMS test primers and control DNA samples and for reviewing the manuscript. Catherine Laprise was supported by the Fonds pour la formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) du Québec.

REFERENCES

- American Thoracic Society (1987) Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. *Am Rev Respir Dis* 136 : 225-244
- American Thoracic Society (1994) Standardization of spirometry. *Am J Respir Crit Care Med* 152 : 1107-1136
- Barbee RA, Kaltenborn W, Lebowitz MD, Burrows B (1987) Longitudinal changes in allergen skin test reactivity in a community population sample. *J Allergy Clin Immunol* 79: 16-24
- Bieber T, De la Salle H, Wollenberg A, Hakimi J, Chizzonite R, Ring J, Hanau D, *et al* (1992) Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (FcεRI-β) *J Exp Med* 175 : 1285-1290
- Blank U, Ra C, Miller L, White K, Metzger H, Kinet J-P (1989) Complete structure and expression in transfected cells of high affinity IgE receptor. *Nature* 337: 187-189
- Boulet L-P, Milot J, Beaupré A (1989) Mortalité associée à l'asthme au Québec de 1975 à 1985. *Union médicale du Canada*; juillet/août : 150-157
- Boulet L-P, Turcotte H, Laprise C, Lavertu C, Bédard P-M, Lavoie A, Hébert J (1997) Comparative degree and type of sensitization to common indoor and outdoor allergens in subjects with allergic rhinitis and/or asthma. *Clin Exp Allergy* 27: 52-59

- Burrows B, Martinez FD, Halonen M, Barbee RA, Cline MG (1989) Association of asthma with serum IgE levels and skin -test reactivity to allergens. *N Engl J Med* 320 : 271-277
- Cookson WOCM, Sharp PA, Faux JA, Hopkin JM (1989) Linkage between immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q. *Lancet* 1: 1292-1295
- Cookson WOCM, Young RP, Sandford AJ, Moffatt MF, Shirakawa T, Sharp PA, Faux JA, *et al.* (1992) Maternal inheritance of atopic IgE responsiveness on chromosome 11q. *Lancet* 340: 381-384
- Cottingham RW Jr; Idury RM, Schaffer AA (1993) Faster sequential genetic linkage computations. *Am J Hum Genet* 53: 252-63
- Duffy DL, Martin NG, Battistutta D, Hopper JL, Mathews JD (1990) Genetics of asthma and hay fever in Australian twins. *Am Rev Respir Dis* 142 : 1351-8
- Duffy DL, Healey SC, Chenevix-Trench G, Martin NG, Weger J, Lichter J (1995) Atopy in Australia. *Nat Genet* 10 : 260
- Edfors-Lubs ML (1971) Allergy in 7000 twin pairs. *Acta Allergol* 26 : 249-285
- Hill MR, James AL, Faux JA, Ryan G, Hopkin JM, le Söuef P, Musk AW, *et al.* (1995) Fc epsilon RI-beta polymorphism and risk of atopy in a general population sample. *BMJ* 311 (7008): 776-779

- Hill MR, Cookson WOCM (1996) A new variant of the β subunit of the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc ϵ RI- β GLU237GLY): associations with measures of atopy and bronchial hyper-responsiveness. *Hum Mol Genet* 5: 959-962
- Hizawa N, Yamaguchi E, Furuya K, Onhuma N, Kodama N, Kojima J, Ohe M, *et al.* (1995) Association between high serum IgE levels and D11S97 on chromosome 11q13 in Japanese subjects. *J Med Genet* 32: 363-369
- Holford SV, Warren P, Wong C, Manfreda J (1984) Serum total immunoglobulin E levels in Canadian adults. *J Allergy Clin Immunol* 73(4): 516-522
- Jeanpierre M (1987) A rapid method for the purification of DNA from blood. *Nucleic Acids Res* 15 : 9611
- Juniper E, Cockcroft DW, Hargreave FE (1991) Histamine and methacholine inhalation tests : Tidal breathing method. Laboratory procedure and standardi-zation. Canadian Thoracic Society. AB Draco, Lund, Sweden
- Küster H, Zhang L, Brini AT, MacGlashan DWJ, Kinet J-P (1992) The gene and cDNA for the human affinity immunoglobulin E receptor b chain and expression of the complete human receptor. *J Biol Chem* 267: 12762-12787
- Laprise C, Boulet L-P (1997) Asymptomatic airway hyperresponsiveness : A three-year follow-up. *Am J Respir Crit Care Med* 156 : 1-7.

- Lathrop GM, Lalouel JM (1984) Easy calculation of lod scores and genetic risks on small computers. *Am J Hum Genet* 36: 460-465
- Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, Ott J (1985) Multilocus linkage analysis in humans : detection of linkage and estimation of recombination. *Am J Hum Genet* 37: 482-498
- Malo JL, Pineau L, Carrier A, Martin RR (1983) Reference values of the provocative concentrations of methacholine that cause 6% and 20% changes in forced expiratory volume in one second in a normal population. *Am Rev Respir Dis* 128 : 8-11
- Martinati LC, Trabetti E, Casartelli A, Boner AL, Pignatti PF (1996) Affected sib-pair and mutation analyses of the high affinity IgE receptor beta chain locus in Italian families with atopic asthmatic children. *Am J Respir Crit Care Med* 153: 1682-1685
- Pepys J (1973) Immunopathology of lung diseases. *Clin Allergy* 3(Suppl): 491-509
- Plaut M, Pierce JH, Watson CJ, Hanley-Hyde J, Nordan RP, Paul WE (1989) Mast cell lines produce lymphokines in response to cross linkage of FcεRI-β or to calcium ionophores. *Nature* 339: 64-67
- Sandford AJ, Shirakawa T, Moffat MF, Daniels SE, Ra C, Faux JA, Young RP, *et al.* (1993) Localisation of atopy and β subunit of high-affinity IgE receptor (FcεRI) on chromosome 11q. *Lancet* 341: 332-334

- Sandford A, Weir T, Paré P (1996) The genetics of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 153: 1749-1765
- Schaffer AA, Gupta SK, Shriram K, Cottingham RW Jr (1994) Avoiding recomputation in linkage analysis. *Hum Hered* 44: 225-237
- Sibbald B, Horn ME, Gregg I (1980) A family study of the genetic basis of asthma and wheezy bronchitis. *Arch Dis Child* 55 : 354-357
- Sibbald B, Horn ME, Brain EA, Gregg I (1980) Genetic factors in childhood asthma. *Thorax* 35 : 671-674
- Shirakawa T, Li A, Dubowitz M, Dekker JW, Shaw AE, Faux JA, Ra C, Cookson WOCM (1994) Association between atopy and variants of the beta subunit of the high-affinity immunoglobulin E receptor. *Nature Genet* 7: 125-130
- Shirakawa T, Hashimoto T, Furuyama J, Takeshita T, Morimoto K (1994) Linkage between severe atopy and chromosome 11q in Japanese families. *Clin Genet* 46: 228-232
- Shirakawa T, Mao X-Q, Sasaki S, Enomoto T, Kawai M, Morimoto K, Hopkin J (1996) Association between atopic asthma and a coding variant of FcεRIβ in a Japanese population. *Hum Mol Genet* 5: 1129-1130
- Stevenson FK, Snow RS, Chapman CJ, Frew Anthony, Holgate ST (1996) Genetic analysis of IgE. *Thorax* 51: 458-460

Sub-Committee on Skin Tests of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology (1989) Skin tests used in type I allergy testing. Position paper. Deborgs, Ed. Allergy 44 Suppl. : 1-59

Wang B, Rieger A, Kilgus O, Ochiai K, Maurer D, Fodinger D, Kinet JP, *et al.* (1992) Epidermal Langerhans cells from human skin bind monomeric IgE via FcεRI-β. J Exp Med 175: 1353-1365

Weiss DG, Samet JM, Meyers DA, Bleecker ER (1996) Classification of the asthma phenotype in genetic studies. In : Liggett SB, Meyers DA (eds) The Genetics of asthma, Marcel Dekker Inc. New York, pp 421-442

Zhong NS, Chen RC, Yang MO, Wu ZY, Zheng JP, Li YF (1992) Is asymptomatic bronchial hyperresponsiveness an indication of potential asthma? A Two-year follow-up of young students with bronchial hyperresponsiveness. Chest 102: 1104-1109

FIGURE LEGENDS

Figure 6.1

Atopic families pedigrees. All living persons, except II-1 and II-9 in Family 2, were examined and enrolled in the linkage study. Asthmatic-atopic individuals are depicted by solid black symbols, unaffected persons by open symbols, persons with airway hyperresponsiveness are depicted by a black solid quadrant in the lower left part of their respective symbols, subjects showing positive skin prick test to animal danders are represented by a black solid quadrant in the top right part of their respective symbols, persons showing positive skin prick test to house dust and housedust mites by a black solid quadrant in the top left part of their respective symbols, persons showing positive skin prick test to outdoor allergens by a black solid quadrant in the lower right part of their respective symbols. Person with total serum IgE level > 280 $\mu\text{g}/\text{ml}$ are indicated by solid dot outside the symbols. Diagonal lines denote deceased individuals. Persons unavailable for testing are indicated by doubled-crossed symbols. The Glu237Gly variant of the Fc ϵ RI- β gene is indicated by G and the wild-type allele is depicted by E under each symbols. The right side of each allele, either G or E, indicates the allele inherited from the father ; the left side indicates the allele inherited from the mother, except for person III-4 in Family 1.

Figure 6.2

Testing for the Glu237Gly FcεRI-β variant in atopic families. A) ARMS tests were performed with genomic DNA obtained from three persons. DNA molecular weight markers are depicted at the far right. An asthmatic-atopic individual was homozygous for the Glu237Gly FcεRI-β variant (GG), a second person with atopic status was heterozygous for the Glu237Gly FcεRI-β variant (EG) and a non-atopic non-asthmatic control person was homozygous for the wild-type allele (EE). The ARMS test depicts a 446 bp control band, the 280 bp band indicates the presence of the wild-type allele whereas the 238 bp band denotes the presence of the Glu237Gly variant. B) Sequence of genomic DNA. Asthmatic-atopic individual homozygote (GG) for the CCT encoding glycine residue at codon 237 of the FcεRI-β is represented by an arrow showing the single nucleotide substitution from adenine to guanine. An atopic person depicts a heterozygote sequence (EG) at the same position and non-atopic non-asthmatic individual is homozygous for the wild-type sequence (EE) allele.

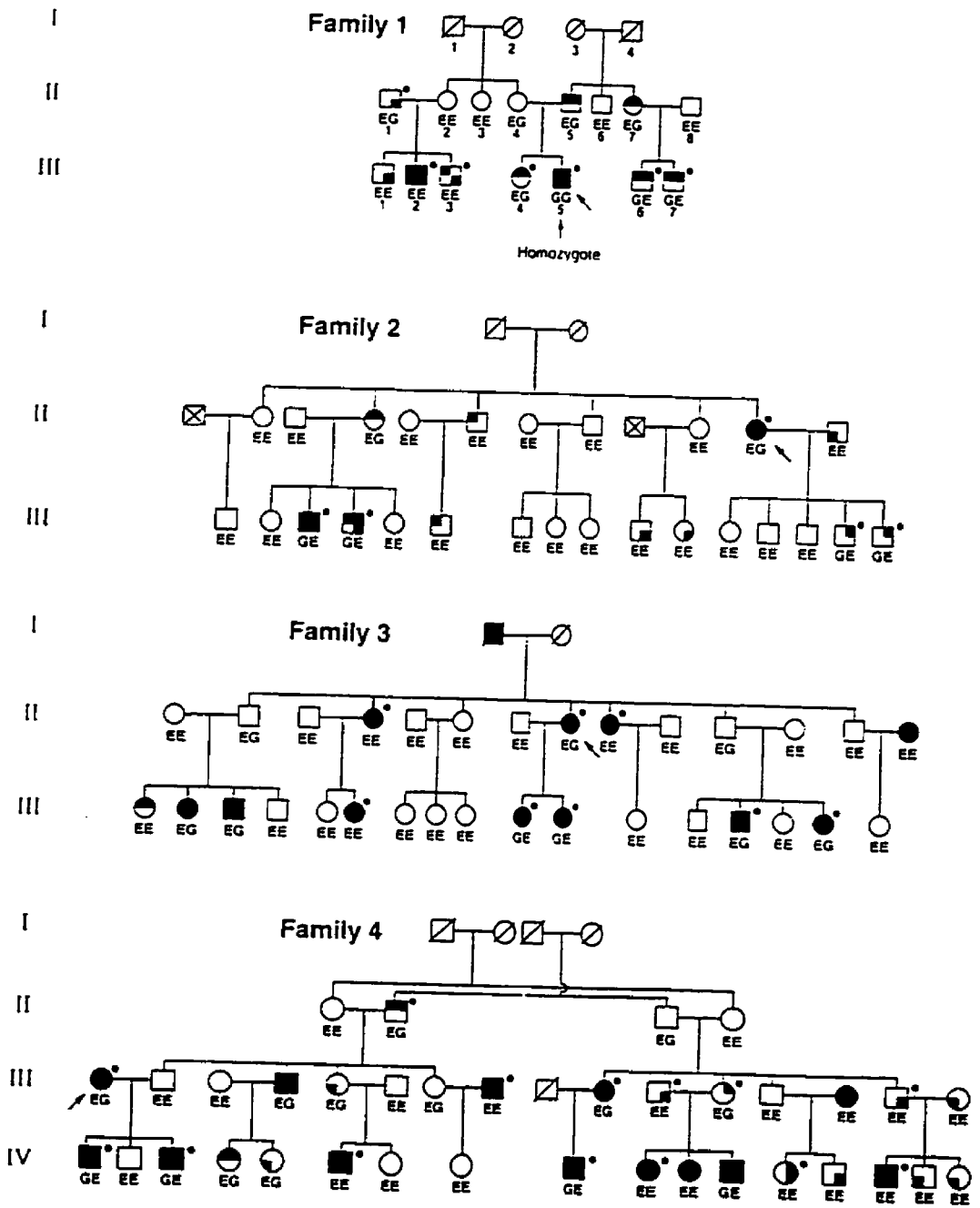
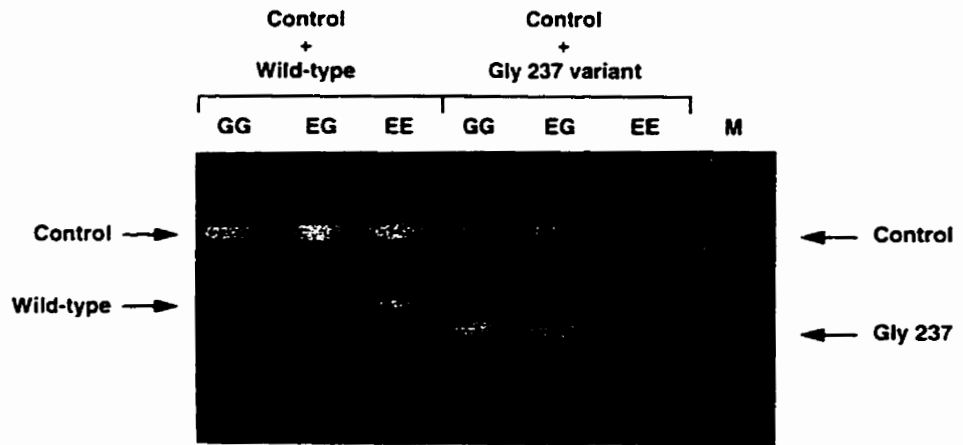


Figure 6.1

A)



B)

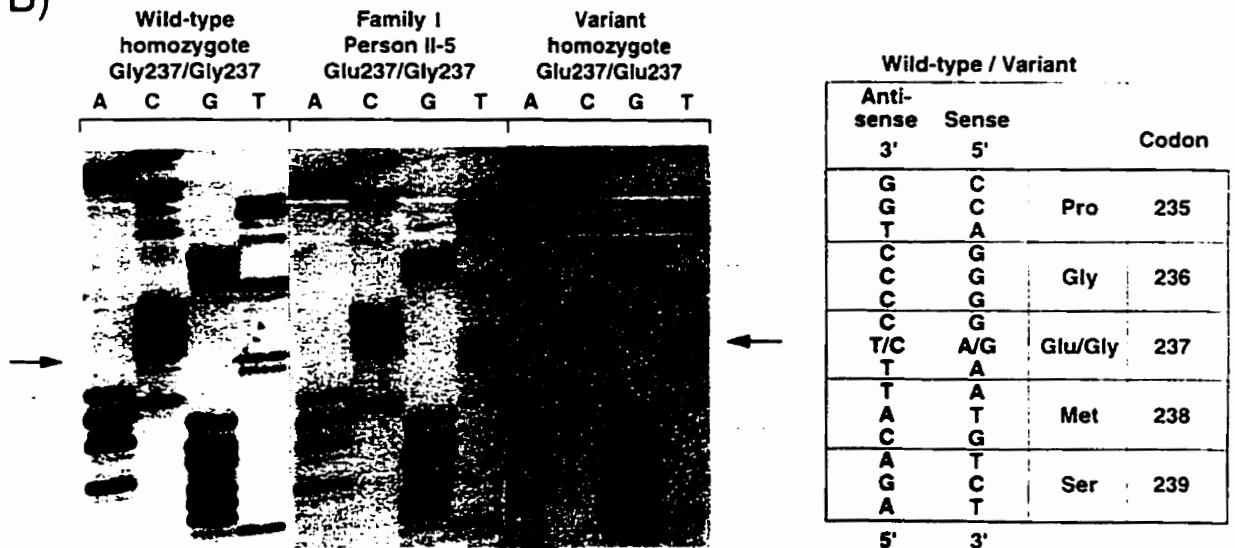


Figure 6.2

Table 6.1

Physiological and immunological parameters associated with the presence of the Glu237Gly variant of the FcεRI-β

Parameters	Glu/Glu	Glu/Gly	Gly/Gly
Number of subjects	178	21	1
Age (yr)	29 ± 1	24 ± 2	35 (90) ^e
FEV ₁ (% predicted)	107.6 ± 3.1	91.2 ± 4.3	73 (1)
PC ₂₀ methacholine (mg/ml) ^a	25.6 ± 1.1	3.7 ± 1.3 ^d	saline (1)
Atopic index (/6) ^b	1.9 ± 0.2	4.4 ± 0.4 ^d	6 (90)
Atopic score (mm) ^c	35.4 ± 3.2	77.6 ± 6.7 ^d	140 (100)
Eosinophils (10 ⁹ /L)	0.2 ± 0.001	0.3 ± 0.03 ^d	0.4 (75)
IgE (μg/L) ^a	271 ± 42	826 ± 225 ^d	955 (75)

^a Geometric mean

^b Number of main categories of allergens producing at least one positive response (total of six categories)

^c Cumulative of all positive responses in millimeters

^d Significant difference between the Glu/Glu and Glu/Gly groups

^e percentile rank of the Gly/Gly homozygous

Table 6.2

Relative risk of atopy associated with with the Glu237Gly FcεRI-β variant and exposure to animal danders

Gly237 / Exposure to animal danders	Number of subjects			Odd ratio (CI ^a = 95%)
	Atopics	Non-atopics	Total	
- / -	56	72	128	-
- / +	24	26	50	1.19
+ / -	8	1	9	10.29
+ / +	12	1	13	15.43

^a Confidence interval

CHAPITRE 7

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Le but ultime de l'ensemble de ces travaux était de clarifier les relations qui existent entre l'atopie, l'HRB et la symptomatologie associée à l'asthme. Dans cette optique, le premier objectif de mes travaux consistait à évaluer l'importance du type de sensibilisation aux aéroallergènes communs dans l'expression phénotypique de l'atopie. En second lieu, je désirais identifier les paramètres cliniques, physiologiques et immunohistologiques associés à l'HRB. De plus, le rôle de l'atopie et de l'hérédité comme facteurs de risque associés au développement de l'asthme chez les individus avec une HRB a été démontré. Les interrelations entre l'HRB, les symptômes respiratoires et le profil inflammatoire des voies aériennes furent également évaluées en regard des changements morphologiques de la paroi bronchique. De plus, les facteurs de risque du développement de la symptomatologie asthmatique au sein d'un groupe de sujets avec HRB asymptomatique ont été identifiés. Finalement, une étude cas-témoin fut effectuée afin d'évaluer l'association entre l'atopie, l'HRB et un polymorphisme de la sous-unité β du récepteur à haute affinité pour les IgE (Fc ϵ RI- β), suivie d'une étude familiale visant à déterminer s'il existe une

liaison significative entre ces anomalies et ce polymorphisme. Chacun des objectifs que nous nous étions fixés fut atteint et les résultats des diverses études sont présentés aux chapitres 3 à 6, inclusivement. Puisque chaque chapitre inclut une discussion détaillée des résultats, la présente section vise à discuter certains aspects particuliers des résultats dans leur ensemble et de la pertinence des méthodologies utilisées.

L'atopie est maintenant reconnu comme un des principaux facteurs étiologiques dans le développement de l'asthme et de la rhinite et certains travaux ont rapporté que l'exposition aux allergènes domestiques est un facteur prédisposant au développement de phénotypes cliniques associés à l'atopie (Gergen et coll. 1992; Blumenthal et coll. 1993). Cependant, aucune étude n'indique clairement la spécificité de la sensibilisation aux allergènes en association avec l'expression phénotypique de l'atopie selon la catégorie d'allergènes auxquels le sujet est sensibilisé en fonction de l'âge et du sexe du sujet. Nous avons analysé les résultats des tests cutanés d'allergie effectués dans une cohorte de 3371 patients provenant de deux centres hospitaliers. De ce fait, puisque la population étudiée est composée de patients ayant fréquenté une clinique spécialisée d'asthme et/ou d'allergie, les observations se limitent à l'ensemble de la population atopique et non à l'ensemble de la population québécoise. Les résultats de cette analyse sont présentés et discutés au chapitre 3. Les sujets furent groupés selon le phénotype clinique établi par les médecins (asthmatique, rhinitique ou asthmatique-rhinitique) et par la suite redistribués à l'intérieur de sous-groupes selon la catégorie d'allergènes auxquels ils étaient sensibilisés (aéroallergènes domestiques et/ou allergènes d'extérieur). Cette étude a permis de déterminer que l'asthme est principalement associée à l'exposition aux allergènes domestiques tandis que la rhinite semble surtout en relation avec l'exposition aux pollens.

Dans la cohorte étudiée, la prévalence de sensibilisation aux allergènes domestiques (chats, chiens, poussière et acariens) était plus importante que celle notée pour les allergènes extérieurs (pollens). Cette différence de prévalence peut s'expliquer par plusieurs facteurs, tels la durée de l'exposition et l'intensité de cette exposition. Au Québec, nous passons l'essentiel de notre temps à l'intérieur et puisque les allergènes domestiques sont présents à longueur d'année, il est logique que cette catégorie d'allergènes ait un effet plus marqué sur la santé respiratoire. La poussière représente une cause majeure d'allergie et forme la substance à laquelle le plus de sujets sont sensibilisés dans notre cohorte. Les acariens, dont les deux principaux représentants sont le *Dermatophagoides pteronyssinus* et le *Dermatophagoides farinae*, se nourrissent de différentes composantes de la poussière dont les squames humaines et se reproduisent très rapidement dans les conditions optimales (45% d'humidité et une température supérieure à 20°C). Ils se retrouvent partout dans la maison, particulièrement dans les matelas et les tapis. Les animaux dont le chat puis le chien, représentent la seconde source d'allergènes intérieurs auxquels les sujets étaient sensibilisés. Aux États-Unis, environ 60% de la population possède un ou plusieurs animaux domestiques (Cullinan 1994-95). Il n'existe pas de données québécoises à ce sujet; toutefois, selon l'ensemble des questionnaires respiratoires (Annexe 1) complétés par les sujets ayant participé aux études de l'Annexe 2 et des Chapitres 4, 5 et 6 (totalisant 294 foyers québécois), 48% des résidences posséderait un animal de compagnie (données non incluses). Cette donnée souligne l'importance de l'exposition aux aéroallergènes d'animaux dans la population québécoise. La catégorie suivante est représentée par les pollens, qui forment aussi une cause importante de problèmes de santé liés aux allergies au Québec, suivie des moisissures. Ainsi, l'analyse des prévalences de sensibilisation aux allergènes obtenues dans la cohorte étudiée suggère que la durée et l'intensité de l'exposition antigénique semblent des facteurs prépondérants sur le type de

sensibilisation observé et son expression clinique.

Les protéines responsables des réactions allergiques à certains animaux, plus particulièrement le chat, ont été identifiées dans la salive, les squames de leur peau et aussi dans l'urine (Schou 1993). Évidemment, ces allergènes se retrouvent sur l'animal, et de surcroît, partout dans l'environnement de celui-ci et sont transportés par toutes les personnes de la maison. Le diamètre et les propriétés physicochimiques de ces particules allergéniques pourraient être des éléments déterminants dans le type de sensibilisation rencontré et dans le phénotype d'atopie associé. Les pollens ont une taille supérieure (20 à 88 kDa ; Zhang et coll. 1991) aux allergènes domestiques (7 à 12 kDa ; Eggleston 1992) et par conséquent, les particules antigéniques de pollens se retrouvent trappées par la muqueuse nasale, d'où la réponse locale sous forme de rhinite allergique. Au cours des dernières années, certains chercheurs ont axé leurs efforts sur la caractérisation des propriétés physicochimiques des allergènes (Bond et coll. 1993; Keating et coll. 1995; Savolainen et coll. 1997). Une étude récente faite par Savolainen et ses collaborateurs (1997) a permis de démontrer une composition protéique similaire dans les allergènes de divers animaux ce qui pourrait expliquer, du moins en partie, la sensibilisation simultanée à divers animaux pour un même individu.

Une forte prévalence de rhinite a été observée chez les sujets présentant un asthme allergique. Cette association entre l'asthme et la rhinite, suggérée pour la première fois en 1925 par Gottlieb (1925), s'observe également dans une étude faite auprès d'une cohorte de 7662 patients où 49% des sujets avaient développé une rhinite avant l'asthme, et 25% simultanément les deux affections (Pederson et Weeke 1983). L'évaluation de la réactivité bronchique chez les sujets rhinitiques démontre que les sujets atteints d'une rhinite allergique présentent une HRB à la métacholine moyenne intermédiaire, se situant entre le niveau de la personne normale et celle de l'asthmatique.

Plusieurs hypothèses ont été soulevées pour expliquer le lien qui existe entre ces deux conditions. D'abord, l'écoulement nasal postérieur de mucus pourrait déclencher la réaction asthmatique. La respiration par la bouche entraînant un air plus froid et plus sec et conduisant simultanément à une perte de chaleur et de vapeur d'eau au niveau des voies aériennes inférieures pourrait également stimuler la réaction asthmatique. Une atteinte des voies aériennes par des allergènes et la libération de facteurs inflammatoires dans la circulation pourraient aussi déclencher la réaction asthmatique. Quoiqu'il en soit, il existe une étroite association entre la rhinite et l'asthme.

Il est intrigant de constater que, parmi la population atopique, un individu sera atteint d'une rhinite allergique, un autre d'un asthme et un troisième des deux affections. Les raisons de ces variations dans l'expression phénotypique de l'atopie ne sont pas connues. Ce travail aura toutefois permis de démontrer qu'elles sont probablement liées à la durée et à la catégorie d'allergènes auxquels l'individu sensibilisé a été exposé. Par ailleurs, l'observation que certains individus sensibilisés aux mêmes allergènes et soumis aux mêmes conditions environnementales ne présentent pas un phénotype identique sous-tend l'implication d'une prédisposition génétique.

Les facteurs impliqués dans la dissociation qui existe parfois entre la symptomatologie asthmatique et l'HRB sont encore indéterminés. Par conséquent, la seconde portion de notre travail a porté sur la caractérisation de l'HRB asymptomatique. Puisque les symptômes respiratoires (toux, sifflements, dyspnée) sont habituellement ce qui motive une personne à consulter un médecin, les sujets qui ont une HRB asymptomatique ignorent qu'ils présentent cette caractéristique. Les hyperréacteurs asymptomatiques furent donc recrutés à partir de notre étude épidémiologique portant sur la prévalence de l'asthme, de l'atopie et de l'HRB chez les proches parents de sujets

asthmatiques en comparaison aux familles témoins (Annexe 2).

Les études rapportées indiquent une prévalence d'HRB asymptomatique variant de 20 à 60% selon les populations étudiées (Cockcroft et coll. 1983; Yan et coll. 1983; Cockcroft et Hargreave 1991; Woolcock 1993). Zhong et ses collaborateurs (1992) ont suggéré que l'HRB peut précéder l'asthme symptomatique chez les enfants ayant une réactivité bronchique marquée ($CP_{20} \leq 2$ mg/ml) et une histoire d'infection respiratoire grave (bronchiolite) en bas âge. Toutefois, aucun suivi de l'HRB dans une cohorte de sujets adultes, sans symptômes respiratoires passés ou présents, n'est rapporté. Le présent travail représente la première étude du genre où les sujets sont pairés avec un groupe de sujets asthmatiques et normoréacteurs et ont été évalués périodiquement sur une période de trois ans. La force majeure de notre investigation repose entre autre sur la caractérisation du phénotype des hyperréacteurs. La zone d'hyperexcitabilité bronchique généralement établie à une CP_{20} métacholine < 16 mg/ml selon la méthode utilisée, mais la zone entre 8 et 16 représentant cette zone grise entre la réactivité normale et asthmatique, nous avons sélectionné les sujets présentant une CP_{20} métacholine ≤ 8 mg/ml afin de s'assurer d'une HRB significative. Nous avons élaboré un questionnaire détaillé (Annexe 1) de la condition respiratoire et de la symptomatologie relative à l'asthme afin d'éviter d'inclure des individus qui sont en fait des asthmatiques qui s'ignorent. De plus, lors du test de provocation bronchique à la métacholine, la perception de la chute du VEMS (dyspnée) a été mesurée avant chaque mesure sur une échelle de Borg visant à exclure les sujets ayant une faible perception des symptômes et/ou ne reconnaissant pas la présence de symptômes d'asthme. Les résultats de l'analyse clinique, physiologique et immunologique se retrouvent au Chapitre 4 et les données relatives à l'histopathologie sont présentées au Chapitre 5.

Au cours du suivi, quatre sujets avec HRB asymptomatique ont développé des symptômes d'asthme. Ces sujets avaient tous un proche parent asthmatique, une histoire d'atopie et étaient exposés à un animal domestique. Ces résultats indiquent que l'histoire familiale d'asthme et le statut atopique représentent des facteurs de risque dans le développement d'un asthme symptomatique. Chez ces sujets, le développement de la symptomatologie asthmatique était également associé à une diminution des cellules lymphocytaires CD8 positives dans la paroi bronchique, à une augmentation des cellules CD4 et des CD25 positives ainsi qu'à une augmentation de la déposition sous-épithéliale bronchique de collagène.

Ces résultats suggèrent l'implication d'éléments inflammatoires et d'un certain remodelage des voies aériennes dans le développement de la symptomatologie asthmatique. Selon les résultats que nous avons obtenu, le traitement anti-inflammatoire débute possiblement trop tard dans l'histoire naturelle de l'asthme puisque les voies aériennes de sujets nouvellement diagnostiqués ont déjà subi des altérations structurales bronchiques marquées. Ainsi, chez les sujets à haut risque de développer de l'asthme, tels ceux avec une HRB asymptomatique, il est possible que l'application d'une thérapie anti-inflammatoire ou de mesures environnementales, telle la réduction de la durée et de l'intensité de l'exposition aux allergènes auxquels le sujet est sensibilisé, avant l'apparition des symptômes puisse prévenir le développement de ceux-ci. Selon les données recueillies, le processus inflammatoire est présent avant le développement de l'asthme et peut être en cause dans le développement d'une HRB soit directement ou par le biais de l'induction de changements structuraux. Sans assainissement de l'environnement et sans traitement, les altérations bronchiques pourraient devenir irréversibles et ces changements permanents pourraient résulter en un asthme permanent. Somme toute, l'HRB asymptomatique représente un état intermédiaire entre la

normalité et la condition asthmatique et révèle la présence d'anomalies précoces tant inflammatoires que structurelles.

Il aurait bien sûr été intéressant de vérifier la distribution des types de collagène dans les biopsies bronchiques. Il nous a été impossible de réaliser ce travail en raison d'un matériel biologique insuffisant, le nombre de biopsies bronchiques prélevées étant limité. Chez les sujets normaux, la membrane basale est composée principalement de laminine et de collagène de type IV. Chez les sujets asthmatiques, la fibrose sous-épithéliale est causée par une déposition anormale de fibronectine et de collagène de type I et III (Roche 1991), lesquels sont impliqués dans la réparation tissulaire. Brewster et ses collaborateurs (1990) ont noté la présence de myofibroblastes dans la zone sous-épithéliale et ont suggéré que ces cellules étaient responsables de la fibrose sous-épithéliale observée dans les biopsies bronchiques de sujets asthmatiques. Ils ont également retrouvé une corrélation entre l'intensité de la fibrose et le nombre de myofibroblastes présents. Le dépôt irrégulier de collagène sous-épithélial observé dans les biopsies bronchiques initiales (Année 1) des hyperréacteurs suggère qu'il s'agit d'une étape préliminaire possible au développement de l'asthme. Il aurait été intéressant de voir si les proportions des types de collagène composant ces dépôts sont de même nature que ceux retrouvés dans les biopsies bronchiques de sujets asthmatiques. Cependant, certaines données récentes sur les biopsies bronchiques de sujets non asthmatiques avec rhinite allergique avec réactivité bronchique normale démontrent un dépôt de collagène de même composition quoique moindre que celui noté dans l'asthme (Chakir et coll. 1996) ce qui suppose que nous aurions pu possiblement observer des résultats similaires.

La signification physiopathologique de ce dépôt de collagène sous-épithélial est indéterminée, quoique certains auteurs aient suggéré que ce remodelage des voies aériennes pourrait être une conséquence du processus

inflammatoire (Chakir et coll. 1996). Chez les sujets asthmatiques, une corrélation a été démontré entre l'hyperréactivité bronchique et la fibrose sous-épithéliale (Chetta et coll. 1996; Boulet et coll. 1997) et, récemment, on a associé le degré de la fibrose avec la sévérité de l'asthme (Chetta et coll. 1997; Boulet et coll. 1997). Ces résultats suggèrent une association entre le remodelage des voies aériennes et la sévérité clinique de l'asthme. À la troisième année d'évaluation, les biopsies bronchiques des sujets avec une HRB asymptomatique qui ont développé une symptomatologie asthmatique présentaient une déposition de collagène sous-épithélial uniformément répartie telle que notée dans les biopsies de sujets asthmatiques. De plus, nous avons observé une corrélation entre l'augmentation de la réactivité bronchique et l'épaississement de la membrane basale (fibrose sous-épithéliale) ce qui suggère, une fois de plus, l'importance de ce remodelage dans l'évolution de la symptomatologie asthmatique.

Il existe peu de données sur la physiopathologie de l'HRB asymptomatique. Notre programme de recherche visait donc à définir les caractéristiques de ce groupe à l'âge adulte. Ainsi, à partir des données que nous avons obtenues, il est évident que l'évaluation des cytokines par marquage immunohistochimique (identification des protéines) et/ou par hybridation *in situ* (pour l'ARN_m) pourraient donner des indications supplémentaires sur les mécanismes impliqués dans les changements inflammatoires et structuraux de ces sujets. En effet, comme les lymphocytes de patients asthmatiques expriment plus fortement les gènes de l'IL-2, l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5 et le GM-CSF que les sujets normaux (Robinson et coll. 1992), il aurait été intéressant d'évaluer les proportions retrouvées chez les hyperréacteurs aux années 1 et 3 et ce, en comparaison avec ce que l'on observe chez les asthmatiques et les normaux.

En résumé, cette section de notre programme de recherche aura permis, et c'était le principal objectif, de mieux caractériser les changements

physiopathologiques impliqués dans la transition entre l'HRB asymptomatique et l'asthme, en plus de confirmer qu'elle constitue une étape préliminaire au développement de cette maladie chez certains sujets. Notre étude aura en outre permis de répondre à certaines questions fondamentales sur la nature même de l'HRB asymptomatique. L'effet indissociable de l'environnement et des composantes héréditaires a été souligné par l'identification de ces facteurs dans le sous-groupe de sujets avec une HRB asymptomatique identifié «à haut risque» de développer un asthme symptomatique. Il reste beaucoup à faire pour comprendre l'HRB, pour élucider les mécanismes qui la sous-tendent et toute son implication dans l'expression phénotypique de l'asthme. Nous espérons avoir contribué à mieux définir la nature de l'HRB asymptomatique et, en ce sens, avoir aidé à orienter des recherches futures dans ce domaine passionnant.

L'asthme, en particulier celui d'origine allergique, démontre une tendance familiale (Sibbald et coll. 1980; Lebowitz et coll. 1984), reflétant une certaine prédisposition génétique à développer cette affection. Cependant, les infections respiratoires, en plus des facteurs environnementaux, contribuent à son apparition, tel que l'a démontré notre programme de recherche. L'histoire naturelle de l'asthme demeure imparfaitement connue; une séquence d'évènements cellulaires engendre une inflammation qui amène des altérations de la muqueuse bronchique, ce qui cause probablement l'apparition de l'hyperréactivité bronchique et les premiers symptômes associés au bronchospasme. Par ailleurs, l'incidence élevée de cette maladie dans les familles souligne l'importance de facteurs génétiques dans son développement. Par conséquent, la suite de nos travaux a porté sur l'établissement de paramètres héréditaires associés à l'asthme, plus particulièrement aux conditions associées à l'asthme.

La rétrospective des diverses études génétiques sur l'asthme souligne la complexité de ce type d'évaluation. Au niveau clinique, l'asthme, particulièrement d'origine allergique, couvre un large spectre de manifestations phénotypiques (allergie, élévation anormale des IgE sériques, augmentation de cellules inflammatoires et de cytokines, HRB, obstruction bronchique réversible, etc.) de divers degrés, celles-ci pouvant être modifiées selon les stimuli environnementaux. L'asthme se développe à tout âge, ce qui rend difficile l'association d'un facteur génétique avec le phénotype de l'asthme. Les difficultés rencontrées dans l'établissement d'un phénotype précis et l'implication de nombreuses anomalies génétiques au cours des diverses études sur la génétique de l'asthme rendent l'évaluation des facteurs de risque d'origine génétique difficile. C'est pour cette raison que les nouvelles investigations sont orientées vers les conditions associées à l'asthme, telle l'atopie, dont le phénotype est clairement défini. Quoique certains auteurs aient suggéré qu'il existait un certain nombre de sujets asthmatiques chez qui la transmission ne semble pas en relation avec le statut atopique, l'essentiel de la transmission héréditaire de l'asthme semble rattaché à l'atopie (Longo et coll. 1987). Ainsi, afin de préciser les déterminants héréditaires impliqués dans l'asthme, nos efforts ont surtout été concentrés sur la caractérisation de polymorphismes déterminant le statut atopique.

La première portion de nos analyses génétiques repose sur une étude cas-témoin où nous avons pu établir une association entre l'atopie et un polymorphisme de la chaîne β du récepteur à haute affinité pour les IgE (Fc ϵ RI- β). La comparaison des fréquences alléliques de ce polymorphisme évalué chez les individus atopiques et chez les individus non-atopiques a permis d'identifier une association entre ces deux paramètres. Cette association suggère l'effet d'un allèle de susceptibilité pour l'atopie dans cette région. Pour confirmer cette association, nous avons également réalisé une analyse de liaison familiale sur quatre grandes familles. Cette analyse a permis de

préciser que FcεRI-β représente un gène candidat susceptible d'intervenir dans l'expression de l'atopie et de l'HRB (résultats présentés au Chapitre 6). Selon nos résultats, il y a une association entre l'atopie, l'HRB et le polymorphisme Glu237Gly de FcεRI-β, ce qui suggère la présence d'un locus de susceptibilité pour ces conditions associées à l'asthme sur le chromosome 11q.

À notre connaissance, il s'agit de la première investigation sur la génétique de l'atopie et de l'HRB au sein de la population québécoise. L'atopie et l'asthme ne sont pas des affections Mendelliennes simples : il s'agit plutôt de complexes polygéniques. Dans cette optique, l'analyse de la population québécoise est un atout considérable en raison de la constitution génétique de la population qui est relativement homogène. En effet, depuis sa fondation jusqu'à la fin des années soixante, l'immigration d'origine non-française était presque inexistante. La population actuelle provient donc en très grande partie de sa population fondatrice. De plus, il y a eu très peu de mariages entre Francophones et non-Francophones avant la révolution tranquille des années 60. Ceci était principalement dû à l'interdiction des mariages entre catholiques et non-catholiques. Ceci facilite l'analyse génétique des maladies complexes. En effet, dans une population non homogène, le gène majeur pourrait se retrouver à plusieurs sites différents, ce qui réduit les chances de mettre en évidence un lien entre le gène majeur et la maladie. De plus, la région de Québec compte plusieurs familles nombreuses, ce qui augmente nos chances de trouver une anomalie génétique.

Le second point original de cette portion de notre programme de recherche repose sur l'évaluation du risque associé à l'exposition aux animaux domestiques (chats et chiens) et de la présence du polymorphisme Glu237Gly de FcεRI-β dans l'expression du phénotype de l'atopie. Cette analyse a permis de démontrer que ces deux paramètres modulent l'expression phénotypique de l'atopie, que la présence de Glu237Gly de FcεRI-β a une influence supérieure

à l'effet de l'environnement et que l'influence concomitante de ces deux facteurs est plus importante que la somme des risques attribués à ces conditions.

Notre investigation de la génétique de l'atopie fut complétée par une analyse de liaisons, ce qui accroît la validité de nos observations. Les arbres généalogiques des familles suggèrent un mode de transmission autosomal dominant à pénétrance réduite pour l'atopie. Par ailleurs, puisqu'il n'existe aucune donnée sur la prévalence de l'atopie et de l'HRB selon le sexe et l'âge des sujets dans la population canadienne, l'analyse de liaison a été effectuée en utilisant une seule classe de liability, ces dernières servant à définir la pénétrance du gène selon la maladie. Cependant, comme il a été démontré assez clairement que la pénétrance de l'asthme et de l'atopie varie avec l'âge et le sexe des sujets (Nelson 1991), il aurait été plus juste de définir différentes classes selon la prévalence évaluée au sein des diverses catégories d'âges dans notre population. De surcroît, notre modèle n'est pas optimal et l'évaluation du «lod score» (logarithme de vraisemblance) est possiblement sous-estimé. La fréquence allélique du polymorphisme est un paramètre dont il faut aussi tenir compte dans l'évaluation du «lod score». Dans notre analyse, nous avons utilisé la fréquence allélique de la population australienne rapportée par Hill et Cookson (1996). Dans leur étude, il ont évalué une fréquence de 5.3% dans un échantillon aléatoire de 1004 personnes (230 familles sur deux générations). Au sein de notre cohorte, 20% des atopiques sévères avaient cet allèle contre 2% des sujets non-atopiques. Puisqu'au moins 15% de la population est atopique, un échantillon aléatoire de la population québécoise aurait dû indiquer une fréquence allélique d'environ 5%. Par conséquent, l'utilisation de la fréquence allélique mesurée par ces auteurs ne semble pas si éloignée de ce que l'on pourrait noter dans une étude de cohorte au sein de la population du Québec.

L'analyse des résultats a permis de montrer qu'il existe une association et une liaison significative entre l'HRB, la sensibilisation aux animaux et ce marqueur polymorphique. Ces résultats correspondent à ceux obtenus dans notre étude épidémiologique sur les catégories de sensibilisation et pourraient indiquer que les mécanismes héréditaires qui sont impliqués dans l'asthme sont en étroite relation avec la sensibilisation aux animaux domestiques. Bien que nous avons obtenu une liaison entre la sensibilisation aux pollens et ce marqueur, elle était moins prononcée. Cette observation soulève certaines hypothèses. Premièrement, cette différence de liaison entre les différentes catégories d'allergènes pourrait être une question de durée et d'intensité d'exposition. Hill et Cookson (1996) ont obtenu une forte association entre Glu237Gly de FcεRI-β et la sensibilisation aux pollens dans la population australienne. Puisque cette population est exposée annuellement à une quantité plus importante d'aéroallergènes de pollens que la population québécoise, il est possible que plus de gens soient sensibilisés à ce type d'allergènes et que l'on observe une association plus marquée.

En ce qui a trait aux acariens, l'amplitude de l'association mesurée par Hill et Cookson (1996) est comparable à la nôtre. Cependant, puisqu'ils n'ont pas testé d'allergènes d'animaux dans leur cohorte, il est difficile de savoir si l'association n'aurait pas été plus grande que celle évaluée concernant les pollens.

Cet énoncé nous porte vers une seconde hypothèse, soit qu'il est possible que les différents types de sensibilisation aux allergènes soient sous l'influence de différents paramètres héréditaires. Ainsi, les facteurs génétiques qui soutiennent la sensibilisation aux animaux seraient différents de ceux qui soutiennent la sensibilisation aux pollens. Il est également possible que certains paramètres héréditaires influencent plusieurs phénotypes distincts. Le fait que l'on observe une association et une liaison entre Glu237Gly de FcεRI-β et

l'HRB souligne l'interrelation entre l'atopie et le développement de l'asthme. Il n'y a pas de liaison entre le taux anormalement élevé d'IgE sériques et la présence de Glu237Gly de FcεRI-β dans nos familles contrairement à ce qui fut démontré par Shirakawa et ses collaborateurs (Shirakawa et coll. 1996).

La séquence des acides aminés de FcεRI-β est connue depuis 1978 (Dorrington et coll. 1978). L'utilisation de produits protéolytiques pour le clivage de FcεRI-β en fragments afin de déterminer les sites de liaisons n'a pas donné de résultats significatifs et aucun des sites n'est apparu actif. Ces résultats suggèrent que les jonctions entre les fragments inactifs pourraient tenir un rôle en ce qui a trait aux liaisons aux récepteurs (Helm et coll. 1988). Ainsi, le polymorphisme de FcεRI-β pourrait promouvoir l'un ou l'autre des états atopiques en augmentant la libération de médiateurs pro-inflammatoires par les mastocytes, en augmentant l'IL-4 et le ligand CD40. Il a été démontré que, pour la chaîne α, certains domaines sont impliqués dans le signal de transduction. Des études de mutagenèse sur les sous-unités de FcεRI-β ont démontré que la substitution d'acides aminés à certains sites spécifiques (domaines transmembranaires) peuvent causer des changements significatifs dans l'expression et la fonction de ce récepteur (Blank et coll. 1989). Des études biochimiques et moléculaires sont requises afin de déterminer l'aspect fonctionnel de ce polymorphisme de FcεRI-β qui semble donc être un allèle de susceptibilité important dans l'expression de l'atopie et de l'asthme.

Conclusion

L'asthme est une affection inflammatoire des bronches fréquente affectant tout groupe d'âge. Jusqu'à récemment, sa prévalence et sa gravité semblaient augmenter, probablement en raison de plusieurs facteurs liés à l'environnement, au diagnostic plus fréquemment reconnu ou encore à une variation spontanée de son expression. L'asthme, en particulier celui

d'origine allergique, démontre une tendance familiale, reflétant une certaine prédisposition génétique à le développer. Cependant, certains facteurs environnementaux contribuent à son expression phénotypique, tels l'exposition régulière à des allergènes domestiques ou les infections respiratoires. L'histoire naturelle de l'asthme reste imparfaitement connue. Toutefois, à la lumière des résultats que nous avons obtenus au long de ce programme de recherche, il est possible de présenter, de façon schématique, les principaux éléments responsable le développement de l'asthme allergique (Figure 7.1, p.230).

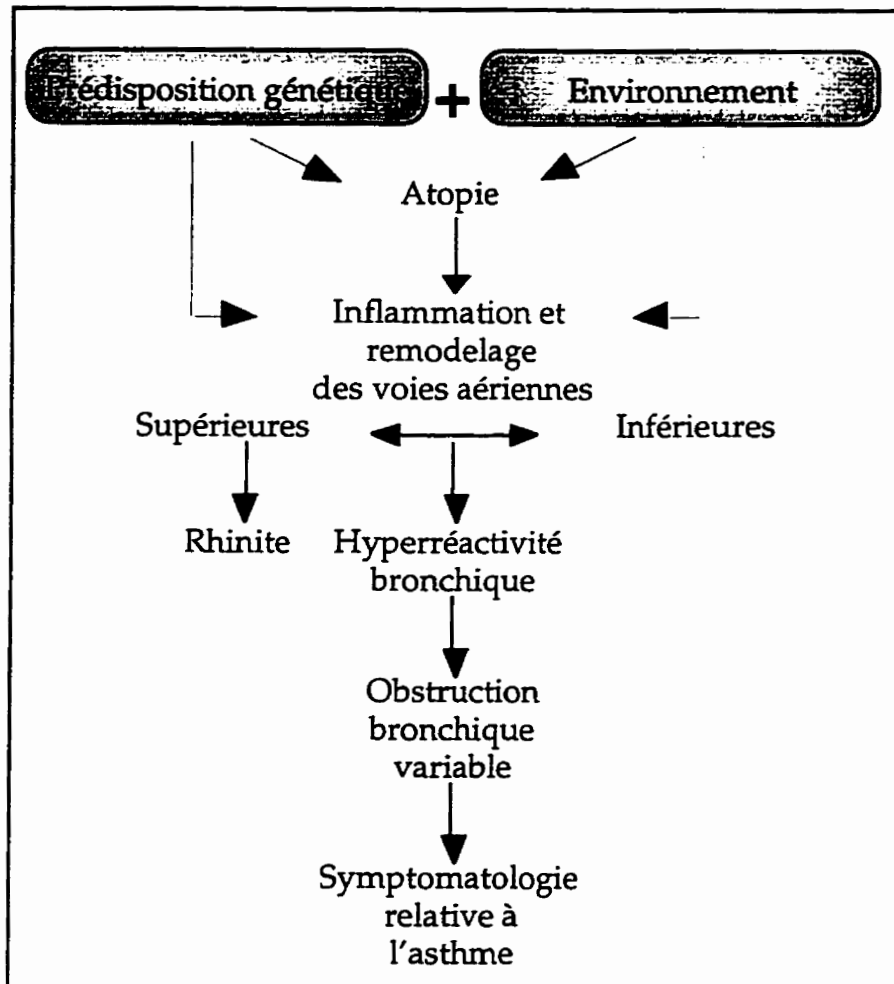


Figure 7.1 Principaux éléments qui sous-tendent le développement de l'asthme allergique. L'environnement joue certainement un rôle important dans le développement de l'asthme. L'exposition aux allergènes présents dans les maisons, et particulièrement les allergènes d'animaux domestiques, est un facteur favorisant le développement de l'asthme. Les infections virales semblent également favoriser le développement de l'asthme. En ce qui concerne son caractère génétique, les recherches sont donc à poursuivre mais nos travaux auront permis de démontrer l'implication d'un allèle de susceptibilité sur le chromosome 11. Ainsi, sous l'influence de facteurs environnementaux, les individus génétiquement prédisposés développeront de l'atopie. Selon la durée, le degré et la nature de l'exposition allergénique, il y aura un recrutement de cellules inflammatoires, relarguage de médiateurs au niveau bronchique et un remodelage des voies aériennes supérieures et/ou inférieures. Il se développe ensuite une hyperréactivité bronchique, une obstruction bronchique variable et la symptomatologie de l'asthme (chez les individus génétiquement prédisposés).

Les résultats des études présentées auront donc permis de démontrer :

- Une association entre la sensibilisation aux allergènes communs tels les acariens de la poussière et les animaux domestiques et le phénotype clinique d'asthme ;
- Que la sensibilisation aux pollens seule est, dans un premier temps, associée à l'expression de la rhinite ;
- Une plus grande incidence d'individus sensibilisés aux allergènes domestiques (acariens et animaux) par rapport aux allergènes extérieurs et ce, toutes catégories d'âge confondues ;
- Une prévalence et un degré de sensibilisation aux aéroallergènes communs maximaux chez les jeunes adultes pour ensuite diminuer avec l'âge ;
- Que l'HRB asymptomatique peut être une phase préliminaire au développement de la symptomatologie asthmatique et donc indiquer un risque accru d'asthme ;
- Que l'exposition aux allergènes domestiques et la présence d'asthme chez un membre de la famille (1^{er} degré) sont des facteurs de risque dans le développement de l'asthme chez les sujets avec une HRB asymptomatique;
- Un certain degré d'inflammation de la muqueuse bronchique ainsi qu'un remodelage des voies aériennes chez les sujets avec une HRB asymptomatique, quoique moindre que dans l'asthme.

L'inflammation bronchique retrouvée chez les asthmatiques engendre probablement le développement d'une HRB et, par la suite, les premiers symptômes associés au bronchospasme. L'inflammation constitue la première cible du traitement ; la prévention des contacts avec les facteurs déclenchants environnementaux, ainsi que le traitement pharmacologique anti-inflammatoire permettrait possiblement de maîtriser l'asthme chez la majorité des personnes atteintes de cette maladie.

Par ailleurs, l'asthme est une affection dans laquelle de nombreux facteurs génétiques semblent impliqués. La base génétique de l'asthme et des conditions qui lui sont associées demeure non-résolue. En effet, les gènes qui sous-tendent la réponse aux allergènes, la production d'IgE, la libération de médiateurs inflammatoires et le développement d'une HRB ne sont pas clairement identifiés. Ces travaux ont permis de déterminer :

- Une association entre l'atopie et un polymorphisme du récepteur à haute affinité pour les IgE (Glu237Gly FcεRI-β) ;
- La variabilité dans l'expression clinique de l'atopie associée à la présence de l'allèle Glu237Gly (homozygote normal, hétérozygote et homozygote muté) ;
- Le risque relatif associé à l'exposition continue aux animaux domestiques et à la présence du polymorphisme Glu237Gly FcεRI-β dans l'expression de l'asthme ;
- Une étroite liaison entre l'HRB et Glu237Gly FcεRI-β.

Perspectives

Nous avons soumis une étude qui représente une extension de ce programme de recherche. Celle-ci consistera à suivre certains sujets avec une HRB asymptomatique à risque de développer un asthme symptomatique sur une période de trois ans en utilisant un traitement anti-inflammatoire avant l'apparition des symptômes respiratoires, dans le but d'évaluer si cette médication pourrait inhiber le processus inflammatoire et donc retarder l'apparition de la symptomatologie asthmatique. Plus spécifiquement, l'évaluation comporterait un groupe sous traitement corticostéroïdien pairé à un groupe de sujets sous placebo, le suivi permettant de noter la fluctuation de l'HRB au fil des ans et les altérations de la paroi bronchique en relation avec le traitement stéroïdien. Enfin, en se basant sur les données recueillies et en raison de la grande hétérogénéité génotypique observée dans l'asthme, la mise en évidence de gènes associés à cette affection sera optimisée par l'étude d'une population isolée (par exemple celle de la région du Saguenay–Lac-St-Jean ou de la région de Rimouski et du bas du Fleuve Saint-Laurent). L'analyse par déséquilibre de liaison serait un outil de diagnostic génotypique intéressant. Contrairement aux analyses de liaisons conventionnelles, l'association par déséquilibre de liaison repose sur la structure de la population étudiée (effet fondateur) et tente de déterminer quelle est la probabilité que plusieurs individus atteints dans la population aient hérité du même allèle ancestral, servant ainsi d'indicateur diagnostique. Le résultat est obtenu en comparant la distribution allélique des individus affectés en comparaison à celle observée dans la population. Certaines régions chromosomiques ont déjà été associées à l'asthme par diverses équipes de chercheurs (5q, 6q, 11q, 12q, 13q, 14q, 21q) et il serait intéressant d'analyser ces régions dans notre population en multipliant les marqueurs de manière à mieux délimiter les régions associées.

RÉFÉRENCES

- Ackerman V, Marini M, Vittori E, Bellini A, Vassali G, Mattoli S. Detection of cytokines and their cell sources in bronchial biopsy specimens from asthmatic patients: relationship to atopic status, symptoms, and level of airway hyperresponsiveness. *Chest* 1994; 105: 687-696.
- Amelung PJ, Panhuysen CIM, Postma DS, Levitt RC, Koeter GH, Francomano CA, Bleecker ER, Meyers DA. Atopy, asthma and bronchial hyperresponsiveness: exclusion of linkage to markers on chromosome 11q and 6p. *Clin Exp Allergy* 1992; 22: 1077-1084.
- Amelung PJ, Postma DS, Xu J, Meyers DA, Bleecker ER. Exclusion of chromosome 11q and the FcεRI-β gene as etiologic factors in allergy and asthma in a population of Dutch asthmatic families. *Am J Crit Care Med* 1997; 155: A488.
- American Thoracic Society: Chronic bronchitis, asthma and pulmonary emphysema: Statement by the committee on diagnostic standards for nontuberculous respiratory diseases. *Am Rev Respir Dis* 1962; 85: 762-768.
- Aron Y, Desmazes-Dufeu N, Matran R, Polla BS, Dusser D, Lockhart A, Swierczewski E. Evidence of a strong positive association between atopy and HLA class II alleles DR4 and DR7. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 821-828.

- Azzawi M, Bradley B, Jeffery PK, Frew AJ, Wardlaw AJ, Knowles G, Assoufi B, Collins JV, Durham S, Kay AB. Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 1407-1413.
- Backer V, Ulrik CS. Development of lung function in relation to increased degree of bronchial responsiveness. *J Asthma* 1992; 29: 331-341.
- Beasley R, Roche WR, Roberts JA, Holgate ST. Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139: 806-817.
- Bentley AM, Maestrelli P, Saetta M, Fabbri LM, Robinson DS, Bradley BL, Jeffery PK, Durham SR, Kay AB. Activated T-lymphocytes and eosinophils in the bronchial mucosa in isocyanate-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 821-829.
- Bernot A. L'analyse des génomes : Cartographie, séquençage, identification des gènes. Éditions nathan, Paris, 1996 : 35-71.
- Betchtel JJ, Starr III T, Dantzker DR, Bower JS. Airway hyperreactivity in patients with sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 1981; 124: 759-761.
- Blank U, Ra C, Miller R, White K, Metzger H, Kinet JP. Complete structure and expression in transfected cells of high affinity IgE receptor. *Nature* 1989; 337: 187-189.

- Blumenthal MD, Marcus-Bagley D, Awdeh Z, Jonhson B, Yunis E, Alper CA. HLA-DR2, [HLA-B7, SC31, DR2], and [HLA-B8, SC01, DR3] haplotypes distinguish subjects with asthma from those with rhinitis only in ragweed pollen allergy. *J Immunol* 1992; 148 : 411-416.
- Blumenthal MN, Namboodiri K, Mendell N, Gleich P, Elston RC, Yunis E. Genetic transmission of IgE levels. *Am J Med Genet* 1981 ; 10 : 219-228.
- Blumenthal MN, Yunis E, Mendell N, Elston RC. Preventive allergy : genetics of IgE-mediated diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 78 : 962-968.
- Bond JF, Brauer AW, Segal DB, Nault AK, Rogers BL, Kuo MC. Native and recombinant Fel d 1 as probes into the relationship of allergen structure to human IgE reactivity. *Mol Immunol* 1993; 16: 1529-1541.
- Borecki IB, Rao JM, Lalouel M, McGue M, Gerrard JW. Demonstration of a common major gene with pleiotrophic effects on immunoglobulin E and allergy. *Genet Epidemiol* 1985 ; 2 : 327-338.
- Boulay JL, Paul WE. The interleukin-4 related lymphokines and their binding to hemapoietin receptors. *J Biol Chem* 1992; 267: 20525-20528.
- Boulet LP, Cartier A, Thompson NC, Robets RS, Dolovich J, Hargreave FE. Asthma and increases in nonallergic bronchial responsiveness from seasonal pollen exposure. *J Allergy Clin Immunol* 1983; 71: 399-406.

- Boulet LP, Laviolette M, Turcotte H, Milot J, Côté J, Cartier A, Dugas M, Malo JL, Boutet M. Bronchial subepithelial fibrosis correlates with airway responsiveness to methacholine. *Chest* 1997, *in press*.
- Boulet LP, Milot J, La Forge J, Laviolette M. Lymphocytic alveolitis and airway responsiveness in recently diagnosed sarcoidosis. *Sarcoidosis* 1992; 9: 43-48.
- Boulet LP, Morin D, Milot J, Turcotte H. Bronchial responsiveness increases after seasonal antigen exposure in non-asthmatic subjects with pollen-induced rhinitis. *Ann Allergy* 1989; 63: 114-119.
- Bousquet J, Blumenthal M, Blumenthal M, Burney P, Burr M, Bryan S. Evidence for an increase in atopic disease and possible causes. *Clin Exper Allergy* 1993; 23: 484-92.
- Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barnéon G, Ghavanian N, Enander I, Venge P, Ahlstedt S, Simony-Lafontaine J, Godard P. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med* 1990; 323: 1033-1039.
- Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Enander I, Venge P, Peterson C, Ahlstedt S, Michel FB, Godard P. Indirect evidence of bronchial inflammation in assessed by titration of inflammatory mediators in BAL fluid of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 649-660.

- Bradley BL, Azzawi M, Jacobson M, Assoufi B, Collins JV, Irani A-M, Schwartz LB, Durham SR, Jeffery PK, Kay AB. Eosinophils, T-lymphocytes, mast cells, neutrophils, and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects with asthma: Comparison with biopsy specimens from atopic subjects without asthma and normal control subjects and relationship to bronchial hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 661-674.
- Braman SS, Burrows AA, DeCotiis BA, Settupane GA, Corrao WM. Airway hyperresponsiveness in allergic rhinitis: a risk factor for asthma. *Chest* 1987; 91: 671-674.
- Brewster CEP, Howarth PD, Djukanovic R, Wilson J, Holgate ST. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990; 3: 507-511.
- Britton J, Pavord I, Richards K, Knox A, Winiewski A, Wahedna I, Kinnear W, Tattersfield A, Weiss S. Factors influencing in the occurrence of airway hyperreactivity in the general population: the importance of atopy and airway calibre. *Eur Respir J* 1994; 7: 881-887.
- Broide DH, Feinstein GS. Endobronchial allergen challenge in asthma. Demonstration of cellular source of granulocyte macrophage colony-stimulating factor by *in situ* hybridization. *J Clin Invest* 1991; 88: 1048-1053.
- Brusasco V, Crimi E, Gianiorio P, Lantero S, Rossi GA. Allergen-induced increase in airway responsiveness and inflammation in mild asthma. *J Appl Physiol* 1990; 69: 2209-2214.

- Burke D, Carle G, Olson M. Cloning of large segments of DNA into yeast by means of artificial chromosomes vectors. *Science* 1987; 236: 806-812.
- Burrows B, Sears MR, Flannery EM, Herbisson GP, Holdaway MD, Silva PA. Relation of the course of bronchial responsiveness from age 9 to age 15 to allergy. *Am J Crit Care Med* 1995; 152: 1302-1308.
- Campbell HD, Tucker WQJ, Hort Y, Martinson ME, Mayo G, Clutterbuck EJ, Sanderson CJ, Young IG. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of the gene encoding human eosinophil differentiation factor (interleukin 5). *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 6629-6633.
- Cartier A, Thompson NC, Frith PA, Roberts R, Hargreave FE. Allergens-induced increase in bronchial responsiveness to histamine: relationship to the late asthmatic response and change in airway caliber. *J Allergy Clin Immunol* 1982; 70: 170-177.
- Casale TB, Rhodes BJ, Donnelly AL, Weiler JM. Airway responses to methacholine in asymptomatic nonatopic cigarette smokers. *J Appl Physiol* 1987; 62: 1888-1892.
- Casale TB, Rhodes BJ, Donnelly AL, Weiler JM. Airway reactivity to methacholine in nonatopic asymptomatic adults. *J Appl Physiol* 1988; 64: 2558-2561.
- Chakir J, Laviolette M, Boutet M, Laliberté R, Dubé J, Boulet L-P. Lower airway remodeling in nonasthmatic subjects with allergic rhinitis. *Lab Invest* 1996; 75: 1-10).

- Chandrasekharappa SC, Rebelsky MS, Firak TA, Le Beau MM, Westbrook CA. A long-range restriction map of the interleukin-4 and interleukin-5 linkage group on chromosome 5. *Genomics* 1990; 6: 94-99.
- Chanez P, Bousquet J, Couret I, Cornillac L, Barnéon G, Vic P, Michel FB, Godard P. Increased numbers of hypodense alveolar macrophages in patients with bronchial asthma. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 923-930.
- Chetta A, Foresi A, Del Donno M, Bertorelli G, Pesci A, Olivieri O. Bronchial responsiveness to distilled water and methacholine and its relationship to inflammation and remodeling of the airways in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 910-917.
- Chetta A, Foresi A, Del Donno M, Bertorelli G, Pesci A, Olivieri O. Airways remodeling is a distinctive feature of asthma and is related to severity of disease. *Chest* 1997; 111: 852-857.
- Ciba foundation guest symposium. *Thorax* 1959; 44: 286-299.
- Cockcroft DW, Berscheid BA. Standardization of inhalation provocation tests. Dose versus concentration of histamine. *Chest* 1982 ; 82 : 572-575.
- Cockcroft DW, Berscheid BA. Measurement of responsiveness to inhaled histamine: comparison of FEV₁ and S Gaw. *Ann Allergy* 1983; 50: 374-377.
- Cockcroft DW, Berscheid BA, Murdock KY. Bronchial response to inhaled histamine in asymptomatic young smokers. *Eur J Respir Dis* 1983; 64: 207-211.

- Cockcroft DW, Murdock KY, Bersheid BA. Relationship between atopy and bronchial responsiveness to histamine in a random population. *Ann Allergy* 1984; 53 : 26-29.
- Collée JM, ten Kate LP, de Vries HG. Allele sharing on chromosome 11q13 in sibs with asthma and atopy. *Lancet* 1993; 342: 936.
- Cook RA, Vander Veer A. Human sensitisation. *J Immunol* 1916 ; 1 : 201-305.
- Cookson WOCM, Sharp PA, Faux JA, Hopkin JM. Linkage between immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q. *Lancet* 1989; 1: 1292-1294.
- Cookson WOCM, Young AJ, Sandford AJ, Shirakawa T. Maternal inheritance of atopic IgE responsiveness on chromosome 11q. *Lancet*, 1992 ; 340 : 381-384.
- Cullinan P. Personal communication. Based upon figures for 667 homes surveyed in 1994-95 in Ashford, Kent. *In* : Gordon S. Allergy to furred animals. *Clin Exp Allergy* 1997; 27 : 479-481.
- Curry JJ. The action of histamine on respiratory tract in normal and asthmatic subjects. *J Clin Invest* 1946; 25: 785-791.
- Curry JJ. Comparative action of mecholyl chloride and histamine. *J Clin Invest* 1947; 26: 430-438.

- Cuss FM, Dixon CM, Barnes PJ. Effects of platelets-activating factor on pulmonary function and bronchial responsiveness in man. *Lancet* 1986; 2: 189-192.
- Cutz E, Levison H, Cooper DM. Ultrastructure of the airways in children with asthma. *Histopathology* 1978; 2: 407-421.
- De Monchy JGR, Kauffman HF, Venge P, Koëter GH, Jansen HM, Sluiter HJ, De Vries K. Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131: 373-376.
- Diaz P, Gonzalez MC, Galleguillos FR, Ancic P, Cromwell O, Shepherd D, Durham SR, Gleich GJ, Kay AB. Leucocytes and mediators in bronchoalveolar lavage during allergen-induced late-phase asthmatic reactions. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139: 1383-1389.
- Djukanovic R, Lai CKW, Wilson JW, Britten KM, Wilson SJ, Roche WR, Howarth PH, Holgate ST. Bronchial mucosal manifestations of atopy: a comparison of markers of inflammation between atopic asthmatics, atopic nonasthmatics and healthy controls. *Eur Respir J* 1992; 5: 538-544.
- Djukanovic R, Walls A, Wilson JW, Walters C, Britten KM, Wilson SJ, Church MK, Howarth PH, Holgate ST. The effect of inhaled beclomethasone dipropionate (BDP) on airway mast cells, histamine and tryptase. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: A627.

- Djukanovic R, Wilson JW, Britten KM, Wilson SJ, Walls AF, Roche WR, Howarth PH, Holgate ST. Quantitation of mast cells and eosinophil in the bronchial mucosa of symptomatic atopic asthmatics and healthy control subjects using immunohistochemistry. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 863-871.
- Djukanovic R, Wilson JW, Britten KM, Wilson SJ, Walls AF, Roche WR, Howarth PH, Holgate ST. Effects of inhaled corticosteroids on airway inflammation and symptoms in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145 : 669-674.
- Dorrington KJ. Structure-function relationships in human immunoglobulin E. *Immunol Rev* 1978; 41: 3-25.
- Dowse GK, Turner KJ, Stewart GA, Alpers MP, Woolcock AJ. The association between *Dermatophagoides* mites and the increasing prevalence of asthma in village communities within the Papua New Guinea highlands. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 75: 75-83.
- Dunnill MS. The pathology of asthma, with special reference to changes in the bronchial asthma. *J Clin Path* 1960; 13: 27.
- Dunnill MS, Massarella GR, Anderson JA. A comparison of the quantitative anatomy of the bronchi in normal subjects, in status asthmaticus, in chronic bronchitis, and in emphysema. *Thorax* 1969; 24: 176-179.
- Edfors-Lubs ML. Allergy in 7000 twin pairs. *Acta Allergol* 1971; 26: 249-285.

- Edfors-Lubs ML. Empiric risks for genetic counseling in families with allergy. *J Pediatr* 1972; 80: 26.
- Eggleston PA. Management of allergies to animals. *Allergy Proc* 1992; 13: 289-292.
- Empey D, Laitinen L, Jacobs L, Gold W, Nadel J. Mechanisms of bronchial hyperreactivity in normal subjects after upper respiratory tract infection. *Am Rev Respir Dis* 1976; 113: 131-139.
- Finkelman FD, Katona IM, Urban JF, Snaper CM, Ohara J, Paul WE. Suppression of in vivo polyclonal IgE responses by monoclonal antibody to the lymphokine B-cell stimulatory factor 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 9675-9678.
- Flavahan NA, Slifman NR, Gleich GJ, Vanhoutte PM. Human eosinophil major basic protein causes hyperreactivity of respiratory smooth muscle. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138: 685-688.
- Freidhoff LR. Epidemiology of atopic allergy. *In* Marsh DG & Blumenthal MN (eds), *Genetic and Environmental Factors in Clinical Allergy*. University of Minnesota Press, Minneapolis, 1990; 53-72.
- Freidhoff LR, Meyers DA, Marsh DG. A genetic-epidemiologic study of human immune responsiveness to allergens in an industrial population. II. The associations among skin sensitivity, total serum IgE, age and sex in a stratified random sample. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 73: 490-499.

- Gautrin D, Boulet LP, Dugas M, Bh erer L, L'Archev eque J, Laviolette M, Côté J, Malo JL. Is reactive airway dysfunction syndrome (RADS) a variant of occupational asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 12-22.
- Gerrard JW, Cockcroft DW, Mink JT, Cotton DJ, Poonawala R, Dosman JA. Increased nonspecific bronchial reactivity in cigarette smokers with normal lung function. *Am Rev Respir Dis* 1980; 122: 577-581.
- Gerrard JW, Horne S, Vickers P, Cockcroft DW. Serum IgE levels in parents and children. *J Pediatr* 1974 ; 85 : 660-663.
- Gergen PJ, Mullally DI, Evans R. National survey of prevalence of asthma among children in the United States, 1976 to 1980. *Pediatrics* 1988; 81: 1-7.
- Gergen PJ, Weiss KB. The increasing problem of asthma in the United States. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 823-824.
- Gibson PG, Allen CJ, Yang JP, Wong BJ, Dolovich J, Denburg J, Hargreave FE. Intraepithelial mast cells in allergic and non allergic asthma: assessment using bronchial brushings. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 80-86.
- Gibson PG, Mattoli S, Sears MR, Dolovich J, Hargreave FE. Increased peak flow variability in children with asymptomatic airway hyperresponsiveness. *Eur Respir J* 1995; 8: 1731-1735.
- Gleich GJ, Frigas E, Loegering DA, Wassom DL, Steinmuller D. Cytotoxic properties of the eosinophil major basic protein. *J Immunol* 1979; 123: 2925-2527.

- Gonzalez MC, Diaz P, Galleguillos FR, Ancic P, Cromwell O, Kay AB. Allergen-induced recruitment of bronchoalveolar (OKT4) and suppressor (OKT8) T-cells in asthma: relative increases in OKT8 cells in single early responders compared with those in late-phase responders. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136: 600-604.
- Gordon JR, Burd PR, Galli SR. Mast cells as source of multifunctional cytokines. *Immunol Today* 1990; 11: 458-464.
- Gosset P, Tsicopoulos A, Wallaert B, Vannimenu C, Joseph M, Tonnel AB, Capron A. Increased secretion of tumor necrosis factor α and interleukin 6 by alveolar macrophages consecutive to the development of the late asthmatic reaction. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 561-571.
- Gottlieb MJ. Relation of intranasal disease in the production of bronchial asthma. *JAMA* 1925; 85: 105-107.
- Gulbenkian AR, Egan RW, Fernandez X, Jones H, Kreutner W, Kung T, Payvandi F, Sullivan L, Zurcher JA, Watnick AS. Interleukin-5 modulates eosinophil accumulation in allergic guinea pig lung. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 263-265.
- Gundel RH, Wegner CD, Letts LG, Gleich GJ. Human eosinophil major basic protein induces airway constriction and airway hyperresponsiveness in primates. *J Clin Invest Med* 1991; 87: 1470-1473.

- Gundel RH, Wegner CD, Torcellini CA, Clarke CC, Haynes N, Rothlein R, Smith CW, Letts LG. Endothelial leucocyte adhesion molecule-1 mediates antigen-induced acute airway inflammation and late phase airway obstruction in monkeys. *J Clin Invest* 1991; 88: 1407-1411.
- Gundel RH, Wegner CD, Torcellini CA, Letts LG. The role of intracellular adhesion molecule 1 in chronic airway inflammation. *Clin Exp Allergy* 1992; 22: 569-575.
- Haahtela T, Laitinen A, Laitinen LA. Using biopsies in the monitoring of inflammation in asthmatic patients. *Allergy* 1993; 48: 65-69
- Hamaguchi Y, Kanakura Y, Fujita J, Takeda S, Nakano T, Tarui S, Honjo T, Kitamura Y. Interleukin-4 as an essential factor for in vitro clonal growth to murine connective tissue-type mast cells. *J Exp Med* 1987; 165: 268-273.
- Hamid Q, Azzawi M, Ying S, Moqbel R, Wardlaw AJ, Corrigan CJ, Bradley B, Durham SR, Collins JV, Jeffery PK. Expression of mRNA for interleukin-5 in mucosal bronchial biopsies from asthma. *J Clin Invest* 1991; 87: 1541-1546.
- Hanson B, McGue M, Roitman-Johnson B, Segal S, Bouchard TJ, Blumenthal MN. Atopic disease and immunoglobulin E in twins reared apart and together. *Am J Hum Genet* 48: 873-879.

- Harisson AC, Asher MI, Pattemore PK, Mitchell EA, Rea HH, Stewart A. Do racial differences in asthma prevalence and severity account for racial differences in asthma admission and mortality rates? *Am Rev Respir Dis* 1986; 133: A178.
- Hassetedt SJ, Meyers DA, Marsh DG. Inheritance of immunoglobulin E: genetic model fitting. *Am J Med Genet* 1983; 14: 61-66.
- Helm B, Marsh P, Vercelli D, Padlan E, Gould H, Geha R. The mast cell binding site on human immunoglobulin E. *Nature* 1988; 331: 180-183.
- Hill MR, Cookson WOCM. A new variant of the β subunit of the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc ϵ RI- β E237G): associations with measures of atopy and bronchial hyperresponsiveness. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 959-962.
- Hizawa N, Yamaguchi E, Furuya K, Ohnuma N, Kodama N, Kojima J, Ohe M, Kawakami Y. Linkage between high serum total IgE levels and D11S97 on chromosome 11q13 in Japanese subjects. *J Med Genet* 1995 ; 46 : 228-232.
- Hizawa N, Yamaguchi E, Ohe M, Itho A, Furuya K, Onhuma N, Kawakami Y. Lack of linkage between atopy and locus 11q13. *Clin Exp Allergy* 1992; 22: 1065-1069.
- Hollaway JW, Doull I, Begishvili B, Beasley R, Holgate ST, Howell WM. Lack of evidence of a significant association between HLA-DR, DQ and DP genotypes and atopy in families with HDM allergy. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 1142-1149.

- Hopp RJ, Bewtra AK, Biven R, Nair NM, Townley. Bronchial reactivity pattern in nonasthmatic parents of asthmatics. *Ann Allergy* 1988; 61: 184-86.
- Hopp RJ, Bewtra AK, Nair NM, Biven R, Townley RG. Pattern of methacholine-induced bronchial reactivity in siblings of asthmatic subjects. *Pediatr Asthma Immunol* 1987; 1: 103-109.
- Hopp RJ, Bewtra AK, Nair NM, Townley RG. Specificity and sensitivity of methacholine inhalation challenge in normal and asthmatic children. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 74: 154-158.
- Hopp RJ, Bewtra A, Nair NM, Townley RG. The effect of age on methacholine response. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 76: 609-613.
- Hopp RJ, Bewtra AK, Nair NM, Watt GD, Townley RG. Methacholine inhalation challenge studies in a selected pediatric population. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134: 994-998.
- Hopp RJ, Brennan B, Degan J, Biven RE, Bewtra AK, Townley RG. Longitudinal measurement of non-specific bronchial hyperresponsiveness in non-allergic children and adolescents. *Pediatr Allergy Immunol* 1992; 3: 84-90.
- Houdson JC, De Navasquez S, Trounce JR. A clinical and pathological study of fatal cases of status asthmaticus. *Thorax* 1953; 8: 207-213.

- Hsieh KH. Changes of lymphoproliferative responses of T cell subsets to allergen and mitogen after hyposensitization in asthmatic children. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 74: 34-40.
- Hsieh KH. Altered interleukin-2 (IL-2) production and responsiveness after hyposensitization to house dust. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 76: 188-194.
- Hwang KC, Fikrig SM, Friedman HM, Gupta S. Deficient concanavalin A-induced suppressor cell-activity in patients with bronchial asthma, allergic rhinitis and atopic dermatitis. *Clin Allergy* 1985; 15: 67-72.
- Ihle JN, Keller J, Oroszalan S, Henderson LE, Copeland TD, Fitch F, Prystowsky MB, Goldwasser E, Schrader JW, Palaszynski E, Dy M, Lebel B. Biologic properties of homogenous interleukin 3. Demonstration of WEHI-3 growth factor activity, mast cell growth factor activity, P cell-stimulating factor activity, colony-stimulating factor activity, and histamine-producing cell-stimulating factor activity. *J Immunol* 1983; 131: 282-287.
- Irani AM, Schwartz LB. Mast cell heterogeneity. *Clin Exp Allergy* 1989; 19:143-155.
- Ishikawa T, Kitao Y. Genetic control of *in vivo* IgE antibody production specific to *Dermatophagoides farinae*. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985; 77 : 210-212.

Jeffery PK, Godfrey RW, Ädelroth E, Nelson F, Rogres A, Johansson SA. Effects of treatment on airway inflammation and thickening of basement membrane reticular collagen in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 890-899.

Jeffery PK, Wardlaw AJ, Nelson FC, Collins JV, Kay AB. Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140: 1745-1753.

Johnston IDA, Bland JM, Anderson HR. Ethnic variation in respiratory morbidity and lung function in childhood. *Thorax* 1987; 42 : 542-548.

Jones A. Asymptomatic bronchial hyperreactivity and the development of asthma and other respiratory tract illnesses in children. *Thorax* 1994; 49: 757-761.

Josephs LK, Gregg I, Mullee MA, Holgate ST. Nonspecific bronchial reactivity and its relationship to the clinical expression of asthma. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140: 350-357.

Josephs LK, Gregg I, Holgate ST. Does non-specific bronchial responsiveness indicate the severity of asthma? *Eur Respir J* 1990; 3: 220-227.

Juniper E, Cockcroft DW, Hargreave FE. 1991. Histamine and methacholine inhalation tests: Tidal breathing method. Laboratory procedure and standardization. Canadian Thoracic Society. AB Draco, Lund, Sweden.

- Juniper EF, Frith PA, Hargreave FE. Airway responsiveness to histamine and methacholine: relationship to minimum treatment to control symptoms of asthma. *Thorax* 1981; 36: 575-579.
- Juniper EK, Kline PA, Vanzieleghem MA, Ramsdale EH, O'Byrne P, Hargreave FE. Effect of long-term treatment with inhaled corticosteroids on airway hyperresponsiveness and clinical asthma in non steroid-dependent asthmatics. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 832-836.
- Kanner RE, Connet JE, Altose MD, Buist AS, Lee WW, Tashkin DP, Wise RA. Gender difference in airway hyperresponsiveness in smokers with mild COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 956-961.
- Kaplan JC, Delpech M. *Biologie moléculaire et médecine*. 2^e Ed, Paris, Médecine-Sciences Flammarion, 1993.
- Kay AB. Asthma inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 893-910.
- Kay AB, Diaz P, Carmichael J, Grant IWB. Corticosteroid-resistant chronic asthma and monocyte complement receptors. *Clin Exp Immunol* 1981; 44: 576-580.
- Keating KM, Segal DB, Craig SJ, Nault AK, Semensi V, Wasserman AS, Counsell CM, Bond JF. Enhanced immunoreactivity and preferential heterodimer formation of reassociated Fel d I recombinant chains. *Mol Immunol* 1995; 32: 287-293.

- Kelleher K, Bean K, Clark Sc. Human interleukin-9: genomic sequence, chromosomal location, and sequences essential for its expression in human T-cell leukemia virus (HTLV)-I-transformed human T cells. *Blood* 1991; 77: 1436-1441.
- Kelley J. Cytokines of the lung. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 765-788.
- Kelly WJW, Hudson I, Phelan PD, Pain MCF, Olinsky O. Childhood asthma in adult life: A further study at 28 years of age. *BMJ* 1987; 294: 1059-1062.
- Kelly C, Ward C, Stenton CS, Bird G, Hendrick DJ, Walters EH. Number and activity of inflammatory cells in bronchoalveolar lavage fluid and their relation to airway responsiveness. *Thorax* 1988; 43: 684-692.
- Kemeny DM, Noble A, Holmes BJ, Diaz-Sanchez D, Lee TH. The role of CD8⁺ T cells in immunoglobulin E regulation. *Allergy* 1995; 50: 9-14.
- Kimani G, Tonnesen MG, Henson PM. Stimulation of eosinophil adherence to human vascular endothelial cells in vitro by platelet-activating factor. *J Immunol* 1988; 140 : 3161-3166.
- Konig P, Godfrey S. Prevalence of exercise-induced bronchial lability in families of children with asthma. *Arch Dis Child* 1973; 48: 513-518.
- Lacoste JY, Chanez P, Paganin F, Godard P, Michel FB, Bousquet J. Inflammation bronchique de l'asthmatique. *Rev Mal Resp* 1991; 8: 533-541.

Laitinen LA, Haahtela T, Kava T, Laitinen A. Non-specific bronchial reactivity and ultrastructure of the airway epithelium in patients with sarcoidosis and allergic alveolitis. *Eur J Respir Dis* 1983; 64(Suppl 131): 267-284.

Laitinen LA, Laitinen A, Haahtela T. A comparative study of the effects of an inhaled corticosteroid, budesonide, and a β 2-agonist, terbutaline, on airway inflammation in newly diagnosed asthma : a randomized, double-blind, parallel-group controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 32-42.

Laitinen LA, Laitinen A, Haahtela T. Airway mucosal inflammation even in patients with newly diagnosed asthma. *Am Rev Respir Dis* 1983; 147: 697-704.

Lam S, LeRiche J, Phillips D, Chan-Yeung M. Cellular and protein changes in bronchial lavage fluid after late asthmatic reaction in patients with red cedar asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 80: 44-50.

Lamas AM, Marcotte GV, Schleimer RP. Human endothelial cells prolong eosinophil survival: regulation by cytokines and glucocorticoids. *J Immunol* 1989; 142: 3978-3984.

Laprise C, Boulet LP. Airway responsiveness and atopy in families of patients with asthma. *Clin Invest Med* 1996; 19: 461-469.

Lee TH, Assoufi BK, Kay AB. The link between exercise, respiratory heat exchange, and the mast cell in bronchial asthma. *Lancet* 1983; 1: 520-522.

- Lee TH, Lane SJ. The role of macrophages in the mechanisms of airway inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: S27-S30.
- Leung DYM, Geha RS. Regulation of the human IgE antibody response. *Intern Rev Immunol* 1987; 2: 75-91.
- Leynaert B, Bousquet J, Neukirch C, Korobaeff M, Liard R, Neukirch F. Bronchial hyperresponsiveness in adults with allergic rhinitis: A population study. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155(4): A79.
- Li PK, Lai CK, Poon AS, Chan CH, Lai KN. Lack of association between HLA-DQ and-DR genotypes and asthma in Southern Chinese patients. *Clin Exp Allergy*. 1995; 25: 323-331.
- Lopez AF, Sanderson CJ, Gamble JR, Campbell HD, Young IG, Vadas MA. Recombinant human interleukin-5 is a selective activator of human eosinophil function. *J Exp Med* 1988; 167: 219-224.
- Lungren R. Scanning electron microscopic studies of bronchial mucosa before and during treatment with beclomethasone dipropionate inhalations. *Scand J Respir Dis* 1977; (Suppl)101: 179-187.
- Lungren R, Söderberg M, Hörstedt P, Stenling R. Morphological studies of mucosal biopsies from asthmatics before and after ten years of treatment with inhaled steroids. *Eur Respir J* 1988; 1: 883-889.

- Lympany P, Welsh K, MacCochrane G. Genetic analysis, using DNA polymorphism, of the linkage between chromosome 11q13 and atopy and bronchial hyperresponsiveness to metacholine. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 619-628.
- Malo JL, Ghezso H, L'Archevêque J, Cartier A. Late asthmatic reactions to occupational sensitizing agents: frequency of changes in nonspecific bronchial responsiveness and of response to inhaled beta-2 adrenergic agent. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85: 834-842.
- Malo JL, Pineau L, Cartier A. Reference values of the provocative concentrations of methacholine that cause 6% and 20% changes in forced expiratory volume in one seconde in a normal population. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128 : 8-11.
- Mark H, Johnston P, Abbey H, Talamo RC. Prevalence of asthma and health service utilization of asthmatic children in an inner city. *J Allergy Clin Immunol* 1982; 70: 367-372.
- Marsh DG, Meyers DA, Bias WB. The epidemiology and genetics of atopic allergy. *N Engl J Med* 1981 ; 305 : 1551-1559.
- Marsh DG, Meyers DA, Freidhoff LR, Hussain R, Hsu SH, Bias WB. Association of HLA phenotypes A1, B8, Dw3 and A3, B7, Dw2 with allergy. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1981; 66(S1) : 48-50.

- Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, Ghosh B, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Schou C, Krihnaswamy G, Beaty TH. Linkage analysis of IL-4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum IgE concentrations. *Science* 1994; 264: 1152-1156.
- Martin AJ, McLennan LA, Landau LI, Phelan PD. The natural history of childhood asthma to adult life. *BMJ* 1980; 280 : 1397-400.
- Martinati LC, Trabetti E, Casartelli A, Boner AL, Pignatti PF. Affected sib-pair and mutation analyses of the high affinity IgE receptor beta chain locus in Italian families with atopic asthmatic children. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 1682-1685.
- McKenzie AN, Li X, Largaespada DA. Structural comparison and chromosomal localization of the human and mouse IL-13 genes. *J Immunol* 1993; 150: 5436-5444.
- Melewicz FM, Kline NE, Cohen AB, Spiegelberg HL. Characterization of Fc receptor for IgE on human alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol* 1982; 49: 364-370.
- Metcalf D, Begley CG, Johnson GR, Nicola NA, Vadas MA, Lopez AF, Williamson DJ, Wong GG, Clark SC, Wang EA. Biologic properties in vitro of a recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1986; 67: 37-45.

- Meyers DA, Beaty TH, Colyer CR, Marsh DG. Genetic of total serum IgE levels : a regressive model approach to segregation analysis. *Genet Epidemiol* 1991; 8 : 351-359.
- Meyers DA, Beaty TH, Freidhoff LR, Marsh DG. Inheritance of serum IgE (basal levels) in man. *Am J Hum Genet* 1987; 41: 51-62.
- Meyers D, Scott AF, Panhuysen CIM, Amelung PJ, Postma DS, Bleecker ER. Novel II-9 polymorphism in asthma families. *Am J Respir crit care Med* 1997; 155: A488.
- Moffat MF, Hill MR, Cornelis F, Hopkin J, Cookson WOCM. Genetic linkage of T-cell receptor α/β complex to specific IgE responses. *Lancet* 1994 ; 343 : 1597-1600.
- Moffat MF, James AL, Musk AW, Cookson WOCM. Tumour necrosis factor: genetic associations with asthma-related traits in a population sample. *Am J Respir crit Care med* 1997; 155: A490.
- Montgomery SJ. Epidemiology and natural history of asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis (eczema). In : Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW, eds. *Allergy: principles and practice*. Third ed. Vol 2. St-Louis : C.V. Mosby 1988; 891-929.
- Monkare S. Clinical aspects of farmer's lung: airway reactivity, treatment and prognosis. *Eur J Respir Dis* 1984; 65 (Suppl 137): 2-67.

- Montefort S, Roche WR, Holgate ST. Bronchial epithelial shedding in asthmatics and non-asthmatics. *Respir Med* 1993; 87(Suppl): 9-11.
- Montefort S, Roche WR, Howarth PH, Baker J. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) expression in the bronchial mucosa of normal and asthmatic subjects. *Eur Respir J* 1992; 5: 815-823.
- Muller BA, Leick CA, Smith RM, Baker J. Comparisons of specific and non-specific bronchoprovocation in subjects with asthma, rhinitis , and healthy subjects. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91: 758-772.
- Ober C, Meyers DA, Marsh DG, Blumenthal MN, Cox NJ, Bleecker ER, Beaty T, Rich SS, Maestri NE, Weber JL, Banks-Schlegel S. Genome-wide search for asthma susceptibility loci in U.S. populations. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: A257.
- O'Byrne P. Neutrophil dynamics in airway disease. In: Busse WW, Holgate ST, eds. *Asthma and rhinitis*. Boston : Blackwell Scientific Publication, 1995 : 389-396.
- Ohashi Y, Motojima S, Fukuda T, Makino S. Airway hyperresponsiveness, increased intracellular spaces of bronchial epithelium and increased infiltration of eosinophils and lymphocytes in bronchial mucosa in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 1469-1476.
- Osler W. *The principles and practice of medicine*. Edinburgh : YJ Pentland, 1892.

- Nelson HS. The natural history of asthma. *Ann Allergy* 1991; 66: 196-203.
- Panhuysen CIM, Xu J, Bleecker ER, Meyers DA, Postma DS. Evidence for a major locus for bronchial hyperresponsiveness independent of the locus regulating total serum IgE levels. University of Maryland. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: A489.
- Pederson PA, Weeke ER. Asthma and allergic rhinitis in the same patient. *Allergy* 1983; 38: 25-29.
- Pepys J. Skin testing. *Br J Hosp Med* 1975; 14: 412-417.
- Perichon B, Krishnamoorthy R. Asthma and HLA system. *Allerg Immunol* 1991; 23 : 301-307.
- Pesci A, Foresi A, Bertorelli G, Chetta A, Oliveri D. Histochemical characteristics and degranulation of mast cells in epithelium and lamina propria of bronchial biopsies from asthmatic and normal subjects. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 684-689.
- Pin IP. Mécanismes de l'hyperréactivité bronchique : rôle de l'inflammation des voies aériennes et de l'atopie. *Rev Mal Resp* 1994; 11: 111-122.
- Pin IP, Freitag AP, O'Byrne P, Girgis-Gabardo A, Watson RM, Dolovich J, Denburg JA, Hargreave FE. Changes in the cellular profile of induced-sputum after allergen-induced asthmatic responses. *Am Rev respir Dis* 1992; 145; 1265-1269.

- Pin IP, Radford S, Kolendowicz R, Jennings B, Denburg JA, Hargreave FE, Dolovich J. Airway inflammation in symptomatic and asymptomatic children with methacholine airway hyperresponsiveness. *Eur respir J* 1993; 6: 1245-1256.
- Platts-Mills TAE, Mitchell EB, Nock P, Tovey ER, Moszoro H, Wilkins SR. Reduction of bronchial hyperreactivity during prolonged allergen avoidance. *Lancet* 1982; 2: 675-678.
- Postma DS, Bleecker ER, Amelung PJ, Holroyd KJ, Xu J, Panhuysen CIM, Meyers DA, Levitt RC. Genetic susceptibility to asthma. Bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy. *N Engl J Med* 1995; 333: 894-900.
- Poston RN, Chanez P, Lacoste PY, Litchfield T, Lee TH, Bousquet J. Immunohistochemical characterization of the cellular infiltration of the cellular infiltration in asthmatic bronchi. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 918-921.
- Power C, Streenan S, Hurson B, Burke C, Poulter LW. Distribution of immunocompetent cells in the bronchial wall of clinically healthy subjects showing bronchial hyperresponsiveness. *Thorax* 1993; 48: 1125-1129.
- Poznansky MC, Gordon ACH, Grant IWB, Willie AH. A cellular abnormality in glucocorticoid resistant asthma. *Clin Exp Immunol* 1985; 61: 135-142.
- Ramsdale EH, Hargreave FE. Differences in airway responsiveness in asthma and airflow chronic obstruction. *Med Clin Am* 1990; 74: 741-750.

- Rich SS, Roitman-Johnson B, Greeberg B, Robert S, Blumenthal MN. Genetic analysis of atopy in three large kindreds: no evidence of linkage to D11S97. *Clin Exp Allergy* 1992; 22: 1070-1076.
- Rijcken Bert, Schouten JP, Weiss ST, Meinesz AF, Vries KD, Van Der Lende R. The distribution of bronchial responsiveness to histamine in symptomatic and asymptomatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140: 615-623.
- Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB. Predominant Th2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992; 326: 298-304.
- Roche WR. Fibroblasts and asthma. *Clin Exp Allergy* 1991; 21: 545-548.
- Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* 1989; 1: 520-524.
- Roche WR, Montefort S, Baker J, Holgate ST. Cell adhesion molecules and the bronchial epithelium. *Am Rev Respir Dis* 1993; 14 (Suppl): 79-82.
- Romagnani S, Maggi E, Del Prete GF, Parronchi P, Macchia D, Tiri A, Ricci M. Role of interleukin 4 and gamma interferon in the regulation of human IgE synthesis: possible alterations in atopic patients. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1989; 88: 111-113.
- Rothlein R, Dustin ML, Martin SD, Springer TA. A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J Immunol* 1986; 137: 1270-1274.

- Ryan G, Latimer KM, Dolovich J, Hargreave FE. Bronchial responsiveness to histamine: relationship to diurnal variation of peak-flow rate, improvement after bronchodilator, and airway caliber. *Thorax* 1982; 37: 423-429.
- Salob SP, Lavery A, Atherton DJ. Bronchial hyperresponsiveness in children with atopic dermatitis. *Pediatrics* 1993; 91: 13-16.
- Sanchez I, Powell RE, Pasterkamp H. Wheezing and airflow obstruction during methacholine challenge in children with cystic fibrosis and normal children. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 705-709.
- Sanderson CJ, Warren DJ, Strath M. Identification of a lymphokine that stimulates eosinophil differentiation in vitro. *J Exp Med* 1985; 162: 60-70.
- Sandford AJ, Weir TD, Zhu S, Paré P. Prevalence of the Glu237Gly polymorphism of the β subunit of the high affinity IgE receptor gene in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: A490.
- Savolainen J, Uitti J, Halmepuro L, Nordman H. IgE response to fur animal allergens and domestic animal allergens in fur farmers and fur garment workers. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 501-509.
- Schou C. Defining allergens of mammalian origin. *Clin Exp Allergy* 1993; 23: 7-14.

Schuler GD, Boguski MS, Stewart EA, Stein LD, Gyapay G, Rice K, White RE, Rodriguez-Tome P, Aggarwal A, Bajorek E, Bentolila S, Birren BB, Butler A, Castle AB, Chiannikulchai N, Chu A, Clee C, Cowles S, Day PJR, Dibling T, Drouot N, Dunham I, Duprat S, East C, Edwards C, Fan JB, Fang N, Fizames C, Garrett C, Green L, Hadley D, Harris M, Harrison P, Brady S, Hicks A, Holloway E, Hui L, Hussaine S, Louis-Dit-Sully C, Ma J, MacGilvery A, Mader C, Maratukulam A, Matise TC, McKusick KB, Morissette J, Mungall A, Muselet D, Nusbaum HC, Page DC, Peck A, Perkins S, Piercy M, Qin F, Quackenbush J, Ranby S, Reif T, Rozen S, Sanders C, She X, Silva J, Slonim DK, Soderlund C, Sun W-L, Tabar P, Thangarajah T, Vega-Czarny N, Vollrath D, Voyticky S, Wilmer T, Wu X, Adams MD, Auffray C, Berry R, Brandon R, Dehejia A, Goodfellow PN, Houlgatte R, Hudson JR, Ide SE, Iorio KR, Lee WY, Seki N, Nagase T, Ishikawa K, Nomura N, Phillips C, Polymeropoulos MH, Sandusky M, Schmitt K, Sikela JM, Swanson K, Torres R, Venter JC, Walter NAR, Beckmann JS, Weissenbach J, Myers RM, Cox DR, James MR, Bentley D, Deloukas P, Lander ES & Hudson TJ (1996). A Gene Map of the Human Genome. *Science* ; 274: 540-546.

Schwartz M. Heredity in bronchial asthma. *Acta Allergol* 1952; 5 (Suppl.) : 2.

Sears MR, Burrows B, Flannery EM, Herbisson GP, Hewitt CJ, Holdaway MD. Relation between airway responsiveness and serum IgE in children with asthma and in apparently normal children. *N Engl J Med* 1991; 325: 1067-1071.

- Sedgwick JB, Calhoun J, Gleich GJ, Kita H, Abrams JS, Schwartz LB, Volovitz B, Ben-Yaakov M, Busse WW. Immediate and late airway response of allergic rhinitis patients to segmental antigen challenge. Characterization of eosinophils and mast cells mediators. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 1274-1281.
- Shirakawa T, Hashimoto T, Furuyama J, Takeshita T, Morimoto K. Linkage between severe atopy and chromosome 11q in Japanese families. *Clin Genet* 1994; 46: 228-32.
- Shikawa T, Li A, Dubowitz M, Dekker JW, Shaw AE, Faux JA, Ra C, Cookson WOCM, Hopkin JM. Association between atopy and variants of the β subunit of the high-affinity immunoglobulin E receptor. *Nature genet* 1994; 7: 125-130.
- Shirakawa T, Mao XQ, Sasaki S, Enomoto T, Kawai M, Morimoto K, Hopkin J (1996) Association between atopic asthma and a coding variant of Fc ϵ RI β in a Japanese population. *Hum Mol Genet* 5: 1129-1130.
- Shirakawa T, Mao XQ, Sasaki S, Enomoto T, Kawai M, Yoshikawa T, Hashimoto T, Furuyama J, Hopkin JM, Morimoto K. Association between atopy and Fc ϵ RI- β variants in Japanese population. *In* Sasaki S, Miyamoto T & Hopkin JM, editors. *Recent Advances in Prediction and Prevention of Childhood Asthma*. Churchill-Livingston, Osaka, 1995.
- Snashall PD, Pauwels R. Definitions and historical perspectives. *In*: *Bronchial hyperresponsiveness: normal and abnormal control, assessment and therapy*. Oxford : Blackwell Scientific Publications 1987: 1-4.

- Sodeberg M, Hellstrom S, Sandstrom T, Lundberg R, Bergh A. Structural characterization of bronchial mucosal biopsies from healthy volunteers: a light and electron microscopical study. *Eur respir J* 1990; 3: 261-266.
- Sporik R, Holgate ST, Platts-Mills TAE, Cogswell JJ. Exposure to house-dust mite allergen (*Der p I*) and the development of asthma in childhood. *New Engl J Med* 1990; 323: 502-507.
- Thomas NS, Wilkinson J, Lio P, Doull I, Holgate ST, Morton NE. Lack of evidence for genetic linkage of asthma and atopy to chromosomes 5q and 11q. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: A491.
- Trigg CJ, Bennet JB, Tooley M, Sibbald B, D'Souza MF, Davies RJ. A general practice based survey of bronchial hyperresponsiveness and its relation to symptoms, sex, age, atopy, and smoking. *Thorax* 1990; 45: 866-872.
- Turner MW, Brostoff RS, Wells RS, Stokes CR, Soothill JF. HLA in eczema and hayfever. *Clin Exp Immunol* 1977; 27 : 43-47.
- Van Haren EHJ, Lammers J WJ, Festen J, Van Herwaarden CLA. Bronchial vagal tone and responsiveness to histamine, exercise and bronchodilators in adult patients with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 1992; 5 : 1083-1088.
- Van Leeuwen BH, Martinson ME, Webb Gc, Young IG. Molecular organization of the cytokine gene cluster involving the human IL-3, IL-4, IL-5 and GM-CSF genes, on chromosome 5. *Blood* 1989; 73: 1142-1148.

- Varpela E, Laitinen LA, Keskinen H, Korhola O. Asthma, allergy, and bronchial hyperreactivity to histamine in patients with bronchiectasy. *Clin Allergy* 1978; 8: 273-280.
- Verma VK, Cockcroft DW, Dosman JA. Airway hyperresponsiveness to inhaled histamine in chronic obstructive airway disease. *Chest* 1988; 94: 457-461.
- Vignola AM, CaMBPell AM, Chanez P, Bousquet J, Paul-Lacoste P, Michel FB, Godard P. HLA-Dr and ICAM-1 expression on bronchial epithelial cells in asthma and chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 1993;
- Waite DA, Eyles EF, Tonkin SL, O'Donnell TV. Asthma prevalence in Tokelauan children in two environments. *Clin Allergy* 1980; 10: 71-75.
- Walker C, Kaegi MK, Braun P, Blaser K. Activated T cells and eosinophilia in bronchoalveolar lavages from subjects with asthma correlated with disease severity. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 935-942.
- Walsh GM, Hartnell A, Wardlaw AJ, Kurihara K, Sanderson CJ, Kay AB. IL-5 enhances in vitro adhesion of human eosinophil but not neutrophils, in a leucocyte integrin (CD11/CD18)-dependent manner. *Immunology* 1990; 71: 258-265.
- Wardlaw AJ, Dunnette S, Gleich GJ, Collins JV, Kay AB. Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma. *Am Rev Respir* 1988; 137: 62-69.

- Wardlaw AJ, Hay H, Cromwell O, Collins JV, Kay AB. Leukotrienes, LTC₄ and LTB₄, in bronchoalveolar lavage fluid in bronchial asthma and other respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84: 19-26.
- Weiss ST, Tager IB, Weiss JW, Munoz A, Speizer FE, Ingram RH. Airway responsiveness in a population sample of adults and children. *Am Rev Respir Dis* 1984; 129: 898-902.
- Wenzel SE, Fowler AA, Schwartz LB. Activation of pulmonary mast cells by bronchoalveolar antigen challenge. *In vivo* release of histamine and tryptase in atopic subjects with or without asthma. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137: 1002-1008.
- Wilkinson Jane, Holgate ST. Candidate locus approach to the genetics of asthma and atopy : The Southampton study. *In* Chanez P, Bousquet J, Michel FB, Godard P, editors. From genetics to quality of life ; the optimal treatment and management of asthma. Proceedings of the XVth Congress of asthmology, Montpellier 1996 ; 5-8.
- Yamaguchi Y, Hayashi Y, Sugama Y, Miura Y, Kasahara T, Kitamura S, Torisu M, Mita S, Tominaga A, Takatsu K. Highly purified murine interleukin-5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival: IL-5 is an eosinophil chemotactic factor. *J Exp Med* 1988; 167: 1737-1742.
- Yan K, Salome CM, Woolcock AJ. Prevalence and nature of bronchial hyperresponsiveness in subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 25-29.

Young RP, Dekker JW, Wordsworth BP, Schou C, Pile KD, Matthiesen F, Rosenberg WM, Bell JI, Hopkin JM, Cookson WOCM. HLA-DR and HLA-DP genotypes and immunoglobulin E responses to common major allergens. *Clin Exp Allergy* 1994; 24 : 431-39.

Young RP, Sharp PA, Lynch JR, Faux JA, Lathrop GM, Cookson WOCM, Hopkin JM. Confirmation of genetic linkage between atopic IgE responses and chromosome 11q13. *J Med Genet* 1992; 29: 236-238.

Zhang L, Kisil FT, Sehon AH, Mohapatra SS. Allergenic and antigenic cross-reactivity of group IX grass pollens allergens. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991; 96: 28-34.

Zhong NS, Chen RC, Yang MO, Wu ZY, Zheng JP, Li YF. Is asymptomatic bronchial hyperresponsiveness an indication of potential asthma? A two-year follow-up of young students with bronchial hyperresponsiveness. *Chest* 1992; 102: 1104-1109.

ANNEXE I

QUESTIONNAIRE D'ÉVALUATION DE LA CONDITION RESPIRATOIRE

Ce questionnaire est distribué à toute personne participant à cette étude et a pour but de mettre en relation la perception que vous avez face à votre condition respiratoire aux résultats que nous obtiendrons lors des analyses de celle-ci.

Nous vous demandons donc de répondre au questionnaire, donné par la personne responsable de cette étude, suivant le meilleur de vos connaissances. En ce sens, la personne ressource pourra, dans la plupart des cas, répondre à vos questions. Si vous estimez qu'une ou plusieurs questions ne décrivent pas votre condition de façon adéquate, sentez-vous libre d'ajouter vos commentaires afin de clarifier la réponse que vous donnerez.

Renseignement généraux

Date: ___/___/___
Jr Ms An

Numéro : _____
(complété par le chercheur)

Nom : _____

Prénom : _____

Sexe : _____ Âge : _____

Date de naissance : _____
Jr Ms An

Adresse : _____
civile, nom de la rue, # App.

Code postal

No. de téléphone à la maison : () _____ - _____

Autre no. où l'on peut vous joindre : () _____ - _____

CARACTÉRISTIQUE DE VOTRE CONDITION RESPIRATOIRE PASSÉE ET ACTUELLE

1- À votre connaissance avez-vous déjà eu des problèmes ou des maladies cardiaques?

Si oui, lesquels : _____

À quel âge (environ) : _____

Sont-ils encore présents : _____

2- À votre connaissance avez-vous déjà eu des problèmes ou des maladies respiratoires?

Si oui, lesquels : _____

À quel âge (environ) : _____

Sont-ils encore présents : _____

3- AVEZ-VOUS DÉJÀ FAIT DE L'ASTHME? OUI _____ NON _____

Si oui, de quand à quand : Début _____

Fin _____

4- Un médecin vous-a-t-il dit que vous étiez asthmatique? oui _____ non _____

Votre asthme était :

Très léger _____ Léger _____ modéré _____ sévère _____ très sévère _____

5- De quelle manière caractériseriez-vous votre asthme aujourd'hui?

Très léger _____ Léger _____ modéré _____ sévère _____ très sévère _____

6- Quel traitement avez-vous déjà pris ou, prenez-vous encore pour votre asthme?

7- Lesquels des facteurs suivants pouvaient (inscrire P pour passé), peuvent (inscrire A pour actuel) déclencher votre asthme?

	oui	non	
Animaux	_____	_____	Lesquels:_____
Poussière	_____	_____	
Odeurs fortes	_____	_____	
Air froid	_____	_____	
Infections	_____	_____	
Exercice	_____	_____	
Aspirine	_____	_____	
Autres	_____	_____	Lesquels:_____

Est-ce que votre asthme était ou est pire lors d'une saison particulière?

Si oui, laquelle : _____

8- Avez-vous des allergies? oui _____ non _____ (si non, passez à la question 8)

Si oui, à quoi êtes-vous allergique?

	oui	non	
Animaux	_____	_____	Lesquels?_____
Poussière	_____	_____	
Air froid	_____	_____	
Aspirine	_____	_____	
Pollens	_____	_____	des : arbres_____, graminées_____, herbe à poux_____
Autres	_____	_____	Lesquels?_____

Parmi les symptômes énumérés ci-dessous, lesquels avez-vous déjà eu?

	oui	non
Yeux qui piquent ou qui coulent	_____	_____
Essoufflement	_____	_____
Toux	_____	_____
Nez qui coule	_____	_____
Éternuements	_____	_____
Sillements ou sifflements	_____	_____
Oppression à la poitrine	_____	_____
Autres	_____	_____ lesquels : _____

Est-ce que votre asthme était ou est pire lors d'une saison particulière?

Si oui, laquelle : _____

Quels traitements avez-vous pris pour vos allergies?

	oui	non
Antihistaminique (Seldane, Claritin, etc.)	_____	_____

lesquels : _____

Vaccins désensibilisants _____ quand : _____

8- Prenez-vous d'autres médicaments régulièrement à part ceux précédemment mentionnés?

Lesquels :

Pour quelle(s) raison(s) :

9- Y a-t-il des asthmatiques dans votre famille

(père, mère, frères, soeurs, enfants)?

oui____ non____

Qui : _____

10- Y a-t-il des personnes allergiques dans votre famille

(père, mère, frères, soeurs, enfants)?

oui____ non____

Qui : _____

DESCRIPTION DES SYMPTÔMES ACTUELLES

TOUX

Toussez-vous habituellement :

oui non

le matin en hiver?

en été?

pendant d'autres périodes de la journée en hiver?

en été?

la plupart des jours et/ou des nuits

au moins trois mois par année?

Depuis combien de temps avez-vous cette toux? _____ans _____mois

EXPECTORATIONS

Ramenez-vous habituellement des sécrétions (crachats) qui viennent de la poitrine :

oui non

en vous levant le matin?

d'autres périodes de la journée ou de la nuit?

au moins trois mois par année?

Depuis combien de temps produisez-vous ces sécrétions? _____ans _____mois

ENVIRONNEMENT

QUAND VOUS ÊTES DANS UNE PIÈCE OU UN ENDROIT

où il y a beaucoup de fumée (la fumée de cigarette par exemple),

est-ce que vous : oui non

toussez?	_____	_____
avez des sifflements (sillements)?	_____	_____
ressentez une oppression dans la poitrine?	_____	_____
êtes essoufflé?	_____	_____

où il y a de la poussière, des animaux ou près des plumes, ou encore quand vous êtes près des arbres, sur la pelouse, ou, lorsqu'il y a beaucoup de pollen dans l'air, est-ce que vous : oui non

toussez?	_____	_____
avez des sifflements (sillements)?	_____	_____
ressentez une oppression dans la poitrine?	_____	_____
êtes essoufflé?	_____	_____
avez le nez qui coule ou des éternuements?	_____	_____
avez les yeux qui piquent ou qui coulent?	_____	_____
avez des irritations ou devenez plaqué?	_____	_____

EXERCICE ET AIR FROID

Quand vous faites de l'exercice, un travail difficile ou que vous respirez de l'air froid et sec l'hiver, est-ce que vous : oui non

toussez?	_____	_____
avez des sifflements (sillements)?	_____	_____
ressentez une oppression dans la poitrine?	_____	_____
êtes essoufflé?	_____	_____

EXPOSITION À LA MAISON

Avez-vous des animaux domestiques? _____ oui _____ non

si oui, lesquels? _____

depuis combien de temps? _____ ans _____ mois

Avez-vous du tapis à la maison? _____ oui _____ non

dans votre chambre à coucher? _____ oui _____ non

Avez-vous des draps santé? _____ oui _____ non

DESCRIPTION DES SYMPTÔMES PARFOIS, OU DÉJÀ RESSENTIS :

Lorsque vous faites de l'exercice, êtes exposé a des irritants respiratoires ou êtes exposé à une substance à laquelle vous êtes allergique, ressentez-vous alors les sensations décrites par les phrases suivantes :

	oui	non
1- Ma respiration ne va pas jusqu'au bout	_____	_____
2- Ma respiration est halatante	_____	_____
3- Ma respiration est plus rapide	_____	_____
4- Ma respiration demande un effort	_____	_____
5- Ma respiration est difficile	_____	_____
6- Ma respiration est laborieuse	_____	_____
7- Ma respiration est superficielle	_____	_____
8- Ma respiration est limitée	_____	_____
9- Ma respiration demande plus de concentration	_____	_____
10- Je me sens étouffé	_____	_____
11- J'ai besoin d'air	_____	_____
12- Je ne peux pas prendre une respiration profonde	_____	_____
13- Je me sens essoufflé	_____	_____

(suite des symptômes parfois, ou déjà ressentis)

- | | | |
|---|-------|-------|
| 14- Je sens une oppression à la poitrine | _____ | _____ |
| 15- Je sens un blocage de ma respiration | _____ | _____ |
| 16- Je me sens suffoqué | _____ | _____ |
| 17- Je sens un serrement dans la poitrine | _____ | _____ |
| 18- Je sens que je respire plus fort | _____ | _____ |
| 19- Je manque d'air | _____ | _____ |
| 20- Autres (description détaillée) : | _____ | |
| | _____ | |
| | _____ | |
| | _____ | |

ANTÉCÉDENTS PERSONNELS

- | Avez-vous déjà fait : | oui | non |
|-------------------------------|-------|-------|
| - du rhume des foins? | _____ | _____ |
| - de l'eczéma? | _____ | _____ |
| - de l'urticaire? | _____ | _____ |
| - de la bronchite chronique? | _____ | _____ |
| - de l'emphysème? | _____ | _____ |
| - une infection respiratoire? | _____ | _____ |
| si oui, quand : | _____ | |
| - autre problème de santé? | _____ | _____ |
| si oui, lequel ou lesquels? | _____ | |
| | _____ | |
| | _____ | |
| | _____ | |

ANTÉCÉDENTS FAMILIAUX

Est-ce que votre père, mère, ou l'un de vos frères, soeurs ou enfants, fait ou a déjà fait :

	oui	non
de l'asthme?	_____	_____
de l'allergie?	_____	_____
de l'eczéma?	_____	_____
de l'urticaire?	_____	_____
de la bronchite chronique?	_____	_____
de l'emphysème?	_____	_____
de la tuberculose?	_____	_____
ou autres (précisez) _____		

TABAGISME

Avez-vous déjà fumé? _____ oui _____ non

si oui, combien de cigarette par jour _____ combien de temps _____

cigare par jour _____ combien de temps _____

marijuana par jour _____ combien de temps _____

Êtes-vous exposé(e) à la fumée de tabac d'autres personnes autour de vous?

À la maison _____ oui _____ non

Au travail _____ oui _____ non

Ailleurs (fréquent) _____ oui _____ non précisez où? _____

ANNEXE II

PREVALENCE OF AIRWAY RESPONSIVENESS AND ATOPY IN ASTHMATIC FAMILIES

Article publié sous une forme modifiée (modifications mineures) dans
Clinical and Investigate Medecine vol.19, p 461-469, 1996

MISE EN CONTEXTE DE L'ÉTUDE ET CONTRIBUTION DES AUTEURS

Le but des travaux présentés dans ce chapitre était d'évaluer les prévalences d'asthme, d'HRB et d'atopie chez les proches parents de sujets asthmatiques comparativement à ce que l'on observe au sein de familles témoins. Les résultats de cette étude, comportant un questionnaire et une évaluation détaillée de la fonction respiratoire pour l'ensemble des individus, ont montré une prévalence accrue d'atopie, d'HRB et de hauts taux sériques d'immunoglobuline E (IgE) au sein des familles d'asthmatiques. Ces conclusions indiquent une concentration familiale de ces affections suggérant l'implication de facteurs héréditaires. Ce protocole représentait le premier programme de recherche du genre dans la province de Québec.

Ma contribution à ces travaux a été de participer à la mise sur pied du protocole expérimental. J'ai effectué le recrutement des familles apparentées à un ou plusieurs asthmatiques en utilisant la liste de sujets ayant déjà participé à des protocoles expérimentales sous la direction des Drs Louis-Philippe Boulet et Michel Laviolette. Le recrutement des familles témoins a été fait à l'aide d'annonces à l'intérieur du personnel hospitalier, dans les journaux et à la radio. J'ai fait l'évaluation phénotypique (questionnaire, dosage des IgE sériques et des éosinophiles sanguins, tests de fonction respiratoire, tests d'allergie et test à la métacholine en duplicata) pour l'ensemble des individus enrôlés dans cette recherche. J'ai compilé les données recueillies, analysé l'ensemble des résultats et rédigé le manuscrit.

Madame Gaétane Bédard a participé au recrutement des familles. Monsieur Serge Simard m'a dirigé dans l'analyse et la présentation des résultats. Le Dr Louis-Philippe Boulet a élaboré le protocole expérimental, a assuré la direction

des travaux et il a effectué les corrections et la mise au point de l'article scientifique.

TITLE: Prevalence of airway responsiveness and atopy in asthmatic families.

AUTHORS: Catherine Laprise, M.Sc.
Louis-Philippe Boulet, MD, FRCPC

FROM: Centre de pneumologie de l'Hôpital Laval,
Université Laval, Sainte-Foy, Québec.
Réseau Canadien des Centres d'excellence en Santé
Respiratoire

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE:

Dr. Louis-Philippe Boulet
Hôpital Laval
2725 chemin Sainte-Foy
Sainte-Foy, Québec
Canada, G1V 4G5

Tel: 418-656-4747

Fax: 418-656-4762

EMAIL: MEDLPB@HERMES.ULAAVAL.CA

Key words : Asthma, atopy, airway hyperresponsiveness, serum IgE level, eosinophils, allergens.

RÉSUMÉ

La prévalence et le degré d'asthme, d'atopie et d'hyperréactivité bronchique (HRB) asymptomatique furent déterminés dans un groupe d'apparentés de premier degré à des sujets asthmatiques (groupe A; 28 familles, n=122) en comparaison à un groupe témoin (groupe C; 28 familles, n=122). La relation entre l'HRB asymptomatique ou l'asthme, l'atopie ou de hauts taux d'IgE sériques et l'éosinophilie sanguine fut étudiée. Chaque sujet a complété un questionnaire et a eu des tests de fonction pulmonaire incluant la mesure de la réactivité bronchique à la méthacholine, en plus de tests cutané d'allergie et du dosage des IgE sériques et des éosinophiles sanguins. Le groupe A présentait une prévalence accrue d'atopie et d'HRB asymptomatique, une CP_{20} métacholine plus basse et de plus hauts taux d'IgE sériques, même si les sujets asthmatiques recrutés initialement étaient exclus des analyses. Les sujets atopiques du groupe A avaient un index atopique plus élevé et un degré de réactivité bronchique supérieur au groupe C. Les sujets avec HRB asymptomatique du groupe A avaient un plus fort index atopique et de plus hauts taux d'IgE sériques. Une corrélation significative fut trouvée entre le taux d'IgE sérique d'une part et l'index atopique, le décompte des éosinophiles ou la CP_{20} métacholine d'autre part. L'HRB asymptomatique était deux fois plus fréquente chez les femmes. En conclusion, notre étude démontre que les apparentés de premier degré de sujets asthmatiques non seulement ont une prévalence accrue d'atopie, d'HRB asymptomatique et de hauts taux d'IgE sériques en comparaison avec des familles non-asthmatiques, mais qu'ils ont une plus forte expression du phénotype atopique et d'HRB asymptomatique.

ABSTRACT

Background : This study was carried out to determine if there is an increased prevalence and degree of airway hyperresponsiveness (AHR) and atopy in asthmatic families (group A; 28 families, n= 122) in comparison with controls (group C; 28 families, n= 122). Furthermore, the relationships between asymptomatic AHR or asthma, and atopy, high serum IgE levels or blood eosinophil counts were examined.

Methods : Each subjects completed a questionnaire and had measurements of expiratory flows, allergy skin prick tests, methacholine tests, total serum IgE and blood eosinophils.

Results : Group A showed an increased prevalence of atopy and AHR, a lower PC₂₀ methacholine and higher serum IgE level, even when the first identified subject with asthma in group A and their control in group C were not included. Atopic subjects in group A had a higher atopic index and serum IgE level than in group C, where asymptomatic AHR was less related to atopy. There was a significant correlation between PC₂₀ methacholine and atopic index, between blood eosinophil count and serum IgE level, and between the atopic index and serum IgE level, for all groups. The proportion of women with asymptomatic AHR was almost twice as high as that of men.

Conclusion : This study showed that not only first degree relatives of subjects with asthma have a higher prevalence of AHR, atopy and elevated serum IgE levels than controls from non-asthmatic families, but also that atopic subjects of this first group had higher atopic index and degree of AHR.

ABBREVIATIONS :

AHR : airway hyperresponsiveness

FEV₁ : forced expiratory volume in one seconde

IgE : immunoglobulin E

PC₂₀ : provocative concentration inducing a 20% fall in FEV1

PEF : peak expiratory flow

INTRODUCTION

Asthma is a common airway inflammation disease, characterized by an increased responsiveness of the tracheo-bronchial tree to different stimuli and by episodes of reversible airflow obstruction <1-3>. Different etiologies have been suggested in the development of asthma, but it is generally attributed to the influence of environmental factors in genetically predisposed individuals such as atopic subjects <4, 5>.

Although airway hyperresponsiveness (AHR) is a common characteristic of symptomatic asthma, it may be observed in the absence of respiratory symptoms. The prevalence of asymptomatic AHR in the general population is quite variable from a study to another, going from less than 5% to 50% <6,7>. Furthermore, up to 30% of subjects with AHR to histamine report no asthma symptoms <8>.

The association between asthma and allergy has been recognized for years. The prevalence of asthma and AHR is higher in atopic subjects than in non atopics <2, 9, 10-13>. Clifford and associates showed a significant association between atopy and AHR to methacholine, independently of symptoms <9>. Furthermore, Pepys has suggested an association between the atopic status and the risk of developing asthma in close relatives <14>.

On the other hand, there also seems to be a close relationship between high levels of IgE and a family history of atopy <15>. However, some allergic subjects have a normal serum IgE level and non-atopic subjects can have high levels. A study by Burrows and colleagues suggests that asthma is mainly associated with high levels of IgE, while rhinitis is mostly associated with atopy <16>. Sears and coworkers have shown that AHR to methacholine is

related to serum IgE levels even in children without a diagnosis of asthma <17>.

There is still a need to further document the characteristics of subjects with asymptomatic AHR and compare possible determinants of this condition to those associated to asthma, to identify possible similar mechanisms or etiological factors. Most studies on the influence of hereditary factors in the development of asthma and atopy suggest the presence of a genetic predisposition probably multifactorially determined <18-20>. There also seems to be a family concentration of high levels of serum IgE and of response to allergy skin tests <15>. It would be of interest to also look at the prevalence of these findings in asymptomatic adults with AHR.

The present study was set to document the comparative prevalence and degree of asthma, atopy and asymptomatic AHR in first degree relatives of asthmatic subjects in comparison with control families. We also wanted to determine the relationships between either symptomatic asthma or asymptomatic AHR, and atopy, high levels of IgE or eosinophilia. Finally, we looked at the relative prevalence of sensitization to the different categories of common allergens among members of atopic families and at the likelihood to present asthma, asymptomatic AHR or atopy according to the parental history of these affections.

METHODS

Subjects

All subjects were residents of the Quebec metropolitan area, aged 14 to 70 years (mean= 33.6 ± 1.3). Our first group of subjects (group A) was recruited following

identification of at least one asthmatic subject in the family (n= 28 families; 122 subjects) and compared to a group of control families from the same neighbourhood (group C) where no asthmatic subject was identified (n= 28 families; 122 subjects). The first identified asthmatic subjects were recruited from the Laval Hospital Asthma Clinic. Atopic subjects and those with asymptomatic AHR in group A (n=60 and 38) were compared to group C (n=37 and 25).

The study was approved by our Local Ethics Committee. Asthmatic subjects were stable at the time of the study; in the last month they had no respiratory infection nor any asthma exacerbation and all subjects confirmed their willingness to take part in this study in signing an informed consent form.

Definitions

Asthma was defined according to the criteria suggested by the American Thoracic Society <1>. Asymptomatic AHR was defined as a PC₂₀, the provocative methacholine concentration inducing a 20% fall in forced expiratory volume in one second (FEV₁) < 16 mg/ml in the absence of symptoms suggestive of asthma (dyspnea, cough, wheezing, phlegm production, chest tightness) in subjects who had never required anti-asthma medication <21>. Subjects were considered atopic if they had at least one positive response to skin prick tests with a battery of common airborne allergens <22>; a positive response was defined as the development of a wheal diameter at least 3 mm at 10 minutes.

Evaluation

Each subject completed a general questionnaire on respiratory health, and the family history of asthma and/or atopy was noted.

Measurements of expiratory flows were done with a Vitalograph PFT II spirometer. The best of 3 forced expiratory volume curves was used to determine the maximal baseline forced vital capacity, and forced expiratory volume in 1 second (FEV₁). This procedure was performed according to the recommendations of the American Thoracic Society <23>.

Peak expiratory flow (PEF) were measured with a mini-wright peak flow meter in the morning and evening over a period of two weeks. The best of 3 repeated measurements was noted on a diary card.

Skin prick tests were done with a battery of airborne allergens, which were divided into six main categories; animal danders, dust, housedust mite, tree pollen, grass pollen and molds. The atopic index was determined as the number of aeroallergen categories (0 to 6) to which the patient showed at least one positive response on allergy skin test.

Methacholine inhalation tests were carried out according to the method described by Juniper and colleagues <24>. Aerosols were generated from a Wright nebulizer with an output of 0.13 ml/min. After the initial control saline inhalation, increasing doubling concentrations of methacholine from 0.03 to 256 mg/ml were inhaled by tidal mouth breathing for 2 min. at intervals of 5 min. The response, the percent fall in FEV₁, was measured at 30 and 90 sec., then at 2-min. intervals, if necessary. The results were expressed as the provocative concentration causing a 20 percent fall in baseline FEV₁ (PC₂₀).

The determination of serum IgE was performed by immunoenzymofluorometry. Blood eosinophils were counted by a coulter STKS.

Statistical Analysis

The PC₂₀ and serum IgE level values were log transformed before analysis, and statistics were expressed as geometric mean and standard error of the mean (SEM). All other statistics were expressed as means \pm SEM. The different populations were compared with the exact method from Fisher-Irwin for parametric data. Comparisons of the methacholine PC₂₀ values between groups were made using the Student's test for unpaired values. A Wilcoxon-Mann-Whitney test was used to compare the mean values. The different correlations were measured with Spearman coefficient correlation. Statistical significance was accepted as $p < 0.05$. For statistical analysis, PC₂₀ greater than 256mg/ml was considered as equivalent to 256.

RESULTS

Subjects' characteristics

Two hundred forty-four subjects took part in the study; 122 in families of asthmatic subjects (group A) and 122 in control families (group C). The first identified asthmatics of group A families (n=28) and their equivalent (paired for age and gender) of group C were excluded for the calculation of the different prevalences and pulmonary function parameters. Asthmatic and control groups did not differ significantly in regard to sex and age (Table 1). As expected from exclusion criteria of control families, there was no subject with symptomatic asthma in group C. FEV₁ and variability of PEF were similar in the two groups of families (Table 1). In addition, in group A, there was a significantly higher mean value of serum IgE levels than in group C, respectively : 108.4 \pm 1.2 and 58.1 \pm 1.2 μ g/ml (Table 1).

There were no significant differences in the prevalence of atopy and symptomatic asthma between genders ($p>0.05$). There were 62 subjects with asymptomatic AHR. Its prevalence was higher in women (66.1%) than in men (33.9%, $p=0.01$, Table 2). This observation was true for all age categories except for subjects aged 50 years and up where the proportion of women with AHR was similar to those of men (Table 2).

Prevalence of atopy and airway hyperresponsiveness

In group A, there was a significantly greater prevalence of atopy than in group C (69.6%/42.2%, $p=0.0002$), and the same was true for AHR (51.1%/26.7%, $p=0.0002$), and for mean value of serum IgE levels ($108.4 \pm 1.2/58.1 \pm 1.2 \mu\text{g/l}$, $p=0.008$, figure 1). There was a greater number of subjects with asymptomatic AHR in group A as compared to group C (41.3/ 26.7%, $p=0.02$, figure 1). The proportion of subjects with both asymptomatic AHR and atopy was higher in asthmatic families than in controls (33.7/13.4%, $p=0.001$, figure 1). Conversely, the proportion of the subjects having asymptomatic AHR but no atopy is lower in group A than in group C (7.6/13.4%, $p>0.05$, figure 1). The proportion of subjects with neither asymptomatic AHR, asthma, or atopy was therefore higher in the group C (22.8/44.4%, $p=0.002$, figure 1).

Comparison of atopic and asymptomatic AHR subjects in group A and C

Ninety-seven subjects were atopic, 60 in group A and 37 in group C. There were no significant differences for age, FEV₁ and variability of PEF between these groups. Mean blood eosinophil counts and serum IgE levels were similar in two groups of atopic subjects. Airway responsiveness was greater in atopic subjects of the group A than in atopic subjects of the group C (PC₂₀= $19.01 \pm 1.2 / 53.1 \pm 1.3$, $p=0.002$, Table 1).

Sixty-three subjects had asymptomatic AHR, 38 in group A and 25 in group C. There were no significant differences for age, FEV₁, diurnal variability of PEF, PC₂₀ methacholine and blood eosinophil count, between these groups. Atopic index and serum IgE levels were higher in asymptomatic AHR subjects of the group A than in AAHR subjects of the group C (atopic index= 2.8 ± 0.4 / 1.4 ± 0.4, p= 0.01, serum IgE levels= 123.02 ± 1.36 / 63.1 ± 1.4, p=0.001, Table 1).

Probability of presenting asymptomatic AHR and atopy according to parental history

Table 3 summarizes the likelihood of presenting asthma, AAHR and allergy according to the parental history of these affections in our groups A and C. In group A, when both parents have asthma, the offspring has an 83.3% chance of inheriting this abnormality; when one parent is an affected; 40%; and when neither parent has asthma, 20%. As control families had no asthmatic subjects, comparable data was not obtained for them. Regarding asymptomatic AHR, when both parents have this affection, the offspring has a 77.8% (group A) and 100% (group C) chance of inheriting this characteristic; when one parent is affected; 32% (group A) and 70% (group C); and when neither parent has asymptomatic AHR, 23.3% (group A) and 28.2% (group C). When both parents have atopy, the offspring have a 79% chance of inheriting this disease in asthmatic families and 88.9% in control families. When one parent is affected, the percentages are 77.8 and 53.3, respectively; whereas if neither parent is allergic, the proportions of offspring with atopy in our group are 53.3% and 30.8%.

Correlations between serum IgE level, PC₂₀ methacholine and eosinophil count

Table 4 shows the correlations between the distribution of serum IgE levels and eosinophil counts, PC₂₀ methacholine and atopic index among groups of families, and among atopic and asymptomatic AHR subjects of these groups. There was a positive correlation between the serum IgE level and eosinophil count for group A, group C, atopic subjects of group A and asymptomatic AHR subjects of group A. There was a positive correlation between the serum IgE level and the PC₂₀ methacholine for all groups. There was also a positive correlation between the atopic index for group A, group C, atopic subjects of group A and group C and asymptomatic AHR subjects of group A and group C.

Sensitization to common allergens

The prevalence of atopy increased in children with parental history of atopy, as compared to the subjects without parental history (Table 3). Table 5 relates the proportion of the atopic offspring associated with a parental history of atopy for the different categories of allergens. The prevalence of sensitization in offspring when parents were affected and the prevalence when neither parent was affected were, respectively, animal danders: 36.0% and 19.1%; dust: 43.8% and 32.6%; dust mites: 38.2% and 29.0%; tree pollen: 42.7% and 23.6%; grass pollen: 43.8% and 27.0%; and for molds: 13.5% and 19.1%.

DISCUSSION

Prevalence of AHR, atopy and elevated serum IgE levels were higher in first degree relatives of subjects with asthma, but most importantly, atopic subjects of this last group had higher atopic index and degree of AHR than atopic

subjects of the control group. Furthermore, asymptomatic AHR was more frequent in group A and these last subjects had higher mean atopic index and mean of serum IgE level than asymptomatic AHR subjects in group C. For the whole group, there was a correlation between serum IgE level and blood eosinophil count, between PC₂₀ methacholine and atopic index, and between atopic index and serum IgE levels.

Some of the results are in keeping with previous observations <5, 21, 25>, but in addition we showed that in atopic subjects of asthmatic families compared to control families, AHR and atopic index were higher, suggesting a genetic tendency to develop a high degree of atopy, although similar environmental exposures to allergens could also be involved. Furthermore, asymptomatic AHR from asthmatic families also had higher atopic index and IgE levels than asymptomatic AHR subjects of control families. The degree of airway responsiveness was correlated with atopic index and this last with serum IgE level.

When the first asthmatic identified is excluded, the incidence of asthma observed in our study for the asthmatic group (all \geq 14 years old) is 9.4%. Arizona and New Zealand studies have shown a prevalence of 5 to 10.6% of asthma in the population of children <2,3>. Regarding the prevalence of atopy, Woolcock and associates showed a prevalence of atopy of 40 to 55% of the general and military population <26>, while it was 42% in a group of municipal parkworkers and control subjects studied by Malo and colleagues <27> and 43.8% in a cohort of children in a study of Sears and coworkers <3>. These results are somewhat similar to our study although they were higher in group A than C.

Cockcroft and colleagues have suggested that methacholine responsiveness follows a unimodal distribution in a random population <6>. In first-

degree relatives of asthmatics, Townley and associates have however reported a bimodal distribution of methacholine responsiveness <28>. These observations are similar to our results as shown by the distribution of methacholine PC₂₀ for asthmatic families (figure 2).

In the study of Sears and colleagues, atopy was significantly more common in boys when compared with girls, and current asthma was more common in boys <3>. On the other hand, Barbee and coworkers <29>, as in our study, did not show any difference between genders for atopy and asthma. We found, however, a higher prevalence of asymptomatic AHR among women; this phenomenon was not associated with age or atopic status, and may be associated to another factor, such as airway calibre <30, 31>.

Our data show that AHR was twice as common among atopic subjects than without atopy (p=0.001). Similarly, Pattermore and colleagues showed that 50% of subjects with AHR were atopic, compared with 33% of subjects without AHR <32>. In a student population, Clifford and associates found a significant association between atopy and bronchial hyperresponsiveness to methacholine independent of symptoms <9>. Our findings also show a correlation between these parameters.

When we compare the atopic subjects in group A to those in group C, we note a larger proportion of subjects with AHR in atopic subjects from asthmatic families. From our data, AHR and atopy are closely associated in asthmatic families. This observation is in accordance with previous studies suggesting that atopy is associated with the development of asthma <12, 33>. Conversely, in control families, AHR does not appear as strongly associated with atopy. Our study is also in keeping with the high prevalence of AHR reported in asymptomatic parents of asthmatic children <25, 34>.

Cockcroft and associates reported that 4.5% of normal adults showed asymptomatic AHR in comparison to 12.7% of subjects with allergic rhinitis <6>. In another study, Woolcock and colleagues reported that 32% of adults with AHR had no asthma symptoms <8>. A publication by Power showed even a higher prevalence of asymptomatic AHR in the general population <7>. In the present investigation, prevalence of asymptomatic AHR is 41.3% in the asthmatic families and 26.7% in the control families.

In addition, among first degree relatives of asthmatic subjects, we observed an increase in the prevalence of high IgE levels as compared to control families which appears to be associated with the proportion of atopic subjects (Table 4) <9, 13, 32>.

A positive correlation between IgE levels and blood eosinophil counts as well as between IgE levels and atopic index have been previously found <35, 36>. We found the same correlations and furthermore we observed that these were present in all groups studied.

Finally, we observed a familial tendency to react to the same categories of allergens (Table 5). Meanwhile, contrary to the study by Kuehr and coworkers this tendency does not appear more closely associated with the maternal history of atopy <37>.

In conclusion, we found in our population not only a higher prevalence of AHR, atopy and elevated serum IgE levels in first degree relatives of subjects with asthma, but most importantly, an increased expression of the atopic phenotype and a higher degree of AHR than a control group from non-asthmatic families. Furthermore, we showed that asymptomatic AHR was more frequent in group A, in women, and was associated to higher atopic index

and serum IgE levels than subjects with asymptomatic AHR in the control group, where asymptomatic AHR was less related to atopy. This suggests that the development of asymptomatic AHR, as asthma, is influenced by immune factors, possibly genetically determined, although its increased prevalence in women remains unexplained.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Lori Schubert for reviewing the manuscript. Catherine Laprise was supported by the «Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche».

REFERENCES

1. American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136: 225-44.
2. Dodge RR, Burrows B. The prevalence and incidence of asthma and asthma-like symptoms in a general population sample. *Am Rev Respir Dis* 1980; 122: 567-75.
3. Sears MR, Burrows B, Flannery EM, Herbisson GP, Holdaway MD. Atopy in childhood. I. Gender and allergen related risks for development of hay fever and asthma. *Clin Exp Allergy* 1993; 23: 941-8.
4. Lockart A, Dizier M-H, Génétique de l'asthme. *M/S* 1991; 7: 1041-7.
5. Montgomery Smith J. Epidemiology and natural history of asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis (eczema). *In* : Middleton E Jr., Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF Jr., Yunginger JW, eds. *Allergy: principles and practice*. Third ed. Vol.2. St-Louis: C.V. Mosby; 1988: 891-929..
6. Cockcroft DW, Murdock KY, Berscheid BA. Relationship between atopy and bronchial responsiveness to histamine in a random population. *Ann Allergy* 1984; 53: 26-9.
7. Power C, Streenan S, Hurson B, Burke C, Poulter LW. Distribution of immunocompetent cells in the bronchial wall of clinically healthy subjects showing bronchial hyperresponsiveness. *Thorax* 1993; 48: 1125-1129.

8. Woolcock AJ, Peat JK, Salome CM *et al.* Prevalence of bronchial hyper-responsiveness and asthma in a rural population. *Thorax* 1987; 42:361-8.
9. Clifford RD, Radfort M, Howell JB, Holgate ST. Prevalence of atopy and range of bronchial response to methacholine in 7- and 11-year-old school children. *Arch Dis Child* 1989; 64: 1126-32.
10. Sherril D, Sears MR, Lebowitz MD, Holdaway MD, Hewitt CJ, Flannery EM, Herbison GP, Silva PA. The effect of bronchial hyperresponsiveness, wheezing, and atopy on longitudinal pulmonary function in children: A 6-year follow-up study. *Pediatric Pulmonol* 1992; 13: 78-85.
11. Anderson HR, Pottier AC, Strachan DP. Asthma from little to age 23: Incidence and relation to prior and concurrent atopic disease. *Thorax* 1992; 47: 537-42.
12. Clough JB, Williams JD, Holgate ST. Effect of atopy on the natural history of symptoms, peak expiratory flow, and bronchial responsiveness in 7- and 8-year-old children with cough and wheeze. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 755-60.
13. Burrows B, Lebowitz M, Barbee R. Respiratory disorders and allergy skin-test reactions. *Ann Intern Med* 1976; 84: 134-9.
14. Pepys J. Immunopathology of lung diseases. *Clin Allergy* 1973; 3 (Suppl.): 491-509.

15. Sears MR, Chow CM and Morseth DJ. Serum total IgE in normal subjects and the influence of a family history of allergy. *Clin Allergy* 1980; 10: 423-31.
16. Burrows B, Martinez FD, Halonen M, Barbee RA, Cline MG. Association of asthma with serum IgE levels and skin test reactivity to allergens. *N Engl J Med* 1989; 320: 271-7.
17. Sears MR, Burrows B, Flannery EM, Herbison GP, Hewitt CJ, Holdaway MD. Relation between airway responsiveness and serum IgE in children with asthma and in apparently normal children. *N Engl J Med* 1991; 325: 1067-71.
18. Gerrard JW, Rao DC, Morton NE. A genetic study of immunoglobulin E. *Am J Hum genet* 1978; 30: 46-58.
19. Gerrard JW, Vickers P, Gerrard CD. The familial incidence of allergic disease. *Ann Allergy* 1976; 36: 10-5.
20. Black PL, Marsh DG. The genetic basis for atopic allergy in man. In: Weiss EB, Segal MS, eds. *Bronchial asthma: mechanisms and therapeutics*. Boston: Little, Brown, 1976: 53-54.
21. Malo JL, Pineau L, Cartier A, Martin RR. Reference values of the provocative concentrations of methacholine that cause 6% and 20% changes in forced expiratory volume in one second in a normal population. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128: 8-11.

22. Sub-Committee on Skin Tests of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. Skin tests used in type I allergy testing. Position paper. Dreborgs, Ed. *Allergy* 1989; 44 Suppl.: 1-59.
23. American Thoracic Society Statement. Snowbird workshop on standardization of spirometry. *Am Rev Respir Dis* 1979; 119: 831-8.
24. Juniper EF, Cockcroft DW and Hargreave E. Histamine and methacholine inhalation tests: Tidal breathing method, laboratory procedure and standardisation. Canadian thoracic society. AB DRACO, lund, Sweden, 1991.
25. Hopp RJ, Bewtra MD, Biven R, Nair NM, Townley RG. Bronchial reactivity pattern in non-asthmatic parents of asthmatics. *Ann Allergy* 1988; 61: 184-6.
26. Woolcock AJ, Colman MH, Jones MW. Atopy and bronchial reactivity in Australian and Melanesian populations. *Clin Allergy* 1978; 8: 155-64.
27. Desjardins A, Benoît C, Ghezso H, L'Archevêque J, Leblanc C, Paquette L, Cartier A, Malo J-L. Exposure to domestic animals and risk of immunologic sensitization in subjects with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91: 979-86.
28. Townley RG, Bewtra MD, Nair NM, Brodkey FD, Watt GD, Burke KM. Methacholine inhalation challenge studies. *J Allergy Clin Immunol* 1979; 64: 569-574.

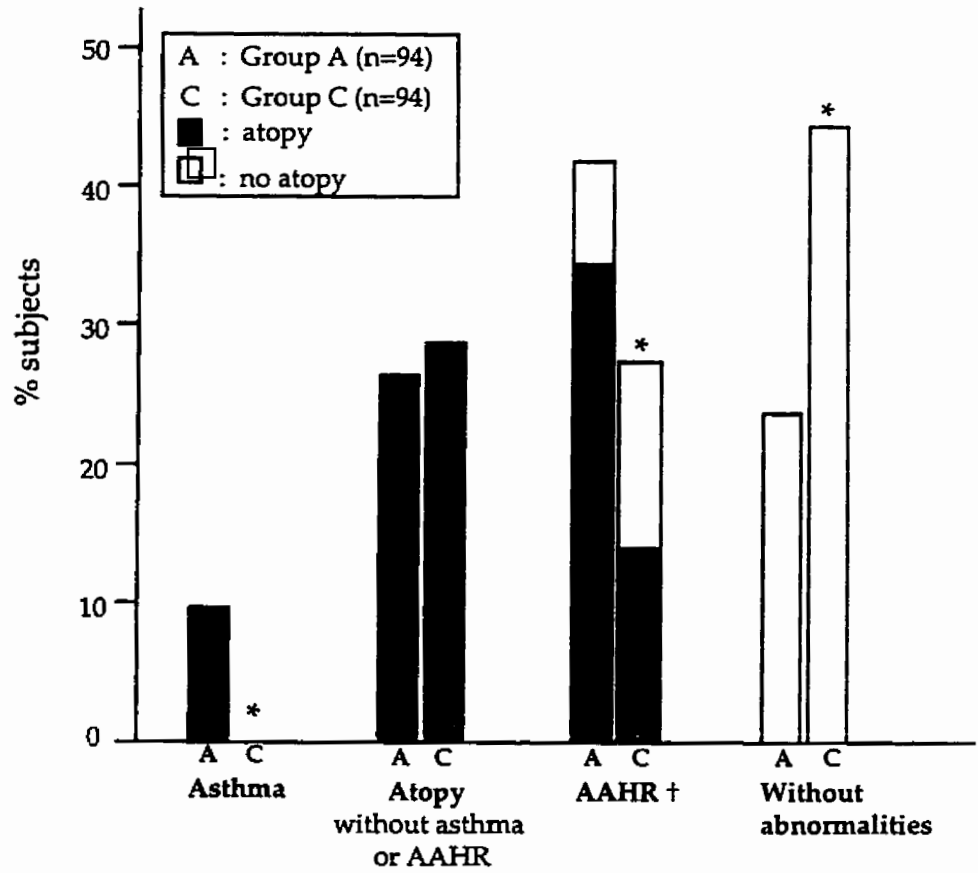
29. Barbee RA, Kaltenborn W, Lebowitz MD and Burrows B. Longitudinal changes in allergen skin test reactivity in a community population sample. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 79(1): 16-24.
30. Britton J, Pavord I, Richards K, Knox A, Wisniewski A, Wahedna I, Kinnear W, Tattersfield A, Weiss S. Factors influencing the occurrence of airway hyperreactivity in the general population: the importance of atopy and airway calibre. *Eur Respir J* 1994; 7: 881-87.
31. Kanner R.E, Connet J.E, Altose M.D, Buist S.B, Lee W.W, Tashkin D.P, Wise R.A. Gender difference in airway hyperresponsiveness in smokers with mild COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 956-61.
32. Pattermore PK, Asher MI, Harisson AC, Mitchell EA, Rea HH, Stewart AW. The interrelationship among airway hyperresponsiveness, the diagnosis of asthma, and asthma symptoms. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 549-54.
33. Dodge RR, Burrows B. The prevalence and incidence of asthma and asthma-like symptoms in a general population sample. *Am Rev Respir Dis* 1980; 122: 567-75.
34. Townley RG, Bewtra AK, Wilson AF, *et al.* Segregation analysis of bronchial response to methacholine inhalation challenge in families with and without asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 77: 101-7.

35. Masinga TT, Schouten JP, Rijcken B, Weiss ST, Speizer FE, Van der Lende R. The relationship of environmental and host factors to the prevalence of skin test reactivity and eosinophilia in a random population sample. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1987; 23(S): 329.
36. Tollerud DJ, O'Connor GT, Sparrow D, Weiss ST. Asthma, hay fever and phlegm production associated with distinct patterns of allergy skin test reactivity, eosinophilia and serum IgE levels. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 776-781.
37. Kuehr J, Karmaus W, Froster J, Frischer T, Hendel-Kramer A, Moseler M, Stephan V, Urbanek R. Sensitization to four common inhalant allergens within 302 nuclear families. *Clin Exp Allergy* 1993; 23: 600-5.

FIGURE LEGEND

Figure 1

Characteristics of control and asthmatic families. Subjects of both groups are classified according to the presence of asthma symptoms, atopy and airway responsiveness. In the asthmatic families, when the first asthmatic subject and their equivalent in control families are excluded, there are more subjects with atopy and airway hyperresponsiveness ($p < 0.05$).



* Significant difference between two groups
 † Asymptomatic airway hyperresponsiveness

Figure 1

Table 1
Subjects' characteristics

	Group A (n =94)	Group C (n =94)	Atopic subjects in group A (n =60)	Atopic subjects in group C (n =37)
Age (years)	35.5 ± 1.6*	34.5 ± 1.6	32.8 ± 1.8	30.9 ± 2.6
Sex (F/M)	47 / 47	47 / 47	29 / 31	11 / 26
FEV ₁ (% of pred.)	101.7 ± 1.8	103.5 ± 1.4	102.1 ± 2.3	105.5 ± 2.5
PEFR (mean % of diurnal variation)	4.6 ± 0.5	3.8 ± 0.4	6.0 ± 1.2	3.6 ± 0.5
PC ₂₀ (mg/ml)	24.2 ± 1.2†	47.6 ± 1.2	19.01 ± 1.2‡	53.1 ± 1.3
Atopic score (mean)§	2.2 ± 0.19†	1.07 ± 0.17	3.5 ± 0.19‡	2.5 ± 0.25
Eosinophils (X 10 ⁹ /L)	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.01
IgE (µg/L)	108.4 ± 1.19†	58.1 ± 1.17	199.5 ± 1.20	119.9 ± 1.28
FRC (% predicted)	117.9 ± 7.7	106.0 ± 2.7	120.7 ± 11.7	119.9 ± 1.3
TLC (% predicted)	108.2 ± 1.7	104.7 ± 2.0	107.2 ± 2.2	103.9 ± 2.9
RV (% predicted)	113.0 ± 3.3	113.8 ± 3.8	114.3 ± 4.3	111.0 ± 4.3

- * Mean ± SEM except for the PC₂₀ and serum IgE level which is expressed as geometric mean ± SEM
- † Significant difference between asthmatic and control families
- ‡ Significant difference between atopic subjects in group A and atopic subjects in group C
- § Mean number of categories of allergens with at least one positive response

Table 2

**Prevalence of AAHR in population according to age
and gender of subjects**

	AGE (years)				TOTAL
	12-18	18-30	30-50	50+	
GROUP A (F/M)	11.3/1.7	12.9/9.7	14.5/4.8	1.6/4.8	40.3/21.0
GROUP C (F/M)	11.4/9.7	4.8/0	4.8/1.6	4.8/1.6	25.8/12.9
TOTAL	22.7/11.4	17.7/9.7	19.3/6.4	6.4/6.4	66.1/33.9

* F/ M (%)

Table 3

Likelihood to present symptomatic and asymptomatic airway hyper-responsiveness and atopy according to the parental history of these affections

Affections	Groups (n= 244 subjects)	Number of parents affected (father and/or mother)		
		2	1	0
		Proportion of the offspring affected*		
Asthma	Group A †	5 / 6 (83.3)	10 / 25 (40.0)	7 / 35 (20.0)
	Group C ‡	—	—	0 / 64 (0.0)
AAHR	Group A †	7 / 9 (77.8)	8 / 25 (32.0)	7 / 30 (23.3)
	Group C ‡	2 / 2 (100.0)	14 / 20 (70.0)	11 / 39 (28.2)
Allergy	Group A †	15 / 19 (79.0)	21 / 27 (77.8)	8 / 15 (53.3)
	Group C ‡	8 / 9 (88.9)	16 / 30 (53.3)	8 / 26 (30.8)

- number of subjects affected / total number of sujets in the offspring (%)
- † 1st asthmatics identified included, n=122 subjects
- ‡ Subjects paired with the 1st asthmatics identified included, n=122 subjects

Table 4

Correlations between serum IgE level and different parameters

Serum IgE level ($\mu\text{g/L}$)	AND	EOSINOPHILS ($10^9/\text{L}$)	PC ₂₀ (mg/ml)	ATOPIC SCORE (1 to 6)‡
Group A (n = 94)		rs* = 0.42† p = 0.0001	rs = 0.15† p = 0.02	rs = 0.61† p = 0.0001
Group C (n = 94)		rs = 0.30† p = 0.003	rs = 0.07 p = 0.42	rs = 0.54† p = 0.0001
Atopic subjects in group A (n = 60)		rs = 0.39† p = 0.002	rs = -0.11 p = 0.4	rs = 0.56† p = 0.0001
Atopic subjects in group C (n = 37)		rs = 0.16 p = 0.33	rs = -0.29 p = 0.09	rs = 0.72† p < 0.0001
AAHR subjects in group A (n = 38)		rs = 0.46† p = 0.005	rs = 0.19 p = 0.3	rs = 0.60† p = 0.0004
AAHR subjects in group C (n = 24)		rs = 0.48 p = 0.02	rs = 0.26 p = 0.2	rs = 0.71† p = 0.0006

* Spearman correlation coefficient

† Significant correlation between the 2 parameters

‡ According to the 6 categories of allergens tested

Table 5

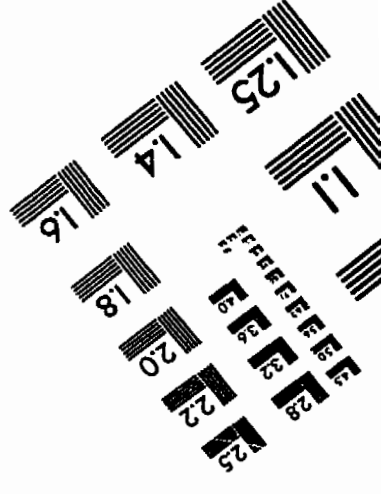
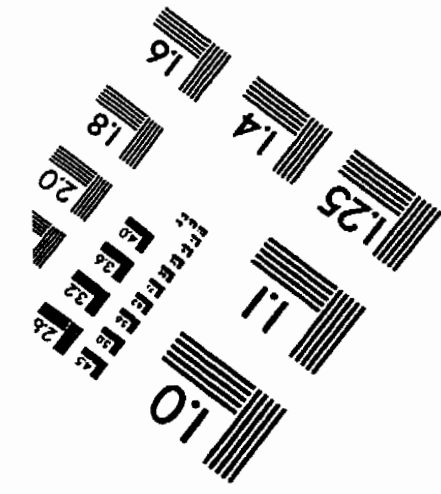
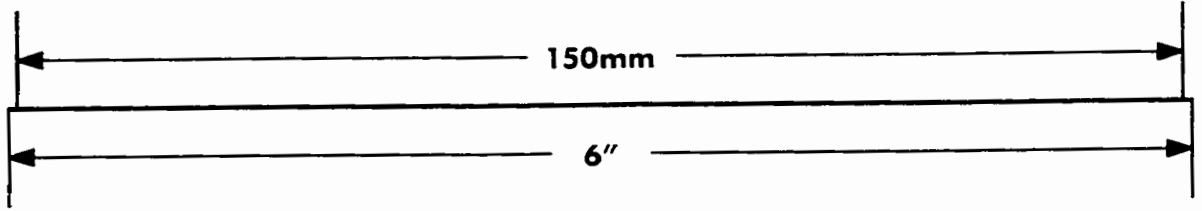
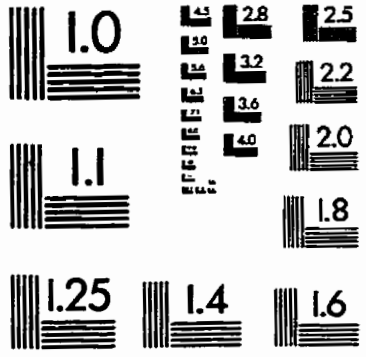
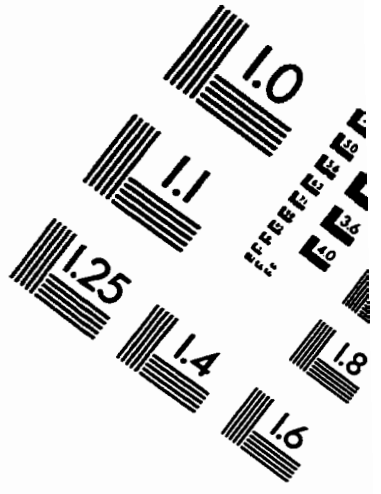
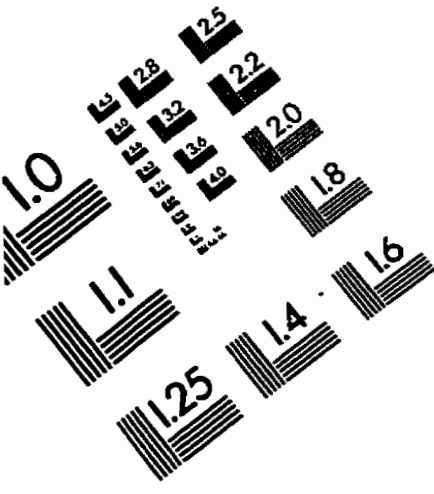
Percentage of children sensitized to a given allergen according to parent sensitization to this category of allergen

<u>CUMULATIVE PREVALENCE FOR THE CHILDREN (n(%))</u>					
Predictor: parental sensitization to the respective categories of allergen					
	<u>Mother</u>	<u>Father</u>	<u>Both</u>	<u>One or both</u>	<u>None</u>
	<u>parents*</u>				
Animal danders	10 (11.2%)	14 (15.7%)	8 (8.0%)	32 (36.0%)†	17 (19.1%)
Dust	14 (15.7%)	14 (15.7%)	11 (12.4%)	39 (43.8%)	29 (32.6%)
Dust mites	12 (13.5%)	10 (11.2%)	12 (13.5%)	34 (38.2%)	26 (29.0%)
Tree pollens	15 (16.9%)	11 (12.4%)	12 (13.5%)	38 (42.7%)†	21 (23.6%)
Grass pollens	12 (13.5%)	14 (15.7%)	13 (14.6%)	39 (43.8%)†	24 (27.0%)
Molds	7 (7.9%)	3 (3.4%)	2 (2.2%)	12 (13.5%)	17 (19.1%)

* Cumulative prevalence of the child sensitization for mother and/or father and/or both parents sensitization to the same categorie of allergens

† Significant difference between prevalence of the child sensitized when one or both parents are sensitized and prevalence of the child sensitized when none parent is sensitized

IMAGE EVALUATION TEST TARGET (QA-3)



APPLIED IMAGE, Inc
 1653 East Main Street
 Rochester, NY 14609 USA
 Phone: 716/482-0300
 Fax: 716/288-5989

© 1993, Applied Image, Inc., All Rights Reserved