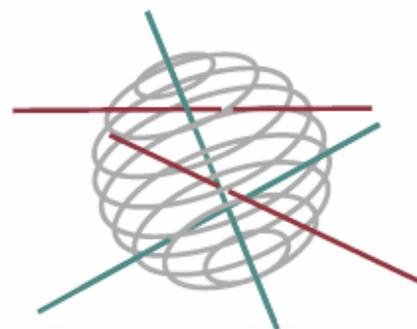


SSD

SCIENCE FOR A SUSTAINABLE DEVELOPMENT



**RISQUES D'AFFECTIONS RESPIRATOIRES CHEZ L'ENFANT LIÉS
A LA QUALITÉ DE L'AIR INTÉRIEUR : DÉVELOPPEMENT ET
APPLICATION DE BIOMARQUEURS NON-INVASIFS**

"ANIMO"

G. Schoeters, R. Van Den Heuvel, K. Bloemen G. Koppen,
E. Goelen, E. Govarts, A. Bernard, C. Voisin, K. Desager, V. Nelen



ENERGY



TRANSPORT AND MOBILITY



AGRO-FOOD



HEALTH AND ENVIRONMENT



CLIMATE



BIODIVERSITY

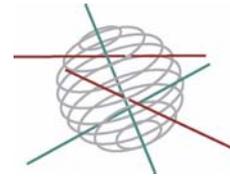


ATMOSPHERE AND TERRESTRIAL AND MARINE ECOSYSTEMS



TRANSVERSAL ACTIONS





Santé et Environnement



RAPPORT FINAL PHASE 1
RESUME

**RISQUES D'AFFECTIONS RESPIRATOIRES CHEZ L'ENFANT LIÉS A
LA QUALITÉ DE L'AIR INTÉRIEUR : DÉVELOPPEMENT ET
APPLICATION DE BIOMARQUEURS NON-INVASIFS
"ANIMO"**

SD/ HE/05A

Promoteurs

Greet Schoeters

Vlaamse Instelling voor Technologisch Onderzoek (VITO)
Environmental Risk & Health
Mol



Alfred Bernard

Université Catholique de Louvain (UCL)
Unité de toxicologie industrielle et de médecine du travail
Bruxelles



Kristine Desager

Universiteit Antwerpen (UA)
Pediatrics and Respiratory Medicine
Antwerp



Auteurs

**G. Schoeters, R. Van Den Heuvel, K. Bloemen
G. Koppen, E. Goelen, E. Govarts - VITO**

A. Bernard, C. Voisin - UCL

K. Desager - UA

V. Nelen - Provincial Institute of Hygiene – Antwerp



Janvier 2009





Rue de la Science 8
Wetenschapsstraat 8
B-1000 Brussels
Belgium
Tel: + 32 (0)2 238 34 11 – Fax: + 32 (0)2 230 59 12
<http://www.belspo.be>

Contact person: Emmanuèle Bourgeois
+ 32 (0)2 238 34 94

Neither the Belgian Science Policy nor any person acting on behalf of the Belgian Science Policy is responsible for the use which might be made of the following information. The authors are responsible for the content.

No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without indicating the reference :

G. Schoeters, R. Van Den Heuvel, K. Bloemen G. Koppen, E. Goelen, E. Govarts, A. Bernard, C. Voisin, K. Desager, V. Nelen ***Risques d'affections respiratoires chez l'enfant liés à la qualité de l'air intérieur : développement et application de biomarqueurs non-invasifs "ANIMO"*** Final Report Phase 1 Résumé. Brussels : Belgian Science Policy 2009 – 6 p. Programme de recherche « La science pour un Développement Durable »

RÉSUMÉ

Au cours de ces dernières décennies le nombre d'affections respiratoires telles que l'asthme ou l'allergie a sérieusement augmenté chez les enfants. Des facteurs environnementaux (intérieurs et extérieurs) contribuent très probablement à cette augmentation. Et les enfants sont, en toute logique, bien plus sensibles à ces différents facteurs de risque environnementaux.

En Europe, le biomonitoring humain est devenu un outil important dans le suivi de la santé environnementale et particulièrement la santé des enfants. La santé respiratoire des enfants reste une des priorités des programmes de santé environnementale.

La critique exige de plus en plus d'inclure une évaluation de l'exposition et des effets de la santé, une collecte d'échantillons biologiques et le comité d'éthique impose davantage de consignes strictes pour la conduite de telles études. Des efforts sont ainsi réalisés dans le développement de biomarqueurs moins ou non-invasifs pouvant être utilisés dans le cadre de la recherche environnementale chez les enfants.

Ainsi, ce projet vise à développer des marqueurs non-invasifs qui pourraient être facilement utilisés chez les enfants. De tels marqueurs utilisés lors d'études épidémiologiques ou en pratique médicale permettraient de détecter les effets néfastes le plus rapidement possible et d'instaurer des mesures préventives avant l'apparition de la maladie.

Les premières activités de la phase initiale se sont focalisées sur le **développement, l'optimisation** et la standardisation des protocoles de 4 **méthodes non-invasives** appliquées chez les enfants : gaz d'air exhalé incluant le NO (oxyde nitrique) et d'autres composés organiques volatiles (VOC), le condensat d'air exhalé (EBC) et le lavage nasal.

Le NO dans l'air exhalé (eNO) est un indicateur bien connu d'inflammation des voies respiratoires inférieures. Les procédures d'usage chez les enfants de la version portable NIOX MINO Airway Inflammation Monitor (Aerocrine, Sweden) et de l'analyseur CLD 88 SP (EcoMedics, Switzerland) ont été finalisées.

La méthode d'analyse des gaz dans l'air exhalé fut optimisée. L'air exhalé des sujets étudiés fut collecté dans des sacs de type Teflon. Une méthode de spectrométrie de masse et de chromatographie fut développée et permet le monitoring des composés organiques volatiles (VOC) C5-C12 dans l'air exhalé des sujets. L'expérimentation fut renouvelée et permit ainsi d'établir la fiabilité d'au moins 56 VOC présents dans l'air exhalé avec dans 89% des cas un coefficient de variation inférieur à 30% (et de moins de 20% dans 85% des cas).

Une étude de variabilité intra-individuelle limitée nous permet de conclure que les variations quotidiennes ou d'un jour à l'autre des VOC contenus dans l'air exhalé sont négligeables (3 %) comparés à la variation analytique observée pour ces VOCS. On recommande donc d'étudier plus en détails les différents facteurs qui peuvent contribuer aux fluctuations des VOC contenus dans l'air exhalé comme par exemple, la concentration des VOC dans l'air ambiant, le régime, l'état de santé, les polymorphismes génétiques, les conditions d'échantillonnage, etc...

Une attention particulière fut accordée à l'étape de concentration précédant les analyses chimiques (GC-MS) des VOCS exhalé. Deux méthodes de pré-concentration, la méthode de désorption thermique GC-MS et la méthode de préconcentration Entech 7100A GC-MS, ont

été comparées et ont montré des différences dans la sensibilité et dans la gamme des VOC mesurables.

La technique du lavage nasal fut évaluée avec succès chez les enfants. Ensuite, la procédure a été légèrement modifiée pour la rendre encore moins envahissante selon une suggestion par le partenaire 3. Après la modification, le rétablissement de protéines comme CC16 et l'albumine dans l'échantillon de lavage nasal fut vérifié.

Le condensat de l'air exhalé (EBC) fut récolté dans un RTUBE. Les déterminants de variabilité des protéines contenues, le volume et le pH de l'EBC avaient été étudiés auparavant chez les adultes. Aucune différence significative entre le prélèvement d'échantillons à des moments différents au cours de la journée ou lors de jours différents ne fut obtenue pour pH, le volume et la concentration de protéine totale, à condition que les sujets soient familiarisés avec cette technique.

En outre, aucune activité d'amylase (marqueur de contamination salivaire) ne fut mesurée dans les échantillons d'EBC. Un protocole pour concentrer les protéines dans les échantillons EBC a été choisi, basé sur le rétablissement des protéines et des données de reproductibilité. La méthode utilisant la concentration des protéines sur des perles, a été conservée. Après la concentration, les protéines ont été digérées et séparées par Nano-LC et la détection a été faite en utilisant un spectromètre massif MALDI-TOF/TOF.

Afin d'évaluer la performance des biomarqueurs non-invasifs, une étude pilote impliquant des enfants asthmatiques et des enfants sains a été organisée. Des enfants asthmatiques (n = 40) ont été recrutés de la clinique d'asthme à l'Hôpital Universitaire Anvers. Des enfants sains (n = 30) ont été recrutés dans le personnel de l'Université et dans une école primaire à Anvers. Les enfants étaient âgés de 6 à 12 ans. Les critères de sélection étaient les suivants : 5 enfants par année scolaire, même nombre de garçons et de filles (asthmatiques : 20/20; contrôles : 17/13), proportion d'étranger et d'habitants du pays : 20/80 (basé sur sélection de noms). L'examen comprenait : Mesures du NO exhalé (tant NIOX MINO que dispositif EcoMedics), EBC (RTube; 15 minutes dans RTUBE non couvert, 10 minutes dans RTUBE couvert), Air exhalé des gaz (dans un sac Tedlar), lavage nasal (narines gauche et droite) et une spirométrie (uniquement pour les patients asthmatiques). L'étude pilote doit permettre d'aider à identifier la faisabilité des mesures des bio-marqueurs dans un groupe d'âge donné et doit faciliter l'identification des déterminants de variabilité des mesures des bio-marqueurs.

Dans l'étude pilote, le NIOX MINO et le dispositif EcoMedics ont été comparés afin de mesurer le NO exhalé. Les valeurs obtenues par les deux dispositifs sont bien corrélées ($r = 0.81$, $p < 0.001$). Les valeurs étaient toutefois légèrement plus élevées dans le NIOX MINO comparées à l'EcoMedics. En raison de la variabilité des deux dispositifs, on recommande de ne pas utiliser les résultats des deux dispositifs dans la même analyse. En outre, nous recommanderions d'exécuter au moins deux mesures qui admettront une variation de 10 entre chacune des mesures, sans tenir compte du dispositif utilisé. Aucune corrélation significative ne fut trouvée dans ce groupe d'étude entre le NO exhalé et l'âge, la taille, le poids et le sexe. Une différence significative entre patients asthmatiques et les contrôles sains fut observée ($p=0.004$ pour l'EcoMedics, et $p=0.027$ pour le NIOX MINO).

Le liquide de lavage nasal fut collecté dans les deux narines. Comme cela fut observé auparavant dans une étude réalisée chez les adolescents et dans cette étude pilote, il y a une bonne corrélation du rapport albumine/urée (log) ($r=0.75$; $p<0.0001$) et le rapport CC16/urée (log) ($r=0.556$; $p=0.0001$) entre les deux narines. De plus, nous utiliserons la valeur moyenne

(log) des 2 narines lors des prochaines analyses. Dans cette étude, le rapport moyen albumine/urée (SD) était de 0,42 (+/- 0,57). Le rapport moyen de CC16/Urée (+/-SD) était de $3,39 \times 10^{-4}$ (+/-6.07 X 10^{-4}). Aucune corrélation ne fut trouvée entre ces rapports (log) et l'âge, le sexe, le poids, la taille ou le type de groupe (asthmatique ou contrôle).

Le pH du condensat d'air exhalé a été mesuré dans 500 µl d'EBC, rassemblé dans des RTUBE non couvert, exactement 5 minutes après la collecte, sans deaeration. La valeur moyenne (\pm SD) était 6.17 (\pm 0.29).

Le pH était significativement plus bas dans le groupe des asthmatiques (6.07 ± 0.28) comparé au groupe des contrôles sains (6.23 ± 0.29 ; Mann-Whitney U test : 0.047). LTB4 fut mesuré dans les échantillons d'EBC collectés dans les RTubes couverts. La concentration moyenne (\pm SD) du LTB4 était 60.05 (\pm 10.61) pg/ml dans l'étude pilote. Nous avons observé des valeurs légèrement plus hautes chez les enfants sains en comparaison des enfants asthmatiques, bien que non significatives. Une corrélation positive entre LTB4 dans l'EBC et le rapport CC16/UREA dans le lavage nasal a été observée.

Afin de réaliser l'analyse protéique, 1 ml EBC de la première collecte fut utilisé. Les échantillons ont été concentrés sur des perles, des peptides digérés par des enzymes et les résultants ont été séparés par nanoLC (la chromatographie liquide). Les peptides dans toutes les fractions ont été détectés dans un spectromètre de masse MALDI-TOF. Des analyses MSMS ont été exécutées pour identifier les protéines diverses.

Les protéines les plus abondantes dans les échantillons d'EBC ont été identifiées comme des cytokératines. D'autres protéines supplémentaires pourraient être identifiées. Cependant, la plupart sont toujours à l'étude à ce moment. Pour comparer le type de protéines entre deux groupes, le secteur des peptides dans les spectres massifs, a été corrigé pour le secteur du standard interne dans cette fraction.

Pour réaliser ces analyses statistiques, le système Support Vector Machines fut utilisé. Bien que le groupe des asthmatiques ne consiste qu'en 4 groupes, c'est à dire : pas d'asthme, asthme contrôlé, asthme modérément contrôlé et asthme non contrôlé, seulement les sujets avec l'asthme modérément contrôlé et non contrôlé ont été utilisés pour le groupe d'asthme et comparés avec le groupe témoin au complet.

L'analyse préliminaire des peptides a résulté dans une modèle de classification qui a classifié tous les sujets correctement (100 %) quant à leur statut d'asthme.

Les gaz exhalés rassemblés dans les sacs tedlar ont été transférés dans des tubes de thermodesorption et, après l'ajout du composé de référence (2-fluorotoluène), ceux-ci ont été soumis à une analyse GC/MS. L'analyse a été exécutée sur une colonne polaire et la détection fut réalisée dans le modus de feuilletage complet (m/z de 25 à 250). Les réponses des différents signaux de tous les échantillons ont été combinées à une base de données. Quelques échantillons ont été exclus de la base de données parce que le temps de conservation de la référence différait largement du temps de référence toléré.

Egalement ici, les Machines de Vecteur d'Appui ont été utilisées pour l'analyse statistique. De nouveau, uniquement les sujets avec un asthme modérément contrôlé et non contrôlé ont été utilisés pour le groupe d'asthme et comparés au groupe témoin entier. Le modèle de classification le plus optimal a classifié correctement tous les sujets (100 %) quant à leur statut d'asthme.

Une cohorte d'enfants existante et une nouvelle **cohorte d'enfants** seront utilisées pour rechercher les facteurs environnementaux ou liés au mode vie impliqués dans ces affections. Pendant la deuxième phase du projet, les biomarqueurs non-invasifs optimisés seront appliqués dans:

- 1) un suivi de la cohorte d'enfants existante de la Région Flamande à l'âge de 6 ans.
- 2) une nouvelle cohorte d'écoliers sélectionnés en fonction de facteurs de risque spécifiques liés à la qualité de l'air intérieur et extérieur.

Lors du suivi de cette cohorte, l'accent sera particulièrement mis sur les facteurs de risque liés à l'environnement intérieur. Les nouveaux biomarqueurs seront utilisés en association avec des critères cliniques classiques (l'asthme par exemple diagnostiqué par un médecin, des symptômes respiratoires, la fonction pulmonaire (ex:VEMS), ...). Les cohortes d'enfants seront utilisées pour tester des hypothèses telles que la validité de ces biomarqueurs non-invasifs en tant qu'informateurs de l'état de santé respiratoire.

A partir d'une compilation d'études précédentes et de données issues de la littérature, un questionnaire fut construit pour investiguer l'état de santé respiratoire et l'exposition aux facteurs environnementaux. Le questionnaire intègre également l'exposition aux produits présents dans le milieu domestique et aborde les expositions liées aux pratiques sportives (ex: piscines chlorées). Il comporte aussi des questions relatives aux antécédents familiaux et aux symptômes respiratoires au cours des 12 derniers mois. Ce questionnaire sera utilisé dans le suivi de la cohorte d'enfants existante et la nouvelle cohorte. Un protocole d'analyse statistique fut élaboré.

La nouvelle cohorte a été recrutée en septembre 2007. Un total de 425 enfants de 30 écoles maternelles des régions de Bruxelles, Liège et Louvain-la-Neuve ont été recrutés. Le questionnaire fut complété par les parents et incluait un total de 60 questions sur la santé actuelle de l'enfant et ses maladies précédentes, les symptômes respiratoires pendant les 12 mois derniers, les antécédents parentaux d'asthme et de maladies allergiques, l'environnement général, l'environnement domestique (la présence d'animaux de compagnie, l'exposition au tabagisme passif, l'utilisation de produits de nettoyage et de parfums d'ambiance ...) et des pratiques sportives. L'examen des enfants incluait la mesure d'oxyde nitrique exhalé (eNO), une spirométrie, une collecte de l'EBC, un échantillon d'urine, la collecte du lavage nasale et un test de dépistage des allergies au moyen d'un Rhinostick.

En conclusion, les protocoles pour quatre biomarqueurs non-invasifs ont été développés et optimisés. Une continuation d'optimisation des analyses proteom et metaboom est nécessaire. Les biomarqueurs non-invasifs ont été appliqués sur des enfants jeunes avec succès. Forts de ces bons résultats méthodologiques dans l'étude pilote et compte tenu du recrutement des enfants dans une nouvelle cohorte, nous sommes bien préparés pour la deuxième phase du projet ANIMO. Dans cette phase les biomarqueurs non-invasifs seront appliqués dans la cohorte d'enfants existante de la Région Flamande et dans une nouvelle cohorte.