



Déterminants génétiques, nutritionnels et métaboliques de l'asthme professionnel

Dovi Stéphanie Acouetey Acouetey-Ardoin

► To cite this version:

Dovi Stéphanie Acouetey Acouetey-Ardoin. Déterminants génétiques, nutritionnels et métaboliques de l'asthme professionnel. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0213 . tel-01749618

HAL Id: tel-01749618

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749618>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : «Sciences de la Vie et de la Santé»

Par Dovi Stéphanie ACOUETAY épouse ARDOIN

***DETERMINANTS GENETIQUES, NUTRITIONNELS ET METABOLIQUES
DE
L'ASTHME PROFESSIONNEL***

30/11/2012

Membres du jury :

Rapporteurs :

Isabella ANNESI-MAESANO

Dr INSERM, Université Paris 6, Paris

Nathalie SETA

Professeur des Universités, Paris-Descartes

Examineurs :

Rosa-Maria GUÉANT-RODRIGUEZ

Professeur des Universités, Université de Lorraine,
Nancy, Co-directeur de thèse

Denis ZMIROU-NAVIER

Professeur des Universités, Université de Lorraine, Nancy
Directeur de thèse

Christophe PARIS

Professeur des Universités, Université de Lorraine, Nancy

Jean-Louis GUÉANT

Professeur des Universités, Université de Lorraine, Nancy.

UMR Inserm 954, Laboratoire de Nutrition génétique et exposition aux risques environnementaux, Faculté de Médecine -

BP 184, 54511 Vandœuvre-lès-Nancy

*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...
Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour,
Le respect, la reconnaissance...*

Remerciements

Monsieur le Professeur Denis Zmirou-Navier

Vous nous aviez guidé dès notre master, offert cette opportunité de rentrer dans le monde de la recherche. Merci pour votre confiance, votre aide et surtout votre patience à notre égard qui nous ont permis de toujours d'avancer. Votre sens de travail, votre rigueur et votre capacité d'écoute m'ont beaucoup appris. Veuillez trouver en l'aboutissement de ce travail commun toute ma reconnaissance.

Madame le Professeur Rosa Maria Guéant

Vous aviez accepté de codiriger ce travail, merci pour votre aide précieuse, vos encouragements, votre disponibilité, votre rigueur, et votre chaleur qui, nous ont guidé à travers cette longue route de la thèse. Veuillez trouver en l'aboutissement de ce travail commun toute ma reconnaissance.

A monsieur le Professeur Jean Louis Guéant

Je tiens à remercier mon directeur de laboratoire, Monsieur le Professeur Jean-Louis Guéant qui m'a accueilli dans son laboratoire. A travers votre confiance et vos recommandations, votre désir de nous amener toujours à nous dépasser, veuillez trouver ici le témoignage de ma sincère gratitude et de toute ma considération.

A monsieur le Professeur Christophe Paris

Tout le plaisir a été pour moi, d'avoir travaillé avec vous durant ces années sur ces différentes études, dans leur déroulement et également sur des projets d'article. J'ai beaucoup appris de votre grand sens d'objectivité et de votre rigueur. Merci pour votre disponibilité et vos conseils.

A madame le Docteur Isabella Annesi-Maesano et madame le Docteur Nathalie Seta

Vous nous faites le grand honneur d'accepter de juger ce travail. Nous vous en remercions et vous assurons de notre très sincère gratitude et de notre plus profond respect.

A mes collègues et amis Laetitia et Thomas,

Merci de vos encouragements, de votre présence, et surtout de cette belle expérience que nous avons vécue ensemble, ce qui nous a permis de nous découvrir et de nous apprécier mutuellement.

Merci à Paul Tossa , pour ta précieuse aide et tes conseils.

A Jean Pierre Michaely, Aline Cazé, Claudia Gallina et Michèle Despesmes,

Des le début vous m'aviez accueillie à bras ouvert, toujours là pour m'encourager, m'aider et me donner des sages conseils, merci pour tout.

Merci Maatem, Patrice, Siwei, et à toute l'équipe de l'INSERM U 954.

Merci à toute l'équipe du LEST et de l'école de santé publique.

Je dédicace ce travail.....

A mon **mari Jonathan**, tu m'as accompagné cette dernière année, merci pour ta présence et ton soutien quotidien.

A **mes parents**, merci pour tous les sacrifices consentis à mon égard, veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance.

A mes frères ; votre petite sœur vous remercie pour tout

A mes frères et sœurs de la mission à Maxéville, merci pour votre soutien

A tous et à toutes qui par un mot, ou un geste ont contribué à l'aboutissement de ce travail

RESUME

L'asthme professionnel (AP) est la maladie respiratoire d'origine professionnelle la plus fréquente dans les pays industrialisés. Il s'agit d'une pathologie complexe dite « multifactorielle » mettant en jeu un grand nombre de facteurs de risques génétiques, constitutionnels, comportementaux et environnementaux.

Sur le plan génétique, l'asthme professionnel représente un bon modèle pour l'étude de l'asthme chez l'adulte et les mécanismes d'interactions gène-gène-environnement masquant ou modulant l'effet de la génétique restent encore à élucider. Aucune étude épidémiologique sur l'asthme professionnel n'a examiné le rôle des facteurs génétiques à un stade très précoce de l'exposition aux allergènes et aux irritants aéroportés.

Nous avons donc cherché dans un premier temps à évaluer le rôle de certains polymorphismes génétiques en rapport avec l'inflammation et l'allergie, à savoir les *IL4RA*, *IL13*, *TNFA*, *IL1A* et *IL5*, sur le déclin de la fonction pulmonaire, l'apparition d'une obstruction ou d'une hyperréactivité bronchiques et l'évolution du monoxyde d'azote exhalé (FeNO) chez 441 apprentis boulangers/pâtisseries et coiffeurs (étude MIBAP). Dans cette première partie nous observons des interactions entre *IL13 R130Q/IL4RA S478P* et *IL13 R130Q/IL4RA Q551R* et la diminution du volume expiratoire forcé ou de la capacité vitale forcée. Le génotype *GG* du *TNFA-G308A* a été trouvé associé à l'hyperréactivité bronchique dans l'ensemble de la population et chez les sujets non atopiques ; nous avons aussi observé que certaines interactions gène-gène étaient associées à une modification du FeNO au cours des deux années d'apprentissage.

Dans un deuxième temps, des déterminants nutritionnels de l'asthme ont été explorés dans une population de jeunes travailleurs engagés dans ces métiers à risque depuis 3 à 10 ans (étude ABCD). Les apports en vitamines, principalement les vitamines A, C, E D, et en

acides gras polyinsaturés oméga 3 et 6 ont été étudiés par questionnaire de fréquence, le diagnostic d'asthme professionnel étant réalisé au moyen d'une batterie d'outils (examen clinique, spirométrie et test de réversibilité d'une obstruction bronchique, mesure du FeNO et examen des taux sériques d'IgE spécifiques). Les résultats portant sur 31 cas d'asthme professionnel et 196 témoins montrent une différence en fonction de la filière : chez les boulangers-pâtisseries, aucun facteur nutritionnel n'est objectivé, contrairement au groupe des coiffeuses chez qui les asthmatiques présentent des apports plus élevés des vitamines A et D. Un déficit en B12 semble être un facteur de risque de survenue d'asthme professionnel et ce indépendamment de la filière. En revanche, aucune corrélation n'est trouvée avec les taux sériques de l'homocystéine et la vitamine B9.

A travers ces études au sein de ces jeunes populations à risque, il ressort que l'expression de certains facteurs de risque de l'asthme professionnel sont modulables en fonction du type d'exposition. Des comportements alimentaires à l'environnement de travail, l'émergence d'une maladie telle que l'asthme professionnel fait appel à des facteurs multiples dont la plupart peuvent être contrôlés et limités par des mesures de prévention efficaces.

MOTS CLEFS : Asthme professionnel, Cytokines, Vitamines, Homocystéine Boulangerie, Coiffure

ABSTRACT

Occupational asthma (OA) is the occupational respiratory disease most common in industrialized countries. It is a multifactorial disease involving a large number of risk factors genetic, constitutional, behavioral and environmental.

At the genetic level, occupational asthma is a good model for the study of adult asthma and the mechanisms of interaction gene-gene-environment masking or modulating effect of genetic remain to be elucidated.

None epidemiological studies on occupational asthma have examined the role of genetic factors in a very early exposure to allergens and airborne irritants.

We initially assess the role of genetic polymorphisms related to inflammation and allergy, namely *IL4RA*, *IL13*, *TNF*, *IL1A* and *IL5*, on the decline of lung function, bronchial hyperresponsiveness and increasing of exhaled nitric oxide (FeNO) in 441 apprentice bakers / pastry-makers and hairdressers (MIBAP study). In this first part we observed interactions between *IL13* and *IL13 R130Q R130Q/IL4RA S478P // IL4RA Q551R* and decreased forced expiratory volume or forced vital capacity. The *GG* genotype of *TNFA-G308A* was found associated with bronchial hyperreactivity in the general population and in non-atopic subjects, we also observed that some gene-gene interactions were associated with a change in the FeNO after two years of training.

In a second time, nutritional determinants of asthma were investigated in a population of young workers employed in these occupations at risk from 3 to 10 years (ABCD study). Intake of vitamins, especially vitamins A, C, E,D, and polyunsaturated fatty acids omega 3 and 6 were studied by frequency questionnaire, the diagnosis of occupational asthma is achieved through a battery of tools (review clinical spirometry and reversibility of bronchial obstruction, FeNO measurement and examination of serum specific IgE). The results on 31 cases of occupational asthma and 196 controls showed a difference in terms of the sector: among bakers, no nutritional factor is objectified, unlike the hairdresser's asthmatics that have higher intakes vitamins A and D. B12 deficiency appears to be a risk factor for onset of occupational asthma regardless of the sector. In contrast, no correlation was found with serum levels of homocysteine and vitamin B9.

Through studies in these young people at risk, it appears that the expression of certain risk factors of occupational asthma is flexible, depending on the type of exposure.

The emergence of a disease such as occupational asthma involves multiple factors, most of which can be controlled and limited by effective preventive measures.

KEY WORDS: Occupational asthma, Cytokine, Vitamin, Homocysteine, Bakery, Hairdressing

Présentation de la thèse

L'asthme professionnel est la maladie respiratoire d'origine professionnelle la plus fréquente dans les pays industrialisés. Il s'agit d'une pathologie complexe dite « multifactorielle », résultant des relations et interconnexions d'un grand nombre de facteurs de risques génétiques, constitutionnels, comportementaux et environnementaux.

L'asthme professionnel est attribuable à des agents présents dans l'environnement professionnel. Plus de 500 agents sont connus pour être impliqués dans le développement de l'AP et sont classés en deux catégories : (i) agents de haut poids moléculaire (surtout des protéines animales ou végétales agissant à travers un mécanisme IgE dépendant) et (ii) agents de bas poids moléculaire (composés organiques et inorganiques généralement non associés à un mécanisme IgE dépendant). Il y a peu d'études prospectives de l'histoire naturelle de l'allergie respiratoire à partir du début de l'exposition à des agents causals au travail jusqu'au développement des stades pré-cliniques et cliniques de la maladie elle-même.

Dans cette thèse nous nous sommes intéressés à deux types de populations issues de deux cohortes différentes l'une d'apprentis (Etude MIBAP) et l'autre de jeunes travailleurs (Etude ABCD). Ces deux populations sont exposées à deux types d'agents différents, les uns à un haut poids moléculaires (la farine), et les autres à un bas poids moléculaire (les produits de coiffure).

Si l'exposition reste la clé de voûte de la survenue de cette maladie, il existe des interactions que l'on ne peut ignorer qui viennent jouer à différents niveaux dans le processus physiopathologique. Ces interactions qui proviennent soit du plan génétique, environnemental ou comportemental, et qui régissent l'apparition de l'asthme sont encore très méconnues.

Sur le plan génétique, l'asthme professionnel représente un bon modèle d'étude de l'asthme chez l'adulte et les mécanismes d'interactions gène-gène-environnement masquant ou modulant l'effet de la génétique restent encore à élucider.

Aucune étude longitudinale sur l'asthme professionnel au sein des apprentis n'a examiné le rôle des facteurs génétiques, à ce stade précoce de l'exposition aux allergènes et aux irritants aéroportés. Or, la plupart des études concernant les facteurs génétiques de l'asthme prennent en compte les enfants, et dans le domaine de l'AP, peu s'intéressent à des jeunes apprentis nouvellement exposés. Le projet MIBAP-Polygène amendé au protocole de base, avait pour objectif d'explorer les polymorphismes génétiques de certains gènes candidats (*Il 1 alpha*, *Il 4R*, *Il 5*, *Il 13*, *TNF alpha*) impliqués dans la physiopathologie de l'inflammation et du recrutement cellulaire.

Ces apprentis, cependant, ne furent pas (*encore*) diagnostiqués comme asthmatiques. Une période de latence étant nécessaire au développement d'une sensibilisation professionnelle et de l'inflammation bronchique, une des perspectives de cette étude était de poursuivre les investigations au-delà des deux premières années d'exposition afin de décrire l'évolution de l'incidence de l'asthme « à plus long terme » ainsi que d'identifier les déterminants de cette incidence. C'est dans ce contexte que l'étude ABCD « Asthme en Boulangerie et Coiffure Débutant » a été mise en place.

Le but de mon travail de thèse consistait à répondre aux objectifs suivants, à savoir :

1. De distinguer les polymorphismes génétiques (*Il 1 alpha*, *Il 4R*, *Il 5*, *Il 13*, *TNF alpha*), en rapport avec la survenue de l'inflammation chez les apprentis de l'étude MIBAP.

2. D'identifier les facteurs de risque nutritionnels et métaboliques influençant l'incidence de l'asthme professionnel au cours des premières années d'exposition de boulangers-pâtisseries et de coiffeurs (Etude ABCD).

Pour répondre à ces objectifs je fus chargée de la réalisation des visites médicales des apprentis et des jeunes travailleurs et plus spécifiquement selon les études:

 Etude « MIBAP POLYGEN »

- o Extraction d'ADN dans le liquide de lavage nasale en vue de l'analyse en PCR
- o La validation des courbes de PCR

 Etude « ABCD »

- o Participation à la rédaction du protocole
- o Elaboration des questionnaires médicaux
- o Saisie et à l'exploitation des données du débit expiratoire de pointe (OASYS)
- o Sélection et à la classification des sujets pour l'étude cas témoins

Ce travail de rédaction regroupe différentes sections :

-  La première partie introductive, qui présente la bibliographie sur l'asthme professionnel, sur la génétique, la nutrition (vitamines ACE, D, oméga 3 et oméga 6), les donneurs de méthyles (vitamines B9 et B12) et le métabolisme de l'homocystéine.

- ✚ La deuxième partie présente les différentes méthodologies des deux études
- ✚ La troisième partie comporte les résultats classés en trois parties :
Premièrement les résultats sur les données des polymorphismes pro inflammatoires dans l'étude MIBAP, deuxièmement les résultats sur les vitamines et l'asthme professionnelle et troisièmement les résultats préliminaires sur les donneurs de méthyles et l'homocystéine dans l'asthme professionnelle. Ces deux derniers résultats sont issus de la même étude, ABCD.
- ✚ Puis suivront la discussion, les différentes perspectives que nous avons pu tirer de ces travaux et enfin la conclusion.

De ces travaux différentes valorisations scientifiques en découlent et sont présentées ci après :

ARTICLES REDIGES

Rémen T*, **Acouetey DS***, Paris C and Zmirou-Navier D. Diet, occupational exposure and early asthma incidence among bakers, pastry makers and hairdressers. *BMC Public Health* 2012, **12**:387 (**Equal contribution*)

Rémen T, Coevoet V, **Acouetey DS**, Guéant JL, Guéant-Rodriguez RM, Paris C, Zmirou-Navier D. Early incidence of occupational asthma among young bakers, pastry-makers and hairdressers: design of a retrospective cohort study. *BMC Public Health*. 2010 Apr 26; 10:206.

Rémen T, **Acouetey DS**, Paris C, Hannhart B, Poussel M, Chenuel B, Barbaud A and Zmirou-Navier D. Early Atopy does not accelerate incidence of occupational asthma in the bakery, pastry and hairdressing sectors. [Soumis]

Dovi Stéphanie Acouetey,¹ MD; Denis Zmirou-Navier,^{1,2*} MD, PhD; Patrice Avogbe,¹ Paul Tossa,¹ MD, PhD; Thomas Rémen,¹ PhD; Annick Barbaud,¹MD, PhD; José-Antonio Cornejo-Garcia,^{1,3} Miguel Blanca,^{1,3} MD; Abraham Bohadana,¹ MD, PhD; Christophe Paris,¹ MD, PhD; Jean-Louis Guéant,^{1*} MD, PhD, AGAF; Rosa-Maria Guéant-Rodriguez^{1*} MD, PhD. **Genetic predictors of inflammation in the risk of occupational asthma in young apprentices** [Soumis]

COMMUNICATIONS ORALES SCIENTIFIQUES

Acouetey DS, Avogbe P, Paris C, Zmirou-Navier D, Bohadana A, Gueant-Rodriguez RM. Influence of pro inflammatory cytokines polymorphisms on the incidence of bronchial hyper-responsiveness after early occupational exposure among hairdressing, bakery and pastry making apprentices. ISES-ISEE 2010, Seoul, Korea, 28/8-1/9/2010.

Acouetey D.S, Rodriguez-Gueant RM, Remen T, Paris C, Gueant JL, Zmirou-Navier D. JIB (Journées Internationales de Biologie), Paris 2-5/11/2010. Sante & Environnement : nutrition, vitamines et oligo-éléments. Statut vitaminique et asthme professionnel dans deux metiers a risque : la boulangerie et la coiffure.

Rémen T, **Acouetey DS**, Coevet V, Paris C, Gueant-Rodriguez RM, Guéant JL, Zmirou-Navier D. ISES-ISEE 2010, Séoul, Corée du Sud, 28/8-1/9/2010. Early symptoms of airways inflammation among young bakers, pastry cooks and hairdressers (communication avec abstract dans la Revue Epidemiology).

Tossa P, Paris C, **Acouetey S**, Michaely JP, Demange V, Wild P, Rémen T, Bohadana A, Zmirou-Navier D. ISEE 2009, Dublin, Irelande, 25-28/08/2009. Incidence of bronchial hyper-responsiveness among apprentices exposed to flourdust and hairdressing chemicals and changes in exhaled nitric oxide.

Tossa P, Rémen T, **Acouetey S**, Michaely JP, Demange V, Wild P, Paris C, Zmirou-Navier D, Bohadana A. ISEE and ISEA 2008 joint conference, Pasadena, California, 12-16/10/2008. Inflammation of airways occurs soon after inception of exposure to flour dust and airborne irritants in bakery, pastry cooking and hairdressing apprentices: a follow-up study of the risk of occupational asthma.

COMMUNICATIONS AFFICHEES

Acouetey S, Avogbe P, Bohadana A, Paris C, Zmirou C, Guéant JL, Guéant-Rodríguez RM - 4^{ème} Journée Claude Huriet de la recherche médicale de la faculté de médecine et du CHU de Nancy. Nancy, France, 19.12.2008 Déterminants polygéniques prédictifs de l'inflammation bronchique précoce chez des jeunes travailleurs exposés à des agents inhalés. « MIBAP-PolyGen

Rémen T, **Acouetey DS**, Paris C, Hannhart B, Poussel M, Chenuel B, Zmirou-Navier D. ISEE 2011, Barcelone, Espagne, 13/9-16/9/2011. Early incidence of occupational asthma among young bakers and hairdressers.

Rémen T, **Acouetey D.S**, Paris C, Hannhart B, Poussel M, Chenuel B, Zmirou-Navier D (2011) - Incidence précoce de l'asthme professionnel en boulangerie, pâtisserie et coiffure : le projet ABCD. Rencontres scientifiques organisées par l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire sur la thématique « Des troubles musculo-squelettiques aux nanoparticules, risques d'aujourd'hui en santé-environnement-travail », 10 mai 2011, Paris, France.

Rémen T, **Acouetey D.S**, Bohadana A, Michaely J.P, Gueant J.L, Gueant R.M, Zmirou-Navier D, Paris C (2009) - ABCD : Asthme en Boulangerie Coiffure Débutant : étude de l'évolution de l'incidence de l'asthme au début de l'activité professionnelle de jeunes boulangers, pâtissiers et coiffeurs, et exploration de ses facteurs de risques. La nouvelle

Gouvernance en Santé, congrès pluri-thématique de la Société française de santé publique.

1er-3 octobre 2009, Nantes, France.

Table des illustrations

Liste des figures

- Figure 1 : Représentation de la cascade inflammatoire lors de la réaction asthmatique allergique immédiate et retardée
- Figure 2 : Histoire naturelle de l'asthme et de l'asthme professionnel.
- Figure 3 : Réponse immunitaire en fonction de TH1 ou Th2
- Figure 4 : Mécanismes de survenue de l'HRB et de l'obstruction des voies aériennes dans développement de l'asthme professionnel à des agents de haut poids et bas poids moléculaires
- Figure 5 : Régulation de la synthèse des IgE par l'IL4 et IL13
- Figure 6 : Métabolisme et actions autocrines et endocrines de la vitamine D
- Figure 7 : Balance omega 3/omega6
- Figure 8 : Structures de l'acide folique
- Figure 9 : Structure de la vitamine B12 ou cobalamine
- Figure 10 : Classement des sujets après administration du questionnaire médical téléphonique selon les symptômes déclarés (par secteur d'activité).
- Figure 11: Classement des sujets après administration du questionnaire médical téléphonique selon les symptômes déclarés (par secteur d'activité).
- Figure 12 : Distribution du taux d'homocysteine en fonction du secteur chez les témoins
- Figure 13 : Distribution du taux d'homocysteine en fonction du secteur chez les cas

Liste des tableaux

Tableau 1 : Critères de définition d'un asthme probable

Tableau 2 : Facteurs génétiques impliqués dans l'asthme professionnel

Tableau 3 : Rôles potentiels des antioxydants dans la survenue des maladies respiratoires liées à l'environnement .

Tableau 4 : Causes d'hyperhomocystéinémie

Tableau 5 : Caractéristiques descriptives des cas et des témoins (Etude ABCD)

Tableau 6 : Caractéristiques des vitamines B et de l'homocystéine selon le statut cas ou témoin indépendamment de la filière

Tableau 7 : Caractéristiques des vitamines B et de l'homocystéine selon le statut cas ou témoin en fonction de la filière

Liste des abréviations

AA	Acide arachidonique
AAL	Acide alpha linoléique
ABC	ATP-binding cassette
ABCD	Asthme en Boulangerie et Coiffure Débutant
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADRB2	Recepteur beta adrenergique
AFSSAPS	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
AGL	Acide gamma linoléinique
AGPI	Acides Gras Poly Insaturés
AGS	Acides gras saturés
AJR	Apports journaliers recommandés
ANR	Agence Nationale de la Recherche
ANSES	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire
AP	Asthme Professionnel
APc	Asthme Professionnel confirmé
APcp	Asthme Professionnel confirmé ou probable
APcpp	Asthme Professionnel confirmé, probable ou possible
APO	Apolipoprotéines
ARA	Acide arachidonique
ARG	Arginine
AS	Asymptomatiques
ATS	American Thoracic Society
BP	Boulangers-Pâtisseries
BPCO	Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive
BPM	Bas Poids Moléculaire
CBS	Cystathionine beta synthase
CD	Cluster de différenciation
CETP	Cholesteryl ester transfer protein
CF	Coiffeurs
CFA	Centre de Formation des Apprentis
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CNAMTS	Caisse Nationale d'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés
CO	Carbon monoxide (Monoxyde de carbone)
COX	Cyclo- oxygénases
CPA	Cellules Présentatrices de l'Antigène
CU	Contact Utile
CVF	Capacité Vitale Forcée
CVL	Capacité Vitale Lente
DEP	Débit Expiratoire de Pointe
DGLA	Acide dihome gamma linolemique
DHA	Acide docosahexaénoïque
EFR	Epreuve Fonctionnelle Respiratoire
EGEA	Etude Epidémiologique sur les facteurs Génétiques et Environnementaux dans l'Asthme
EPA	Acide eicosapentanoïque
ERS	European Respiratory Society
ET	Ecart-Type

FeNO	Fractional Exhaled Nitric Oxide (Fraction exhalée du monoxyde d'azote)
GINA	Global Initiative for Asthma (Consensus international sur l'asthme)
GLN	Glutamine
GOLD	Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease
GRL	Recepteur aux glucocorticoïdes
GSTP	Glutathione-S-transferase gene
HCY	Homocystéine
HL	Hepatic lipase
HLA	Human leukocyte antigen
HPM	Haut Poids Moléculaire
HRB	Hyper-Réactivité Bronchique
HRBns	Hyper-Réactivité Bronchique non spécifique
IgE	Immunoglobuline E
IL	Interleukine
IMC	Indice de Masse Corporelle
IPCRG	International Primary Care Respiratory Group (groupe international pour les premiers soins respiratoires)
IVA	Inflammation des Voies Aériennes
JAK	Janus kinase
L-FABP	Liver Fatty acid-binding proteins
LOX	Lipoxygenase,
LPL	Lipoprotein lipase
LT	Leukotriènes
MCP	Monocyte chemoattractant protein
MdB	Métiers de Bouche
MIBAP	Marqueurs d'Inflammation Bronchique dans l'Asthme Professionnel
MTHFR	Methylenetetrahydrofolate reductase
MTP	Microsomal Triglyceride Transfert. Protein
MTR	Methionine synthase
MTRR	Methionine synthase reductase
NFKB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO	Nitric Oxide (Monoxyde d'azote)
OA	Occupational Asthma
OCR	Optical character recognition (Reconnaissance optique des caractères)
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONAP	Observatoire National des Asthmes Professionnels
ORL	Oto-rhino-laryngologie
PGE	Prostaglandin E
PLTP	Phospholipid transfer protein
Polygen	Polymorphismes génétiques
PTH	Parathormone
RADS	Reactive Airways Dysfunction Syndrome (Syndrome de dysfonction réactive des voies aériennes)
RP	Rhinite Professionnelle
SENSOR	Sentinel Event Notification System for Occupational Risk
SR	Signes Respiratoires
SR-B1	Scavenger receptor class B member 1
SWORD	Surveillance of Work-related and Occupational Respiratory Disease
TDI	Diisocyanate de toluène
TH	T helper

TNF	Tumor necrosis factor
TPBs	Test de Provocation Bronchique spécifique
VDR	Vitamine D receptor
VEMS	Volume Expiratoire Maximal en 1 Seconde

Liste des annexes

Annexe 1	Estimation de l'incidence de l'asthme professionnel chez les boulangers (synthèse de la littérature)
Annexe 2	Estimation de l'incidence de l'asthme professionnel chez les coiffeurs (synthèse de la littérature)
Annexe 3	Substances nutritives influençant l'incidence de l'asthme [35]
Annexe 4	Cycle des folates et de l'homocystéine
Annexe 5	Schéma des visites de l'étude MIBAP
Annexe 6	Technique extraction ADN/Lavages Nasaux
Annexe 7	Fiches techniques (polymorphismes)
Annexe 8	Comparaison internationale des agents étiologiques retrouvés dans l'asthme professionnel et métiers à risque d'AP
Annexe 9	Questionnaire Médical Téléphonique
Annexe 10	Questionnaire Médical
Annexe 11	Questionnaire Alimentaire
Annexe 12	Fiches techniques (dosages biologiques)
Annexe 13	Articles princeps "ABCD"
Annexe 14	Répartition des sujets déclarant des symptômes respiratoires en relation avec le travail après la réalisation de la visite
Annexe 15	Exhaled nitric oxide (FENO) and the screening of occupational asthma in two at risk sectors: bakery and hairdressing

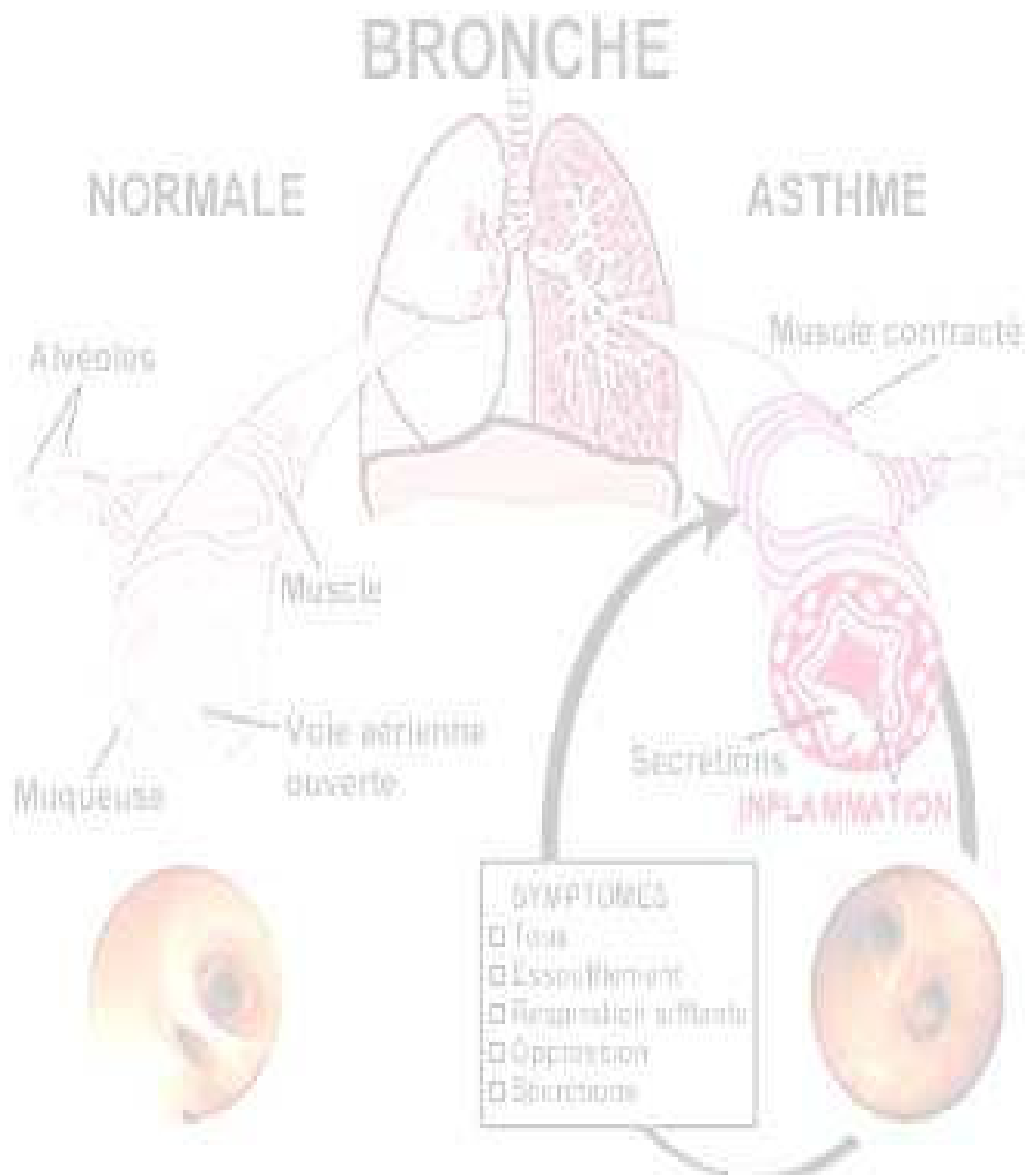
Table des MATIERES

<u>INTRODUCTION.....</u>	1
<u>A. GENERALITES SUR L'ASTHME PROFESSIONNEL</u>	2
I. Importance du problème.....	3
II. Etiologie	4
III. Physiopathologie	5
1. Différents types d'asthme [8, 15,16].....	5
2. Principales anomalies sur le plan physiopathologique [20-22].....	7
IV. CRITERES DIAGNOSTIQUES DE L'asthme	13
1. Asthme probable	13
2. Critères diagnostiques de l'asthme professionnel	14
3. Interrogatoire/questionnaire	15
4. Le débit expiratoire de pointe en pratique ambulatoire.....	20
5. Investigations immunologiques.....	21
6. Epreuves fonctionnelles respiratoires (EFR) et mesure de la réactivité bronchique non spécifique	23
<u>B. POLYMORPHISMES GENETIQUES ET ASTHME PROFESSIONNEL</u>	26
1. Réponse inflammatoire « La triade inflammatoire » : IL-1 – IL-6 – TNF α	31
2. Réponse immune « cytokine gène cluster »	34
3. Etat des lieux dans l'asthme Professionnel	40
<u>C. -NUTRITION ET ASTHME PROFESSIONNEL.....</u>	45
I. <u>VITAMINE ACE</u>	
1. Vitamine C	48
2. Vitamine E.....	50
3. Vitamine A et bêta carotène	52
4. Asthme et antioxydants.	53
II. <u>VITAMINE D</u>	56
III. <u>ACIDES GRAS POLYINSTURES</u>	58
1. Les acides gras oméga-3	60
2. Les acides gras oméga-6	61
3. AGPI et inflammation	62
4. BALANCE OMEGA 3/OMEGA6.....	64
IV. <u>HYPERHOMOCYSTEINEMIE, VITAMINES DU GROUPE B ET INFLAMMATION.....</u>	65
1. Métabolisme de l'Homocysteine (Hcy)	65
2. Les Vitamines du groupe B (B9, B12)	67
3. Rôle de l'Homocysteine et des vitamines du groupe B dans l'inflammation et l'allergie	72
<u>MATERIELS ET METHODES.....</u>	74
<u>A. Etude M.I.B.A.P « Polygen » : Marqueurs de l'Inflammation Bronchique et Asthme Professionnel et polymorphismes génétiques.....</u>	75
I. Objectif de l'étude « MIBAP POLYGEN ».....	75

II.	Description du protocole MIBAP	75
1.	Recueil des données	77
2.	TECHNIQUE DE GENOTYPAGE GENES CANDIDATS : Méthode FRET, Light cycler	80
3.	Analyses statistiques	85
B.	<u>Etude A.B.C.D : Asthme en Boulangerie et Coiffure Débutant</u>	87
I.	Objectifs de l'étude Cas-témoin	87
II.	Matériels et méthodes de l'étude cas- témoin « ABCD »	88
1.	Critères d'inclusion et de non inclusion	88
2.	Matériels et méthodes.....	89
III.	DOSAGE BIOLOGIQUE	97
IV.	ANALYSES STATISTIQUES	97
	<u>RESULTATS</u>	99
A.	<u>ARTICLE 1</u> :.....	100
	<i>Polymorphismes génétiques prédictors de l'inflammation et le risque de l'asthme professionnel chez des jeunes apprentis boulangers-pâtissiers et coiffeurs</i>	
B.	<u>ARTICLE 2</u> :.....	133
	<i>Nutrition, exposition professionnel, et incidence d'asthme chez des jeunes travailleurs boulangers pâtissiers et coiffeurs.</i>	133
C.	<u>RESULTATS 3</u> : (Etude cas témoins, vitamine B9, B12, homocysteine).....	161
	<u>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</u>	169
A.	<u>DISCUSSION</u>	170
I.	DETERMINANTS GENETIQUES DE L'AP	170
1.	Principaux résultats	170
2.	Limites de l'étude.....	174
3.	Originalité de l'étude.....	174
II.	DETERMINANTS NUTRITIONNELLS ET METABOLIQUES DE L'AP	175
1.	Principaux résultats	175
2.	Limites de l'étude.....	178
3.	Forces de l'étude	178
B.	<u>PERSPECTIVES</u>	179
	<u>CONCLUSION</u>	181
	<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	183

INTRODUCTION

A. GENERALITES SUR L'ASTHME PROFESSIONNEL



L'asthme, pathologie de plus en plus préoccupante dans les pays industrialisés, [1] est un véritable problème de santé publique. Outre les 2 000 décès estimés qu'il entraîne chaque année en France, il est également responsable d'une surconsommation médicale et d'une désinsertion professionnelle pour beaucoup de personnes atteintes [1].

Sur le plan professionnel, l'asthme professionnel (AP) est la maladie respiratoire d'origine professionnelle la plus fréquente dans les pays industrialisés, puisqu'il est responsable de 10 à 30 % des asthmes de l'adulte selon les auteurs [2- 4].

I. Importance du problème

L'asthme professionnel a été étudié dans de nombreux pays ayant mis en place un système de surveillance dédié (par filière en annexe 1 et 2). En Finlande, *Karjalainen* utilise des données du registre finlandais des maladies professionnelles et estime l'incidence à 17,4/100 000 pour les sujets âgés de 20 à 64 ans pour la période 1989-1995 [5]. En Suède, *Torén* estime l'incidence de l'asthme professionnel à 80 cas/million en 1990-92 à partir du registre suédois des maladies professionnelles déclarées (SRROD 1995 [5]. En Grande Bretagne, dans le projet SWORD (Surveillance of Work related and Occupational Respiratory Disease) qui repose sur un réseau de médecins du travail et de pneumologues, *McDonald* estime l'incidence de l'asthme professionnel à 44 cas/million chez les hommes et 24 cas/million chez les femmes 1995 [6]. En Italie, l'incidence est estimée à 24/million pour les deux sexes dans le programme de surveillance PRIOR 1995 [7].

En France [8], les données disponibles jusqu'à présent proviennent essentiellement des statistiques des maladies professionnelles de la Caisse Nationale de l'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés et de l'Observatoire National des Asthmes Professionnels créé en 1996. Bien que les données soient parcellaires, cet observatoire a permis de recueillir plus de 3000 cas incidents d'asthme professionnel entre 1996 et 2001.

II. *Etiologie*

L' AP est caractérisé par une inflammation des voies aériennes, une obstruction bronchique variable et une hyperréactivité bronchique non spécifique dues à un environnement professionnel particulier [8]. Une définition plus globale a été proposée récemment par Bernstein et coll [9] « L'AP professionnel est un type d'asthme dû à des causes et conditions attribuables à l'environnement professionnel plutôt qu'à des stimuli rencontrés en dehors du travail ».

Il existe deux types d'asthme professionnel définis en 2008 par « the American College of Chest Physician » [10]. Le premier type : l'AP *d'origine immunologique* apparaît après une période de latence nécessaire pour la sensibilisation de l'individu à l'agent causal. Ce type d'asthme inclut l'AP induit par des mécanismes IgE dépendants (la plupart des substances de haut poids moléculaire et quelques substances de bas poids moléculaire) ou non IgE dépendants (cas des AP induits par l'exposition aux isocyanates). Le deuxième type : est l'AP *non immunologique* qui s'observe en l'absence de période de latence, comme c'est le cas après une exposition accidentelle à des irritants au travail ("irritant induced asthma" ou RADS) [11].

Le principal facteur de risque d'AP est l'exposition [11] déterminée par le type d'agent en cause (sa composition et son poids moléculaire), et les conditions d'exposition (concentrations ambiantes). Plus de 400 agents sont connus [12-13] pour être impliqués dans le développement de l'AP et sont classés en deux catégories : (i) agents de haut poids moléculaire (surtout des protéines animales ou végétales agissant à travers un mécanisme IgE dépendant) et (ii) agents de bas poids moléculaire (composés organiques et inorganiques généralement non associés à un mécanisme IgE dépendant) [14].

Ce nombre est en constante augmentation du fait de la mise sur le marché, chaque année, d'agents potentiellement actifs. Une liste exhaustive des agents étiologiques est régulièrement mise à jour sur le site <http://www.asthme.csst.qc.ca/>.

En France [8], les agents le plus fréquemment incriminés sont la farine (20.3 %), les isocyanates (14.1 %), le latex (7.2 %), l'aldéhyde (5.9 %), les sels de persulfate (5.8 %), et les poussières de bois (3.7 %) ; les populations les plus à risque sont celles des boulangers/pâtisseries (prévalence de 683/million), peintres de carrosserie (326/million), coiffeurs/coiffeuses (308/million), et travailleurs du bois (218/million) [8]

III. Physiopathologie

Les mécanismes physiopathologiques qui conduisent de l'exposition à des agents du milieu professionnel à l'apparition de la maladie sont proches de ceux de l'asthme non professionnel. Les asthmes professionnels peuvent relever de différents mécanismes, souvent intriqués et complexes.

1. Différents types d'asthme [8, 15,16]

D'une manière conventionnelle, il existe deux types d'asthme professionnel. Il est cependant utile de mentionner qu'un asthme *non professionnel* préexistant chez un travailleur, n'exclut pas la survenue d'un AP, pas plus qu'il n'augmente le risque d'en développer un ; dans ce cas il s'agit d'un Asthme Aggravé par le travail (AAT). L'histoire naturelle de la maladie est variable.

a) Asthme avec période de latence ou asthme de mécanisme allergique

C'est la forme la plus fréquente. Elle comporte une période de latence nécessaire à l'acquisition de la sensibilisation et le développement de l'asthme.

Ils ne surviennent qu'après une durée d'exposition pouvant varier de quelques semaines à plusieurs années. Il a été démontré que la survenue de l'AP *avec période de latence* peut survenir dans la première année d'exposition pour 40 % des personnes exposées aux agents de faible poids moléculaire [14], IgE dépendants ou indépendants. Ils affectent une minorité de sujets exposés et, après sensibilisation, récidivent lors de toute exposition à l'agent causal, même à faible concentration.

Les asthmes IgE dépendants résultent le plus souvent d'une sensibilisation à des molécules de haut poids moléculaire (protéines ou polysaccharides d'origine animale ou végétale), ou certains agents de faible poids moléculaire (isocyanates, anhydrides d'acide ou sels de platine) et affectent principalement des sujets atopiques.

Pour la majorité des agents chimiques de faible poids moléculaire, un mécanisme IgE dépendant n'a pu être démontré. Les asthmes professionnels dus à ces agents ne semblent pas favorisés par un terrain atopique. D'autres mécanismes tels que l'hypersensibilité à médiation cellulaire, l'activation du complément, ou encore l'histamino-libération non spécifique ont été évoqués.

b) Asthme sans période de latence : Asthmes de mécanisme irritatif ou toxique

Ils surviennent au décours immédiat d'une exposition aiguë massive et accidentelle à un agent irritant bronchique. Mettant en jeu des mécanismes inflammatoires, ils ont été décrits initialement par S.M. Brooks, sous l'appellation de Réactive Airways Dysfunction Syndrome (RADS). [14, 17-18]

La réexposition à l'agent causal à faible concentration n'induit pas la reproduction des symptômes. Les deux principaux agents étiologiques sont le chlore et l'ammoniac.

D'autres formes d'asthme non allergique ont été décrites [19]:

- asthme de mécanisme pharmacologique : certains agents professionnels peuvent agir comme des substances pharmacologiques agonistes et induire une bronchoconstriction directe du muscle lisse. Parmi ces mécanismes, on retrouve (i) l'histamino-libération non spécifique pouvant entraîner une bronchoconstriction aiguë (ex : poussières de coton), (ii) l'inhibition des cholinestérases du fait d'une surcharge bronchique en acétylcholine (ex : certains pesticides comme les carbamates et les organophosphorés), (iii) l'activation du complément entraînant la production d'anaphylatoxines C3a et C5a histaminolibératrices (ex : cèdre rouge, acide plicatique) ;
- asthmes de mécanisme réflexe et inflammatoire neurogène : certains produits chimiques ou inertes ont la capacité de provoquer une bronchoconstriction réflexe en stimulant les récepteurs de l'irritation des voies aériennes (ex : ozone, SO₂, NO₂).

2. Principales anomalies sur le plan physiopathologique [20-22]

Nous allons successivement aborder :

- 1) Modifications morphologiques responsables de l'obstruction bronchique (en aigu, de manière chronique).
- 2) Hyperréactivité bronchique non spécifique (HRBNS) ou hyperexcitabilité bronchique non spécifique à des stimuli naturels (exercice, froid, polluants chimiques d'origine atmosphérique), des médiateurs chimiques (telle que l'histamine), et des agents agonistes (tels que les dérivés cholinergiques).
- 3) L'inflammation bronchique : caractéristique commune à toutes les formes d'asthme, dont les mécanismes sont incomplètement connus (inflammation d'origine neurogène, d'origine mastocytaire et/ou macrophagique, et/ou éosinophilique, et inflammation d'origine lymphocytaire).

Il est à noter que **le mécanisme allergique** est une des hypothèses physiopathologiques prédominantes, 50 % des asthmatiques ont une composante allergique décelable par les méthodes actuelles (tests cutanés, dosages d'IgE spécifiques).

a) L'obstruction bronchique

A la phase aiguë cela se caractérise par un bronchospasme des muscles lisses, un œdème de la muqueuse et des sécrétions endobronchiques

b) L'Hyperréactivité bronchique « HRB »

L'hyperréactivité est variable et peut être démontrée par une diminution du volume expiratoire maximal/seconde (VEMS) ou du débit expiratoire de pointe (DEP). L'hyperréactivité peut notamment se manifester spontanément, être initiée par des facteurs précipitants ou lors d'un test de provocation bronchique non spécifique à la métacholine ou à l'histamine. L'intensité de l'HRB peut diminuer avec la cessation de l'exposition chez certains sujets, elle reste parfois inchangée, même plusieurs années après. Ceci laisse suggérer que l'inflammation n'est pas le seul facteur déterminant l'HRB. Le retour à la normale de la réactivité bronchique dépend de la durée de l'exposition, du niveau de l'obstruction et du degré d'HRB à l'époque du diagnostic d'asthme professionnel [23-25] . Malo et coll. [26] ont montré que le plateau d'amélioration de l'obstruction s'observe un an après la cessation de l'exposition, alors que celui de l'HRB est plus tardif.

c) L'inflammation

L'inflammation des voies aériennes ou ses conséquences jouent un rôle important dans la pathogenèse et dans la persistance de l'asthme.

Cette inflammation fait le lit de l'hyperréactivité bronchique non spécifique, caractéristique de l'asthme, et aggrave l'obstruction bronchique.

Chez l'adulte, il a pu être établi que la sévérité des crises est conditionnée par le degré de l'inflammation bronchique [21]. Le rôle de l'inflammation bronchique et des changements structuraux de la paroi dans l'asthme a été très discuté au cours des dernières années [21]. Cette altération princeps entraîne des modifications anatomo-pathologiques des bronches qui peuvent être irréversibles : hypertrophie du muscle lisse, néovascularisation, dépôt de collagène dans l'épithélium. Les mécanismes par lesquels des agents du milieu professionnel peuvent induire de l'asthme sont proches de ceux de l'asthme non professionnel ; les mécanismes immunologiques y jouent un rôle prépondérant.

A l'appui de ce type de mécanismes, la mise en évidence d'IgE spécifiques de glycoprotéines d'origine animale ou végétale, mais aussi de petites molécules chimiques tels que les sels de platine, la chloramine T, le nickel, la mise en évidence de modifications histologiques sur les biopsies bronchiques telle qu'une infiltration à éosinophiles et à T lymphocytes activés dans des asthmes professionnels modérés.

L'inflammation est donc responsable d'une part, du développement d'une hyperréactivité bronchique et d'autre part, de modifications parfois durables et définitives des petites bronches, encore appelées remodelage bronchique.

Toutes ces données, démontrées pour la muqueuse bronchique, sont transposables à la muqueuse nasale qui est en continuité avec les bronches et se comporte de la même façon.

Un lien très étroit, non seulement anatomique mais également physiopathologique, lie le nez et les bronches [27].

Le développement d'une inflammation chronique des tissus bronchiques est muet, d'où la nécessité de le dépister tôt avant son installation qui signe alors l'irréversibilité des signes cliniques.

d) Mécanismes physiopathologiques

Le mécanisme allergique est alors tout à fait comparable à celui des asthmes allergiques aux pneumallergènes habituels de l'environnement. La signification des anticorps de type IgG dirigés contre l'acide plicatique ou divers isocyanates est encore incertaine.

Le rôle de l'hypersensibilité à médiation cellulaire reste également à démontrer [28].

D'autres mécanismes peuvent être en cause : activation du complément, histaminolibération non spécifique, mécanismes pharmacologiques tels que l'inhibition des cholinestérases due aux insecticides organophosphorés, altération de l'épithélium, mécanismes réflexes, déficit en endopeptidases neutres responsable de l'inflammation neurogène induite par la libération de tachykinines [28].

L'asthme dépend donc de différents mécanismes physiopathologiques et, il est probable que les mécanismes pathogéniques fondamentaux soient communs [11].

La plupart des asthmes surviennent sur un terrain atopique caractérisé par la production excessive d'immunoglobulines IgE dirigées contre des aéro-allergènes environnementaux. Les IgE se fixent à des récepteurs de haute affinité et sur des récepteurs d'affinité plus faible situés à la surface des plaquettes, monocytes et macrophages, lymphocytes et éosinophiles, ce qui permet à ces cellules d'être activées en présence d'un allergène spécifique. La cellule de Langerhans, le monocyte et l'éosinophile expriment également un récepteur de haute affinité.

La réponse des voies aériennes à un allergène inhalé comporte deux phases :

- *la phase précoce* caractérisée par la survenue rapide d'une bronchoconstriction

qui est maximale 15 à 20 minutes après l'inhalation de l'allergène et qui régresse spontanément dans l'heure suivante ; cette phase survient chez tous les patients ayant un asthme allergique ; la phase précoce est due à l'interaction entre l'allergène et les IgE présentes à la surface des mastocytes et des basophiles ; elle est l'expression d'une réaction d'hypersensibilité immédiate médiée par les IgE (et accessoirement par les IgG4 chez

l'homme, les IgG1 chez la souris) ; elle est facilement contrôlée par l'inhalation d'agonistes β 2-adrénergiques ; elle est prévenue par l'inhalation d'agonistes β 2-adrénergiques ou de cromoglycate de sodium .

Une dose unique de corticoïdes oraux ou inhalés est inefficace mais une administration prolongée sur plusieurs jours peut inhiber partiellement cette phase précoce, en partie par la diminution du nombre de mastocytes présents dans la muqueuse bronchique ;

- *la phase tardive débute 4 à 6 heures après l'inhalation antigénique, dure environ 12 heures et peut parfois se répéter les jours suivants ; elle survient chez près de 50 % des patients et se caractérise par la persistance de l'obstruction bronchique (plus de 12 heures), une sensibilité réduite aux traitements broncho-dilatateurs (β 2-mimétiques) et l'existence d'une hyperréactivité bronchique ; cette phase est reliée à une infiltration cellulaire polymorphe de la paroi bronchique comportant des neutrophiles, puis des polynucléaires éosinophiles et des lymphocytes [16] ; on suppose que cet infiltrat inflammatoire est dû à l'activation des cellules résidentes (cellules endothéliales et épithéliales) et des cellules inflammatoires (mastocytes, macrophages...) lors du contact avec l'allergène ; la sécrétion locale de molécules chimio-attractantes et l'expression de molécules d'adhérence intercellulaire permettent l'attraction puis l'activation au site de la réaction inflammatoire de cellules effectrices spécialisées responsables des manifestations cliniques et fonctionnelles.*

La figure 1 résume la cascade inflammatoire survenant dans l'asthme.

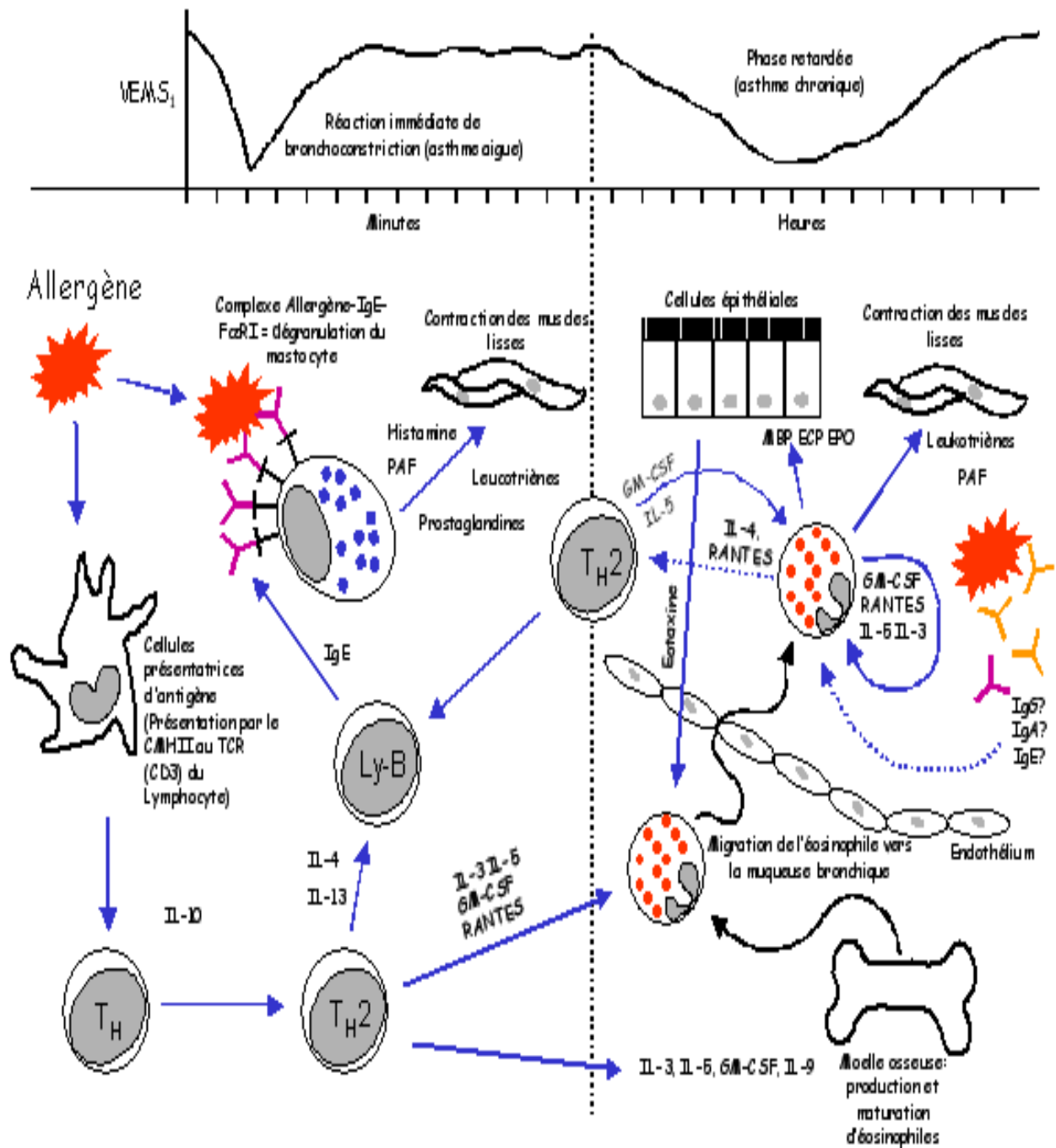


Figure 1 : Représentation de la cascade inflammatoire lors de la réaction asthmatique allergique immédiate et retardée

IV. CRITERES DIAGNOSTIQUES DE L'asthme

1. Asthme probable

Une période de latence de durée variable (de plusieurs mois à plusieurs années) entre l'exposition initiale et l'apparition des symptômes est caractéristique des asthmes avec réactions immunologiques. La symptomatologie respiratoire peut se déclarer suite à l'inhalation d'allergènes présents dans l'air ambiant. L'individu va soit développer une symptomatologie respiratoire supérieure ou des réactions cutanées, soit évoluer vers une irritation bronchique sous forme d'HRBNS. Un asthme peut alors survenir dans un environnement professionnel, mais peut aussi résulter de l'amplification d'une HRBNS ou d'un asthme déjà présent en dehors du milieu professionnel [29]. Les facteurs génétiques, associés à l'inhalation de substances provoquant une inflammation bronchique, contribuent à l'expression clinique de l'asthme [30].

Chez l'adulte qui n'a pas d'antécédents d'asthme de l'enfance, le diagnostic d'AP doit être systématiquement envisagé.

L'hyperréactivité bronchique, bien que caractéristique de l'asthme n'est pas synonyme d'asthme et de plus elle peut être présente sur des sujets asymptomatiques.

Des études ont montré que l'hyperréactivité bronchique n'est pas plus sensible que les symptômes, ou le VEMS, pour détecter à lui seul les effets sur les voies aériennes d'une exposition professionnelle.

Même si, de façon générale, il existe peu d'évaluation quantitative sur une relation dose-réponse entre le niveau d'exposition et la prévalence de l'asthme professionnel, cette relation a été retrouvée pour certains agents, montrant une augmentation du risque de développer l'asthme en fonction d'une élévation du niveau d'exposition de ces agents [11]. Les études chez les apprentis permettent d'étudier les premières étapes et de déterminer des asthmes probables.

Les modèles utilisés pour définir un asthme probable, varie d'une étude à une autre mais peu d'études se sont intéressées à la définition d'un asthme probable chez les apprentis.

Le tableau 1 qui suit nous décrit les différents paramètres intervenant dans la définition d'un cas d'asthme probable chez des apprentis exposés, selon la littérature:

Tableau 1 : Critères de définition d'un asthme probable

Critères paracliniques	Critères cliniques	Population d'étude	Références
Installation ou augmentation <u>HRB</u> + au moins 1 prick test positif aux allergènes au travail	non considérés	Apprentis en santé animale ; en pâtisserie, et en hygiène dentaire	Gautrin AJRCCM 2001 [31]
Augmentation significative <u>HRB</u>	symptômes au travail	Apprentis soudeurs	El Zein 2003 [32]
<u>HRBns</u> + prick test ou IgE sp	non considérés	Revue de littérature	Beach et al Chest 2007 [33]

2. Critères diagnostiques de l'asthme professionnel

Le diagnostic d'asthme professionnel devrait être confirmé de façon objective en établissant le lien entre l'asthme et l'exposition professionnelle [34,35]. Ce diagnostic est basé sur une histoire professionnelle certaine et la présence de limitations variables des débits ventilatoires ou, si les volumes pulmonaires sont normaux, la présence d'hyperréactivité bronchique non spécifique à la métacholine ou à l'histamine.

3. Interrogatoire/questionnaire

a) Anamnèse

Tout asthme apparaissant chez un adulte en activité professionnelle devrait inciter à rechercher systématiquement une cause liée au travail [36], surtout si le sujet appartient à un groupe professionnel « à risque ». Une anamnèse professionnelle doit être la première étape dans l'évaluation initiale de l'asthme survenant chez l'adulte. La survenue des symptômes peut être d'emblée évocatrice lorsqu'ils sont rythmés par le travail, apparaissant pendant le travail ou dans la soirée ou la nuit suivant le travail et s'améliorant durant les jours de vacances [37].

L'asthme associé à une rhino-conjonctivite et, occasionnellement, à un rash cutané (urticaire), chez un individu exposé à des substances chimiques de haut poids moléculaire, est très vraisemblablement d'origine professionnelle. Les symptômes peuvent apparaître seulement quelques semaines ou quelques années après une exposition dont la durée tend à être plus courte en cas d'exposition à des substances chimiques de bas poids moléculaire.

L'interrogatoire est plus utile pour exclure que pour confirmer le diagnostic d'asthme professionnel. Selon Malo et coll. [38], la valeur prédictive d'une histoire négative serait de 83 % alors que la valeur prédictive d'une histoire suggestive ne serait que de 63 %.

b) Enquête environnementale

Elle est essentielle et permet le repérage des agents déjà connus et l'identification des circonstances de déclenchement des crises. Elle se caractérise par une étude du poste de travail (actuel, antérieur). Il est aussi nécessaire d'obtenir la liste de tous les produits manipulés et l'obtention des fiches de données de sécurité auprès du fabricant est fondamentale. Les conditions de travail et de protection individuelle doivent être précisées. Une métrologie ou prélèvements atmosphériques qualitatifs et quantitatifs sont surtout nécessaires pour le diagnostic de nouvelles causes d'asthme professionnel.

Cette enquête bien conduite permettra aussi d'évaluer les risques, car elle tient en compte la nature de l'agent sensibilisant.

c) Recherche des facteurs de risque individuels

L'AP est une maladie multifactorielle faisant intervenir à la fois des facteurs reliés à l'hôte et à l'environnement.

i. Agents en cause

L'exposition est le déterminant le plus important dans la survenue d'un asthme professionnel [3, 39]. L'importance des facteurs professionnels est variable selon les pays ; en Norvège, les fonderies d'aluminium sont souvent mises en cause, tandis qu'en Allemagne ou en Suède, les boulangers sont plus nombreux à développer un asthme professionnel et en général les agents biologiques sont le plus souvent en cause.

Selon l'Observatoire National des Asthmes Professionnels, ils sont ainsi responsables de 48,6 % des cas, devant les agents chimiques (42,8 % des cas) et les métaux (2 %). La farine serait donc le premier responsable.

Les agents en cause sont revus à la suite dans les principaux secteurs d'activité concernés [8] .

- ***Boulangers, pâtisseries***

La farine (blé et seigle) est la principale étiologie, mais de nombreux autres allergènes peuvent être impliqués, notamment les enzymes utilisées comme améliorants de la farine (alpha-amylase, cellulase) et les contaminants de la farine (acariens de stockage, charançons du blé, papillons, blattes, etc.).

- ***Coiffeurs***

Il existe plusieurs causes possibles, mais les cas sont dus en majorité aux persulfates alcalins. Ces molécules, conditionnées sous forme de poudres très fines, sont utilisées comme produits de décoloration capillaire. Des cas d'AP, beaucoup plus rares, ont été imputés aux teintures capillaires, aux produits de permanente ou au henné.

D'après l'Observatoire National des Asthmes Professionnels, la farine et les isocyanates constituent les principales causes d'asthme chez les hommes, alors que les persulfates alcalins et le latex sont les agents étiologiques les plus fréquents pour les femmes.

ii. Causes non modifiables

1) Age et sexe

Ni l'âge, ni le sexe ne sont des facteurs de risque d'AP. La distinction entre les sexes proviendrait plus particulièrement dans le choix de la filière, plus privilégié par un sexe ou non. La filière coiffure majoritairement féminine alors que la filière boulanger/pâtissier est majoritairement masculine.

2) Atopie

C'est une prédisposition, d'origine héréditaire ou génétique, à développer des réactions allergiques au contact d'allergènes. Elle est définie par une réponse positive aux tests cutanés à des pneumallergènes communs, et par une élévation des IgE totales et spécifiques. L'introduction d'un antigène va susciter la formation d'anticorps de classe immunoglobulines E en quantité exagérée. Ces protéines de sérum sanguin sont spécifiques de l'allergène concerné. Il a été démontré que la survenue d'un asthme professionnel est également liée au statut atopique du sujet [40-41] dans le cas de la sensibilisation IgE médiée, ce qui représente un facteur de risque non négligeable chez les sujets exposés à de HPM comme la farine ou les substances animales [41-42].

Le rôle de l'atopie dans l'apparition des asthmes professionnels est estimé à environ 30 %. Elle est un facteur de risque majeur pour l'apparition d'une sensibilité professionnelle aux agents de haut poids moléculaire [42].

La valeur prédictive de l'atopie est cependant basse car en effet seul un tiers des atopiques va peut-être développer une maladie professionnelle [42,43].

Par contre ce facteur de risque est moins présent chez les sujets exposés à des agents de bas poids moléculaire, ne faisant pas intervenir la voie IgE, mais plus un processus irritatif. Ces individus atopiques ne présenteraient pas d'excès de risque de développer un AP par rapport aux sujets non atopiques [44].

3) Facteurs génétiques (section 2)

L'asthme est une maladie polygénique et de nombreux autres gènes candidats ont été identifiés ou proposés pour jouer un rôle mais aussi d'autres gènes sans relation avec l'immunité mais intervenant dans l'hyperréactivité bronchique [45], cette section introductive sera développée plus longuement dans la section 2.

L'étude de la génétique dans l'AP permet de mettre en évidence des interactions de type gène-environnement, gène-gène, gène-gène-environnement, gène-environnement-environnement.

Un travail récent [46] suggère qu'un polymorphisme du gène *MTHFR* impliqué dans le métabolisme des folates et vitamines B serait associé au risque d'asthme.

La complexité génétique de cette maladie témoigne de son caractère multifactoriel.

iii. Causes modifiables

1) Rhinite professionnelle

Dans la population générale, les données épidémiologiques actuelles font état d'un lien étroit entre rhinite allergique et asthme ; ces deux pathologies coexistent très fréquemment et la

rhinite allergique est un facteur de risque de développement d'un asthme. On parle de la notion de « United Airway Disease » ou « one airway one disease » [46].

Dans le domaine professionnel, cette unicité fait actuellement l'objet de controverses et l'on observe que dans les études transversales réalisées, la prévalence de la rhinite professionnelle est généralement plus élevée que celle de l'asthme bronchique, quel que soient la gêne et les secteurs d'activités concernés : farines, poussières de céréales, protéines du latex, animaux de laboratoire, enzymes, poussières de bois, persulfates [47].

MALO et coll. ont montré que des symptômes ORL sont très fréquemment retrouvés chez les sujets atteints d'asthme lié au travail. [37]. Pour SIRACUSA et coll., la prévalence des symptômes de rhinite ou de rhinoconjonctivite liés à l'environnement professionnel chez les sujets souffrant d'asthme professionnel peut être estimée entre 76 et 92 %. [47].

Quand les rhinites professionnelles sont associées à l'asthme, elles sont le plus souvent causées par des agents de haut poids moléculaire [49]. Une étude récente de SEED et coll., a observé ainsi des ratios plus élevés pour les molécules de haut poids moléculaire par rapport aux molécules de bas poids moléculaire. [46, 50]. Chronologiquement, des études portant sur le suivi de sujets exposés dans le cadre professionnel ont montré que l'asthme professionnel fait suite à la rhinite professionnelle [3].

2) Tabac

Le tabagisme est souvent décrit comme un facteur de risque de l'asthme professionnel, même si son effet sur le développement de l'asthme fait toujours l'objet de débats. Le lien entre tabac et asthme professionnel, rhinites professionnelles et sensibilisation professionnelle, sont complexes et contradictoires [51,52].

3) Facteurs nutritionnels (section 3)

L'hypothèse nutritionnelle attribue l'augmentation des allergies respiratoires à des changements dans l'apport alimentaire, principalement en anti-oxydants et en lipides [53,54].

Cette modification de l'alimentation aurait pour conséquence des modifications complexes sur le plan immunomodulateur et aussi des effets pro-inflammatoires, avec une probable association bénéfique entre ces composés et les paramètres de l'asthme et des maladies atopiques [53].

Cette partie ne constitue qu'une introduction du sujet qui fera l'objet d'un plus long développement en section 3.

L'annexe 3, regroupe les différentes sortes de nutriments et leur effet potentiel dans la survenue de l'asthme. Sur le plan professionnel, peu de données ont été publiées, et le domaine reste vaste.

4. Le débit expiratoire de pointe en pratique ambulatoire

Dans la démarche diagnostique classique, la première étape est souvent constituée par des mesures du DEP [55] portant à la fois sur les périodes d'activité et de congé. Burge et coll. (1979) ont proposé le monitoring du débit expiratoire de pointe (DEP) au travail et en dehors du travail pour évaluer l'AP : différents profils de réaction ont été décrits (Burge, 1982).

Celui caractérisé par la décroissance progressive du DEP pendant le travail et son amélioration pendant les périodes de congé est très utile. Vandenplas *et coll.* [pauli] en soulignent cependant les inconvénients multiples : biais dus à l'enregistrement par le patient lui-même, non identification de l'agent responsable, difficultés de faire effectuer une mesure de l'obstruction bronchique par des professionnels de santé sur les lieux du travail (DEP et spirométrie). Cependant, l'équipe de Burge [58] a prôné récemment un système assisté par ordinateur et estime que des mesures répétées du débit expiratoire de pointe peuvent souvent aider le clinicien à prendre une décision. On demande au patient de faire les mesures au moins

quatre fois par jour et de noter les différents symptômes observés ainsi que les différents médicaments utilisés pendant les périodes d'activité et les périodes de repos [118]. La sensibilité et la spécificité du DEP sont respectivement de 73 et 100 %, soit plus élevées que celles des autres tests objectifs [56].

Les études visant à déterminer le nombre minimum de mesures qui doivent être faites sans réduction de sensibilité et de spécificité montrent qu'une mesure 4 fois par jour est aussi bonne qu'une mesure toutes les deux heures [58]. La période minimale de monitoring est de 2 semaines au travail et d'au moins 1 semaine à 10 jours en dehors du travail. L'utilisation de médicaments n'est pas interdite, mais le sujet doit, autant que possible, prendre les mêmes quantités pendant le monitoring. Les agents bêta-2 mimétiques doivent être utilisés à la demande, et toujours après la mesure du DEP. Les principales limitations de la mesure du DEP sont les suivantes :

- le DEP est dépendant de l'effort et demande donc la collaboration du sujet, ce qui n'est pas toujours aisé à obtenir ; l'utilisation de nouveaux appareils de mesure de DEP avec microprocesseurs incorporés permet d'assurer au mieux la fiabilité des résultats ;
- un tracé positif indique une relation entre asthme et travail, mais n'identifie pas spécifiquement l'agent responsable.

5. Investigations immunologiques

a) Prick tests

La présence d'une réactivité cutanée de type immédiat ou une augmentation des taux d'IgE ou d'IgG spécifiques est le reflet d'une exposition ou d'une sensibilisation, mais n'est pas synonyme d'asthme professionnel. Inversement, un test cutané négatif aux substances chimiques de haut poids moléculaire (céréales, psyllium) n'exclut pas entièrement le diagnostic d'AP, mais le rend peu probable [59].

Par leur sûreté, spécificité et sensibilité - supérieures à celles des techniques sérologiques d'immunoabsorption - les tests cutanés par la technique du prick test (intradermoréaction) sont considérés comme la méthode idéale pour détecter la sensibilité à des substances de haut poids moléculaire [58].

L'évaluation des substances de bas poids moléculaire est plus délicate. Les tests cutanés sont presque toujours inutiles bien que des exceptions existent (sels de platine par exemple, et quelques autres dont les tests possèdent une grande sensibilité [59]). Il existe des techniques fiables de recherche d'anticorps IgE spécifiques pour plusieurs acides anhydriques et pour les teintures [50].

De plus la réponse aux Prick tests peut être positive dans plus de 60 % des cas chez des sujets asymptomatiques exposés professionnellement aux enzymes [60].

b) Les dosages d'IgE et IgG spécifiques

Ils n'écartent, ni ne confirment le diagnostic. Une étude suggère, néanmoins, que la présence d'IgE spécifiques contre les isocyanates est très spécifique, bien que peu sensible, pour le diagnostic de l'asthme aux isocyanates.

Néanmoins, la recherche d'une sensibilisation immunologique médiée par les IgE, par tests cutanés ou par la mesure d'IgE spécifiques sériques (RAST), peut être utile au diagnostic d'asthme professionnel.

Pour les agents de poids moléculaire très élevé, la sensibilisation immunologique est considérée comme un test d'excellente sensibilité [59] ; c'est-à-dire que l'absence de ces anticorps élimine effectivement le diagnostic d'asthme professionnel. Ceci suppose bien entendu la bonne qualité des tests sur tous les allergènes sélectionnés. Mais le test ne garantit pas une spécificité de 100 %, aussi la découverte d'anticorps IgE spécifiques ou un Prick test positif ne signifie pas nécessairement l'existence d'un asthme professionnel.

Enfin, concernant les dosages des IgG spécifiques, ils se sont révélés positifs dans certains cas d'AP, en particulier ceux où les anhydrides d'acide seraient l'agent responsable [129]. Cependant, la présence des IgG serait fréquente chez les salariés exposés, qu'ils présentent une symptomatologie évocatrice ou non. Elle est considérée davantage comme un reflet de l'exposition professionnelle [61].

6. Epreuves fonctionnelles respiratoires (EFR) et mesure de la réactivité bronchique non spécifique

a) Spirométrie de base

L'examen spirométrique de base permet de confirmer le diagnostic d'asthme s'il met en évidence un syndrome obstructif, c'est-à-dire un coefficient de Tiffeneau (VEMS/CV) diminué de 20 % par rapport à la théorique, réversible sous traitement bronchodilatateur.

La mise en évidence d'un syndrome obstructif à caractère réversible est une étape importante dans la démarche visant à caractériser la présence d'asthme [62].

Malgré ses limites, la spirométrie demeure l'outil indispensable pour le dépistage et la surveillance d'anomalies de la fonction respiratoire. La capacité vitale forcée (CVF), le volume expiré maximal en une seconde (VEMS), donnant le rapport de Tiffeneau (VEMS/CVF) sont les index spirographiques les plus utiles pour l'appréciation de la déficience respiratoire.

Les conditions de l'examen sont primordiales. Bien réalisé, c'est un examen simple, reproductible mais non spécifique d'une pathologie professionnelle. Les volumes pulmonaires et les débits expiratoires maximaux varient avec l'âge, le sexe et surtout la taille. Les résultats doivent être comparés aux valeurs de référence du laboratoire, exprimées sous forme de moyenne avec leur écart-type dans la population normale. Les valeurs de référence habituellement utilisées en France sont celles des experts de la Communauté européenne Charbon Acier (CECA), publiées en 1960 et corrigées en 1983.

b) Tests de provocation bronchique : hyperréactivité bronchique spécifique ou non spécifique

En cas de normalité des EFR de base, il est nécessaire de réaliser une épreuve de provocation bronchique non spécifique à la métacholine, à la recherche d'une hyperréactivité bronchique non spécifique (HRBNS).

Si la réactivité bronchique peut être normale si elle est mesurée à distance de l'exposition au facteur de risque [63], l'absence d'hyperréactivité bronchique au décours d'une période d'exposition permet pratiquement de récuser le diagnostic.

La controverse demeure dans l'implication effective de l'HRB dans la survenue de l'AP soit en tant que résultat de l'exposition ou en tant que facteur prédisposant à l'asthme professionnel.

***i.* Hyperréactivité bronchique spécifique : Gold standard**

Les tests d'HRB bronchique spécifique aux agents professionnels [126] sont réalisés dans peu de centres spécialisés [38-61] ; même s'ils représentent des tests de certitude, ils ne peuvent être réalisés en routine. Ils sont considérés comme le gold standard dans la démarche diagnostic de l'AP.

Par ailleurs, seulement 50 % des sujets avec diagnostic clinique d'AP présentent une réponse positive à ces tests [38]. Ce test nécessitant beaucoup de temps pour sa réalisation et pouvant donner de faux résultats (surtout faux négatifs) [64], il ne doit être réalisé que dans des conditions bien précises et surtout en cas de discordance entre les résultats du DEP et ceux des test d'HRB non spécifique à la métacholine ou à l'histamine, ou encore lorsqu'il est nécessaire de confirmer le diagnostic dans le cas d'une suspicion d'un nouvel agent non répertorié.

Un test négatif chez un travailleur éloigné du travail depuis plusieurs mois n'écarte pas le diagnostic d'asthme professionnel (« désensibilisation »).

Une alternative moins contraignante et moins dangereuse est le test de provocation nasale.

ii. Hyperréactivité bronchique non-spécifique

Sa présence n'est pas strictement synonyme d'AP. Bien qu'elle soit reconnue comme un des phénotypes de l'asthme [45], l'hyperréactivité bronchique (HRB) est présente aussi dans d'autres conditions maladies telles que : rhinite, bronchopneumopathie chronique obstructive – BPCO [65].

Elle peut être aussi isolée, voir asymptomatique chez environ 10 % des sujets avec une HRBNS. Des cas authentiques d'AP sans HRBns ont aussi été décrits. Ils représenteraient, par exemple, environ 10 à 20 % des AP aux isocyanates [65].

C'est un test utile pour identifier des malades dont les symptômes respiratoires ont une relation causale avec l'exposition professionnelle. Une bonne corrélation existe entre le degré d'HRB et la symptomatologie clinique : un sujet avec HRB présente volontiers des symptômes lors d'une exposition à des substances irritantes en milieu professionnel.

La pathologie asthmatique professionnelle est un véritable problème de santé publique, et force est de constater que le voile sur cette maladie n'est pas encore levé, les causes modifiables et non modifiables restent encore à distinguer.

Dans les sections suivantes nous allons vous présenter les facteurs de risque non modifiables (génétique) et ceux modifiables (nutrition)

B. POLYMORPHISMES GENETIQUES ET ASTHME PROFESSIONNEL



L'asthme est une maladie inflammatoire bronchique, complexe et hétérogène dans ses manifestations. Son développement est favorisé par l'association d'une prédisposition génétique et d'une exposition à des facteurs liés à l'environnement et au mode de vie.

Le principal risque de développer un asthme professionnel est l'exposition à l'agent incriminé. Mais d'autres facteurs interviennent dans la survenue de la pathologie outre l'exposition et interagissent les uns avec les autres. Plusieurs modèles d'interaction ont été proposés [66]. Quatre modèles pourraient contribuer au risque de développer l'AP : interactions de type *gène-environnement*, *gène-gène*, *gène-gène-environnement*, *gène-environnement-environnement*.

L'AP avec période de latence est un bon modèle d'étude de l'asthme chez les adultes et permet la mise en évidence d'interactions de type gène-environnement dans l'asthme.

Si la physiopathologie de l'asthme professionnel aux agents de haut poids moléculaire est superposable à celle des asthmes allergiques, avec au premier plan la responsabilité des lymphocytes activés de type Th2, celle par contre des asthmes professionnels aux agents de bas poids moléculaire est moins claire, et la grande variété des agents en cause rend impossible une extrapolation des mécanismes en cause. Pour la majorité de ces agents chimiques de faible poids moléculaire, un mécanisme IgE dépendant n'a pu être démontré. L'AP dû à ces agents n'est pas favorisé par un terrain atopique et des mécanismes tels que l'hypersensibilité à médiation cellulaire, l'activation du complément, ou encore l'histaminolibération non spécifique ont été évoqués.

Au début de l'exposition professionnelle (figure 2 ci après), différents marqueurs de l'hôte dont les polymorphismes génétiques interviennent dans l'acquisition de la sensibilisation et plus tard dans l'installation de la pathologie [14].

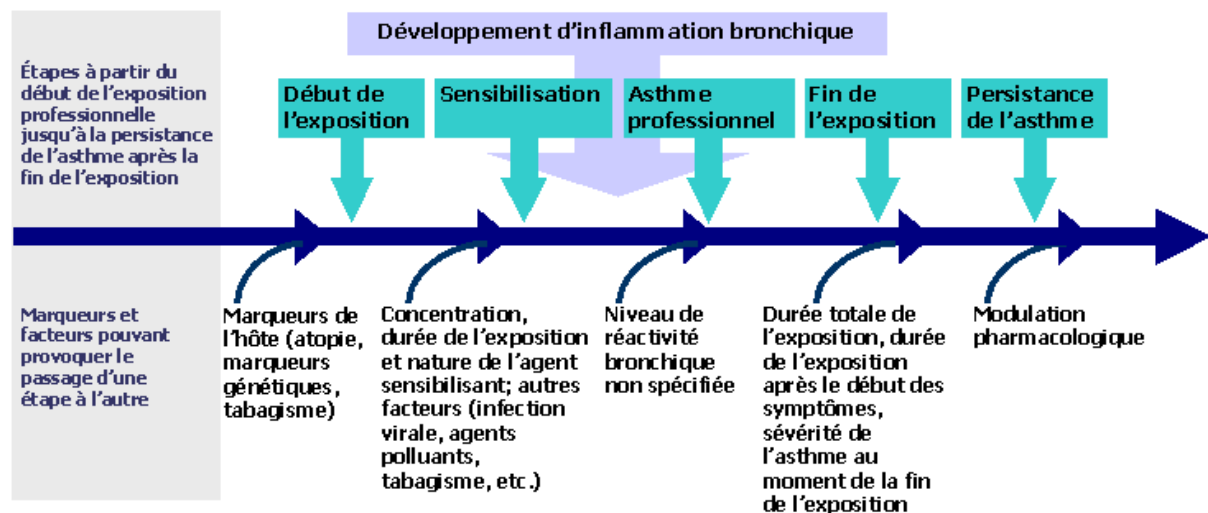


Figure 2 Histoire naturelle de l'asthme et de l'asthme professionnel [14].

Dans l'asthme général, la plupart des gènes connus pour modifier la susceptibilité de la maladie ont été identifiés grâce à des études qui ont cherché à analyser les variants comme les polymorphismes d'un simple nucléotide (SNP) qui influencent l'inflammation allergique de l'asthme ou qui sont liés à des phénotypes de celui-ci.

Ces variants expliqueraient la majorité des maladies génétiques dites complexes telles que l'asthme, l'atopie, ou encore le diabète et l'hypertension artérielle, ainsi que la plupart des réponses aux thérapeutiques. [45,50].

On commence à identifier certains gènes, qui sont des marqueurs du risque à développer un asthme professionnel, spécifique à chaque produit et l'on peut identifier des individus plus à risque sur la base de leur patrimoine génétique.

Il existe au moins une douzaine de polymorphismes qui régulent l'asthme, par intermédiaire de la réponse inflammatoire, la production d'IgE, la production de chemokines et cytokines et la fonction respiratoire. Il existe une balance sur le plan immunitaire, la balance cytokinique ou balance Th1/Th2. On a observé que certaines souris à profil cytokinique particulier étaient bonnes productrices d'anticorps de l'allergie (IgE) alors que d'autres non. On a isolé chez elles deux types de lymphocytes ceux que l'on a appelé *Th1* aidant à la création d'une réponse cellulaire et ceux aidant à une réponse d'"allergie" appelés *Th2*.

Les cellules CD4⁺ naïves peuvent se différencier en lymphocytes T auxiliaires, Th1, Th2 ou Th17 ou en lymphocytes T régulateurs en fonction de la nature des cytokines en présence. Elles sécrètent à leur tour des cytokines spécifiques à chaque lignée.

La réponse Th1 est définie comme une synthèse de l'IL-2, interféron gamma et TNF- α . Tandis que la réponse Th2 active la production d'IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 et IL-13.

La production de cytokines provoquée par une réponse Th2 est un point central pour la production des IgE, par contre, la réponse Th1 donne un profil plutôt inflammatoire. (Figure 3).

Il existe donc clairement une balance entre les deux voies et les circonstances environnementales tels professionnelles qui viennent modifier dans un sens ou dans l'autre ce que la génétique nous a donné comme profil. L'inné et l'acquis sont étroitement mêlés.

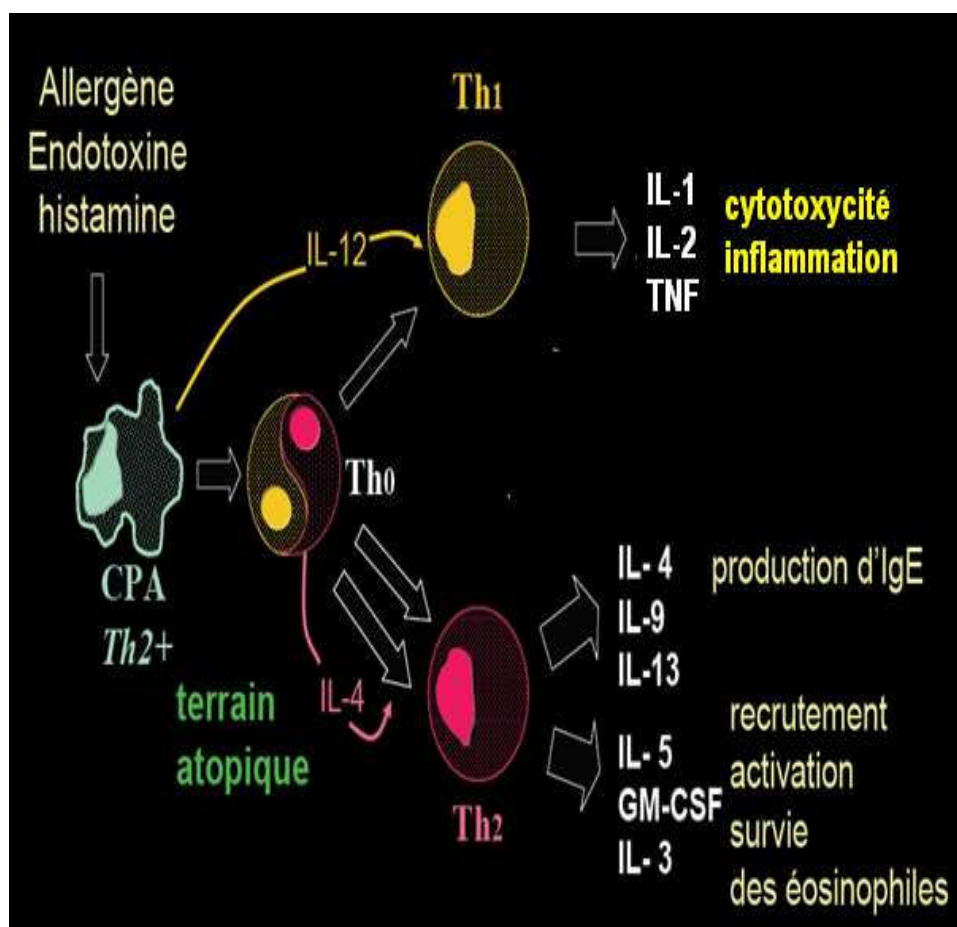


Figure 3 : Réponse immunitaire en fonction de TH1 ou Th2 [36]

La figure 4 ci-dessous présente les différents acteurs cytokiniques en cause dans l'AP à des agents de haut poids et de bas poids moléculaires ; aboutissant à l'HRB et l'obstruction des voies aériennes.

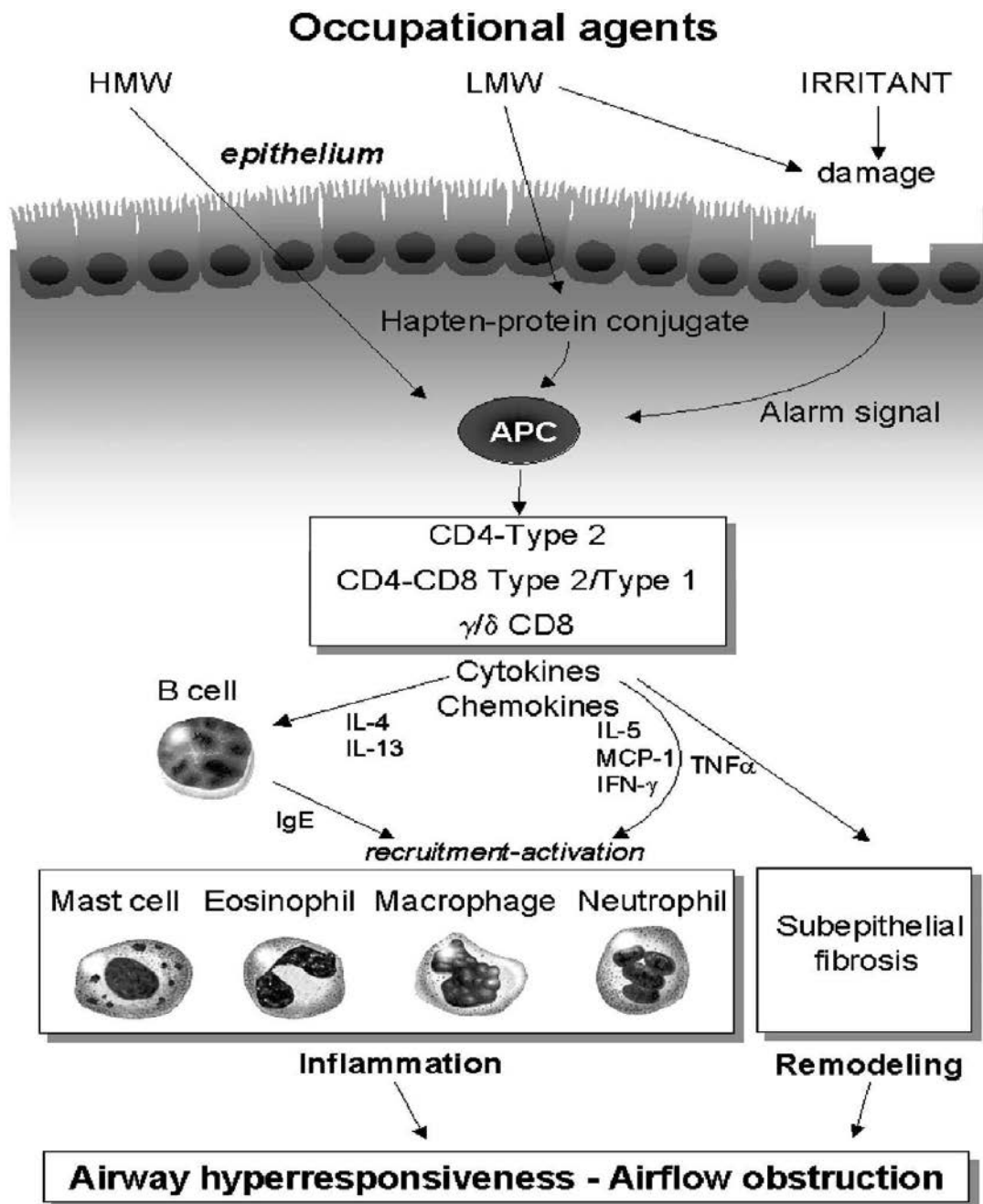


Figure 4 : Mécanismes de survenue de l'HRB et de l'obstruction des voies aériennes dans le développement de l'asthme professionnel à des agents de haut et bas poids moléculaires

Source : [36]

Dans la suite de cette revue nous allons développer les polymorphismes des cytokines intervenant dans l'inflammation (*TNF alpha*, *Interleukine (IL1)*) et ceux responsables de la sécrétion des IgE et du recrutement des éosinophiles (*IL4*, *IL5*, *IL13*) puis nous ferons un état des lieux des avancées de la génétique dans l'asthme professionnel. *Études des polymorphismes génétiques*

De nombreux gènes sont polymorphes, c'est-à-dire présentent une variation dans la séquence des gènes. Un gène est dit polymorphe lorsqu'il existe, dans une population, sous plusieurs formes chez au moins 1 % des individus.

1. Réponse inflammatoire « La triade inflammatoire » : IL-1 – IL-6 – TNF α .

Avant la découverte des lymphocytes Th17 et de leur rôle pro-inflammatoire, les cytokines historiquement étudiées lors d'une réponse inflammatoire étaient principalement les membres des familles de l'IL-1, du TNF et de l'IL-6, formant dès lors la « triade inflammatoire ». Ces cytokines sont sécrétées en particulier par les cellules phagocytaires, lors de la phase aiguë de l'inflammation et jouent un rôle prépondérant dans son initiation et son maintien. Les familles de l'IL-1 et TNF α retiendront plus particulièrement notre attention.

a) Interleukine 1

Située sur le chromosome 2, l'IL-1 est la cytokine pro-inflammatoire majeure, elle se trouve sous deux formes : IL-1alpha et IL-1beta. Ces molécules ont une structure et fonction similaires, elles se lient aux mêmes récepteurs avec une affinité différente.

Elles sont synthétisées par différents types de cellules [67]. L'IL-1alpha est associée aux cellules, elle se trouve en majorité dans le cytosol et la membrane plasmatique, tandis que, l'IL-1beta joue un rôle dans la sensibilisation par contact. L'IL-1alpha est la forme la plus

sécritée [67]. Les deux formes de l'IL-1 sont codifiées par deux gènes différents le long du bras long du chromosome 2. In vitro, il a été montré que la réponse inflammatoire est altérée en présence des polymorphismes de ces gènes. Certains de ces polymorphismes ont été associés à la sévérité ou la susceptibilité des maladies inflammatoires [68,69].

Karjalainen et coll., ont étudié la relation entre le polymorphisme de *l'IL-1alpha* et l'asthme chez 245 patients et 405 contrôles ; les fréquences alléliques étaient similaires dans les deux groupes, par contre, dans l'analyse par groupe : sexe masculin ou féminin, la fréquence d'hétérozygotes était plus élevée chez les asthmatiques hommes, avec des taux d'IgE plus bas [70].

Ces mêmes auteurs ont étudié le polymorphisme de *l'IL-1alpha* et les tests cutanés dans la population précédente. Chez les asthmatiques, ils n'ont pas observé d'association entre le polymorphisme et les tests cutanés. Par contre, chez les sujets sains, la fréquence du polymorphisme de *l'IL-1a* était significativement plus basse, en cas de test cutané positif.

Si ces résultats doivent être confirmés par d'autres études [71], les gènes de la cytokine *IL-1*, sont intéressants à étudier en relation avec le taux d'IgE et de la réponse aux tests cutanés.

b) Tumor necrosis alpha (TNF alpha)

Le TNF- α est la cytokine la plus étudiée de la superfamille du TNF, qui comprend plus de 40 membres. Les sources cellulaires principales du TNF- α sont les monocytes / macrophages, les fibroblastes et les cellules endothéliales stimulés. Il peut également être sécrété par les lymphocytes T et B, les mastocytes et les kératinocytes [72]. Le TNF- α doit son nom à sa première action décrite de facteur inducteur de nécrose des cellules cancéreuses chez la souris ayant développé un cancer induit expérimentalement [73,74].

Le gène du *TNF-alpha* est localisé dans le bras court du chromosome 6p avec le CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité), appelé complexe HLA (*Human Leucocyte Antigens*).

La cytokine TNF-alpha induit l'affluence de cellules inflammatoires, par une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion, et aussi une augmentation des éosinophiles et des cellules T, et une augmentation de l'hyperréactivité bronchique. Le TNF-alpha est retrouvé en excès dans les voies aériennes des sujets asthmatiques. Récemment, Moffat et ses collaborateurs ont décrit une association entre le gène de *TNF-alpha* et l'asthme [75]. Un autre auteur a détecté un polymorphisme en position 308 dans la région du promoteur de l'allèle de TNF, ce polymorphisme est associé à une augmentation de la transcription du TNF-alpha de trois fois et demie [76].

Le gène *TNF-alpha* est maintenant connu pour être impliqués dans une production excessive de TNFA. [76].

Plusieurs polymorphismes ont été identifiés à l'intérieur du promoteur *TNF-alpha* positionné au niveau (par rapport au site d'initiation de la transcription) - 1031 (T → C), - 863 (C → A), - 857 (C → A), - 851 (C → T), - 419 (G → C), - 376 (G → A), - 308 (G → A), - 238 (G → A), - 162 (G → A), et - 49 (G → A), bien que les positions - 419, - 163, - 49 sont rares chez les Caucasiens[77 ;78]. Parmi ces variants, un polymorphisme qui affecte directement l'expression du *TNF-alpha* est situé à la position de nucléotide – 308.

Ce polymorphisme a été largement étudié pour être associée à l'asthme, mais les résultats des différentes études ont été contradictoires. [79]

Ce polymorphisme du promoteur du gène du *TNF-alpha* conduit à 2 formes alléliques, dans lequel une guanine définit l'allèle commun (*TNFA GG*) et l'autre dans laquelle la guanine est substituée par des formes de l'allèle plus rare adénosine (*TNFA AA*) en position - 308. La présence de l'allèle rare A à été associé à la fois à une stimulation ou à une amélioration de la sécrétion de TNF alpha in vitro et in vivo [79]. D'autres études n'ont trouvé aucune association entre l'asthme et cet allèle [80] ou par contre, certaines ont mis en évidence une association entre l'allèle de type sauvage et l'asthme. [81; 82]

2. Réponse immune « cytokine gène cluster »

Le chromosome 5q21-33, ou « cytokine gène cluster » doit son nom à la richesse des gènes codant pour des cytokines impliquées dans la réponse immune à l'asthme. Plusieurs cytokines sont localisées dans cette région (IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 et la chaîne bêta d'IL-12), mais aussi le gène qui code pour le récepteur bêta-adrénergique (ADRB2), et pour le récepteur aux gluco-corticoïdes (GRL1).

Les réponses Th-2 sont caractérisées par des niveaux de sécrétions élevées des cytokines IL-4, IL-13 et IL-5. Certains polymorphismes ont été identifiés au niveau des gènes IL-4 (et son récepteur) et IL-13 et leur association avec l'asthme et l'atopie a été recherchée.

a) IL4, IL13 et leurs récepteurs

Les études de jumeaux ont permis de démontrer que la concentration d'Ig E est déterminée par des facteurs génétiques. De plus, Marsh *et al* ont mis en évidence l'association entre des marqueurs du chromosome 5q31, porteur des gènes *d'IL-4* et *d'IL-13*, et les concentrations sériques d'Ig E totales [83]. L'hypothèse selon laquelle des polymorphismes de ces gènes pourraient influencer le taux d'Ig E et la survenue des maladies allergiques a par la suite conduit à l'identification des polymorphismes ci-après.

Deux types de signaux sont indispensables au switch Ig E : le premier provient de l'intervention des cytokines IL 4 et IL 13, et le second de l'activation de CD40 sur les LB [84,85].

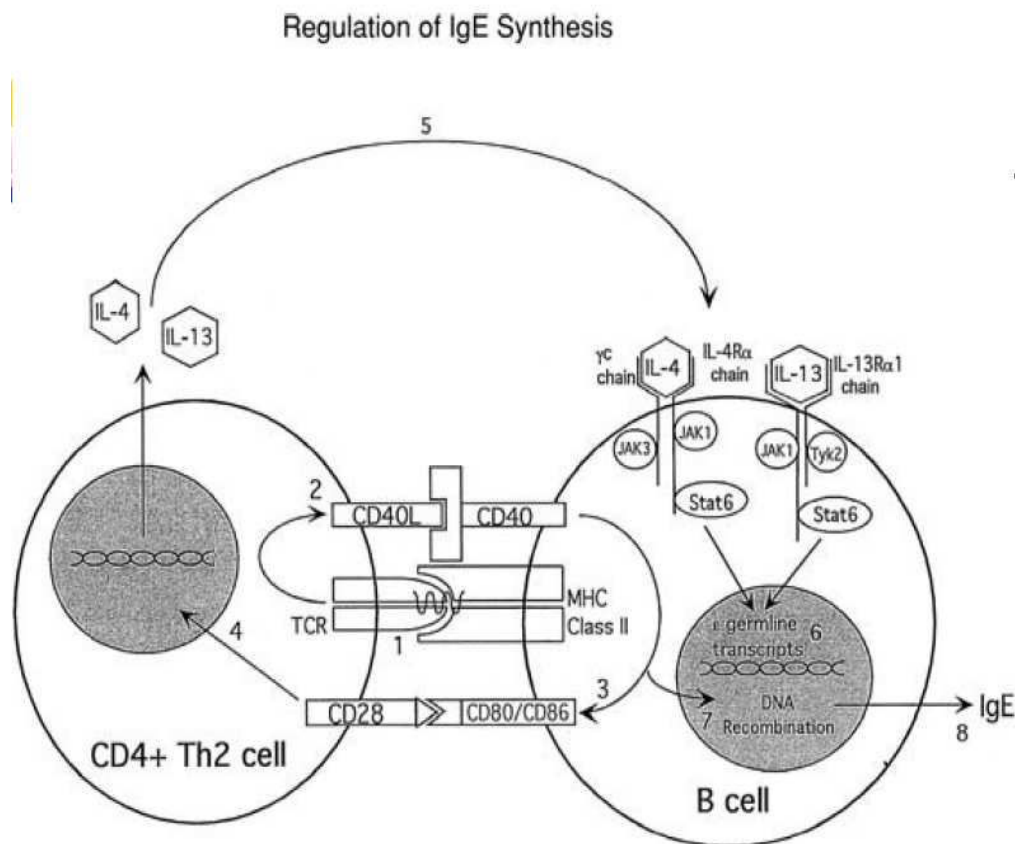


Figure 5 : Régulation de la synthèse des IgE par l'IL4 et IL13 [84]

Un certain nombre de polymorphismes de l'*IL-13* et *IL-4* en relation avec le taux d'IgE ont été identifiés [86]. Ces gènes régulent directement la synthèse de l'IgE et d'autres mécanismes effecteurs et d'amplification dépendent de ces cytokines de type Th2.

La polarisation Th2 à partir des cellules CD4⁺ naïves nécessite l'induction de la GATA-binding protein 3 (GATA3) par des signaux émis par les 13 interactions *IL-4-IL-4R* et sous l'influence de STAT6 (figure 6). Ainsi, des variants de STAT6 [87] ont été récemment décrits comme étant associés à l'asthme et à l'allergie, ainsi qu'à la réponse à la corticothérapie.

i. IL4 et son récepteur (IL4R)

Il s'agit d'une protéine de 153 acides aminés comportant une séquence signal de 24 acides aminés. Son poids moléculaire est de 17.5 kDa. IL-4 est produite par les lymphocytes T, les mastocytes et basophiles. [83-84]

IL-4 est un facteur de croissance pour les B pré-activées et les cellules T, et est cruciale pour le développement des lymphocytes TH2. Il stimule la production d'Ig G1 et d'Ig E, et augmente l'expression de CD 23 et des molécules du CMH2 à la surface des cellules B.

Il exerce ses effets biologiques via la liaison à son récepteur, **IL4R**. Ce récepteur est un hétérodimère composé d'une sous-unité α et d'une sous-unité γ commune à d'autres cytokines.

IL-4R α est codé par un gène de 51 kb localisé sur le chromosome 16p12 et contenant 12 exons.

Cette protéine comporte un peptide signal (exon3), un domaine extra-cellulaire (exon3-7), un domaine trans-membranaire (exon9) et un domaine intra-cellulaire (exons10-12).

IL4R α est une sous-unité commune aux récepteurs d' *l'IL-4* et d'*IL-13* et possède une fonction tyrosine kinase. La liaison d'*IL-4* et *IL-13* à leur récepteur conduit à la phosphorylation du résidu tyrosine des Janus kinases (JAK1 et 3), permettant la phosphorylation du facteur de transcription Stat6. Stat6 devenant alors homodimère, est transloqué dans le noyau et se fixe à son promoteur le conduisant à la transcription de l'ADN germinatif. Ainsi, *IL-4* et *IL-13* sont associées à la synthèse accrue des IgE.

ii. IL 13 et son récepteur.

Cette cytokine est produite par les cellules TH2, mais aussi par les cellules TH1 et CD8+ en plus faible quantité. IL-13 permet la différenciation des lymphocytes T vers un profil TH2 d'une part, et une synthèse accrue d'Ig E de la même façon qu'IL-4 d'autre part.

Les effets d'IL-13 sont médiés par son récepteur, composé de la sous-unité IL4R α et d'une autre sous-unité (IL13R α 1 de faible affinité et IL13R α 2 de forte affinité pour IL13).

Elle intervient dans la physiopathologie de l'asthme. Elle est suffisante pour expliquer tous les signes majeurs de l'asthme dans les modèles d'asthme expérimental (hyperréactivité bronchique, infiltration de cellules inflammatoires, hypersécrétion de mucus et fibrose) [88,89].

Ainsi, le gène codant l'IL13 est aussi l'un des gènes candidats les plus étudiés dans l'asthme et l'allergie.

iii. Polymorphismes génétiques d'IL4, IL13 et IL4R α

L'hypothèse selon laquelle des polymorphismes de ces gènes pourraient influencer le taux d'Ig E et la survenue des maladies allergiques a par la suite conduit à l'identification des polymorphismes ci-après.

1) Polymorphisme IL-13Arg130Gln

L'IL13 Arg130Gln est un SNP qui induit le remplacement d'une Arginine en position 130 par une Glutamine et l'expression d'un variant d'IL-13 dont l'activité biologique est augmentée [90].

Ce polymorphisme est associé également à une augmentation des IgE totales sériques, de la prévalence de l'asthme [91] et de l'atopie [92].

Graves *et al* ont mis en évidence une association significative entre l'existence de ce polymorphisme et un taux élevé d'Ig E dans une population de 1399 enfants asthmatiques ou allergiques [93]. Wang *et al* ont rapporté une association significative entre ce polymorphisme et une population de 199 patients chinois porteurs d'une rhinite allergique et d'une atopie : le génotype Gln/Gln est significativement associé à l'augmentation des Ig E totales [94]. De même, Liu *et al* ont montré une association significative entre l'allèle A et deux phénotypes atopiques : l'élévation des Ig E totales chez des enfants allemands et suédois, et la dermatite atopique chez des enfants allemands [95].

Ces données sont confirmées par une étude plus fondamentale ayant mis en évidence la capacité accrue d'*IL13 R130Q* à induire une phosphorylation accrue de Stat6, une augmentation de l'expression de CD23 sur les monocytes et une augmentation du switch Ig E, par rapport à IL 13 non mutée [96].

Enfin, dans une étude d'interaction de gènes concernant IL-13 et IL-4R α , R-M Guéant-Rodriguez *et al* ont montré que la combinaison de l'allèle muté (adénine, nommé Q dans l'étude) et certains polymorphismes homozygotes dominants de l'*IL4R α* (*I50V*, *S478P*, *Q551R*) est associée à une augmentation significative du risque allergique aux bêta-lactamines [97].

On note par ailleurs qu' Howard *et al*, dans une étude prenant en compte les tests cutanés, menée chez des asthmatiques et leur épouse, ne retrouvent pas d'association significative entre les taux sériques d'IgE totales et ce polymorphisme chez des individus à test cutané négatif, donc non allergiques [98].

2) Polymorphisme IL-4RSer478Pro

Il s'agit d'une mutation de la thymine en cytosine, conduisant à la substitution d'une sérine par une proline en position 1681 au niveau de l'exon 9 du gène.

Le gène muté (proline) semble lié à une diminution des Ig E par rapport à la forme sauvage. Kruse *et al* ont montré que l'association de ce polymorphisme (*P503* dans l'étude) avec un autre polymorphisme du récepteur (*R576 d' IL-4R R576Q*) tend à réduire la phosphorylation de Stat6, donc le switch et la production d'Ig E [99]. La diminution de phosphorylation du promoteur serait due à une diminution de la liaison d'IL13 à son récepteur dont la conformation serait modifiée par le changement de polarité entraîné par la substitution de la sérine par une proline.

Au contraire, Howard *et al* ont pu montrer que la forme *Ser478* du gène est associée à un taux d'Ig E plus élevé dans une population allemande d'asthmatiques. L'association du génotype

Ser478 avec le variant *1111C/T d'IL13* multiplie par cinq le risque de développer un asthme [100].

3) Polymorphisme IL-4R Gln551Arg

Ce polymorphisme consiste en la substitution d'une guanine par une adénine en position 1902, et entraîne la substitution d'une glutamine par une arginine en 576 (ou 551 selon que la numérotation se fait sur la protéine mature ou pas). Cette modification se fait au niveau du domaine cytoplasmique du récepteur. Ce polymorphisme est associé au syndrome d'hyper-IgE et à la dermatite atopique [101]. D'un point de vue biologique cette mutation a pour effet une augmentation de la signalisation du récepteur. En effet, l'apparition d'une glutamine en 576 a pour conséquence une modification du profil de fixation du résidu tyrosine adjacent si bien que la phosphotyrosine phosphatase ne peut plus s'y fixer et le signal transmis par la voie *d'IL-4R* n'est pas interrompu. Finalement, cette amplification de la signalisation du récepteur est associée à l'augmentation de l'expression du récepteur de faible affinité pour les IgE, CD23, sur les lymphocytes, monocytes et macrophages.

En revanche, pour Noguchi *et al* l'allèle *R576* n'apparaît pas lié à l'asthme ni à l'atopie, et sa prévalence est similaire dans la population d'atopiques et de non atopiques [102].

Les études d'association de gène sont particulièrement informatives pour ce polymorphisme car elles font apparaître que le polymorphisme *IL-4Q576R* joue un rôle variable sur la production d'IgE en fonction des polymorphismes qui lui sont associés. Ainsi, on peut citer l'étude de Kruse [100] montrant que l'haplotype contenant les allèles *P503* (polymorphisme *P478*) et *R576* est associé à une diminution de liaison d'IL-4Ralpha à Stat6, et donc à un taux plus faible d'IgE totales.

Hytönen quant à elle a pu démontrer que l'haplotype contenant les allèles *R551*, *V50* (polymorphisme *IL-4RI50V*) et *T-3223* (polymorphisme *IL-4RC-3223T*) est significativement associé à l'asthme atopique [103].

Ces différents résultats plaident pour un rôle de ce polymorphisme dans l'allergie, lié à un changement de conformation du récepteur affectant sa liaison au promoteur, mais ce rôle reste à préciser.

b) Interleukine 5

La phase effectrice de l'inflammation allergique repose également sur l'interaction entre l'IL-5 dérivée des cellules Th2 et son récepteur (IL-5RA) sur les progéniteurs éosinophiles. L'IL-5 entraîne le développement des éosinophiles, qui peuvent être ensuite recrutés dans les voies respiratoires et devenir à leur tour une source importante de cytokines Th2. Des SNP de l'*IL5* et *IL5RA* sont trouvés associés modérément à des phénotypes particuliers de la maladie [104,105].

II. ASTHME PROFESSIONNEL

Le tableau 2 (ci après à la page 46) résume les différents polymorphismes impliqués dans la survenue de l'AP, et ce en fonction des produits en cause [106].

L'effet des facteurs génétiques semblerait varier en fonction du niveau d'exposition, étant plus marqué dans les populations de travailleurs faiblement exposés [107].

La relation entre l'AP causé par des agents de BPM a été majoritairement prouvée avec certains antigènes *HLA* de classe II qui sont impliqués dans la présentation des antigènes aux cellules immunitaires [108,109]. D'autres auteurs ont rapporté une association entre l'AP induit par les isocyanates et certains génotypes de la *glutathion-Stransférase* et de la *N-acétyltransférase* qui jouent un rôle primordial dans la protection des cellules contre les agressions oxydatives [110-112].

Grâce aux progrès actuels dans la génétique humaine, il y'a eu de nettes avancées dans la connaissance de la base génétique au niveau de la susceptibilité individuelle dans la survenue de l'OA.

Plusieurs études ont documenté des associations significatives entre l'OA du à des agents de hauts ou de bas poids moléculaires (par exemple, des isocyanates, le cèdre rouge, des anhydrides d'acides, de sels de platine, le latex, les animaux de laboratoire) et les molécules *HLA de classe II*.

On sait que la réponse immune est contrôlée par le complexe HLA [45]. Le complexe HLA se divise en deux classes de molécules : I et II. Les molécules de classe II ont une expression normalement restreinte à certaines cellules. Leur densité est particulièrement élevée sur des cellules spécialisées dans la présentation de l'antigène aux lymphocytes T CD4⁺ : lymphocytes B, cellules dendritiques, monocytes/macrophages, etc. L'expression des molécules HLA de classe II est augmentée sous l'influence de l'interféron g, de l'IL-4, de l'IL-13 et du TNF-alpha et, est diminuée par la prostaglandine PGE-2 [113].

Donc, le complexe HLA a une importance dans la pathophysiologie de l'asthme. De nombreux gènes extrêmement polymorphes ont été décrits au sein du complexe HLA.

Il existe un grand nombre de combinaisons possibles (haplotype). Des associations entre allèles de gènes de classe II et la production d'IgE spécifiques ont été mises en évidence. Cependant, des résultats très discordants ont été rapportés en ce qui concerne la réponse IgE. Certains gènes du complexe HLA II ont été incriminés dans l'asthme industriel. La présence de l'allèle *DRBI*13* représente un facteur de risque important de l'asthme, avec un Odds Ratio de 14.5 [113]. Ces molécules sont impliquées dans la présentation de l'antigène par les lymphocytes T.

Les polymorphismes de l'*HLA DR*, *HLA-DQ* et *HLA-DP* [108-110] ont selon les études des effets soit de susceptibilité soit de protection par rapport à l'OA. A ce jour ces résultats n'ont pas été reproduits dans d'autres études [50,106].

Le rôle possible des polymorphismes des cytokines associés à la différenciation des cellules TH2 dans le développement de l'OA a été suggéré dans une seule étude [106, 117].

Cette étude a évalué les variants alléliques des cytokines TH2, l'IL-4 du récepteur α (*IL4RA*) et de l'*IL-13*, et un *CD14* (*C159T*) dans l'asthme induit par les isocyanates [106]. Le *IL4RA* (*I50V*) seul ou en combinaison avec l'*IL-13* (*R110Q*) *RR*, et les *CD14* (*C159T*) étaient significativement associés à l'OA causée par le diisocyanate d'hexaméthylène.

Dans une autre étude [118] Pacheco et al. ont évalué si des variants alléliques de la *TLR4*, qui est la principale endotoxine spécifique de la surface cellulaire des récepteurs, pourraient moduler les réponses allergiques aux animaux de laboratoire ou à d'autres agents inhalés.

Il en ressort que l'allèle *G* du polymorphisme *TLR4/855I*, qui est le moins sensible à l'endotoxine, était significativement associée à un risque accru de sensibilisation aux animaux de laboratoire et d'autres substances inhalées [118].

D'autres études toujours sur l'isocyanate ont montré des liens entre gène et environnement [119-121], et aussi en rapport avec le stress oxydatif. Les gènes impliqués dans la protection contre le stress oxydatif étudiés sont le glutathion-S-transférase (*GSTP1* et *GSTM1*) et la N-acétyltransférase (*NAT*) [122-124]. En conclusion, le génotype *GSTM1* seul a été associé à un risque accru OA induit par l'isocyanate [124] alors que le contraire se prouvait pour le polymorphisme *GSTP1 Val/Val*.

Dans l'ensemble, les informations actuellement disponibles indiquent que les tests génétiques sont limités à la fois pour le diagnostic et la prévention [124]. On ignore toujours pourquoi un même gène peut représenter un facteur de risque dans certaines populations, mais pas dans d'autres. A titre d'exemple, l'allèle *HLADQB1 *0501* est associé à une susceptibilité accrue de développer des anticorps IgE spécifiques contre les anhydrides d'acides [125], tandis que le même allèle est protecteur pour le diisocyanate et l'acide plicatique [126,127]. Il y'a aussi des évidences que les déterminants génétiques sont liés à une grande variété de facteurs environnementaux qui peuvent interagir [106].

Ces observations soulignent l'importance de mesurer l'exposition de l'environnement dans les études génétiques de l'OA.

Ces facteurs environnementaux comprennent les infections virales, l'alimentation, la fumée de tabac, et les irritants, ainsi que l'intensité et la durée de l'exposition à des agents sensibilisants dans le lieu de travail [106].

Par exemple, une interaction gène environnement (plus précisément niveau d'exposition) a été démontrée pour la sensibilisation aux sels de platine [128]. Les travailleurs exposés avaient un risque relatif de sensibilisation associée au phénotype *HLA-DR3* plus élevé pour des niveaux inférieurs d'exposition. Cette constatation indique que le rôle de la susceptibilité génétique est susceptible de varier dans les milieux de travail où l'exposition à des sensibilisants a été même réduite au niveau minimum [106].

La pathologie asthmatique est multifactorielle. Dans le chapitre suivant nous allons étudier les facteurs nutritionnels pouvant de même interagir dans la survenue de la maladie.

Tableau 2 : Facteurs génétiques impliqués dans l'asthme professionnel [106]

Agent professionnel	Nombre de sujets	Gène	Association *
Anhydrides acides	30	<i>HLA-DR3</i>	OR = 6,0 (p=0,05)
Anhydrides trimellitique	11	<i>HLA-DR3</i>	OR = 16,0 (p=0,004)
Anhydrides acides	52	<i>HLA-DQ5</i>	OR = 4,3 [1,7-11,0]
		<i>HLA-DQB1*0501</i>	OR = 3,0 [1,2-7,4]
		<i>HLA-DR1</i>	OR = 3,0 [1,2-11,0]
Cèdre rouge	56	<i>HLA-DQB1*0302</i>	OR = 4,9 [1,3-18,6]
		<i>HLA-DQB1*0501</i>	OR = 0,3 [0,1-0,8]
		<i>HLA-DQB1*0603</i>	OR = 2,9 [1,0-8,2]
Isocyanates †	55	<i>HLA-DQA1/DQB1/DRB1</i>	NS
Isocyanates †	10	<i>HLA-DR/DQ</i>	NS
Isocyanates †	109	<i>GSTM1 abs.</i>	OR = 1,89 [1,0-3,5]
Isocyanates †	109	<i>NAT1</i>	OR = 2,5 [1,3-4,9]
		<i>GSTM1 abs. + NAT1</i>	OR = 4,5 [1,7-11,6]
		<i>GSTM1 abs. + NAT2</i>	OR = 7,8 [1,2-51,6]
Isocyanates (TDI)	28	<i>HLA-DQB1*0201/0301</i>	RR = 9,5 (p=0,05)
		<i>HLA-DQB1*0501</i>	RR = 0,1 (p<0,03)
		<i>HLA-DQB1*0503</i>	RR = 9,8 (p<0,04)
Isocyanates (TDI)	30	<i>HLA-DQB1*0501</i>	RR = 0,04 (p=0,02)
		<i>HLA-DQB1*0503</i>	RR = 2,9 (p=0,03)
Isocyanates (TDI)	67	<i>HLA-DQA1*0101</i>	RR = 0,53 [0,1-0,6]
		<i>HLA-DQA1*0104</i>	RR = 1,5 (p=0,005)
		<i>HLA-DQB1*0501</i>	RR = 0,6 [0,1-0,7]
		<i>HLA-DQB1*0503</i>	RR = 1,5 (p=0,009)
Isocyanates (TDI)	116	<i>HLA Classe I (A,B,C)</i>	NS
	142	<i>TNFα-308</i>	NS
Isocyanates (TDI)	109	<i>NAT1</i>	OR = 7,8 [1,2-51,6]
Isocyanates (TDI)	56	<i>GSTM1 Val/Val</i>	OR = 0,2 [0,1-1,1]
Platine	44	<i>HLA-DR3</i>	OR = 2,3 [1,0-5,6]
		<i>HLA-DR6</i>	OR = 0,4 [0,2-0,8]
Rat (allergène urinaire)	109	<i>HLA-DR3</i>	OR = 0,6 [0,1-0,95]
		<i>HLA-DR7</i>	OR = 1,8 [1,1-2,9]
		<i>HLA-DQ3</i>	OR = 1,6 [1,0-2,5]

*Association exprimée par la valeur du RR (risque relatif) ou de l'OR (odds ratio) ainsi que l'intervalle de confiance (valeur du p quand IC non calculé) - NS = association non significative.

†Différents types d'isocyanates incluant le TDI (toluène diisocyanates), le HDI (hexaméthylène diisocyanates) et le MDI (méthylène diphenyl diisocyanates) GSTM = Glutathione S-transférase ; NAT = n-acétyltransférase.

C. -NUTRITION ET ASTHME PROFESSIONNEL



Dans cette partie introductive, après l'analyse de la littérature sur le rôle des expositions à des agents présents sur le lieu de travail et de certains polymorphismes génétiques dans le développement de l'asthme professionnel, nous allons ici, voir la l'association entre certains facteurs nutritionnels et la survenue de l'asthme.

Notre projet prendra en compte, à côté des déterminants génétiques directement liés à l'inflammation, les déterminants nutritionnels en considérant les effets modulateurs des facteurs alimentaires pouvant influencer l'inflammation [129] (les acides gras n-3), le stress oxydant (les caroténoïdes, les polyphénols), l'hyperhomocystéinémie (les folates et la vitamine B12). L'association des micronutriments liés au statut inflammatoire et au stress oxydant avec l'asthme a été mise en évidence dans de nombreuses études [129,130], sans cependant prendre en compte l'ensemble des nutriments candidats et la complexité du modèle physiopathologique, et de l'influence des déterminants génétiques de leur métabolisme et de leurs effets cellulaires.

Les vitamines sont des substances sans valeur énergétique mais vitales. A l'exception de deux d'entre elles (vitamines K et D), nous ne sommes pas capables de les fabriquer et leur apport par l'alimentation est primordial pour le fonctionnement harmonieux de notre organisme. Contrairement aux macro-nutriments (protéines, glucides ou sucres, lipides ou graisses) elles exercent leurs actions à très faibles doses.

On distingue deux groupes de vitamines

- **les vitamines liposolubles** sont solubles dans les graisses, et l'organisme peut les mettre en réserve. Elles sont essentiellement apportées par les aliments d'origine animale et les huiles végétales. Ce sont les vitamines A, D, E et K.
- **les vitamines hydrosolubles** sont solubles dans l'eau et ne sont pas stockées dans l'organisme (à l'exception de la vitamine B12) ; leurs apports doivent donc être assurés quotidiennement par notre alimentation. Ces vitamines sont apportées par la quasi-totalité

des groupes d'aliments (viande, poisson, œufs, produits laitiers, céréales, fruits et légumes). Ce sont la vitamine C et les vitamines du groupe B (B1, B2, B3 ou PP, B5, B6, B8, B9 et B12).

Chaque vitamine exerce un rôle bien spécifique. Globalement, elles sont impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques : construction (croissance, développement du squelette...), fonctionnement et entretien (transformation et utilisation des macro-nutriments, vision, coagulation du sang, systèmes musculaire, nerveux, immunitaire, fabrication d'ADN, antioxydants...).

Le rôle d'un apport adéquat en vitamines dans la prévention de nombreuses pathologies (maladies liées au vieillissement, maladies cardiovasculaires, cancers, allergies) est de plus en plus démontré, mais la surconsommation de vitamines peut aussi avoir des effets néfastes à long terme.

Nous allons passer brièvement en revue les données épidémiologiques d'une association entre l'alimentation et la survenue de l'asthme, en se concentrant sur les éléments nutritifs les plus fréquemment étudiés.

Les vitamines ACE font parties des systèmes de défense de l'organisme contre le phénomène de stress oxydatif.

Le stress oxydatif est la rupture de l'équilibre entre les espèces oxydantes et les systèmes antioxydants au profit des premières, soit par augmentation de la quantité d'espèces oxydantes, soit par diminution de l'activité anti-oxydante [131]. Les oxydants sont appelés « formes réactives de l'oxygène » car elles sont plus réactives que l'oxygène présent dans l'air. Parmi ces molécules, on retrouve les radicaux libres, qui contiennent un ou plusieurs électrons célibataires dans leur orbite moléculaire (oxyde nitrique, superoxyde, radical hydroxyle) et d'autres molécules comme le peroxyde d'hydrogène et l'acide hypochloreux qui n'en contiennent pas. Les oxydants réagissent ensuite avec des molécules

cibles présentes dans les cellules, provoquant ainsi des dégâts. Ce déséquilibre entre les systèmes de défense et de production des radicaux libres entraîne des lésions biochimiques au niveau des cellules de l'organisme du fait de leurs conséquences sur le plan moléculaire, telles que les altérations au niveau des protéines, l'apparition de cassures au niveau de l'ADN, ou des atteintes de l'intégrité de la membrane cellulaire par l'induction de la peroxydation lipidique [132,133].

1. Vitamine C

Dès l'Antiquité, on note l'existence d'une très grave maladie, le scorbut, caractérisée par des douleurs osseuses, des hémorragies gingivales et une forte anémie.

Cette maladie touchait de préférence les marins, et de manière générale toute personne privée d'aliments frais pendant longtemps. Au 18^{ème} siècle (dans les années 1750), un médecin de la marine anglaise, James Lind démontre l'efficacité de quelques gouttes de jus d'orange ou de citron dans le traitement préventif et curatif du scorbut. Il suffisait que les marins en absorbent quotidiennement pour se protéger et ne plus souffrir de cette maladie.

Ce n'est qu'en 1928 qu'un biochimiste hongrois, Albert Szent Györgyi, isole une substance cristalline du jus de citron qu'il dénomma « acide ascorbique » en référence à ses effets bénéfiques sur le scorbut.

L'acide ascorbique est appelé de manière plus courante « vitamine C ». Sa synthèse fut réalisée en 1933 par Reichstein et Haworth.

Longtemps on a pensé que la seule fonction de la vitamine C était de prévenir le scorbut jusqu'à la fin des années 60.

Mais en 1970, le Pr L Paulin soulève une vive controverse dans le monde entier avec son livre : "Vitamine C and the Common Cold". Il a découvert les bienfaits de la vitamine C sur

les rhumes. C'est à partir de cette date que les travaux scientifiques se multiplient à propos des diverses fonctions de l'acide ascorbique : processus d'oxydoréduction au niveau cellulaire, intervention dans les réactions immunitaires, inhibition de la forme endogène des nitrosamines, capacité à piéger les radicaux libres...etc. On ne compte pas moins de 20 000 articles scientifiques à son sujet.

La vitamine C, en raison de sa structure comportant une fonction ène-diol, a des propriétés réductrices à la base de son activité biologique.

Elle assure deux fonctions principales : une activité antioxydante et un rôle de cofacteur dans les réactions d'hydroxylation catalysées par les oxygènes. Aussi la vitamine C intervient-elle dans la synthèse de collagène, des catécholamines et de la carnitine. La vitamine C est caractérisée par un très fort potentiel antioxydant. L'ascorbate piège les espèces oxygénées réactives dérivées de l'oxygène, tel le radical hydroxyle et l'anion superoxyde, ainsi que les espèces réactives dérivées de l'azote, tel que le peroxy-nitrite [134-135]

A concentration optimale (60 micromol/L dans le plasma), teneur assurée par une consommation journalière de 110 mg (équivalent à son Apport Nutritionnel Conseillé), son pouvoir réducteur protège nos tissus de l'ensemble des espèces radicalaires produites en milieu aqueux dans des conditions normales. En s'oxydant elle-même, elle protège ainsi un grand nombre de biomolécules. Le glutathion, autre composant réducteur, est capable de régénérer la vitamine C ; un tel système permet le maintien de la concentration en vitamine C dans notre organisme.

Une baisse de cette concentration, malgré le maintien des apports à un niveau adéquat, révèle la présence d'un stress oxydant et l'inefficacité de l'organisme à faire face à ce stress. Elle est nécessaire aux défenses immunitaires.

Elle est abondante dans les cellules immunitaires et accélère leur mobilité. La vitamine C est essentiellement apportée par les fruits et légumes consommés en frais et leurs produits

dérivés, dont les jus de fruits. Les sources de vitamine C sont, pour les fruits, les agrumes, les kiwis, les abricots et les petits fruits rouges, et pour les légumes, les poivrons et les choux.

Dans plusieurs études transversales, ou d'études cas-témoins, elle a été associée à une diminution du risque de survenue de l'asthme [136,137-139]. La seule étude longitudinale, réalisée n'a pas mis en évidence cet effet [136]. Dans les études randomisées, la vitamine C, donne en combinaison avec d'autres antioxydants, un effet protecteur [130]. De même, les enfants asthmatiques ont des taux de vitamine C plus faibles par rapport aux enfants non asthmatiques, ce qui indique la possibilité que la réduction du taux de vitamine C puisse conduire à une inflammation accrue et/ou à un risque élevé d'asthme.

Cependant, une supplémentation en vitamine C n'a pas toujours abouti à des améliorations significatives des symptômes d'asthme ou de mesures objectives de ces tests de fonction pulmonaire ou de spirométrie [136].

Les études sont encore assez controversées quand au rôle de la vitamine C sur l'asthme. En effet la prise de suppléments de vitamine C pourrait réduire l'asthme induit par l'effort, mais encore peu de données scientifiques appuient une telle recommandation [134-136].

2. Vitamine E

La découverte de la Vitamine E remonte à 1921 lorsque deux chercheurs, H. Evans et K. Bishop découvrirent l'existence d'un facteur liposoluble favorisant la fertilité chez l'animal [134]. C'est en 1936 que H. Evans et P. Emerson réussirent à l'isoler et à définir la formule chimique. Sa synthèse fut réalisée en 1938 par P. Karrer, prix Nobel de chimie.

Cette même année il réalise la synthèse de l'alpha-tocophérol racémique. Ce n'est qu'en 1968 que la vitamine E est reconnue comme un élément nutritif essentiel pour l'homme par le National Research Council des États-Unis [140].

La **vitamine E** est une vitamine liposoluble recouvrant un ensemble de huit molécules organiques, quatre tocophérols et quatre tocotriénols. La forme biologiquement la plus active est l' α -tocophérol, la plus abondante dans l'alimentation étant le γ -tocophérol. Ces molécules sont présentes en grande quantité dans les huiles végétales. Elles agissent, parallèlement à la vitamine C et au glutathion, essentiellement comme antioxydants contre les dérivés réactifs de l'oxygène produits notamment par l'oxydation des acides gras [140]. La vitamine E fait partie des systèmes de défense non enzymatiques, qui protègent les phospholipides membranaires contre les réactions en chaîne de peroxydation. Elle inactive les formes réactives de l'oxygène par captation de l'électron non apparié. La vitamine E est un donneur d'hydrogène par l'intermédiaire notamment du radical OH en position 6 du noyau chromane. L' α -tocophérol réagit avec les peroxydes lipidiques pour former des hydroperoxydes et se transforme alors en quinone. L' α -tocophérol agit en synergie avec d'autres systèmes antioxydants comme le glutathion pour décomposer les hydroperoxydes [140].

Une revue de la littérature suggère que le rôle principal de la vitamine E dans le corps est de fonctionner comme un antioxydant. Elle a aussi un rôle immunomodulateur: elle stimule la production des lymphocytes, diminue les prostaglandines E2 et les hydroperoxydes sériques immunodépresseurs [143].

À ce jour, ces études n'ont pas été en mesure de produire des résultats concluants. Après 75 années de recherche, le rôle physiologique de la vitamine E reste insaisissable.

Sur le plan pulmonaire, c'est la moins étudiée des vitamines anti-oxydantes, mais son rôle protecteur est établi [144], en association avec les autres antioxydants.

En effet les études sur une supplémentation de cette vitamine dans l'asthme, montre qu'elle est associée à une sensibilisation cutanée, à une baisse des taux d'IgE et à une baisse de l'inflammation dans la physiopathologie de l'asthme [145].

Mais la controverse demeure car des essais cliniques randomisés de supplémentation en vitamine E chez les asthmatiques n'ont pas toujours démontré que la prise des suppléments de vitamine E améliore ou empêche la survenue de l'asthme ou l'apparition des symptômes d'asthme [146-148].

3. Vitamine A et bêta carotène

Elle porte cette lettre tout simplement car c'est la 1^{ère} vitamine qui a été découverte, en 1913, par un chercheur anglais, Hopkins. Mais ce n'est qu'en 1931 que Karrer réussira à l'isoler et à en définir sa formule chimique. Et il faudra encore attendre 16 ans pour qu'Isler et ses collaborateurs réalisent sa synthèse à l'état pur et cristallisé.

C'est une vitamine liposoluble, résistante à la chaleur, aux acides et aux alcalis, mais facilement oxydée, très altérable à l'air et rapidement détruite par la lumière. Etant insoluble dans l'eau, elle ne se dissout que peu dans l'eau de cuisson des aliments.

Une proportion de 90 % est stockée dans le foie et peut répondre aux besoins de l'organisme pendant 1 ou 2 ans. On la trouve à l'état naturel sous 2 formes :

- **Provitamine A** (notamment les *carotènes alpha et bêta*), que le foie transforme par oxydation en vitamine A, afin qu'elle soit utilisée par l'organisme, que les reins éliminent.
- Vitamine A ou **Rétinol** qui est sa forme « libre »

La **provitamine A** est donc le précurseur de la vitamine A et le **rétinol** est sa forme active, directement assimilable par l'organisme.

Une consommation de 2,1 mg de beta-carotène (correspond à 350 ER), notamment par une consommation de fruits et de légumes est conseillée dans notre alimentation quotidienne. Les AJR en vitamine A pour un adulte sont de l'ordre de 1 mg par jour.

On trouve la vitamine A principalement dans le foie des poissons et la provitamine A (bêta-carotène) dans les légumes, en plus grande quantité si leur coloration est très prononcée.

La vitamine A est indispensable à tous les âges de la vie. Elle est très antioxydante du fait de sa capacité à détruire les radicaux libres. Elle joue un rôle dans plusieurs fonctions de l'organisme : la vision, notamment dans l'adaptation de l'oeil à l'obscurité, mais aussi dans la croissance des os, la reproduction et la régulation du système immunitaire [146-148].

Au niveau pulmonaire une déficience en vitamine A peut soit induire une inflammation ou en aggraver une déjà existante [149]. Ce rôle de la vitamine A dans l'inflammation est en partie du à son action sur les lymphocytes et à son action anti-inflammatoire.

4. Asthme et antioxydants.

La muqueuse pulmonaire est régulièrement exposée à une série de substances, dont beaucoup procèdent par un stress oxydant d'une manière directe ou indirecte. Il n'est donc pas surprenant qu'elle ait développé un système robuste de défense pour se protéger d'une éventuelle agression [150]. A certains moments de la vie, ce défi quotidien augmente de façon exponentielle. Dès la naissance, elle est soumise à des événements oxydatifs, causés par l'inhalation de polluants, les irritants de l'environnement et les maladies [150].

L'hypothèse nutritionnelle attribue l'augmentation des allergies respiratoires à des changements dans l'apport alimentaire, principalement en antioxydants et en lipides [152].

Cette modification de l'alimentation aurait pour conséquence des modifications sur le plan immuno-régulateur d'une manière variée et complexe, et aussi des effets pro-inflammatoires, avec une probable association bénéfique entre ces composés et les composants physiopathologiques de l'asthme et des maladies atopiques [152].

Chez les adultes, il y a une évidence qui suggère qu'une alimentation riche en fruits et légumes a un effet protecteur sur la fonction pulmonaire [153-154].

En particulier, un nombre d'études rétrospectives ont reporté que les individus avec une prise élevée de vitamines antioxydantes (A, C, E) ont une amélioration de leur fonction respiratoire, et une baisse des symptômes respiratoires [155].

Les études ne sont néanmoins pas unanimes ; certaines trouvent un effet protecteur, d'autres pas. La spéculation persiste quant au rôle possible, le cas échéant, des antioxydants dans la maladie allergique [155].

Bien qu'ait été émise l'hypothèse que l'augmentation récente de la maladie allergique serait une conséquence de la baisse de l'apport en antioxydants alimentaires, une autre hypothèse propose que l'augmentation de la maladie allergique soit au contraire due à l'excès d'antioxydants [156].

Le tableau 3 ci-après résume les principales données de la littérature sur l'effet potentiel des différentes vitamines anti-oxydantes.

Tableau 3 : Rôles potentiels des antioxydants dans la survenue des maladies respiratoires liées à l'environnement (source : [156])

Nutriments	Mécanismes
Vitamine C (acide ascorbique)	✚ Antioxydant hydrosoluble ✚ Neutralise O_2^- ✚ Régénère la vitamine E oxydée ✚ Présente dans les neutrophiles et les lymphocytes ✚ Inhibition de la prostaglandine
Vitamine E (alpha-tocophérol)	✚ Antioxydants liposoluble ✚ Réagit avec les radicaux peroxydes pour stopper la peroxydation des lipides contenus dans les membranes ✚ Stabilisation de la membrane / inhibition de la production d'IgE
Vitamine A (Bêtacarotène, lycophène et autres caroténoïdes)	✚ Antioxydants liposolubles ✚ Réagit avec les radicaux libres peroxydes diminue la peroxydation lipidique ✚ Neutralise le O_2^- ✚ Effet peut être plus important pour les maladies pulmonaires liées à l'environnement que leur effet provitamine

II. VITAMINE D

La vitamine D a été identifiée en 1922. Elle est en fait considérée comme une hormone, de part sa structure et son mode de fonctionnement similaires aux hormones stéroïdes. La vitamine D est désignée comme une vitamine liposoluble bien que ce soit avant tout une hormone synthétisée dans l'organisme humain à partir d'un dérivé du cholestérol sous l'action des rayonnements ultraviolets de la lumière.

Elle existe sous deux formes : D₂ (*ergocalciférol*) ou D₃ (*cholécalférol*). Elle possède deux origines, l'une alimentaire et l'autre issue de la synthèse cutanée à partir du rayonnement solaire. La 1,25 dihydroxyvitamine D [1,25(OH)₂D] est la forme active de la vitamine D.

Elle est produite au niveau du tubule proximal rénal par l'action de la 1 α -hydroxylase sur la 25 hydroxyvitamine (25OHD) [157]

La figure 6 illustre le métabolisme de la vitamine D ainsi que ses actions endocrines et paracrines. La large distribution des récepteurs à la vitamine D (VDR) dans l'organisme suggère des fonctions bien supérieures à la simple régulation du Calcium et du Phosphore.

Dans une revue, Gilbert et coll. [158] analysent les rôles potentiels de la vitamine D dans les maladies pulmonaires. La 1,25(OH)₂D est un puissant immuno-régulateur *in vitro* [159] : les lymphocytes, macrophages et cellules dendritiques expriment le VDR. Ainsi, la 1,25(OH)₂D inhibe la prolifération des lymphocytes T (plus particulièrement les Th1), des lymphocytes CD4 et modifie la sécrétion des cytokines : en diminuant l'IL2 (ou interleukine 2) et l'INF γ (interféron gamma) et en augmentant l'IL5 et l'IL10. De plus, la 1,25(OH)₂D inhibe la prolifération d'IL6 (qui a un rôle dans les réactions auto-immunes), régule la sécrétion des anticorps par les lymphocytes B, favorise la différenciation des macrophages et bloque la différenciation des cellules dendritiques.

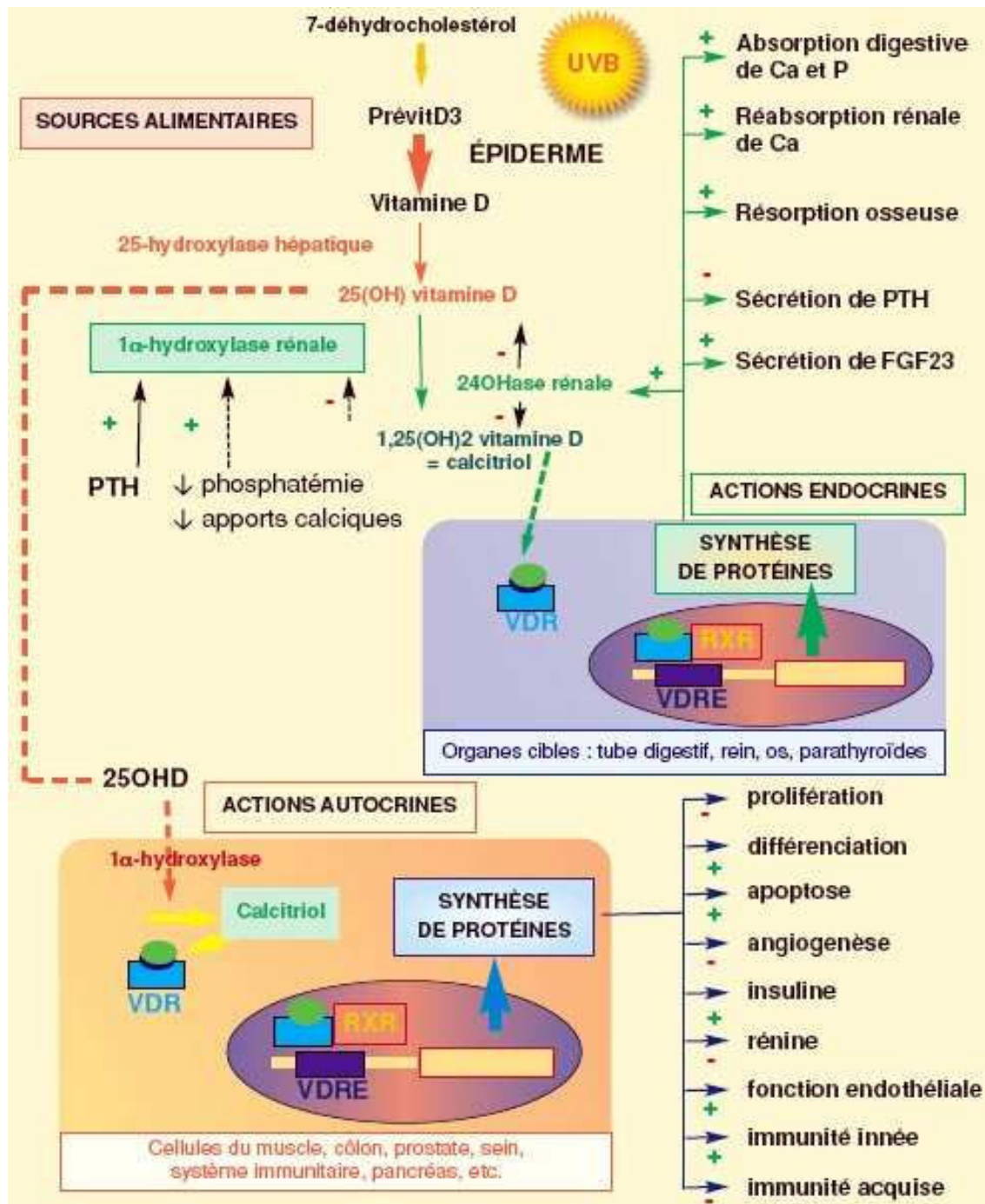


Figure 6 : Métabolisme et actions autocrines et endocrines de la vitamine D [160]

Deux hypothèses contradictoires émergent concernant le rôle potentiel de la vitamine D sur la survenue de l'asthme et de l'allergie. Elle se base sur une modification du mode de vie dans les pays industrialisés. Des 1999, une hypothèse émerge sur le rôle délétère de la vitamine D dû à une supplémentation en vue de la prophylaxie contre le rachitisme.

Des études ont mis en évidence des effets de la vitamine D dans la promotion et la différenciation des cellules Th naïves-vers le phénotype Th2 [161, 162]. Ceci aurait donc eu pour conséquences une augmentation de l'asthme et de l'allergie [163]. En revanche, en 2007, c'est l'insuffisance en vitamine D qui est indexée du fait de la généralisation de la supplémentation en vitamine D qui traduit une insuffisance en cette vitamine dans les pays occidentalisés. Les effets d'une insuffisance en vitamine D sur le recrutement et la régulation des cellules T ont également été mis en évidence [164, 165].

De ce fait et il a été supposé que l'augmentation de l'asthme est une conséquence d'une insuffisance en vitamine D [166] et ce, par le biais d'une réduction de l'effet inhibiteur des T-cellules sur la différenciation immunitaire Th2 [166].

III. ACIDES GRAS POLYINSATURES

Les acides gras présents dans les matières grasses alimentaires servent à satisfaire non seulement une partie de nos dépenses énergétiques mais également nos besoins en acides gras indispensables que sont les acides gras polyinsaturés (AGPI) [167].

Les acides gras (AG) sont des molécules hydrophobes. Acides carboxyliques aliphatiques, ils sont composés d'une chaîne linéaire carbonée allant de 4 à 28 carbones portant une extrémité méthyle (-CH₃) et une extrémité carboxyle (-COOH). On distingue 3 types d'acides gras en fonction de leur degré d'insaturation : les acides gras saturés (AGS), dont tous les atomes de carbone sont saturés en hydrogène, les mono-insaturés (AGMI), qui comportent une seule double liaison et les polyinsaturés (AGPI), qui possèdent au moins 2 doubles liaisons [167].

Ils sont répertoriés selon la nomenclature biochimique en fonction, de leur nombre de carbones, du degré d'insaturation et de la position de leurs doubles liaisons. Les doubles liaisons sont séparées systématiquement par 3 atomes de carbone. Les propriétés physiques et

chimiques des acides gras dépendent de la longueur de leur chaîne carbonée et du nombre de double liaison.

Ainsi, plus la chaîne carbonée est longue, plus la solubilité de ces molécules dans l'eau est faible ; de même, le degré d'insaturation entraîne une diminution du point de fusion (ce qui explique que les huiles sont riches en AGPI, tandis que le beurre contient essentiellement des AGS).

Il est aujourd'hui bien admis que les AGPI présents dans notre alimentation, de par leur nature et leur abondance, influencent la santé de l'homme et jouent un rôle dans l'étiologie d'un grand nombre de pathologies (maladies métaboliques, neurodégénératives, cardiovasculaires et inflammatoires, obésité).

Les AGPI sont des acides gras dont la chaîne hydrocarbonée comprend au moins 2 insaturations (ou double liaison). Il existe 2 familles, les AGPI de la série n-6 (ou oméga 6) et ceux de la série n-3 (ou oméga 3). La différence entre les 2 familles vient de la position de la première double liaison à partir de l'extrémité méthyle terminale de l'acide gras qui se situe entre le 3^{ème} et le 4^{ème} carbone pour les AGPI n-3, et entre le 6^{ème} et le 7^{ème} carbone pour les AGPI n-6.

Ces 2 familles dérivent de précurseurs métaboliques exclusivement d'origine végétale, l'acide alpha-linolénique (ALA ; 18 :3n-3) pour la série n-3 et l'acide linoléique (LA ; 18 :2n-6) pour la série n-6. Ces 2 AGPI doivent être obligatoirement apportés par l'alimentation parce que les vertébrés sont incapables de les synthétiser. En effet, contrairement aux végétaux les vertébrés ne possèdent pas les enzymes qui permettent d'introduire les doubles liaisons en position n-6 et n-3 pour produire l'ALA et le LA.

Ces précurseurs à l'origine de dérivés métaboliques impliqués dans de multiples fonctions sont à ce titre des acides gras indispensables d'où le terme essentiel.

1. Les acides gras oméga-3

Les oméga-3 sont utilisés dans l'élaboration d'acides gras hautement insaturés et d'eicosanoïdes de série 3. Ces substances ont des effets favorables sur la composition des membranes cellulaires ainsi que sur de nombreux processus biochimiques de l'organisme : la régulation de la tension artérielle, l'élasticité des vaisseaux, les réactions immunitaires et anti-inflammatoires, l'agrégation des plaquettes sanguines [167].

Les oméga-3 les plus courants sont :

✚ l'AAL (acide alpha-linolénique)

✚ l'EPA (acide eicosapentaénoïque)

✚ le DHA (acide docosahexaénoïque)

L'AAL est un acide gras qui se trouve principalement dans certains aliments et notamment **les poissons gras**, le pourpier (sorte de cresson fréquemment consommé sur les bords de la méditerranée), les noix, le colza ou les graines de lin.

L'EPA et le DHA se trouvent eux surtout dans les poissons, et particulièrement les poissons de mers froides. On les retrouve aussi dans les produits dérivés (oeufs, viande, lait, etc.) d'animaux nourris en partie avec des graines de lins.

Parmi les oméga-3, seul l'**acide alpha-linolénique** (AAL) est qualifié d'« essentiel ». En effet, les autres acides gras oméga-3 peuvent être synthétisés par le corps à partir de l'AAL.

Plusieurs pays, ainsi que l'Organisation mondiale de la Santé, ont émis des recommandations au sujet de l'apport en oméga-3, qui se résument ainsi [168] :

✚ AAL : de 0,8 g à 1,1 g/jour

✚ AEP + ADH : de 0,3 g à 0,5 g/jour

2. Les acides gras oméga-6

Ils participent à l'élaboration d'acides gras hautement insaturés et d'eicosanoïdes de séries 1 et 2. Ces substances jouent un rôle important au chapitre du système nerveux, de l'équilibre cardiovasculaire, de l'immunité, de la guérison des blessures et des réactions allergiques et inflammatoires. Consommés en excès, les acides gras oméga-6 peuvent empêcher les acides gras oméga-3 de jouer leur rôle, notamment au chapitre de la protection cardiovasculaire et provoquer des douleurs et des maladies inflammatoires comme l'asthme ou l'arthrite.

Les oméga-6 les plus courants sont :

- ✚ l'AL (acide linoléique)
- ✚ l'AGL (acide gamma-linolénique)
- ✚ le DGLA (acide dihomogamma-linolénique)
- ✚ L'AA (acide arachidonique)

Dans cette famille, seul l'**acide linoléique** (AL) est dit « essentiel ». En effet, les autres acides gras oméga-6 peuvent être fabriqués par le corps à partir de l'AL. Contrairement à l'AA, il est abondamment présent dans l'alimentation moderne: les huiles de maïs, de tournesol, de soya, de carthame, de pépins de raisin, etc.

L'AGL est synthétisé à partir de l'AL, mais plusieurs obstacles peuvent nuire à cette conversion : l'excès de cholestérol, l'excès de mauvais gras (trans, saturés, etc.), l'alcool, le vieillissement et le diabète, par exemple.

Le DGLA est un dérivé de l'AGL. La seule source directe connue est le lait maternel. Il se transforme en eicosanoïdes de série 1 qui contribuent à la protection des artères et du cœur, stimulent l'immunité et ont des effets anti-inflammatoires.

L'AA est un dérivé du DGLA. Le jaune d'oeuf et les gras animaux en sont des sources directes. L'AA contribue à la formation d'eicosanoïdes de série 2, assure la cicatrisation et la guérison des blessures et contribue aux mécanismes des réactions allergiques.

Cependant, un excès de ces eicosanoïdes peut entraîner des maladies comme l'arthrite, l'eczéma, le psoriasis et plusieurs maladies auto-immunes.

Les apports suffisants suivants pour une alimentation fournissant 2000kcal par jour :

🚧 4,44g (2 % des kcal quotidiennes)

🚧 Apport maximal suggéré: 6,67g (3 % des kcal quotidiennes)

3. AGPI et inflammation

Les AGPI libres sont les précurseurs de médiateurs oxygénés appelés eicosanoïdes (prostaglandines, prostacyclines, thromboxanes, leucotriènes et lipoxines) et docosanoïdes (résolvines et neuroprotectines), qui sont synthétisés respectivement à partir d'AGPI à 20 carbones (Acide EicosaPentaénoïque (EPA) ou Acide Arachidonique(AA) ou à partir du DHA [169, 170].

Ces dérivés jouent un rôle de messagers cellulaires et sont impliqués notamment dans les processus d'inflammation [171, 172].

De manière générale, les médiateurs oxygénés générés à partir des AGPI n-6 ont des propriétés opposées à ceux générés à partir des AGPI n-3 ; on attribue davantage une action pro-inflammatoire aux AGPI n-6 et une action anti-inflammatoire aux AGPI n-3 [173].

Parmi les dérivés de l'AA, on trouvera un certain nombre de prostaglandines (PG), de leucotriènes (LT) et d'acides gras hydroperoxydés (HETE, hydroxyeicosatetraenoic) ayant une action pro-inflammatoire. Ainsi, pendant longtemps, l'AA a été considéré uniquement

dans son rôle d'initiation et de maintien de l'inflammation. Cependant, la classification est assez délicate car certains composés ont des actions à la fois pro- et anti-inflammatoires [165,166]. La PGE2 est capable de réguler sa propre production en activant au niveau des fibroblastes la COX et elle induit également la production d'interleukine IL-6 par les macrophages ce qui lui confère des propriétés pro-inflammatoires [174].

Cependant, elle pourrait également avoir une activité plutôt antiinflammatoire en inhibant la 5-LOX et donc la production de LT de série 4 et en activant la 15-LOX permettant la production de lipoxines anti-inflammatoires [175]. Les enzymes de conversion des AGPI n-3 et n-6 en dérivés oxygénés étant communes, il existe une certaine compétition entre les différentes voies. Ainsi, c'est à partir de l'acide arachidonique (ARA, ω 6) que s'effectue la synthèse d'eicosanoïdes pro-inflammatoires tels que les prostaglandines (PG), les thromboxanes (TX) et les leucotriènes (LT). La présence de ces éicosanoïdes va initier la mise en place de la réaction inflammatoire. Les ω 3 entrent en compétition avec l'ARA et permettraient ainsi une réduction de production des cytokines pro-inflammatoires et une production de cytokines moins pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires.

Ainsi une supplémentation en huile de poisson riche en AGPI n-3 réduirait la production des dérivés de l'AA tels que la PGE2 [175]. En plus de réguler la production de dérivés pro-inflammatoires formés à partir de l'AA, les AGPI n-3 sont à la l'origine de dérivés de nature davantage anti-inflammatoire, [176178].

Par ailleurs une étude Burns *et al* [179] a montré que l'association entre des apports alimentaires pauvres en acides gras oméga-3 avait un risque augmenté de 1.68 sur la survenue de l'asthme. Les AGPI n-6 et n-3 sont aussi capables d'induire des modifications des voies de signalisation inter-cellulaires, la réduction des cytokines pro-inflammatoires (principalement du TNF l'IL6 l'IL8) [175].

L'intensité de la réponse inflammatoire, une fois amorcée, sera limitée par la proportion des précurseurs (oméga-3 et oméga-6) et des inhibiteurs présents dans les tissus [180].

Les éicosanoïdes provenant des oméga-3 et de l'oméga-6 ont des impacts variés et souvent opposés [181,182]. La puissance des éicosanoïdes provenant des oméga-3 s'avère toutefois moindre que celle des oméga-6 [183,184].

En réduisant la présence des précurseurs oméga-6 dans les tissus, les oméga-3 permettent de diminuer la synthèse des éicosanoïdes provenant des oméga-6. Pour cette raison, il est important que l'équilibre [185] des ces acides gras soit atteint.

4. BALANCE OMEGA 3/OMEGA6

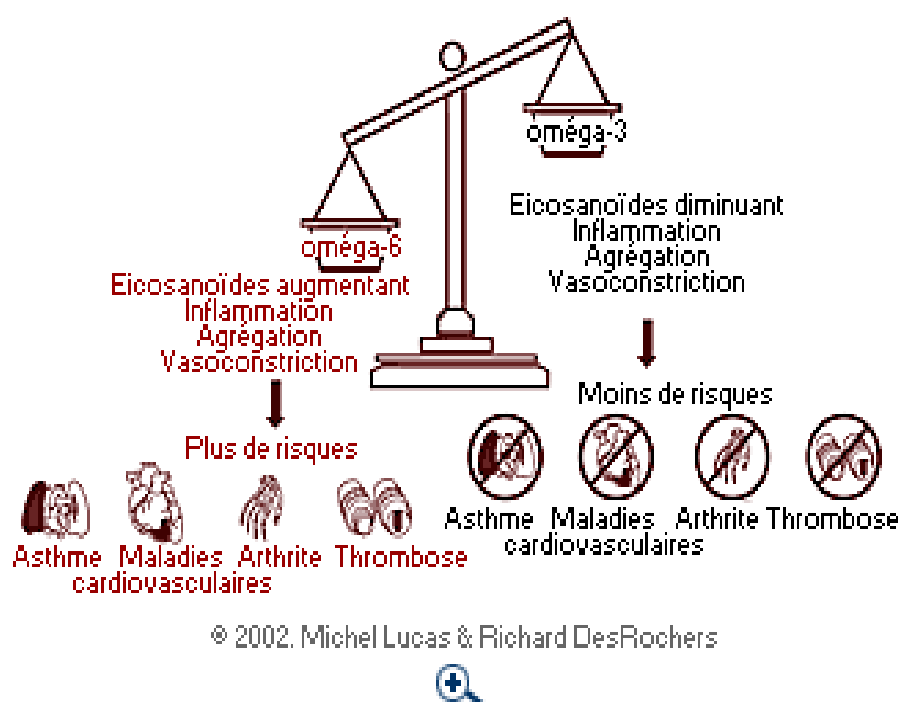


Figure 7 : Balance omega 3/omega6

On estime en général que le rapport oméga-6/oméga-3 dans l'alimentation occidentale se situe entre 10 et 30 pour 1, alors qu'il devrait idéalement se situer entre 1 et 4 pour 1 [186,188].

L'excès d'oméga-6 empêche l'utilisation optimale des oméga-3 par l'organisme, car ils se concurrencent. En effet, comme précisé plus haut, le métabolisme des oméga-3 et des oméga-6 fait appel aux mêmes enzymes et, dans une moindre mesure, à plusieurs vitamines (vitamine B3, B6, C, E) et minéraux (magnésium et zinc) communs. Un excès d'oméga-6 dans l'alimentation empêche donc l'organisme d'exploiter adéquatement ses sources d'oméga-3.

Ce déséquilibre induit, entre autres choses, un état physiologique propice aux maladies cardiovasculaires ainsi qu'aux troubles allergiques et inflammatoires [188].

Selon la littérature, un retour à une alimentation fournissant un ratio adéquat d'oméga-6 et d'oméga-3 aurait un impact positif sur la santé des populations occidentales [189,190] et réduirait aussi les maladies inflammatoires [190,191].

IV. HYPERHOMOCYSTEINEMIE, VITAMINES DU GROUPE B ET INFLAMMATION

Dans le domaine professionnel aucune étude n'a envisagé jusqu'à présent l'influence de l'homocystéine et des vitamines B12 et folates malgré leurs effets sur l'expression des cytokines pro-inflammatoires.

1. Métabolisme de l'Homocystéine (Hcy)

L'homocystéine est un acide aminé intermédiaire dans le métabolisme de la méthionine. Sa teneur dans le plasma dépend de nombreux facteurs, parmi lesquels le statut en folates et vitamines B12 et B6 et le polymorphisme génétique du méthylène tétrahydrofolateréductase jouent un rôle crucial. Mais notre attention se fixera sur les folates et la vitamine B12 comme donneuses de méthyles.

L'Hcy n'est pas codée génétiquement et est absente des protéines. Elle est synthétisée par toutes les cellules de l'organisme. La production d'Hcy résulte de la déméthylation de la

méthionine. Le catabolisme de l'Hcy se produit principalement dans le foie et dans les reins par deux voies: la voie de la reméthylation (en méthionine) et la voie de la transulfuration (en cystathionine). (Annexe 4)

a) Les déterminants d'une hyperhomocystéinémie

Les déterminants de l'Hcy totale plasmatique (résumé dans le tableau 4 ci dessous) sont complexes et impliquent des déterminants environnementaux, nutritionnels et génétiques.

Tableau 4 : Causes d'hyperhomocystéinémie

Causes	Hyperhomocystéinémies	
	Intermédiaire et modérée (16 – 50 µmol/L)	Sévère (> 50 µmol/L)
Génétiques	Déficit hétérozygote en CBS Polymorphisme <i>MTHFR C677T</i>	Déficit homozygote en CBS Déficit homozygote en MTHFR Déficit en méthionine synthase
Nutritionnelles	Déficit en folates Déficit en Vitamine B6 Déficit en Vitamine B12	
Thérapeutiques	Anticonvulsivantes Méthotrexate Phénytoïne Monoxyde d'azote Azaribine	
Etats pathologiques	Insuffisance rénale chronique hypothyroïdie Psoriasis Arthrite rhumatoïde Diabète type II Cancers (pancréas, sein, ovaire)	

Les principaux facteurs environnementaux qui contribuent à une hyperhomocystéinémie modérée, incluent l'âge, le sexe, certains médicaments et différentes conditions pathologiques.

Les personnes âgées ont des taux plus élevés d'Hcy. Dans ce groupe d'âge, le statut vitaminique a une influence majeure [192].

Les hommes ont une Hcy plus élevée que les femmes, due à une plus grande masse musculaire ou aux effets sur les hormones sexuelles [193,194].

L'hyperhomocystéinémie modérée peut être liée à la prise des certains médicaments comme le methotrexate, la phénytoïne, la carbamazépine qui interfèrent avec le métabolisme des folates, le monoxyde d'azote, qui inactivent la vitamine B12, l'azaribine qui empêche l'activité de la CBS [195].

Mais d'une manière générale, des suppléments en folates et/ou en vitamine B12 sont suffisants pour abaisser le taux d'Hcy [196]. Des conditions pathologiques comme l'hypothyroïdie, l'insuffisance rénale, les affections inflammatoires, l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis, le diabète de type II, les maladies lymphoprolifératives et certains cancers (sein, ovaire, pancréas) peuvent augmenter les taux d'Hcy [197].

2. Les Vitamines du groupe B (B9, B12)

Les vitamines du groupe B regroupent des molécules de classes chimiques très différentes, toutes hydrosolubles mais qui ont toutes pour fonction principale de participer au contrôle des activités enzymatiques au niveau de toutes les voies du métabolisme.

Elles comprennent :

- Vitamine B1 ou thiamine
- Vitamine B2 ou riboflavine
- Vitamine B3 (PP) ou nicotinamide
- Vitamine B5 ou acide pantothénique
- Vitamine B6 ou pyridoxine
- Vitamine B8 (H) ou biotine

- Vitamine B9 ou acide folique
- Vitamine B12 ou cyanocobalamine.

Les vitamines du groupe B et notamment les vitamines B6, B9, B12 jouent à bien des égards un rôle déterminant dans le fonctionnement de l'organisme. Nous allons vous présenter ici les folates et les vitamines B12.

En effet, de nombreux arguments expérimentaux suggèrent de focaliser notre intérêt sur les vitamines donneuses de groupements méthyles et impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine en raison des interactions possibles de leurs effets cibles.

La plupart des études concernant les donneurs de méthyle montrent leur implication dans de nombreux troubles inflammatoires (cardio-vasculaires, neurodégénératives, maladies auto-immunes ...) [198,199], et certaines études ont suggéré leur implication dans le développement de l'atopie. Pour eux, une carence alimentaire en vitamines B, en méthionine, en acide folique et d'autres types de vitamines B sont associés à un risque élevé d'atopie [200]. La supplémentation en vitamine B6 ainsi que celle en acide folique, en vitamine B12 et bétaine, abaissent l'homocystéinémie.

a) FOLATES

L'acide folique tire son nom du mot latin *folium* qui signifie feuille, et a été ainsi nommé par Mitchell en 1941 en raison de son abondance dans les feuilles d'épinard [201].

La vitamine B9, comme toutes les vitamines du groupe B, est hydrosoluble. La vitamine B9, ou folacine, est aussi appelée acide folique pour la forme synthétisée servant de supplément et folate pour celle présente naturellement dans les aliments.

Le terme de « folates » (ou folacine ou vitamine B9) qualifie l'ensemble des composés dans lesquels l'acide ptéroïque est lié à une ou plusieurs molécules de glutamate (Figure 8).

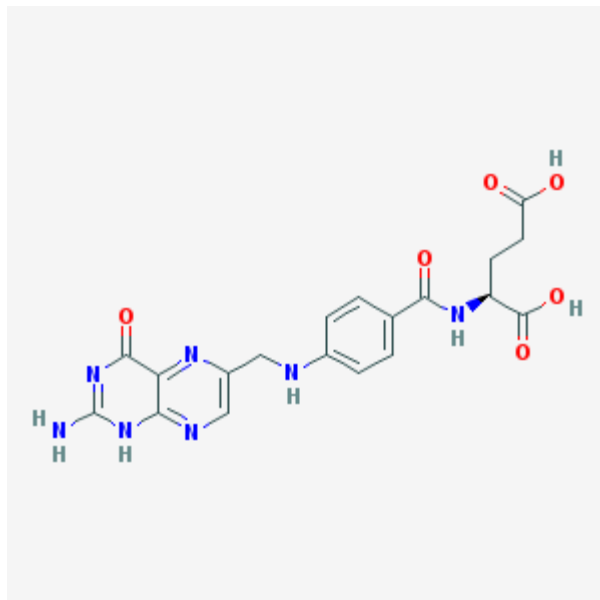


Figure 8. Structures de l'acide folique (C₁₉H₁₉N₇O₆) [202]

La plus grande partie de l'acide folique est présente dans les aliments sous forme de polyglutamates (entre 1 et 7 résidus glutamates reliés en chaîne au glutamyl constitutif).

L'absorption se fait au niveau du duodénum et du jéjunum, après hydrolyse en monoglutamate; c'est un processus actif saturable très dépendant du pH et du sodium. Le sang portal achemine l'acide ptéroylglutamique au foie où il est méthylé [203].

C'est sous cette forme que la molécule est transportée dans le sérum, excrétée dans la bile, puis réabsorbée. Ce cycle entérohépatique représente une très forte circulation quotidienne de folates (>80 µg/jour) et constitue une voie importante de redistribution de l'acide folique aux tissus périphériques. A ce niveau (les tissus périphériques) les folates y jouent leur rôle notamment dans la synthèse des nucléotides.

Les folates facilitent le transfert des unités monocarbonées à partir de multiples biomolécules vers des nombreuses réactions biosynthétiques telles que la synthèse de purine et de

pyrimidine, la synthèse de la méthionine à partir de l'Hcy. Un apport adéquat en folates est essentiel pour la division cellulaire et l'homéostasie, en produisant de l'ADN [204].

Une enzyme clé du métabolisme des folates est la méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR). Cette enzyme va orienter celui-ci soit vers la méthylation de l'ADN, soit vers la synthèse d'ADN, en fonction notamment de l'apport alimentaire quotidien en nutriments (folates...) et de ses polymorphismes

Pour être métaboliquement active, la molécule doit être réduite par cette enzyme qui fixe d'abord 2, puis 4 atomes d'hydrogène sur la molécule, ce qui explique sa grande sensibilité à l'oxydation. C'est le cycle des folates (figure en anexe 4) décrit ci après :

b) VITAMINE B12

La vitamine B12 appartient à la famille des corrinoïdes. Elle est constituée d'un noyau corrine et d'un ribonucléotide reliés entre eux par un pont amino2- propanol (Figure 9)

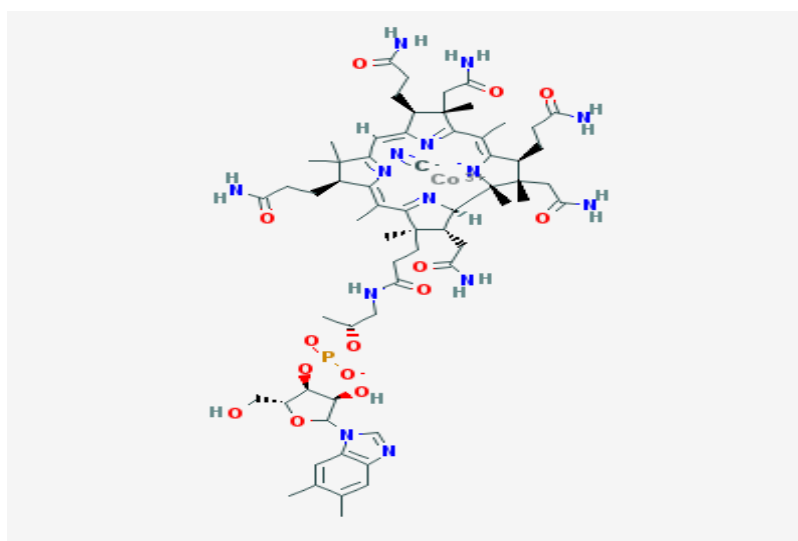


Figure 9. Structure de la vitamine B12 ou cobalamine (C₆₃H₈₈CoN₁₄O₁₄P). Source : [205]

La vitamine B12, ou cobalamine, peut exister naturellement sous forme d'hydroxocobalamine (ou aquocobalamine à pH < 8), de coenzyme B12 et de méthylcobalamine.

Ces différents composés sont présents dans les matrices alimentaires à l'état libre et/ou lié à des protéines.

Cette vitamine joue un rôle essentiel dans l'assimilation des acides aminés. Elle intervient également dans la synthèse de l'ADN, la formation des globules rouges et le fonctionnement du système nerveux. La vitamine B12, stockée dans le foie, joue en effet un rôle important dans de nombreux processus enzymatiques.

La méthylcobalamine est le coenzyme indispensable à la conversion de l'homocystéine en méthionine. C'est une réaction très importante car couplée à la transformation de l'acide 5-méthyltétrahydrofolique en acide tétrahydrofolique, composé qui participe ensuite à des réactions conduisant à la synthèse des acides nucléiques. Le coenzyme B12 est le coenzyme qui permet la conversion du méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA, molécule intervenant ensuite dans le cycle de Krebs [206].

Pour un adulte, la prise recommandée est de 1 µg par jour. Il n'y aurait pas d'hypervitaminose. Seule l'hypovitaminose entraîne des anomalies de la division cellulaire, du fait de la difficulté de synthèse de l'ADN.

La vitamine B12 est présente exclusivement dans les viandes, les poissons et les produits laitiers.

La vitamine B12 est exclusivement synthétisée par des bactéries. Liée aux protéines, elle est libérée du support alimentaire dans l'estomac sous l'effet du pH acide. L'absorption digestive (iléon) nécessite la liaison à une protéine, le facteur intrinsèque synthétisé par les cellules pariétales gastriques. Le transport est assuré par des transporteurs spécifiques : les transcobalamines I, II, III.

3. Rôle de l'Homocystéine et des vitamines du groupe B dans l'inflammation et l'allergie

- ***Vitamines du groupe B***

Concernant le rôle de la vitamine B dans l'asthme, il a fait l'objet de récents travaux, et est sujet à controverse. Une étude transversale suggère qu'un défaut dans le métabolisme des folates pourrait intervenir dans le développement de l'atopie et des symptômes respiratoires. Pour eux, une carence alimentaire de méthionine, de folates, et d'autres vitamines B, serait associée à un risque élevé d'atopie chez ces personnes [199]. De même ces mêmes auteurs indiquent qu'une supplémentation en folates et en vitamines B12 ne serait pas associée à la survenue d'un asthme ou l'atopie [199]. En revanche, les résultats d'une étude longitudinale indiquent notamment qu'une supplémentation en folates chez la femme enceinte augmenterait plutôt le risque d'asthme chez l'enfant [206]. Dans une troisième étude, aucune association n'a été retrouvée [207].

Par ailleurs, on sait que la déficience en folates altère la réponse immune cellulaire, et pourrait être associée à l'atopie en inhibant le cycle de reméthylation de l'ADN, entraînant une altération de la balance TH1/TH2 ; les folates et la vitamine B12 interagiraient comme cofacteurs [208].

- ***Homocystéine***

Le rôle pathogène [209] de l'homocystéine en relation avec l'inflammation et le stress oxydant a été documenté par ses effets *in vitro* sur les cellules musculaires lisses vasculaires et endothéliales, la synthèse du NO, les voies de la coagulation, le stress oxydatif, l'inflammation et le métabolisme des lipides.

L'homocystéine possède *in vitro* une action pro-oxydante, son groupe thiol étant oxydé pour former des espèces réactives de l'oxygène qui, sont responsables de lésions et de dysfonctionnement cellulaires [209].

Chez l'homme, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle majeur joué par les espèces réactives de l'oxygène dans la survenue des lésions des muqueuses [210].

L'homocystéine peut également sensibiliser les cellules au stress oxydatif en diminuant l'expression d'une large gamme d'enzymes anti-oxydantes. Il a également été montré *in vitro* que l'homocystéine pouvait stimuler la production de plusieurs facteurs pro-inflammatoires tels que MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), une chémokine pour les monocytes, et l'interleukine (IL)-8, une chémokine pour les lymphocytes T et les neutrophiles, ceci via l'activation de NFkB [211-212]. Enfin, les résultats d'expériences menées *in vitro* et *in vivo* suggèrent que l'homocystéine pourrait provoquer des lésions de muqueuse, par un effet cytotoxique médié par le TNF ; l'homocystéine induirait une mort cellulaire en augmentant la capacité du TNF à détruire les potentiels membranaires mitochondriaux [212].

Les lésions induites par l'homocystéine via une augmentation de la production de molécules d'adhésion, de cytokines, et de chémokines pourraient ainsi participer au maintien d'une inflammation chronique. Des études portant sur d'autres cytokines induites par l'homocystéine, dont IL-6, pourraient également permettre une meilleure compréhension de l'homocystéine dans la régulation de l'inflammation [213-214].

MATERIELS & METHODES

A. Etude M.I.B.A.P « Polygen » : Marqueurs de l'Inflammation Bronchique et Asthme Professionnel et polymorphismes génétiques

I. Objectif de l'étude « MIBAP POLYGEN »

Annexé à l'étude MIBAP, ce travail vise à explorer le rôle des polymorphismes génétiques des cytokines dans l'apparition précoce d'une inflammation de la muqueuse respiratoire et d'une évolution des paramètres de la fonction respiratoire, en réponse à des agents inhalés connus pour être des facteurs de risque d'asthme d'origine professionnelle.

Les apprentis représentent un bon modèle d'étude de l'histoire naturelle de l'AP chez les adultes. Si la littérature regorge d'études longitudinales au sein des apprentis exposés à des agents de bas comme de haut poids moléculaires, aucune à ce jour n'a considéré les polymorphismes génétiques impliqués à ce stade précoce d'exposition.

Parmi les nombreux gènes candidats reconnus comme facteurs de risque de l'asthme certains comme *IL13*, *IL4RA*, *IL5*, *IL1A* et *TNF* ont retenu notre attention du fait de leur rôle dans l'atopie et l'inflammation et aussi l'hyperréactivité bronchique non spécifique [215,216].

Notre objectif dans cette étude est donc d'évaluer l'association entre les polymorphismes de *IL13* (*R130Q rs20541*), *IL4RA* (*S478P rs1805015*, et *Q551R rs180275 variants*), *IL-5* (*-705 C>T rs2069807*), *IL1A* (*-889C>T rs1800587*), *TNF* (*-308 G>A rs1800629*) et l'altération de la fonction respiratoire, l'incidence de l'HRBNS ou une augmentation du monoxyde d'azote exhalé (FeNO).

II. Description du protocole MIBAP

Le protocole de l'étude a fait l'objet d'une publication [217], de même que les résultats principaux de l'étude [218]. Cette recherche a reçu l'avis favorable du Comité Consultatif de

Protection des Personnes participant à une Recherche Biomédicale de Lorraine (avis favorable n° 02.09.02). Le fichier informatique utilisé pour la recherche a fait l'objet d'une autorisation auprès de la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés en application des articles 40-1 et suivants de la loi “ informatique et libertés ” (avis favorable n° 902129).

Initiée en Lorraine, en partenariat avec les différents centres de formation d'apprentis (CFA), cette étude avait pour objectif d'étudier les phases précoces de l'inflammation des voies aériennes. Il s'agissait d'une étude longitudinale prospective visant à évaluer chez ces apprentis le développement d'une inflammation des voies aériennes au cours de leurs deux années de formation. Afin d'analyser les différences dans la nature des agents étudiés, deux types de sous-population ont été choisis : les boulangers et pâtisseries pour les agents de haut poids moléculaire (HPM) et les coiffeurs pour les agents de bas poids moléculaire (BPM).

Ces apprentis sont formés dans six centres de formation d'apprentis (CFA) de la région Lorraine (Bar le Duc, Epinal, Forbach, Laxou, Metz, Thionville).

Pour être inclus dans l'étude, ces jeunes apprentis devraient répondre aux critères suivants :

- ne pas être asthmatique,
- ne pas avoir une exposition antérieure connue à des substances irritantes ou sensibilisante pour les bronches,
- être en début de formation dans une des filières concernées dans les CFA participants,
- avoir signé (majeur) ou avoir fait signer par les parents un consentement éclairé et un autre **consentement** pour le **génotypage** pour les **volontaires majeurs** participant à une recherche biomédicale **sans bénéfice individuel direct**.

La visite d'inclusion de tous les sujets est réalisée avant le démarrage de toute exposition professionnelle, ou à son tout début, c'est-à-dire peu de temps après leur entrée au centre

d'apprentissage. Les visites suivantes ont été effectuées 6, 12 et 18 mois après la première visite (schéma des visites en annexe 5).

1. Recueil des données

a) Questionnaires standardisés

A chaque visite ils furent soumis à un questionnaire standardisé permettant de rechercher les symptômes en rapport avec les lieux du travail, les données relatives au tabagisme, l'existence ou non d'un terrain allergique personnel ou familial (atopie), l'histoire professionnelle.

Les questionnaires « initiaux » et « de suivi » ont été administrés par les infirmières de recherche clinique du centre d'investigation clinique (CIC) formées à cet effet, et validés ensuite par un médecin lors de la visite médicale.

b) Examen clinique médical (ECM)

Il est réalisé à chaque visite. La visite médicale initiale est celle d'inclusion des sujets. Elle permet de recueillir à nouveau le consentement des sujets après un bref rappel des objectifs par le médecin. Le but de cette visite médicale est de rechercher des éléments pertinents tels que :

- à l'interrogatoire : une notion d'atopie personnelle et/ou familiale, des manifestations allergiques déjà survenues en rapport ou non avec l'activité professionnelle, la notion de tabagisme actif (quantité de cigarettes fumées par jour et durée du tabagisme) et passif, que ce soit en milieu de travail ou à domicile,
- à l'examen clinique : les signes cliniques d'asthme ou d'autres maladies allergiques telles que les allergies cutanées (eczéma), les rhino conjonctivites ; les signes cliniques d'affection des voies respiratoires en cours (angine, rhinites infectieuses, bronchites... etc.).

Nous avons eu à effectuer la visite médicale des sujets qui arrivaient au terme de l'étude et à recueillir les données de leurs visites antérieures, de même que ceux des apprentis déjà sortis de l'étude.

c) Investigations paracliniques

i. Spirométrie par la méthode des oscillations forcées

La capacité vitale forcée (CVF), le volume expiratoire maximal à la première seconde (VEMS) et les débits maximum expiratoires à différents volumes pulmonaires (V'max) sont obtenus au cours d'une expiration forcée succédant immédiatement à une inspiration profonde. Pour la valeur de base, au moins trois manœuvres d'expirations forcées satisfaisantes respectant les critères recommandés par l'American Thoracic Society ont été enregistrées.

Les résultats sont exprimés en pourcentage des valeurs prédites de la Communauté Européenne du Charbon et de l'Acier.[219]

ii. Mesure de la fraction expirée monoxyde d'azote (FENO)

La FENO a été mesurée en respectant des recommandations de l'American Thoracic Society (ATS) à l'aide du système Niox © 2.0 (Aérocine AB, Solna, Suède) par des infirmières de recherche clinique formées. En position assise, les lèvres bien autour de l'embout buccal (à usage unique) afin d'éviter toute fuite, les sujets expiraient avec une pression suffisante pour vaincre une pression de 5 cm d'eau délivrée par la machine avec un débit de 50 mL/s. Cette pression orale délivrée par les sujets au cours de l'expiration et maintenue pendant 10 secondes, était nécessaire pour fermer le voile du palais afin d'éviter une éventuelle contamination par le NO nasal. Toute expiration qui ne respecte pas les critères de l'A.T.S. est rejetée par le système. Des valeurs prédites de la FENO ont également été calculées à

partir de l'équation de régression proposée par Travers [220]. Cette équation tient compte du sexe, de l'atopie et du statut tabagique.

iii. Définition de l'Hyperréactivité bronchique non spécifique (HRBNS)

L'HRBNS est évaluée à l'aide du test à la métacholine (TM). La méthode de mesure de la fonction ventilatoire utilisée ici est celle des ventilations forcées, le paramètre étudié étant le VEMS. Il n'y a pas d'avantage bien net à utiliser d'autres paramètres de la courbe débit-volume. La mesure du VEMS a été choisie car c'est la technique de choix dans les études épidémiologiques.

Trois doses croissantes de métacholine sont délivrées par un appareil produisant des aérosols.

Lorsque le test est mené à terme, le sujet reçoit donc une dose totale cumulée de 1600 µg.

Le test est arrêté avant la troisième série d'inhalations lorsque le VEMS chute de 20 %, et considéré alors comme positif. Les résultats sont exprimés en pourcentage de chute du VEMS.

L'HRBNS (HRBNS+) a été définie [218] comme *incidente* si une des conditions suivantes est remplie:

- ✚ Si TM (+) à V_n (n>1) et TM (-) à V1
- ✚ Si TM (+) à V1 et TM (+) à V_n (n>1) pour une dose de métacholine plus faible
- ✚ Quelle que soit la visite, une diminution d'au moins 0,100 de la pente dose-réponse par rapport à V1 chez les sujets avec chute de VEMS de base d'au moins 15%

d) Atopie et sensibilisation allergénique

Les tests cutanés (Prick tests) ont été réalisés en utilisant trois groupes d'allergènes, appliqués sur la face antérieure de l'avant-bras ou dans le dos. Les allergènes testés sont :

- 1) les aéroallergènes communs à tous les sujets : les acariens (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* contenus dans les poussières de maison et les mites de stockage), les squames cutanées d'animaux (poils de chat, chien), les pollens de végétaux (pollens 12 graminées, pollens 4 céréales, mélanges herbacées, mélanges bétulacées, mélanges d'arbres), les moisissures (*Alternaria tenuis*, *Aspergillus mix*) ;
- 2) les antigènes propres à chaque catégorie professionnelle : les allergènes de la boulangerie/pâtisserie (levures de bière et de boulangerie, alpha amylase, 7 céréales, sésame, sarrazin, poussières de boulangerie), les allergènes de la coiffure (les persulfates alcalins 1 % en solution aqueuse) ;
- 3) les témoins : témoin positif (histamine à 10 %) et témoin négatif (soluté isotonique phénolé à 4 ‰).

La réaction consiste en l'apparition d'une réaction cutanée grossièrement circulaire faite d'une papule centrale et d'un érythème périphérique. La lecture est faite au bout de 20 minutes en mesurant les diamètres de la papule et de l'érythème des réactions engendrées par chaque allergène. La réaction provoquée par un allergène est considérée comme positive lorsque le diamètre de la papule de cette réaction est supérieur au diamètre de la papule du témoin négatif d'au moins 3 mm avec une réaction positive au témoin positif [221, 222].

2. TECHNIQUE DE GENOTYPAGE GENES CANDIDATS : Méthode FRET, Light cycler

a) Lavage nasal : Méthode de HIDLING

Un procédé original de lavage, développé initialement par Hilding et al. [223] a été amélioré par Wang et al. [224]. Il consiste à utiliser une sonde vésicale (type Foley, charrière 12), coupée à l'extrémité du ballonnet et placée dans le vestibule nasal. Le ballonnet est gonflé au

maximum tolérable (approximativement 5 à 8 ml d'air pour un adulte) pour assurer l'obturation du conduit nasal. L'autre extrémité de la sonde est fixée à une seringue contenant 7 ml de NaCl à 9 ‰ chauffé à 37°C. Le sujet incline la tête en avant, afin d'éviter toute fuite éventuelle de liquide par le nasopharynx. Le cycle instillation - aspiration est renouvelé trois fois, puis le ballonnet est dégonflé et retiré. Chaque narine est ainsi lavée ; les liquides sont regroupés puis répartis en plusieurs échantillons. L'ensemble est centrifugé à 500 g pendant 10 minutes à +4°C et le surnageant est stocké à -70°C pour analyse ultérieure. En outre, cette méthode présente l'avantage de prolonger le temps de contact du NaCl à 9 ‰ avec la muqueuse nasale, améliorant ainsi la diffusion des cellules et des médiateurs. Elle est, de plus, confortable pour le patient car a-traumatique, ce qui évite la stimulation de la muqueuse. Elle apparaît comme une bonne candidate à l'utilisation en épidémiologie.

b) Extraction d'ADN du liquide de lavage nasal: fiche technique (en Annexe 6)

L'ADN a été extrait de 200 µl du LLN en utilisant le QuiAmp mini kit (Quiagen, Courtaboeuf, France). Les génotypes de 4 polymorphismes choisis ont été déterminés par la technique de polymérase Chain Réaction [225, 226] (PCR) (Roche Molecular Biochemicals, Lyon, France).

i. Principe du Light Cycler

Il s'agit d'un thermocycleur à air pulsé couplé à un microspectrofluorimètre.

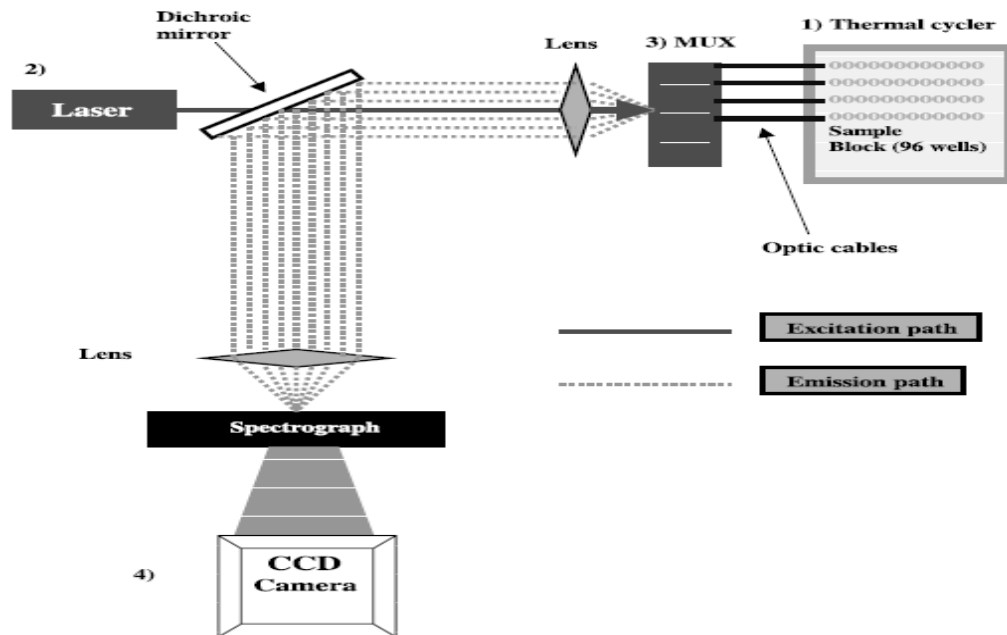


Figure 11: Principe de base d'un système PCR temps réel avec le Light Cycler (LC)

La recherche de polymorphismes a été effectuée par PCR en temps réel (Light Cycler, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) à l'aide de sondes fluorescentes spécifiques du polymorphisme recherché.

Le LC480 est composé :

- 1- d'un thermocycleur
- 2- d'un laser de fluorescence
- 3- d'un multiplexeur pour répartir l'excitation sur l'ensemble des échantillons
- 4- d'une caméra CCD pour mesurer la fluorescence émise

Deux grands types de marquage peuvent être envisagés pour suivre l'amplification en temps réel : Sybr Green et sondes d'hybridation.

SYBR Green I

Le SYBR Green est une molécule qui se lie à l'ADN double brin. Il appartient à la catégorie des agents intercalants comme le bromure d'éthidium (BET), largement utilisé dans les laboratoires de biologie moléculaire.

Il donne une fluorescence proportionnelle à la concentration en ADN. Ce signal de fluorescence est mesuré en direct tout au long de l'amplification. On visualise ainsi la formation des produits de PCR en temps réel à chaque cycle d'amplification.

Le Light Cycler permet la discrimination des produits d'amplification en calculant leur T_m (temps de fusion) par courbes de fusion.

Sondes d'hybridation

Ce système, qui est aussi connu sous le nom de *hybridization probes*, est basé sur l'emploi de deux sondes linéaires capables de se fixer d'une manière spécifique sur le produit de PCR simple brin néosynthétisé. Les deux sondes sont marquées par deux fluorochromes.

L'une des sondes est porteuse d'un fluorophore donneur en 5', et l'autre phosphorylée à son extrémité 3' afin d'empêcher son extension par la polymérisation pendant l'étape d'élongation. Pendant l'élongation la Taq déplace la sonde d'ancrage, et la fluorescence disparaît. Le signal obtenu est ainsi proportionnel à la concentration de l'ADN spécifique.

Ce procédé permet la détection de mutations par analyse des variations de température de fusion (T_m) des sondes d'hybridation. Lorsqu'il y a mutation le mésappariement va provoquer une diminution de quelques degrés de la température de fusion.

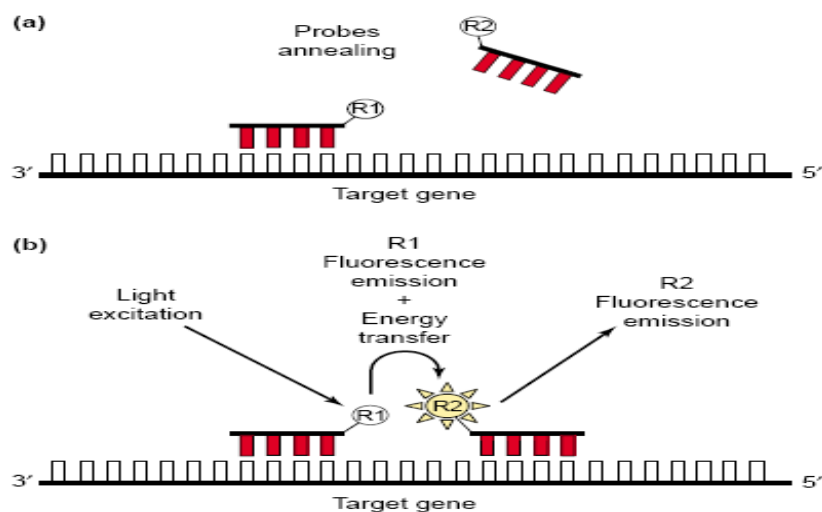


Figure 12 : Principe d'une sonde FRET en tandem:

- (a) les deux sondes fluorophores R1 et R2 sont suffisamment éloignées ; pas d'émission de signal
- (b) après hybridation des amorces et fixation des 2 sondes fluorophores à leurs cibles, les deux sont suffisamment proches et leur proximité permet le transfert de l'énergie du fluorophore donneur R1 vers le fluorophore accepteur (quencher) R2. La distance entre les sondes doit être bien réduite (1-5 bp) pour augmenter le phénomène de transfert.

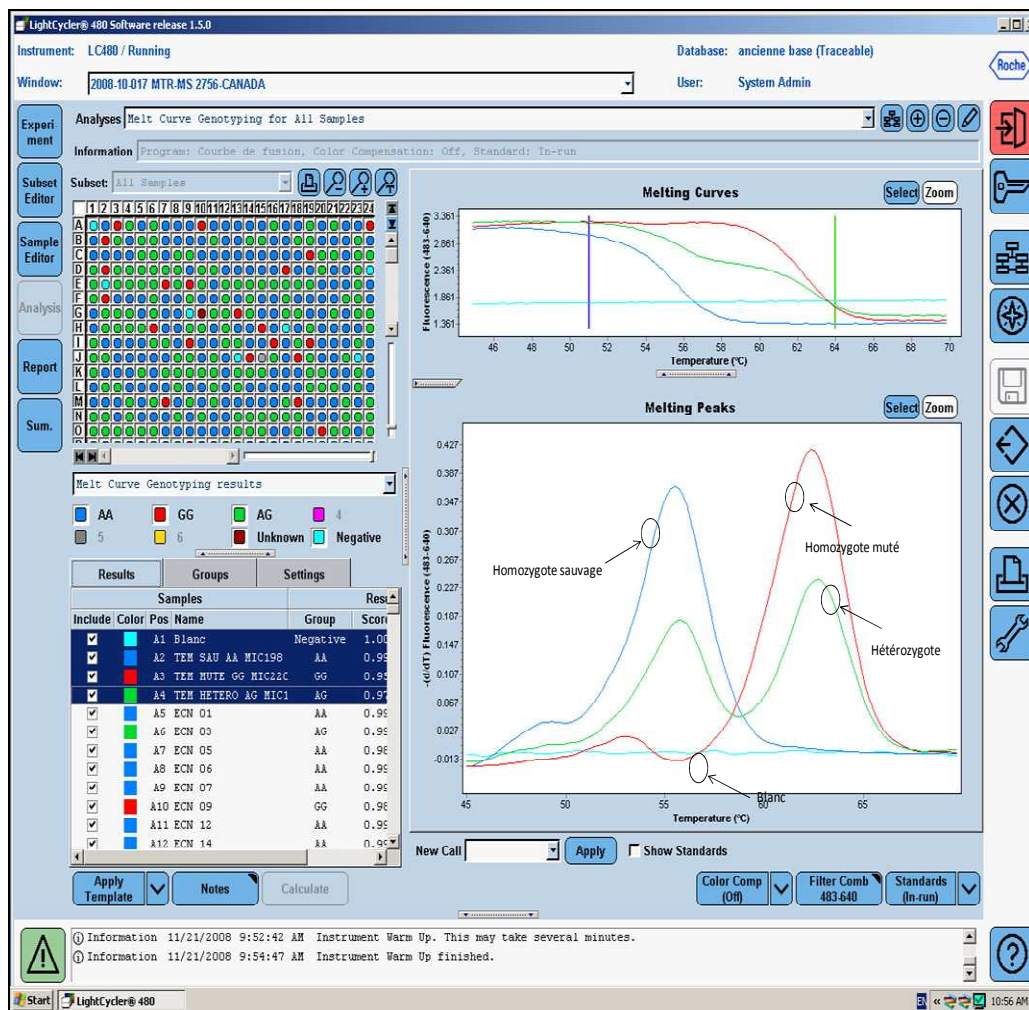


Figure 13 : Aspect d'une courbe de fusion obtenue avec les sondes FRET après expertise par le logiciel.

En bleu : sujet normal (homozygote sauvage) ($T_m = 55^\circ \text{C}$), en rouge : sujet muté (homozygote muté) ($T_m = 61^\circ \text{C}$) et en vert : sujet hétérozygote ($T_m = 55^\circ \text{C} + 61^\circ \text{C}$).

D'autres techniques peuvent être appliquées sur le LC480 comme le HRM (High Resolution Melting ou Fusion à Haute Résolution).

La fusion à haute résolution est une nouvelle technique qui permet, après une PCR, de discriminer, sur une montée en température très progressive, les différents variants amplifiés, et ce avec un simple fluorochrome intercalant.

En effet, l'utilisation de cette nouvelle chimie sature complètement les structures doubles brins et permet de distinguer des variations, même d'une seule base, selon le profil de dénaturation.

L'homogénéité parfaite du thermobloc du LightCycler 480 permet d'obtenir la meilleure des résolutions.

c) Gènes explorés (fiches techniques en Annexe 7)

i. Lies à l'inflammation

 *Tumor necrosis alpha-308 rs1800629*

 *Interleukine (IL) 1A -889 rs1800587*

ii. Lies à l'allergie

 *Interleukine 4-S478P rs1805015 et 4R Q551R rs180275*

 *Interleukine 5-705 rs2069807*

 *Interleukine 13 R130Q rs20541*

3. Analyses statistiques

Les analyses statistiques avaient pour objectif d'évaluer durant la période d'apprentissage et en fonction de l'exposition, les interactions « gènes-environnement de travail » et gène –gène. Toutes les analyses ont été réalisées avec le logiciel STATA-11.1 SE package (StataCorp, Texas, USA).

Des statistiques descriptives (fréquences, moyennes et médianes) ont été réalisées pour décrire les caractéristiques sociodémographiques et spirométriques de la population. Les

variables continues ont été exprimées en moyenne + / - SD. Une transformation Log a été réalisée pour les valeurs de la FENO (Log-FENO). Les distributions des génotypes selon l'équilibre de Hardy Weinberg ont été testées chez toute la population et en fonction du statut atopique en utilisant le test chi2 goodness of fit. La distribution des polymorphismes entre les groupes considérés a été faite en utilisant le test de Fisher.

L'influence des variations génétiques sur les paramètres fonctionnels respiratoires a été évaluée à différents moments de l'examen. L'évolution de la fonction pulmonaire (CVF, VEMS, Rapport de Tiffeneau) et celle de la FeNO ont été calculés par un indice de variation (i) le long de la période d'étude de 2 ans pour chaque paramètre de la fonction pulmonaire et des valeurs de la FeNO. Les sujets ont été appariés entre eux-mêmes (sujet pris pour son propre témoin).

L'indice de variation « i » a été défini comme la différence entre la valeur du paramètre considéré à la dernière visite du sujet (V3 ou V4) et celle considérée à la première visite d'inclusion (V1) revenu sur la durée moyenne de suivi du sujet. (Voir encadré)

$\text{Index (i) de variation : } ((V4 \text{ ou } V3 - V1) / \text{durée du suivi})$

En analyse univariée, une ANOVA a été utilisée pour analyser l'association des génotypes avec les variables indépendantes. Seuls les génotypes avec un seuil d'association $p < 0,10$ ont été inclus dans les analyses multivariées. L'ajustement a été fait sur le statut atopique, statut tabagique, et la filière d'exposition.

Les corrections pour les tests multiples entre les génotypes ont été faites en utilisant le test de Bonferroni. Une courbe de survie selon la méthode de Kaplan-Meier en fonction de l'HRBNS a été réalisée.

B. Etude A.B.C.D : Asthme en Boulangerie et Coiffure

Débutant

I. Objectifs de l'étude Cas-témoin

L'augmentation de la prévalence de l'asthme fut sans cesse croissante depuis ces dernières décennies dans les pays industrialisés, et l'hypothèse avancée a trait à une modification de l'environnement et/ou des modes de vie plutôt qu'une influence unique des facteurs génétiques [156]. Ainsi, des modifications dans l'alimentation, parmi d'autres facteurs « environnementaux » pourraient être la cause de cette augmentation. Mais les mécanismes qui sous-tendent cette hypothèse restent encore peu définis car la plupart des études aboutissent à des contradictions. Le rôle des antioxydants (Vitamines ACE), de la vitamine D [227], est encore peu défini et de nombreuses contradictions sur les mécanismes ont été reportées. Considérant les acides gras polyinsaturés, une hypothèse a été avancée [228], et le domaine du rôle de la vitamine B reste encore à définir [229,230]. La plupart de ces études ont été réalisées en population générale, très peu ont exploré l'interaction nutrition - environnement dans l'AP.

L'étude ABCD s'intègre à la suite de la précédente étude MIBAP, et vise à poursuivre les investigations au delà de la période d'apprentissage, période d'exposition assez courte. Le protocole de l'étude a fait l'objet d'une publication [231].

Elle comportait deux parties intriquées. La première consistait en étude descriptive s'appuyant sur une cohorte longitudinale rétrospective; elle permit l'estimation de l'incidence précoce de l'asthme professionnel. Sa seconde partie, dont les résultats sont présentés dans cette thèse, s'appuyait sur une étude de type cas-témoin nichée dans la cohorte, associée à des mesures objectives, transversales, réalisées au cours d'une visite ; elle permit une exploration

de certains facteurs étiologiques de l'asthme professionnel dont les facteurs nutritionnels et métaboliques qui font l'objet de cette thèse.

Les résultats cliniques et celles de la cohorte ont déjà fait l'objet d'une thèse présentée par le Dr Thomas Remen.

Brièvement, cette étude concerne les mêmes filières : boulangerie-pâtisserie et coiffure, reconnues comme secteurs à risque d'AP (Annexe 8). Les jeunes boulangers, pâtisseries ou coiffeurs sortis diplômés d'un CFA Lorrain ont ainsi été invités à participer à l'étude.

II. *Matériels et méthodes de l'étude cas- témoin « ABCD »*

1. Critères d'inclusion et de non inclusion

a) Critères d'inclusion

- Tout individu, des 2 sexes, sorti diplômé entre 2001 et 2006 dans le secteur de la Boulangerie-Pâtisserie ou de la Coiffure, ou sorti diplômé en 2001 dans les secteurs des métiers de Bouche ou de la vente d'un des 10 Centres de Formations des Apprentis (CFA) lorrains sélectionnés ;
- Sujets acceptant de participer à la visite médicale (phase de recrutement initial) ou acceptant de compléter le questionnaire médical téléphonique.
- L'ancienneté dans le métier devait être en moyenne supérieure dans le groupe témoin, constitué pour une part importante de sujets entrés en formation depuis plusieurs années.

Cette différence a été voulue car l'incidence précoce de l'AP attendue dans ce groupe est faible.

b) Critère de non inclusion (CNI)

- Sujets pour lesquels un asthme a été diagnostiqué avant l'entrée en apprentissage ;
- Pour les sujets du groupe 'non exposé' : avoir travaillé dans un secteur reconnu comme «à risque » d'AP.

2. Matériels et méthodes

a) Constitution de la population cible

Elle s'est réalisée en deux phases. La figure ci après récapitule les différentes phases qui ont permis le recrutement des sujets ABCD.

Brièvement après une première phase de recrutement, suite à des contraintes financières notamment liées à l'insuccès d'une soumission à l'Agence Nationale de la Recherche (ANR), des modifications furent apportées au protocole. Une deuxième phase alors fut initiée et le nombre de visites des sujets qui était initialement prévu à 1150 est passé à 300 sujets, car une phase de repérage par téléphone avec un questionnaire médicale court (Annexe 9) à permis de repérer les sujets « probablement cas » et un tirage au sort de témoins (« non cas ») fut réalisé. Tous les sujets « probablement cas » furent invités à bénéficier de la visite médicale soit à domicile, ou au lieu de travail.

Cet entretien téléphonique permettait de classifier ces sujets en 3 catégories distinctes :

❖ Sujets présentant des symptômes respiratoires rythmés par le travail (SR +/-ORL)

Cette classification regroupe tous les individus répondant aux critères suivants :

- ✓ Etre diagnostiqué comme asthmatique ou déclarer au moins un symptôme respiratoire (toux, dyspnée, essoufflements, douleur ou gêne thoracique) au cours des 12 derniers mois travaillés [si la personne a quitté le secteur dans lequel elle a été diplômé ou si elle est sous traitement asthmatique, les 12 derniers mois considérés furent ceux précédant l'abandon du secteur ou la prise de médication] ;

- ✓ Les symptômes doivent être apparus après l'entrée en apprentissage ;

- ✓ Les symptômes doivent être présents au cours de la semaine de travail et s'améliorer ou disparaître pendant les week-ends ou les congés.

❖ Sujets présentant uniquement des symptômes ORL en relation avec le travail (ORL)

Cette classification regroupe tous les individus répondant aux critères suivants :

- ✓ Déclarer au moins un symptôme majeur de la rhinite (obstruction nasale ou rhinorrhée) au cours des 12 derniers mois travaillés [si la personne a quitté le secteur dans lequel elle a été diplômée ou si elle est sous traitement asthmatique, les 12 derniers mois considérés furent ceux précédant l'abandon du secteur ou la prise de médication] ;
- ✓ Les symptômes devaient être apparus après l'entrée en apprentissage ou, pour les sujets rapportant des symptômes de la rhinite avant l'entrée en apprentissage, ces symptômes devaient s'être aggravés au travail ;
- ✓ Les symptômes devaient être présents au cours de la semaine de travail [l'amélioration ou la disparition des symptômes pendant les week-ends ou les congés ne furent pas considérés afin de ne pas écarter les rhinites chroniques d'origine professionnelle].

Les sujets répondant à ces 2 premières catégories furent considérés comme « AP présumé ».

❖ Sujets ne présentant ni symptômes respiratoires ni symptômes ORL

Cette dernière classification regroupe les sujets considérés comme asymptomatiques (AS) vis-à-vis des manifestations précédemment recherchées.

Des informations concernant l'exposition (durée de l'apprentissage avec détail des diplômes obtenus, durée de l'exposition professionnelle) et le statut tabagique furent également collectées.

Pour tous les sujets présentant des symptômes respiratoires pour lesquels la rythmicité avec le travail n'était pas évidente, un rappel téléphonique fut réalisé par un médecin de l'étude afin de clarifier le contexte dans lequel ils apparaissaient. Pour les individus refusant de compléter le questionnaire dans sa version complète, le remplissage d'un questionnaire court leur fut

proposé afin de collecter un minimum d'informations les concernant et apprécier un éventuel biais de sélection lié à ce refus.

b) Visites médicales

Les visites médicales pouvaient se dérouler, au choix, (i) au domicile du sujet ou au domicile d'un de ses proches, (ii) sur le lieu de travail du volontaire [accord de l'employeur nécessaire] ou (iii) dans les locaux du Centre Hospitalier et Universitaire (CHU) de Nancy-Brabois.

Deux personnes, dont un médecin (ASD ou interne), participèrent à chaque visite dont la durée était approximativement d'une heure trente.

c) Questionnaire médical et examen clinique

L'histoire clinique fut évaluée avec le questionnaire EGEA (Epidemiological Study of the Genetic and Environmental Factors in Asthma, Bronchial Hyper-responsiveness and Atopy) [232]. Les informations collectées au cours de l'interview téléphonique furent ainsi vérifiées et complétées. Ce questionnaire (Annexe 10) comprenait différentes sections : (i) antécédents respiratoires et allergiques, (ii) antécédents familiaux, (iii) hyperréactivité ressentie dans différents contextes (pièce enfumée, effort physique important, présence d'allergènes, de poussières,...), (iv) tabagisme et (v) symptômes respiratoires, ORL et cutanés. Ce questionnaire ne permettant pas d'explorer la dimension professionnelle de l'asthme (rythmicité avec le travail), elle fut évaluée par des items provenant de deux autres questionnaires: 'What are the questionnaire items most useful in identifying subjects with occupational asthma?' [233] and 'Validation of an asthma questionnaire for use in healthcare workers.' [234].

Un examen clinique complétait le questionnaire médical. Après la mesure des signes vitaux (fréquence cardiaque et pression artérielle), un examen général était réalisé, centré sur l'appareil ORL, l'appareil respiratoire, la peau et les phanères. Des signes d'irritation

conjonctivale, d'obstruction nasale et d'obstruction bronchique (en particulier la présence de sibilances inspiratoires ou expiratoires) étaient notamment recherchés.

Dans le même temps, un second enquêteur procédait à la vérification du remplissage du questionnaire alimentaire.

d) Mesure du CO et du NO exhalé

Pour compléter le statut tabagique, la teneur en monoxyde de carbone (CO) dans l'air expiré était mesurée par un analyseur portable (Micro CO®, Micro Medical [CareFusion], Royaume-Uni).

La fraction exhalée de l'oxyde nitrique (FeNO) était mesurée grâce à un analyseur portable (NIOX Mino®, Aerocrine, Suède) selon les recommandations de l'ATS/ERS [235] : les participants devaient maintenir un débit constant de 50ml/s pendant 10-12 secondes sous une pression de 10cm H₂O. Contrairement à la méthode classique qui nécessite au moins trois mesures valables, avec le NIOX MINO, une seule bonne mesure est nécessaire. Une bonne corrélation a été démontrée entre les valeurs obtenues avec l'appareil portable et l'appareil classique, pris comme référence [236].

e) Spirométrie et test de réversibilité bronchique au salbutamol

Après les mesures du CO et du FeNO, les explorations fonctionnelles respiratoires (EFR) étaient réalisées en position debout avec un spiromètre (Spirolab II®, RDSM, Italie). La capacité vitale forcée (CVF), le volume expiré maximal par seconde (VEMS) et les débits expiratoires maximaux à différents pourcentages de la capacité vitale (V'max) étaient obtenus au cours d'une manoeuvre d'expiration forcée à partir de la capacité pulmonaire totale. Au moins trois manoeuvres forcées satisfaisant les critères de l'ATS [237] furent réalisées. Les plus grandes valeurs de CVF et de VEMS furent retenues pour l'analyse. Les résultats sont

exprimés en pourcentage des valeurs prédites par les équations préconisées par l'European Respiratory Society [238].

Pour tous les sujets présentant des symptômes (respiratoires ou ORL) en relation avec le travail, un test de réversibilité était réalisé 15 minutes après l'inhalation d'un bronchodilatateur (inhalation de 4 doses séparées de 100µg de Salbutamol), à condition que le sujet ne présente pas de contre-indication à la réalisation de ce test. En effet, une hypersensibilité connue à un des composants du Salbutamol, ou une contre-indication à son utilisation (pathologie cardiaque, hypertension, diabète,...) ne permettaient pas la réalisation de ce test.

f) Questionnaire d'exposition

Pour évaluer la durée et l'intensité de l'exposition, un questionnaire en fonction de la filière était administré lors de la visite. Trois questionnaires distincts furent donc utilisés : un pour les boulangers-pâtisseries), un pour les coiffeurs et un pour les sujets sans exposition spécifique.

g) Questionnaire alimentaire (SUVIMAX 2)

Un questionnaire de fréquence alimentaire (Suvimax 2) a été utilisé pour évaluer les apports nutritionnels [239]. Ce questionnaire auto-administré (Annexe 11) a été envoyé par la poste (avec un livret d'aide au remplissage) et récupéré lors du rendez-vous. Il était contrôlé et validé par l'un des enquêteurs sur place ce qui permettait de compléter éventuellement les données manquantes.

Ce questionnaire semi-quantitatif de fréquence alimentaire (FFQ) a été développé pour évaluer l'apport alimentaire habituel, parmi les adultes français. Il prend en compte 240 types d'aliments et des boissons classés en 22 catégories.

Les données du questionnaire alimentaire furent exploitées grâce à la méthode développée par l'équipe du Pr Serge Hercberg (UMR U557 Inserm U1125/Inra/Cnam/Université Paris 13 (UREN)). A partir des informations complétées par chaque volontaire, les correspondances vitaminiques furent extraites. Ce questionnaire permit notamment d'évaluer de manière qualitative les déficits d'apports en déterminants nutritionnels d'intérêt : acides gras poly-insaturés ; 18:2 n-6 acide linoléique ; 20:4 n-6 acide arachidonique ; 18:3 n-3 acide 5S alpha-linoléique ; 20:5 n-3 EPA ; 22:5 n-3 DPA ; 22:6 n-3 DHA ; Vit A – rétinol ; Bétacarotène ; Vit B1 – thiamine ; Vit B2 – riboflavine ; Vit B3 – niacine ; Vit B5 – acide pantothénique ; Vit B6 – pyridoxine ; Vit B9 – folates ; Vit B12 – cobalamine ; Vit C – acide ascorbique ; Vit D – calciférol ; Vit E – tocophérols ; magnésium et sodium.

h) Monitoring du débit de pointe

Les sujets décrivant des symptômes respiratoires ou ORL en relation avec leur travail furent sollicités pour réaliser un suivi de leur DEP pendant 3 semaines.

Un débitmètre de pointe leur fut remis (Asma-1®, Vitalograph, Irlande ou One-flow®, Mediflux, France) ainsi qu'un livret contenant la notice explicative de l'appareil et une grille de recueil. Il leur fut demandé de mesurer leur DEP 4 fois par jour : 2 sur le lieu de travail (la première 2-3 heures après la prise de poste et la seconde avant de quitter le poste) et 2 en dehors (une avant d'aller au travail, l'autre avant le coucher) ; pendant une durée de 3 semaines. Pour chaque mesure, le sujet était invité à souffler 3 fois dans le débitmètre et à reporter la meilleure valeur du DEP dans la grille de recueil prévue à cet effet.

Les données ainsi recueillies étaient analysées via le logiciel OASYS version beta, afin de mesurer la présence ou non d'une rythmicité avec le travail (score OASYS sup à 2.5) et/ou d'une variation diurne.

i) Diagnostic de l'AP

La démarche diagnostic de l'AP fut réalisée en fonction d'un arbre décisionnel (figures 11 et 12).

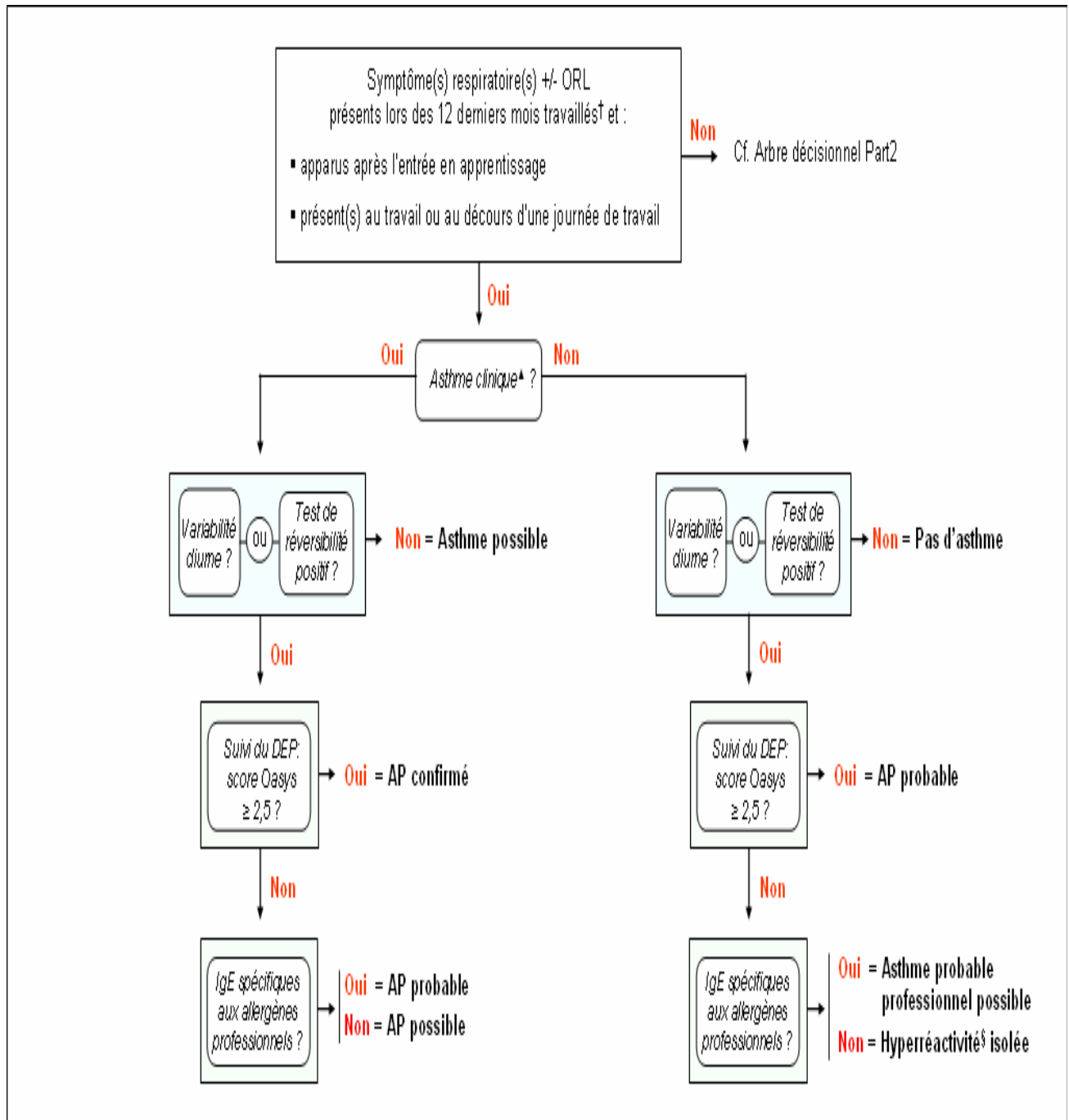


Figure 11 : Arbre décisionnel pour le diagnostic de l'asthme professionnel (Part 1).

† Si le sujet a quitté son activité ou est sous traitement asthmatique, les 12 mois précédant l'arrêt de l'activité ou le début de la médication furent considérés. ▲ Symptomatologie répondant à la définition clinique de l'asthme proposée par Levy et coll. [240]

§ Hyperréactivité des voies aériennes

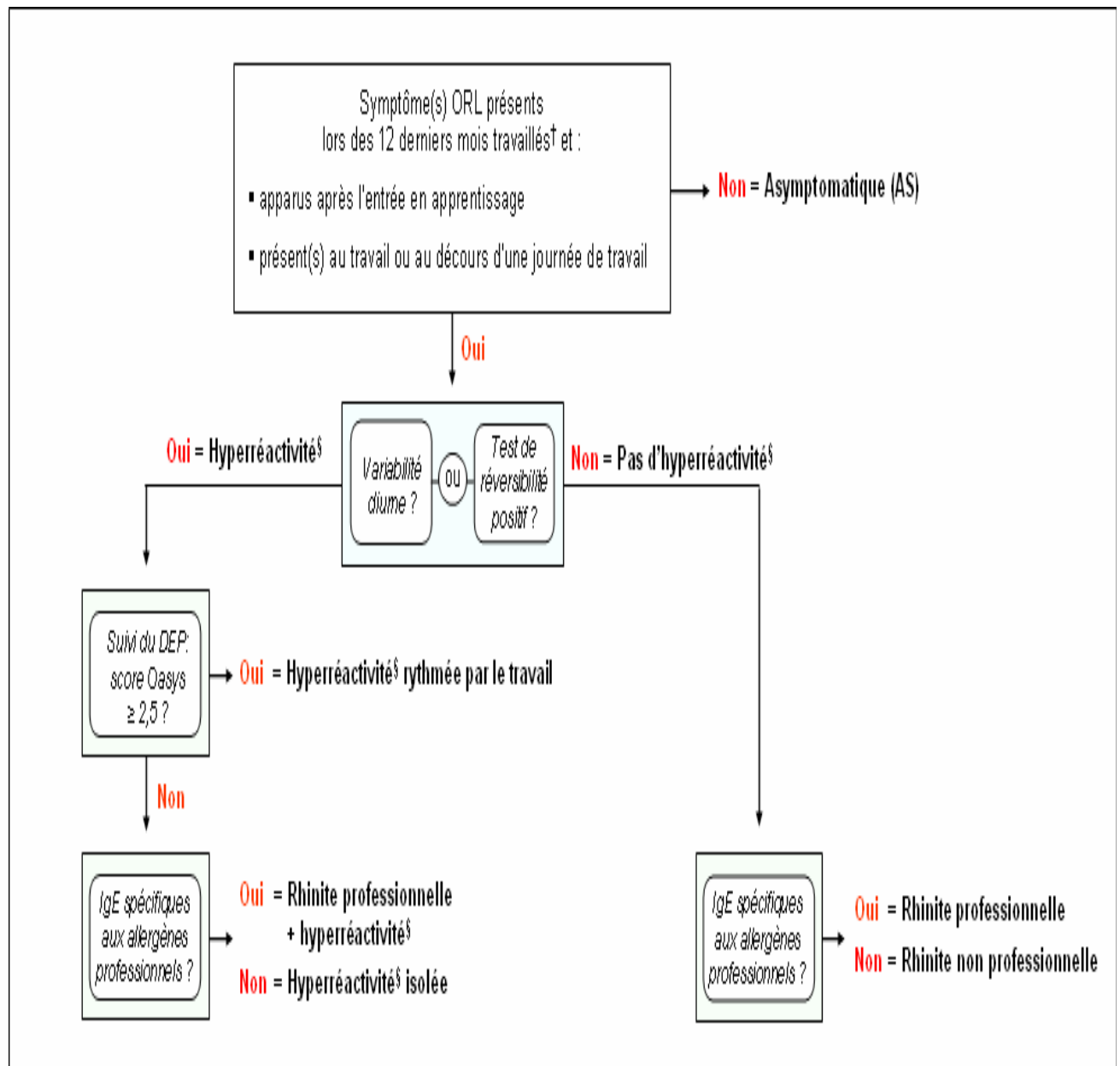


Figure 12 : Arbre décisionnel pour le diagnostic de l'asthme professionnel (Part 2).

† Si le sujet a quitté son activité ou est sous traitement asthmatique, les 12 mois précédant l'arrêt de l'activité ou le début de la médication furent considérés.

§ Hyperréactivité des voies aériennes

j) Prélèvements sanguins

Ils étaient réalisés en fin de visite et 4 tubes Vacutainer® furent prélevés : 2 tubes de 6 ml de EDTA, 1 tube sec de 6 ml et 1 tube de 4 ml contenant de l'héparine.

Ces analyses avaient pour objectif de déterminer :

- du statut atopique par le phadiatop,
- dosage des IgE spécifiques (latex, allergènes de boulangerie, ammonium quarternaire)
- recherche de polymorphismes génétiques associés à l'AP,
- dosage métaboliques en rapport avec le métabolisme des folates
- dosage des vitamines.

III. DOSAGE BIOLOGIQUE

 **Dosage quantitatif et simultané de la vitamine B12 et des folates**
(fiche technique en Annexe 12)

 **Dosage de l'homocystéine par le système IMx (Fiche technique en Annexe 12)**

IV. ANALYSES STATISTIQUES

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SAS® 9.2.

Dans un premier temps, une analyse descriptive élémentaire fut réalisée. Les variables quantitatives furent décrites par leur moyenne et leur écart type (ET). Les variables qualitatives furent décrites par leur pourcentage.

L'étude du lien entre facteurs personnels, familiaux, professionnels, nutritionnels et le statut d'asthme professionnel fut explorée par régression logistique. Les variables biologiques furent log transformées car leurs distributions ne respectaient pas la normalité.

Dans un premier temps, une analyse bivariée fut réalisée afin d'évaluer l'association entre le statut d'AP et les variables d'intérêt. Le test utilisé était un test du Chi-2 lorsque la variable

explicative était qualitative (dichotomique ou en classe) et un test de Student ou de Wilcoxon (selon les conditions d'application) lorsque la variable explicative était de type quantitative.

Les déterminants du statut d'AP furent mis en évidence par régression logistique après avoir testé l'écart à la linéarité pour chaque variable.

RESULTATS

A. ARTICLE 1 :

Polymorphismes génétiques et marqueurs de l'obstruction des bronches chez les apprentis boulangers-pâtisseries et coiffeurs.

*Ces résultats ont fait l'objet d'un article qui est soumis à la revue internationale « **Annals of Allergy** »*

Polymorphismes génétiques prédictors de l'inflammation et le risque de l'asthme professionnel chez des jeunes apprentis boulangers-pâtisseries et coiffeurs

Dovi Stéphanie Acouetey,¹ MD; Denis Zmirou-Navier,^{1,2*} MD, PhD; Patrice Avogbe;¹ Paul Tossa,¹ MD, PhD; Thomas Rémen,¹ PhD; Annick Barbaud,¹ MD, PhD; José-Antonio Cornejo-Garcia,^{1,3} Miguel Blanca,^{1,3} MD; Abraham Bohadana,¹ MD, PhD; Christophe Paris,¹ MD, PhD; Jean-Louis Guéant,^{1*} MD, PhD, AGAF; Rosa-Maria Guéant-Rodriguez^{1*} MD, PhD

Aucune étude longitudinale, sur l'asthme professionnel des apprentis, n'a examiné le rôle des facteurs génétiques, à ce stade précoce de l'exposition aux allergènes et aux irritants aéroportés.

Nous avons donc cherché à évaluer le rôle des polymorphismes génétiques en rapport avec l'inflammation et l'allergie, à savoir les *IL13* (*R130Q rs20541*), *IL4RA* (*S478P rs1805015*, et *Q551R rs180275* variants), *IL-5* (*-705 rs2069807*), *IL1A* (*-889 rs1800587*) et *TNF* (*-308 rs1800629*) et ce, sur le déclin de la fonction pulmonaire, y compris l'obstruction bronchique, l'hyperréactivité bronchique et le monoxyde d'azote exhalé (FeNO) depuis le début de l'exposition de 441 boulanger / pâtissier et apprentis coiffeurs.

Dans ce travail nous observons des interactions épistatiques entre soit *IL13 R130Q/IL4RA S478P* et *IL13 R130Q/IL4RA Q551R* et la diminution du volume expiratoire forcé et la capacité vitale forcée ($P \leq 0,006$).

Le génotype GG du TNFa-G308A a été associé à l'hyperréactivité bronchique dans l'ensemble de la population et chez les sujets non atopiques (90,63 % vs 9,38 %; OR = 3,78 [1,10 à 12,83]).

Nous avons aussi observé que certaines interactions gène-gène étaient associées avec une modification de la FeNO. Les interactions gènes-gènes entre *TNFA* GA & *IL-5* CC et *TNFA* GA & *IL-1A* CC étaient associés à une diminution du monoxyde d'azote exhalé au cours du suivi ($P = 0,017$ et $P = 0,004$, respectivement), association plus marquée chez les apprentis boulangers et pâtisseries non atopiques.

Par contre chez les non atopiques coiffeuses c'est l'interaction *TNFA* GG & *IL-1A* CC qui est associé à une augmentation du FeNO ($p=0.035$).

Genetic predictors of inflammation in the risk of occupational asthma in young apprentices

Running head: Polymorphisms and bronchial inflammation among apprentices

Dovi Stéphanie Acouetey,¹ MD; Denis Zmirou-Navier,^{1,2*} MD, PhD; Patrice Avogbe,¹ Paul Tossa,¹ MD, PhD; Thomas Rémen,¹ PhD; Annick Barbaud,¹ MD, PhD; José-Antonio Cornejo-Garcia,^{1,3} Miguel Blanca,^{1,3} MD; Abraham Bohadana,¹ MD, PhD; Christophe Paris,¹ MD, PhD; Jean-Louis Guéant,^{1*} MD, PhD, AGAF; Rosa-Maria Guéant-Rodriguez^{1*} MD, PhD

¹ Nutrition, genetics and environment, INSERM-U954, Faculty of Medecine, Vandœuvre lès Nancy, France

² Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique, Rennes, France

³ Research Laboratory, Carlos Haya Hospital-Fundacion IMABIS, Malaga, Spain

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Dr RM Guéant-Rodriguez, Inserm U954, 9 rue de la Forêt de Haye, 54505 Vandœuvre-Lès-Nancy, France. E-mail: Rosa-Maria.Gueant-Rodriguez@medecine.uhp-nancy.fr

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the directors and teachers of the six apprenticeship schools of Lorraine. The authors are indebted to Denise Tramoy and René Debard for their excellent technical contribution in the genotyping.

FUNDING SOURCES: Grants from AFSSET (contract RD-2003-04), French Ministry of Labour (2002 Health and Occupation call for proposal), the regional Social Security office (CRAM Nord-Est), the Lorraine Region, ANR (the French national research agency; grant 05 9 75 / ANR 05 SEST 021-01), PHRC (Hospital clinical research programme, 2004) and from INRS (National institute for labor security). The Soufflet group and L'Oréal also provided financial support.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

DSA: analyzed data, performed subject testing, genotyping analyses, statistical analyses and wrote paper; *DZN: designed research, conducted research, analyzed data, revised paper, supervised the whole project and had primary responsibility for final content ; PA: performed genotyping analysis; PT: performed subject testing; TR: provided essential materials; JAC: performed genotyping analysis; MB: designed and conducted research; AB: designed and conducted research ; CP: designed and conducted research, analyzed data, wrote paper; *JLG: designed research, conducted research, analyzed data, wrote paper, supervised the whole project and had primary responsibility for final content; *RMGR: designed research, conducted research, supervised genotyping analyses, analyzed data, wrote paper, had primary responsibility for final content

*These authors have equal contribution to this manuscript

Number of figures (2) and tables (4)

Word count of the manuscript: 2868

CONFLICT OF INTEREST

No financial or other potential conflict of interest exists for any of the authors

ABSTRACT

Background: No longitudinal studies of occupational asthma in apprentices have considered the related genetic predictors, at the early stage of exposure to allergens and/or airborne irritants.

Objectives: We aimed to assess genetic predictors of inflammation and atopy, *IL4RA*, *IL13*, *TNFA*, *IL1A* and *IL5* on decline of lung function, including bronchial hyper-responsiveness and airway inflammation since the very beginning of exposure of 441 baker/pastry and hairdresser apprentices.

Methods: Our follow-up study evaluated the influence of genetic predictors on spirometry and airways responsiveness to methacholine in 441 baker/pastry and hairdresser apprentices during a 2-year training period.

Results: Significant epistatic associations were observed between either *IL13 R130Q/IL4RA S478P* or *IL13 R130Q/IL4RA Q551R* and the decrease of forced expiratory volume and forced vital capacity ($P \leq 0.006$). Genotype *GG* of *TNFA-G308A* was associated with bronchial hyper-responsiveness in the whole population and in non-atopic subjects (90.63% vs 9.38%; OR=3.78 [1.10-12.83]). *TNFA GA & IL-5 CC* and *TNFA GA & IL-1A CC* were two epistatic predictors of exhaled nitrogen monoxide decrease during follow up ($P = 0.017$ and $P = 0.004$, respectively). The association with *TNFA GA & IL-1A CC* was the most significant in non-atopic bakers ($P < 0.001$).

Conclusions: We evidenced a predicting influence of *IL13/IL4RA* and *TNFA* in the early exposure to allergens and irritants that precedes occupational asthma. The significance of the associations in absence of atopy suggests an influence of the genetics predictors related to inflammatory pathways.

Key words: airway inflammation; *IL4RA*; *IL13*; non-specific bronchial hyper-responsiveness; *TNFA*.

INTRODUCTION

Apprentices represent a good model for studying the natural history of adult onset occupational asthma and to describe the mechanisms associated with the incidence of airways inflammation and bronchial hyper-responsiveness (BHR). Several longitudinal studies on apprentices exposed either to low molecular weight [1] (LMW) or high molecular weight [2] (HMW) agents have contributed to a better understanding of the clinical determinants of occupational sensitization and inflammation in OA. However, to date, none of these studies have considered gene polymorphisms involved in airway inflammation.

The early stage of exposure and inflammation development may enhance our understanding of the genetic factors that are involved in the mechanisms specifically related with the “susceptibility” of OA [3]. There is a growing interest for taking into consideration a level of complexity that includes gene-gene and gene-environment interactions[3]. Among the high number of candidate genes, which have been evaluated as predictors of general asthma, some of them, *IL13*, *IL4RA*, *IL5*, *IL1A* and *TNF* have been related with atopy and/or inflammation [4]. Beside their influence on atopy and inflammation, these candidate genes are also potent predictors of bronchial hyper-responsiveness (NSBHR) in children populations from Western Europe [5].

In the present study, we aimed to assess the association between polymorphisms of *IL13* (*R130Q rs20541*), *IL4RA* (*S478P rs1805015*, and *Q551R rs180275* variants), *IL-5* (*-C705T rs2069807*), *IL1A* (*-C889T rs1800587*) and *TNF* (*-G308A rs1800629*) and the alteration of the lung function, incidence of NSBHR and increase of exhaled nitrogen monoxide (FeNO). These lung parameters were chosen as indicators of airway inflammation in young bakery and hairdressing apprentices, two populations at high risk of OA, and exposed to contrasted types of occupational agents [6] (HMW vs. LMW).

MATERIALS AND METHODS (see E-supplement (s) materials and methods for detail)

Subjects and study design

This study has a prospective follow-up design whereby 441 baker/pastry maker and hairdresser apprentices were repeatedly visited over their 2-year training period in the Lorraine region, North-Eastern France. The design has been described elsewhere [7].

The number of subjects seen at enrollement and still present at last visit was 351 (80% of inclusions).

Examinations were performed, on average, within 3 months of the beginning of apprenticeship and every 6 months thereafter. Following a first inclusion examination within 3 months of the beginning of apprenticeship, the 441 subjects had three follow-up visits scheduled at 6, 12 and 18 months, respectively. All subjects provided written consent and the local ethic committee approved the study protocol. Subjects were included provided they had neither been previously exposed to substances known to induce OA, nor physician-diagnosed asthma.

The research program has been authorized by the University Hospital ethical committee (CCPPBR n°02 09 02) and written consents were obtained from participants, and from their parents for minors. The data base created for this project was declared to and approved by the French National Commission for Data Protection (CNIL no. 902 129).

Clinical examination and skin prick tests (SPTs).

A standardized questionnaire was used for personal, demographic information and for smoking habits. Atopy assessed at entry and the end of the study was defined by at least one positive prick test reaction to prevalent common aeroallergens.

Fraction exhaled nitric oxide (FeNO)

Immediately after the clinical examination, FeNO was measured in compliance with ATS/ERS recommendations [8] and expressed in parts per billion (ppb). Measurements were

taken by a trained technician using a chemiluminescence analyzer (NIOX[®] 2.0 system; Aerocrine AB, Solna, Sweden).

Spirometry measurements and airway responsiveness to methacholine (NSBHR)

Spirometry was recorded for all subjects, and results were expressed as a percentage of the predicted values given by the European Steel and Coal Community Working Party [9]. Forced vital capacity (FVC), forced expiratory volume in one second (FEV₁) and maximal expiratory flows at various lung volumes (V_{max}) were obtained by having the subject expire forcefully after a maximum inspiratory maneuver. At least three forced expiratory maneuvers, satisfying the recommended criteria [3] (ATS 1995) were recorded as baseline measurement. The largest FVC and FEV₁ values were retained for analysis.

Apprentices also underwent methacholine test and it's was considered positive (MCT+) if Forced expiratory volume in one second (FEV₁) decreased by at least 20% below the baseline value and the corresponding provocative concentration (PC₂₀) was recorded. "NSBHR incidence", defined according of the occurrence or aggravation of a positive MTC [10] as follows: 1. Occurrence of a positive response to the methacholine test challenge (MCT+) at any visit in patients with a negative MCT at inclusion (MCT-). 2. Aggravation of the PC₂₀ (provocative concentration of inhaled methacholine required to reduce FEV_t by 20%), at least for one lower dose in subjects with MCT+ at the first visit. 3. Aggravation of the coefficient of the NDRS (Normal Dose Reponse Slope) with a decrease by 0.100 or more at any visit compared to the NDRS measured at the first visit, in subjects with at least a decrease of 15% of FEV₁ whatever the visit, (the 0.100 cut-off point corresponding to the mean decrease in all MCT+ subjects with a significant PC₂₀).

DNA extraction from collected nasal cells.

DNA was extracted from 200 ml of nasal lavage using the QuiAmp mini kit (Quiagen, Courtaboeuf, France). The genotypes of the four polymorphisms were determined by real-

time polymerase chain reaction [11, 12] (PCR) (Roche Molecular Biochemicals, Lyon, France).

Statistical analysis

The statistical analyses were designed to explore the association between the selected polymorphisms and the variation, along the study period, of the indicators of airways inflammation, according to the apprenticeship training tracks.

All analyses were performed with the STATA-11.1 SE package (StataCorp, Texas USA). Continuous variables were expressed as mean $\pm$ SD. FeNO was logarithmically transformed, as it showed a skewed distribution. Polymorphisms were tested for Hardy-Weinberg equilibrium in the subjects according to the atopic status, and the combined sample by using the χ^2 goodness-of-fit test. The genotype distribution among groups was compared by Fisher exact test. The influence of genetic variants on functional parameters was evaluated at the different times of examination. Variation of the lung functions parameters was calculated by a variation index along the 2-year study period for each lung function parameter or FeNO values. It was defined as “(last determination – determination at enrollment) / (follow-up duration)”. In univariate analyses, a one-way ANOVA was used to analyze the association of genotypes with independent variables. Only genotypes associated with P values < 0.10 were included in multivariate analyses. The latter were adjusted for smoking status, training track and atopic status. Corrections for multiple testing among genotypes were made using the Bonferroni test. The follow-up of NSBHR according the exposure delay was analyzed by Kaplan-Meier analysis.

RESULTS

Description of the population

The demographical, clinical and functional variables are summarized in Table 1. 47% of all apprentices are smokers, with no differences according to the exposure ($P = 0.352$). “Incident” NSBHR was evidenced in 17.2% ($n=71$) of the subjects, over the follow-up period. NSBHR incidence are equally distributed among the two apprenticeships ($P = 0.590$).

We observed a decrease of the lung function parameters related to NSBHR, during the follow-up. The variation index was reduced in 60.1%, 64.7% and 58.5% of subjects respectively for FVC, FEV1 and FEV1/FVC. It increased for FeNO, in 53.4% of subjects. The lowest FVC variation index was observed among the hairdressers apprentices (-0.45 versus -0.09 for the bakers and pastry makers) ($P = 0.002$).

Influence of Polymorphisms on variation of the parameters of airways obstruction

To investigate associations of the selected polymorphisms with our outcomes, we considered subjects homozygous for the common alleles as the reference group. The polymorphisms were in Hardy Weinberg Equilibrium. There was no significant difference of the distribution of polymorphisms and allele frequency according to the training tracks and to NSBHR (E-Table1 and E-table 2).

A significant association was observed between TH2-related polymorphisms (*IL13 R130Q*, *IL4RA S478P* and *IL4RA Q551R*) and the variation index of FEV1, after two years of occupational exposure in univariate analysis (Table 2) and in adjusted multivariate analysis (Table 3). The *RR* genotype of *IL13* rs20541 polymorphism predicted a significantly lower i.FVC (-0.36, $P = 0.019$) and a lower i.FEV1 (-0.34, $P = 0.008$) in all the apprentices, compared to *RQQQ* genotype. *RR* genotype predicted also a lower i.FVC (Fig.1A) and a lower i.FEV1 (Fig. 1B), compared to *RQ* and *QQ* genotypes in non atopic bakers and pastry

makers apprentices.

IL4RA S478P and *IL4RA Q551P* polymorphisms were predictors of lower i.FEV1 among all the apprentices (Table 2). The *SPPP* genotype predicted a lower i.FVC among hairdressers (Table 3). Among all the epistatic interactions tested, the combination of *IL13 RR* with either *IL4RA 478 SPPP* or *IL4RA 551 QRRR* predicted significantly a lower i.FVC and a lower iFEV1, independently of training track. The combination *IL13RR* with *IL4R 551 QRRR* was the most significant epistatic predictor of lower i.FVC and i.FEV1, in non atopic apprentices (Fig. 1C, D and Table 3).

Polymorphisms involved in non specific bronchial hyper-responsiveness (NSBHR) and FeNO

In all population, the genotype *TNFA GG* was more frequent in subjects with NSBHR (18.8 versus 10.9%, $P = 0.050$). When stratified by atopic status, the association remained significant only in non-atopic subjects (Table 4). Other polymorphisms did not show significant associations according to the training tracks. Variation of FeNO levels during follow-up was not associated with the study polymorphisms when all subjects were considered (S-Table 3). After stratification according to atopic status, two epistatic interactions, *TNFA GA & IL-5 CC* and *TNFA GA & IL-1A CC* were associated with decrease of FeNO in all non atopic apprentices, over the training period (Table 4). *TNFA GA IL-1A CC* was a predictor of reduction of FeNO in non-atopic bakers ($P < 0.001$). On the other hand, *TNFA GG & IL-1A CC* was associated with an increase of FeNO among hairdressers ($P = 0.035$).

Follow up of NSBHR

The cumulative incidence of NSBHR according to *TNFA GG* vs. *GAAA* genotype at 24 months was 19.6% and 6.4% respectively in atopic subjects (Fig. 2A), and 28.5% and 8.5% respectively in non atopic (Fig. 2B).

DISCUSSION

The decline of lung function depends on complex mechanisms that involved age, genetic predictors, smoking habits and environmental exposure [13]. Several longitudinal studies on apprentices exposed either to LMW [1] or HMW [14] agents, have contributed to a better understanding of the clinical determinants of occupational sensitization and inflammation in OA. However, to date none of these studies have considered the influence of gene polymorphisms on lung function and airway inflammation assessed by NSBHR and measurement of FeNO.

We focused our interest on *IL13* and *IL4 RA* because previous population studies had reported their association with atopy and asthma in children [15]. *IL4RA S478P* and *Q551R* were associated with a decline of FEV1 and FVC after two years of exposure (Table 2 and Table 3). The receptor of *IL4* triggers the effects of IL13 and IL4 in allergy-related inflammation by promoting Th2 cell differentiation and IgE synthesis [16]. In our study, both *IL4RA S478P*, *IL4RA Q551R* were correlated to the risk of a decline lung function and having a mutated allele seemed to faster it. The associations depended on the type of exposure [17], with an influence of *IL4RA S478P* on the consequences of the exposure to LMW agents and an influence of *IL4RA Q551R* on the consequences of HMW agents. The *Q551R* polymorphism is located in a region that encodes a STAT6 recruiting domain of *IL4RA*, making its functional influence possible in this pathway [18].

In our study, *IL13 R130Q* was significantly associated with i.FVC, i.FEV1 (Tables 3). Having the homozygous wild type fastered the decline of the lung function (Fig.1A,B), in exposure to HMW agents (Table 3). This polymorphism encodes an amino acid residue, which is located within the D helix, close to the C-terminal region of *IL13* [19]. Since *IL13* is a ligand of *IL4RA* subunit, it is thus possible that the D helix interacts with the *IL4RA* subunit and that the *R130Q* polymorphism influences such interaction. *IL13* is a cytokine secreted by many cell

types, including Th2 cells [20], and has effects related with OA, including airway hyper-responsiveness, goblet cell metaplasia and mucus hypersecretion, which all contribute to airway obstruction [20].

We previously found a gene-gene interaction of *IL13* and *IL4RA* polymorphisms on the risk of betalactam allergy [18]. Presently, the combination of *IL13* *RR* and *IL4RA* 551 *QRRR* genotypes was at risk against the fast decline of lung function regardless of the type of exposure (Fig.1C, D). The underlying molecular mechanisms of this association need to be clarified, since the computer modeling of *IL13/IL4Ra* interaction suggests that the arginine of the 130RR variant – but not the glutamic acid of the less frequent variant – repulses the histidine 131 of *IL4RA* [15]. The association remained significant in non atopic apprentices, after stratification. This suggests that the underlying mechanism is related to downstream signaling pathways of inflammation, rather than to IgE production. Similarly, these combinations were also significantly associated with Diisocyanate asthma in exposed worker [21]. These genes are associated with asthma susceptibility by regulating the differentiation of naive CD41 TH cells into a TH2-cell polarized effector phenotype [17].

Regarding phenotypes of asthma, we found that the *TNFA* -308G>A polymorphism was associated with NSBHR in non-atopic apprentices (Table 4 and Fig.2B). The *TNFA* -308G>A polymorphism is located in the promoter region of *TNFA* and has been associated with increased secretion and promoter activity of *TNFA* [22]. In the European Community Health Respiratory Survey, Castro-Giner et al. reported a mild association of *TNFA* -308G>A polymorphism with asthma and NSBHR [23].

Other study found no association between *TNFA*-308 G>A and asthma in atopic subjects [24]. The role of *TNFA* in airway inflammation of asthmatic subjects is supported by its increased expression [25]. Moreover, *TNFA* enhances NSBHR in normal subjects [26] and in asthmatic subjects [25]. The relation between *TNFA* and occupational asthma has been clearly

evidenced in animal models [27] of TDI-induced asthma. In contrast to these experimental based evidences, little is known about the influence of *TNFA* polymorphisms in OA, with one case-control study reporting no association between *TNFA* -308G>A polymorphism and TDI-induced asthma in 142 cases and 45 controls [28]. However, the atopic status was not considered in this study. Interestingly, we reported a significant association between the *TNFA* GG polymorphism and the incidence of NSBHR in a cohort of young apprentices that was more significant in non-atopic subjects. A similar result was found in a case-control study conducted in the general Chinese population [29]. Presently, our cohort allowed us to explore the incidence of NSBHR in apprentices since the very beginning of exposure to occupational allergens, a study design more accurate to evaluate the predictive value of this association than comparing asthmatic subjects to the general population.

IL-1 seems to play also significant role in OA, in regards to experimental models [30, 31]. Antibody neutralization of *IL-1A* prevented the production of IgG1 after TDI challenge in mice [31], while TDI-challenge in sensitized mice failed to increase *IL-4* expression in *IL1-1R* KO mice. In contrast, population based evidences are lacking. This association could be related to atopy, considering the significant association between one *IL1A* polymorphism and atopy in non-asthmatic patients [32]. We have previously shown that the incidence of NSBHR is associated with the occurrence of sensitization to flour evidenced by positive skin prick test [10]. We observed gene-gene interactions between *IL-1A* and *TNFA* polymorphisms, particularly in non-atopic subjects (Table 3 and Table 4). The influence of this gene –gene interaction on occurrence of NSBHR supported the hypothesis that the two cytokines act synergistically. These interactions need to be studied at the experimental level.

We observed also that some polymorphisms were associated with the variation, of FeNO levels among non atopic apprentices (Table 4). *TNFA* GA & *IL-5* CC and *TNFA* GA & *IL-1A* CC were two epistatic predictors of an exhaled nitrogen monoxide decrease during follow-up,

an association stronger among non atopic subjects exposed to HMW agents (flour dust). Non atopic hairdressers with the *TNFA GG & IL-1A CC* genotype showed also an increase of exhaled nitrogen monoxide during follow up ($P=0.035$). Increased FeNO is derived from stimulated inducible NO synthase by inflammatory cytokines such as TNF- α and Th1 cytokines [33].

Our study has some limitations. Firstly, the number of subjects agrees with the study power estimate, but its size was limited by the study design on an apprentice's cohort. This could explain that some ORs did not reach statistical significance, which precludes any definitive conclusions. Secondly, interpretation of our results was also limited by the impossibility to evaluate qualitatively and quantitatively the exposure and IgE-response against allergens [34]. The strength of our study was to evaluate the occurrence of NSBHR and airway inflammation in two young adult groups since the very beginning of exposure to occupational allergens. Our findings support the hypothesis of the existence of gene-environment and gene-gene interactions in occupational NSBHR, in agreement with the available knowledge on non-occupational settings.

CONCLUSION

This study evidenced the predicting influence of variants of *IL4RA*, *IL13*, *TNFA*, *IL1A* and *IL5* on NSBHR and airway inflammation since the very beginning of exposure to occupational irritant and allergens, in young adult apprentices. Most of the associations remained significant in absence of atopy, suggesting that inflammatory downstream signaling pathways of these genetic predictors are involved in the early step that precedes occupational asthma.

REFERENCES

1. Dragos M, Jones M, Malo JL, Ghezze H, Gautrin D. Specific antibodies to diisocyanate and work-related respiratory symptoms in apprentice car-painters. *Occup Environ Med* 2009; **66**: 227-234.
2. Gautrin D, Ghezze H, Infante-Rivard C, Malo JL. Incidence and host determinants of work-related rhinoconjunctivitis in apprentice pastry-makers. *Allergy* 2002;**57**:913-918..
3. Christiani DC, Mehta AJ, Yu CL. Genetic susceptibility to occupational exposures. *Occup Environ Med* 2008; **65**: 430-436; quiz 436, 397.
4. Hoffjan S, Nicolae D, Ober C. Association studies for asthma and atopic diseases: a comprehensive review of the literature. *Respiratory research* 2003; **4**:4-14
5. Liu X, Beaty TH, Deindl P, et al. Associations between specific serum IgE response and 6 variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: the German Multicenter Atopy Study. *J.All Clin Immunol* 2004; **113**: 489-495.
6. Mounier-Geyssant E, Barthelemy JF, Mouchot L, Paris C, Zmirou-Navier D. Exposure of bakery and pastry apprentices to airborne flour dust using pm2.5 and pm10 personal samplers. *BMC public health* 2007;**7**:311. doi:10.1186/1471-2458-7-311
7. Tossa P, Bohadana A, Demange V, et al. Early markers of airways inflammation and occupational asthma: rationale, study design and follow-up rates among bakery, pastry and hairdressing apprentices. *BMC public health* 2009; **9**: 113. doi: 10.1186/1471-2458-9-113
8. ATS/ERS: ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; **171**: 912-930.
9. Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R, Yernault JC. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung

Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J Suppl* 1993; **16**: 5-40.

10. Tossa P, Paris C, Zmirou-Navier D, et al. Increase in exhaled nitric oxide is associated with bronchial hyperresponsiveness among apprentices. *Am J Respir Crit Care Med* 2010 **182**; 738-744.

11. Bosco P, Gueant-Rodriguez RM, Anello G, Romano A, et al. Association of IL-1 RN*2 allele and methionine synthase 2756 AA genotype with dementia severity of sporadic Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; **75**: 1036-1038.

12. Gueant-Rodriguez RM, Gueant JL, Viola M, Tramoy D, Gaeta F, Romano A. Association of tumor necrosis factor-alpha -308G>A polymorphism with IgE-mediated allergy to betalactams in an Italian population. *The pharmacogenomics journal* 2008; **8**: 162-168.

13. Kohansal R, Martinez-Camblor P, Agusti A, Buist AS, Mannino DM, Soriano JB. The natural history of chronic airflow obstruction revisited: an analysis of the Framingham offspring cohort. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; **180**: 3-10.

14. Gautrin D, Infante-Rivard C, Ghezzo H, Malo JL. Incidence and host determinants of probable occupational asthma in apprentices exposed to laboratory animals. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; **163**: 899-904.

15. Heinzmann A, Mao XQ, Akaiwa M, Kreomer RT, et al. Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy. *Hum. Mol. Genet* 2000; **9**: 549-559.

16. Isidoro-Garcia M, Davila I, Laffond E, Moreno E, Lorente F, Gonzalez-Sarmiento R. Interleukin-4 (IL4) and Interleukin-4 receptor (IL4RA) polymorphisms in asthma: a case control study. *Clin Mol Allergy* 2005; **3**: 15.

17. Maestrelli P, Boschetto P, Fabbri LM, Mapp CE. Mechanisms of occupational asthma. *J All Clin Immunol* 2009; **123**: 531-542.

18. Gueant-Rodriguez RM, Romano A, Beri-Dexheimer M, Viola M, Gaeta F, Gueant JL. Gene-gene interactions of IL13 and IL4RA variants in immediate allergic reactions to betalactam antibiotics. *Pharmacogenetics and genomics* 2006; **16**: 713-719.
19. Zurawski SM, Vega F, Jr., Huyghe B, Zurawski G. Receptors for interleukin-13 and interleukin-4 are complex and share a novel component that functions in signal transduction. *EMBO J* 1993; **12**: 2663-2670.
20. Kips JC. Cytokines in asthma. *Eur Respir J Suppl* 2001; **34**: 24s-33s.
21. Bernstein DI, Wang N, Campo P, et al. Diisocyanate asthma and gene-environment interactions with IL4RA, CD-14, and IL-13 genes. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006; **97**:800-806.
22. Elahi MM, Asotra K, Matata BM, Mastana SS. Tumour Necrosis Factor Alpha-308 Gene Locus Promoter Polymorphism: An Analysis of Association with Health and Disease. *Biochimica et biophysica acta* 2009; **1792**:163-172.
23. Castro-Giner F, Kogevinas M, Machler M, et al. TNFA -308G>A in two international population-based cohorts and risk of asthma. *Eur Respir J* 2008; **32**: 350-361.
24. Louis R, Leyder E, Malaise M, Bartsch P, Louis E. Lack of association between adult asthma and the tumour necrosis factor alpha-308 polymorphism gene. *Eur Respir J* 2000; **16**: 604-608.
25. Commins SP, Borish L, Steinke JW. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 2010; **125**: 53-72.
26. Thomas PS, Yates DH, Barnes PJ. Tumor necrosis factor-alpha increases airway responsiveness and sputum neutrophilia in normal human subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;**152**: 76-80.
27. Matheson JM, Lemus R, Lange RW, Karol MH, Luster MI. Role of tumor necrosis factor in toluene diisocyanate asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* 2002; **27**: 396-405.

28. Beghe B, Padoan M, Moss CT, et al. Lack of association of HLA class I genes and TNF alpha-308 polymorphism in toluene diisocyanate-induced asthma. *Allergy* 2004; **59**: 61-64.
29. Shin HD, Park BL, Kim LH, et al. Association of tumor necrosis factor polymorphisms with asthma and serum total IgE. *Hum. Mol. Genet* 2004; **13**: 397-403.
30. Whelan R, Kim C, Chen M, Leiter J, Grunstein MM, Hakonarson H. Role and regulation of interleukin-1 molecules in pro-asthmatic sensitised airway smooth muscle. *Eur Respir J* 2004; **24**: 559-567.
31. Johnson VJ, Yucesoy B, Luster MI. Prevention of IL-1 signaling attenuates airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005; **116**: 851-858.
32. Karjalainen J, Hulkkonen J, Pessi T, et al. The IL1A genotype associates with atopy in nonasthmatic adults. *J Allergy Clin Immunol* 2002; **110**: 429-434.
33. Ricciardolo FL. Multiple roles of nitric oxide in the airways. *Thorax* 2003; **58**: 175-182.
34. Aalto-Korte K, Makinen-Kiljunen S. Specific immunoglobulin E in patients with immediate persulfate hypersensitivity. *Contact Dermatitis* 2003; **49**: 22-25.

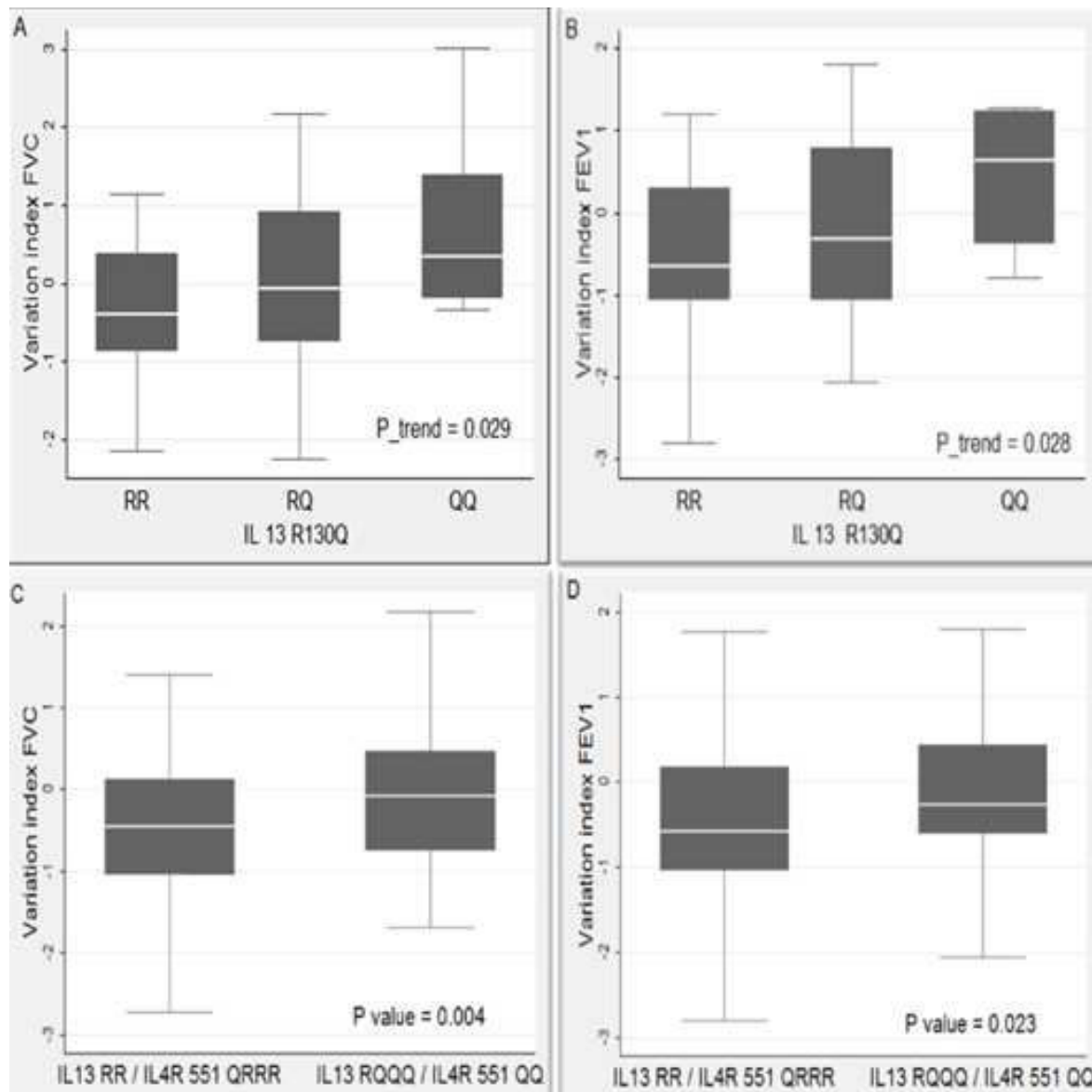


Figure 1: Variation of FVC (A) and of FEV1 (B) among non-atopic bakers and pastry maker apprentices according to *IL 13 R130Q* shows that *RR* genotype predicted a lower decrease of FVC (A) and FEV1, compared to *RQ* and *QQ* genotypes. The Association between the *IL13R 130Q* and *IL4RA Q551R* and the variation index of FVC (C) and FEV1 (D) among non-atopic apprentices shows that the combination *IL13 RR* with *IL4R 551 QRRR* was a significant predictor of a lower decrease of FVC and FEV1.

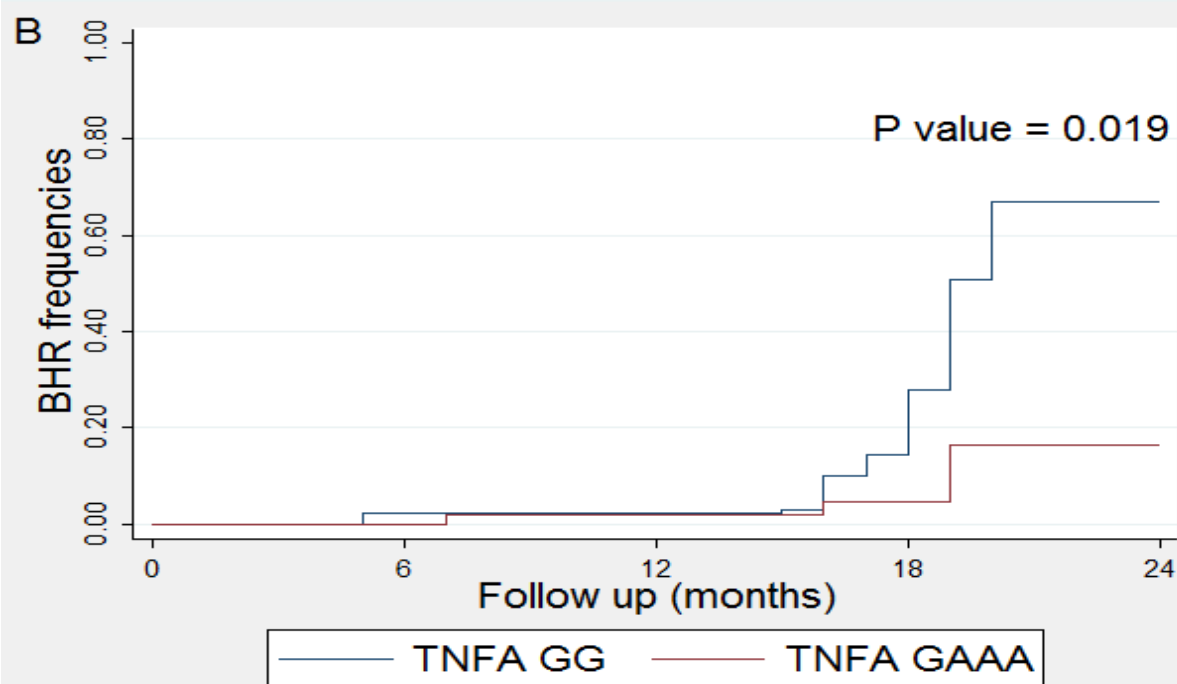
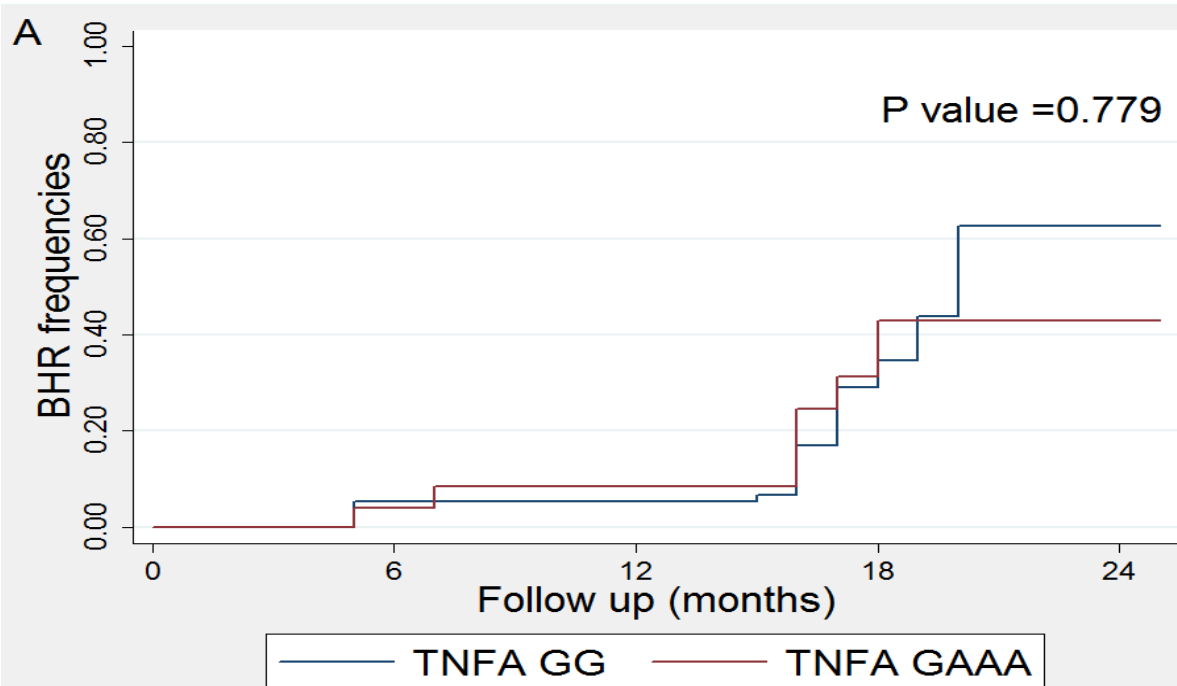


Table 1: Baseline clinical and spirometric characteristics of subjects

Clinical characteristics	All apprentices (N=441)	Hairdressers (N=169)	Bakers and Pastry makers (N=272)	†P value
	n (frequency, 95% C.I.) or mean ± standard deviation (sd)			
Age in years	16.9±0.07	16.9 (±0.11)	16.9 (±0.08)	0.788
Male sex	251 (0.57, 0.52-0.61)	12 (0.07, 0.03-0.11)	239(0.87, 0.84-0.92)	<0.001
Atopic status	141 (0.33, 0.28-0.38)	43 (0.27, 0.20-0.34)	98 (0.37, 0.30-0.43)	0.018
Current smokers	206 (0.47, 0.41-0.51)	67 (0.45; 0.36-0.52)	109 (0.48, 0.42-0.55)	0.352
FVC (% of predicted value)	91.26±0.54	91.67±0.83	91.01±0.73	0.007
*Variation index (i) of FVC	-0.24±0.06	-0.45±0.07	-0.09±0.09	0.002
FEV1 (% of predicted value)	92.37±0.50	92.97±0.69	92.00±0.69	0.352
**Variation index of FEV1	-0.36 ±0.05	-0.44±0.06	-0.30±0.07	0.183
FEV1/FVC (% of predicted value)	101.65±0.40	101.87±0.55	101.51±0.50	0.650
Variation index of FEV1/FVC	-3.56.10 ⁻⁵ ±7.06.10 ⁻⁶	-1.03.10 ⁻⁵ ±9.06.10 ⁻⁶	-5.25.10 ⁻⁵ ±9.96.10 ⁻⁶	0.003
Incidence of NSBHR	71(0.17, 0.14-0.21)	26(0.16, 0.10-0.21)	45 (0.18, 0.13-0.22)	0.590
***FeNO (% of predicted value)	18.36±0.9	15.07±1.19	20.24±1.26	0.007
*Variation index of FeNO	1.33.10 ⁻⁴ ±1.17.10 ⁻⁴	1.25.10 ⁻⁵ .±1.47.10 ⁻⁴	2.12.10 ⁻³ ±1.64.10 ⁻⁴	0.404

See text (materials and methods, statistical analysis section) for a description of the “i”

† Fisher exact test for categorical ANOVA for continuous variables; *Forced Vital Capacity (FVC), **Forced Expiratory Volume (FEV), ***Fractional Concentration Of Nitrogen Monoxide in Exhaled Breath (ppb) (FeNO)

Table 2: Association of gene variants and significant gene–gene combination of variants with the †variation of the parameters of airway inflammation along the study period (univariate analysis) in all apprentices (n=380)

GENE	Polymorphisms	Genotype (n)	†i. FVC mean ± SD		*P	†i.FEV1 mean ± SD		*P
			With genotype	Without genotype		With genotype	Without genotype	
<i>IL4RA S478P</i>	rs1805015	SS (333)	-0.24±1.13	0.53±1.16	.065	-0.34±0.94	-0.61±0.94	0.034
<i>IL4RA Q551R</i>	rs180275	QQ (338)	-0.24±1.15	-0.41±1.21	.219	-0.31±0.92	-0.56±0.99	0.029
<i>IL13 R130Q</i>	rs20541	RR (284)	-0.44±1.16	-0.09±1.09	.024	-0.52±0.89	-0.20±1.06	0.013
<i>TNFA -G308A</i>	rs1800629	GG (364)	-0.32±1.25	-0.24±0.97	.565	-0.42±1.02	-0.31±0.75	0.371
<i>IL1A -C889T</i>	rs1800587	CC (356)	-0.36±1.13	-0.29±1.24	.602	-0.45±1.01	-0.37±0.91	0.467
<i>IL5 C703T</i>	rs2069821	CC (371)	-0.37±1.09	-0.24±1.25	.316	-0.44±0.93	-0.35±0.99	0.438
<i>IL13 RQQQ /</i>	rs20541/	<i>RQQQ/SS</i>	0.04±1.07	-0.46±1.15	.006	-0.10±0.95	-0.53±0.93	0.003
<i>IL4RA 478 SS</i>	rs1805015							
<i>IL13 RQQQ /</i>	rs20541/	<i>RQQQ/QQ</i>	0.06±1.09	-0.44±1.14	.005	-0.10±0.95	-0.50±0.94	0.006
<i>IL4RA 551 QQ</i>	rs180275							
<i>TNFA GA/ IL5</i>	rs1800629/	<i>GA/TT</i>	-0.51±0.70	-0.29±1.23	.228	-0.38±0.60	0.39±1.01	0.965
<i>TT</i>	rs2069821							

†The variation index (i) of parameters of airway inflammation measures the variation of each parameter between the inclusion time and the last determination, using the formula “(last determination – determination at enrollment) vs. (follow-up duration)”; *One-way ANOVA

Table 3: Association between polymorphisms and the variation of lung function during the study period, according to the training track and the atopic status (multivariate analysis)

VARIABLES	†i.FVC		†i.FEV1		†i.FEV1/FVC	
	*B (**SE)	***P	*B (**SE)	***P	*B (**SE)	***P
	value		value		value	
ALL APPRENTICES						
IL4RA 478 SPPP vs. SS (n= 333)	-0.26 (0.15)	.095	-0.26 (0.13)	.041	-6.72.10 ⁻⁶ (1.85.10 ⁻⁵)	0.717
IL4R576 QRRR vs. QQ (n= 338)	-0.15 (0.14)	.208	-0.21 (0.11)	.060	-2.03.10 ⁻⁵ (1.68.10 ⁻⁵)	0.229
IL13 RR vs. RQQQ (n= 284)	-0.36 (0.15)	.019	-0.34 (0.13)	.008	-3.33.10 ⁻⁵ (1.45.10 ⁻⁴)	0.603
IL13 RR / IL4RA 478 SPPP	-0.51 (0.16)	.002	-0.44 (0.13)	.001	-6.41.10-6 (2.10.10 ⁻⁵)	0.754
IL13 RR / IL4RA 551 QRRR	-0.50 (0.17)	.004	-0.42 (0.14)	.004	1.14.10-6 (2.20.10 ⁻⁵)	0.949
HAIRDRESSERS						
IL4RA 478 SPPP vs. SS (n= 131)	-0.40 (0.18)	.026	-0.30 (0.15)	.049	9.14.10-6 (2.112.10 ⁻⁵)	0.666
BAKERS AND PASTRY MAKERS						
IL4R576 QRRR vs. QQ (n= 203)	-0.15 (0.21)	.471	-0.32 (0.17)	.055	-1.94.658.10-5 (2.51.10 ⁻⁵)	0.066
ALL NON ATOPIC APPRENTICES						
IL13 RR vs RQQQ (n=189)	-0.35 (0.17)	.038	-0.28 (0.15)	.059	-2.27.10 ⁻⁶ (2.21.10 ⁻⁵)	0.918
IL13 RR / IL4RA 478 SPPP	-0.52 (0.18)	.004	-0.40 (0.16)	.011	3.33.10-6 (2.39.10 ⁻⁵)	0.890
IL13 RR / IL4RA 551 QRRR	-0.54 (0.19)	.005	-0.38 (0.17)	.025	1.58.10-5 (2.54.10 ⁻⁵)	0.535

†The variation index (i) of parameters of airway inflammation measures the variation of each parameter between the inclusion time and the last determination, using the formula “(last determination – determination at enrollment) vs. (follow-up duration)”; *B: coef of multiple linear regression (adjustment on smoking status, training track and atopic status); **SE (standard error); ***P indicates the significance of the contribution of the genotype to the model. (See supplement(S-table 3) for univariate analysis)

Table 4: Association between genetic polymorphisms and/or gene-gene interactions with the incidence of NSBHR and the variation of FeNO along the study period (multivariate analysis)

VARIABLES	NSBHR	iFeNO		
	†OR (95% C.I.)	**P	*B (SE)	**P
		value		value
ALL NON ATOPIC (n=281)				
<i>TNFA G308A GG (n=239)</i>	3.74 (1.10-12.82)	.036	3.99.10 ⁻⁴ (5.14.10 ⁻⁴)	0.273
<i>TNF GG / IL1A CC</i>	2.25 (1.01-5.01)	.047	3.02.10 ⁻⁴ (3.55.10 ⁻⁴)	0.397
<i>TNFA GA / IL5 CC</i>	2.49 (0.14-43.45)	.531	-2.61.10 ⁻³ (1.09.10 ⁻³)	0.017
<i>TNFA GA / IL1A CC</i>	0.46 (0.10-2.07)	.315	-1.42.10 ⁻³ (4.89.10 ⁻³)	0.004
NON ATOPIC BAKERS/PASTRY MAKERS (n= 162)				
<i>TNFA GG / IL5 TT</i>	3.76(1.11-12.74)	.055	1.69.10 ⁻⁴ (5.73.10 ⁻⁴)	0.769
<i>TNFA GA / IL5 CC</i>	na		-0.02 (2.54.10 ⁻³)	<0.001
<i>TNFA GA / IL1A CC</i>	0.48 (0.06-4.21)	.509	-1.95.10 ⁻³ (8.44.10 ⁻⁴)	0.022
NON ATOPIC HAIRDRESSERS (n= 119)				
<i>TNFA GG / IL1A TT</i>	5.75 (1.03-32.08)	.046	-7.10.10 ⁻⁴ (6.39.10 ⁻⁴)	0.269
<i>TNFA GG / IL1A CC</i>	2.40 (0.78-7.33)	.125	6.61.10 ⁻⁴ (3.09.10 ⁻⁴)	0.035

†ORs : adjusted Odds Ratios using logistic regression models; *B: coef of multiple linear regression (adjustment on smoking status, training track and atopic status); SE (standard error); **P indicates the significance of the contribution of the genotype to the model.

Abbreviations list:

OA, Occupational asthma; BHR, Bronchial hyper-responsiveness; NSBHR, Non specific Bronchial hyper-responsiveness; LMW, Low molecular weight; HMW, High molecular weight; FeNO, Fraction exhaled nitric oxide; PPB, Parts per billion; FVC, Forced vital capacity; FEV1, Forced expiratory volume in one second; i, variation index along the follow-up period; Vmax , Maximal expiratory flows at various lung volumes; MCT, Methacholine challenge test; NDRS , Normal Dose Reponse Slope; NL , Nasal lavage; IL, Inteleukine; TNF, Tumor necrosis factor; OR, Odds ratio; S, supplementary.

E-SUPPLEMENTARY MATERIAL**E-SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS****Skin prick tests (SPTs).**

Atopy assessed at entry and the end of the study was defined by positive skin reaction to common aeroallergens including dust mites (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae*), animal danders (cat, dog), pollens (mixtures of the following pollens: grass, weed, fagaceae, *betulaceae*, cereals) and moulds (*Alternaria tenius*, *Aspergillus fumigatus*). All extracts were commercialized by Allerbio-ALK laboratory (Varennnes en Argonnes, France). Prick tests were done on the forearm. The diameter of the wheal was measured at 20 minutes, then compared to those of negative (saline) and positive (histamine) controls. It was considered as positive when the diameter was equal or more than those of the negative control and if the patient had normal skin reactivity to histamine. The diameter of the wheal was considered as

positive when it was >3 mms than those of negative control (saline) in patients with a normal skin reactivity to histamine.

Fraction exhaled nitric oxide (FeNO)

Measurements were taken by a trained technician using a chemiluminescence analyzer (NIOX[®] 2.0 system; Aerocrine AB, Solna, Sweden). Three correctly performed exhalations were recorded during each session. Any exhalation not meeting ATS/ERS requirements was rejected by the NIOX system. In particular, subjects with a recent respiratory infection were excluded from the FENO tests.

Airways responsiveness to methacholine

Non specific airways responsiveness was evaluated using the methacholine challenge test (MCT) using three cumulative successive doses (0.5, 3.0, and 8.0 µmol) and “BHR incidence”, defined according of the occurrence or aggravation of a positive MTC as follows [1, 5]: 1. Occurrence of a positive response to the methacholine test challenge (MCT+) at any visit in patients with a negative MCT at inclusion (MCT-). 2. Aggravation of the PC20 (provocative concentration of inhaled methacholine required to reduce FEV_t by 20%), at least for one lower dose in subjects with MCT+ at the first visit. 3. Aggravation of the coefficient of the NDRS (Normal Dose Reponse Slope) with a decrease by 0.100 or more at any visit compared to the NDRS measured at the first visit, in subjects with at least a decrease of 15% of FEV1 whatever the visit, (the 0.100 cut-off point corresponding to the mean decrease in all MCT+ subjects with a significant PC20).

Nasal Lavage technique and DNA extraction from collected nasal cells.

The nasal lavage (NL) was adapted from the Hilding procedure and performed with the subject in a sitting position [1]. DNA was extracted from 200 ml of NL using the QuiAmp mini kit (Quiagen, Courtaboeuf, France). The genotypes of the four polymorphisms were determined by real-time polymerase chain reaction (PCR) (Roche Molecular Biochemicals,

Lyon, France). The anchor (Flu) and detection probes (LC) were labeled at the 3' ends with fluorescein and at the 5' ends with LC-Red-640. They covered the mutation sites and were modified at the 3' ends by phosphorylation to avoid extension (Tib MolBiol Syntheselabor GmbH, Berlin, Germany). The pair of probes hybridized template DNA with a 1-bp gap between them. PCR was carried out in a 10-ml mixture in the Light-Cycler glass capillaries. The PCR primers, Flu, and LC primers were respectively:

5'AGCATGTCCGAGACAC3', 5'CTTCCCGCCTACCCAA3',
 5'CCTGTCTCTCTGCAAATAATGTGCTTTCGT3', and 5'GTTTCAGTTGACCGTC
 CCT3' for IL13 gene (rs20541); 5'GAGCCAAGTCCTCCTG3',
 5'CTCGGGTTCTACTTCCT3', 5'AGCTTCAGCAACCCCCT3', and
 5'GCCAGTCACCGTGTCCCAG3' for the rs1805015 variant of the *IL4RA* gene; and
 5'AGCTCTCTGAGCCAAC3', 5'CTTGTAACCAGCCTCTCC3', 5'ACCCTGCTCC
 ACCGCAT3', and 5'ACAAACTCCCGATAGCCACTG3' for the rs180275 variant of the
IL4RA gene; 5'TGTGACCCTTGTCAGAAAGAG3',
 5'TGAGGTCTCAAGATGATGTXTCAG3' and
 5'GAACAGAATACATACAGATCCAGGAGT3' for the rs2069807 variant of *IL5*;
 5'CCTGCATCCTGTCTGGAAGTTA 3', 5'CTGCACCTTCTGTCTCGGTTT 3' and
 5'AACCCCGTCCCCATGCCCC3',
 5'CAAAACCTATTGCCTCCATTCTTTTGGGGAC3' for the rs1800629 variant of *TNFA*
 gene; 5'TGTTCTACCACCTGAACTAGGC3', 5'TGGCTAAGTTTGGGAATGGAGAT3'
 and 5'GGAAGGCATGGATTTTACATATGAGCC3',
 5'TTATTATCATTAGTCCGTTGTAGTAACT3' for the rs1800587 variant of *IL1A*. The
 details of determinations are described previously [2, 3].

E-SUPPLEMENTARY TABLES

E-Table 1: Distribution of “Th2” genetics polymorphisms and allele frequencies among subjects with bronchial hyperresponsiveness (BHR) in the study population according to the training track

	Bakers/Pastry		Hairdressers		*P	All apprentices		*P
	with BHR		with BHR		value	with BHR		value
	N	% [CI]	N	% [CI]		N	% [CI]	
IL4RA S478P (rs1805015)								
<i>SS</i>	156	78.0 [72.1-83.8]	97	74.4 [67.0-81.9]	.754	38	74.5 [59.7-83.2]	.792
<i>SP</i>	31	15.5 [10.4-20.5]	24	18.0 [11.5-24.6]		10	19.6 [10.8-32.0]	
<i>PP</i>	13	06.5 [03.1-10.0]	10	07.5 [03.0-12.0]		3	05.9 [02.1-15.7]	
<i>Allele S</i>	343	85.8 [82.0-89.0]	222	83.3 [78.5-87.4]	.419	86	84.3 [76.0-90.1]	.873
<i>Allele P</i>	57	14.2 [11.2-18.0]	44	16.5 [12.6-21.5]		16	15.7 [09.9-24.0]	
IL4RA Q551R (rs180275)								
<i>QQ</i>	133	65.5 [58.9-72.1]	86	63.7 [55.5-71.9]	.611	36	66.67 [53.3-77.8]	.647
<i>QR</i>	57	28.1 [21.8-34.3]	43	31.9 [23.9-39.8]		14	25.93 [16.1-39.0]	
<i>RR</i>	13	06.4 [03.0-09.8]	6	04.4 [00.9-07.9]		4	07.41 [03.0-17.6]	
<i>Allele Q</i>	266	91.1 [75.4-83.2]	172	93.5 [74.4-84.0]	.350	72	90.00 [81.5-94.8]	.466
<i>Allele R</i>	26	08.9 [16.8-24.6]	12	06.5 [16.0-25.6]		8	10.00 [05.2-18.5]	
IL13 R130Q (rs20541)								
<i>RR</i>	110	65.5 [58.2-72.7]	84	72.4 [64.2-80.6]	.466	31	68.89 [54.3-80.5]	.924
<i>RQ</i>	47	28.0 [21.1-34.8]	26	22.4 [14.8-30.1]		11	24.44 [14.3-38.8]	
<i>QQ</i>	11	06.5 [2.8-10.31]	6	05.2 [11.1-09.2]		3	06.67 [02.4-17.9]	
<i>Allele R</i>	267	79.5 [74.8-83.4]	194	83.6 [78.3-87.8]	.213	73	81.11 [71.8-87.8]	.989
<i>Allele Q</i>	69	20.5 [16.6-25.2]	38	16.4 [12.2-21.7]		17	18.89 [12.8-28.2]	
IL5 C703T (rs2069821)								
<i>CC</i>	102	46.4 [39.7-53.0]	73	48.7 [40.6-56.7]	.694	28	44.4 [32.8-56.7]	.480
<i>CT</i>	97	44.1 [37.5-50.7]	60	40.0 [32.1-47.9]		26	41.3 [29.9-53.6]	
<i>TT</i>	22	09.5 [05.6-13.4]	17	11.3 [06.2-16.4]		9	14.3 [05.5-23.0]	
<i>Allele C</i>	301	68.9 [64.4-73.0]	206	68.9 [63.4-73.9]	.996	82	65.6 [56.9-73.4]	.376
<i>Allele T</i>	136	31.1 [27.0-35.6]	93	31.1 [26.1-36.6]		43	34.4 [26.7-43.1]	

* Fisher exact test for categorical variables, with Bonferroni correction for mutiple testing

E-Table 2: Distribution of “Th1” genetics polymorphisms and allele frequencies among subjects with bronchial hyperresponsiveness (BHR) in the study population according to the training track

	Bakers/Pastry		Hairdressers		* <i>P</i>	All Apprentices		* <i>P</i>
	with BHR		with BHR		value	with BHR		value
	N	% [CI]	N	% [CI]		N	% [CI]	
<i>TNFA G308A (rs1800629)</i>								
<i>GG</i>	159	74.0 [68.0-80.0]	113	75.8 [69.0-82.8]	.740	51	83.6 [72.3-90.8]	.239
<i>GA</i>	47	21.9 [16.3-27.4]	32	21.5 [14.8-28.1]		9	14.6 [8.02-25.78]	
<i>AA</i>	9	04.2 [01.5-06.9]	4	02.6 [0.7-05.2]		1	01.6 [0.4-08.7]	
<i>Allele G</i>	365	84.9 [81.2-88.0]	258	86.6 [82.0-89.0]	.522	111	91.0 [84.7-94.9]	.061
<i>Allele A</i>	65	15.1 [12.0-18.8]	40	09.3 [06.9-12.4]		11	09.0 [05.1-15.4]	
<i>IL1A C889T (rs1800587)</i>								
<i>CC</i>	97	45.1 [38.4-51.8]	71	50.4 [42.0-56.7]	.321	30	51.7 [39.1-64.1]	.349
<i>CT</i>	95	44.2 [37.5-50.9]	61	43.2 [35.0-51.5]		21	36.2 [25.0-49.1]	
<i>TT</i>	23	10.7 [06.5-14.9]	9	06.4 [02.3-10.4]		7	12.1 [06.0-22.3]	
<i>Allele C</i>	289	67.2 [62.5-71.3]	203	71.7 [66.5-76.9]	.177	81	69.8 [60.9-77.4]	.853
<i>Allele T</i>	141	32.8 [28.5-37.4]	79	28.0 [23.1-33.5]		35	30.2 [22.6-39.1]	

* Fisher exact test for categorical variables, with Bonferroni correction for mutiple testing.

E-Table 3: Association of gene variants and significant gene–gene combination of variants with the variation* of the *FEV1/FV* ratio and of *FeNO* along the study period (univariate analysis).

Gene	Polymorphisms	Genotype	i.FEV1/FVC		**P	i.FeNO		**P
	(n)		mean ± SD		value	mean ± SD		value
			With	Without		With	Without	
			genotype	genotype		genotype	genotype	
IL4RA S478P	rs1805015	SS	-3.16.10 ⁻⁵ ±	-3.47.10 ⁻⁵ ±	.868	1.99.10 ⁻⁴ ±	-1.27.10-4 ±	.302
	(n=333)		1.35.10 ⁻⁴	1.49.10 ⁻⁴		1.61. 10 ⁻⁴	1.97. 10-3	
IL4RA Q551R	rs180275	QQ	-2.65.10 ⁻⁵ ±	-4.75.10 ⁻⁵ ±	.217	1.05.10 ⁻⁴ ±	1.25.10-4 ±	.942
	(n=338)		1.31.10 ⁻⁴	1.60.10 ⁻⁴		1.66.10 ⁻⁴	2.39.10-3	
IL13 R130Q	rs20541 (n=284)	RR	-3.33.10 ⁻⁵ ±	-2.52.10 ⁻⁴ ±	.672	4.96.10 ⁻⁵ ±	2.16.10-4 ±	.611
			1.45.10 ⁻⁴	1.34.10 ⁻⁴		1.58.10 ⁻⁴	3.11.10-3	
TNFA G308A	rs1800629	GG	-3.33.10 ⁻⁵ ±	-2.77.10 ⁻⁵ ±	.754	1.61.10 ⁻⁴ ±	1.23.10-4 ±	.318
	(n=364)		1.45.10 ⁻⁴	1.24.10 ⁻⁴		1.23.10 ⁻⁴	3.17.10-3	
IL1A C889T	rs1800587	CC	-3.11.10 ⁻⁵ ±	-3.02.10 ⁻⁵ ±	.957	-5.61.10 ⁻⁶ ±	2.73.10-4±	.275
	(n=356)		1.24.10 ⁻⁴	1.54.10 ⁻⁴		2.06.10 ⁻⁴	2.08.10-3	
IL5 C703T	rs2069821	CC	-2.52.10 ⁻⁵ ±	-3.86.10 ⁻⁵ ±	.381	1.60.10 ⁻⁴ ±	2.42.10-5 ±	.586
	(n=371)		1.32.10 ⁻⁴	1.45.10 ⁻⁴		1.86.10 ⁻⁴	2.26.10-3	
IL13 RQQQ /	rs20541/	RQQQ/SS	-2.94.10 ⁻⁵ ±	3.24.10 ⁻⁵ ±	.927	2.96.10 ⁻⁴ ±	2.28.10 ⁻⁵ ±	.582
IL4RA 478 SS	rs1805015		1.24.10 ⁻⁴	1.48. 10 ⁻⁴		3.32. 10 ⁻³	2.11. 10 ⁻³	
IL13 RQQQ /	rs20541/	RQQQ/QQ	-3.42.10 ⁻⁵ ±	-2.99.10 ⁻⁵ ±	.770	-3.77.10 ⁻⁵ ±	1.41.10 ⁻⁴ ±	.9753
IL4RA 551 QQ	rs180275		1.29.10 ⁻⁴	1.45.10 ⁻⁴		2.91. 10 ⁻³	2.35. 10 ⁻³	
TNFA GA/	rs1800629/	GA/TT	1.67.10 ⁻⁵ ±	-3.52.10 ⁻⁵ ±	.044	-4.39.10 ⁻⁵ ±	8.41.10 ⁻⁵ ±	.760
IL5 TT	rs2069821		8.78.10 ⁻⁵	1.44.10 ⁻⁴		3.15. 10 ⁻³	2.19. 10 ⁻³	

*The evolution index of parameters of airway inflammation measures the variation of each parameter between the inclusion visit and the last determination, using the formula “(last determination – determination at enrollment) vs. (follow-up duration)”;** One-way ANOVA

E-SUPPLEMENTARY REFERENCES

1. Hilding AC. Simple method for collecting near-normal human nasal secretion. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1972; **81**:422-423.
2. Gueant-Rodriguez RM, Gueant JL, Viola M, Tramoy D, Gaeta F, Romano A. Association of tumor necrosis factor-alpha -308g>a polymorphism with ige-mediated allergy to betalactams in an italian population. *The pharmacogenomics journal* 2008; **8**:162-168.
3. Bosco P, Gueant-Rodriguez RM, Anello G, Romano A, Namour B, Spada RS, Caraci F, Tringali G, Ferri R, Gueant JL. Association of il-1 rn*2 allele and methionine synthase 2756 aa genotype with dementia severity of sporadic alzheimer's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2004; **75**:1036-1038.

B. ARTICLE 2:

*Nutrition, exposition professionnel, et incidence d'asthme
chez des jeunes travailleurs boulangers pâtissiers et
coiffeurs.*

Cette section a fait l'objet d'un article intitulé « **Diet, occupational exposure and early asthma incidence among bakers, pastry makers and hairdressers** » publié dans la revue BMC Public Health, 2012, 12:387 doi:10.1186/1471-2458-12-387.

Nutrition, exposition professionnel, et incidence d'asthme chez des jeunes travailleurs boulangers pâtisseries et coiffeurs

Thomas Rémen* ^{1,2}, Dovi-Stéphanie Acouetey[§] ^{1,2} Christophe Paris ^{1,2}, Denis Zmirou-Navier ^{1,2,3}.

Cette étude cas témoins inscrite dans l'étude ABCD qui avait pour objectif d'identifier des déterminants personnels (dont génétiques) et environnementaux associés à la survenue de l'AP en fonction de la filière d'activité. La population de l'étude cas-temoin est issue de la cohorte ABCD. Seuls les sujets des filières de la boulangerie-pâtisserie et de la coiffure furent retenus pour l'analyse.

Elle a permis de prendre en considération le régime alimentaire, renseigné par le questionnaire de fréquence Suvimax 2, une facette jusqu'ici peu explorée, et aussi l'exposition, au travers de scores construits à partir d'un ensemble de variables caractérisant l'environnement au travail, l'intensité de l'activité et l'organisation du travail, susceptibles d'influencer l'exposition (Thèse de Thomas Remen « Exploration des facteurs de risque de l'asthme professionnel débutant en boulangerie et coiffure ». Université Henri Poincaré, 13-07-2011).

Les apports en vitamines, principalement les vitamines A, C, E D, et les omégas 3 et 6 ont été étudiés, et les résultats montrent une différence en fonction de la filière.

Chez les boulangers-pâtisseries, seul l'atopie est un facteur indépendant de l'AP (OR=10.07 95%CI [2.76 – 36.65]). Chez les coiffeuses plusieurs variables sont associées au risque de survenue de l'AP : l'indice de masse corporel (OR=1.24 [1.03 – 1.48]), le score de l'intensité d'exposition (OR=1.79 [1.05 – 3.05]).

Certains facteurs nutritionnels vitaminiques sont significativement liés à un risque d'AP : la vitamine A plus élevée chez les cas coiffeuses (OR brut p=0.002, OR ajusté sur l'IMC et

l'atopie, $p=0.0$); la même observation est faite pour la vitamine D (OR brut $p=0.004$; OR ajusté $p=0.01$).

Diet, occupational exposure and early asthma incidence among bakers, pastry makers and hairdressers

Thomas Rémen* ^{1,2}, Dovi-Stéphanie Acouetey^{§ 1,2} Christophe Paris ^{1,2}, Denis Zmirou-Navier ^{1,2,3}.

* corresponding author

[§] equally contributed first author

¹ Inserm U954 (Institut National de la santé et de la Recherche Médicale), School of Medicine, Nancy, France

² Lorraine University Medical School, Nancy, France

³ EHESP School of Public Health, Sorbonne-Paris Cité, Rennes, France

Email addresses:

TR: thomas.remen@inserm.fr

DSA: dovi-stephanie.acouetey@inserm.fr

CP: christophe.paris@inserm.fr

DZN: denis.zmirou@inserm.fr

Corresponding author:

Thomas REMEN

Postal address: INSERM U954 – Faculté de Médecine – Bâtiment E – 2^{ème} étage – 9 avenue de la forêt de Haye – 54505 VANDOEUVRE-LES-NANCY – France

Telephone: + 33 (0)3.83.68.39.12 – Fax: + 33 (0)3.83.68.39.19

Abstract:

Background. The natural history of occupational asthma (OA) is influenced by many determinants. This study aims to assess the combined roles of personal characteristics,

including occupational exposure and nutritional habits, on the incidence of OA during the first years at work.

Methods. A nested case-control study was conducted within a retrospective cohort of young workers in the bakery, pastry-making and hairdressing sectors. Cases were subjects diagnosed as 'confirmed' or 'probable' OA consecutively to a medical visit (N=31). Controls were subjects without OA (N=196). Atopy was defined after blood specific IgE analysis, based on the PhadiatopTM test. Occupational exposure was characterized by standardized questionnaires and diet patterns by a food frequency questionnaire.

Results. Among bakers and pastry-makers, only atopy is an independent risk factor of OA (OR=10.07 95%CI [2.76 – 36.65]). Among hairdressers, several variables are associated with OA. Body mass index (unit OR=1.24 [1.03 – 1.48]) and the score of exposure intensity (unit OR=1.79 [1.05 – 3.05]) are independent predictors of OA, but the role of atopy is weak (OR=4.94 [0.66 – 36.75]). Intake of vitamin A is higher among hairdressers cases (crude p=0.002, adjusted p=0.01 after control for body mass index and atopy); the same observation is made for vitamin D (crude p=0.004, adjusted p=0.01).

Conclusion. This study suggests that the influence of several factors on the incidence of OA, including dietary vitamins, might vary across exposure settings.

Key words: occupational asthma, epidemiology, atopy, vitamins

Background

Occupational asthma (OA) is a disease characterized by variable airflow limitation and/or airway hyperresponsiveness due to causes and conditions attributable to a particular work environment rather than to stimuli encountered outside the workplace [1]. Two types of OA can be distinguished: (i) immunologic OA appears after a latency period of exposure necessary for acquiring immunologic sensitization to the causal agent(s); and (ii) non immunologic OA occurs after acute exposure to high concentrations of irritants ('irritant-induced asthma') [2].

A general framework for the natural history of immunological OA encompasses several stages after onset of exposure, including development of sensitization and inception of OA that can be followed by removal from exposure and remission or persistence of OA [3]. This allergic march is influenced by multiple determinants. While occupational exposure plays the key role, with the interplay between the nature of agents encountered at the workplace (in particular the contrast between high- vs. low molecular weight agents) and intensity or exposure duration before and after occurrence of symptoms, other factors related to personal or more general characters also contribute to the onset of the disease, among which are genetic predispositions and possibly nutritional factors [3].

A large increase in the prevalence of asthma was observed during the last decades in most developed countries [4]. According to Allan *and coll.*, it would be the consequence of changing environmental and/or lifestyle factors rather than genetic influences [5]. Changes in diet have been put forward as responsible for part of this increase. However, interactions between these factors remain unclear. Numerous hypotheses have been discussed concerning the role of nutrition in asthma occurrence without definitive evidence. The role of antioxidants (vitamins A, C, E) or of vitamin D is still questioned, with contradictory hypotheses being reported [5-6]. Considering poly-unsaturated fatty acids (PUFA), a

suggested mechanism relates increased dietary n-6:n-3 PUFA ratio to the augmentation of allergic disease and of asthma [4]. These hypotheses still need to be documented. Most of the epidemiologic studies involving nutritional factors have been implemented in the general population. Very few explored nutrition-environment interactions in OA [7] which can be viewed as a model of “experimental” asthma [8].

In the framework of a retrospective follow-up of young bakers, pastry-makers and hairdressers, i.e. in occupational sectors with a known high risk of OA, a nested case-control study was undertaken to assess the combined influence of personal characteristics (including nutritional habits) and occupational exposure on the incidence of OA during the first years at work.

Material and methods

Design and Study population

The study protocol has been published previously [9]. Briefly, the ABCD (French acronym for early asthma in bakery and hairdressing sectors) study aimed to assess early incidence of OA among young workers according to their sector of activity and exposure duration, and to identify risk factors of OA. It was based on a retrospective follow-up design, with a nested case-control facet. The population based study comprises groups of exposed (bakers, pastry-makers and hairdressers) and non exposed subjects (sales and food sectors: butcher, pork butcher, caterer, cook job...), used as a reference group, who graduated between 2001 and 2006 (2001 for the non exposed group) from nine vocational schools in Lorraine, North-Eastern France. The cohort consisted of all who had completed a phone medical questionnaire about respiratory, ENT and skin conditions since engaging in their training and occupation, and their connection with work [10].

Within this subset of the cohort, all subjects who declared work-related respiratory symptoms or isolated work-related rhinitis symptoms that had appeared after inception of

exposure, and a matched sample of all others (frequency matching criteria: year of graduation, vocational school and occupational sector) were invited to participate in a medical visit to complete clinical and lung function investigations and to collect blood samples for IgE assays (total IgE and specific IgE for work-related and common allergens).

Selection of cases and controls

For the nested case-control study, we included only bakers, pastry-makers and hairdressers who had the medical visit.

Diagnosis of OA encompassed two aspects: (i) diagnosis of asthma, and (ii) evidence of a temporal relationship between the occurrence of symptoms and occupation. Each subject who performed the medical visit was classified according to a decisional tree for the definition of OA [10] into one of four categories: (i) *confirmed OA*; (ii) *probable OA*; (iii) *possible OA*; and (iv) *absence of OA*. Briefly, this classification was established after data collected during the medical visit on the basis of the following criteria: (i) the clinical definition of asthma proposed by the International Primary Care Respiratory Group [11]; (ii) recording of peak-flow expiratory curves for three weeks; (iii) a spirometry with bronchodilator testing (short acting β -2 agonist); and finally (iv) work-related specific IgE assays when available.

Cases were subjects diagnosed as '*confirmed or probable*' OA. Controls were subjects not diagnosed as OA (neither confirmed, probable, nor possible) and nor labelled with 'unknown' OA status (when PEF monitoring was not exploitable and reversibility tests were either not feasible or not usable)

Data collection

During the medical examination, height and weight were recorded with the same device - electronic balance and electronic height gauge - for all subjects (to avoid measurement bias). Two investigators realized the vast majority of medical visits (TR and DSA), with the

assistance of three medical interns for some visits. Data on past and present tobacco smoking, history of work-related respiratory, rhinitis, eczema and urticaria symptoms were collected using the EGEA questionnaire [12]. The time sequence of symptoms with work was assessed using items derived from other dedicated questionnaires [13, 14]. Atopic family history (first degree) was considered if at least one of the following pathologies was reported: asthma, hay fever, eczema, urticaria, or in case of a family history of treatment for allergy or desensitisation.

From blood sampling, specific IgE analysis was used to categorize subjects as atopic or not, based on the PhadiatopTM test (Phadia, Sweden). This test screens an IgE-dependant allergy with a median sensitivity of 96% (ranging from 70% to 100% across studies) and a median specificity of 95% (77% to 100%) according to a meta-analysis on a general adult population [15]. The PhadiatopTM test includes mite, pollen, mould, and animal dander allergens, but the exact allergen composition is not issued by the company [15].

The phone screening questionnaire and the medical visit took place from March 2009 to July 2010. Analyses were performed from November 2010 to August 2011. The research program was authorized by the Nancy University Hospital ethics committee and written consents were obtained from the young workers themselves.

Exposure assessment

Exposure scores and duration were obtained from the occupational exposure questionnaires [16-17]. A score of *exposure intensity* depends on the average number of tasks declared to be realized each day. For bakers, the daily tasks were bread-making (kneading-machine loading, transfer by shovel, dough division, dough shaping, bread put in the oven), pastry-making (pastry preparation) and cleaning activities, and were scored (0, 1 or 2) using tertiles [see supplementary files for more precision]. The sum of these 7 notes (from 0 to 2) defined the score of exposure intensity, a score of 0 reflecting a low exposure, a score of 14 a very high

exposure. Calculation of exposure duration entailed reconstruction of the occupational history of each subject since inception of apprenticeship (duration of apprenticeship, diplomas obtained, hiring date, cumulative length of unemployment, date of sector dropout and date of administration of the phone questionnaire). This exposure duration corresponds to the cumulative periods of exposure since engaging in apprenticeship (excluding classroom periods during apprenticeship or periods of inactivity) until the date of the telephone interview. Hence, by construction, one year exposure duration encompasses more than one calendar year.

For hairdressers, a corresponding intensity score was based on the following four activities: perm, hair dyes, hair bleached and rinsing, with a note of 0, 1 or 2 according to tertiles of the average number of hairdressing tasks reported per day. The sum of these 4 scores (from 0 to 2) defined the score of exposure intensity among hairdressers, a score of 0 reflecting a low exposure, a score of 8 a very high exposure [see supplementary files for more precision].

Nutritional intake

A food frequency questionnaire (Suvimax 2) [18] was used to evaluate dietary imbalance of nutritional factors during the 12 months prior to the medical visit. Briefly, this semi-quantitative food frequency questionnaire (FFQ) was developed for self-administered assessment of usual dietary intake over the past year among French adults at an individual level. The food list contained 240 food and beverage items categorized into 22 categories. Validity and reproducibility of this questionnaire has been described elsewhere [18]. The frequency of consumption referred to usual consumption over the past year on an increasing scale including yearly, monthly, weekly or daily units, as suitable. The FFQ was self-administered and completed at home. Questionnaires were recovered and verified during the medical visit in order to complete eventual missing information and correct ambiguities.

French recipes, validated by food and nutrition professionals, were used to estimate amounts of simple items consumed among mixed foods. Frequencies were converted into numbers of servings per day and multiplied by the standard portion size or by the portion size declared using photographs. An ad hoc composition table was developed to calculate weighted mean nutrient values. The weights were derived from the gender-specific mean frequency of each item that was declared [18].

Statistical analysis

The data were analysed using SAS® 9.2 software. Proportions are expressed as percentages and quantitative data as means with standard deviations (SD). Quantitative data were tested for linearity. For non linear variables, they were divided into categories using quartiles. Comparisons used chi-square or Fisher exact tests, Student or Kruskal-Wallis tests, as appropriate. Logistic regression was used to calculate odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals, while adjusting for confounders or exploring effect modification. The significance level to remain in the model was fixed to 0.20, not to overlook confounding and weak associations.

Personal characteristics such as gender, age, BMI and smoking habits were compared between cases and controls. Medical characteristics such as atopy, respiratory, ENT and skin symptoms were also compared between these two groups. The role of nutritional intakes was explored in a second step. Crude ORs and, when appropriate, ORs adjusted for potential confounders such as atopy and body mass index are presented. Work-related symptoms were not retained for the multivariate model because of their strong association with the OA status.

Because of differences in the mechanisms involved in the onset of OA between the two occupational sectors, determinants of OA can vary according to the sector. Hence, the analysis was conducted separately according to sector, after a global assessment.

Results

Demographics

31 cases met the inclusion criteria. Respiratory symptoms had begun between less than 1 year to 7.4 years prior to the medical visits. Among the 202 control subjects meeting the inclusion criteria, 6 were excluded because of airway responsiveness whose association with occupational nature could not be investigated (absence of specific IgE assays), bringing the total number to 196 controls. Demographic and other relevant characteristics of the 227 subjects (mean age: 25.2 years, 40.5% hairdressers) retained in the analysis are summarised in table 1.

Differences were observed between cases and controls concerning occupational sector and gender (more hairdressers and therefore more women among controls, respectively $p=0.03$ and $p=0.02$) and sector dropout (higher among cases [$p=0.002$]). Among hairdressers retained for the case-control study, 96.7% are women while, among bakers and pastry-makers, 90.4% are men. Because gender and occupational sectors are so strongly associated, no adjustment for sex will be done in sector specific analyses.

Atopy, exposure and symptoms

Crude associations are summarised in table 2, separately for bakers and pastry-makers on the one hand, and hairdressers on the other hand. Atopy is significantly more frequent among cases than among controls in the bakery and pastry-making sectors; the same pattern is seen in hairdressers, but fails to reach significance. Exposure intensity is higher among hairdressing cases.

After multivariate analysis, only atopy remains an independent risk factor of OA among bakers and pastry-makers (OR=10.07 95%CI [2.76 – 36.65]). Among hairdressers, atopy is weakly associated with OA (OR=4.94 [0.66 – 36.75]), while BMI (unit OR=1.24 [1.03 –

1.48]) and the score of exposure intensity (unit OR=1.79 [1.05 – 3.05]) are independent predictors of OA.

OA and nutrient intakes

Associations between OA and nutrients intake are presented in table 3. Overall, the associations of OA with vitamins D and E are borderline significant ($p=0.06$ for the two vitamins: $3.8 \mu\text{g}$ [SD=3.0] among cases, vs $2.9 \mu\text{g}$ [2.1] among controls for vitamin D; respectively 21.1 mg [16.7] and 16.3 mg [11.0] for vitamin E), but vanishes after adjustment for body mass index and personal atopy. Adding exposure intensity in the model does not change the effect measures of nutrients intake (data not shown).

Among bakers and pastry-makers alone, no nutrient intake is associated with OA, whether prior to or after adjustment. On the other hand, among hairdressers, intake of vitamin A is higher among OA cases before adjustment ($p=0.002$; 1.9 mg [1.2] among cases, vs $0.7 \mu\text{g}$ [0.6] among controls) and after ($p=0.01$). The same association is found with vitamin D, whether before ($p=0.004$; $5.5 \mu\text{g}$ [2.5] among cases, vs $2.5 \mu\text{g}$ [1.7] among controls) or after adjustment ($p=0.01$).

Discussion

Our results show that among hairdressers, intensity of exposure, measured by the daily number of specific tasks, and body mass index are risk factors of OA. Also, vitamin A and D intakes are greater among cases than among controls in this group. On the other hand, nutritional patterns showed no association with OA among bakers and pastry-makers. While the well known role of atopy on the occurrence of OA is confirmed in this sector, it is also suggested among hairdressers.

In our study, "work intensity" is positively associated with OA incidence among hairdressers and reflects the number and variety of techniques (discoloration, colouring, perms) performed in a typical day. Akpınar-Elci and coworkers also found a higher risk of OA in high work intensity hairdressers [19], in accord with another study that showed an increased risk of OA, though not significant, among hairdressers often performing hair bleaching treatments or using hair spray, compared with more infrequent users [20]. We found no such association among bakers and pastry-makers. For Brisman *et al.*, the risk of asthma or rhinitis is less dependent on the cumulative dose of inhaled flour dust than on current exposure [21]; also, a longitudinal study showed significant associations between dust concentrations at onset of disease and the risk of asthma and rhinitis [22]. Discrepancies in the job dropout process due to OA symptoms could in part explain these differences in the time sequence between exposure and disease incidence across occupational sectors, since bakers have more opportunities for job reclassification than hairdressers, in particular by switching to pastry-making, an activity where exposure levels are lower [23], or to industrial bread processing rather than in the small, solo-bakeries that composed the vast majority of our study settings.

BMI was positively associated with OA among our study hairdressers (unit OR=1.24 [1.03 – 1.48]). While data on OA are scarce, many studies explored the possible link between BMI

and non occupational asthma or airway inflammation [24-31], showing a positive association where weight gain occurs before the onset of asthma and respiratory symptoms. This relationship between BMI and asthma could depend on gender, with a greater risk among women [32, 33]. This might explain why we found an association between BMI and asthma in hairdressers, a predominantly female population, and not among bakers/pastry-makers, a predominantly male population.

Atopy is a well known risk factor of work-related sensitization, especially for high molecular weight agents. The odds ratio among bakers/pastry-makers is high (10.07 [2.76 - 36.65]). Among hairdressers, the association is more uncertain, possibly due to small numbers (OR=4.94 [0.66 - 36.75], but the role of atopy is still controversial in the literature [34].

In occupational settings, nutritional factors could significantly modify host responses to environmental toxicants. According to Romieu and coll., “an adequate diet may inhibit, arrest, or even reverse the chain of events in toxicity, while a deficient diet could increase persons’ susceptibility to adverse environmental exposures, such as occupational allergens” [35].

To the best of our knowledge, this is the first study that explored the association between nutrient intakes, vitamins in particular, and OA. There are controversies about the relation between diet antioxidant intake and asthma [5]. Some authors assert that the increase of asthma is a consequence of a decline in antioxidant intake associated with the transition from a traditional to the modern diet [36]. An experimental study conducted by Gu found that supplementation with antioxidant vitamins in toluene diisocyanate-treated animals, mimicking an occupational exposure, ameliorated the respiratory eosinophilia [7]. In contrast, our results are consistent with the hypothesis that the increase in asthma and allergic diseases is favoured by an enhanced antioxidant intake associated with the greater availability of functional and antioxidant-enriched foods that might switch the balance of Th1 and Th2 towards a Th2 response [37].

Our findings suggest that the role of nutritional factors might depend on the exposure context. While exposure to flour dust and atopy, but not diet, are the key predictors of OA among bakers and pastry makers, nutritional factors are associated with OA among hairdressers, subjects who encounter several pro-oxidant chemicals agents in the work place. In a normal lung, there is a balance between the toxicity of oxidants (generated through normal cellular function or exposure to an oxygen-rich environment) and the protective activities of several intracellular and extracellular antioxidant defense systems [38]. Oxidative stress occurs when there is an imbalance between the antioxidant defense system of the body and oxidant insults, such as cigarette smoke, air pollution and infections [35]. Chemicals agents may cause disequilibrium in this balance, through an increase in oxidant stress and a compromise of antioxidant resources, and this might result in pathophysiologic events in the lung that culminate in cellular death and pulmonary dysfunction [35].

Concerning vitamin D, results are also contradictory in the literature: a first hypothesis proposed that the increase in allergy and asthma is a consequence of widespread vitamin D insufficiency [39]. A second one, more in line with our results, links this increase to a widespread early life vitamin D supplementation for rickets prophylaxis in developed countries [39]; now, high dose *in vitro* vitamin D supplementation was shown to promote Th2 differentiation [40]. Another study also showed that vitamin D is associated with a dose-dependent reduction in transcription of Th1 cytokines, and increased expression of the Th2 cytokines [41]. Studies on molecular epigenetic mechanisms of dietary vitamin D in lung cellular function (senescence, apoptosis, autophagia, proliferation, phagocytosis) are still ongoing. Such data might shed light on how dietary vitamin D supplementation might interact with environmental agents and give place to chronic lung diseases like asthma [42]. Prospective studies of supplementation therapy or sub-optimal nutrient intake are needed to confirm these hypotheses.

Strengths and weaknesses of the study

The main limitation is the small number of cases which affects the statistical power of our study, possibly explaining the unstable (non significant) association between atopy and OA among hairdressers where absence of biomarkers of sensitization (specific IgE) precluded a clear assessment of asthma-like symptoms in relation to work. As in all case-control studies with other than incident cases, one should be cautious about the measures of associations since the information is collected some time after declaration of the disease. Although nested in a cohort, cases had started their symptoms with varying anteriority, due to the retrospective nature of the cohort. Thus, assessment of some risk factors might be affected by potential changes in behaviours or practices following onset of the disease (e.g. regarding the smoking status, the occupational tasks that are performed or dietary habits).

Strengths of this study lie in its design, with cases and controls coming from the same retrospective cohort study, in the accurate exposure duration history and in the diagnostic criteria we used for OA ascertainment. An interesting aspect of our study stems from the comparison of bakers/pastry-makers and hairdressers since the physical and chemical nature of the agents involved in the job processes and possibly the underlying mechanisms of asthma development differ substantially. Moreover, for the first time, nutritional factors were assessed as potential risk factors for OA. Food Frequencies Questionnaires are considered to be reproducible and to provide a useful scale for categorizing individuals according to their intake of energy and nutrients over one year [18; 43]. Although respiratory symptoms had begun up to 7 years prior to the medical visits, food habits are not likely to have changed so that the data provided by the questionnaires is a good proxy for nutrient intake at the time OA subjects became cases.

Conclusion

This study suggests that the role of several factors that influence the incidence of occupational asthma, including dietary vitamins, might vary across exposure settings. Asthmatic cases declared higher intakes of vitamins A and D than controls, among hairdressers. The risk of OA also increases with intensity of exposure and with the body mass index in this predominantly female group. Among bakers and pastry makers, no other risk factor than the atopic status emerged.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

TR and DSA carried out the epidemiologic study. They participated in the medical visits and performed the statistical analysis. CP and DZN designed the study and participated to the interpretation of results. All co-authors wrote and approved the final manuscript.

Acknowledgements:

This projects received funds from AFSSET (contract EST-08-03), the national PHRC-Hospital clinical research programme (2008), the Lorraine Region, the Grand Nancy Urban Community and the Meurthe et Moselle Département.

The authors thank Jean-Louis Guéant and Rosa-Maria Guéant (biochemical analyses at Inserm-U954 unit and Nancy University Hospital), and Serge Hercberg and Pilar Galan (coordinators of the Suvimax 2 project, UMR U557 Inserm/ U1125 Inra/ Cnam/ University Paris13) for their important contributions.

Dovi-Stéphanie Acouetey and Thomas Remen were recipients of doctoral grants from the Lorraine Region.

REFERENCES

- [1] Bernstein IL, Bernstein DI, Chan-Yeung M, Malo J-L. Definition and classification of asthma in the workplace. In: Bernstein L, Chan-Yeung M, Malo J-L, Bernstein DI, editors. *Asthma in the workplace*. 3rd ed. New York: Taylor & Francis Group; 2006. p. 1-8.
- [2] Mapp CE, Boschetto P, Maestrelli P, Fabbri LM. Occupational asthma: state of art. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:280-305.
- [3] Malo JL, Ghezzo H, D'Aquino C, L'Archevêque J, Cartier A, Chan-Yeung M. Natural history of occupational asthma: relevance of type of agent and other factors in the rate of development of symptoms in affected subjects. *J Allergy Clin Immunol*. 1992 Dec;90(6 Pt 1):937-44.
- [4] Black PN, Sharpe S. Dietary fat and asthma: is there a connection? *Eur Respir J*. 1997 Jan;10(1):6-12.
- [5] Allan K, Devereux G. Diet and asthma: nutrition implications from prevention to treatment. *J Am Diet Assoc*. 2011 Feb;111(2):258-68.
- [6] Nurmatov U, Devereux G, Sheikh A. Nutrients and foods for the primary prevention of asthma and allergy: systematic review and meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Mar;127(3):724-33.e1-30. Epub 2010 Dec 24.
- [7] Gu H, Itoh M, Matsuyama N, Hayashi S, Iimura A, Nakamura Y, Miki T, Takeuchi Y. Toluene diisocyanate exposure induces laryngo-tracheal eosinophilia, which can be ameliorated by supplementation with antioxidant vitamins in guinea pigs. *Acta Otolaryngol*. 2003 Oct;123(8):965-71.
- [8] Gautrin D, Newman-Taylor AJ, Nordman H, Malo JL. Controversies in epidemiology of occupational asthma. *Eur Respir J*. 2003 Sep;22(3):551-9.

- [9] Rémen T, Coevoet V, Acouetey DS, Guéant JL, Guéant-Rodriguez RM, Paris C, Zmirou-Navier D. Early incidence of occupational asthma among young bakers, pastry-makers and hairdressers: design of a retrospective cohort study. *BMC Public Health*. 2010 Apr 26;10:206.
- [10] Rémen T, Acouetey DS, Paris C, Hannhart B, Poussel M, Chenuel B, Barbaud A, Zmirou-Navier D. Early incidence of occupational asthma in the bakery, pastry and hairdressing sectors. *Submitted*
- [11] Levy ML, Fletcher M, Price DB, Hausen T, Halbert RJ, Yawn BP. International Primary Care Respiratory Group (IPCRG) Guidelines: diagnosis of respiratory diseases in primary care. *Prim Care Respir J*. 2006 Feb;15(1):20-34.
- [12] Kauffmann F, Annesi-Maesano I, Liard R, Paty E, Faraldo B, Neukirch F, et al. [Construction and validation of a respiratory epidemiological questionnaire]. *Rev Mal Respir*. 2002 Jun;19(3):323-33.
- [13] Delclos GL, Arif AA, Aday L, Carson A, Lai D, Lusk C, et al. Validation of an asthma questionnaire for use in healthcare workers. *Occup Environ Med*. 2006 Mar;63(3):173-9.
- [14] Vandenplas O, Ghezzi H, Munoz X, Moscato G, Perfetti L, Lemiére C, et al. What are the questionnaire items most useful in identifying subjects with occupational asthma? *Eur Respir J*. 2005 Dec;26(6):1056-63.
- [15] Vidal C, Gude F, Boquete O, Fernandez-Merino MC, Mejjide LM, Rey J, et al. Evaluation of the phadiatop test in the diagnosis of allergic sensitization in a general adult population. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2005;15(2):124-30.

- [16] Mounier-Geyssant E, Barthelemy JF, Mouchot L, Paris C, Zmirou-Navier D. Exposure of bakery and pastry apprentices to airborne flour dust using PM2.5 and PM10 personal samplers. *BMC Public Health*. 2007;7:311.
- [17] Mounier-Geyssant E, Oury V, Mouchot L, Paris C, Zmirou-Navier D. Exposure of hairdressing apprentices to airborne hazardous substances. *Environ Health*. 2006;5:23.
- [18] Kesse-Guyot E, Castetbon K, Touvier M, Hercberg S, Galan P. Relative validity and reproducibility of a food frequency questionnaire designed for French adults. *Ann Nutr Metab*. 2010;57(3-4):153-62. Epub 2010 Nov 16.
- [19] Akpinar-Elci M, Cimrin AH, Elci OC. Prevalence and risk factors of occupational asthma among hairdressers in Turkey. *J Occup Environ Med* 2002; 44:585–590.
- [20] Albin M, Rylander L, Mikoczy Z, Lillienberg L, Dahlman Hoglund A, Brisman J, et al. Incidence of asthma in female Swedish hairdressers. *Occupational and environmental medicine*. 2002 Feb;59(2):119-23.
- [21] Brisman J, Jarvholm B, Lillienberg L. Exposure-response relations for self reported asthma and rhinitis in bakers. *Occupational and environmental medicine*. 2000 May;57(5):335-40.
- [22] Cullinan P, Cook A, Nieuwenhuijsen MJ, et al. Allergen and dust exposure as determinants of work-related symptoms and sensitization in a cohort of flour-exposed workers; a case-control analysis. *Ann Occup Hyg* 2001;45:97–103.
- [23] Mounier-Geyssant E, Barthélemy JF, Mouchot L, Paris C, Zmirou-Navier D. Exposure of bakery and pastry apprentices to airborne flour dust using PM2.5 and PM10 personal samplers. *BMC Public Health*. 2007 Nov 1;7:311.

- [24] Camargo CA, Jr., Weiss ST, Zhang S, Willett WC, Speizer FE. Prospective study of body mass index, weight change, and risk of adult-onset asthma in women. *Archives of internal medicine*. 1999 Nov 22;159(21):2582-8.
- [25] Castro-Rodriguez JA, Holberg CJ, Morgan WJ, Wright AL, Martinez FD. Increased incidence of asthmalike symptoms in girls who become overweight or obese during the school years. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001 May;163(6):1344-9.
- [26] Chinn S, Jarvis D, Burney P. Relation of bronchial responsiveness to body mass index in the ECRHS. *European Community Respiratory Health Survey*. *Thorax*. 2002 Dec;57(12):1028-33.
- [27] Gilliland FD, Berhane K, Islam T, McConnell R, Gauderman WJ, Gilliland SS, et al. Obesity and the risk of newly diagnosed asthma in school-age children. *American journal of epidemiology*. 2003 Sep 1;158(5):406-15.
- [28] Gold DR, Damokosh AI, Dockery DW, Berkey CS. Body-mass index as a predictor of incident asthma in a prospective cohort of children. *Pediatric pulmonology*. 2003 Dec;36(6):514-21.
- [29] Guerra S, Wright AL, Morgan WJ, Sherrill DL, Holberg CJ, Martinez FD. Persistence of asthma symptoms during adolescence: role of obesity and age at the onset of puberty. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004 Jul 1;170(1):78-85.
- [30] Oddy WH, Sherriff JL, de Klerk NH, Kendall GE, Sly PD, Beilin LJ, et al. The relation of breastfeeding and body mass index to asthma and atopy in children: a prospective cohort study to age 6 years. *American journal of public health*. 2004 Sep;94(9):1531-7.

- [31] Romieu I, Avenel V, Leynaert B, Kauffmann F, Clavel-Chapelon F. Body mass index, change in body silhouette, and risk of asthma in the E3N cohort study. *American journal of epidemiology*. 2003 Jul 15;158(2):165-74.
- [32] Schaub B, von Mutius E. Obesity and asthma, what are the links? *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2005 Apr;5(2):185-93.
- [33] McLachlan CR, Poulton R, Car G, Cowan J, Filsell S, Greene JM, Taylor DR, Welch D, Williamson A, Sears MR, Hancox RJ. Adiposity, asthma, and airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Mar;119 (3):634-9.
- [34] Moscato G, Galdi E. Asthma and hairdressers. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2006 Apr;6(2):91-5.
- [35] Romieu I, Trenga C. Diet and obstructive lung diseases. *Epidemiol Rev*. 2001;23(2):268-87.
- [36] Seaton A, Godden DJ, Brown K. Increase in asthma: A more toxic environment or a more susceptible population? *Thorax*. 1994;49:171-174.
- [37] Murr C, Schroecksnadel K, Winkler C, Ledochowski M, Fuchs D. Antioxidants may increase the probability of developing allergic diseases and asthma. *Med Hypotheses*. 2005;64(5):973-7.
- [38] Romieu I. Nutrition and lung health. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2005 Apr;9(4):362-74.
- [39] Litonjua AA, Weiss ST. Is vitamin D deficiency to blame for the asthma epidemic? *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120:1031-1035.
- [40] Lemire JM, Archer DC, Beck L, Spiegelberg HL. Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxy vitamin D3: preferential inhibition of Th1 functions. *J Nutr*. 1995;125(suppl):1704S-1708S.

- [41] Jirapongsananuruk O, Melamed I, Leung DY. Additive immunosuppressive effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and corticosteroids on TH1, but not TH2, responses. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106:981- 985.
- [42] Lehouck A., Mathieu C., Bouillon R., Verhaegen J., Van Eldere J., Decallonne B., Carremans C., Baeke F., Decramer M., Janssens W. (2011). High doses of vitamin D for the treatment of COPD exacerbations: an intervention trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 183, A5372.
- [43] Molag ML, de Vries JH, Ocké MC, Dagnelie PC, van den Brandt PA, Jansen MC, van Staveren WA, van't Veer P. Design characteristics of food frequency questionnaires in relation to their validity. *Am J Epidemiol*. 2007 Dec 15;166(12):1468-78. Epub 2007 Sep 18.

Tables

Table 1: Descriptive characteristics of cases and controls

Characteristic		Cases (N=31)	Controls (N=196)	Total (N=227)	p	Test used ^Ω
Women	%	8 (25.8%)	94 (48.0%)	102 (44.9%)	0.02	Chi2
Age (years)	Mean [SD]	26.1 [2.5]	25.1 [3.0]	25.2 [2.9]	0.06	T
Height (cm)	Mean [SD]	173.4 [8.0]	170.1 [9.2]	170.5 [9.1]	0.06	T
Weight (kg)	Mean [SD]	77.5 [15.5]	70.2 [14.1]	71.2 [14.5]	0.009	T
Tobacco smoking (at visit):						
Never smokers	%	10 (32.2%)	76 (38.8%)	86 (37.9%)	0.38	Chi2
Ex smokers	%	7 (22.6%)	26 (13.3%)	33 (14.5%)		
Current smokers	%	14 (45.2%)	94 (48.0%)	108 (47.6%)		
Occupation:						
Hairdressers	%	7 (22.6%)	85 (43.4%)	92 (40.5%)	0.03	Chi2
Exposure duration (years)	Mean [SD]	6.1 [3.1]	6.7 [2.2]	6.6 [2.4]	0.25	KW
Sector dropout [†]	%	10 (32.3%)	22 (11.2%)	32 (14.1%)	0.004	F

Ω Chi2 = chi-square test – T = Student test – KW = Kruskal-Wallis test – Fisher = fisher test

† From the sector in which the subjects graduated

Table 2: Distribution of symptoms and of putative risk factors among cases and controls according to the occupational sector

		All			Bakers and pastry-makers			Hairdressers			
Variable		Cases (N=31)	Controls (N=196)	p	Cases (N=24)	Controls (N=111)	p	Cases (N=7)	Controls (N=85)	p	Test used ^Ω
Body mass index (kg/m ²)	Mean [SD]	25.9 [5.9]	24.2 [3.9]	0.13	25.6 [5.8]	25.1 [4.1]	0.94	27.2 [6.3]	23.1 [3.4]	0.07	KW
Work-related rhinitis symptoms	%	28 (90.3%)	77 (39.3%)	<0.001	22 (91.7%)	45 (40.5%)	<0.001	6 (85.7%)	32 (37.7%)	0.02	Chi2
Work-related eczema symptoms	%	11 (35.5%)	23 (11.7%)	0.002	7 (29.2%)	7 (6.4%)	<0.001	4 (57.1%)	16 (18.8%)	0.04	Chi2
Work-related urticaria symptoms	%	7 (22.6%)	12 (6.1%)	0.007	6 (25.0%)	4 (3.6%)	0.002	1 (14.3%)	8 (9.4%)	0.53	Fisher
Personal atopy	%	26 (83.9%)	78 (39.8%)	<0.001	21 (87.5%)	44 (39.6%)	<0.001	5 (71.4%)	34 (40.0%)	0.13	Chi2
Family atopy	%	12 (38.7%)	82 (41.8%)	0.74	8 (33.3%)	37 (33.3%)	1.00	4 (57.1%)	45 (52.9%)	1.00	Chi2
Exposure duration (year)											
0 - 4.7 (Q1)	%	14 (45.1%)	42 (21.4%)	0.02	11 (45.8%)	29 (26.1%)	0.11	3 (42.9%)	13 (15.3%)	0.40	Chi2
4.8 - 6.6 (Q2)	%	3 (9.7%)	55 (28.1%)		2 (8.3%)	33 (29.7%)		1 (14.3%)	22 (25.9%)		
6.7 - 8.2 (Q3)	%	7 (22.6%)	49 (25.0%)		6 (25.0%)	25 (22.5%)		1 (14.3%)	24 (28.2%)		
8.3 - 13.8 (Q4)	%	7 (22.6%)	50 (25.5%)		5 (20.8%)	24 (21.6%)		2 (28.6%)	26 (30.6%)		
Score of exposure intensity											
Among bakers/pastry makers§	Mean [SD]	-	-	-	5.0 [3.1]	5.5 [3.5]	0.59	-	-	-	KW
Among hairdressers†	Mean [SD]	-	-	-	-	-	-	6.9 [1.3]	4.5 [2.4]	0.01	KW

Ω KW = Kruskal-Wallis test – Chi2 = chi-square test – Fisher = fisher test

§ Score max = 14 † Score max = 8

Table 3: Associations between OA and nutrients intake, by occupational sector

Nutrient Intake	Unit	All		Bakers and pastry makers		Hairdressers	
		Crude odds ratio*	Adjusted [†] odds ratio*	Crude odds ratio*	Adjusted [†] odds ratio*	Crude odds ratio*	Adjusted [†] odds ratio*
Energy intake	Mcal	1.33 [1.07 - 1.65]	1.28 [1.01 - 1.60]	1.12 [0.86 - 1.44]	1.07 [0.81 - 1.41]	2.16 [1.15 - 4.07]	1.94 [1.00 - 3.72]
n-6:n-3 PUFA ^λ	g	1.02 [0.91 - 1.13]	1.01 [0.91 - 1.13]	1.11 [0.96 - 1.28]	1.08 [0.92 - 1.25]	0.77 [0.56 - 1.06]	0.74 [0.50 - 1.10]
Vitamin A	mg	1.16 [0.89 - 1.52]	1.22 [0.90 - 1.65]	0.93 [0.61 - 1.41]	0.90 [0.50 - 1.60]	4.08 [1.64 - 10.14]	3.47 [1.30 - 9.22]
Vitamin C	dg	1.04 [0.81 - 1.33]	1.00 [0.76 - 1.33]	1.04 [0.78 - 1.39]	1.00 [0.69 - 1.43]	1.05 [0.63 - 1.73]	1.08 [0.63 - 1.85]
Vitamin D	μg	1.15 [0.99 - 1.35]	1.13 [0.95 - 1.34]	1.01 [0.83 - 1.23]	1.01 [0.82 - 1.23]	1.75 [1.20 - 2.56]	1.71 [1.12 - 2.59]
Vitamin E	cg	1.30 [0.98 - 1.71]	1.23 [0.90 - 1.67]	1.20 [0.86 - 1.68]	1.09 [0.76 - 1.57]	1.49 [0.89 - 2.50]	1.64 [0.91 - 2.94]

* OR per unit increase of each variable

[†] For personal atopy and body mass index

^λ Ratio polyunsaturated fatty acids of omega 6 (n-6 PUFA)/ polyunsaturated fatty acids of omega 3 (n-3 PUFA)

C. RESULTATS 3: ASTHME PROFESSIONNEL ET METABOLISME DES FOLATES.

(Etude cas témoins, vitamine B9, B12, homocysteine)

Cette partie représente des résultats descriptifs en rapport avec les donneurs de méthyles sus cités, l'Homocystéine et le risque de survenue d'un AP. Ces résultats ont fait l'objet d'une présentation au congrès JIB 2010 [241]

I. POPULATION d'étude

La population de l'étude cas-témoin est issue de la cohorte ABCD. Seuls les sujets exerçant dans des métiers « exposés » (boulangerie, coiffure, pâtisserie) furent retenus pour l'analyse. Les sujets sont les mêmes que ceux présentés dans l'article précédent.

La démarche diagnostique (annexe 14) et les résultats de l'étude ABCD furent l'objet d'un article soumis. (Remen *et al*, Annexe 13)

En quelques mots les critères définissant nos cas et témoins sont les suivants :

- Cas : être diplômé dans les secteurs de la boulangerie-pâtisserie et coiffure ; avoir réalisé la visite médicale ; avoir été identifié comme AP probable.
- Témoins : être diplômé dans les secteurs de la boulangerie-pâtisserie et coiffure ; avoir réalisé la visite médicale ; ne pas avoir été identifié comme AP ; ne pas avoir un statut indéterminé vis-à-vis de l'AP.

Les caractéristiques des 227 individus retenus pour l'étude cas-témoin sont présentées dans le tableau ci après :

Table 4 : Caractéristiques descriptives des cas et des témoins

Caractéristiques		Cas (N=31)	Témoins (N=196)	Total (N=227)	p	Test ^Ω
Femmes	%	8 (25,8%)	94 (48,0%)	102 (44,9%)	0,02	Chi2
Age (an)	Moyenne [ET]	26,1 [2,5]	25,1 [3,0]	25,2 [2,9]	0,06	T
Atopie	%	26 (83,9%)	78 (39,8%)	104	<0,001	Chi2
Statut tabagique (lors de la visite):						
Non fumeurs	%	10 (32,2%)	76 (38,8%)	86 (37,9%)		
Ex fumeurs	%	7 (22,6%)	26 (13,3%)	33 (14,5%)	0,38	Chi2
Fumeurs actifs	%	14 (45,2%)	94 (48,0%)	108 (47,6%)		
Secteur†:						
Coiffure	%	7 (22,6%)	85 (43,4%)	92 (40,5%)	0,03	Chi2
Boulangerie-pâtisserie	%	24 (77,4%)	110 (56,6%)	134 (59,5%)	0,03	Chi2

Ω Chi2 = test du χ^2 – T = test de Student – Fisher = test de Fisher

† du secteur dans lequel le sujet a été diplômé

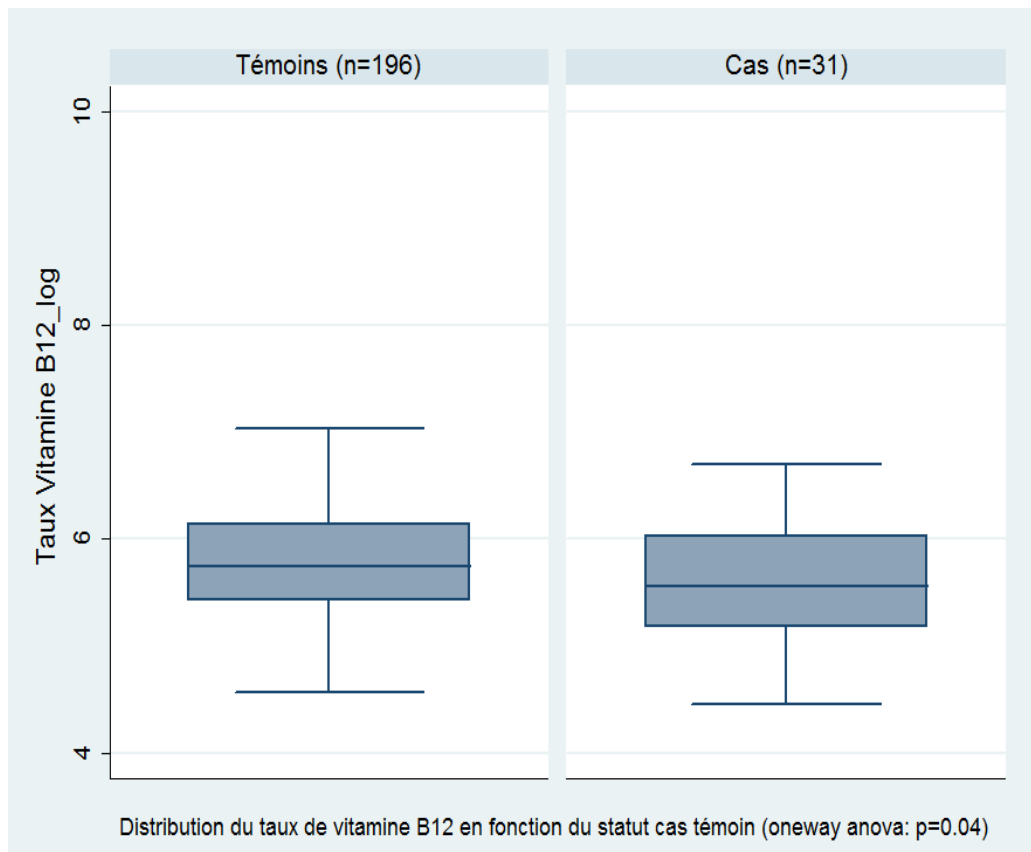
II. DOSAGE DES VITAMINES B, DE L'HOMOCYSTEINE ET DU STATUT CAS / TEMOINS

Table 5 : Caractéristiques des vitamines B et de l'homocystéine selon le statut cas ou témoin indépendamment de la filière

Variables métaboliques (Log transformées)		APPRENTIS					
		Cas (N=31)	Témoins (N=196)	Total (N=227)	p ¹ brute	OR [IC]	p ² ajusté
Vitamine B9	Moy	1,89	2,00	1,99		0,89	
	[ET]	[1,07]	[1,01]	[1,02]	0,62	[0,56-1,43]	0,64
Vitamine B12	Moy	5,57	5,82	5,78		0,42	
	[ET]	[0,58]	[0,64]	[0,64]	0,04	[0,19-0,97]	0,04
HOMOCYSTEINE	Moy	2,60	2,66	2,65		0,17	
	[ET]	[0,29]	[0,33]	[0,32]	0,29	[0,03-0,09]	0,05

¹ ONEWAY ANOVA

² Ajustement sur l'atopie et le secteur en régression logistique multivariée



Il y a un seul lien observé, entre les concentrations sériques des vitamines B12, et la présence d'un asthme professionnel dans la population d'étude (Figure 11). Un déficit un B12 semble être un facteur de risque de survenue de la maladie asthmatique (p=0,04).

Table 6 : Caractéristiques des vitamines B et de l’homocystéine en fonction de la filière

Variables métaboliques (Log transformées)		Boulangers et pâtisseries (BP)					Coiffeuse (C)					Comparaison entre les cas		
		Cas (N=24)	Témoins (N=111)	p <i>brute</i>	OR [IC]	p <i>ajusté</i>	Cas (N=7)	Témoins (N=85)	p <i>brute</i>	OR [IC]	p <i>ajusté</i>	Cas “BP”	Cas “C”	p *
Vitamine B9	Moy [ET]	1,77 [0,93]	1,84 [0,72]	0,70	0,78 [0,43-1,42]	0,42	2,33 [1,45]	2,21 [1,29]	0,82	1,15 [0,53-2,48]	0,72	1,82 [0,76]	2,22 [1,29]	0,23
Vitamine B12	Moy [ET]	5,60 [0,51]	5,80 [0,51]	0,11	0,53 [0,20-1,42]	0,21	5,43 [0,80]	5,84 [0,79]	0,19	0,23 [0,04-1,25]	0,09	5,76 [0,52]	5,80 [0,79]	0,50
HOMOCYSTEINE	Moy [ET]	2,66 [0,25]	2,77 [0,33]	0,14	0,20 [0,04-1,18]	0,08	2,36 [0,29]	2,52 [0,26]	0,14	0,30 [0,01-11,48]	0,52	2,75 [0,32]	2,51 [0,26]	0,01

Analyse bivariée : ¹ ONEWAY ANOVA; * Kruskal wallis ² Ajustement sur l’atopie et tabagisme en régression logistique multivariée

Deux modèles de régression logistique furent réalisés (un pour chaque filière). En analyse bivariée comme en multivariée, aucune association n'apparaît entre les donneurs de méthyles (Vit B9 et vit B12) et la survenue d'un asthme quelque soit la filière considérée.

Un constat identique est fait pour l'homocystéine. En comparant les deux filières entre elles il ressort une différence au niveau du taux de l'homocystéine, différence notée autant chez les témoins (Figure 12) que chez les cas (Figure 13).

Ces résultats sont à prendre avec précaution car physiologiquement l'homocystéine est liée au sexe. Et dans notre population le sexe est lié au secteur (table 4).

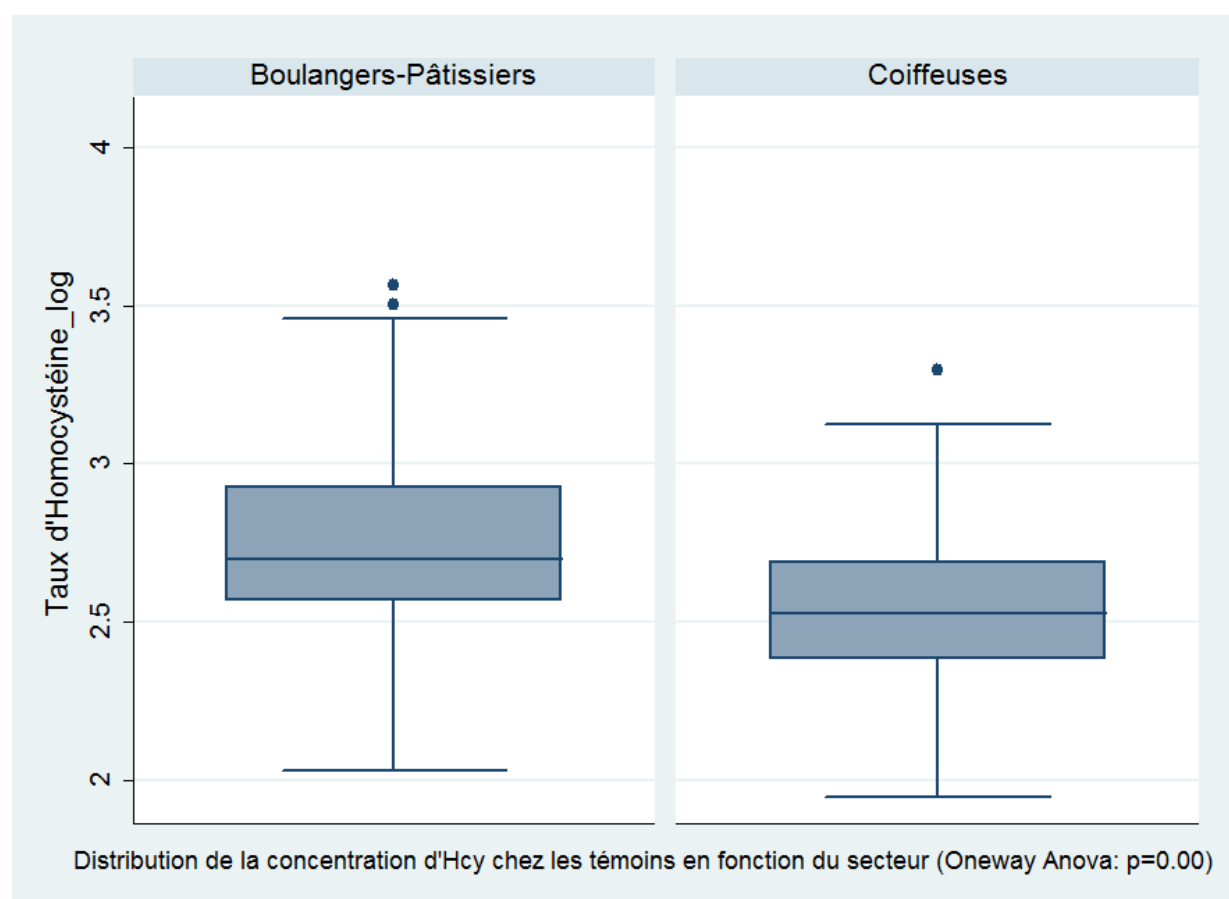


Figure 12 : Distribution du taux d'homocystéine en fonction du secteur chez les témoins

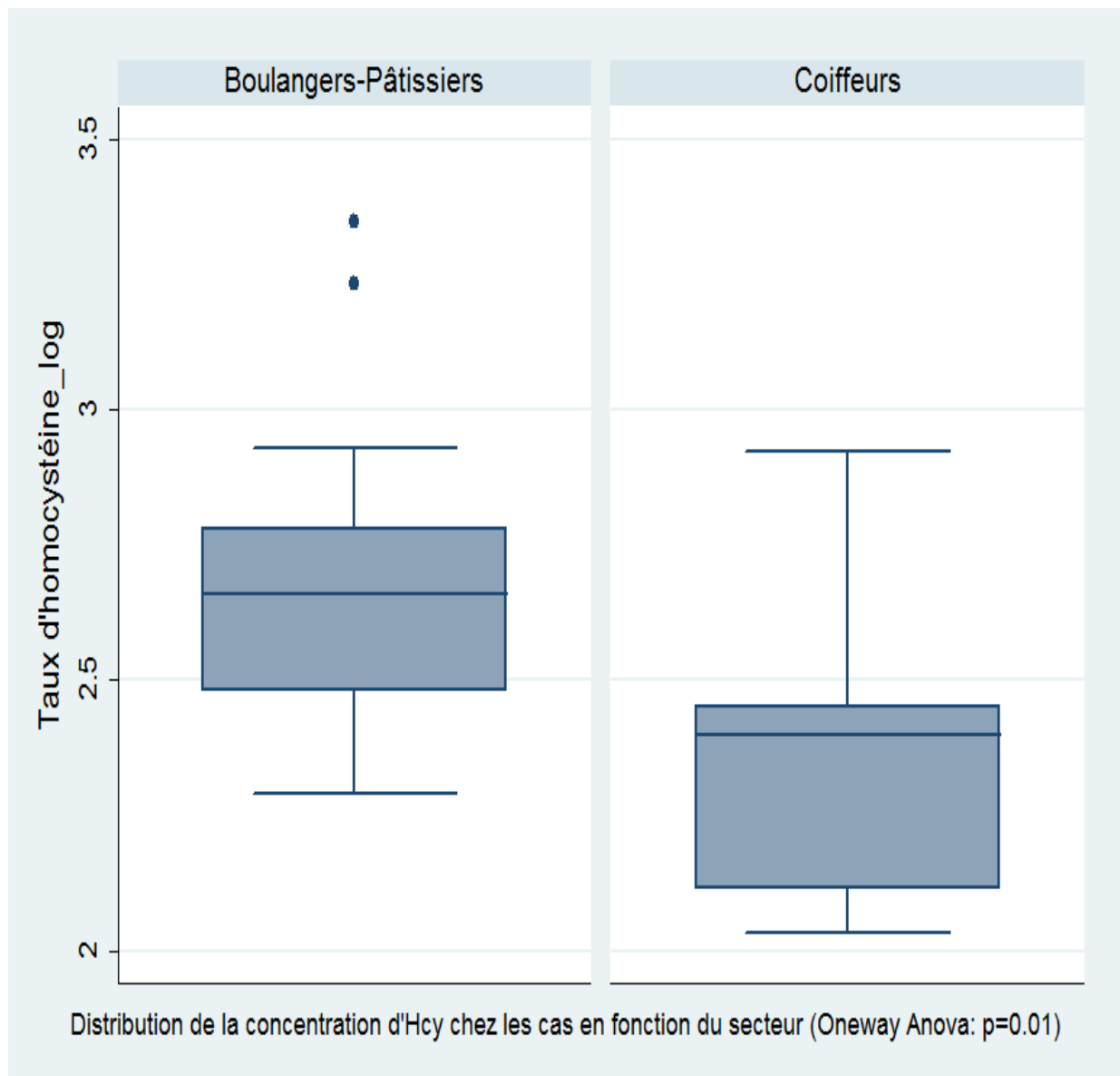


Figure 13 : Distribution du taux d'homocystéine en fonction du secteur chez les cas

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Les différents points abordés dans cette discussion ont pour la plupart été discutés dans la discussion des différents articles figurant dans ce manuscrit, mis ici en perspective. Ce chapitre ouvre aussi des perspectives pour la prévention du risque d'asthme professionnel dans ces métiers à risque et pour la poursuite de la voie de recherche empruntée dans ce travail.

Nos résultats ont porté sur deux cohortes, l'une d'apprentis et l'autre de jeunes travailleurs. Notre objectif était de déterminer les facteurs de risque de survenue d'un AP depuis le début de l'exposition jusqu'aux premières années d'activité professionnelle.

Sans prétendre ici décrire de manière exhaustive les facteurs de risques de cette maladie multifactorielle qui ne cesse de révéler des zones jusqu'ici restées dans l'ombre, notre discussion s'articulera successivement autour des données génétiques, des données nutritionnelles et s'attardera en dernier lieu sur les données nouvelles portant sur l'Homocystéine et les vitamines B9 et B12. Nous aborderons en conclusion de ce chapitre les perspectives ouvertes par cette thèse.

A. DISCUSSION

I. Déterminants génétiques de l'AP

1. Principaux résultats

La trajectoire entre le début de l'exposition à des agents professionnels sensibilisants et le déclin de la fonction respiratoire dépend d'une imbrication de mécanismes divers dont des facteurs génétiques, l'âge, les habitudes tabagiques, etc. [242]. L'asthme est une maladie complexe et hétérogène résultant des effets et interactions de nombreux facteurs génétiques et environnementaux. L'augmentation de l'incidence, de la prévalence et de la morbidité de l'asthme dans les décennies récentes représente un véritable défi de santé publique.

Cette notion d'interaction « gène-environnement » est très importante car un même gène peut être un facteur de risque de maladie ou au contraire un facteur de protection en fonction de cet environnement [243].

Ces études n'en sont encore qu'à leurs prémices dans le domaine de l'asthme professionnel [244]. L'asthme professionnel est un bon modèle d'étude de l'asthme chez l'adulte et fait intervenir des mécanismes immunologiques et non immunologiques en réponse à deux types d'allergènes (agents de haut et bas poids moléculaire).

La correspondance entre le mécanisme en jeu et le type de l'allergène en cause n'est pas clairement définie. L'AP induit par les allergènes de haut poids moléculaires est bien connue et fait appel un mécanisme Ig-E médié. Pourtant, l'expression d'un polymorphisme dépend de la nature de l'allergène. Le mécanisme est bien moins clair pour l'AP causé par les agents de bas poids moléculaire [243, 245].

A notre connaissance, aucune étude n'a encore considéré l'influence des polymorphismes génétiques sur la fonction respiratoire et l'inflammation des voies aériennes chez des jeunes apprentis. Plusieurs études se sont intéressées aux apprentis exposés à des agents de haut ou bas poids moléculaire (respectivement HPM et BPM), ce qui a permis une meilleure compréhension des déterminants cliniques de la sensibilisation professionnelle et de l'inflammation dans l'AP.

Nous avons donc cherché à évaluer le rôle des polymorphismes génétiques en rapport avec l'inflammation et l'allergie, à savoir les gènes codant pour **IL4RA**, **IL13**, **TNFa**, **IL1A** et **IL5**.

a) Polymorphismes génétiques et déclin de la fonction respiratoire (IL13, IL4RA)

Notre intérêt s'est porté sur les polymorphismes de *IL13* et *IL4RA*, du fait de leur association reconnue avec l'atopie et l'asthme [91]. Chez nos apprentis, les variants du polymorphisme d'*IL4RA*, *S478P* et *Q551R* sont associés au déclin du VEMS et de la CVF, après deux ans d'exposition, déclin plus accentué chez les porteurs de l'allèle muté.

Ces associations avec le déclin respiratoire dépendent du type de l'allergène [50], *IL4RA S478P* chez les jeunes exposés aux BPM, et *IL4RA Q551R* chez ceux exposés aux agents de HPM.

En ce qui concerne le polymorphisme *IL13 R130Q*, avoir la forme homozygote semble être non protecteur chez les apprentis exposés au HPM. IL13 et IL4 sont des cytokines sécrétées par de nombreuses cellules, incluant les cellules de type TH2. Ils ont des actions reconnues dans l'AP sur l'HRBNS et l'hypersécrétion qui contribuent à l'obstruction bronchique.

Du point de vue de l'interaction gène-gène, nous avons trouvé une association entre le déclin de la fonction respiratoire et la combinaison d'*IL13 RR* et *IL4RA 551 QRRR*, association qui demeure significative chez les non atopiques, ce qui suggère que le déclin de la fonction respiratoire fait plus appel à la voie de signalisation de l'inflammation qu'à une production d'IGE.

Ces combinaisons gène-gène ont été aussi significativement associées à l'asthme induit par les isocyanates chez les travailleurs exposés [246]. Ces gènes ont été associés à une susceptibilité de survenue de l'asthme en régulant la différenciation des cellules TH naïves en TH2, orientant ainsi la réponse immunitaire [50].

b) Polymorphismes génétiques et HRBNS et FeNO

Nous avons trouvé une association entre la présence d'une HRBNS et la forme homozygote GG du polymorphisme *TNFA* -308G>A au sein des sujets non atopiques. Un résultat similaire a été trouvé dans une étude cas-témoins conduite dans la population générale chinoise [247]. La relation entre *TNFA* et l'AP a été bien mise en évidence dans les modèles animaux d'asthme induit au TDI [248] mais peu de données sont disponibles à ce jour chez les humains. Une seule étude cas-témoins ne montre aucune association entre ce polymorphisme et l'asthme induit aux isocyanates, mais le statut atopique n'a pas été pris en considération dans cette étude.

IL1 semble jouer un rôle important dans l'AP au regard des modèles expérimentaux [249,250]. En contraste, les études en milieu professionnel font défaut. Nous avons trouvé une interaction gène-gène entre ces deux polymorphismes et l'HRBNS, particulièrement chez les non atopiques. L'influence de cette interaction, peut être supportée par l'hypothèse que ces deux cytokines agissent en synergie, mais cette interaction devra être confirmée sur le plan expérimental. Il s'agit donc ici d'une perspective de recherche.

Notre étude n'a pu révéler d'interaction gène-environnement en rapport avec la FeNO, mais nous avons observé que certaines interactions gène-gène étaient associées à une variation du niveau de la FeNO chez les apprentis non atopiques, association différente en fonction de l'exposition.

Une augmentation de la FeNO a été retrouvée chez les apprentis coiffeuses non atopiques en lien avec l'interaction des polymorphismes *TNFA* GG /*IL1A* CC. L'augmentation de la FeNO est dérivée de la stimulation du NO- synthase par les cytokines inflammatoires comme le *TNFA* et les cytokines pro TH1 [251]. Ces résultats originaux nécessitent d'être confirmés par d'autres études.

2. Limites de l'étude

Des limites sont à souligner pour ce qui concerne l'effectif disponible, les techniques de génotypage et le dosage des IgE spécifiques.

Le nombre de sujets recrutés dans les deux cohortes est en accord avec l'estimation de la puissance attendue mais la taille de l'échantillon sur lequel les analyses ont pu porter est limitée par le design de l'étude sur la cohorte d'apprenti. Cela pourrait expliquer que certaines associations n'ont pu atteindre une signification statistique, ce qui exclut des conclusions définitives.

Par ailleurs, la technique de gène candidat reste assez limitée et ne permet pas d'explorer toute la fonctionnalité d'un gène. En effet, la fonction de la plupart de ces gènes est encore mal connue. Les avancées récentes dans les technologies moléculaires, qui permettent le génotypage de milliers de polymorphismes génétiques dans des régions chromosomiques candidates ainsi que sur l'ensemble du génome, couplées aux développements de méthodes statistiques pouvant considérer des systèmes biologiques complexes, vont permettre de progresser rapidement dans la caractérisation de nouveaux gènes et d'interactions gène-gène et gène-environnement.

L'interprétation de nos résultats a également été limitée par l'impossibilité d'évaluer qualitativement et quantitativement l'exposition et la réponse IgE contre ces allergènes professionnels [252].

3. Originalité de l'étude

L'originalité majeure de notre étude est d'évaluer l'apparition de l'inflammation des voies aériennes et HBRNS depuis le début de l'exposition aux allergènes professionnels, dans une population *a priori* « vierge » d'exposition et d'asthme préexistant.

Grâce à cela, nos résultats soutiennent l'hypothèse de l'existence d'interactions gène-environnement et gène-gène dans l'apparition d'une HRBNS d'origine professionnelle, en accord avec les connaissances disponibles en milieu non professionnel.

II. DETERMINANTS NUTRITIONNELS ET METABOLIQUES DE L'AP

1. Principaux résultats

Nous n'aborderont ici que les principaux résultats portant sur l'aspect nutritionnel, car les autres facteurs de risque étudiés ont fait l'objet d'une analyse plus détaillée dans la thèse de Mr Thomas Remen.

Notre étude est la première à explorer l'association entre facteurs alimentaires, en particulier les vitamines, et l'AP. Elle permet de suggérer que le rôle des facteurs nutritionnels peut dépendre de l'exposition, et vient confirmer Romieu *et al*, qui suggèrent qu'« une alimentation équilibrée peut inhiber, arrêter voire inverser le processus de toxicité, alors que, inversement, une alimentation déséquilibrée augmente la sensibilisation aux polluants environnementaux, comme ceux d'origine professionnels. »

a) Vitamines A .C.E

Leur rôle dans l'asthme reste encore sujet à controverses [156]. Nos résultats sont différents selon l'exposition. Ces éléments nutritionnels ne sont pas facteurs de risque au sein des boulangers et pâtisseries, mais sont associés à l'AP chez les coiffeuses. Ces résultats sont consistants avec l'hypothèse selon laquelle un apport en excès d'antioxydants peut entraîner un déséquilibre de la balance TH1 et TH2 en faveur d'une réponse de type TH2 [253].

Les produits chimiques utilisés en coiffure peuvent par ailleurs aussi entraîner un déséquilibre dans la balance entre système de défense antioxydant et stress oxydant [254], ce qui peut

entraîner des conséquences physiopathologiques au niveau des tissus des poumons, telles que l'apoptose cellulaire et une diminution de la fonction pulmonaire.

b) Vitamine D

De même que les vitamines précédentes, son rôle dans l'asthme reste sujet à controverses, mais nos résultats chez les coiffeuses viennent confirmer l'hypothèse des études *in vitro* selon lesquelles des doses élevées de vitamine D en supplémentation peuvent promouvoir une différenciation de type TH2 [255].

c) Acides Gras Poly-Insaturés

Nos résultats, qui ne montrent pas d'association avec l'AP, ne viennent pas corroborer les résultats de la littérature. Les données de la littérature ne sont pas concluantes, car pour certains, un apport en AGPI augmenterait le risque d'asthme [170,256], pour d'autres il est associé à un risque réduit [173-175].

d) Déterminants métaboliques de l'AP

A ce stade de l'analyse, encore assez sommaire, nous avons retrouvé une association entre le risque d'AP et les concentrations sériques plus faibles de la vitamine B12, donneuse de méthyles. Les résultats des études en population générale, ne sont pas unanimes sur le sujet. Dans une étude longitudinale, c'est une supplémentation en folates chez la femme enceinte qui augmenterait le risque d'asthme ou d'atopie chez le nouveau-né [206] alors que les données issues d'une étude transversale indiquent qu'une supplémentation en folates et en vitamines B12 ne serait pas liée à la survenue d'un asthme ou d'atopie [199]. Ce serait plutôt une carence en folates qui serait associée à une augmentation de la prévalence de l'asthme et des symptômes respiratoires, semblablement à nos résultats. Dans une troisième étude, aucune association n'a été retrouvée [208].

Un déficit en B12 est associé à risque d'AP à un stade précoce et ce indépendamment de la filière ; pas d'association pour B9, ni MMA et ni pour l'homocystéine.

La vitamine B12 se trouve surtout dans les légumes verts, les haricots secs, les pois, les céréales entières, le foie et le jaune d'œuf ; un déficit en B12 et non en B9 pourrait être lié à la mauvaise alimentation (fréquente chez les sujets jeunes).

Par ailleurs, on sait que la déficience en B12 altère la réponse immune cellulaire et pourrait être associée à l'atopie en inhibant le cycle de reméthylation de l'ADN, entraînant une altération de la balance TH1/TH2 ; la vitamine B12 et les folates interagiraient comme cofacteurs.

Néanmoins, il s'agit ici de la première étude en milieu professionnel, et des études plus approfondies sont en cours afin de confirmer ou d'infirmer si le risque associé à déficit B12 dans notre population dépend du profil génétique (MTHFR C677T).

Le rôle pathogène de l'homocystéine [209-213] en relation avec l'inflammation et le stress oxydant a été documenté par ses effets *in vitro* sur les cellules musculaires lisses, vasculaires et endothéliales, la synthèse du NO, les voies de la coagulation, le stress oxydatif, l'inflammation et le métabolisme des lipides. Nos résultats sont à prendre avec précaution et nécessitent une analyse plus approfondie, car physiologiquement les hommes ont un taux d'homocystéine plus élevé que chez les femmes, dû à une plus grande masse musculaire ou aux effets sur les hormones sexuelles, ce qui se confirme dans notre population en comparant les BP avec les coiffeurs. L'homocystéine est fortement corrélée au sexe ce qui implique que le lien avec l'AP ne peut ici être confirmé car l'analyse au sein des filières ne retrouve pas de lien.

2. Limites de l'étude

Les résultats sur les différences d'apport en nutriments entre cas et témoins, que ce soit dans le secteur de la boulangerie-pâtisserie ou dans la coiffure, doivent être interprétés avec précaution du fait des faibles effectifs (notamment chez les coiffeurs), de la multiplicité des tests et éventuellement de la méthode de recueil de l'information (questionnaire de fréquence alimentaire). Nous devons nous contenter malheureusement, pour certaines vitamines, de nous baser sur les données issues du questionnaire SUVIMAX 2, avec les risques inhérents à ce mode de recueil d'informations, notamment un biais de mémoire. Certains facteurs de risque associés à la survenue de la pathologie peuvent ne pas être identifiables du fait également de modifications du comportement ou des pratiques des sujets suite à l'apparition de la maladie (par exemple concernant le statut tabagique, l'activité professionnelle ou les habitudes alimentaires). De la même manière, certains facteurs de risque mis en évidence dans notre étude pourraient ne pas être un facteur causal mais une conséquence de la maladie. Par ailleurs du fait du type d'enquête, qui a été réalisée à domicile dans la majorité des cas, les dosages biologiques de certaines vitamines n'ont pu être réalisés en raison du délai de transport et des contraintes relatives à la conservation des échantillons.

3. Forces de l'étude

Les études cas-témoin nichées dans une cohorte présentent l'avantage principal que les cas et les témoins sont issus de la même population source.

Un autre aspect important favorable de cette étude est le fait de pouvoir comparer deux types d'expositions différentes (agents HPM vs BPM) dans deux populations de travailleurs différentes (Boulangers-Pâtissiers vs Coiffeurs) et ce après un délai relativement court après le démarrage de l'exposition. Les facteurs nutritionnels pris en compte, de même que les facteurs métaboliques, font de cette étude la première dans le domaine professionnel.

B. PERSPECTIVES

Les perspectives ouvertes par ce travail relèvent d'une part du registre de la prévention du risque d'asthme professionnel, et d'autre part de la progression des connaissances relatives au rôle du métabolisme des vitamines B dans le développement de l'AP.

Sur le plan de la prévention, ce travail souligne que, si l'atopie représente un facteur de risque non négligeable, surtout dans le cas des sujets exposés aux agents de HPM, l'exposition professionnelle sensibilisante et allergisante demeure la clé de voûte de la survenue de la maladie. Aussi il faut :

- En premier lieu une prévention primaire, par l'action sur les produits utilisés et sur les conditions d'exercice de l'activité professionnelle (ventilation des locaux ...); également une information et une éducation des jeunes apprentis en vue de les sensibiliser au risque de survenue de la maladie.
- Ensuite une prévention secondaire, avec la mise en œuvre d'un dépistage précoce des jeunes qui s'engagent dans les filières à hauts risques professionnelles, et la réalisation des visites médicales régulières avec des outils de dépistage de coût raisonnable et cependant sensibles.

La mesure du monoxyde d'azote exhalé (FeNO) peut être considérée comme une méthode valide d'évaluation de l'inflammation des voies aériennes chez des sujets nouvellement exposés à des agents sensibilisants respiratoires.

L'étude MIBAP avait montré la valeur prédictive de mesures répétées de la FeNO depuis le début de l'exposition pour apprécier l'apparition ou l'aggravation d'une hyperréactivité bronchique, pouvant donc constituer un élément intéressant de surveillance de ces sujets. L'analyse des données issues de la cohorte ABCD va dans le même sens et semble permettre de déterminer des valeurs seuils de FeNO qui pourraient servir de repère pour le dépistage de

sujets présentant un AP à un stade précoce de la marche allergique (Article en cours de finalisation en Annexe 15)

Sur le plan nutritionnel, de nouvelles études sont nécessaires afin de confirmer les résultats obtenus ici, surtout sur le plan du métabolisme des folates. Les analyses prévues prendront en compte des polymorphismes du métabolisme des folates (une puce a été conçue pour une étude en Light cycler, et les résultats sont en cours d'exploitation). Une meilleure compréhension de l'interaction entre exposition professionnelle et apports nutritionnels, modulée par certains polymorphismes génétiques impliqués dans la production de facteurs pro-inflammatoires ou dans le métabolisme des vitamines du groupe B et l'homocystéine pourrait éclairer l'incidence différentielle de l'asthme précoce chez les jeunes travailleurs dans ces métiers à risque.

Des études ultérieures sur les données issues de cette cohorte prendront en compte, à côté des déterminants génétiques directement liés à l'inflammation (*TNF α* , *IL1 α* , *IL1 β* , *IL1RN*), les déterminants nutritionnels et nutriginétiques en considérant les effets modulateurs des facteurs alimentaires pouvant influencer l'inflammation (acides gras n-3 et polyphénols : Apo AIV, APO E, CETP, HL-480, I- et L-FABP, LPL, MTP, PLTP, ABC, SR-B1, ABCA1 et 3, CD36), le stress oxydant (les caroténoïdes, les polyphénols), et l'hyperhomocystéinémie (*MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, *TCN2*, *GIF*, *RFC*, *COMTs*).

A travers ces études au sein de ces populations à risque, il ressort que l'expression de certains facteurs de risque sont modulables en fonction du type d'exposition.

De la génétique aux comportements alimentaires, en passant par son environnement, l'émergence d'une maladie telle que l'asthme professionnel fait appel à des facteurs multiples, dont la plupart peuvent être contrôlés et limités par des mesures efficaces .

CONCLUSION

L'asthme professionnel est la maladie respiratoire d'origine professionnelle la plus fréquente dans les pays industrialisés. Il touche principalement des sujets jeunes et actifs, avec souvent un pronostic médiocre malgré l'éviction.

A travers deux études, conduites respectivement chez des apprentis (MIBAP) et des jeunes travailleurs (ABCD) au sein de ces populations à risque, il ressort que l'expression de certains facteurs de risque professionnels et généraux de l'asthme professionnel est modulable en fonction du type d'exposition. Des comportements alimentaires à l'environnement de travail, l'émergence d'une maladie telle que l'asthme professionnel fait appel à des facteurs multiples dont la plupart peuvent être contrôlés et limités par des mesures de prévention efficaces.

Particulièrement intéressant est le monoxyde d'azote exhalé qui pourrait constituer un outil de dépistage précoce, simple et non invasif de cette pathologie, de même qu'il était apparu corrélé, chez les apprentis à l'apparition ou l'aggravation d'une hyperréactivité bronchique avant la manifestation clinique d'un asthme. Le contexte alimentaire, notamment l'apport vitaminique, a été aussi mis en lumière, ce qui devra faire appel à une prise en charge globale des travailleurs.

La prévention primaire devra donc tenir compte des facteurs individuels et environnementaux, et repose à ce jour sur l'élimination ou le maintien à « faible niveau » des substances montrées comme ayant un pouvoir de sensibilisation. La prévention secondaire demeure elle aussi nécessaire, car la connaissance des expositions « sans danger » est très incertaine, et la répétition d'expositions peut entraîner développement d'un asthme professionnel même pour des niveaux d'exposition relativement faibles, notamment chez des sujets prédisposés génétiquement. La mesure du monoxyde d'azote exhalé pourrait s'inscrire, dans ce cadre, comme un outil pertinent d'évaluation de l'inflammation des voies aériennes qui gagnerait à être promue largement chez des sujets nouvellement exposés à des agents sensibilisants respiratoires.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. Yeatts K, Sly P, Shore S, Weiss S, Martinez F, Geller A, et al. A brief targeted review of susceptibility factors, environmental exposures, asthma incidence, and recommendations for future asthma incidence research. *Environ Health Perspect* 2006; 114(4):634-40.
2. Balmes J, Becklake M, Blanc P et al. American Thoracic Society statement: occupational contribution to the burden of airway disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:787-797.
3. Chan-Yeung M, Occupational asthma. *N Engl J Med.*, 1995. 13: p. 107-12.
4. Cristina, Occupational Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2005. 172: p. 280-305.
5. Coppieters Yves et al., « Etude bibliographique de l'efficacité des actions de prévention de l'asthme professionnel », *Santé Publique*, 2003/4 Vol. 15, p. 423-435. DOI : 10.3917/spub.034.0423
6. McDonald JC, Keynes HL, Meredith SK. Reported incidence of occupational asthma in the United Kingdom, 1989-97. *Occupational and environmental medicine*. 2000 Dec;57(12):823-9.
7. Bena A, D'Errico A, Mirabelli D. [A system for the active surveillance of occupational bronchial asthma: the results of 2 years of activity of the PRiOR program]. *La Medicina del lavoro*. 1999 Jul-Aug;90(4):556-71.
8. Ameille J, Pauli G, Calastreng-Crinquand A, Vervloet D, Iwatsubo Y, Popin E, et al. Reported incidence of occupational asthma in France, 1996-99: the ONAP programme. *Occupational and environmental medicine*. 2003 Feb;60(2):136-41.
9. Bernstein IL, Keskinen H, Blanc PD, Chan-Yeung M, Malo J. Medicolegal aspects, compensation aspects, and evaluation of impairment/disability. In: Bernstein IL, Chan-Yeung M, Malo J, eds. *Asthma in the workplace*, 3rd ed. New-York: Taylor & Francis 2006:319-51.
10. Brooks SM, Weiss MA, Bernstein IL. Reactive airways dysfunction syndrome (RADS). Persistent asthma syndrome after high level irritant exposures. *Chest*. 1985 Sep;88(3):376-84.
11. Chan-Yeung M., Dimich-Ward H. Natural history of occupational lung diseases. *Eur Respir Mon* 1999 ; 11 : 46-63

12. Latza U, Stahlkopf H, Weinssen U, Sschneider WD, van Kampen V, Gässler A, et al. Prevention of work-related obstructive pulmonary diseases. Wirtschaftsverlag NW. 2002;59-109.
13. Van Kampen V, Czuppon A, Butz M, Baur X. Airway irritating substances, labeling and occurrence of occupational diseases. Zbl Arbeitsmed 1998;48:24-46.
14. Malo, J.L., et al., Asthme professionnel avec et sans période de latence. Encycl MédChir, 2000. 6-039-V-10: p. 7p.
15. . Bessot J-C, Pauli G. L'asthme professionnel. Eds Margaux Orange, 1999
16. Maghni K, Lemiere C, Ghezze H, Yuquan W, Malo JL. Airway inflammation after cessation of exposure to agents causing occupational asthma. Am J Respir Crit Care Med. 2004 ; 169(3):367-72
17. Brooks, S.M., M.A. Weiss, and I.L. Bernstein, Reactive airways dysfunction syndrome (RADS). Persistent asthma syndrome after high level irritant exposures. Chest, 1985. 88(3): p. 376-84.
18. Brooks, S.M., M.A. Weiss, and I.L. Bernstein, Reactive airways dysfunction syndrome. Case reports of persistent airways hyperreactivity following high-level irritant exposures. J Occup Med, 1985. 27(7): p. 473-6.
19. Bessot JC, Pauli G. L'asthme professionnel 1999.
20. Vignola AM, Mirabella F, Costanzo G, Di Giorgi R, Gjomarkaj M, Bellia V, et al. Airway remodeling in asthma. Chest. 2003 Mar;123(3 Suppl):417S-22S.
21. Godard P, Chanez P, Bousquet J, Demoly P, Pujol JL, Michel FB. Asthmologie. Paris: Masson 2000.
22. Dautzenberg B. Guide pratique de l'asthme 1995.
23. Archambault S., Malo JL, Infante-Rivard C., Ghezze H, Gautrin D. Incidence of sensitization, symptoms and asthma in apprentices starting exposure to latex. J Allergy Clin Immunol 2001; 107: 921-923
24. Gautrin D, Ghezze H, Infante-Rivard C, Malo JL. Natural history of sensitization, symptoms and occupational diseases in apprentices exposed to laboratory animals. Eur Respir J 2001; 17:904-908
25. Gautrin D., Infante-Rivard C, Ghezze H, Malo JL. Incidence and host determinants of

- probable occupational asthma in apprentices exposed to laboratory animals. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 899-904
26. Malo JL, Blanc P. Occupational lung disease: issues in management. *Eur Respir Monogr* 1999; 11:106-123
 27. E. Mapp, Boschetto P, Maestrelli P. State of the art : Occupational Asthma *Am. J. Respir. Crit. Care Med*, 2005, 172, 306-313
 28. Peat, J.K., van den Berg,. Green, W.F., Mellis, C.M., Leede, S.R. and Woolcock, A.J. , Changing prevalence of asthma in Australian children. . *British Medical Journal* 1994. 308(1591-96).
 29. Orriols Martinez, R., et al., [Guidelines for occupational asthma]. *Arch Bronconeumol*, 2006. 42(9): p. 457-74.
 30. Katz, I., et al., The occurrence, recrudescence, and worsening of asthma in a population of young adults: impact of varying types of occupation. *Chest*, 1999. 116(3): p. 614-8.
 31. Gautrin, D., et al., Incidence and host determinants of probable occupational asthma in apprentices exposed to laboratory animals. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001. 163(4): p. 899-904.
 32. El-Zein, M., et al., Incidence of probable occupational asthma and changes in airway calibre and responsiveness in apprentice welders. *Eur Respir J*, 2003. 22(3): p. 513-8.
 33. Beach, J., et al., A Systematic Review of the Diagnosis of Occupational Asthma. 2007. p. 569-578.
 34. Maestrelli P, Fabbri LM, Mapp CE. Pathophysiology. In: Chan-Yeung M, Malo JL, Bernstein DI, eds. *Asthma in the workplace and related conditions*. New-York: Taylor and Francis 2006:109-40.
 35. Malo JL, Chan-Yeung M. Occupational asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2001 Sep;108(3):317-28.
 36. Mapp, C.E., et al., Occupational asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005. 172(3): p. 280-305.
 37. Malo, J.L., et al., Prevalence and intensity of rhinoconjunctivitis in subjects with occupational asthma. *Eur Respir J*, 1997. 10(7): p. 1513-5.
 38. Malo, J.L., et al., Is the clinical history a satisfactory means of diagnosing occupational

- asthma? *Am Rev Respir Dis*, 1991. 143(3): p. 528-32.
39. Nicholson, P.J., et al., Evidence based guidelines for the prevention, identification, and management of occupational asthma. *Occup Environ Med*, 2005. 62(5): p. 290-9.
 40. Cullinan, P., et al., Allergen and dust exposure as determinants of work-related symptoms and sensitization in a cohort of flour-exposed workers; a case-control analysis. *Ann Occup Hyg*, 2001. 45(2): p. 97-103.
 41. Chan-Yeung, M., Occupational asthma--a model to study the natural history and pathogenic mechanisms in asthma. *Agents Actions Suppl*, 1993. 43: p. 107-18.
 42. Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, Bruijnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, et al. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy*. 2001 Sep;56(9):813-24.
 43. Lemièrre C, Charpin D, Vervloet D. [Is atopy a risk factor of occupational asthma?]. *Revue des maladies respiratoires*. 1995;12(3):231-9.
 44. Botham PA, Lamb CT, Teasdale EL, Bonner SM, Tomenson JA. Allergy to laboratory animals: a follow up study of its incidence and of the influence of atopy and pre-existing sensitisation on its development. *Occupational and environmental medicine*. 1995 Feb;52(2):129-33.
 45. Hoffjan S, Nicolae D, Ober C. Association studies for asthma and atopic diseases: a comprehensive review of the literature. *Respiratory research* 2003; 4:4-14
 46. Smit HA, Grievink L, Tabak C. Dietary influences on chronic obstructive lung disease and asthma: a review of the epidemiological evidence. *Proc Nutr Soc*. 1999 May;58(2):309-19.
 47. Grossman J. One airway, one disease. *Chest*. 1997 Feb; 111(2 Suppl):11S-6S.
 48. Garnier R., Villa A., Chataigner D. Rhinites professionnelles *Rev. Mal. Respir.*, 2007, 24, 205-220
 49. Moscato G, Vandenplas O, Van Wijk RG, Malo JL, Perfetti L, Quirce S, et al. EAACI position paper on occupational rhinitis. *Respiratory research*. 2009;10:16.
 50. Maestrelli P, Boschetto P, Fabbri LM, Mapp CE. Mechanisms of occupational asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009 Mar;123(3):531-42; quiz 43-4.
 51. Siracusa, A., et al., Smoking and occupational asthma. *Clin Exp Allergy*, 2006. 36(5): p.

577-84.

52. Jindal, S. and D. Gupta, The relationship between tobacco smoke and bronchial asthma. *Indian J Med Res*, 2004. 120(5): p. 443-453.
53. Seaton A, Godden DJ, Brown K. Increase in asthma: a more toxic environment or a more susceptible population? *Thorax*. 1994 Feb;49(2):171-4.
54. McKeever TM, Britton J. Diet and asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004 Oct 1;170(7):725-9.
55. Tarlo SM, Boulet LP, Cartier A, Cockcroft D, Cote J, Hargreave FE, et al. Canadian Thoracic Society guidelines for occupational asthma. *Can Respir J*. 1998 Jul-Aug; 5(4):289-300.
56. Bernstein DI, Campo P, Baur X. Clinical assessment and management of occupational asthma. In: Bernstein IL, Chan-Yeung M, Malo JL, Bernstein DI, eds. *Asthma in the workplace*. New York London: Taylor and Francis 2006:161-78.
57. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001 Apr;163(5):1256-76
58. Anees W, Gannon PF, Huggins V, Pantin CF, Burge PS. Effect of peak expiratory flow data quantity on diagnostic sensitivity and specificity in occupational asthma. *Eur Respir J*. 2004 May; 23(5):730-4.
59. Baur X, Barbinova L. Latex allergen exposure increases exhaled nitric oxide in symptomatic healthcare workers. *Eur Respir J*. 2005 Feb;25(2):309-16.
60. Lemiere C. Induced sputum and exhaled nitric oxide as noninvasive markers of airway inflammation from work exposures. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007 Apr; 7(2):133-7.
61. Yokota K, Yamaguchi K, Takeshita T, Morimoto K. The significance of specific IgG4 antibodies to methyltetrahydrophthalic anhydride in occupationally exposed subjects. *Clin Exp Allergy*. 1998 Jun; 28(6):694-701.
62. Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, Crapo RO, Burgos F, Casaburi R, et al. Stratégies

- d'interprétation des explorations fonctionnelles respiratoires. *Revue des maladies respiratoires*. 2007;24:83-108.
63. Vandenplas O, Larbanois A, Bugli C, Kempeneers E, Nemery B. [The epidemiology of occupational asthma in Belgium]. *Revue des maladies respiratoires*. 2005 Jun;22(3):421-30.
 64. Vandenplas O, Larbanois A, Delwiche JP. [Diagnostic approach occupational asthma]. *Revue des maladies respiratoires*. 2002 Jun;19(3):334-40.
 65. Enright PL, Kronmal RA, Higgins M, Schenker M, Haponik EF. Spirometry reference values for women and men 65 to 85 years of age. Cardiovascular health study. *Am Rev Respir Dis*. 1993 Jan;147(1):125-33.
 66. Rosenman KD, Reilly MJ, Kalinowski DJ. A state-based surveillance system for work-related asthma. *Journal of occupational and environmental medicine / American College of Occupational and Environmental Medicine*. 1997 May;39(5):415-25.
 67. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996 ;87 :2095-2147.
 68. Bidwell J Keen L Gallagher G et al. Cytokine gene polymorphism in human disease :on-line data bases. *Genes Immunol* 1999 ;1 :3-19.
 69. Van den Velden PA and Reitma PH. Amino acid dimorphism in IL-1A is detectable by PCR amplification. *Hum Mol Gen* 1993 ;2 :1753.
 70. Karjalainen J Nieminen MM, Aromaa A et al. The IL-1beta genotype carries asthma susceptibility only in men. *J Allergy Clin Immunol* 2002 ;109 :514-516.
 71. Karjalainen J, Hulkkonen J, Pessi T et al. The IL-1A genotype associates with atopy in nonasthmatic adults. *J Allergy Clin Immunol* 2002 ;110 :429-434.
 72. Mukhopadhyay S., Hoidal J. R. and Mukherjee T. K. (2006) Role of TNFalpha in pulmonary pathophysiology. *Respir Res* 7, 125.
 73. O'Malley W. E., Achinstein B. and Shear M. J. (1962) *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 29, 1962: Action of bacterial polysaccharide on tumors. II. Damage of sarcoma 37 by serum of mice treated with *Serratia marcescens* polysaccharide, and induced tolerance. *Nutr Rev* 46, 389-91.
 74. Balkwill F. (2009) Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* 9, 361-71.
 75. Moffatt MF, Cookson WOCM. Tumor necrosis factor haplotypes and asthma. *Hum Mol*

Genet 1997 ;6 :551-554.

76. Witte JS, Palmer LJ, O'Connor RD et al. Relation between tumour necrosis factor polymorphism TNFalpha-308 and risk of asthma Eur J Hum Genet 2002 ;10 :82-85.
77. M. Aidoo, P.D. McElroy, M.S. Kolczak, D.J. Terlouw, F.O. ter Kuile, B. Nahlen, A.A. Lal,V. Udhayakumar, Tumor necrosis factor-alpha promoter variant 2 (TNF2) is associated with pre-term delivery, infant mortality, and malaria morbidity in western Kenya: Asembo Bay Cohort Project IX, Genet. Epidemiol. 21 (2001) 201–211.
78. Elahi MM, Asotra K, Matata BM, Mastana SS. Tumor necrosis factor alpha—308 gene locus promoter polymorphism: an analysis of association with health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009;1792(3):163–172.
79. Takeshi Aoki , Tomomitsu Hirota, Mayumi Tamari, Kunio Ichikawa, Kazunori Takeda, Tadao Arinami, Masanao Shibasaki, Emiko Noguchi. An association between asthma and TNF-308G/A polymorphism: meta-analysis. J Hum Genet (2006) 51:677–685 ;
80. El Bahlawan L, Christensen M, Binaei S, Murphy C, Zhang Q, Quasney M. Lack of association between the tumor necrosis factor-alpha regulatory region genetic polymorphisms associated with elevated tumor necrosis factor-alpha levels and children with asthma. Chest 2003;123(suppl):374S-5S.
81. Shin HD, Park BL, Kim LH, Jung JH, Wang JH, Kim YJ, et al. Association of tumor necrosis factor polymorphisms with asthma and serum total IgE. Hum Mol Genet 2004;13:397-403.
82. Randolph AG, Lange C, Silverman EK, Lazarus R, Weiss ST. Extended haplotype in the TNF gene cluster is associated with asthma and asthma related phenotypes. Am J Respir Crit Care Med 2005;172:687-9
83. DG.Marsh, JD.Neely, DR. Breazeale, et al. Linkage analysis of IL-4 and other chromosome
84. Paul WE. Regulation of immunoglobulin E synthesis.in « Fundamental Immunology », M. Wills-Karp, GK. Khurana Hershey. eds Lippincott Williams Wilkins, Philadelphia, 2003, pp.1453-1456
85. HC. Oettgen. Regulation of the IgE isotype switch : new insights on cytokine signals and functions of ε germline transcripts. Current Opinion in Immunology. 2000, 12 : 618-23

86. Graves PE, Kabesch M, Halonen M et al. A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children. *J Allergy Clin Immunol* 2000 ;105 :506-513.
87. Schedel M, Carr D, Klopp N, Woitsch B, Illig T, Stachel D, Schmid I, Fritzsche C, Weiland SK, von Mutius E, Kabesch M. A signal transducer and activator of transcription 6 haplotype influences the regulation of serum IgE levels. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:1100-5.
88. Grunig G., et al. 1998. Requirement for IL13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science* 282 : 2261-2263.
89. Wills-Karp M., et al. 1998. Interleukin-13 : central mediator of allergic asthma (see comments). *Science* 282 : 2258-2261.
90. Vladich, F.D., Brazille, S.M., Stern, D., Peck, M.L., Ghittoni, R. & Vercelli, D. (2005) IL-13 R130Q, a common variant associated with allergy and asthma, enhanced effector mechanisms essential for human allergic inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, 115, 747.
91. Heinzmann, A., Mao, X.Q., Akaiwa, M., Kreomer, R.T., Gao, P.S., Ohshima, K. et al. (2000) Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy. *Human Molecular Genetics*, 9, 549.
92. He, J.Q., Chan-Yeung, M., Becker, A.B., Dimich-Ward, H., Ferguson, A.C. & Manfreda, J., et al. (2003) Genetic variants of the IL13 and IL4 genes and atopic diseases in at-risk children. *Genes and Immunity*, 4, 385.
93. Graves P.E., Kabesch M., Halonen M., Holberg C.J., Baldini M., Fritzsche C., Weiland C.K., Ericson R.P., von Mutius E., Martinez F.D. A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children. *J Allergy Clin Immunol* 2000 ; 105 : 506-13.
94. Wang M, Xing ZM, LU C, Ma YX, Yan Z, Wang SW, YU LS. A common IL-13 Arg130Gln single nucleotide polymorphism among chinese atopy patients with allergic rhinitis. *Hum. Genet.* 2003; 113 : 387-90
95. Liu X., Nickel R., Beyer K., Wahn U., Ehrlich E., Freidhoff L.R., Björkstén B., Beaty T.H., Huang S-K. and the MAS-Study Group. An IL13 coding region variant is associated with a high total serum IgE level and atopic dermatitis in the German

- Multicenter Atopy Study (MAS-90). *J Allergy Clin Immunol*, 2000; 106 : 167-70.
96. Vladich FD, Brazille SM, Stern D, Peck ML, Ghittoni R, Vercelli D. IL-13 R130Q, a common variant associated with allergy and asthma, enhances effector mechanisms essential for human allergic inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*. 1995; 115 : 747-54
 97. Gueant-Rodriguez RM, Romano A, Beri-Dexheimer M, Viola M, Gaeta F, Gueant JL. Gene-gene interactions of IL13 and IL4RA variants in immediate allergic reactions to betalactam antibiotics. *Pharmacogenetics and genomics* 2006; **16**: 713-719
 98. Howard TD, Whittaker PA, Zaiman AL, Koppelman GH, Xu J, Hanley MT, Meyers DA, Postma DS, Bleecker ER. Identification and association of polymorphisms in the interleukin-13 gene with asthma and atopy in a Dutch population. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001 ; 25(3) :377-84.
 99. Howard TD, Koppelman GH, Xu J, Zheng SL, Postma DS, Meyers DA, Bleecker ER. Gene-gene interaction in asthma : IL4RA and IL13 in a Dutch population with asthma. *Am J Hum Genet* 2002 ; 70(1) : 230-6.
 100. Kruse S, Japha t, Tedner M, Sparholt SH, Forster J, Kuehr J, Deichmann KA. The polymorphisms S503P and Q576R in the interleukin-4 receptor alpha are associated with atopy and influence the signal transduction. *Immunology* 1999 ;96(3) :365-71.
 101. Hershey GK, Friedrich MF, Esswein LA, Thomas ML, Chatila TA. The association of atopy with a gain-of-fonction mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. *N Engl J Med* 1997 ; 337 :1720-5.
 102. Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Takeda K, Yokouchi Y, Kobayashi K, Imoto N, Nakahara S, Matsui A, Hamaguchi H. Lack of association of atopy/asthma and the interleukin-4 receptor alpha gene in Japanese. *Clin Exp Allergy* 1999 ; 29(2) :228-33.
 103. Hytönen AM, Löwhagen O, Arvidsson M, Balder B, Björk AL, Lindgren S, Hahn-Zoric M, Hanson LA, Padyukov L. Haplotypes of the interleukin-4 receptor alpha chain gene associate with susceptibility to and severity of atopic asthma. . *Clin Exp Allergy*. 2004 Oct;34(10):1570-5.
 104. Kabesch,M., Depner,M., Dahmen,I., Weiland,S.K., Vogelberg,C., Niggemann,B., Lau,S., Illig,T.,Klopp,N., Wahn,U., Reinhardt,D., von,M.E., and Nickel,R. (2007). Polymorphisms in eosinophil pathway genes, asthma and atopy. *Allergy* 62, 423-428.

105. Namkung,J.H., Lee,J.E., Kim,E., Cho,H.J., Kim,S., Shin,E.S., Cho,E.Y., and Yang,J.M. (2007). IL-5 and IL-5 receptor alpha polymorphisms are associated with atopic dermatitis in Koreans. *Allergy* 62, 934-942.
106. Vandenplas O.Occupational Asthma: Etiologies and Risk Factors. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2011 Jul;3(3):157-167
107. Newman Taylor, A.J., et al., Interaction of HLA phenotype and exposure intensity in
108. sensitization to complex platinum salts. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999. 160(2): p.435-8.
109. Bignon, J.S., et al., HLA class II alleles in isocyanate-induced asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994. 149(1): p. 71-5.
110. Horne, C., et al., Distribution of DRB1 and DQB1 HLA class II alleles in occupational asthma due to western red cedar. *Eur Respir J*, 2000. 15(5): p. 911-4.
111. Mapp, C.E., et al., Glutathione S-transferase GSTP1 is a susceptibility gene for occupational asthma induced by isocyanates. *J Allergy Clin Immunol*, 2002. 109(5): p. 867-72.119
112. Piirila, P., et al., Glutathione S-transferase genotypes and allergic responses to diisocyanate exposure. *Pharmacogenetics*, 2001. 11(5): p. 437-45.
113. Wikman, H., et al., N-Acetyltransferase genotypes as modifiers of diisocyanate exposure-associated asthma risk. *Pharmacogenetics*, 2002. 12(3): p. 227-33.
114. Soriano JB, Ercilla G, Sunyer J et al. HLA class II genes in Soybean epidemic asthma patients ; *Am J Resp Crit Care Med* 1997 ;156 :1394-1398.
115. Rihs HP, Barbalho-Krölls T, Huber H, Baur X. No evidence for the influence of HLA class II in alleles in isocyanate-induced asthma. *Am J Ind Med* 1997;32:522-7.
116. Bernstein JA, Munson J, Lummus ZL, Balakrishnan K, Leikauf G. T-cell receptor V beta gene segment expression in diisocyanate-induced occupational asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:245-50.
117. Beghe B, Padoan M, Moss CT, Barton SJ, Holloway JW, Holgate ST, Howell WM, Mapp CE. Lack of association of HLA class I genes and TNF alpha-308 polymorphism in toluene diisocyanate-induced asthma. *Allergy* 2004;59:61-4.
118. Pacheco K, Maier L, Silveira L, Goelz K, Noteware K, Luna B, du Bois R, Murphy J,

- Rose C. Association of Toll-like receptor 4 alleles with symptoms and sensitization to laboratory animals. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:896-902.e4.
119. Bernstein DI, Wang N, Campo P, Chakraborty R, Smith A, Cartier A, Boulet LP, Malo JL, Yucesoy B, Luster M, Tarlo SM, Hershey GK. Diisocyanate asthma and gene-environment interactions with IL4RA, CD-14, and IL-13 genes. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006;97:800-6.
120. Wisnewski AV, Liu Q, Liu J, Redlich CA. Human innate immune responses to hexamethylene diisocyanate (HDI) and HDI-albumin conjugates. *Clin Exp Allergy* 2008;38:957-67.
121. Ye YM, Kang YM, Kim SH, Kim CW, Kim HR, Hong CS, Park CS, Kim HM, Nahm DH, Park HS. Relationship between neurokinin 2 receptor gene polymorphisms and serum vascular endothelial growth factor levels in patients with toluene diisocyanate-induced asthma. *Clin Exp Allergy* 2006;36:1153-60.
122. Wikman H, Piirilä P, Rosenberg C, Luukkonen R, Kääriä K, Nordman H, Norppa H, Vainio H, Hirvonen A. N-Acetyltransferase genotypes as modifiers of diisocyanate exposure-associated asthma risk. *Pharmacogenetics* 2002;12:227-33.
123. Mapp CE, Fryer AA, De Marzo N, Pozzato V, Padoan M, Boschetto P, Strange RC, Hemmingsen A, Spiteri MA. Glutathione S-transferase GSTP1 is a susceptibility gene for occupational asthma induced by isocyanates. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:867-72.
124. Berode M, Jost M, Ruegger M, Savolainen H. Host factors in occupational diisocyanate asthma: a Swiss longitudinal study. *Int Arch Occup Environ Health* 2005;78:158-63.
125. Piirilä P, Wikman H, Luukkonen R, Kääriä K, Rosenberg C, Nordman H, Norppa H, Vainio H, Hirvonen A. Glutathione S-transferase genotypes and allergic responses to diisocyanate exposure. *Pharmacogenetics* 2001;11:437-45.
126. Jones MG, Nielsen J, Welch J, Harris J, Welinder H, Bensryd I, Skerfving S, Welsh K, Venables KM, Taylor AN. Association of HLA-DQ5 and HLA-DR1 with sensitization to organic acid anhydrides. *Clin Exp Allergy* 2004;34:812-6.
127. Mapp CE, Beghè B, Balboni A, Zamorani G, Padoan M, Jovine L, Baricordi OR, Fabbri LM. Association between HLA genes and susceptibility to toluene diisocyanate-

- induced asthma. *Clin Exp Allergy* 2000;30:651-6.
128. Horne C, Quintana PJ, Keown PA, Dimich-Ward H, Chan-Yeung M. Distribution of DRB1 and DQB1 HLA class II alleles in occupational asthma due to western red cedar. *Eur Respir J* 2000;15:911-4.
 129. Newman Taylor AJ, Cullinan P, Lympny PA, Harris JM, Dowdeswell RJ, du Bois RM. Interaction of HLA phenotype and exposure intensity in sensitization to complex platinum salts. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:435-8.
 130. McKeever TM, Britton J. Diet and asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004 Oct 1;170(7):725-9.
 131. Fogarty A, Britton J. The role of diet in the aetiology of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2000 May;30 (5):615-27.
 132. Favier A. Le stress oxydant: intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann Biol Clin* 55 (1) 1997: 9-16.
 133. Favier A. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique* 2003 108-115.
 134. Bonnefont-Rousselot, D., Théron, P., Delattre, J. Radicaux libres et anti-oxydants. In
 135. Delattre J, Durand G, Jardillier JC. Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires : 59-81. Médecine-sciences Flammarion Paris, 2003.
 136. Jacob, R. A., and Sotoudeh, G. Vitamin C function and status in chronic disease. *Nutrition in clinical care* 2002; 5(2).
 137. Birlouez-Aragon, I., and Tessier, F. J. Antioxidant vitamins and degenerative pathologies: a review of vitamin C. *Journal of Nutrition, Health & Aging* 2003;7(2), 103-109.
 138. Padayatty, S. J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J. H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S. K., and Levine, M. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American College of Cardiology* 2003; 22(1), 18-35.
 139. Berhane KT, Gilliland FD, et al. Children's lung function and antioxidant vitamin, fruit, juice, and vegetable intake. *Am J Epidemiol*. 2003 Sep 15; 158(6):576-84.
 140. Kalayci O, Besler T, et al. Serum levels of antioxidant vitamins (alpha tocopherol,

- beta carotene, and ascorbic acid in children with bronchial asthma. *Turk J Pediatr* 2000 Jan-Mar; 42(1):17-21.
141. Riccioni G, Barbara M, et al. Antioxidant vitamin supplementation in asthma.. *Ann Clin Lab Sci.* 2007 Winter; 37(1):96-101. Review.
 142. Evans H.M., Bishop K.S. On the relation between fertility and nutrition.I. The ovulation rhythm in the rat on a standard nutritional regime.*J. Metab. Res.* ~ 1 : 319 (1922).
 143. H. Sies, W. Stahl; Vitamin E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants; *Am. J. Clin. Nutr.*, 62 (1995) 1315S-1321
 144. Munnich A, Ogier H, Saudubray JM. Les vitamines. Aspects métaboliques, génétiques,nutritionnels et thérapeutiques. 1987, Edition Masson, Paris, France, 428 pp.
 145. Joan M Cook-Mills; Christine A McCary Isoforms of vitamin E differentially regulate inflammation. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets* 2010;10(4):348-366.
 146. McKeever TM, Britton J. Diet and Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* Vol 170. pp 725-729, 2004 ;
 147. de Batlle J, Garcia-Aymerich J, Barraza-Villarreal A, Antó JM, Romieu I. Mediterranean diet is associated with reduced asthma and rhinitis in Mexican children. *Allergy.* 2008 Oct;63(10):1310-6
 148. Augusto A. Litonjua Dietary Factors and the Development of Asthma Immunol Allergy Clin North Am. 2008 ; 28(3): 603–ix. doi:10.1016/j.iac.2008.03.
 149. Azais-Braesco, V., and Grolier, P. (2001). Vitamine A et caroténoïdes provitaminiques. In *Apports nutritionnels conseillés pour la population française* (A. Martin, Ed.), pp. 221-228: 221-228. Tec et Doc Lavoisier.
 150. Krinsky, N. I., and Johnson, E. J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular aspects of medicine* 26(6).
 151. Amiot, M. J., Babot-Laurent, C., and Touniaire, F. (2007). Plant Pigments as bioactive substances. In *Food colorants: chemical and functional properties* (C. Socaciu, Ed.) CRC Press.
 152. Reifen R. Vitamin A as an anti-inflammatory agent. *proc nutr Soc.* 2002

Aug;61(3):397-400.

153. Devereux G, Seaton A. Diet as a risk factor for atopy and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115:1109–17. doi: 10.1016/j.jaci.2004.12.1139.]
154. Barros P, Moreira, Fonseca A et. al. Adherence to the Mediterranean diet and fresh fruit intake are associated with improved asthma control. *lergy* 63:917-923, 2008)
155. Romieu I, Sienra-Monge JJ, Ramirez-Aguilar M, Tellez-Rojo MM, Moreno-Macias H, Reyes-Ruiz NI, et al. Antioxidant supplementation and lung functions among children with asthma exposed to high levels of air pollutants. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 2002 Sep 1;166(5):703-9.
156. Allan K, Devereux G. Diet and asthma: nutrition implications from prevention to treatment. *J Am Diet Assoc.* 2011 Feb;111(2):258-68.
157. Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Molecular Biol* 2006; 92 (1) :4-8.
158. Gilbert CR, Arum SM, Smith CM. Vitamin D deficiency and chronic lung disease. *Can Respir J.* 2009;16:75–80.)
159. Arnson, Yoav, Howard Amital, et Yehuda Shoenfeld. 2007. « Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 66 (9): 1137 -1142.)
160. [http:// www.JIM.fr](http://www.JIM.fr)
161. Lemire JM, Archer DC, Beck L et al. (1995) Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxy vitamin D3: preferential inhibition of Th1 functions. *J Nutr* 125, 1704S–1708S.
162. Jirapongsananuruk O, Melamed I & Leung DY (2000) Additive immunosuppressive effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and corticosteroids on TH1, but not TH2, responses. *J Allergy Clin Immunol* 106, 981–985.
163. Wjst M & Dold S (1999) Genes, factor X, and allergens: what causes allergic diseases? *Allergy* 54, 757–759.
164. Xystrakis E, Kusumakar S, Boswell S et al. (2006) Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients. *J Clin Invest* 116, 146–155.
165. Penna G, Roncari A, Amuchastegui S et al. (2005) Expression of the inhibitory

- receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4 + Foxp3 + regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Blood* 106, 3490–3497.
166. Litonjua AA & Weiss ST (2007) Is vitamin D deficiency to blame for the asthma epidemic? *J Allergy Clin Immunol* 120, 1031–1035.
 167. Guesnet P, Alessandri JM, Astorg P, Pifferi F, Lavialle M, Les rôles physiologiques majeurs exercés par les acides gras polyinsaturés (AGPI), 2005, *OCL*, 12(5) : 333-43)
 168. Kris-Etherton PM, Taylor DS, Yu-Poth S, Huth P, Moriarty K, Fishell V, Hargrove RL, Zhao G, Etherton TD, Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States, 2000, *Am J Clin Nutr*, 71(1Suppl):179S-88S)
 169. Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T, Modulation of inflammation in brain: a matter of fat, 2007, *J Neurochem*, 101(3):577-99 ;
 170. Orr SK, Bazinet RP, The emerging role of docosahexaenoic acid in neuroinflammation, 2008, *Curr Opin Investig Drugs*, 9(7):735-43)
 171. Funk CD, Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology, 2001, *Science*, 294(5548):1871-5 ;
 172. Farooqui AA, Horrocks LA, Phospholipase A2-generated lipid mediators in the brain: the good, the bad and the ugly, 2006, *Neuroscientis*, 12(3):245-60)
 173. Layé S, Polyunsaturated fatty acids, neuroinflammation and well being, 2010, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 82(4-6):295-303)
 174. Calder PC, n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and inflammatory diseases, 2006, *Am J Clin Nutr*, 83(6 Suppl):1505S-1519S;
 175. Serhan CN, Petasis, Resolvins and protectins in inflammation resolution, 2011, *Chem Res*, 111(10):633-46)
 176. Bagga D, Wang L, Farias-Eisner R, Glaspy JA, Reddy ST, Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion, 2003, *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(4):1751-6)
 177. Arita M, Yoshida M, Hong S, Tjonahen E, Glickman JN, Petasis NA, Blumberg RS, Serhan CN, Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis, 2005, *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(21):7671-6 //)

178. Spite M, NOrling LV, Summers L, Yang R, Cooper D, Petasis NA, Flwer RJ, Perretti M, Serhan CN (Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis, 2009, *Nature*, 461(7268):1287-91)
179. J.S. Burns, D.W. Dockery, L.M. Neas, J. Schwartz, B.A. Coull, M. Raizenne, F.E. Speizer Low dietary nutrient intakes and respiratory health in adolescents *Chest*, 132 (2007), pp. 238–245
180. Liu, G., Bibus, D. M., Bode, A. M., Ma, W.-Y., Holman, R. T. & Dong, Z. (2001) Omega 3 but not omega 6 fatty acids inhibit AP-1 activity and cell transformation in JB6 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:7510-7515
181. Endres, S. Messengers and mediators: interactions among lipids, eicosanoids, and cytokines. 1993, *Am J Clin Nutr* 57 (5 Suppl): 798S-800S.
182. M.J. James, R.A. Gibson, L.G. Cleland Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production *Am. J. Clin. Nutr.*, 71 (2000), pp. 343S–348S
183. Lands, W.E.M., Libelt, B., Morris, A., Kramer, N.C., Prewitt, T.E., Bowen, P., Schmeisser, D., Davidson, M.H., Burns, J.H. (1992). Maintenance of lower proportions of (n-6) eicosanoid precursors in phospholipids of human plasma in response to added dietary (n-3) fatty-acids. *Biochim Biophys Acta*, 1180, 147–162.
184. Abayasekara DR, Wathes DC. Effects of altering dietary fatty acid composition on prostaglandin synthesis and fertility. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1999 Nov;61(5):275-87. Review
185. Schwartz, J Role of polyunsaturated fatty acids in lung disease. *Am J Clin Nutr* 2000; 71, 393S-396S
186. Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation*. 2002 Nov 19;106(21):2747-57.
187. Simopoulos AP. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nutr*. 1999 Sep;70(3 Suppl):560S-569S. Review.
188. Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother*. 2002 Oct;56(8):365-79)
189. Hu FB, Willett WC. Optimal diets for prevention of coronary heart disease. *JAMA*. 2002 Nov 27;288(20):2569-78. Review.)

190. Calder PC, Grimble RF. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Eur J Clin Nutr.* 2002 Aug;56 Suppl 3:S14-9. Review.)
191. Gil A. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory diseases. *Biomed Pharmacother.* 2002 Oct;56(8):388-96. Review.)
192. Selhub J, Jaques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population *JAMA* 1993;270: 2693–8.)
193. Andersson A, Brattström LE, Israelsson B, Isaksson A, Hamfelt A, Hultberg B. Plasma homocysteine before and after methionine loading with regard to age, gender, and menopausal status. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 79-87.)
194. Jacobsen DW, Gatautis VJ, Green R, Robinson K, Savon SR, Secic M, Ji J, Otto JM, Taylor Jr LM. Rapid HPLC determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma: sex differences and correlation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects *Clin Chem* 1994; 40: 873–81)
195. Ueland PM, Refsum H, Brattström L. Plasma homocysteine and cardiovascular disease. In: Francis Jr RB Ed. *Atherosclerotic cardiovascular disease. Marcel Dekker, Inc. hemostasis, and endothelial function* New York, 1992; 183-236.).
196. de Bree A, Verschuren WM, Kromhout D, Kluijtmans LA, Blom HJ. Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease *Pharmacol Rev* 2002; 54: 599-618).
197. Gueant JL, Anello G, Bosco P, Gueant-Rodriguez RM, Romano A, Barone C, Gerard P, Romano C: Homocysteine and related genetic polymorphisms in Down's syndrome IQ. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2005, 76(5):706-709.//
198. Gueant-Rodriguez RM, Juilliere Y, Nippert M, Abdelmouttaleb I, Herbeth B, Aliot E, Danchin N, Gueant JL: Left ventricular systolic dysfunction is an independent predictor of homocysteine in angiographically documented patients with or without coronary artery lesions. *J Thromb Haemost* 2007, 5(6):1209-1216.]
199. Husemoen LL, Toft U, Fenger M, Jorgensen T, Johansen N, Linneberg A: The association between atopy and factors influencing folate metabolism: is low folate status causally related to the development of atopy? *International journal of epidemiology* 2006, 35(4):954-961.)

200. Lucock M. Folic acid : nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Mol Genet Metab* 2000 ; 71 : 121-38.)
201. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
202. Guillard JC, Lequeu B. Les vitamines: Du nutriment au médicament. *EM internationales*. Paris. 1992. p 357.).
203. Scott JM, Weir DG. Folic acid, homocysteine and one-carbon metabolism: a review of the essential biochemistry *J Cardiovasc Risk* 1998; 5: 223–7.).
204. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. (Guéant JL, Namour F. Vitamin B12: Absorption, metabolism and deficiency. *Encyclopedia of Gastroenterology* 2003; 619-24.).
205. Scott JM, Weir DG. Folic acid, homocysteine and one-carbon metabolism: a review of the essential biochemistry *J Cardiovasc Risk* 1998; 5: 223–7.).
206. Whitrow, M. J., V. M. Moore, et al. (2009). "Effect of supplemental folic acid in pregnancy on childhood asthma: a prospective birth cohort study." *Am J Epidemiol* 170(12): 1486-1493.
207. Bueso, A. K., S. Berntsen, et al. (2011). "Dietary intake in adolescents with asthma--potential for improvement." *Pediatr Allergy Immunol* 22(1 Pt 1): 19-24
208. Thuesen, B. H., L. L. Husemoen, et al. (2010). "Atopy, asthma, and lung function in relation to folate and vitamin B(12) in adults." *Allergy* 65(11): 1446-1454.)
209. Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 1996; 98:5-7.
210. McKenzie SJ, Baker MS, Buffinton GD, Doe WF. Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 1996; 98:136-41.
211. Collins T, Cybulsky MI. NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest* 2001; 107:255-64.
212. Danese S, Sgambato A, Papa A, Scaldaferri F, Pola R, Sans M, Lovecchio M, Gasbarrini G, Cittadini A, Gasbarrini A. Homocysteine triggers mucosal microvascular activation in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100:886-95.
213. Poddar R, Sivasubramanian N, DiBello PM, Robinson K, Jacobsen DW. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. *Circulation* 2001; 103:2717-23.

214. Ratter F, Gassner C, Shatrov V, Lehmann V. Modulation of tumor necrosis factor α -mediated cytotoxicity by changes of the cellular methylation state: mechanism and in vivo relevance. *Int Immunol* 1999; **11**:519-27.
215. Hoffjan S, Nicolae D, Ober C. Association studies for asthma and atopic diseases: a comprehensive review of the literature. *Respiratory research* 2003; **4**:4-14
216. Liu X, Beaty TH, Deindl P, Huang SK, Lau S, Sommerfeld C, Fallin MD, Kao WH, Wahn U, Nickel R. Associations between specific serum IgE response and 6 variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: the German Multicenter Atopy Study. *J All Clin Immunol* 2004; **113**: 489-495.
217. Tossa P, Bohadana A, Demange V, Wild P, Michaely JP, Hannhart B, Paris C, Zmirou-Navier D. Early markers of airways inflammation and occupational asthma: rationale, study design and follow-up rates among bakery, pastry and hairdressing apprentices. *BMC public health* 2009; **9**: 113. doi: 10.1186/1471-2458-9-113
218. Tossa P, Paris C, Zmirou-Navier D, Demange V, Acouetey DS, Michaely JP, Bohadana A. Increase in exhaled nitric oxide is associated with bronchial hyperresponsiveness among apprentices. *Am J Respir Crit Care Med* 2010 **182**: 738-744.
219. Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R, Yernault JC. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J Suppl* 1993; **16**: 5-40.
220. Travers, J., et al., Reference ranges for exhaled nitric oxide derived from a random community survey of adults. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007. **176**(3): p. 238-42.
221. Friedman-Jimenez, G., et al., Clinical evaluation, management, and prevention of work-related asthma. *Am J Ind Med*, 2000. **37**(1): p. 121-41
222. Kopferschmitt-Kubler, M.C., et al., Occupational asthma in France: a 1-yr report of the observatoire National de Asthmes Professionnels project. *Eur Respir J*, 2002. **19**(1): p. 84-9.
223. Hilding, A.C., Simple method for collecting near-normal human nasal secretion. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1972. **81**(3): p. 422-3.

224. Wang, J.H., et al., Effect of six-hour exposure to nitrogen dioxide on early-phase nasal response to allergen challenge in patients with a history of seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*, 1995. **96**(5 Pt 1): p. 669-76.
225. Bosco P, Gueant-Rodriguez RM, Anello G, Romano A, Namour B, Spada RS, Caraci F, Tringali G, Ferri R, Gueant JL. Association of IL-1 RN*2 allele and methionine synthase 2756 AA genotype with dementia severity of sporadic Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; **75**: 1036-1038.
226. Gueant-Rodriguez RM, Gueant JL, Viola M, Tramoy D, Gaeta F, Romano A. Association of tumor necrosis factor-alpha -308G>A polymorphism with IgE-mediated allergy to betalactams in an Italian population. *The pharmacogenomics journal* 2008; **8**: 162-168.
227. Black PN, Sharpe S. Dietary fat and asthma: is there a connection? *Eur Respir J*. 1997 Jan;10(1):6-12.
228. Nurmatov U, Devereux G, Sheikh A. Nutrients and foods for the primary prevention of asthma and allergy: systematic review and meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Mar;127(3):724-33.e1-30. Epub 2010 Dec 24.
229. Gu H, Itoh M, Matsuyama N, Hayashi S, Iimura A, Nakamura Y, Miki T, Takeuchi Y. Toluene diisocyanate exposure induces laryngo-tracheal eosinophilia, which can be ameliorated by supplementation with antioxidant vitamins in guinea pigs. *Acta Otolaryngol*. 2003 Oct;123(8):965-71.
230. Gautrin D, Newman-Taylor AJ, Nordman H, Malo JL. Controversies in epidemiology of occupational asthma. *Eur Respir J*. 2003 Sep;22(3):551-9.
231. Rémen T, Coevoet V, Acouetey DS, Guéant JL, Guéant-Rodriguez RM, Paris C, Zmirou-Navier D. Early incidence of occupational asthma among young bakers, pastry-makers and hairdressers: design of a retrospective cohort study. *BMC Public Health*. 2010 Apr 26;10:206.
232. Kauffmann, F., M. H. Dizier, et al. (2001). "[Epidemiological study of genetic and environmental factors in asthma, bronchial hyperresponsiveness and atopy. Protocol and potential selection bias]." *Rev Epidemiol Sante Publique* 49(4): 343-356.
233. Vandenplas O, Ghezze H, Munoz X, Moscato G, Perfetti L, Lemiere C, Labrecque M, L'Archeveque J, Malo JL: What are the questionnaire items most useful in

- identifying subjects with occupational asthma? *Eur Respir J* 2005, 26(6):1056-1063.
234. Delclos GL, Arif AA, Aday L, Carson A, Lai D, Lusk C, Stock T, Symanski E, Whitehead LW, Benavides FG et al: Validation of an asthma questionnaire for use in healthcare workers. *Occupational and environmental medicine* 2006, 63(3):173-179.
 235. ATS/ERS: ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2005, 171(8):912-930.
 236. Menzies D, Nair A, Lipworth BJ: Portable exhaled nitric oxide measurement: Comparison with the "gold standard" technique. *Chest* 2007, 131(2):410-414.
 237. ATS: Standardization of Spirometry, 1994 Update. American Thoracic Society. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1995, 152(3):1107-1136.
 238. ERS: Recommandations Européennes pour les explorations Fonctionnelles Respiratoires. *Rev Mal; Respir* 2001, 18:6S1- 6S119.
 239. Kesse-Guyot E, Castetbon K, Touvier M, Hercberg S, Galan P. Relative validity and reproducibility of a food frequency questionnaire designed for French adults. *Ann Nutr Metab.* 2010;57(3-4):153-62. Epub 2010 Nov 16.
 240. Levy, M. L., M. Fletcher, et al. (2006). "International Primary Care Respiratory Group (IPCRG) Guidelines: diagnosis of respiratory diseases in primary care." *Prim Care Respir J* 15(1): 20-34.
 241. ACOUETHEY D.S, RODRIGUEZ- GUEANT RM, REMEN T, PARIS C, GUEANT JL, ZMIROU-NAVIER D. Paris 2-5/11/2010. Santé & Environnement : nutrition, vitamines et oligo-éléments. Statut vitaminique et asthme professionnel dans deux métiers à risque: la boulangerie et la coiffure.
 242. Kohansal R, Martinez-Camblor P, Agusti A, Buist AS, Mannino DM, Soriano JB. The natural history of chronic airflow obstruction revisited: an analysis of the Framingham offspring cohort. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180: 3-10.
 243. Christiani DC, Mehta AJ, Yu CL, Genetic susceptibility to occupational exposures. *Occup Environ Med.* 2008 Jun;65(6):430-6; quiz 436, 397. Review.
 244. Mapp CE, Miotto D, Boschetto P *Med Lav. Occupational asthma* 2006 Mar-Apr; 97(2):404-9.).
 245. Sastre J, Vandenplas O, Park HS Pathogenesis of occupational asthma *Eur Respir J.* 2003 Aug;22(2):364-73.

246. Kips JC. Cytokines in asthma. *Eur Respir J Suppl* 2001; 34: 24s-33s.
247. Shin HD, Park BL, Kim LH, Jung JH, Wang HJ, Kim YJ, Park HS, Hong SJ, Choi BW, Kim DJ, Park CS. Association of tumor necrosis factor polymorphisms with asthma and serum total IgE. *Hum. Mol. Genet* 2004; 13: 397-403
248. Matheson JM, Lemus R, Lange RW, Karol MH, Luster MI. Role of tumor necrosis factor in toluene diisocyanate asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* 2002; 27: 396-405.
249. Whelan R, Kim C, Chen M, Leiter J, Grunstein MM, Hakonarson H. Role and regulation of interleukin-1 molecules in pro-asthmatic sensitised airway smooth muscle. *Eur Respir J* 2004; 24: 559-567.
250. Johnson VJ, Yucesoy B, Luster MI. Prevention of IL-1 signaling attenuates airwayhyperresponsiveness and inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 851-858.
251. Ricciardolo FL. Multiple roles of nitric oxide in the airways. *Thorax* 2003; 58: 175-182.
252. Aalto-Korte K, Makinen-Kiljunen S. Specific immunoglobulin E in patients with immediate persulfate hypersensitivity. *Contact Dermatitis* 2003; 49: 22-25.
253. Murr C, Schroecksnadel K, Winkler C, Ledochowski M, Fuchs D. Antioxidants may increase the probability of developing allergic diseases and asthma. *Med Hypotheses*. 2005;64(5):973-7.
254. Romieu I. Nutrition and lung health. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2005 Apr;9(4):362-74.
255. Lemire JM, Archer DC, Beck L, Spiegelberg HL. Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxy vitamin D3: preferential inhibition of Th1 functions. *J Nutr*. 1995;125(suppl):1704S-1708S.
256. De Luca S, Woods RK, Thien FC, Abramson MJ: Dietary marine fatty acids (fish oil) for asthma in adults and children (Cochrane Review). In *The Cochrane Library*, Issue 1. Chichester, UK: John Wiley& Sons, Ltd; 2004.

ANNEXES

Annexe 1 : Estimation de l'incidence de l'asthme professionnel chez les boulangers (synthèse de la littérature)

Pays Auteurs [réf.]	Région/Source	Année(s)	Type de données [▪]	Incidence annuelle (pour 100 000 travailleurs)	IC 95% ns = non spécifié
Finlande					
KARJALAINEN <i>et coll.</i> [1]	-/FROD	1989-95	SMMC	444 (H) - 408 (F)	362-540 (H) - 337-489 (F)
France					
AMEILLE <i>et coll.</i> [2]	-/ONAP	1996-99	PS	68	62-75
Italie					
BENA <i>et coll.</i> [3]	Piémont/ PRiOR	1996-97	PS	54	ns
Norvège					
LEIRA <i>et coll.</i> [4]	-	1995-99	SHR (81%)	247 (H) - 100 (F)	ns
Royaume-Uni					
MEREDITH <i>et coll.</i> [5]	-/SWORD	1989-90	PS	33	25-44
GANNON <i>et coll.</i> [6]	Midlands de l'Ouest /SCHIELD	1989-91	PS	45	12-82
MCDONALD <i>et coll.</i> [7]	-/ SWORD	1992-97	PS	95 ^Δ	62-142
Suède					
BRISMAN <i>et coll.</i> [8]	-	1992	SHR (76%)	297 (H) - 285 (F)	ns
TOREN [9]	-/SRROD	1990-92	PS	78 ^Φ	42-118

[▪] SHR : étude dans des secteurs à haut risque d'AP / SMMC : statistiques médicales, médicolégales et compensatrices / PS : programmes sentinelles

^Δ basé sur une estimation du nombre de cas

^Φ chez les hommes uniquement

Annexe 2 : Estimation de l'incidence de l'asthme professionnel chez les coiffeurs (synthèse de la littérature)

Pays Auteurs [réf.]	Région/Source	Année/Période d'étude	Type de données [□]	Incidence annuelle (pour 100 000 travailleurs)	IC 95% ns = non spécifié
Finlande					
KARJALAINEN <i>et coll.</i> [1]	-/FROD	1989-95	SMMC	33 (H) – 37 (F)	1-186 (H) – 26-51 (F)
LEINO <i>et coll.</i> [10]	-	1980-95	SHR (82%)	218 ^Δ	ns
France					
AMEILLE <i>et coll.</i> [2]	-/ONAP	1996-99	PS	31	26-37
Italie					
BENA <i>et coll.</i> [3]	Piémont/ PRiOR	1996-97	PS	20	ns
Norvège					
LEIRA <i>et coll.</i> [4]	-	1995-99	SHR (81%)	20 (H) - 27 (F)	ns
Royaume-Uni					
MEREDITH <i>et coll.</i> [5]	-/SWORD	1989-90	PS	8	4-13
Suède					
ALBIN <i>et coll.</i> [11]	-	1996	SHR (55%)	1970-80 : 173 ^Δ 1981-90 : 312 ^Δ 1991-96 : 530 ^Δ Total : 390 ^Δ	ns
TOREN [9]	-/SRROD	1990-92	PS	13 ^Φ	2-23

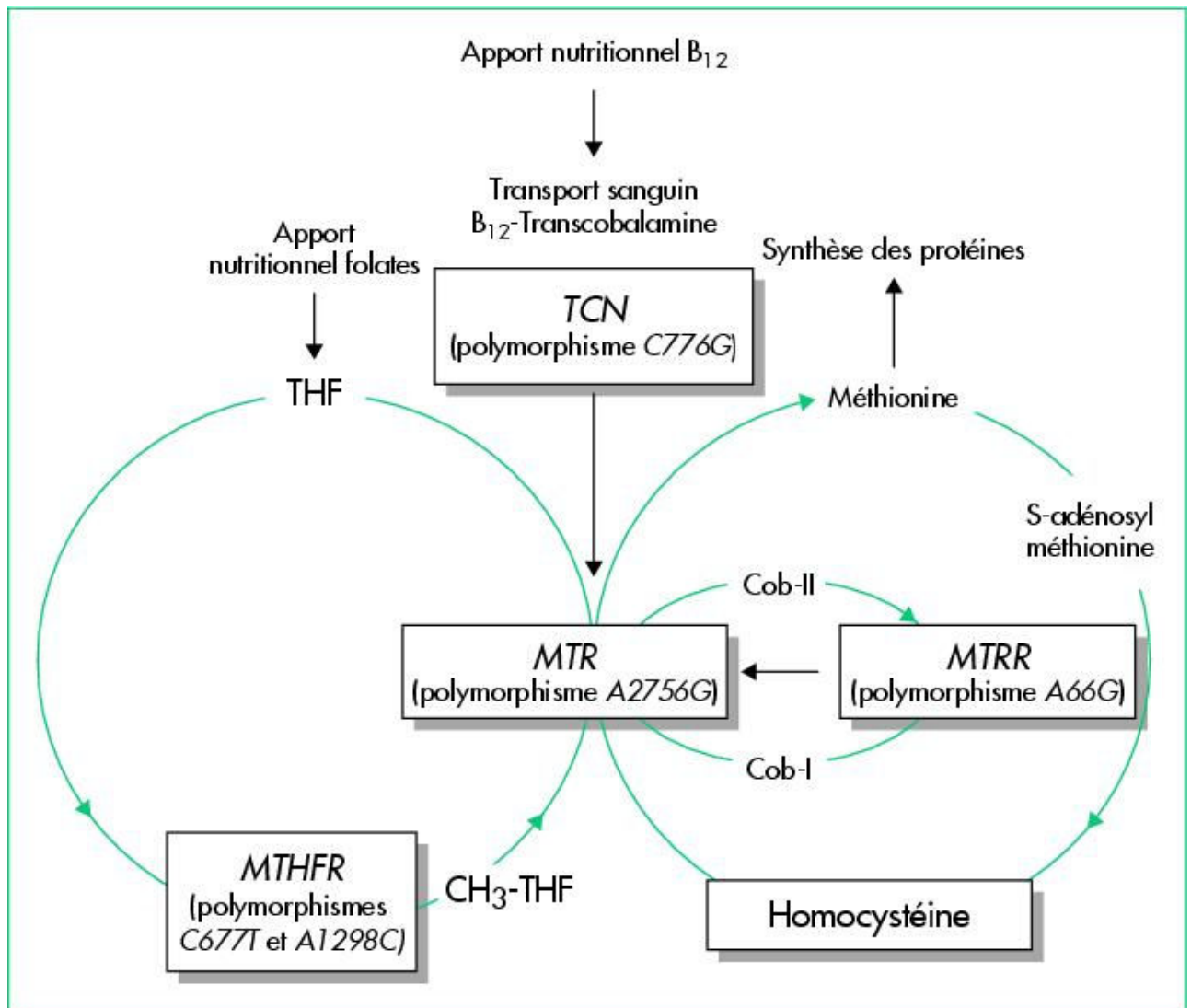
[□] SHR : étude dans des secteurs à haut risque d'AP (taux de participation) / SMMC : statistiques médicales, médicolégales et compensatrices / PS : programmes sentinelles

^Δ Nouveaux cas d'asthme chez les coiffeuses actives sans mise en évidence du caractère professionnel de l'asthme^Φ chez les femmes uniquement

Annexe 3 : Substances nutritives influençant l'incidence de l'asthme [35]

Substances nutritives	Activité et effet potentiel
Vitamines A, C, E	Antioxydants; protection contre l'oxydation et l'inflammation (endogène et exogène)
Vitamine C	Inhibition de la prostaglandine
Vitamine E	Stabilisation de la membrane / inhibition de la production d'IgE
Flavonoïdes	Antioxydants; stabilisation des mastocytes
Magnésium	Détente du muscle lisse / stabilisation des mastocytes
Sélénium	Cofacteur antioxydant dans la glutathion peroxydase
Cuivre, zinc	Cofacteur antioxydant dans la superoxyde dismutase
Acides gras n-3	Substitution des leucotriènes / stabilisation de l'inflammation des membranes cellulaires
Poly-insaturés n-6 / acides gras insaturés	Augmentation de la production des eicosanoïdes
Sodium	Augmentation de la contraction du muscle lisse

Annexe 4 : Cycle des folates et de l'homocystéine



Legende. Métabolisme de l'homocystéine chez l'homme et l'animal (adapté à partir de : *Selhub J.* référence 21). THF : tétrahydrofolate ; PLP :Pyridoxine 5'-phosphate ; SAM : S-adenosyl-méthionine ; B12 : vitamine B12. la 5,10 méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR), la méthionine synthase (MTR), la méthionine synthase réductase (MTRR), la cystathionine-bêta-synthase (CBS) et la transcobalamine (TCN)

Annexe 5: Schéma des visites de l'étude MIBAP



Annexe 6

TECHNIQUE EXTRACTION ADN/LAVAGES NASAUX ADN/LIQUIDES AMNIOTIQUES ADN/SERUMS (KIT AMP QIAGEN DNA BLOOD MINI KIT)

- Mettre le bain-marie à 56°C
- Pipeter 20 µL (40µL) de Protéase dans l'éppendorf .
- Ajouter 200 µL (400 µL) dans le tube du culot de cellules redissout dans du PBS 1X ou RPMI.
- Vortexer 15 secondes.
- Ajouter 200 µL (400µL) de buffer AL.Vortexer 15 secondes.
- Incuber à 56C pendant 10mn.
- Centrifuger brièvement (condensation).
- Ajouter 200 µL (400µL) d'éthanol froid à -20°C à l' échantillon et vortexer 15 secondes.
- Centrifuger brièvement.
- Déposer la mixture dans la colonne placée dans le tube de 2 mL(bien au centre) et centrifuger à 8000rpm une minute.
- Jeter le filtrat.Placer la colonne dans un tube de 2 mL et ajouter 500 µL de buffer AW1 (plus nécessaire de mettre au double) et centrifuger 1 mn à 8000 rpm.
- Jeter le filtrat.Placer la colonne dans un tube de 2 mL et ajouter 500 µL de buffer AW2 de la meme façon que précédemment.
- Centrifuger à 14000 rpm pendant 3 mn .
- Jeter le filtrat.
- Refaire l'étape précédente (facultatif).
- Placer la colonne dans un eppendorf de 1.5 mL(non fourni) et jeter le filtrat.
- Ouvrir la colonne et ajouter 200 µL ou 50µL ou 25 µL pour peu de cellules de buffer AE .
- Incuber à température ambiante 1mn ou mieux 5 mn et centrifuger à 8000 rpm pendant 1 mn.

ANNEXE 7

CHU NANCY Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire Professeur J.L. GUEANT	Procédure de Fonctionnement Général	Version n°1 du 07/09/2007	
	Mode Opérateur de la Technique au LIGHT CYCLER 480 TNF Alpha c.G-308A rs 1800629 Plaque 96 puits	préparé par : RenéeDEBARD Denise FOREST- TRAMOY	validé par: Farès NAMOUR Rosa-Maria GUEANT- RODRIGUEZ

	µl/tube	Concentration finale	MIX (Nb de tubes + 1)
H2O	3		
Amorce TNF A 308 sens à 5picoM/µl 5' AA _g gAA ACA gAC CAC AgA CCT g 3" T _m = 66°C EUROGENTEC	1 (5µL SM200µM +195µL H2O)	0.5µM	
Amorce TNF A 308antisens à 5picoM/µl 5' ggT CTT CTg ggC CAC TgA C 3' T _m = 62°C EUROGENTEC	1 (5µL SM200µM +195µL H2O)	0.5µM	
Probe Sensor(G)TNF A 308Flu à 4picoM/µl 5' AAC CCC gTC CCC ATg CCC C TIBMOLBIOL	0.5 (2µLSM100µM +48µl H2O)	0.2µM	
Probe Anchor LC Red 640 TNF A 308 à 8picoM/µl 5' CAA AAC CTA TTg CCT CCA TTT CTT TTg ggg AC PH TIBMOLBIOL	0.5 (4µLSM100µM +46µl H2O) (ou 2µLSM100µM +23µl H2O)	0.4µM	
Kit LC 480 genotyping 5X (pret à l'emploi)	2	1X	

Déposer 8µl de MIX dans chaque puits et ajouter ensuite 2µl de DNA
(Concentration finale comprise entre 10 et 20 ng/analyse)

Filmer et centrifuger la plaque à 1500g (2730rpm) pendant 2mn (programme 1 centrifugeuse à plaques Eppendorf pièce B 01E1.A027) .

PROGRAMME : TNF Alpha-plaque96-OK		Temps de réaction : environ 1H15	
Detection format : Mono Color HybProbe Selected Filter Combinations : 483-640		Reaction volume : 10µl	
target (°C)	Acquisition Mode = Type	Hold (hh :mm :ss)	Ramp Rate (°C/s) = Pente
DENATURATION		Cycles : 1	Analysis Mode : None
95	None	00 :10 :00	4.4
PCR		Cycles 40	Analysis Mode : Quantification
95	None	00 :00 :10	4.4
57	Single	00 :00 :15	2.2
72	None	00 :00 :10	4.4
COURBES DE FUSION		Cycles : 1	Analysis Mode : Melting curves
95	None	00 :01 :00	4.4
45	None	00 :02 :00	2.2
80	Continuous		
REFROIDISSEMENT		Cycles : 1	Analysis Mode : None
40	None	00 :00 :30	2.2

RESULTATS :

TNF ALPHA-308	génotypage	Températures de fusion (T _m)
Homozygote sauvage LCAT6	GG	67°C
Homozygote muté MIC 365	AA	60°C
Hétérozygote LCAT5	GA	60°C+67°C

CHU NANCY Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire Professeur J.L. GUEANT	Procédure de Fonctionnement Général	Version n°1 du 26/07/2007	
	Mode Opératoire de la Technique au LIGHT CYCLER 480 Interleukine IL4R 576 <i>p.G576R</i> (A -> G)rs 1801275 Plaque 96 puits	préparé par : Mylène BERI	validé par: Farès NAMOUR Rosa-Maria GUEANT- RODRIGUEZ

Composants	µl/tube	Concentration finale	MIX (Nb de tubes + 1)
H2O	3.2		
MgCl2 (25mM)	0.8	2mM	
Amorce IL 4R-576 Sens (5µM) 5'AgC TCT CTg AgC CAA C 3' EUROGENTEC	1 (5µL SM200µM +195µL H2O)	0.5µM	
Amorce IL 4R-576 Antisens (5µM) 5'CTT gTA ACC AgC CTC TCC 3' EUROGENTEC	1 (5µL SM200µM +195µL H2O)	0.5µM	
Probe Flu IL 4R 576 (4µM) 5'ACC CTg CTC CAC CgC AT 3' TIBMOLBIOL	0.5 (2µLSM100µM +48µlH2O)	0.2µM	
Probe LC Red 640 IL 4R 576 (4µM) 5'ACA AAC TCC CgA TAg CCA CTg 3' TIBMOLBIOL	0.5 (2µLSM100µM +48µlH2O)	0.2µM	
Kit LC FastStart DNA MasterHybProbe 10X(pourLC1.2) (60µL de 1b dans 1a)	1	1X	

Déposer 8µl de MIX dans chaque puits et ajouter ensuite 2µl de DNA (concentration comprise entre 10 et 20 ng/analyse)

Filmer et centrifuger la plaque à 1500g (2730rpm) pendant 2mn (programme 1 centrifugeuse à plaques Eppendorf pièce B 01E1.A027) .

PROGRAMME :IL4 R576-plaque96-OK		Temps de réaction :environ 1H15	
Detection format : Mono Color HybProbe		Reaction volume : 10µl	
Selected Filter Combinations : 483-640			
target (°C)	Acquisition Mode = Type	Hold (hh :mm :ss)	Ramp Rate (°C/s) = Pente
DENATURATION		Cycles : 1	Analysis Mode : None
95	None	00 :10 :00	4.4
PCR		Cycles : 50	Analysis Mode : Quantification
95	None	00 :00 :10	4.4
54	Single	00 :00 :15	2.2
72	None	00 :00 :10	4.4
COURBES DE FUSION		Cycles : 1	Analysis Mode : Melting curves
95	None	00 :00 :30	4.4
40	None	00 :01:00	2.2
74	Continuous		
REFROIDISSEMENT		Cycles : 1	Analysis Mode : None
40	None	00 :00 :30	2.2

RESULTATS :

IL 4R - 576	génotypage	Températures de fusion (Tm)
Homozygote sauvage LCAT 45 ou FEPA 006	AA	56°C
Homozygote muté CAMP 28 ou FEPA 018	GG	63°C
Hétérozygote LCAT 37 ou FEPA 001	AG	56°C+63°C

CHU NANCY Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire Professeur J.L. GUEANT	Procédure de Fonctionnement Général	Version n°1 du 26/07/2007	
	Mode Opérateur de la Technique au LIGHT CYCLER 480 Interleukine IL-4R 478 <i>p.S478P</i> (T-> C) rs 1805015 Plaque 96 puits	préparé par : Mylène BERI	validé par: Fares.NAMOUR Rosa.Maria. GUEANT- RODRIGUEZ

Composants	µl/tube	Concentration finale	MIX (Nb de tubes + 1)
H2O	2.8		
MgCl2 (25mM)	1.2	4mM	
Amorce IL4R-478 Sens (5µM) 5'gAg CCA AgT CCT CCT g 3' EUROGENTEC	1 (5µL SM200µM +195µL H2O)	0.5µM	
Amorce IL4R-478 Antisens (5µM) 5'CTC ggg TTC TAC TTC CT 3' EUROGENTEC	1 (5µL SM200µM +195µL H2O)	0.5µM	
Probe Flu IL4R478 (4µM) 5'AgC TTC AgC AAC CCC CT 3' TIBMOBIO	0.5 (2µLSM100µM +48µlH2O)	0.2µM	
Probe LCRed640 IL4R478 (4µM) 5'gCC AgT CAC CgT gTC CCA g 3' TIBMOBIO	0.5 (2µLSM100µM +48µlH2O)	0.2µM	
Kit LC FastStart DNA MasterHybProbe 10X (pourLC1.2) (60µL de 1b dans 1a)	1	1X	

Déposer 8µl de MIX dans chaque puits et ajouter ensuite 2µl de DNA (concentration comprise entre 10 et 20 ng/analyse)

Filmer et centrifuger la plaque à 1500g (2730rpm) pendant 2mn (programme 1 centrifugeuse à plaques Eppendorf pièce B 01E1.A027) .

PROGRAMME : IL 4R478-plaque 96-OK		Temps de réaction : 1H	
Detection format : Mono Color HybProbe Selected Filter Combinations : 483-640		Reaction volume : 10µl	
target (°C)	Acquisition Mode = Type	Hold (hh :mm :ss)	Ramp Rate (°C/s) = Pente
DENATURATION		Cycles : 1	Analysis Mode : None
95	None	00 :10 :00	4.4
PCR		Cycles : 50	Analysis Mode : Quantification
95	None	00 :00 :10	4.4
54	Single	00 :00 :15	2.2
72	None	00 :00 :10	4.4
COURBES DE FUSION		Cycles : 1	Analysis Mode : Melting curves
95	None	00 :00 :30	4.4
40	None	00 :01:00	2.2
74	Continuous		
REFROIDISSEMENT		Cycles : 1	Analysis Mode : None
40	None	00 :00 :30	2.2

RESULTATS :

IL 4R 478	génotypage	Températures de fusion (Tm)
Homozygote sauvage LCAT 45 ou FEPA 001	TT	52°C
Homozygote muté CAMP 5 ou FEPA 018	CC	61°C
Hétérozygote LCAT 37 ou FEPA 004	TC	52°C+61°C

Mylene BERCHU NANCY Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire Professeur J.L. GUEANT	Procédure de Fonctionnement Général	Version n°1 du 03/08/2007	
	Mode Opérateur de la Technique au LIGHT CYCLER 480 Interleukine 13 IL13 130p.R130G (G -> A) rs20541 Plaque 96 puits	<u>préparé par :</u> Mylène BERI	<u>validé par:</u> Farès NAMOUR Rosa-Maria GUEANT- RODRIGUEZ

	µl/tube	Concentration finale	MIX (Nb de tubes+1)
H2O	3		
Amorce IL13-130 Sens (5µM) Tm=50°C 5'TgC ATg TCC gAg ACA C3' EUROGENTEC	1 (5µL SM 200µM +195µL H2O)	0.5 µM	
Amorce IL13-130 AS (5µM) Tm=52°C 5'CTT CCC gCC TAC CCA A3' EUROGENTEC	1 (5µL SM 200µM +195µL H2O)	0.5 µM	
Probe IL13-130 Flu (4µM) 5'CCT gTC TCT CTg CAA ATA ATg ATg CTT TCg T 3' TIBMOLBIOL	0.5 (2µL SM100µM +48µL H2O)	0.2 µM	
Probe IL13-130- LC Red 640 (4µM) 5'gTT TCA gTT gAC CgT CCC T3' TIBMOLBIOL	0.5 (2µL SM100µM +48µL H2O)	0.2 µM	
Kit genotyping 5X (prêt à l'emploi)	2	1X	

Déposer 8µl de MIX dans chaque puits et ajouter ensuite 2µl de DNA
(concentration comprise entre 10 et 20 ng/analyse)

Filmer et centrifuger la plaque à 1500g (2730rpm) pendant 2mn (programme 1 centrifugeuse à plaques Eppendorf pièce B 01E1.A027) .

PROGRAMME :IL13-130-plaque96-OK		Temps de réaction : 1H15	
<u>Detection format</u> : Mono Color HybProbe Selected Filter Combinations : 483-640		Reaction volume : 10µl	
target (°C)	Acquisition Mode = Type	Hold (hh :mm :ss)	Ramp Rate (°C/s) = Pente
DENATURATION		Cycles : 1 Analysis Mode : None	
95	None	00 :10 :00	4.4
PCR		Cycles : 45 Analysis Mode : Quantification	
95	None	00 :00 :10	4.4
54	Single	00 :00 :10	2.2
72	None	00 :00 :10	4.4
COURBES DE FUSION		Cycles : 1 Analysis Mode : Melting curves	
95	None	00 :00 :30	4.4
40	None	00 :01:00	2.2
70	Continuous		
REFROIDISSEMENT		Cycles : 1 Analysis Mode : None	
40	None	00 :00 :30	2.2

RESULTATS :

IL 13 - 130	génotypage	Températures de fusion
Homozygote sauvage LCAT 20 ou FEPA 006	GG	58°C
Homozygote muté LCAT 19 ou FEPA 021	AA	49°C
Hétérozygote LCAT 18 ou FEPA 001	GA	50°C+59°C

CHU NANCY Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire Professeur J.L. GUEANT	Procédure de Fonctionnement Général	Version n°1 du 3/12/2007	
	Mode Opératoire de la Technique au LIGHT CYCLER 480 InterLeukine 5 IL5 -703 C>T PLAQUE 96 PUIITS	préparé par : Denise FOREST- TRAMOY	validé par: Isabelle AIMONE-GASTIN

	µl/tube	Concentration finale	MIX (Nb de tubes + 1)
H2O	0.5		
Amorce IL5S sens à 5pM/µL=5µM 5' TgT gAC CCT TgT CAg AAA gAg 3' Tm 62°C TIBMOLBIOL	1 (5µL SM100µM +95µL H2O)	0.5µM	
Amorce IL5 mismatch antisens Red 640 à 5pM/µL=5µM 5' TgA ggT CTC AAg ATg ATg TXT CAg 3' Tm 66°C TIBMOLBIOL	1 (5µL SM100µM +95µL H2O)	0.5µM	
SENSOR FLU C IL5 à 4µM 5' gAA CAg AAT ACA TAC *AgA TCC Agg AgT -FL 3' TIBMOLBIOL	0.5 (2µL SM100µM +48µL H2O)	0.2µM	
Kit PROBE LC480 2X (prêt à l'emploi)	5	1X	

Déposer 8µl de MIX dans chaque puits et ajouter ensuite 2µl de DNA
(concentration finale comprise entre 10 et 20 ng/analyse)

Filmer et centrifuger la plaque à 1500g (2730rpm) pendant 2mn (programme 1 centrifugeuse à plaques Eppendorf pièce B 01E1.A027) .

PROGRAMME :IL 5 –plaque96-OK		Temps de réaction : environ 1H15	
<u>Detection format</u> : Mono Color HybProbe Selected Filter Combinations : 483-640		Reaction volume : 10µl	
target (°C)	Acquisition Mode = Type	Hold (hh :mm :ss)	Ramp Rate (°C/s) = Pente
DENATURATION		Cycles : 1	Analysis Mode : None
95	None	00 :10 :00	4.4
PCR		Cycles : 45	Analysis Mode : Quantification
95	None	00 :00 :10	4.4
57	Single	00 :00 :15	2.2
72	None	00 :00 : 20	4.4
COURBES DE FUSION		Cycles : 1	Analysis Mode : Melting curves
95	None	00 :00 :30	4.4
40	None	00 :01 :00	2.2
75	Continuous		
REFROIDISSEMENT		Cycles : 1	Analysis Mode : None
40	None	00 :00 :30	2.2

RESULTATS :

IL5 -703		génotypage	Températures de fusion
Homozygote sauvage	LCAT 11	-703 CC	63°C
Homozygote muté	LCAT 12	-703TT	56°C
Hétérozygote	LCAT 32 (ou PHRC 76)	-703CT	56°C+63°C

CHU NANCY Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire Professeur J.L. GUEANT	Procédure de Fonctionnement Général	Version n°1 du 26/01/07	
	Mode Opératoire de la Technique au LIGHT CYCLER 480 InterLeukine 1 alpha IL 1 alpha c.C889T rs1800587 Plaque 96 puits	préparé par : RenéeDEBARD Denise FOREST- TRAMOY	validé par: Farès NAMOUR Rosa-Maria GUEANT- RODRIGUEZ

Composants	µl/tube	Concentration finale	MIX (Nb de tubes + 1)
Amorce sens IL 1 Alpha à 5pM/µl 5'TGTTCTACCACCTGAACCTAGGC3' EUROGENTEC	1 (2.5µL SM200µM +97.5µL H2O)	0.5µM	
Amorce antisens IL 1 Alpha à 5pM/µl 5'TGGCTAAGTTTGGGAATGGAGAT3' EUROGENTEC	1 (2.5µL SM200µM +97.5µL H2O)	0.5µM	
Probe Flu IL Alpha à 4µM 5'GGAAGGCATGGATTTTACATATGAGCC X TIBMOLBIOL	0.5 (2µL SM100µM +48µl H2O)	0.2µM	
Probe LC Red 640 – IL Alpha à 8µM 5'TCAATGATGTTGCCTGATTACTATTATT p TIBMOLBIOL	0.5 (4µL SM100µM +46 µl H2O)	0.4µM	
Kit LC 480 PROBE 2X (prêt à l'emploi)	5	1X	

Déposer 8µl de MIX dans chaque puits et ajouter ensuite 2µl de DNA
(concentration finale comprise entre 10 et 20 ng/analyse)

Filmer et centrifuger la plaque à 1500g (2730rpm) pendant 2mn (programme 1 centrifugeuse à plaques Eppendorf pièce B 01E1.A027).

PROGRAMME :IL1 Alpha-plaque96-OK		Temps de réaction : environ 1H15	
<u>Detection format</u> : Mono Color HybProbe Selected Filter Combinations : 483-640		Reaction volume : 10µl	
target (°C)	Acquisition Mode = Type	Hold (hh :mm :ss)	Ramp Rate (°C/s) = Pente
DENATURATION	Cycles : 1	Analysis Mode : None	
95	None	00 :10 :00	4.4
PCR	Cycles : 50	Analysis Mode : Quantification	
95	None	00 :00 :10	4.4
62	Single	00 :00 :10	2.2
72	None	00 :00 : 20	4.4
COURBES DE FUSION	Cycles : 1	Analysis Mode : Melting curves	
95	None	00 :01 :00	4.4
45	None	00 :02 :00	2.2
62	Continuous		
REFROIDISSEMENT	Cycles : 1	Analysis Mode : None	
40	None	00 :00 :30	2.2

RESULTATS :

IL1 ALPHA		génotypage	Températures de fusion (Tm)
Homozygote sauvage	LCAT 21	CC	52°C
Homozygote muté	MIC 313	TT	57°C
hétérozygote	LCAT 20	CT	52°C+57°C

Annexe 8 : Comparaison internationale des agents étiologiques retrouvés dans l'asthme professionnel
(en % des facteurs causaux recherchés)

PAYS (Région)	Auteur [réf]	Année ou période d'étude	Isocyanates	Farines + Grains + Céréales	Pouss. de bois	Subst. animales	Latex	Soudure	Pdts de coiffure	Aldéhydes
SINGAPOUR	KOR <i>et coll.</i> [12]	1983-99	31,1%	2,2%	4,4%	-	-	22,2%	-	-
CANADA (Québec)	LAGIER <i>et coll.</i> [13]	1986-88	25,2%	13,6%	11,7%	2,8%	-	2,3%	0,5%	0,9% ⁽¹⁾
ETATS-UNIS (Mich.)	ROSENMAN <i>et coll.</i> [14]	1988-94	19,9%	1,9%	0,8%	0,4%	0,7% ⁽²⁾	5,1% ⁽³⁾	0,4%	4,1% ⁽¹⁾
FINLANDE	KARJALAINEN <i>et coll.</i> [1]	1989-95	4,8%	22,3%	2,7%	37,7%	0,3%	4,4%	1,4%	1,8% ⁽¹⁾
ROYAUME-UNI	MCDONALD <i>et coll.</i> [7]	1989-97	16,0%	8,3%	5,0%	7,1%	< 0,1%	4,3% ⁽³⁾	-	1% ⁽¹⁾
CANADA (Clbie-Brit.)	CONTRERAS <i>et coll.</i> [15]	1991	16,2%	4,0%	46,7%	3,2%	-	3,2%	-	-
ETATS-UNIS (Calif.)	REINISCH <i>et coll.</i> [16]	1993-96	1,9%	0,3%	0,9%	2,6%	0,3% ⁽³⁾	1,4%	-	1,2% ⁽⁴⁾
ITALIE (Piémont)	BENA <i>et coll.</i> [3]	1996-97	1,96%	27,0%	1,96%	-	51,0%	-	2,0% ⁽⁵⁾	-
FRANCE	AMEILLE <i>et coll.</i> [2]	1996-99	14,1%	24,7% ⁽⁶⁾	3,7%	1,1%	7,2%	1,7% ⁽³⁾	5,8% ⁽⁵⁾	5,9%
BELGIQUE	VANDENPLAS <i>et coll.</i> [17]	2000-02	17,3%	13,1%	3,1%	4,2%	10,4%	1,9%	4,2% ⁽⁴⁾	0,8%
ALLEMAGNE	LATZA <i>et coll.</i> [18]	2003	6,5%	44,9%	2,2%	1,8%	5,9%	3,4%	7,3%	0,8%

⁽¹⁾ Formaldéhydes

⁽²⁾ Caoutchouc

⁽³⁾ Colophane incluse

⁽⁴⁾ Aldéhydes et acétates

⁽⁵⁾ Persulfates uniquement

⁽⁶⁾ Alpha amylase comprise

Annexe 8 bis : Comparaison internationale des métiers reconnus comme les plus à risque d'AP

° SHR : étude dans des secteurs à haut risque d'AP (taux de participation) / SMMC : statistiques médicales, médicolégales et compensatrices / PS : programmes sentinelles

Pays Auteurs [réf.]	Région (Source)	Année ou Période d'étude	Type d'étude °	Incidence annuelle ▲	Principaux métier à risque (incidence annuelle par secteur ou fréquence des cas rapportés au secteur si incidence indisponible)
Allemagne					
LATZA <i>et coll.</i> [18]	-	2003	SMMC	2,8	BP (39%), Coiffeurs (9%), Grossistes-Revendeurs-Acheteurs (5%) Employés du process chimique (4%), Assistants Médicaux (4%)
Etats-Unis					
ROSENMAN <i>et coll.</i> [14]	Michigan (MDPH)	1989-92	SMMC	3	Métallurgistes-Fondeurs (25), Employés de fabrication automobile (17), Raffineurs (12)
REINISCH <i>et coll.</i> [16]	- (DFRs)	1993-96	PS	2,5	Employés dans le nettoyage / Concierges (63), Pompiers (55), Assistants sociaux (30), Caristes (27)
Finlande					
KARJALAINEN <i>et coll.</i> [1]	- (FROD)	1989-95	SMMC	17,4	BP (423), Peintres (213 [†]), Eleveurs/Fermiers (148), Employés de process chimique (145), Cuisiniers (138)
France					
AMEILLE <i>et coll.</i> [2]	- (ONAP)	1996-99	PS	2,4	BP (68), Peintres (33), Coiffeurs (31), Travailleurs du bois (22), Employés dans le nettoyage (6)
Italie					
BENA <i>et coll.</i> [3]	Piémont (PriOR)	1996-97	PS	2,4	BP (54), Maroquiniers (21), Personnel médical (21), Pharmaciens (20), Coiffeurs (19), Agriculteurs (14)
Norvège					
LEIRA <i>et coll.</i> [4] SLASTAD <i>et coll.</i> [19]	-	1995-99	SHR (81%)	11,5	BP (188), Peintres automobile (153), Soudeurs (130), Personnel de laboratoire (51), Coiffeurs (26)
Royaume-Uni					
MEREDITH <i>et coll.</i> [5]	- (SWORD)	1989-90	PS	2	Peintres (66), Employés de process chimique (36), Employés du plastique (34), BP (33)
MCDONAL <i>et coll.</i> [7]	- (SWORD)	1992-97	PS	3,8	Peintres (97), BP (86), Employés du process chimique (57), Métallurges (57), Employés du plastique (38)
Suède					
TOREN [9]	- (SRROD)	1990-92	PS	8,1	BP (88*), Soudeurs (69*), Employés de process chimique (67), Peintres (59*), Employés du plastique (46)

▲ Incidence annuelle pour 100 000 travailleurs, toutes filières confondues

* Données concernant les hommes uniquement (données non disponibles chez les femmes)

† Excepté peintres en bâtiment

ANNEXE 9

Questionnaire Médical Téléphonique

Identification :

Identifiant : \$\$\$\$

Date : \$\$ / \$\$ / 20\$\$

Enquêteur : \$\$

Médecin (pour la validation): \$\$

1.	Votre sexe : <i>(cocher la bonne réponse)</i>		Masculin U	Féminin U
2.	Date de naissance :		\$\$ / \$\$ / 19\$\$	
3.	Filière de formation en apprentissage : (Plusieurs réponses possibles)	Oui	Non	
3.1.	- Boulangerie	U	U	
3.2.	- Pâtisserie	U	U	
3.3.	- Coiffure	U	U	
3.4.	- Métiers de Bouche	U	U	
3.5.	- Vente	U	U	
3.6.	- Autre : précisez \$\$\$\$\$\$\$\$\$\$\$\$\$\$\$\$\$\$	U	U	
4.	Nombre d'années de formation en apprentissage (dans la filière de formation)	\$		
----- Détail des apprentissages réalisés		Oui	Non	
4.1.	- CAP pendant \$ ans (à cumuler si plusieurs CAP réalisés)	U	U	
4.2.	- Brevet Professionnel (BP) pendant \$ ans (idem)	U	U	
4.3.	- Mention Complémentaire (MC) pendant \$ ans (idem)	U	U	
4.4.	- Brevet Technique des Métiers (BTM) pendant \$ ans (idem)	U	U	
4.5.	- Autres diplômes en apprentissage pendant \$ ans	U	U	
Précisez : \$\$\$\$\$\$\$\$\$\$\$\$\$\$\$\$\$\$				

5.	Date de fin d'apprentissage (<i>mois / année</i>)	\$\$ / 200\$
6.	Date de la 1 ^{ère} embauche après la sortie du CFA (<i>mois / année</i>)	\$\$ / 200\$
7.	Durée totale d'interruption en mois depuis la date de 1 ^{ère} embauche (congé maternité, inactivité, maladie, incapacité...)	\$\$

SYMPTOMES RESPIRATOIRES

Je vais vous poser un certain nombre de questions concernant les éventuels symptômes respiratoires et allergiques que vous avez pu présenter. Seuls les symptômes présents en dehors d'une infection devront être pris en compte.

Veuillez répondre à ces questions par Oui ou Non, et si une question ne vous paraît pas claire, dites le moi.

<i>SIFFLEMENTS</i>		Oui	Non
8.	<u>Depuis votre entrée en apprentissage</u> , avez-vous déjà présenté des sifflements dans la poitrine ?	U	U
Si OUI:			
8.1.	Avez-vous présenté des sifflements dans la poitrine <u>au cours des 12 derniers mois travaillés dans votre secteur de votre formation initiale</u> ?	U	U
8.2.	Avez-vous été essoufflé(e), même légèrement, quand vous aviez ces sifflements ?	U	U
8.3.	Avez-vous eu ces sifflements quand vous n'étiez pas enrhumé(e) ?	U	U

<i>DYSPNEE/ESOUFLEMENTS</i>		Oui	Non
9.	<u>Depuis votre entrée en apprentissage</u> , avez-vous déjà présenté des difficultés pour respirer ?	U	U
Si OUI:			
9.1.	Vous avez ces difficultés : 1 = U continuellement : votre respiration n'étant jamais tout à fait normale 2 = U de façon répétée, mais cela s'arrange toujours complètement 3 = U rarement		
9.2.	Avez-vous eu une crise d'essoufflement au repos, pendant la journée à un moment quelconque <u>au cours des 12 derniers mois travaillés</u> (dans votre secteur de formation initiale) ?	U	U
9.3.	Avez-vous eu une crise d'essoufflement à la suite d'un effort intense, à un moment quelconque <u>au cours des 12 derniers mois travaillés</u> (dans votre secteur de formation initiale) ?	U	U

<i>Douleur thoracique ou gêne thoracique</i>		Oui	Non
10.	<u>Depuis votre entrée en apprentissage</u> , avez-vous déjà eu l'impression que vos poumons sont serrés ?	U	U
11.	<u>Depuis votre entrée en apprentissage</u> , avez-vous déjà eu des brûlures dans les poumons ?	U	U
<i>Si NON aux questions 10 et 11, passez directement à la question 13.</i>			
12.	Si OUI à 10 ou 11 : Avez-vous présenté l'un (au moins) de ces symptômes <u>au cours des 12 derniers mois travaillés</u> (dans votre secteur de formation initiale) ?	U	U

<i>TOUX et EXPECTORATION</i>		Oui	Non
13.	Toussez-vous habituellement (toutes les semaines) en vous levant le matin en hiver ?	U	U
14.	Toussez-vous habituellement (toutes les semaines) pendant la journée ou pendant la nuit en hiver ?	U	U
<i>Si NON aux questions 13 et 14, passez directement à la question 16.</i>			
15.	Si OUI à 13 ou 14 : Toussez-vous comme cela presque tous les jours pendant au moins trois mois de suite chaque année ?	U	U
16.	Crachez-vous habituellement (toutes les semaines) en vous levant le matin en hiver ? (<i>Répondre OUI si vous avez des crachats qui viennent de vos bronches. Si vos crachats viennent uniquement du nez ou de la gorge, répondre NON</i>)	U	U
17.	Crachez-vous habituellement (toutes les semaines) pendant la journée ou pendant la nuit en hiver ?	U	U
<i>Si NON aux questions 16 et 17, passez directement à la question 19.</i>			
18.	Si OUI à 16 ou 17 : Crachez-vous comme cela presque tous les jours pendant au moins trois mois de suite chaque année ?	U	U

<i>PERTE DE LA VOIX</i>		Oui	Non
19.	<u>Depuis votre entrée en apprentissage</u> , avez-vous déjà présenté des épisodes de perte de la voix en dehors d'un rhume ou d'une grippe ?	U	U
19.1.	Si OUI , avez-vous ces épisodes : 1 = U continuellement : votre voix n'étant jamais tout à fait normale 2 = U de façon répétée, mais cela s'arrange toujours complètement 3 = U rarement		
19.2.	Avez-vous présenté de tels épisodes <u>au cours des 12 derniers mois travaillés</u> (dans votre secteur de formation initiale) ?	U	U

25. Avez-vous présenté au moins un de ces symptômes au cours de votre semaine de travail ? (répondre pour les 12 derniers mois travaillés dans la filière de formation)	U	U
<i>Si OUI, existe-t-il une notion de :</i>		
25.1. - Persistance des symptômes après la fin de la journée de travail ?	U	U
25.2. - Amélioration (voire disparition) pendant les week-ends ?	U	U
25.3. - Amélioration (voire disparition) pendant les vacances ?	U	U
25.4. - Réaggravation (voire réapparition) après chaque nouvelle exposition ?	U	U
25.5. - Amélioration quand les fenêtres sont ouvertes ?	U	U

SYMPTOMES ORL

<i>RHINITE ALLERGIQUE</i>													Oui	Non
26. Depuis votre entrée en <u>apprentissage</u> , avez-vous déjà eu <u>des crises d'éternuements</u> en dehors d'un rhume ? <i>(au moins 5 éternuements)</i>													U	U
<i>Si OUI,</i>														
26.1. Cela vous arrive-t-il :														
1 = U moins d'une fois par an														
2 = U plus d'une fois par an														
3 = U plus d'une fois par mois														
4 = U presque tous les jours														
26.2. Avez-vous présenté des crises d'éternuements <u>au cours des 12 derniers mois travaillés</u> (dans votre secteur de formation initiale) ?													U	U
27. Depuis votre entrée en <u>apprentissage</u> , avez-vous habituellement le <u>nez bouché</u> en dehors d'un rhume?													U	U
<i>Si OUI :</i>													Oui	Non
27.1. Cela vous arrive-t-il au moins trois mois de suite chaque année ?													U	U
27.2. Cela vous arrive-t-il plus fréquemment certains mois de l'année ?													U	U
27.3. Si <u>OUI</u> , quel(s) mois ?														
U U U U U U U U U U U U U														
Janvier Février Mars Avril Mai Juin Juillet Août Sept. Octobre Nov. Déc. Tous														

28. Depuis votre entrée en apprentissage, avez-vous habituellement le <u>nez qui coule</u> en dehors d'un rhume?	U	U
<i>Si OUI :</i>	Oui	Non
28.1. Cela vous arrive-t-il au moins trois mois de suite chaque année ?	U	U
28.2. Cela vous arrive-t-il plus fréquemment certains mois de l'année ?	U	U
28.3. Si OUI , quel(s) mois ?		
UUUUUUUUUUUUU JanvierFévrierMarsAvrilMaiJuinJuilletAoûtSept.OctobreNov.Déc.Tous		

CONJONCTIVITE		Oui	Non
29. Depuis votre entrée en apprentissage, avez-vous déjà eu les yeux qui piquent, qui grattent ou qui pleurent en dehors d'un rhume ?		U	U
<i>Si OUI :</i>			
29.1. Cela vous arrive-t-il :			
1 = U	rarement (moins d'une fois par an)		
2 = U	plus d'une fois par an		
3 = U	plus d'une fois par mois		
4 = U	presque tous les jours		
29.2. Cela vous arrive-t-il habituellement			
1 = U	de façon isolée		
2 = U	associée avec le nez bouché ou le nez qui coule		
29.3. Avez-vous eu les yeux qui piquent, qui grattent ou qui pleurent <u>au cours des 12 derniers mois travaillés</u> (dans votre secteur de formation initiale) ?		U	U

SURVENUE DES SYMPTOMES ORL		Oui	Non
30. Parmi les signes ORL évoqués précédemment, certains sont-ils apparus après l'entrée en apprentissage ?		U	U
<i>Si OUI, lesquels ?</i>			
30.1. - Crises d'éternuements		U	U
30.2. - Nez bouché		U	U
30.3. - Nez qui coule		U	U
30.4. - Yeux qui piquent, qui grattent ou qui pleurent		U	U

31. Avez-vous présenté au moins un de ces symptômes au cours de votre semaine de travail ? (répondre pour les 12 derniers mois travaillés dans la filière de formation)	U	U
<i>Si OUI, existe-t-il une notion de :</i>		
31.1. - Persistance des symptômes après la fin de la journée de travail ?	U	U
31.2. - Amélioration (voire disparition) pendant les week-ends ?	U	U
31.3. - Amélioration (voire disparition) pendant les vacances ?	U	U
31.4. - Réaggravation (voire réapparition) après chaque nouvelle exposition ?	U	U
31.5. - Amélioration quand les fenêtres sont ouvertes ?	U	U

SYMPTOMES CUTANES

TROUBLES CUTANES	Oui	Non
32. Depuis votre entrée en apprentissage, avez-vous déjà eu des problèmes de peau ?	U	U
<i>Si NON à la question 32, passez directement à la question 34. Si OUI, avez-vous présenté :</i>		
32.1. - un eczéma	U	U
32.2. - une dermite irritative	U	U
32.3. - une urticaire	U	U
32.4. - un rash cutané (éruption)	U	U
32.5. Cette ou ces allergie(s) cutanée(s) ont-elle(s) été confirmées par un médecin ?	U	U
32.6. Avez-vous présenté ce ou ces problèmes de peau <u>au cours des 12 derniers mois travaillés</u> (dans votre secteur de formation initiale) ?	U	U
33. Parmi les signes cutanés évoqués précédemment, certains sont-ils apparus <u>après</u> l'entrée en apprentissage ?	U	U
<i>Si OUI, lesquels ?</i>	Oui	Non
33.1. - un eczéma	U	U
33.2. - une dermite irritative	U	U
33.3. - une urticaire	U	U
33.4. - un rash cutané (éruption)	U	U

<i>TABAC</i>		Oui	Non
34.	Actuellement fumez vous ? <i>(en moyenne 1 cigarette par jour depuis au moins 1 an)</i>	U	U
<i>Si <u>NON</u> ::</i>			
35.	Etes-vous un ancien fumeur ? <i>(en moyenne 1 cigarette par jour pendant au moins 1 an)</i>	U	U

Merci d'avoir bien voulu répondre à ce questionnaire

ANNEXE 10

Questionnaire Médical

Identification :

Identifiant :

Date : / /

Médecin Investigateur : (initiales)

1.	Votre sexe : (cocher la bonne réponse)	Masculin ☐	Féminin ☐
2.	Date de naissance :	/ /	
3.	Taille (en cm)		
4.	Poids (en kg)		

ANTECEDENTS

ANTECEDENTS PERSONNELS		Oui	Non	NSP
5.	Etes-vous né(e) prématurément (c'est-à-dire au moins un mois avant la date prévue de naissance) ?	☐	☐	☐
Avant l'âge de 16 ans				
6.	Avez-vous eu des sifflements dans la poitrine ?	☐	☐	☐
7.	Avez-vous eu une ou plusieurs maladies broncho-pulmonaires comme une pneumonie, bronchopneumonie, congestion pulmonaire lors d'une grippe ?	☐	☐	☐
8.	Avez-vous eu une bronchite ?	☐	☐	☐
Si OUI combien de fois ?				
8.1.	1 = ☐ 1 fois ou 2			
	2 = ☐ 3 à 9 fois			
	3 = ☐ 10 fois ou plus			

Questionnaire médical

	Oui	Non	NSP																		
9. Avez-vous eu une bronchiolite ?	☐	☐	☐																		
10. Avez-vous eu une bronchite asthmatiforme ?	☐	☐	☐																		
11. Avez-vous eu une otite ?	☐	☐	☐																		
Dans votre vie																					
12. Avez-vous eu la rougeole ?	☐	☐	☐																		
13. Avez-vous eu la coqueluche ?	☐	☐	☐																		
14. Avez-vous eu de l'eczéma dans votre enfance (avant 16 ans) ? (En cas de réponse positive, faire décrire pour authentifier le diagnostic)	☐	☐	☐																		
15. Avez-vous eu de l'eczéma depuis votre enfance (après 16 ans) ? (En cas de réponse positive, faire décrire pour authentifier le diagnostic)	☐	☐	☐																		
Si OUI :																					
15.1. Est-il actuellement en poussée ?	☐	☐	☐																		
Est(était)-il provoqué par :																					
15.2. - un contact avec des lessives	☐	☐	☐																		
15.3. - des colorants	☐	☐	☐																		
15.4. - des huiles minérales	☐	☐	☐																		
15.5. - un contact (ceinture, boucle d'oreille)	☐	☐	☐																		
15.6. - des médicaments → lesquels : <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>																			☐	☐	☐
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>																					
15.7. - autre : <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>																			☐	☐	☐
16. Avez-vous déjà eu de l'urticaire ? (En cas de réponse positive, faire décrire pour authentifier le diagnostic)	☐	☐	☐																		
Si OUI, est (était)-il provoqué par :																					
16.1. - un frottement	☐	☐	☐																		
16.2. - le froid	☐	☐	☐																		
16.3. - l'exercice	☐	☐	☐																		
16.4. - l'alimentation	☐	☐	☐																		
16.5. - l'aspirine	☐	☐	☐																		

Questionnaire médical

		Oui	Non	NSP
16.6.	- certaines saisons	☐	☐	☐
16.7.	- autres raisons : précisez 	☐	☐	☐
17. Avez-vous déjà eu ?				
17.1.	- une rhinite allergique : si OUI , âge de début : ans	☐	☐	☐
17.2.	- une conjonctivite allergique ?	☐	☐	☐
17.3.	- le rhume des foins ?	☐	☐	☐
17.4.	- une sinusite ?	☐	☐	☐
17.5.	- un choc anaphylactique ?	☐	☐	☐
17.6.	- un oedème de Quincke ?	☐	☐	☐
18. Etes-vous allergique aux piqûres d'insectes ?		☐	☐	☐
<i>Si OUI</i>				
18.1.	Pour quel(s) insecte(s)			
<u>Quel genre de réaction(s) avez-vous ?</u>				
18.2.	- des difficultés pour respirer, une sensation d'évanouissement, des nausées ou de la fièvre	☐	☐	☐
18.3.	- une rougeur, démangeaison ou enflure à l'endroit de la piqûre	☐	☐	☐
18.4.	- autres : précisez	☐	☐	☐
19. Avez-vous été opéré pour des polypes dans le nez ?		☐	☐	☐
20. Avez-vous été soigné(e) ou suivi(e) pour :				
20.1.	- une pleurésie	☐	☐	☐
20.2.	- un pneumothorax	☐	☐	☐
20.3.	- une tuberculose pulmonaire	☐	☐	☐
20.4.	- une silicose ou une maladie professionnelle pulmonaire	☐	☐	☐
20.5.	- un accident ou une opération au thorax	☐	☐	☐



Questionnaire médical

	Oui	Non	NSP
20.6. - une déformation thoracique (scoliose, cyphose,...)	☐	☐	☐
20.7. - de l'emphysème	☐	☐	☐
20.8. - de la bronchite chronique	☐	☐	☐
- une autre maladie respiratoire	☐	☐	☐
20.9. Si OUI , précisez :			
20.10. - un ulcère à l'estomac	☐	☐	☐
20.11. - un ulcère au duodénum	☐	☐	☐
20.12. - une maladie cardiovasculaire	☐	☐	☐
- une autre maladie grave	☐	☐	☐
20.13. Si OUI , précisez :			

Questionnaire médical

ANTECEDENTS FAMILIAUX		Votre père			Votre mère			Votre (vos) frère(s) et/ou sœur(s)		
		OUI	NON	NSP	OUI	NON	NSP	OUI	NON	NSP
A-t-il (elle) été déjà soignée par un médecin pour :										
21.	Bronchite chronique	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
22.	Emphysème	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
23.	Pneumothorax	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
24.	Asthme	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
25.	Cancer du poumon	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
26.	Mucoviscidose	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
27.	Autre maladie respiratoire	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Si OUI à « Autre maladie respiratoire », laquelle :										
27.1.	- Père :									
27.2.	- Mère :									
27.3.	- Frère(s) ou sœur(s) :									
28.	Rhinite allergique (rhume des foins)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
29.	Urticaire	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
30.	Sinusite	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
31.	Eczéma dans l'enfance	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

Questionnaire médical

ANTECEDENTS FAMILIAUX (suite)		Votre père			Votre mère			Votre (vos) frère(s) et/ou sœur(s)													
		OUI	NON	NSP	OUI	NON	NSP	OUI	NON	NSP											
32.	Opération des polypes dans le nez	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐											
33.	Soigné(e) pour de l'allergie	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐											
Si OUI à « Soigné(e) pour de l'allergie », précisez la maladie :																					
33.1.	- Père :																				
33.2.	- Mère :																				
33.3.	- Frère(s) ou sœur(s) :																				
34.	Désensibilisation allergique	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐											
35.	(Autre) Maladie grave	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐											
Si OUI à « Maladie grave », laquelle :																					
35.1.	- Père :																				
35.2.	- Mère :																				
35.3.	- Frère(s) ou sœur(s) :																				
36.	Fumeur	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐											
36.1.	Si fumeur : précisez sa consommation (pour les frères et sœurs, cumulez leurs consommations)																				
	1 = légère (1 à 10 cig./jour)	☐			☐			☐													
	2 = moyenne (10 à 20 cig./jour)	☐			☐			☐													
	3 = élevée (> 1 paquet/jour)	☐			☐			☐													
37.	Ex-fumeur	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐											

Questionnaire médical

TABAC		Oui	Non
38.	Fumez-vous ou avez-vous fumé antérieurement une cigarette par jour ou plus pendant au moins un an ?	☐	☐
POUR LES FUMEURS ET LES EX-FUMEURS			
39.	A quel âge avez-vous commencé à fumer ? (<i>en année</i>)		
40.	Durée de consommation (<i>en année</i>) <i>Durée actuelle pour les fumeurs ou ancienne pour les ex-fumeurs (de 1 à 11 mois, coder 0 dans durée)</i>		
41.	Consommation :		
41.1.	- Cigarettes / jour		
41.2.	- Tabac à rouler en grs / semaine		
41.3.	- Cigares / semaine		
41.4.	- Cigarillos / semaine		
41.5.	- Tabac pipe en grs / semaine (1 paquet = 40 ou 50g ou à défaut une pipe = 2 g de tabac)		
42.	Aval(i)ez-vous la fumée ?	☐	☐
43.	<i>Si vous avez arrêté de fumer</i>		
43.1.	Depuis combien de temps avez-vous arrêté ?		
43.2.	Avez-vous arrêté de fumer à cause de vos bronches ?	☐	☐
44.	Avez-vous arrêté ou diminué votre tabagisme parce que vous aviez des troubles tels que toux, crachats, voix enrouée, gorge irritée ?	☐	☐
ENVIRONNEMENT TABAGIQUE			
45.	A part vous-même, combien de personnes vivent actuellement dans le même appartement ou la même maison que vous ?		
45.1.	Parmi celles-ci, combien sont des fumeurs ?		
46.	Le cas échéant, votre conjoint fume-t-il(elle) ou a-t-il (elle) fumé depuis que vous vivez ensemble ?	☐	☐
Si OUI , sa consommation est(était)-elle :			
1 = ☐ légère (moins de 10 cigarettes par jour)			
46.1.	2 = ☐ moyenne (entre 10 et 20 cigarettes par jour)		
3 = ☐ élevée (plus d'un paquet par jour)			

HYPERRACTIVITE RESSENTIE

Cochez (☒) les situations provoquant habituellement les symptômes suivants (En cas de changement, répondre pour les 12 derniers mois. Si les situations décrites ne provoquent habituellement aucun des symptômes décrits, cocher la case aucun symptôme).

	Habituellement aucun symptôme	Quinte de toux	Eternements	Nez qui coule comme de l'eau	Sifflements	Crise d'essoufflements	Yeux qui piquent/pleurent
Pièce enfumée	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Contact air froid	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Effort physique important	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Foin, fleurs coupées	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Animaux	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Poussières	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Exposition professionnelle *	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Pollution atmosphérique	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Temps *	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Emotion	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Vin, alcool	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Aspirine	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Autre *	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

* A précisez si des symptômes sont présents :

– Exposition professionnelle : ☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐

– Temps : ☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐

– Autre : ☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐

SYMPTOMES RESPIRATOIRES

Je vais vous poser un certain nombre de questions concernant les maladies respiratoires et allergiques. Je vous demanderai d'y répondre de façon nette par oui ou par non.

Si une question ne vous paraît pas claire, dites le moi.

TOUX et EXPECTORATION		Oui	Non																	
47.	Toussez-vous <u>habituellement</u> en vous levant (le matin) en hiver?	☐	☐																	
48.	Toussez-vous <u>habituellement</u> pendant la journée ou pendant la nuit en hiver ?	☐	☐																	
49.	Si OUI à 47 ou 48 : Toussez-vous comme cela presque tous les jours pendant trois mois de suite chaque année ?	☐	☐																	
50.	Crachez-vous <u>habituellement</u> en vous levant en hiver ? (Répondre OUI si vous avez des crachats qui viennent de vos bronches. Si vos crachats viennent uniquement du nez ou de la gorge, répondre NON)	☐	☐																	
51.	Crachez-vous <u>habituellement</u> pendant la journée ou pendant la nuit en hiver ?	☐	☐																	
52.	Si OUI à 50 ou 51 : Crachez-vous comme cela presque tous les jours pendant trois mois de suite chaque année ?	☐	☐																	
53.	Dans les trois dernières années, vous est-il arrivé de tousser et de cracher (davantage) pendant au moins trois semaines ?	☐	☐																	
53.1.	Si OUI , cela vous est-il arrivé plus d'une fois ?	☐	☐																	
54.	Lors de ces 12 derniers mois, avez-vous eu une quinte de toux quand vous étiez sur votre lieu de travail ?	☐	☐																	
Si NON à la question 54, passez directement à la question 56. Si OUI , relation avec le travail :		Oui	Non																	
- Aggravation des symptômes au travail :																				
54.1.	• tous les jours ?	☐	☐																	
54.2.	• progressivement au cours de la semaine ?	☐	☐																	
54.3.	• lors du contact ou de l'exposition à un agent spécifique ? Si OUI , le(s)quel(s) : <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr></table>																		☐	☐
54.4.	- Amélioration pendant les week-ends ?	☐	☐																	
54.5.	- Amélioration pendant les vacances ?	☐	☐																	
54.6.	- Réapparition après chaque nouvelle exposition ?	☐	☐																	
54.7.	- Amélioration quand les fenêtres sont ouvertes ?	☐	☐																	

Questionnaire médical

55. Avez-vous manqué des jours de travail à cause de votre toux dans les 12 derniers mois ?	☐	☐
55.1. Si OUI , combien de jours approximativement ?		

SIFFLEMENTS		Oui	Non
56. Avez-vous eu des sifflements dans la poitrine, à un moment quelconque, dans les 12 derniers mois ?	☐	☐	
<i>Si NON à la question 56, passez directement à la question 62.</i> <i>Si OUI, continuez normalement le questionnaire.</i>			
57. Avez-vous été essoufflé(e), même légèrement, quand vous aviez ces sifflements ?	☐	☐	
58. Avez-vous eu ces sifflements quand vous n'étiez pas enrhumé(e) ?	☐	☐	
59. Combien d'épisodes de sifflements vous est-il arrivé lors des 12 derniers mois ? (approximativement)			
60. Lors de ces 12 derniers mois, avez-vous eu une crise de sifflements quand vous étiez sur votre lieu de travail ?	☐	☐	
<i>Si NON à la question 60, passez directement à la question 62.</i> <i>Si OUI, relation avec le travail :</i>		Oui	Non
- Aggravation des symptômes au travail :			
60.1. • tous les jours ?	☐	☐	
60.2. • progressivement au cours de la semaine ?	☐	☐	
60.3. • lors du contact ou de l'exposition à un agent spécifique ?	☐	☐	
Si OUI , le(s)quel(s) :			
60.4. - Amélioration pendant les week-ends ?	☐	☐	
60.5. - Amélioration pendant les vacances ?	☐	☐	
60.6. - Réapparition après chaque nouvelle exposition ?	☐	☐	
60.7. - Amélioration quand les fenêtres sont ouvertes ?	☐	☐	
61. Avez-vous manqué des jours de travail à cause de vos sifflements dans les 12 derniers mois ?	☐	☐	
61.1. Si OUI , combien de jours approximativement ?			

Questionnaire médical

DYSPNEE/ESSOUFLEMENTS		Oui	Non
62. Vous arrive-t-il d'avoir des difficultés pour respirer ?	☐	☐	
62.1. Si OUI , avez-vous ces difficultés : 1 = ☐ continuellement : votre respiration n'étant jamais tout à fait normale 2 = ☐ de façon répétée, mais cela s'arrange toujours complètement 3 = ☐ rarement			
63. Combien de crise(s) d'essoufflement vous est-il arrivé lors des 12 derniers mois ? (mettre 0 si aucune crise)			
64. Si 0 à la question 63 , passez directement à la question 69 . Sinon, continuez normalement le questionnaire		Oui	Non
65. Avez-vous eu une crise d'essoufflement au repos, pendant la journée à un moment quelconque au cours des 12 derniers mois ?	☐	☐	
66. Avez-vous eu une crise d'essoufflement à la suite d'un effort intense, à un moment quelconque au cours des 12 derniers mois ?	☐	☐	
67. Avez-vous eu au cours de ces 12 derniers mois une crise d'essoufflement quand vous étiez sur votre lieu de travail ?	☐	☐	
Si NON à la question 67 , passez directement à la question 69 . Si OUI , relation avec le travail :			
- Aggravation des symptômes au travail :			
67.1. • tous les jours ?	☐	☐	
67.2. • progressivement au cours de la semaine ?	☐	☐	
67.3. • lors du contact ou de l'exposition à un agent spécifique ?	☐	☐	
Si OUI , le(s)quel(s) :			
67.4. - Amélioration pendant les week-ends ?	☐	☐	
67.5. - Amélioration pendant les vacances ?	☐	☐	
67.6. - Réapparition après chaque nouvelle exposition ?	☐	☐	
67.7. - Amélioration quand les fenêtres sont ouvertes ?	☐	☐	
68. Avez-vous manqué des jours de travail à cause de votre essoufflement dans les 12 derniers mois ?	☐	☐	
68.1. Si OUI combien de jours approximativement ?			

Questionnaire médical

Douleur thoracique ou gêne thoracique		Oui	Non
69. Avez-vous déjà eu l'impression que les poumons sont serrés ?	☐	☐	
70. Avez-vous déjà eu des brûlures dans les poumons ?	☐	☐	
<i>Si NON à la question 69 et 70, passez directement à la question 75. Si OUI, continuez normalement le questionnaire.</i>			
71. Cela vous est-il arrivé plus d'une fois <u>au cours des 12 derniers mois</u> ?	☐	☐	
72. Combien de fois cela vous est-il arrivé lors des 12 derniers mois ? (mettre 0 si aucune crise)			
73. Avez-vous eu au cours de ces 12 derniers mois une douleur ou une gêne thoracique quand vous étiez sur votre lieu de travail ?	☐	☐	
<i>Si NON à la question 73, passez directement à la question 75. Si OUI, relation avec le travail :</i>			
- Aggravation des symptômes au travail :			
73.1. • tous les jours ?	☐	☐	
73.2. • progressivement au cours de la semaine ?	☐	☐	
73.3. • lors du contact ou de l'exposition à un agent spécifique ?	☐	☐	
Si OUI , le(s)quel(s) :			
73.4. - Amélioration pendant les week-ends ?	☐	☐	
73.5. - Amélioration pendant les vacances ?	☐	☐	
73.6. - Réapparition après chaque nouvelle exposition ?	☐	☐	
73.7. - Amélioration quand les fenêtres sont ouvertes ?	☐	☐	
74. Avez-vous manqué des jours de travail à cause de cette douleur ou gêne thoracique dans les 12 derniers mois ?	☐	☐	
74.1. Si OUI combien de jours approximativement ?			

ASTHME : historique et description des crises des 12 derniers mois <i>(Si vos crises ont cessé, répondre pour la période où vous aviez des crises)</i>		Oui	Non
75. Avez-vous déjà eu des crises d'étouffement au repos avec des sifflements dans la poitrine ?	☐	☐	
76. Avez-vous déjà eu des crises d'asthme ?	☐	☐	
Si <u>OUI</u> à la question 75 ou 76, remplissez le questionnaire concernant l'asthme			

EPISODES NOCTURNES	Oui	Non
77. Avez-vous été réveillé durant la nuit par une attaque ou un épisode de l'un des symptômes respiratoires suivants au cours des 12 derniers mois	☐	☐
<i>Si OUI : quel(s) symptôme(s) ?</i>		
77.1. - Quinte de toux	☐	☐
77.2. - Essoufflement	☐	☐
77.3. - Sifflement	☐	☐
77.4. - Douleur thoracique ou gêne thoracique	☐	☐

SURVENUE DES SYMPTOMES RESPIRATOIRES	Oui	Non
78. Parmi les signes respiratoires évoqués précédemment (voir ci-après), certains sont-ils apparus après l'entrée en apprentissage ?	☐	☐
<i>Si OUI, lesquels ?</i>	Oui	Non
78.1. - Toux et expectorations	☐	☐
78.2. - Sifflements	☐	☐
78.3. - Essoufflements	☐	☐
78.4. - Douleur ou gêne thoracique	☐	☐
78.5. - Asthme	☐	☐
78.6. Ces symptômes sont-ils apparus - au cours de la période d'apprentissage ? Si OUI , combien de temps après le début de l'apprentissage ? (en mois) - après la fin de l'apprentissage ? Si OUI , précisez la date des premiers symptômes : (mois) / (année)	☐	☐

SYMPTOMES ORL

RHINITE ALLERGIQUE	Oui	Non
79. Avez-vous déjà eu quand vous n'étiez pas enrhumé(e) <u>des crises d'éternuements</u> ? (au moins 5 éternuements)	☐	☐
<i>Si OUI, cela vous arrive-t-il :</i>		

Questionnaire médical

79.1. 1 = ☐ rarement (moins d'une fois par an) 2 = ☐ plus d'une fois par an 3 = ☐ plus d'une fois par mois 4 = ☐ presque tous les jours		
80. Quand vous n'êtes pas enrhumé(e), avez-vous habituellement le <u>nez bouché</u> ?	☐	☐
Si OUI :	Oui	Non
80.1. Cela vous arrive-t-il trois mois de suite chaque année ?	☐	☐
80.2. Cela vous arrive-t-il plus fréquemment certains mois de l'année ?	☐	☐
80.3. Si OUI , quel(s) mois ? ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ Janvier – Février – Mars – Avril – Mai – Juin – Juillet – Août – Septembre – Octobre – Novembre – Décembre		
81. Quand vous n'êtes pas enrhumé(e) avez-vous habituellement le <u>nez qui coule</u> comme de l'eau ?	☐	☐
Si OUI :	Oui	Non
81.1. Cela vous arrive-t-il trois mois de suite chaque année ?	☐	☐
81.2. Cela vous arrive-t-il plus fréquemment certains mois de l'année ?	☐	☐
81.3. Si OUI , quel(s) mois ? ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ Janvier – Février – Mars – Avril – Mai – Juin – Juillet – Août – Septembre – Octobre – Novembre – Décembre		
82. Avez-vous eu au cours de ces 12 derniers mois un ou plusieurs des symptômes de la rhinite allergique (voir ci-dessous) quand vous étiez sur votre lieu de travail ?	☐	☐
Si NON à la question 82 , passez directement à la question 84 . Si OUI , le(s)quel(s) ?		
82.1. - Crises d'éternuements	☐	☐
82.2. - Nez bouché	☐	☐
82.3. - Nez qui coule	☐	☐
Concernant toujours la rhinite survenue sur le lieu de travail :		
- Aggravation des symptômes au travail :	Oui	Non
82.4. • tous les jours ?	☐	☐
82.5. • progressivement au cours de la semaine ?	☐	☐
82.6. • lors du contact ou de l'exposition à un agent spécifique ?	☐	☐
Si OUI , le(s)quel(s) : ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐		



Questionnaire médical

82.7. - Amélioration pendant les week-ends ?	☐	☐
82.8. - Amélioration pendant les vacances ?	☐	☐
82.9. - Réapparition après chaque nouvelle exposition ?	☐	☐
82.10 - Amélioration quand les fenêtres sont ouvertes ?	☐	☐
83. Avez-vous manqué des jours de travail pour cause de rhinite allergique dans les 12 derniers mois ?	☐	☐
83.1. Si OUI , combien de jours approximativement ?		

CONJONCTIVITE		Oui	Non
84. Avez-vous déjà eu les yeux qui piquent ou qui pleurent quand vous n'êtes pas enrhumé(e) ?	☐	☐	
<i>Si OUI :</i>			
84.1. Cela vous arrive-t-il :			
1 = ☐ rarement (moins d'une fois par an)			
2 = ☐ plus d'une fois par an			
3 = ☐ plus d'une fois par mois			
4 = ☐ presque tous les jours			
84.2. Cela vous arrive-t-il habituellement			
1 = ☐ de façon isolée			
2 = ☐ associée avec le nez bouché ou le nez qui coule			
85. Avez-vous eu au cours de ces 12 derniers mois les yeux qui piquent ou qui pleurent quand vous étiez sur votre lieu de travail ?	☐	☐	
<i>Si NON à la question 85, passez directement à la question 87.</i>			
<i>Si OUI, relation avec le travail :</i>			
- Aggravation des symptômes au travail :			
85.1. • tous les jours ?	☐	☐	
85.2. • progressivement au cours de la semaine ?	☐	☐	
85.3. • lors du contact ou de l'exposition à un agent spécifique ?	☐	☐	
Si OUI , le(s)quel(s) :			
85.4. - Amélioration pendant les week-ends ?	☐	☐	
85.5. - Amélioration pendant les vacances ?	☐	☐	

Questionnaire médical

85.6. - Réapparition après chaque nouvelle exposition ?	☐	☐
85.7. - Amélioration quand les fenêtres sont ouvertes ?	☐	☐
86. Avez-vous manqué des jours de travail pour cause de conjonctivite dans les 12 derniers mois ?	☐	☐
86.1. Si <u>OUI</u> , combien de jours approximativement ?		

SURVENUE DES SYMPTOMES ORL		Oui	Non
87. Parmi les signes ORL évoqués précédemment (voir ci-dessous), certains sont-ils apparus après l'entrée en apprentissage ?		☐	☐
Si OUI , lesquels ?			
87.1. - Rhinite allergique		☐	☐
87.2. - Conjonctivite		☐	☐
87.3. Ces symptômes sont-ils apparus - <u>au cours de la période d'apprentissage</u> ? Si <u>OUI</u> , combien de temps après le début de l'apprentissage ? (en mois) - <u>après la fin de l'apprentissage</u> ? Si <u>OUI</u> , précisez la date des premiers symptômes : (mois) / (année)		☐	☐

SYMPTOMES CUTANES

TROUBLES CUTANES		Oui	Non
88. Avez-vous déjà eu des problèmes de peau dans les 12 derniers mois ?		☐	☐
Si <u>NON</u> à la question 88, passez directement à la question <u>92</u> . Si <u>OUI</u> , le(s)quel(s) ?			
88.1. - un eczéma		☐	☐
88.2. - une dermite irritative		☐	☐
88.3. - une urticaire		☐	☐
88.4. Cette ou ces allergies ont-elle(s) été confirmées par un médecin ?		☐	☐



89. Survenue des troubles cutanés :		Oui	Non
Ces symptômes sont-ils apparus - <u>au cours de la période d'apprentissage</u> ? Si <u>OUI</u> , combien de temps après le début de l'apprentissage ? (en mois)		☐	
89.1. - <u>après la fin de l'apprentissage</u> ? Si <u>OUI</u> , précisez la date des premiers symptômes : (mois) / (année)		☐	
90. Concernant le(s) trouble(s) cutané(s) survenu(s) éventuellement sur le lieu de travail :			
- Aggravation des symptômes au travail :			
90.1.	• tous les jours ?	☐	☐
90.2.	• progressivement au cours de la semaine ?	☐	☐
• lors du contact ou de l'exposition à un agent spécifique ?		☐	☐
90.3.	Si <u>OUI</u> , le(s)quel(s) :		
90.4.	- Amélioration pendant les week-ends ?	☐	☐
90.5.	- Amélioration pendant les vacances ?	☐	☐
90.6.	- Réapparition après chaque nouvelle exposition ?	☐	☐
91.	Avez-vous manqué des jours de travail pour cause de problèmes de peau dans les 12 derniers mois ?	☐	☐
91.1.	Si <u>OUI</u> , combien de jours approximativement ?		

EN VUE DE L'EXPLORATION FONCTIONNELLE		Oui	Non
92.	Actuellement, êtes-vous enrhumé ?	☐	☐
93.	Actuellement, toussiez-vous ?	☐	☐
94.	Actuellement, crachez-vous ?	☐	☐
95.	Concernant votre éventuel tabagisme : aujourd'hui, depuis votre réveil, avez-vous fumé ?	☐	☐
95.1.	Si <u>OUI</u> , combien de cigarettes ?		
95.2.	A quelle heure avez-vous fumé pour la dernière fois ? :		
96.	Le cas échéant, avez-vous eu une crise d'asthme dans les 3 derniers jours ?	☐	☐

97. Avez-vous pris des médicaments dans les dernières 48 heures (y compris gouttes dans le nez, aérosols)	☐	☐
Si OUI , lesquels ? <table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse; width: 200px; height: 20px; vertical-align: middle;"></table>		
97.1. <table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse; width: 200px; height: 20px; vertical-align: middle;"></table>		

AUSCULTATION PULMONAIRE	
	Résultat :
	0 = ☐ Rien
98.	1 = ☐ Ronchi
	2 = ☐ Sibilances
	3 = ☐ Ronchi + sibilances

COURBE DEBIT - VOLUME	
Coopération :	
99.	1 = ☐ Bonne
	2 = ☐ Inacceptable

TOUX	Oui	Non
100 Toux pendant EFR initiale ?	☐	☐

<i>HORS ENQUETE</i>	Oui	Non
101 Bonne coopération du sujet ?	☐	☐

REMARQUES GENERALES	

Merci d'avoir bien voulu répondre à ce questionnaire



ANNEXE 11



Questionnaire Alimentaire

Ne pas compléter

Numéro d'identifiant :

Date de la visite : / /

Date de remplissage : / /

Avant de commencer à remplir le questionnaire

Merci de lire le fascicule :

« Le questionnaire alimentaire : Comment ça marche ? »

A - QUESTIONNAIRE ALIMENTAIRE

A1 - Au cours des 12 derniers mois, à quelle fréquence avez-vous consommé :

PAIN ET CEREALES	FREQUENCE				
	par jour	par semaine	par mois	par an	jamais
¼ de baguette de pain blanc, une tranche de pain de mie (<i>y compris dans les sandwiches</i>)					☐
¼ de baguette de pain complet ou aux céréales, une tranche de pain complet ou aux céréales (<i>y compris dans les sandwiches</i>)					☐
1 biscotte, petit-grillé ou cracotte					☐
1 part de céréales de type petit déjeuner (<i>corn-flakes, cheerios, au chocolat, muesli, etc.</i>)					☐
1 viennoiserie (<i>croissant, pain au chocolat, etc.</i>)					☐
1 brioche (<i>individuelle ou en tranche</i>)					☐

A2. Si vous mangez des céréales, citez la ou les marque(s) et dénomination(s) exacte(s) que vous consommez le plus fréquemment :

Marque

Nom du produit

Produit 1		
Produit 2		

A3 - Au cours des 12 derniers mois, à quelle fréquence avez-vous consommé :

CONFITURE, SUCRE, MIEL	FREQUENCE MOYENNE				
	par jour	par semaine	par mois	par an	jamais
1 cuillerée à café de miel, confiture ou marmelade					☐
1 cuillerée à café de Nutella					☐
1 morceau ou cuillerée à café de sucre (<i>hors édulcorant</i>) (<i>dans le café, le thé ou dans les yaourts, etc.</i>)					☐

N'oubliez pas de mettre un **chiffre** quand il y a une consommation et n'oubliez pas de vérifier que vous avez rempli chaque ligne de chaque tableau

A4 - Au cours des 12 derniers mois, à quelle fréquence avez-vous consommé :

BOISSONS CHAUDES	FREQUENCE MOYENNE				
	par jour	par semaine	par mois	par an	jamais
1 tasse de café au lait					☐
1 tasse de café noir					☐
1 tasse de chicorée au lait					☐
1 tasse de chicorée nature					☐
1 tasse de chocolat chaud					☐
1 tasse de thé nature ou au citron					☐
1 tasse d'infusion nature ou au citron					☐
1 tasse de thé au lait					☐

A5. Si vous buvez du chocolat, citez la ou les marque(s) et dénomination(s) exacte(s) que vous consommez le plus fréquemment :

Marque

Nom du produit

Produit 1

Produit 2

A6 - Au cours des 12 derniers mois, à quelle fréquence avez-vous consommé :

LAIT (hors café, thé, chocolat, chicorée)	FREQUENCE MOYENNE				
	par jour	par semaine	par mois	par an	jamais
1 bol de lait entier					☐
1 bol de lait demi-écrémé					☐
1 bol de lait écrémé					☐

N'oubliez pas de mettre un **chiffre** quand il y a une consommation et n'oubliez pas de vérifier que vous avez rempli chaque ligne de chaque tableau

1 bol de lait fermenté					☐
1 bol de lait de soja					☐

A7. Si vous buvez du lait, citez la ou les marque(s) et dénomination(s) exacte(s) que vous consommez le plus fréquemment :

	Marque	Nom du produit
Produit 1		
Produit 2		

A8 - Au cours des 12 derniers mois, à quelle fréquence avez-vous consommé :

YAOURTS	FREQUENCE MOYENNE				
	par jour	par semaine	par mois	par an	jamais
1 yaourt au lait entier nature					☐
1 yaourt au lait entier aux fruits, aromatisé, sucré					☐
1 yaourt au lait ½ écrémé nature					☐
1 yaourt au lait ½ écrémé aux fruits, aromatisé, sucré					☐
1 yaourt à 0% de matière grasse nature					☐
1 yaourt à 0% de matière grasse aux fruits, aromatisé, sucré					☐
1 yaourt à 0% de matière grasse à l'aspartame et aux fruits (<i>type Taillefine, Panier de Yoplait 0%</i>)					☐
1 yaourt au bifidus (<i>type Bio</i>)					☐
1 yaourt au soja					☐

N'oubliez pas de mettre un **chiffre** quand il y a une consommation et n'oubliez pas de vérifier que vous avez rempli chaque ligne de chaque tableau

A9 - Au cours des 12 derniers mois, à quelle fréquence avez-vous consommé :

FROMAGE BLANC	FREQUENCE MOYENNE				
	par jour	par semaine	par mois	par an	jamais
½ bol de fromage blanc à 0% de matière grasse nature	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
½ bol de fromage blanc à 0% de matière grasse aux fruits, aromatisé, sucré	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
½ bol de fromage blanc à 0% de matière grasse aux fruits, à l'aspartame (<i>type Taillefine</i>)	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
½ bol de fromage blanc à 20% de matière grasse nature	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
½ bol de fromage blanc à 20% de matière grasse aux fruits, aromatisé, sucré	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
½ bol de fromage blanc à 40% de matière grasse nature	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
½ bol de fromage blanc à 40% de matière grasse aux fruits, aromatisé, sucré	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 Petit suisse (<i>nature, Petits filous, Petits musclés, etc.</i>)	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐

A10. Si vous mangez des yaourts ou petits suisses, citez la ou les marque(s) et dénomination(s) exacte(s) que vous consommez le plus fréquemment :

Marque

Nom du produit

Produit 1

Produit 2

N'oubliez pas de mettre un **chiffre** quand il y a une consommation et n'oubliez pas de vérifier que vous avez rempli chaque ligne de chaque tableau

A11 - Au cours des 12 derniers mois, à quelle fréquence avez-vous consommé :

CREMES ET ENTREMETS	FREQUENCE MOYENNE				
	par jour	par semaine	par mois	par an	jamais
1 cuillère à soupe de crème fraîche entière (dans une tarte, dans un plat, etc.)					☐
1 cuillère à soupe de crème fraîche allégée (dans une tarte, dans un plat, etc.)					☐
1 cuillère à soupe de crème chantilly					☐
1 coupe d'entremet (y compris maison) (crème dessert type Danette, Liégeois, mousse, etc.)					☐
1 coupe de crème caramel, crème brûlée, crème anglaise					☐

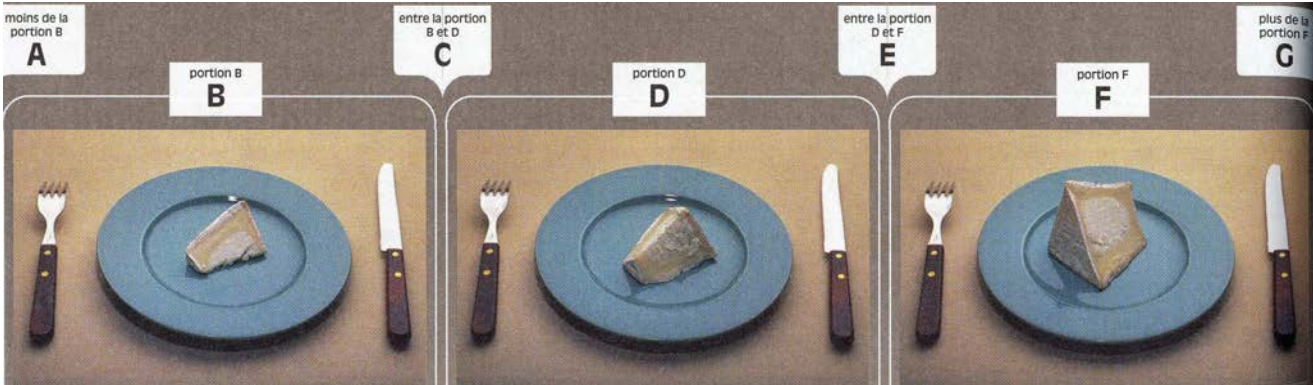
A12 - Au cours des 12 derniers mois, à quelle fréquence avez-vous consommé :

FROMAGE (lors d'un repas ou dans un sandwich) 	FREQUENCE MOYENNE				
	par jour	par semaine	par mois	par an	jamais
fromage fondu (La vache-qui-rit, Apéricubes, etc.)					☐
Bleu, Roquefort, Gorgonzola					☐
Brie, Camembert, Munster, Pont-l'Évêque, fromage type Caprice des Dieux					☐
fromage de chèvre					☐
Gouda, Emmental, Gruyère, Comté, Beaufort, Parmesan, Bonbel, Babybel, Port-Salut, Saint-Paulin (en morceau ou râpé)					☐
Edam, Mimolette					☐
Mozzarella, Feta, Mascarpone					☐
fromage allégé					☐
fromage frais (Tartare, Kiri, Boursin, St. Môret, etc.)					☐

N'oubliez pas de mettre un **chiffre** quand il y a une consommation et n'oubliez pas de vérifier que vous avez rempli chaque ligne de chaque tableau

 Regardez la photo ci-dessous : quand vous mangez du fromage en général, quelle quantité moyenne en mangez vous ? Cochez la lettre qui correspond à la portion de fromage que vous mangez en moyenne (cochez une seule case) :

A	B	C	D	E	F	G
☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐



A13 - Au cours des 12 derniers mois, à quelle fréquence avez-vous consommé :

CHARCUTERIE (lors d'un repas ou dans un sandwich)	FREQUENCE MOYENNE				
	par jour	par semaine	par mois	par an	jamais
1 tranche de jambon blanc	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 tranche de jambon cru ou de bacon	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 tranche de saucisson sec	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 tranche de cervelas	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 tranche de mortadelle	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
pâté 	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
rillettes 	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐

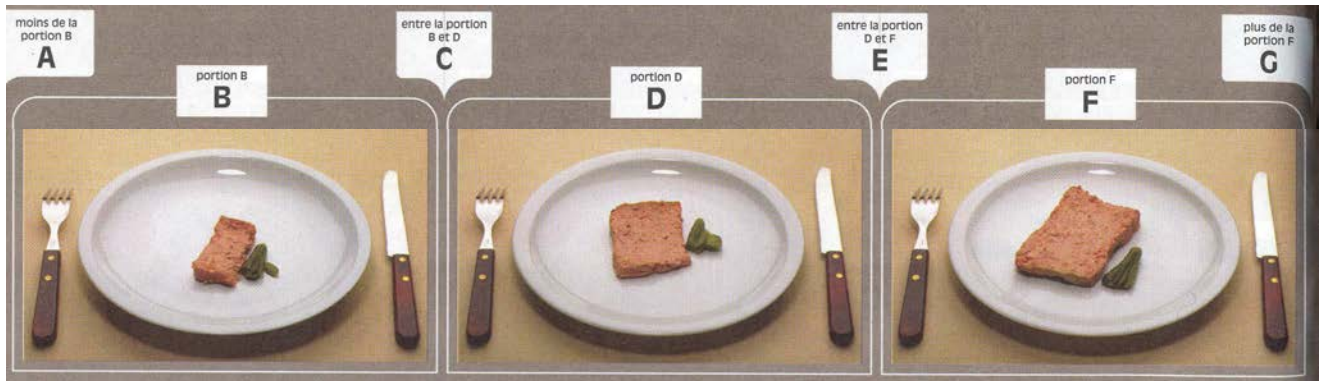
N'oubliez pas de mettre un chiffre quand il y a une consommation et n'oubliez pas de vérifier que vous avez rempli chaque ligne de chaque tableau



Si vous avez coché pâté ou rillettes :

Regardez la photo ci-dessous : quand vous mangez du pâté ou des rillettes en général, quelle quantité moyenne en mangez vous ? Cochez la lettre qui correspond à la portion de pâté ou de rillettes que vous mangez (cochez une seule case) :

A	B	C	D	E	F	G
☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐



A14 - Au cours des 12 derniers mois, à quelle fréquence avez-vous consommé :

OEUFS	FREQUENCE MOYENNE				
	par jour	par semaine	par mois	par an	jamais
1 oeuf à la coque, dur ou poché	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 oeuf sur le plat ou en omelette	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐

A15. Si vous mangez des œufs enrichis, citez la marque ou la dénomination exacte du produit :

Marque ou dénomination du produit

Produit

A16 - Au cours des 12 derniers mois, à quelle fréquence avez-vous consommé :

PLATS GARNIS, COMPOSES, FOURRES (du commerce ou maison)	FREQUENCE MOYENNE				
	par jour	par semaine	par mois	par an	jamais
1 crêpe salée garnie	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 part de quiche ou de tarte salée	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐

N'oubliez pas de mettre un **chiffre** quand il y a une consommation et n'oubliez pas de vérifier que vous avez rempli chaque ligne de chaque tableau

1 croque-monsieur					☐
1 part de pizza					☐
1 assiette de raviolis ou de lasagnes					☐
1 sandwich grec/turc					☐
1 plat chinois/vietnamien					☐
1 hamburger					☐
1 panini					☐
1 assiette de choucroute garnie					☐
1 assiette de cassoulet					☐

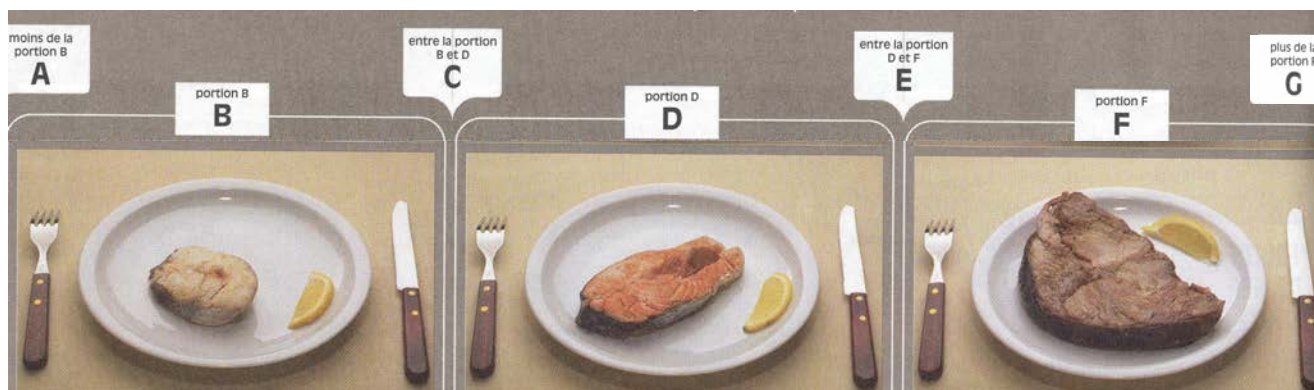
A17 - Au cours des 12 derniers mois, à quelle fréquence avez-vous consommé :

POISSON	FREQUENCE MOYENNE				
	par jour	par semaine	par mois	par an	jamais
1 assiette de fruits de mer (<i>coquillages et crustacés</i>)					☐
1 portion de 3 bâtonnets de poisson pané					☐
1 portion de poisson 'gras' (<i>maquereau, hareng, anguille, sardine, saumon</i>) 					☐
1 portion de poisson 'mi-gras' (<i>anchois, bar, carpe, espadon, flétan, rouget, roussette, thon, mulot, truite, turbot</i>) 					☐
1 portion de poisson 'maigre' (<i>les autres espèces, comme cabillaud, colin, merlan, sole</i>) 					☐

N'oubliez pas de mettre un **chiffre** quand il y a une consommation et n'oubliez pas de vérifier que vous avez rempli chaque ligne de chaque tableau

 **Regardez la photo ci-dessous : quand vous mangez du poisson en général, quelle quantité moyenne en mangez-vous ? Cochez la lettre qui correspond à la portion de poisson que vous mangez en moyenne (cochez une seule case) :**

A **B** **C** **D** **E** **F** **G**
☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐



A18 - Au cours des 12 derniers mois, à quelle fréquence avez-vous consommé :

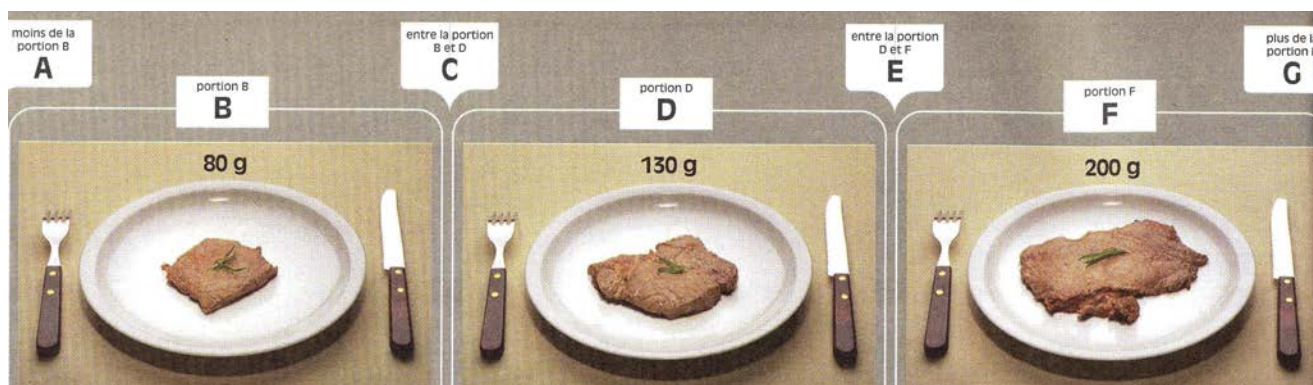
VIANDE OU CHARCUTERIE CHAUDE 	FREQUENCE MOYENNE				
	par jour	par semaine	par mois	par an	jamais
lapin ou volaille sans la peau (<i>dinde, poulet, canard, etc.</i>)	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
volaille avec la peau (<i>dinde, poulet, canard, etc.</i>)	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
steak haché	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
rôti ou steak de bœuf	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
côte ou entrecôte de bœuf	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
bœuf à la bourguignonne (<i>ou braisé</i>)	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
pot-au-feu	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
escalope de veau	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
rôti de veau	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
côte de veau	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
sauté de veau, blanquette, osso-bucco	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐

N'oubliez pas de mettre un **chiffre** quand il y a une consommation et n'oubliez pas de vérifier que vous avez rempli chaque ligne de chaque tableau

côte d'agneau	☐	☐	☐	☐	☐
épaule ou gigot d'agneau	☐	☐	☐	☐	☐
sauté d'agneau, navarin, couscous, etc.	☐	☐	☐	☐	☐
côte ou grillade de porc	☐	☐	☐	☐	☐
rôti de porc	☐	☐	☐	☐	☐
échine ou travers de porc	☐	☐	☐	☐	☐
filet mignon de porc	☐	☐	☐	☐	☐
lardons (<i>dans une salade ou dans un plat</i>)	☐	☐	☐	☐	☐
saucisse (<i>merguez, chipolatas</i>)	☐	☐	☐	☐	☐
foie (<i>génisse, veau, volaille, etc.</i>)	☐	☐	☐	☐	☐
autres abats (<i>rognons, tripes, boudin, andouillette, etc.</i>)	☐	☐	☐	☐	☐
viande panée (<i>cordon bleu, escalope panée</i>)	☐	☐	☐	☐	☐

 **Regardez la photo ci-dessous : quand vous mangez de la viande en général, quelle quantité moyenne en mangez-vous ? Cochez la lettre qui correspond à la portion de viande que vous mangez en moyenne (cochez une seule case) :**

A ☐
B ☐
C ☐
D ☐
E ☐
F ☐
G ☐



N'oubliez pas de mettre un **chiffre** quand il y a une consommation et n'oubliez pas de vérifier que vous avez rempli **chaque ligne de chaque tableau**

A19 - Au cours des 12 derniers mois, à quelle fréquence avez-vous consommé :

SAUCES ET MATIERES GRASSES	FREQUENCE MOYENNE				
	par jour	par semaine	par mois	par an	jamais
1 cuillerée à café de mayonnaise (du commerce ou maison)	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 cuillerée à café de moutarde	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 cuillerée à café de ketchup	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 cuillerée à café de sauce froide du commerce (<i>type tartare, béarnaise, américaine</i>)	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 cuillerée à soupe de sauce béchamel	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 portion de 2 cuillerées à soupe de sauce pour pâtes (<i>tomates, bolognaise, carbonara, etc.</i>)	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 portion de 5 cuillerées à soupe de sauce chaude accompagnant la viande ou le poisson (<i>commerce ou maison</i>)	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 cuillerée à soupe de jus de cuisson de la viande	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 noisette de beurre ou margarine dans les préparations (<i>viandes, pâtes, légumes, salades, etc.</i>) ou pour la cuisson	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 cuillerée à soupe de sauce vinaigrette du commerce	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
Dans les préparations, pour la cuisson ou pour la vinaigrette maison :					
1 cuillerée à soupe d'huile de tournesol	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 cuillerée à soupe d'huile d'olive	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 cuillerée à soupe d'huile d'arachide	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 cuillerée à soupe d'huile de colza	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 cuillerée à soupe d'huile de maïs	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 cuillerée à soupe d'huile de soja	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐

N'oubliez pas de mettre un **chiffre** quand il y a une consommation et n'oubliez pas de vérifier que vous avez rempli chaque ligne de chaque tableau

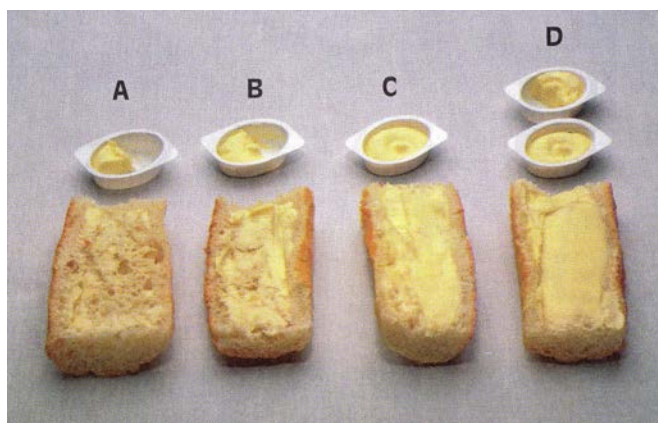
1 cuillerée à soupe d'huile mélangée (<i>type Isio 4</i>)	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 cuillerée à soupe d'huile Primevère	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 cuillerée à soupe d'une autre huile préciser :	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
beurre ou margarine sur le pain 	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐



Si vous avez coché « beurre ou margarine sur le pain » :

Regardez la photo ci-dessous : quand vous étalez du beurre ou de la margarine sur du pain, quelle quantité en mettez-vous, en moyenne ? Cochez la lettre qui correspond à la quantité de beurre ou margarine que vous mangez en moyenne sur le pain (cochez une seule case) :

A B C D
☐ ☐ ☐ ☐



A20 a- Cochez le type de beurre, margarine ou autre type de matière grasse que vous consommez le plus fréquemment dans les préparations ou pour la cuisson (*une seule réponse*) :

margarine ordinaire à environ 80% de matière grasse	☐
margarine à environ 70% matière grasse (<i>type Astra</i>)	☐
margarine à environ 80% de matière grasse au tournesol	☐
margarine à environ 70% de matière grasse (<i>type Fruit d'Or</i>)	☐
margarine allégée à environ 60% de matière grasse (<i>type Plantafin, Le Fleurier</i>)	☐
margarine allégée à environ 60% de matière grasse à l'huile d'olive (<i>type Olivio</i>)	☐
margarine allégée à environ 60% de matière grasse au tournesol	☐

N'oubliez pas de mettre un chiffre quand il y a une consommation et n'oubliez pas de vérifier que vous avez rempli chaque ligne de chaque tableau

margarine allégée à environ 60% de matière grasse (<i>type Fruit d'Or</i>)	☐
margarine allégée à environ 60% de matière grasse (<i>type Primevère</i>)	☐
margarine allégée à environ 40% de matière grasse nature (<i>type Effi ou St. Hubert 41</i>)	☐
margarine allégée à environ 25% de matière grasse nature (<i>type Bridelight</i>)	☐
Fruit d'Or "pro-activ"	☐
beurre nature ou demi-sel	☐
beurre allégé	☐
Végétaline	☐
suif, saindoux, autre graisse animale	☐

Si le type de matière grasse que vous utilisez le plus fréquemment pour la cuisson n'est pas listé ci-dessus, citez la marque ou la dénomination exacte du produit :

Marque ou dénomination du produit

Produit

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

A20 b- Cochez le type de beurre, margarine ou autre type de matière grasse que vous utilisez le plus fréquemment pour tartiner (*une seule réponse*) :

margarine ordinaire à environ 80% de matière grasse	☐
margarine à environ 70% matière grasse (<i>type Astra</i>)	☐
margarine à environ 80% de matière grasse au tournesol	☐
margarine à environ 70% de matière grasse (<i>type Fruit d'Or</i>)	☐
margarine allégée à environ 60% de matière grasse (<i>type Plantafin, Le Fleurier</i>)	☐
margarine allégée à environ 60% de matière grasse à l'huile d'olive (<i>type Olivio</i>)	☐
margarine allégée à environ 60% de matière grasse au tournesol	☐
margarine allégée à environ 60% de matière grasse (<i>type Fruit d'Or</i>)	☐
margarine allégée à environ 60% de matière grasse (<i>type Primevère</i>)	☐
margarine allégée à environ 40% de matière grasse nature (<i>type Effi ou St. Hubert 41</i>)	☐

N'oubliez pas de mettre un chiffre quand il y a une consommation et n'oubliez pas de vérifier que vous avez rempli chaque ligne de chaque tableau

margarine allégée à environ 25% de matière grasse nature (<i>type Bridelight</i>)	☐
Fruit d'Or "pro-activ"	☐
beurre nature ou demi-sel	☐
beurre allégé	☐
Végétaline	☐
suif, saindoux, autre graisse animale	☐

Si le type de matière grasse que vous utilisez le plus fréquemment pour tartiner ou assaisonner n'est pas listé ci-dessus, citez la marque ou la dénomination exacte du produit :

Marque ou dénomination du produit

Produit

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

A21 - A propos de votre consommation de sel :

OUI

NON

Mettez-vous systématiquement la salière sur la table ?

☐
☐

Re-salez vous toujours ou presque toujours les aliments dans votre assiette ?

☐
☐

Mettez-vous toujours ou presque toujours du sel lors de la préparation des plats ?

☐
☐

A22 - Au cours des 12 derniers mois, à quelle fréquence avez-vous consommé :

POMMES DE TERRE 	FREQUENCE MOYENNE				
	par jour	par semaine	par mois	par an	jamais
salade de pommes de terre					
pommes de terre à l'eau ou au four					
pommes de terre sautées à l'huile ou au beurre					
Purée (du commerce ou maison)					
frites					

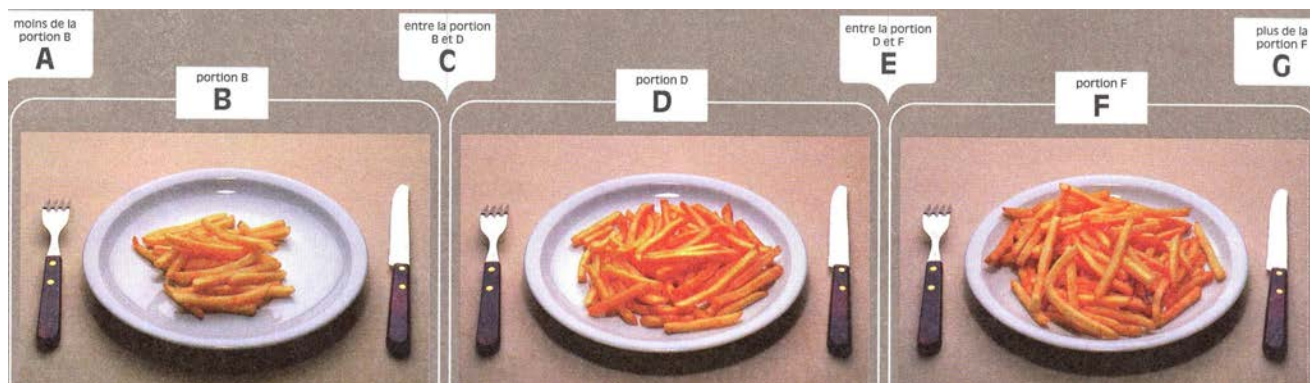
N'oubliez pas de mettre un **chiffre** quand il y a une consommation et n'oubliez pas de vérifier que vous avez rempli chaque ligne de chaque tableau



Regardez la photo ci-dessous : quand vous mangez des pommes de terre, de la purée ou des frites en général, quelle quantité moyenne en mangez vous ? Cochez la lettre qui correspond à la portion que vous mangez en moyenne (cochez une seule case) :

A B C D E F G

☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐



A23 - Au cours des 12 derniers mois, à quelle fréquence avez-vous consommé :

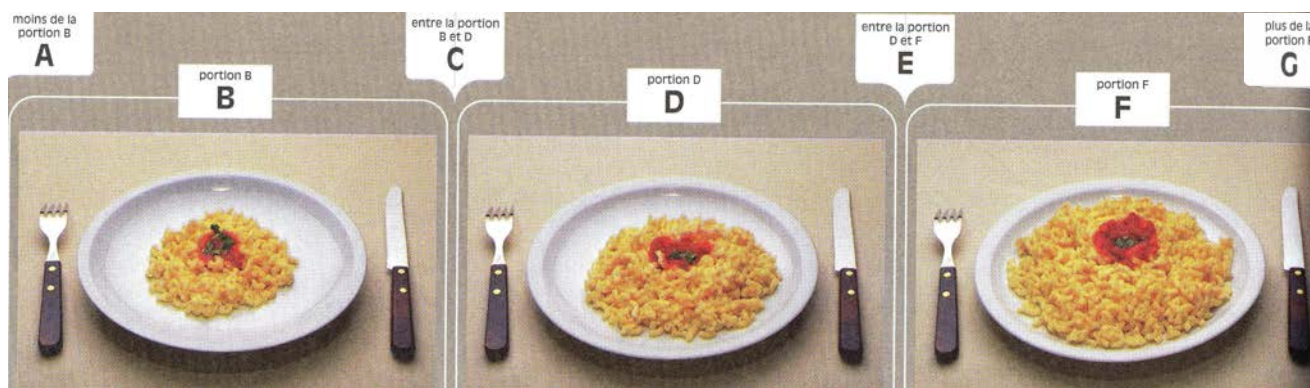
PATES, RIZ, SEMOULE 	FREQUENCE MOYENNE				
	par jour	par semaine	par mois	par an	jamais
pâtes	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
riz	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
semoule (y compris couscous), blé concassé, ebly	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐



Regardez la photo ci-dessous : quand vous mangez des pâtes, du riz ou de la semoule en général, quelle quantité moyenne en mangez vous ? Cochez la lettre qui correspond à la portion que vous mangez en moyenne (cochez une seule case)

A B C D E F G

☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐



N'oubliez pas de mettre un **chiffre** quand il y a une consommation et n'oubliez pas de vérifier que vous avez rempli chaque ligne de chaque tableau

24 - Au cours des 12 derniers mois, à quelle fréquence avez-vous consommé :

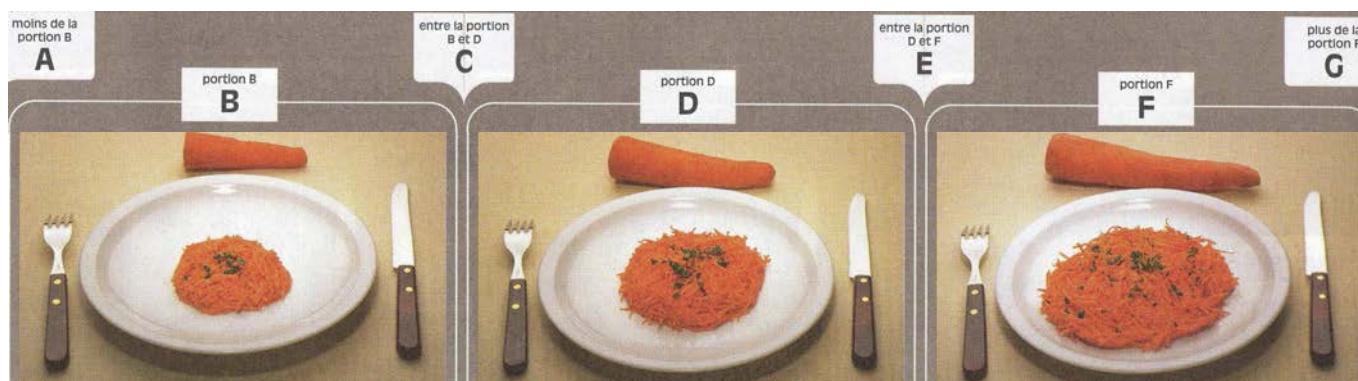
LEGUMES (frais, conserve, surgelé)	FREQUENCE MOYENNE				
	par jour	par semaine	par mois	par an	jamais
½ avocat	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 artichaut moyen	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
oignons (<i>dans une sauce, une tarte, une ratatouille, etc.</i>)	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
ail (<i>dans un plat</i>)	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
petit pois, légumes secs (<i>lentilles, haricots blancs, fèves, pois cassés, pois chiches</i>) 📷	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 portion de champignons	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
soupe de légumes (chaude ou froide, du commerce ou maison)	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
salade verte 📷	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
carottes (<i>râpées ou cuites</i>) 📷	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
céleri 📷	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
tomate 📷	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
betterave 📷	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
chou rouge 📷	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
chou blanc 📷	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
chou vert 📷	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
choux de Bruxelles 📷	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
chou-fleur 📷	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐

N'oubliez pas de mettre un **chiffre** quand il y a une consommation et n'oubliez pas de vérifier que vous avez rempli chaque ligne de chaque tableau

brocolis 📷	☐	☐	☐	☐	☐
haricots verts 📷	☐	☐	☐	☐	☐
endives (<i>en salade ou cuites</i>) 📷	☐	☐	☐	☐	☐
épinards 📷	☐	☐	☐	☐	☐
concombre, courgettes ou aubergines 📷	☐	☐	☐	☐	☐
poivrons rouge/ vert/ jaune 📷	☐	☐	☐	☐	☐
poireaux 📷	☐	☐	☐	☐	☐
fenouil 📷	☐	☐	☐	☐	☐
potiron 📷	☐	☐	☐	☐	☐
navets, radis 📷	☐	☐	☐	☐	☐
maïs 📷	☐	☐	☐	☐	☐

📷 **Regardez la photo ci-dessous : quand vous mangez des légumes en général, quelle quantité moyenne en mangez-vous ? Cochez la lettre qui correspond à la portion de légumes que vous mangez en moyenne (cochez une seule case) :**

A **B** **C** **D** **E** **F** **G**
☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐



N'oubliez pas de mettre un **chiffre** quand il y a une consommation et n'oubliez pas de vérifier que vous avez rempli **chaque ligne de chaque tableau**

A25 - Au cours des 12 derniers mois, à quelle fréquence avez-vous consommé :

FRUITS (entiers ou sous forme de jus de fruits pressés maison)	FREQUENCE MOYENNE				
	par jour	par semaine	par mois	par an	jamais
1 pomme	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 poire	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 agrume (<i>orange, mandarine, pamplemousse, citron</i>)	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 banane	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 pêche, nectarine, brugnon ou abricot	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 morceau de melon	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 bol de cerises	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 bol de fraises, framboises ou d'autres fruits rouges	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 prune	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 kiwi	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 bol de raisins (<i>blanc ou noir</i>)	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 morceau d'ananas	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 mangue	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 portion de litchis frais	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 poignée de fruits secs (<i>pruneaux, abricots, raisins, etc.</i>)	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐
1 coupe de fruits en compote ou au sirop	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐ ☐	☐

N'oubliez pas de mettre un **chiffre** quand il y a une consommation et n'oubliez pas de vérifier que vous avez rempli chaque ligne de chaque tableau

A26 - Au cours des 12 derniers mois, à quelle fréquence avez-vous consommé :

BISCUITS, GATEAUX, SUCRERIES (du commerce ou maison)	FREQUENCE MOYENNE				
	par jour	par semaine	par mois	par an	jamais
1 carré de chocolat (<i>noir, au lait, aux noisettes, etc.</i>)					☐
1 bonbon					☐
1 part de tarte aux fruits					☐
1 part de flan					☐
1 tranche de cake ou de quatre-quarts, madeleine					☐
1 biscuit sec au chocolat					☐
1 biscuit sec nature (<i>petit beurre, galette</i>)					☐
1 petit gâteau (<i>barquettes, figolu, etc.</i>)					☐
1 brownie, 1 part de gâteau au chocolat					☐
1 pâtisserie à la crème					☐
1 barre chocolatée ou aux céréales (<i>Mars, Twix, Granny, etc.</i>)					☐
1 crêpe sucrée ou 1 gaufre					☐
1 boule de sorbet					☐
1 boule de glace					☐

A27. Si vous mangez des biscuits, citez la ou les marque(s) et dénomination(s) exacte(s) que vous consommez le plus fréquemment ?

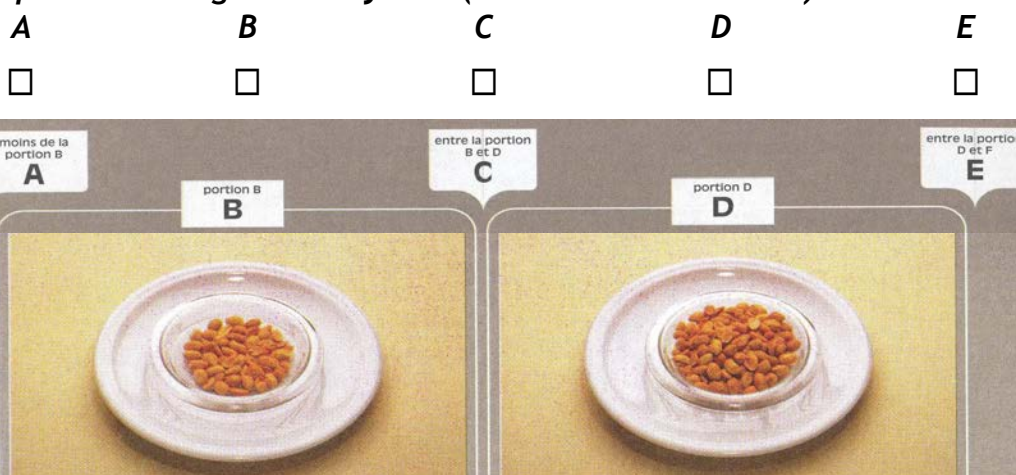
	Marque	Nom du produit
Produit 1		
Produit 2		

N'oubliez pas de mettre un **chiffre** quand il y a une consommation et n'oubliez pas de vérifier que vous avez rempli chaque ligne de chaque tableau

A28 - Au cours des 12 derniers mois, à quelle fréquence avez-vous consommé :

SNACKS SALES	FREQUENCE MOYENNE				
	par jour	par semaine	par mois	par an	jamais
1 poignée de gâteaux apéritifs salés (hors mélange de fruits secs)					☐
1 portion de chips					☐
1 cornet ou un sachet de pop-corn					☐
1 portion de fruits oléagineux salés (cacahuètes, amandes, pistaches, noisettes, noix, etc.) 📷					☐
1 portion de fruits oléagineux non salés (cacahuètes, amandes, pistaches, noisettes, noix, etc.) 📷					☐

📷 **Regardez la photo ci-dessous : cochez la lettre qui correspond à la portion de fruits oléagineux que vous mangez en moyenne (cochez une seule case) :**



A29 - Au cours des 12 derniers mois, à quelle fréquence avez-vous consommé :

BOISSONS FROIDES NON ALCOOLISEES	FREQUENCE MOYENNE				
	par jour	par semaine	par mois	par an	jamais
1 verre de jus de fruits du commerce					☐
1 verre de sirop à l'eau					☐
1 verre de soda (Coca-cola, Sprite, Fanta, Orangina, Ice Tea, etc.)					☐
1 verre de soda light					☐

N'oubliez pas de mettre un **chiffre** quand il y a une consommation et n'oubliez pas de vérifier que vous avez rempli chaque ligne de chaque tableau

A32- Si vous consommez habituellement (au moins une fois par semaine) des aliments enrichis (jus de fruits, céréales pour petit-déjeuner, pâtes, lait etc.) merci de les noter ci-dessous :

NOM DE L'ALIMENT OU DE LA BOISSON	UNITE (verre, tranche, cuillère etc.)	NOMBRE DE FOIS PAR SEMAINE

A33- Si des aliments ou boissons que vous consommez habituellement (au moins une fois par semaine) ne sont pas mentionnés dans ce questionnaire, merci de les noter ci-dessous :

NOM DE L'ALIMENT OU DE LA BOISSON	UNITE (verre, tranche, cuillère etc.)	NOMBRE DE FOIS PAR SEMAINE

N'oubliez pas de mettre un chiffre quand il y a une consommation et n'oubliez pas de vérifier que vous avez rempli chaque ligne de chaque tableau

B - REGIME ALIMENTAIRE

B1. Actuellement, suivez-vous un régime alimentaire particulier ?

Oui ☐ si oui, passez à la question suivante

Non ☐ si non, passez à la section C - « Les compléments alimentaires »

B2. Pour quelle raison suivez-vous un régime ? (plusieurs réponses possibles)

Pour diminuer le taux de cholestérol	☐
Pour diminuer la pression artérielle	☐
Pour le diabète	☐
Pour maigrir	☐
Pour rester en forme	☐
Pour éviter de maigrir	☐
Autre raison précisez laquelle :	☐

B3. Quelles sont les caractéristiques de votre régime ? (plusieurs réponses possibles)

pauvre en graisses	☐
pauvre en glucides	☐
pauvre en sel	☐
pauvre en alcool	☐
riche en graisses	☐
riche en glucides	☐
riche en (huile de) poisson	☐
riche en produits laitiers	☐
Autres caractéristiques précisez laquelle :	☐

N'oubliez pas de mettre un **chiffre** quand il y a une consommation et n'oubliez pas de vérifier que vous avez rempli chaque ligne de chaque tableau

B4. Votre régime est :

Prescrit par un médecin, généraliste, spécialiste ou diététicien	☐
Lu / trouvé / entendu dans un magazine, un livre, sur Internet, à la radio ou à la télévision	☐
Défini par vous-même ou par un proche	☐
Autre (précisez) :	☐

C - LES COMPLEMENTS ALIMENTAIRES

C1. Prenez-vous actuellement des vitamines ou des minéraux sous forme de compléments alimentaires c'est-à-dire sous forme de comprimés, gélules, sachets de poudre, sirop ?
(une seule réponse possible)

Oui ☐

Non ☐

C2. Si oui, quelles sont les marques et dénomination exactes de ce(s) complément(s) alimentaire(s) ? Cette question porte uniquement sur les 3 compléments alimentaires que vous consommez le plus souvent. Si vous ne consommez qu'un complément alimentaire, remplissez uniquement la ligne Produit 1. Si vous ne consommez que 2 compléments alimentaires, remplissez uniquement les lignes Produit 1 et Produit 2. Pour répondre aux questions munissez-vous, si possible, des emballages.

[illegible]

Produit 2 :	Laboratoire :	
	Nom du produit :	
	Fréquence	

N'oubliez pas de mettre un **chiffre** quand il y a une consommation et n'oubliez pas de vérifier que vous avez rempli chaque ligne de chaque tableau

Produit 3 :	Laboratoire :	
	Nom du produit :	
	Fréquence	

D- Remplissage du questionnaire

D1- Avez-vous rempli ce questionnaire :

seul(e)	☐
avec l'aide de votre conjoint(e)	☐
avec l'aide d'une autre personne : précisez laquelle	☐

Vous voici arrivé à la fin du questionnaire: vérifiez bien que vous avez rempli chaque ligne de chaque tableau d'aliments.

MERCI BEAUCOUP D'AVOIR PRIS LE TEMPS DE REMPLIR CE QUESTIONNAIRE !

N'oubliez pas de mettre un chiffre quand il y a une consommation et n'oubliez pas de vérifier que vous avez rempli chaque ligne de chaque tableau

ANNEXE 12 : DOSAGE BIOLOGIQUE

1. Dosage quantitatif et simultané de la vitamine B12 et des folates

Fiche technique

Coffret SimulTrac-SNB pour dosage radioimmunologique Vitamine B12 [57Co] Folates [125I] (MP Biomedicals, New York, Etats Unis)

Principe du test

Dans une analyse par compétition, le réactif de liaison doit avoir une affinité égale pour l'étalon et pour la substance présente dans l'échantillon. La vitamine B12 ou les folates non marqués entrent en compétition avec leurs homologues marqués sur le nombre restreint de sites de fixation disponibles sur l'agent de fixation, ce qui réduit la quantité de vitamine B12 ou de folates marqués liés au réactif. Par conséquent, le taux de radioactivité liée est inversement proportionnel à la concentration de l'échantillon du patient ou de l'étalon.

Dans le cas du test radio-immunologique SimulTrac-SNB de MP Biomedicals, les taux de vitamine B12 et de folates sont simultanément déterminés dans un seul tube.

Prélèvement des échantillons : les échantillons doivent être prélevés chez des individus à jeun de préférence.

Préparation de l'échantillon pour analyse

a. Sérum ou plasma: prélever le sang dans un tube sec sous vide de 5 ou 10 ml. Si on prélève du sérum, laisser le sang former un caillot à température ambiante pendant 30 à 60 min. Utiliser de l'EDTA si l'on veut faire une analyse sur le plasma. Centrifuger pendant 10 min et prélever le sérum ou le plasma.

b. Hémolysât de sang total (pour dosage des folates érythrocytaires) : Prélever le sang dans un tube en verre sous vide de 7 mL contenant de l'EDTA (bouchon lavande). Mesurer et noter la

valeur de l'hématocrite. Ajouter 100 μ L de sang en suspension à 2 ml de solution récente d'acide ascorbique à 0,2%. La dilution est alors de 1 pour 21. Renverser plusieurs fois pour bien mélanger ; éviter la formation de mousse; Laisser reposer l'hémolysât entre 20 et 25°C pendant 60 à 90 min avant analyse. Tenir à l'abri de la lumière pendant ce laps de temps.

c. Transport des échantillons: le sérum et le plasma soigneusement emballés doivent être transportés congelés du départ à l'arrivée.

d. Conservation des échantillons: Avant analyse, conserver les échantillons entre 2 et 8°C. Si l'on doit garder un échantillon plus de 4 heures, il faut le congeler à -20°C. Ne pas stocker les échantillons dans des congélateurs à dégivrage automatique pour éviter des cycles de congélation- décongélation.

Procédure du dosage

Si le compteur possède 2 canaux ou plus, il convient de l'étalonner pour compter l'Iode 125 dans un canal et le Cobalt 57 dans un autre. Par contre, si le compteur n'a qu'un seul canal, il faut l'étalonner de façon à ce que les différents réglages du compteur permettent de compter un seul isotope à la fois ; dans ce cas, il faudra passer les tubes 2fois : la première fois, le compteur étant réglé pour l'Iode 125, on obtiendra la courbe des folates et les résultats de l'échantillon, et la seconde fois, le compteur étant réglé pour le Cobalt 57, on obtiendra la courbe de la vitamine B12 et les résultats de l'échantillon.

Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante avant utilisation ; mais pour minimiser tout risque de détérioration, il faut éviter de les laisser à l'air ambiant plus longtemps que nécessaire. Ne jamais mélanger les réactifs provenant différents coffrets, pour un même dosage.

Le protocole utilisé est celui décrit par le fabricant.

Préparation des réactifs

1. Si l'on doit utiliser un flacon de marqueur dans les 30 jours, verser le contenu d'un flacon de D

thiothréitol (DTT) dans un flacon de marqueur.

2. Il faut ajouter la même quantité de marqueur et de DTT (100 μ L de chaque) par tube à doser. On peut également pipeter séparément le marqueur et le DTT (100 μ L), en ajoutant d'abord le marqueur puis le DTT.

Dosage

1. Numéroté 16 tubes pour la courbe étalon. A partir du No. 17, numéroté deux tubes supplémentaires pour chaque échantillon clinique.

2. Ajouter les étalons et les échantillons cliniques suivant les indications données.

3. Ajouter 200 μ L de solution active de marquage/DTT (réactif 2A) dans chaque tube, y compris les tubes 1 et 2. Agiter les tubes au vortex.

4. Incuber à température ambiante (18- 25°C) pendant 15 min.

5. Ajouter 100 μ L de réactif d'extraction aux tubes 3 -16 et aux tubes contenant les échantillons. Agiter au vortex.

6. Incuber à température ambiante pendant 10 min.

7. Bien agiter le flacon de réactif neutre SimulTrac-SNB. Ajouter 1000 μ L de réactif neutre aux tubes 3 et 4.

8. Bien agiter le flacon de réactif de liaison SimulTrac-SNB. Ajouter 1000 μ L de réactif de liaison aux tubes 5-16 et aux tubes contenant les échantillons. Agiter les tubes au vortex.

9. Incuber les tubes de 3-16 et tous les tubes contenant les échantillons à température ambiante (18-25°C) pendant 60 min à partir du dernier ajout de réactif de liaison. Recouvrir le portoir de papier aluminium pour protéger de la lumière, ou le placer dans un endroit sombre.

10. Centrifuger à au moins 1000 X g pendant 10 min, de préférence au frais.

11. Décanter avec précaution, et jeter le surnageant. Retirer la dernière goutte en posant les tubes sur un papier absorbant.

12. Compter la radioactivité dans les pellets (culots) et dans les tubes 1 et 2, l'un après l'autre à l'aide d'un compteur gamma. Le nombre de coups total par min pour les tubes 1 et 2 doit se situer entre 10 000 et 25 000 pour le Cobalt 57 et 15 000 et 35 000 pour l'Iode 125, en fonction de l'appareil et de l'âge du marqueur. On peut utiliser un temps de mesure plus court, à condition que le nombre de coups pour les tubes 1 et 2 soient au moins de 10 000 (nombre de coups total).

Calcul des résultats

Le compteur gamma utilisé est de type COBRA-IITM autogamma (Packard) à double canal.

La courbe pour la vitamine B12 et les résultats sont calculés partir des résultats obtenus par comptage du Cobalt 57 ; la courbe pour les folates et les résultats sont calculés à partir des valeurs obtenes pour le comptage de l'Iode 125.

Les valeurs de référence sont : pour la vitamine B12 : 100 pmol/L ; pour les folates : 7 nmol/L.

2. Dosage de l'homocystéine par le système IMx

Fiche technique

Coffret IMX-Homocystéine, ABBOTT (Abbott Park, IL, Etats-Unis)

Principe du test

Le dosage IMx Homocystéine est basé sur la technologie immunoenzymatique par polarisation de fluorescence (FPIA). L'Hcy liée (forme oxydée) est réduite en Hcy libre, qui est à son tour convertie enzymatiquement en S-adénosyl-L-Hcy (SAH) comme décrit ci-dessous :

Réduction : L'homocystine, ses formes disulfures ainsi que les formes mixtes protéine-Hcy présentes dans l'échantillon sont réduites en Hcy libre sous l'action du dithiothréiol (DTT).

HCY-SS-HCY (Homocystine) DTT

R1-SS-HCY (R1=résidu thiol) HCY

Protéine-SS-HCY

Conversion enzymatique : L'Hcy libre totale est convertie en S-adenosyl-L-Hcy (SAH) en utilisant de la SAH-hydrolase et de l'adénosine en excès.

SAH- hydrolase

HCY + Adénosine SAH

Dans les conditions physiologiques, la SAH-hydrolase convertit la SAH en Hcy. L'adénosine en excès dans la solution de prétraitement permet de convertir l'Hcy en SAH par la SAH-hydrolase bovine.

Prélèvement des échantillons : les échantillons doivent être prélevés chez des individus à jeun.

Préparation de l'échantillon pour analyse

a. Sérum ou plasma: prélever le sang dans un tube sec sous vide de 5 ou 10 ml. Si on prélève du sérum, laisser le sang former un caillot à température ambiante pendant 30 à 60 min. Utiliser de l'EDTA si l'on veut faire une analyse sur le plasma. Centrifuger pendant 10 min et prélever le sérum ou le plasma.

b. Transport des échantillons: le sérum et le plasma soigneusement emballés doivent être transportés congelés du départ à l'arrivée.

c. Conservation des échantillons: Avant analyse, conserver les échantillons entre 2 et 8°C. Si l'on doit garder un échantillon plus de 4 heures, il faut le congeler à -20°C. Ne pas stocker les échantillons dans des congélateurs à dégivrage automatique pour éviter des cycles de congélation- décongélation.

Procédure du dosage

L'appareil doit être allumé au moins 1 heure avant. Tous les réactifs et les échantillons sont amenés à température ambiante avant utilisation.

Préparation du dosage

Les réactifs IMx Hcy et l'échantillon sont ajoutés dans la cartouche-échantillon FPIA et dans la cuvette dans l'ordre suivant :

- Le système aiguille-électrode distribue l'échantillon, la solution de prétraitement, l'enzyme et le tampon de dilution FPIA No.1 dans le puits de prédilution de la cartouche-échantillon ;
- La solution de prétraitement réduit l'Hcy, ses formes disulfures ainsi que les formes mixtes protéine-Hcy présentes dans le plasma ou le sérum en une forme chimique, l'Hcy.
- La S-adenosyl-L-Hcy hydrolase convertit l'Hcy en S-adenosyl-L-Hcy (SAH).
- Une partie aliquote du mélange de prédilution, l'anticorps et le tampon de dilution FPIA No.1 sont distribués dans la cuvette et le bruit de fond est mesuré par le système optique FPIA.
- Le traceur, le tampon de dilution FPIA No.1 et une seconde partie aliquote du mélange de prédilution sont transférés dans la cuvette.
- La SAH et le traceur marqué à la fluorecécine entrent en compétition pour occuper les sites de liaison sur la molécule d'anticorps monoclonal.
- L'intensité de la polarisation de fluorescence est mesurée par le système optique FPIA.

Dosage

Pour le fonctionnement de l'appareil, les logiciels suivants sont nécessaires pour effectuer le dosage :

- Modules système IMx – version 6.0 ou supérieure
- Modules Dosages IMx d'exploitation du métabolisme – version 4.0 ou supérieure

Avant d'effectuer le dosage IMx Hcy à l'aide du Module Dosages IMx d'exploitation du métabolisme v4.0, il est nécessaire d'activer le dosage. Se référer à la table des maîtres du manuel technique IMx, afin de trouver les informations de procédure d'activation des dosages.

Les paramètres du dosage IMx Hcy ont déjà été ajustés en usine. Ils peuvent être imprimés, affichés à l'écran et modifiés selon la procédure décrite au chapitre 6 du manuel technique.

- 1- Le volume minimum d'échantillon nécessaire pour réaliser le dosage est de 50 µL
- 2- Le volume minimum de tampon de dilution est de 200 mL ; avant de lancer le dosage, vérifier la présence d'au moins 200 mL de ce tampon de dilution.
- 3- Identifier les échantillons nécessitant une dilution. Le protocole de dilution doit être effectué uniquement sur des échantillons de concentration supérieure à 50 µmol/L.
- 4- Charger le carrousel FPIA avec 2 cuvettes ou cartouches- échantillons par échantillon à diluer.
- 5- Distribuer les échantillons requis.
- 6- Charger les réactifs.
- 7- Appuyer sur [ASSAY] [XX] XX étant le No du dosage [OTHER] [DIL_ALT] [STORE].
Le message **tHCY : #SmpCt TO USE DIL/ALT** s'affiche. On peut également utiliser la procédure de la liste de chargement pour programmer la dilution.
- 8- Utiliser le clavier numérique pour **saisir le nombre total de cartouches-échantillons qui seront utilisées pour les échantillons dilués** et non pas le nombre d'échantillons à diluer.
- 9- Appuyer sur [STORE]. Pour lancer la dilution :
- 10- Dans le menu dilution, appuyer sur [RUN].

Pour charger un carrousel avec des échantillons à diluer et des échantillons non dilués, les échantillons non dilués doivent être chargés après les contrôles Hcy, suivis des échantillons à

diluer. Ex : s'il faut analyser 3 contrôles Hcy, 4 échantillons non dilués et 2 échantillons à diluer, le carrousel doit être chargé comme suit :

Position 1 à 3 : Contrôle Hcy

Position 4 à 7 : Echantillons non dilués

Position 8 : cartouche-échantillon FPIA1- premier échantillon à diluer

Position 9 : cartouche-échantillon FPIA2- vide

Position 10 : cartouche-échantillon FPIA1- premier échantillon à diluer

Position 11 : cartouche-échantillon FPIA2- vide

Ajouter 11 cuvettes sur le carrousel FPIA. Si l'on utilise le protocole de dilution automatique, l'échantillon doit être pipeté **uniquement dans le puits-échantillon de la première cartouche-échantillon.**

L'IMx transférera la quantité d'échantillon appropriée de la cartouche-échantillon 1 à la cartouche-échantillon.

L'on peut pratiquer la dilution manuelle, dans ce cas, bien mélanger l'échantillon en le retournant ou le passant au vortex avant de le pipeter dans les puits-échantillon de la cartouche-échantillon. Il est recommandé de faire des dilutions au 1/3. Pour déterminer la concentration en Hcy totale, multiplier la concentration de l'échantillon dilué par le facteur de dilution.

Calcul des résultats

Le dosage IMx Hcy utilise une méthode de traitement des données avec une courbe logistique à 4 paramètres pour obtenir une courbe de calibration.

Pour effectuer une calibration du dosage IMx Hcy, analyser en double toutes les concentrations des calibrateurs Hcy placés dans les 12 premières positions du carrousel, suivies de toutes les concentrations des contrôles Hcy. Le paragraphe « Résultats » fournit une explication sur le type d'ajustement de la courbe utilisée par le dosage IMx Hcy et sur les

vérifications spécifiques du dosage utilisées pour déterminer si la courbe est acceptable. **Une fois la calibration du dosage acceptée et mémorisée, tous les dosages sont effectués en MODE 2.**

L'opérateur confirme que les paramètres se trouvent dans les limites acceptables :

Paramètres de dosage Evaluation des calibrateurs

94.40 MAX SPAN F-A Calibrateur F- calibrateur A PERR RMSE (Erreur de polarisation)

(Erreur quadratique moyenne) $\pm 2,0 \leq 1,0$

La courbe de dosage est stable pendant 2 semaines au minimum. Pour convertir les résultats en $\mu\text{g/mL}$, effectuer le calcul suivant : Concentration en $\mu\text{mol/L}$ X 0,1352.

ANNEXE 13

Early incidence of occupational asthma is not accelerated by atopy in the bakery/pastry and hairdressing sectors

Thomas Rémen* ^{1,2}, Dovi-Stéphanie Acouetey ^{1,2}, Christophe Paris ^{1,2}, Bernard Hannhart ¹, Mathias Poussel ³, Bruno Chenuel ³, Annick Barbaud ² and Denis Zmirou-Navier ^{1,2,4}.

* corresponding author

¹ Institut National de la santé et de la Recherche Médicale U954, School of Medicine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

² University Medical School, Vandœuvre-lès-Nancy, France

³ Department of Pulmonary Function Testing and Exercise Test, CHU of Nancy, Brabois Adults Hospital, Vandœuvre-lès-Nancy, France

⁴ EHESP School of Public Health, Rennes, France

Email addresses:

TR: thomas.remen@inserm.fr

DSA: stephanie.acouetey@inserm.fr

CP: christophe.paris@inserm.fr

BH: bernard.hannhart@inserm.fr

PM: m.poussel@chu-nancy.fr

BC: b.chenuel@chu-nancy.fr

AB: a.barbaud@chu-nancy.fr

DZN: denis.zmirou@inserm.fr

Corresponding author:

Thomas REMEN

Postal adress : INSERM U954 – Faculté de Médecine – Bâtiment E – 2^{ème} étage – 9 avenue de la forêt de Haye – 54505 VANDOEUVRE-LES-NANCY – France

Telephone : + 33 (0)3.83.68.39.12 – Fax : + 33 (0)3.83.68.39.19

Abstract:

Setting. Occupational asthma (OA) is most likely to develop in the very first years of exposure. This study aims to describe the early incidence of OA among bakers/pastry-makers (BP) or among hairdressers and to explore the role of atopy.

Design. Following a retrospective follow-up design, subjects were invited to undergo telephone interviews. Those who declared work-related respiratory or rhinitis symptoms and a sample of all others were proposed a medical visit for OA investigations. Data from interviews and from medical visits were used to estimate incidence for OA according to increasing exposure durations.

Results. 866 subjects were interviewed (mean age: 25.3 years, 43.8% females), among which 282 underwent a medical visit. Global estimated incidence rates of 'confirmed or probable' OA during the first 12 years of exposure were high in BP (2.63 per 100 person-years) and in hairdressers (0.58 per 100 p-y), particularly in the first four years. Atopy is a strong risk factor for incidence among BP but, irrespective of the occupational sector, does not influence the timing of OA symptoms.

Conclusion. Occupational asthma symptoms occur soon after inception of exposure. Our results suggest that atopy does not precipitate the occurrence of symptoms in two different allergen exposure settings.

Keywords: epidemiology, diagnosis

Introduction

Occupational asthma (OA) is defined as asthma caused by exposure to an agent encountered in the work environment [1]. Disparities in OA prevalence exist across activity sectors. In most Western Europe countries, bakers are among occupations with the highest risk of OA [2-8]. The main agents that cause occupational asthma in this sector are cereal flours (wheat, rye and barley) and enzymes. Other sectors also experience a high risk of OA as painters (especially in the car manufacturing industry), hairdressers, chemical process workers or health care workers. In France, hairdressing ranks third among occupations with the highest risk of occupational asthma and first among females [2]. Hairdressers are exposed to several reactive agents when performing techniques (perm, hair dye or hair bleached) with potentially irritant and sensitizing effects on the airways and on the skin.

Most epidemiological studies on OA have been cross-sectional, a design that is subject to the "healthy worker effect" and, hence, to underestimation of OA incidence [9]. Numerous authors have studied OA incidence among bakers during the last twenty years, yielding incidence rates ranging from 0.334 to 4.44 cases per 1 000 person-years [2-4, 6-8, 10-12]. Among hairdressers, data are scarcer. OA incidence varies from 0.081 to 0.37 cases per 1 000 person-years [2-4, 6, 8, 10]. These figures were mainly derived from surveillance system or registers. However, they are hardly comparable due in part to methodological differences and lack of consensus about definitions, diagnosis criteria or occupational settings.

Few authors explored the early natural history of OA. Studies evaluating the delay between start of exposure and onset of symptoms are recent and seminal papers were published on apprentices in at risk activities like bakery, dental hygiene or laboratory animals sectors [13-15]. These studies described risk factors of occupational sensitization, including characteristics of occupational exposure, host and environmental factors. Among them, atopy is known to be a risk factor of OA, particularly in bakers and more generally in high molecular weight (HMW) allergen exposure environments [16]. As a result, the hypothesis that atopy is a risk factor of an earlier incidence of OA, at least in sectors where HMW allergens are present, is plausible. With this in mind, we set the ABCD study (French acronym for early asthma in bakery and hairdressing) which seeks to explore the early incidence of OA during the first years of activity of young workers in at risk occupations, with a special attention on the role of atopy.

Materials

The details of our study design have been presented elsewhere [17]. ABCD is a retrospective follow-up study. Our source population comprises exposed (bakers, pastry-makers and hairdressers) and non exposed subjects (sales and food sectors: butcher, pork butcher, caterer, cook job...), the latter being used as the reference group., who graduated between 2001 and 2006 (2001 for the "non exposed" group) from nine vocational schools in the Lorraine region, North-Eastern France.

Subjects were invited by nurses to complete a medical questionnaire by phone. This phone interview allowed to classify subjects into three categories, according to whether they declared (i) work-related¹ respiratory symptoms or (ii) isolated work-related rhinitis symptoms that had appeared after inception of exposure ; or (iii) absence of work-related symptoms [17]. The ABCD cohort is composed of all subjects who completed this phone questionnaire.

In a second time, all subjects defined as "putative" OA cases (the two first categories) and a random sample of 285 subjects not reporting symptoms composed so as to represent the baseline study population for year of graduation, vocational school and occupational sector) [17] were proposed a medical visit at home which included in particular a clinical examination and interview, spirometry, blood sampling and peak-flow-monitoring.

Concerning case-control study, details are presented elsewhere [18].

The research program was authorized by the Nancy University Hospital ethics committee and written consents were obtained from all workers.

Diagnosis of occupational asthma after the medical visits and OA timing

The clinical history was explored with the EGEA questionnaire [19], while the time sequence of symptoms with work was assessed using items derived from other dedicated questionnaires [20, 21]. Each subject who performed the medical visit was classified according to a decisional tree for the definition of OA (figure 1) into one of four categories: (i) **confirmed OA**; (ii) **probable OA**; (iii) **possible OA** and (iv) **absence of OA**. This classification was obtained (see online supplement for precisions) on the basis of (i) the clinical definition of asthma proposed by the International Primary Care Respiratory

¹ Corresponding to symptoms appeared after inception of apprenticeship and which are present at work or following a work day

Group [22], (ii) recording of peak-flow expiratory curves for three weeks, (iii) a spirometry with bronchodilator testing (short acting β_2 agonists), and finally (iv) work-related specific IgE assays when available. A fifth category corresponded to subjects for whom OA diagnosis was *indeterminate*, when PEF monitoring was not exploitable and reversibility test was either not feasible (contra-indication) or not usable (no occupational exposure during the 15 days prior to the visit) [23]. All the criteria were compared to a decisional tree and the final classification was validated by expert judgement (CP). The date retained for the incidence of 'confirmed or 'probable' OA corresponds to the first occurrence of the work-related respiratory symptoms [17].

Calculation of effective time at work (which corresponds to exposure duration among exposed subjects) entailed reconstruction of the occupational history of each subject since inception of apprenticeship (duration of apprenticeship, diplomas obtained, hiring date, cumulative length of unemployment, date of sector dropout and date of administration of the phone questionnaire). This exposure duration corresponds to the cumulative periods of exposure since engaging in apprenticeship (excluding classroom periods during apprenticeship or periods of inactivity) until the date of the telephone interview. Hence, by construction, one year of exposure duration encompasses more than one calendar year.

Assessment of OA prevalence and incidence in the whole study population

Following the degree of evidence about OA (figure 1), three definitions were computed: (i) 'confirmed' OA (OAc) only, (ii) '*confirmed or probable*' OA (OAc_p) and (iii) '*confirmed, probable or possible*' OA (OAc_{pp}). The data on OA stemming from medical visits were extrapolated to the whole population, including to subjects who answered the telephone questionnaires without attending the visits. For this, the positive predictive values of each category of symptoms retrieved after the telephone interview (work-related respiratory symptoms suggestive of asthma – respiratory symptoms suggestive of asthma not related to work and work-related ENT symptoms) and the negative predictive value (absence of these symptoms) were assessed among those who also attended the medical visits (n=282) for each occupational sector and for OAc, OAc_p and OAc_{pp} estimates, respectively. Results will be presented hereafter for OAc_p cases. The other categories are exposed in on-line supplementary files and differences across the 3 categories are stated in the discussion, when relevant.

Atopy

Specific IgE analysis was used to categorize subjects as atopic or not, based on the Phadiatop™ test (Phadia, Sweden). This test screens an IgE-dependant allergy with a median sensitivity of 96% (ranging from 70% to 100% across studies) and a median specificity of 95% (77% to 100%) according to a meta-analysis on a general adult population [24]. The Phadiatop™ test includes mite, pollen, mould, and animal dander allergens, but the exact allergen composition is not issued by the company [24].

Statistical analysis

Because we excluded all subjects who declared asthma before apprenticeship, the prevalence of OA at a given point in time is also the cumulative incidence. Overall cumulative incidence was assessed separately among the two occupational sectors of interest and among the reference group. We subdivided our study population (N=866) into groups of increasing exposure duration by quartiles (Q1 to Q4). Incidence rates were then computed over the successive quartiles and expressed as number of cases per person.year (p-y). A global incidence rate by occupational sector was also calculated over all subjects, irrespective of their exposure duration, to allow comparisons with others studies. Incidence was estimated among atopic subjects and non-atopic subjects who performed the visit according to occupation.

The data were analysed using SAS® 9.2 software. Proportions are expressed as percentages and quantitative data are presented as means with standard deviations (SD). Characteristics such as gender, age, exposure duration and smoking habits were compared using chi-square or Fisher exact tests, Student or Kruskal-Wallis tests, as appropriate. Comparisons of incidence density were performed using the chi-squared test.

Results

Study population

The students' logs of the 9 vocational schools provided information on 3 275 apprentices (1 775 bakers/pastry-makers, 1 191 hairdressers and 409 sales/food workers) who graduated between 2001 and 2006. Contact details on 2 282 (70%) subjects were obtained through the parents. Of these 2 282

subjects, 866 (38%) answered the telephone interview and were included in our study. A summary flow chart is presented in the online supplement.

The main characteristics of these subjects are presented in Table 1. Additional information is available in the on-line supplementary file, allowing to compare participants and non participants, and among them those who refused the phone interview.

Medical visits and telephone interviews

Among the 866 subjects included in our study, 258 (30%) reporting respiratory or rhinitis symptoms related to work were offered a medical visit, among which 162 (63%) accepted. Among the putative OA cases, no difference was shown between subjects who performed the visit and those who declined, regarding the occupational sector ($p=0.88$), work seniority (6.94 [2.47] vs 6.37 [2.69], $p=0.88$) and sector dropout (25.6% vs 30.2%, $p=0.50$), patterns in smoking prevalence being more contrasted (53.7% vs 65.6%, $p=0.10$). Among the 285 non symptomatic subjects selected for the visit, 120 performed it (acceptance rate=42%).

The main characteristics of subjects who attended ($n=282$) or not the visit are also presented in table 1. The sector dropout was greater among subjects who did not attend the visit compared with attendees ($p<0.001$), this difference being found only among bakers/pastry-makers when sectors were analyzed separately.

OA classification

At the end of the investigations, participants were classified using the OA classification decisional tree (figure 1). Among the 282 visited subjects, 108 reported work-related respiratory symptoms (with or without ENT symptoms) during the visit. They were split across 14 **confirmed** OA cases, 17 **probable** OA cases, 18 **possible** OA cases, 16 undetermined, 6 cases of airway responsiveness (the occupational origin being impossible to investigate among these subjects, the OA diagnosis was not retained) and 39 non OA cases (figure 2). On the other hand, 55 reported only ENT symptoms.

Respectively 13%, 28% and 45% of participants who declared work-related respiratory symptoms after the telephone interview were classified as OA after the medical visit according to our 3 definitions (**OAc**, **OAcP** and **OAcPP**).

Early incidence of OA

Trends over time of the incidence of OA are presented in figure 3. Among bakers/pastry-makers, incidence is high during the first quartile (upper bound of 4.3 years) after inception of exposure. The average estimated incidence rate during this period is greater than in the other exposure duration groups ($p=2.10^{-3}$, $p=4.10^{-4}$ and $p=10^{-4}$ for comparisons of Q1 with Q2, Q3 and Q4, corresponding to upper bounds of 6.4, 8.6 and 16.3 years respectively) where rates are similar. Figures are more stable along time among hairdressers, but tend to show a similar pattern, with higher rates after short duration of exposure. No OA case was observed among the reference group during the same follow-up period.

OA incidence and atopy

Atopy is a risk factor of OA among bakers/pastry-makers ($RR=7.54$ [2.36–24.09]) while the association remains unclear ($RR=3.40$ [0.70–16.61]) among hairdressers. Regarding the prevalence of atopy, no difference was found between OA cases with short exposure duration (first quartile, 86%) relative to OA cases with a higher seniority ((the three other quartiles, grouped for the sake of statistical power because of small numbers of cases, 82% [atopy prevalence was consistent across these 3 quartiles; data not shown])) (table 2). Relative risks associated with atopy are similar among early (quartile 1) and later (quartiles 2,3 and 4) OA onset cases, both among bakers/pastry makers and among hairdressers (Atopy RRs = 6.00 [1.47 - 24.4] and 5.99 [1.78 - 20.1], respectively in the two occupational groups altogether). So that the relative risk for early occurrence – first quartile of exposure duration – versus later on is 1.04 [95% CI 0.77-1.41].

Current active smoking was unrelated to OA ($RR = 0.91$ [0.47 – 1.75]), even after adjusting for atopic status XXXX

OA risk and sector

Risk among bakers/pastry-makers is near four times greater than among hairdressers ($RR=3.64$ [2.04 – 6.49]). No difference ($p=0.93$) was observed across sectors for the latency period between inception of exposure and asthma symptoms among OA cases (mean=3.34 years [standard deviation=5.93] for bakers/pastry-makers versus 2.83 years [1.60] among hairdressers).

Global estimated incidence rates of OA during the first 12 years after inception of exposure (99th percentile of the exposure duration group) were 2.63 per 100 p-y for bakers/pastry-makers and 0.58 per 100 p-y for hairdressers.

Discussion

In summary, while the incidence rate of OA is higher during the first quartile of exposure compared with longer duration periods among bakers/pastry-makers, atopy is not a risk factor for earlier incidence. Similar results are suggested among hairdressers but fail to reach significance because of small numbers. Over the whole study period, early incidence rates are high in the two occupational sectors. Considering subjects who performed the visit, respectively 50% and 57% of all OA cases occurred during the 3 first years of exposure, within a 12 years (99th percentile) follow-up period among bakers/pastry-makers and hairdressers.

Atopic status was not a determinant of early onset of OA in any of the two exposed groups, whatever the OA definition that was used. Irrespective of the occupational sector, our results suggest that atopy does not influence the timing of OA symptoms which are not precipitated among atopic subjects, respective to non atopic. While atopy is well known as a predisposing factor for OA in bakers/pastry-makers, this relation is unclear among hairdressers (71% of atopic subjects among OA cases versus 40% among non cases - RR = 3.47 [0.70–17.05]). Published results are controversial in this sector. Albin *et al.* [25] found that atopy had no effect, nor was it associated with persulphate-related asthma in the subjects studied by Moscato *et al.* [26] or by Munoz *et al.* [27]. Akpinar-Elci *et al.* [28], however, found an increased risk among atopic hairdressers.

Our data confirm that the average rate of occurrence of OA is high during the first years of activity and exposure, as already demonstrated elsewhere [29, 30]. Beyond four years of exposure, average estimated incidence rates of OA remain stable, resulting in gradually increasing cumulative incidence among bakers/pastry-makers (for the **OAcP** and **OAcPP** case estimates), an observation in accord with that described by Jacobs *et al.* [31]. On the other hand, cumulative incidence is stable among hairdressers after 6.5 years. These time patterns express a combination of processes such as the force of early OA incidence, the severity of symptoms and the provisions that can be taken by asthmatic subjects to manage their condition, including quitting the job or, when possible, modifying their activity or workplace.

Considering OA incidence, our results are higher than previously published incidence rates, with a rate almost six times and nearly sixteen times greater in bakers/pastry-makers and hairdressers (0.44% p-y and 0.037 % p-y) respectively [2-4, 6-8, 10-12]. Several factors may explain this difference,

including methodology, data sources, case definition and work practices. We think this observation is also likely to express the underreporting of OA cases in many published papers, due to inappropriate methodology.

We chose bakers/pastry-makers, on the one side, and hairdressers, on the other side, because the physical and chemical nature of the agents involved in asthma development, and possibly the underlying mechanisms, differ substantially. Previous results from our team showed that the early incidence of bronchial hyperresponsiveness was greater among bakers/pastry-makers engaged into apprenticeship than among hairdressing students [32]. Our results do not support the view that these differences across occupational sectors translate into the duration of the latency period.

Based on data from subjects who had the medical visits, 50% of all OA cases among bakers/pastry-makers occurred during the 3 first years of exposure (71% among hairdressers), given the fact that we decided to set the date of asthma onset when the first respiratory symptoms were declared by the study participants. From a prevention point of view, this confirms that early screening of OA in these at risk occupations would be most appropriate by the end of apprenticeship (median exposure duration during apprenticeship = 2.8 years). It has been shown that the medical outcome is best when diagnosis of OA occurs soon after onset of symptoms, and workers are removed from further exposure or undertake appropriate treatment [33].

Some limitations of this study warrant discussion. Spirometry is a recommended method for measuring airflow limitation and reversibility in view of asthma diagnosis. However, it lacks sensitivity. Repeated testing along time was not practical with our study design, so that we recorded PEF as an alternative method and we looked for diurnal variation in PEF of more than 20%. Using the specific inhalation challenge, the gold standard to confirm the OA diagnosis, was not possible in the context of our study, leading to a probable overestimation of the true incidence of OA. The date retained for the diagnosis of OA was the occurrence of the work-related respiratory symptoms, in order not to overestimate the latency period. The consequence of this is also a probable overestimation of the OA incidence in the first exposure duration groups and, in contrast, an underestimation in the last ones.

Accurate PEFR monitoring depends on patient compliance and honesty. Now, diurnal variation was not interpretable for 49% of subjects considered as “putative OA cases” (results sheet not completed, data falsification or peak-flow not returned) and the OASys score was calculable for only 22% of

subjects (it needs more PEF records than required for the interpretation of diurnal variation and it is not computable for workers who have left their training sector). Moreover, period without work exposure was usually short, limited to two days of each week, a fact that could decrease the diagnostic yield of the OASys score. Furthermore, peak-flow monitoring does not totally exclude the possibility of asthma aggravated by work.

Different definitions were used to ascertain OA, with different levels of proof. For bakers/pastry-makers, the definition including 'confirmed' or 'probable' OA seems to us most suitable. Still, the true incidence of OA is likely to be greater because assessing the association of asthma with work suffers from uncertainties (e.g. OASys score not calculable or IgE assays not comprehensive). For hairdressers, the same diagnostic criteria tend to underestimate more heavily the incidence of OA. The reason is that it is hard to demonstrate sensitization to bleaching agents, and particularly to persulphate salts, the major causes of respiratory symptoms and of hairdressers' OA. Tests were either unavailable (for IgE assays) or unfeasible in the context of our study (French regulations prohibit to undertake prick-tests in a non medical environment). As a consequence, contrasts between the two sectors might be exaggerated for the **OAc_p** estimate.

The asthma status of subjects for whom diurnal variability was not available and reversibility test not performed (or not contributory if the subject was not exposed anymore) remains uncertain. When these "undetermined" cases (N=16) were excluded, the global cumulative incidences of OA were reduced by 3.8% to 5.3% among bakers/pastry-makers according to the scenario; and by 7.0% to 9.3% among hairdressers, mostly women, including pregnant women for which the reversibility test with Salbutamol was not done.

Another limitation of this study is that 256 workers refused to complete the initial phone questionnaire. Data on 74 of these non participants for whom minimal information could be obtained despite refusal to participate did not show differences compared to volunteers concerning the prevalence of asthma-like symptoms (see online supplement for precisions). Also, 96 (37%) subjects classified as "putative OA cases" after the phone interview did not accept the medical visit, resulting in imprecision in the assessment of OA incidence. Because these subjects did not exhibit differences in OA relevant characteristics, we think that extrapolation of the OA frequencies observed among those who underwent the medical visit is appropriate. Comparisons between bakers/pastry-makers who

attended or not showed a greater sector drop out among non attendees; this might be due to the fact they felt less concerned by the study topic. However, this difference was unrelated to medical conditions.

Finally, these limitations tend to underestimate the incidence of OA in our study, possibly with greater impact on hairdressers than on bakers/pastry-makers. To estimate the cumulative incidence of OA, predictive values of symptoms declared after the telephone interviews were calculated on the basis of all subjects who also performed the medical visit, by occupational sector. Due to the limited size of our study sample, we computed these predictive values over all exposure durations, which might result in reduced contrasts in incidence estimates between exposure duration quartiles.

Conclusions

Atopy was not a risk factor for earlier onset of OA among bakers/pastry-makers and hairdressers. Occupational asthma symptoms occur soon after inception of exposure with greater incidence rates among the former, an observation that pledges for early screening of OA, by the end of apprenticeship in these at risk occupations.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors contributions

TR carried out the epidemiologic study, participates in the medical visits with DSA and performed the statistical analysis. TR and DSA participated in the design of the protocol and drafted the manuscript. CP, DZN, BH, MP and BC participated to the interpretation of results. CP and DZN designed the study and drafted the manuscript. BH, MP, BC and AB reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors are grateful to the young workers who volunteer in this study and to their family for the recruitment preliminary step. They thank the directors and the administrative personnel of the 9 vocational training centres of Lorraine of Bar-Le-Duc, Forbach, Gérardmer, Epinal, Laxou, Metz, Nancy, Epinal and Thionville.

This projects received funds from AFSSET (contract EST-08-03), the national PHRC-Hospital clinical research programme (2008), the Lorraine Region, the Grand Nancy Urban Community and the Meurthe et Moselle Département..

Thomas Remen and Dovi-Stéphanie Acouetey were recipients of doctoral grants from the Lorraine Region.

REFERENCES

- [1] Global Initiative for Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention. Updated December 2010. <http://www.ginasthma.com>
- [2] Ameille J, Pauli G, Calastreng-Crinquand A, Vervloet D, Iwatsubo Y, Popin E, et al. Reported incidence of occupational asthma in France, 1996-99: the ONAP programme. *Occup Environ Med*. 2003 Feb;60(2):136-41.
- [3] Bena A, D'Errico A, Mirabelli D. [A system for the active surveillance of occupational bronchial asthma: the results of 2 years of activity of the PRiOR program]. *Med Lav*. 1999 Jul-Aug;90(4):556-71.
- [4] Karjalainen A, Kurppa K, Virtanen S, Keskinen H, Nordman H. Incidence of occupational asthma by occupation and industry in Finland. *Am J Ind Med*. 2000 May;37(5):451-8.
- [5] Latza U, Baur X. Occupational obstructive airway diseases in Germany: Frequency and causes in an international comparison. *Am J Ind Med*. 2005 Aug;48(2):144-52.
- [6] Leira HL, Bratt U, Slastad S. Notified cases of occupational asthma in Norway: exposure and consequences for health and income. *Am J Ind Med*. 2005 Nov;48(5):359-64.
- [7] McDonald JC, Keynes HL, Meredith SK. Reported incidence of occupational asthma in the United Kingdom, 1989-97. *Occup Environ Med*. 2000 Dec;57(12):823-9.
- [8] Toren K. Self reported rate of occupational asthma in Sweden 1990-2. *Occup Environ Med*. 1996 Nov;53(11):757-61.
- [9] Gautrin D, Newman-Taylor AJ, Nordman H, Malo JL. Controversies in epidemiology of occupational asthma. *Eur Respir J*. 2003 Sep;22(3):551-9.
- [10] Meredith S. Reported incidence of occupational asthma in the United Kingdom, 1989-90. *J Epidemiol Community Health*. 1993 Dec;47(6):459-63.
- [11] Gannon PF, Burge PS. The SHIELD scheme in the West Midlands Region, United Kingdom. Midland Thoracic Society Research Group. *Br J Ind Med*. 1993 Sep;50(9):791-6.

- [12] Brisman J, Jarvholm B, Lillienberg L. Exposure-response relations for self reported asthma and rhinitis in bakers. *Occup Environ Med*. 2000 May;57(5):335-40.
- [13] Walusiak J, Wiszniewska M, Krawczyk-Adamus P, Niescierenko E, Palczynski C. [Allergy to alpha-amylase in apprentice bakers--prevalence, incidence, risk factors and clinical symptoms]. *Med Pr*. 2005;56(2):121-30.
- [14] Gautrin D, Infante-Rivard C, Ghezze H, Malo JL. Incidence and host determinants of probable occupational asthma in apprentices exposed to laboratory animals. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Mar;163(4):899-904.
- [15] Archambault S, Malo JL, Infante-Rivard C, Ghezze H, Gautrin D. Incidence of sensitization, symptoms, and probable occupational rhinoconjunctivitis and asthma in apprentices starting exposure to latex. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 May;107(5):921-3.
- [16] Malo JL. Prevention of occupational asthma. Proceedings of the first. Jack Pepys Occupational Asthma Symposium. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:463–464.
- [17] Remen T, Coevoet V, Acouetey DS, Gueant JL, Gueant-Rodriguez RM, Paris C, et al. Early incidence of occupational asthma among young bakers, pastry-makers and hairdressers: design of a retrospective cohort study. *BMC Public Health*. 2010;10:206.
- [18] Rémen T, Acouetey DS, Paris C, Zmirou-Navier D. Diet, occupational exposure and early asthma incidence among bakers, pastry makers and hairdressers. *BMC Public Health*. 2012 May 29;12:387.
- [19] Kauffmann F, Annesi-Maesano I, Liard R, Paty E, Faraldo B, Neukirch F, et al. Construction and validation of a respiratory epidemiological questionnaire. *Rev Mal Respir*. 2002 Jun;19(3):323-33.
- [20] Delclos GL, Arif AA, Aday L, Carson A, Lai D, Lusk C, et al. Validation of an asthma questionnaire for use in healthcare workers. *Occup Environ Med*. 2006 Mar;63(3):173-9.
- [21] Vandenplas O, Ghezze H, Munoz X, Moscato G, Perfetti L, Lemiere C, et al. What are the questionnaire items most useful in identifying subjects with occupational asthma? *Eur Respir J*. 2005 Dec;26(6):1056-63.

- [22] Levy ML, Fletcher M, Price DB, Hausen T, Halbert RJ, Yawn BP. International Primary Care Respiratory Group (IPCRG) Guidelines: diagnosis of respiratory diseases in primary care. *Prim Care Respir J*. 2006 Feb;15(1):20-34.
- [23] Mapp CE, Polato R, Maestrelli P, Hendrick DJ, Fabbri LM, Time course of the increase in airway responsiveness associated with late asthmatic reactions to toluene diisocyanate in sensitised subjects, *J Allergy Clin Immunol*, 1985 ; 75 : 568-572.
- [24] Vidal C, Gude F, Boquete O, Fernandez-Merino MC, Meijide LM, Rey J, et al. Evaluation of the phadiatop test in the diagnosis of allergic sensitization in a general adult population. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2005;15(2):124-30.
- [25] Albin M, Rylander L, Mikoczy Z, Lillienberg L, Dahlman Hoglund A, Brisman J, et al. Incidence of asthma in female Swedish hairdressers. *Occup Environ Med*. 2002 Feb;59(2):119-23.
- [26] Moscato G, Pignatti P, Yacoub MR, Romano C, Spezia S, Perfetti L. Occupational asthma and occupational rhinitis in hairdressers. *Chest*. 2005 Nov;128(5):3590-8.
- [27] Munoz X, Cruz MJ, Orriols R, Torres F, Espuga M, Morell F. Validation of specific inhalation challenge for the diagnosis of occupational asthma due to persulphate salts. *Occup Environ Med*. 2004 Oct;61(10):861-6.
- [28] Akpinar-Elci M, Cimrin AH, Elci OC. Prevalence and risk factors of occupational asthma among hairdressers in Turkey. *J Occup Environ Med*. 2002 Jun;44(6):585-90.
- [29] Gautrin D, Ghezzi H, Infante-Rivard C, Magnan M, L'Archeveque J, Suarathana E, et al. Long-term outcomes in a prospective cohort of apprentices exposed to high-molecular-weight agents. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Apr 15;177(8):871-9.
- [30] Gautrin D, Ghezzi H, Infante-Rivard C, Malo JL. Incidence and determinants of IgE-mediated sensitization in apprentices. A prospective study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Oct;162(4 Pt 1):1222-8.
- [31] Jacobs JH, Meijster T, Meijer E, Suarathana E, Heederik D. Wheat allergen exposure and the prevalence of work-related sensitization and allergy in bakery workers. *Allergy*. 2008 Dec;63(12):1597-604.

- [32] Tossa P, Paris C, Zmirou-Navier D, Demange V, Acouetey DS, Michaely JP, et al. Increase in exhaled nitric oxide is associated with bronchial hyperresponsiveness among apprentices. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Sep 15;182(6):738-44.
- [33] Gannon PF, Weir DC, Robertson AS, Burge PS. Health, employment, and financial outcomes in workers with occupational asthma. *Br J Ind Med*. 1993 Jun;50(6):491-6.

Tables

Table 1: Socio-demographic characteristics of the study participants – telephone interviews (N= 866)

Sector	N	Mean age (in years) [SD]	Working time [▲] (in years) [SD]	Smokers (%)	Women (%)	Sector dropout [†] (%)
Bakers or Pastry-makers (BP)	455	24.6 [2.9]	5.7 [2.6]	51.7	8.1	35.2
<i>BP attended [§]</i>	148	24.6 [2.9]	6.3 [2.4]	50.7	9.5	18.2
<i>BP non attended [§]</i>	307	24.6 [3.0]	5.4 [2.7]	52.1	7.5	43.3
Hairdressers (H)	313	25.8 [3.1]	7.1 [2.6]	49.8	94.3	18.9
<i>H attended [§]</i>	114	25.5 [2.6]	7.0 [2.3]	45.6	97.4	14.9
<i>H non attended [§]</i>	199	25.9 [3.1]	7.2 [2.7]	52.3	92.5	21.2
Sale or food workers (SFw)	98	26.8 [1.5]	7.4 [2.8]	61.2	44.9	31.6
<i>SFw attended [§]</i>	20	27.0 [1.4]	6.5 [2.6]	70.0	55.0	35.0
<i>SFw non attended [§]</i>	78	26.8 [1.5]	7.6 [2.8]	59.9	42.3	30.8
All	866	25.3 [2.9]	6.4 [2.7]	52.1	43.4	28.9
<i>All attended [§]</i>	282	25.1 [2.8]	6.6 [2.4]	50.0	48.2	18.1
<i>All non attended [§]</i>	584	25.3 [3.0]	6.3 [2.9]	53.1	41.1	34.1

[▲] In the sector in which the subjects were graduated (with consideration of the probationary period during apprenticeship)

[†] From the sector in which the subjects were graduated

[§] In reference to the medical visit

Table 2: Prevalence of atopy according to exposure duration among bakers/pastry makers and hairdressers who attended the medical visits

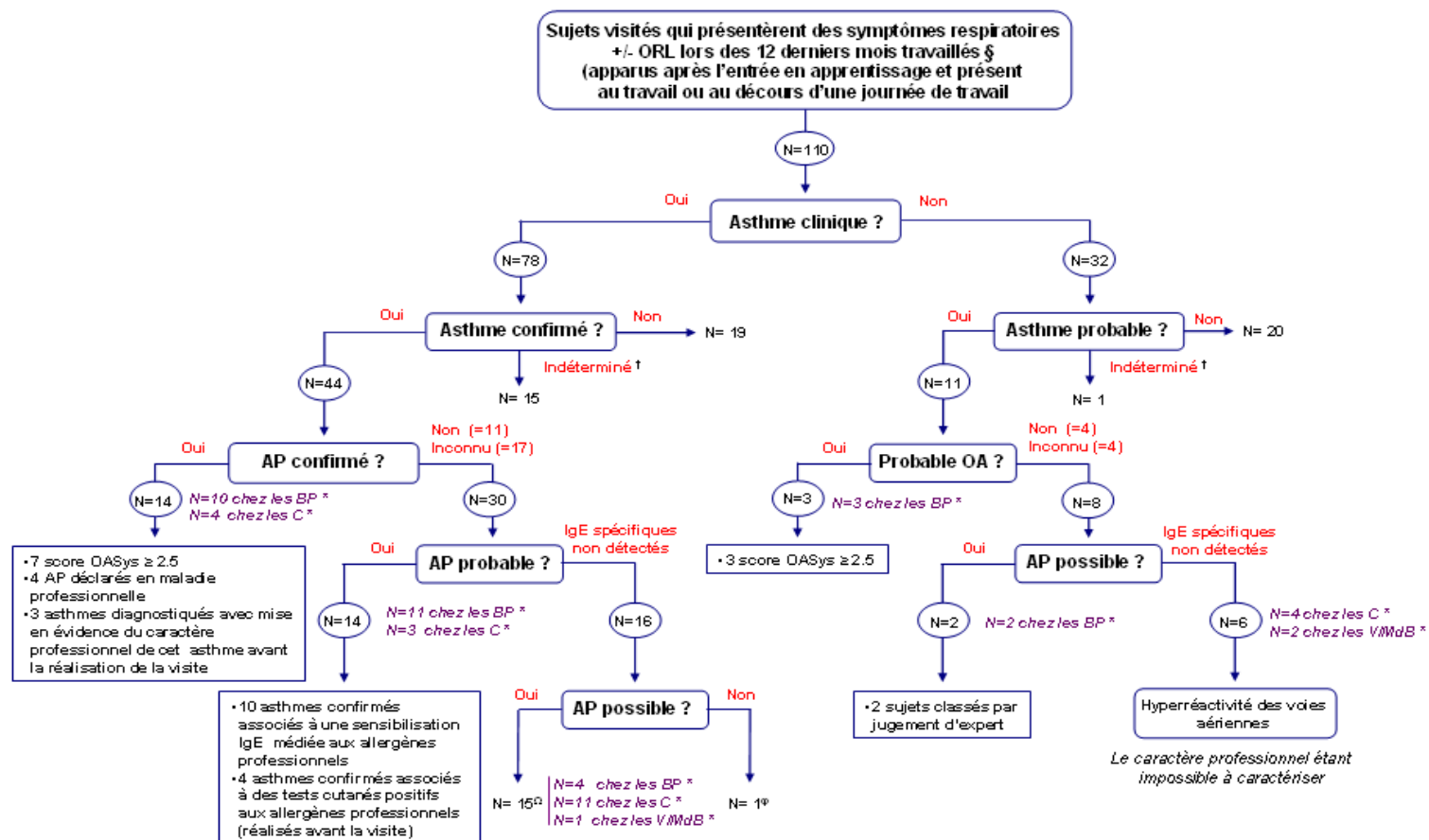
Prevalence of atopy among cases	Exposure duration	
	Quartile 1	Quartiles 234†
Among bakers and pastry makers	0,91	0,85
Among hairdressers	0,67	0,75
Total	0,86	0,82

Table 3: Prevalence of occupational asthma (OA) according to exposure duration and atopic status
among bakers/pastry makers and hairdressers who attended the medical visits

Prevalence of OA and risk associated	Exposure duration			
	Quartile 1		Quartiles 234 [†]	
	Atopic	Non atopic	Atopic	Non atopic
Among bakers and pastry makers	45,5% (10 out of 22)	5,6% (1 out of 18)	25.6% (11 out of 43)	3.9% (2 out of 52)
	RR = 8.18 [1.15 - 58.03]		RR = 6.65 [1.55 - 28.40]	
Among hairdressers	33.3% (2 out of 6)	10.0% (1 out of 10)	9.7% (3 out of 31)	2.3% (1 out of 43)
	RR = 3.33 [0.37 - 29.40]		RR = 4.16 [0.45 - 38.15]	
Total	42.9% (12 out of 28)	7.1% (2 out of 28)	18.9% (14 out of 74)	3.2% (3 out of 95)
	RR = 6.00 [1.47 - 24.39]		RR = 5.99 [1.78 - 20.08]	

[†] Because of small numbers, quartiles 2, 3 and 4 were grouped in order to be contrasted with subjects with the exposure duration (quartile 1) shorter

Annexe 14 : Répartition des sujets déclarant des symptômes respiratoires en relation avec le travail après la réalisation de la visite



* BP: boulangers et pâtisseries – C: coiffeurs – VMdB: vendeurs et métiers de bouche

† La confirmation de l'asthme n'est pas possible chez les sujets pour lesquels le test de réversibilité ne put être réalisé (contre-indication) ou non contributif (sujets ne travaillant plus dans le secteur), et pour lesquels le suivi du DEP ne put être interprété

‡ 16 sujets au total: 1 sujet présentant des symptômes respiratoires non reliés au travail fut classé comme 'AP Possible' par avis d'expert après interprétation du suivi du DEP

* Ce sujet réalisa des tests complémentaires à l'hôpital qui permit de relier les manifestations asthmatiques à la présence de moisissures au domicile du sujet

ANNEXE 15: Article FeNo (en cours d'écriture)

Exhaled nitric oxide (FENO) and the screening of occupational asthma in two at risk sectors: bakery and hairdressing

Florentin Arnaud^{1,2}, Acouetey Dovi-Stéphanie^{1,2}, Remen Thomas^{1,2}, Thaon Isabelle^{1,2},
Zmirou-Navier Denis^{1,2,3}, Paris Christophe^{1,2}.

1- Inserm U954, 9 Avenue de la forêt de Haye BP 184, 54 505 Vandœuvre-lès-Nancy
cedex France

2- Lorraine University Medical School, Nancy, France

3- EHESP School of Public Health, Rennes, France

Corresponding author

M. Arnaud FLORENTIN

INSERM U 954

Faculté de Médecine

9, avenue de la Forêt de Haye

BP 184

54 505 Vandœuvre-lès-Nancy

France

arnaud.florentin@medecine.uhp-nancy.fr

25 **Abstract**

26 Abstract **A écrire**

27 **Keywords**

28 Keywords

Introduction

The workplace is the source of significant exposure to known or suspected allergenic agents. This exposure may induce airway inflammation and occupational asthma. Occupational Asthma (OA) is a disease characterized by variable airflow limitation and/or airway hyperresponsiveness [1-3]. The diagnosis of occupational asthma is usually based on symptoms, measurement of airway obstruction indicators or non-specific bronchial hyperresponsiveness (BHR) [1-3]. Nevertheless, investigation of BHR is a time consuming procedure and requires a technical platform due to the risk of severe bronchospasm. As airway inflammation is the hallmark of asthma, indirect indicators of airway inflammation have been assessed for the diagnosis and management of OA [2-4]. Noninvasive methods are increasingly used such as induced sputum analysis, fractional exhaled nitric oxide or exhaled breath condensate. Sputum eosinophil counts and fractional concentration of exhaled nitric oxide (FENO) measurement has been widely studied in the last ten years. Both are increased in subjects with established asthma and management of asthma based on their control have been shown to reduce the occurrence of severe asthmatic exacerbations and allow lower doses of inhaled corticosteroids compared with the management of asthma based upon symptoms and spirometry [5, 6]. Furthermore, measurement of FENO is simple, noninvasive and quick to perform.

The aim of this paper is to assess the performance of FENO measurement in detecting occupational asthma in the setting of field occupational health surveillance.

Material and methods

A case control study was nested within the ABCD retrospective cohort. The ABCD (French acronym for early asthma in bakery and hairdressing sectors) is a retrospective follow-up study that aimed to assess early incidence of OA among young workers according to their sector of activity and exposure duration, and to identify some risk factors of OA [7, 8].

Briefly, exposed (bakers, pastry-makers and hairdressers) and non-exposed (sales and food sectors) subjects, who had graduated between 2001 and 2006 from nine vocational schools in Lorraine, North-Eastern France, were invited to participate. Details are presented elsewhere [7]. The cohort consisted of all who had completed a medical questionnaire during a telephone interview. We assessed their respiratory conditions and the time connection of symptoms with work, that was assessed using items derived from dedicated questionnaires [9, 10]. Subjects were included provided they had no history of asthma before apprenticeship. All subjects defined as "putative OA" cases, and a matched sample of "non cases" (frequency matching criteria: year of graduation, vocational school and occupational sector) were invited to participate in a medical visit to complete clinical and lung function investigations.

After the medical visit, each subject was classified into one of four categories [11]: *confirmed OA*; *probable OA*; *possible OA*; *absence of OA and unknown status*. In short, this classification was established on the basis of the following criteria: (i) the clinical definition of asthma proposed by the International Primary Care Respiratory Group [12]; (ii) recording of peak-flow expiratory curves for three weeks; (iii) a spirometry with bronchodilator testing (short acting β -2 agonist); and finally (iv) work-related specific IgE assays when available.

In the case control study, we included subjects still working in the sector of activity at the moment of the visit, who had undergone FENO measurements and the Phadiatop® test. We defined cases as subjects diagnosed as "confirmed or probable" OA. Controls were neither with "confirmed or probable" OA nor with and unknown OA status.

The research program was approved by the Nancy University Hospital ethics committee and written consents were obtained from the young workers themselves.

Clinical examination and blood sampling

A standardized questionnaire was used for personal and family antecedents and clinical examination [13]. During the medical examination, height and weight were recorded; the same material was used for all the subjects to avoid measurement bias. Past and present tobacco smoking status, history of work-related rhinitis, eczema and urticaria symptoms were retrieved using the EGEA questionnaire (Epidemiological Study of the Genetic and Environmental Factors in Asthma, Bronchial Hyper-responsiveness and Atopy) [13]. Blood samples were taken to determine total and specific IgE. Atopy was defined as the presence of a positive PhadiatopTM (Phadia, Sweden) test for common allergens.

Functional Respiratory Measurements

After the clinical examination, lung function investigations were performed including carbon monoxide (CO), fractional exhaled nitric oxide (FE_{NO}) and spirometry measurements.

To document the smoking status, CO was measured by a portable analyzer (Micro CO[®] analyser, Micro Medical, United Kingdom) that provides values after a single expiration.

Fractional Exhaled Nitric Oxide (FENO) was measured by a portable analyzer (Niox-Mino[®] analyzer, Aerocrine, Sweden). The FENO measurement realized at a mouth flow rate of 50 mL/s and a pressure of 10 cm H₂O in accordance with the recommended criteria [14]. A single measurement was undertaken. FENO results were expressed as part per billion (ppb) and as percentage of the predicted values presented by Olin and colleagues [15], which take into account atopy, smoking status, height, age and reported use of inhaled steroids.

Spirometry was performed, after CO and FE_{NO} measurements, using Spirolab II (RDSM Co., Italy) and according to the recommended criteria [16].

Statistical analysis

All statistical calculations were performed using the statistical software SPSS 16 [17]. Results of the descriptive analysis are presented as means (SD) and proportions. FE_{NO} values are

presented as medians and interquartile ranges. The univariate analysis was based on the Mann-Whitney and Chi Square tests and Spearman's correlation coefficient rho.

To assess the association between FE_{NO} and the different explanatory variables, a multiple linear regression model was performed, both with log-transformed FE_{NO} values and with FE_{NO} as a percentage of predicted values. Logistic regression was performed to assess the relationship between the case-control status and a positive FE_{NO} test. The significance level entry and to stay in the models were fixed at 0.20. Quantitative data were tested for linearity. For non-linear variables, they were divided into categories by using quartiles.

Results

For this study, we included only bakers, pastry-makers and hairdressers. The students' logs of the 9 vocational schools allowed to identify 3 275 apprentices who graduated between 2001 and 2006. Contact information on 2 282 (70%) subjects was obtained through the parents. Of these, 866 (38%) answered the telephone interview and were included in the study; 258 (30%) presented respiratory or rhinitis symptoms related to work and were offered a medical visit, among which 162 (63%) accepted. Among the 285 non symptomatic subjects selected for the visit, 122 performed it (acceptance rate=43%). Altogether, 178 workers were included in the analysis. Among them, 19 were classified as having occupational asthma: 2 (10.5%) were hairdresser and 17 (89.5%) were bakers or pastry makers. Demographic and other relevant characteristics of the study population are summarized in table I. Differences are observed between cases and controls concerning age, height and weight, cases being one year older, 5.4 cm higher and 8.3 Kg larger on average (p=0.045, 0.013 and 0.003 respectively). This can be explain by the gender distribution: the percentage of men was higher in cases than in controls (89.5 versus 52.2% respectively). In our population, gender and occupation status was strongly correlated, with X% of bakers or pastry-makers being males and Y% of hairdressers

being females ($p < 0.001$). Smoking status and seniority are not statistically different in the two groups.

Table I: Descriptive characteristics of study subjects

Characteristics	Cases	Controls	Total	p
Number of subjects (n)	19	159	178	
Men (n, (%))	17 (89.5%)	83 (52.2%)	100 (56.2%)	0.002
Women (n, (%))	2 (10.5%)	76 (47.8%)	78 (43.8%)	
Age (years, mean, (sd))	25.9 (2.5)	24.9 (3.0)	25.0 (2.9)	0.045
Height (cm, mean, (sd))	175.3 (6.9)	169.9 (9.2)	170.5 (9.1)	0.013
Weight (kg, mean, (sd))	78.5 (11.7)	70.2 (14.0)	71.1 (14.0)	0.003
Smoking status				
Nonsmokers (n, (%))	7 (36.8%)	83 (52.2%)	90 (50.6%)	0.206
Smokers (n, (%))	12 (63.2%)	76 (47.8%)	88 (49.4%)	
Occupation				
Bakers or pastry makers (n, (%))	17 (89.5%)	87 (55.8%)	104 (59.4%)	0.005
Hairdressers (n, (%))	2 (10.5%)	69 (44.2%)	71 (40.6%)	
Seniority (years, mean, (sd))	7.5 (2.8)	7.0 (2.2)	7.0 (2.3)	0.315
Atopy (n, (%))	16 (84.2%)	61 (38.4%)	77 (43.3%)	< 0.001
Active steroid treatment	6 (31.6%)	2 (1.3%)	8 (4.5%)	< 0.001

FE_{NO} was not normally distributed. FE_{NO} values are shown in table 2, stratified by known modifying factors as smoking status or atopy. FE_{NO}, expressed as ppb, is moderately correlated with height ($\rho = 0.177$, $p=0.018$) but not with age, weight and seniority. FE_{NO} values were higher among cases, men, nonsmokers and bakers/pastry makers; this remains true for values expressed as a percentage of the predicted value for cases, although gender and the smoking status are taken into account in calculating the predicted values.

Table II: FE_{NO} (median (interquartile range) in ppb and as % predicted) in cases and controls stratified by occupational asthma status, sex, atopy, occupation and smoking status

	FE _{NO} as ppb [FE _{NO} as % predicted]	p
Case-control status		
Cases (n=19)	25.0 (9.0 – 37.0)	0.002
	[103.5 (83.3 – 139.2)]	0.003

Controls (n=159)	9.0 (6.0 – 13.0) [82.9 (67.1 – 94.4)]	
Gender		
Men (n=100)	11.5 (6.25 – 19.0)	0.024
Women (n=78)	9.0 (5.0 – 12.0)	
Atopic status		
Non-atopy (n=101)	9.0 (5.5 – 15.0)	0.399
Atopy (n=77)	11.0 (7.0 – 17.0)	
Active cigarette smoking		
Nonsmokers (n=90)	12.5 (8.0 – 22.25)	> 0.001
Smokers (n=88)	8.0 (5.0 – 11.0)	
Occupation		
Bakers or pastrymakers (n=104)	11.0 (6.0 – 19.0) [87.9 (69.6 – 101.5)]	0.035 0.104
Hairdressers (n=74)	9.0 (5.0 – 12.0) [80.2 (64.5 – 94.0)]	
Steroid treatment		
Yes (n=8)	12.0 (10.0 – 22.25)	0.222
No (n=170)	10.0 (6.0 – 15.0)	

In a multiple linear regression model, the case-control and smoking status, and gender were introduced. Atopy was forced into the models due to the literature regarding the relationship between atopy and FE_{NO} values. Gender and occupation were excluded from the model 1 due to their correlation, together and with height. Results are presented in table III, showing higher FE_{NO} values among cases and among non-smokers.

Table III: Multiple linear regression models of FE_{NO} according to case-control status, gender or occupational, smoking status and atopy.

	Model 1 FENO as ppb	Model 2 FENO as % predicted
	Coefficient (CI 95 %)	Coefficient (CI 95 %)
Intercept	-55.7 (-92.2 ; -19.3)	53.8 (38.6 ; 69.1)
Case-control status (0=control)	19.9 (13.3 – 26.6)	24.3 (11.0 ; 67.6)
Height (centimeter)	0.3 (0.1 ; 0.5)	
Smoking status (0=nonsmoking)	-9.8 (-13.7 ; -5.9)	
Atopy status (0=non-atopic)	0.6 (-3.5 ; 4.6)	

Using ROC curves, we assessed the association between different FENO values (ppb and % predicted) and the diagnosis of occupational asthma. The area under the curve (AUC) was significantly different from the reference line for FENO as ppb (AUC: 0.717 [0.574 – 0.860], $p = 0.002$) and FENO as % predicted (AUC: 0.710 [0.569 – 0.850], $p = 0.003$) (figure 1). The global performance of FENO as a tool to predict OA is not high. However, good or fair sensitivity, close to 80 and 70%, can be achieved using low FENO thresholds, above 8.5 and 10.5 ppb, respectively. This is, as usual, at the cost of specificity (table IV).

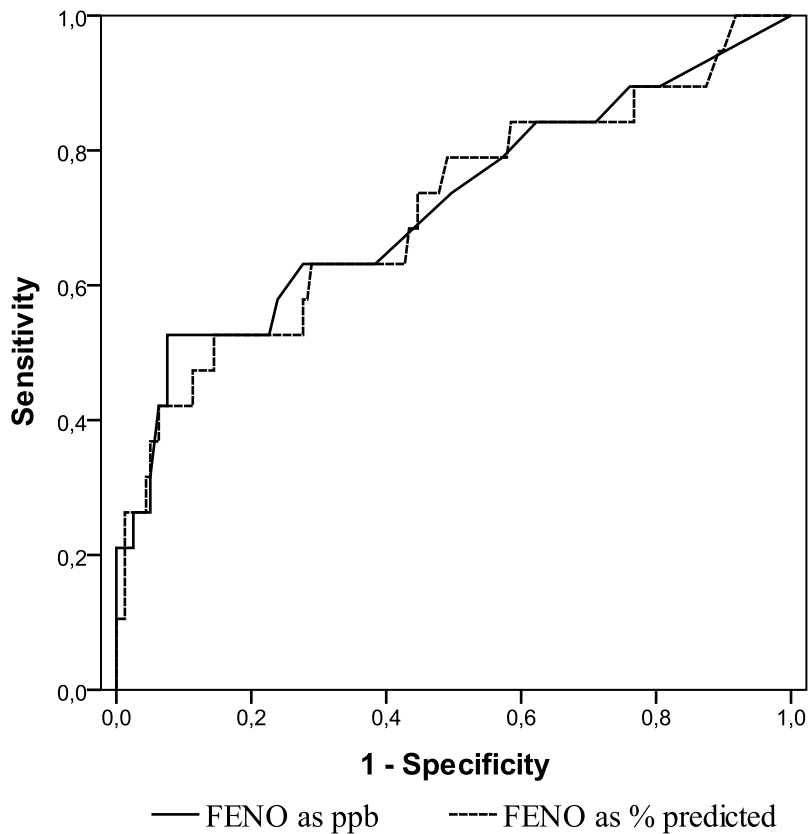


Figure 1: Receiver operating characteristic (ROC) curves of the fractional concentration of exhaled nitric oxide in detecting occupational asthma.

Table IV: Sensitivity, Specificity, Positive Predictive Value and Negative Predictive Value of different FENO values in the diagnosis of occupational asthma

FENO in ppb	FENO in % predicted	FENO > 8.5ppb and
-------------	---------------------	-------------------

Cut-off point	> 8.5	> 10.5	> 50 *	> 75.7	> 86.2	positive clinical examination
Sensitivity	78.9%	68.4%	21.0%	78.9%	68.4%	79.0%
Specificity	42.8%	56.0%	98.7%	42.1%	55.3%	80.5%
PPV	14.1%	15.7%	66.7%	18.3%	15.5%	32.6%
NPV	94.4%	93.7%	91.3%	95.8%	93.6%	97.0%

*Cut-points proposed by ATS in 2011 [18]

Using a threshold value of 8.5 ppb of FENO and a positive clinical examination, we detected 46 subjects with possible occupational asthma including 15 cases status subjects. 4 cases status subjects were classified incorrectly.

Discussion

The main objective of this article was to assess, in a population of young bakers, pastry makers and hairdressers, whether FENO measurements could help the screening of occupational asthma as a tool in field surveillance. Our results show that high sensitivity (close to 70 and 80%, respectively) can be achieved for FENO values above 8.5 or 10.5 ppb. Using such low threshold values, however, more than 4 (or 5) out of 10 subjects would incorrectly be classified as asthmatics, a typical trade-off that calls for a second row test with higher specificity, to be offered in specialized medical premises.

The exhaled NO levels observed were similar to those found in a previous study with the same type of population [19, 20]. In agreement with other findings, FENO of smoking subjects and of women was significantly lower than among non-smokers and men [20]. Unexpectedly, in our study, atopy was not associated with FENO elevation, an observation which had already been made in other studies (refs); noteworthy is that 79% of our atopic subjects were controls.

X

FENO has been proposed to help diagnose asthma in the general population (ref). For this purpose, the American Thoracic Society (ATS) suggested that FENO > 50 ppb indicates a high likelihood of eosinophilic inflammation among adults (> 12 years old) [Dweik, 2011 #86]. Dupont & al. have issued a threshold value of 13 ppb [21], this threshold is associated

with a sensitivity of 85% and a specificity of 80%. Our study shows a significantly higher (about twice) threshold of 24.5 ppb with a sensitivity just over 50% but a higher specificity (X%). However, some other studies highlighted a threshold value of 30 ppb [22, 23]. This threshold value was associated with a sensitivity of 75% and a specificity of 87% for the diagnosis of chronic cough. Two hypotheses could explain the lower sensitivity of our study: Firstly, because of the retrospective design of the study, some patients suffered from occupational asthma for some time when the medical examination took place. They may have changed their habits to reduce exposure or be under medication. Secondly, we performed our measurements of FENO at home, after the work shift. Several studies have demonstrated that FENO was decreased during and immediately after exposure (ref). This decrease has been associated with bronchoconstriction which increase the speed of airflow in the bronchi and thus the decrease the FENO value by lesser contact time. The use of FENO in the diagnosis of asthma is controversial because of the substantial number of factors that may cause variation. Thus it has been demonstrated that smoking, treatment with corticosteroids resulted a decrease in exhaled NO. In contrast, allergic rhinitis and respiratory infections result in an increase. For purposes of this study, we excluded some of these factors such as corticosteroid therapy, presence of allergic rhinitis or a recent respiratory infection. As mentioned previously, we find this difference to the factors that we included. The values of exhaled NO are also dependent on the exhalation flow rate. Therefore we measured exhaled NO as recommended by the ATS at a rate of 50 mL/s.

The strength of our study is to propose a threshold value of FE_{NO} measure provided close to the real. Although our measurements of FE_{NO} were not performed under the same conditions as during a occupational medical check, it is much closer to that challenge testing laboratory. Few studies [19, 20, 24] have highlighted the rise of FE_{NO} after an exposure to wheat flour and isocyanates in a population of hairdressers or bakers

Conclusion

We have shown that, in this specific study population, FE_{NO} measurements can not be considered as a valid screening test of occupational asthma. FE_{NO}, as a rapid and non-invasive screening tool, could possibly help to reduce the number of provocation tests and furthermore the health-care costs.

Acknowledgements

We would like to thank.

Bibliography

1. Chan-Yeung, M., *Assessment of asthma in the workplace. ACCP consensus statement. American College of Chest Physicians*. Chest, 1995. **108**(4): p. 1084-117.
2. Arghir, O.C., C. Constandina, and A. Rascu, *[Diagnosis and management of occupational asthma in the American College of Chest Physicians statement]*. Pneumologia, 2009. **58**(4): p. 259-62.
3. Nicholson, P.J., P. Cullinan, and S. Burge, *Concise guidance: diagnosis, management and prevention of occupational asthma*. Clinical medicine, 2012. **12**(2): p. 156-9.
4. Lemiere, C., *Induced sputum and exhaled nitric oxide as noninvasive markers of airway inflammation from work exposures*. Current opinion in allergy and clinical immunology, 2007. **7**(2): p. 133-7.
5. Green, R.H., et al., *Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial*. Lancet, 2002. **360**(9347): p. 1715-21.
6. Smith, A.D., et al., *Use of Exhaled Nitric Oxide Measurements to Guide Treatment in Chronic Asthma*. New England Journal of Medicine, 2005. **352**(21): p. 2163-2173.
7. Remen, T., et al., *Early incidence of occupational asthma among young bakers, pastry-makers and hairdressers: design of a retrospective cohort study*. BMC public health, 2010. **10**: p. 206.
8. Remen, T., et al., *Diet, occupational exposure and early asthma incidence among bakers, pastry makers and hairdressers*. BMC public health, 2012. **12**(1): p. 387.
9. Delclos, G.L., et al., *Validation of an asthma questionnaire for use in healthcare workers*. Occupational and environmental medicine, 2006. **63**(3): p. 173-9.
10. Vandenplas, O., et al., *What are the questionnaire items most useful in identifying subjects with occupational asthma?* The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology, 2005. **26**(6): p. 1056-63.
11. Remen, T., et al., *Early incidence of occupational asthma in the bakery, pastry and hairdressing sectors*. Submitted.
12. Levy, M.L., et al., *International Primary Care Respiratory Group (IPCRG) Guidelines: diagnosis of respiratory diseases in primary care*. Primary care respiratory journal : journal of the General Practice Airways Group, 2006. **15**(1): p. 20-34.

- 250 13. Kauffmann, F., et al., *[Construction and validation of a respiratory epidemiological*
251 *questionnaire]*. Revue des maladies respiratoires, 2002. **19**(3): p. 323-33.
- 252 14. *ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline*
253 *measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide*, 2005.
254 American journal of respiratory and critical care medicine, 2005. **171**(8): p. 912-30.
- 255 15. Olin, A.C., et al., *Height, age, and atopy are associated with fraction of exhaled nitric*
256 *oxide in a large adult general population sample*. Chest, 2006. **130**(5): p. 1319-25.
- 257 16. *Standardization of Spirometry, 1994 Update*. American Thoracic Society. American
258 journal of respiratory and critical care medicine, 1995. **152**(3): p. 1107-36.
- 259 17. SPSS Inc. *SPSS for Windows, Release 16*. 2007; Available from: [http://www-](http://www-01.ibm.com/software/analytics/spss/)
260 [01.ibm.com/software/analytics/spss/](http://www-01.ibm.com/software/analytics/spss/).
- 261 18. Dweik, R.A., et al., *An official ATS clinical practice guideline: interpretation of*
262 *exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications*. American journal of
263 respiratory and critical care medicine, 2011. **184**(5): p. 602-15.
- 264 19. Demange, V., et al., *Associations of airway inflammation and responsiveness markers*
265 *in non asthmatic subjects at start of apprenticeship*. BMC pulmonary medicine, 2010.
266 **10**: p. 37.
- 267 20. Tossa, P., et al., *Increase in exhaled nitric oxide is associated with bronchial*
268 *hyperresponsiveness among apprentices*. American journal of respiratory and critical
269 care medicine, 2010. **182**(6): p. 738-44.
- 270 21. Dupont, L.J., M.G. Demedts, and G.M. Verleden, *Prospective evaluation of the*
271 *validity of exhaled nitric oxide for the diagnosis of asthma*. Chest, 2003. **123**(3): p.
272 751-6.
- 273 22. Deykin, A., et al., *Exhaled nitric oxide as a diagnostic test for asthma: online versus*
274 *offline techniques and effect of flow rate*. American journal of respiratory and critical
275 care medicine, 2002. **165**(12): p. 1597-601.
- 276 23. Chatkin, J.M., et al., *Exhaled nitric oxide as a noninvasive assessment of chronic*
277 *cough*. American journal of respiratory and critical care medicine, 1999. **159**(6): p.
278 1810-3.
- 279 24. Ferrazzoni, S., et al., *Exhaled nitric oxide and breath condensate pH in asthmatic*
280 *reactions induced by isocyanates*. Chest, 2009. **136**(1): p. 155-62.
- 281
- 282

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Diet, occupational exposure and early asthma incidence among bakers, pastry makers and hairdressers

Thomas Rémen^{1,2,4*}, Dovi-Stéphanie Acouetey^{1,2†}, Christophe Paris^{1,2} and Denis Zmirou-Navier^{1,2,3}

Abstract

Background: The natural history of occupational asthma (OA) is influenced by many determinants. This study aims to assess the combined roles of personal characteristics, including occupational exposure and nutritional habits, on the incidence of OA during the first years at work.

Methods: A nested case-control study was conducted within a retrospective cohort of young workers in the bakery, pastry-making and hairdressing sectors. Cases were subjects diagnosed as 'confirmed' or 'probable' OA consecutively to a medical visit (N = 31). Controls were subjects without OA (N = 196). Atopy was defined after blood specific IgE analysis, based on the PhadiatopTM test. Occupational exposure was characterized by standardized questionnaires and diet patterns by a food frequency questionnaire.

Results: Among bakers and pastry-makers, only atopy is an independent risk factor of OA (OR = 10.07 95%CI [2.76 – 36.65]). Among hairdressers, several variables are associated with OA. Body mass index (unit OR = 1.24 [1.03 – 1.48]) and the score of exposure intensity (unit OR = 1.79 [1.05 – 3.05]) are independent predictors of OA, but the role of atopy is weak (OR = 4.94 [0.66 – 36.75]). Intake of vitamin A is higher among hairdressers cases (crude p = 0.002, adjusted p = 0.01 after control for body mass index and atopy); the same observation is made for vitamin D (crude p = 0.004, adjusted p = 0.01).

Conclusion: This study suggests that the influence of several factors on the incidence of OA, including dietary vitamins, might vary across exposure settings.

Keywords: Occupational asthma, Epidemiology, Atopy, Vitamins

Background

Occupational asthma (OA) is a disease characterized by variable airflow limitation and/or airway hyperresponsiveness due to causes and conditions attributable to a particular work environment rather than to stimuli encountered outside the workplace [1]. Two types of OA can be distinguished: (i) immunologic OA appears after a latency period of exposure necessary for acquiring immunologic sensitization to the causal agent(s); and (ii) non immunologic OA occurs after acute exposure to high concentrations of irritants ('irritant-induced asthma') [2].

A general framework for the natural history of immunological OA encompasses several stages after onset of exposure, including development of sensitization and inception of OA that can be followed by removal from exposure and remission or persistence of OA [3]. This allergic march is influenced by multiple determinants. While occupational exposure plays the key role, with the interplay between the nature of agents encountered at the workplace (in particular the contrast between high- vs. low molecular weight agents) and intensity or exposure duration before and after occurrence of symptoms, other factors related to personal or more general characters also contribute to the onset of the disease, among which are genetic predispositions and possibly nutritional factors [3].

A large increase in the prevalence of asthma was observed during the last decades in most developed

* Correspondence: thomas.remen@inserm.fr

†Equal contributors

¹Inserm U954 (Institut National de la santé et de la Recherche Médicale), School of Medicine, Nancy, France

²Lorraine University Medical School, Nancy, France

Full list of author information is available at the end of the article

countries [4]. According to Allan *and coll.*, it would be the consequence of changing environmental and/or life-style factors rather than genetic influences [5]. Changes in diet have been put forward as responsible for part of this increase. However, interactions between these factors remain unclear. Numerous hypotheses have been discussed concerning the role of nutrition in asthma occurrence without definitive evidence. The role of antioxidants (vitamins A, C, E) or of vitamin D is still questioned, with contradictory hypotheses being reported [5,6]. Considering poly-unsaturated fatty acids (PUFA), a suggested mechanism relates increased dietary n-6:n-3 PUFA ratio to the augmentation of allergic disease and to asthma [4]. These hypotheses still need to be documented. Most of the epidemiologic studies involving nutritional factors have been implemented in the general population. Very few explored nutrition-environment interactions in OA [7] which can be viewed as a model of “experimental” asthma [8].

In the framework of a retrospective follow-up of young bakers, pastry-makers and hairdressers, i.e. in occupational sectors with a known high risk of OA, a nested case-control study was undertaken to assess the combined influence of personal characteristics (including nutritional habits) and occupational exposure on the incidence of OA during the first years at work.

Methods

Design and study population

The study protocol has been published previously [9]. Briefly, the ABCD (French acronym for early asthma in bakery and hairdressing sectors) study aimed to assess early incidence of OA among young workers according to their sector of activity and exposure duration, and to identify risk factors of OA. It was based on a retrospective follow-up design, with a nested case-control facet. The population based study comprises groups of exposed (bakers, pastry-makers and hairdressers) and non exposed subjects (sales and food sectors: butcher, pork butcher, caterer, cook job...), used as a reference group, who graduated between 2001 and 2006 (2001 for the non exposed group) from nine vocational schools in Lorraine, North-Eastern France. The cohort consisted of all who had completed a phone medical questionnaire about respiratory, ENT and skin conditions since engaging in their training and occupation, and about their connection with work [10].

Within this subset of the cohort, all subjects who declared work-related respiratory symptoms or isolated work-related rhinitis symptoms that had appeared after inception of exposure, and a matched sample of all others (frequency matching criteria: year of graduation, vocational school and occupational sector) were invited to participate in a medical visit to complete clinical and

lung function investigations and to collect blood samples for IgE assays (total IgE and specific IgE for work-related and common allergens).

The research program is authorized by the Nancy University Hospital ethics committee and written consents are obtained from the young workers themselves.

Selection of cases and controls

For the nested case-control study, we included only bakers, pastry-makers and hairdressers who had the medical visit.

Diagnosis of OA encompassed two aspects: (i) diagnosis of asthma, and (ii) evidence of a temporal relationship between the occurrence of symptoms and occupation. Each subject who performed the medical visit was classified according to a decisional tree for the definition of OA [10] into one of four categories: (i) *confirmed* OA; (ii) *probable* OA; (iii) *possible* OA; and (iv) *absence of* OA. Briefly, this classification was established after data collected during the medical visit on the basis of the following criteria: (i) the clinical definition of asthma proposed by the International Primary Care Respiratory Group [11]; (ii) recording of peak-flow expiratory curves for three weeks; (iii) a spirometry with bronchodilator testing (short acting β -2 agonist); and finally (iv) work-related specific IgE assays when available.

Cases were subjects diagnosed as ‘confirmed’ or ‘probable’ OA. Controls were subjects not diagnosed as OA (*neither confirmed, probable, nor possible*) and nor labelled with ‘unknown’ OA status (when PEF monitoring was not exploitable and reversibility tests were either not feasible or not usable).

Data collection

During the medical examination, height and weight were recorded with the same device - electronic balance and electronic height gauge - for all subjects (to avoid measurement bias). Two investigators realized the vast majority of medical visits (TR and DSA), with the assistance of three medical interns for some visits. Data on past and present tobacco smoking, history of work-related respiratory, rhinitis, eczema and urticaria symptoms were collected using the EGEA questionnaire [12]. The time sequence of symptoms with work was assessed using items derived from other dedicated questionnaires [13,14]. Atopic family history (first degree) was considered if at least one of the following pathologies was reported: asthma, hay fever, eczema, urticaria, or in case of a family history of treatment for allergy or desensitisation.

From blood sampling, specific IgE analysis was used to categorize subjects as atopic or not, based on the PhadiatopTM test (Phadia, Sweden). This test screens an

IgE-dependant allergy with a median sensitivity of 96% (ranging from 70% to 100% across studies) and a median specificity of 95% (77% to 100%) according to a meta-analysis on a general adult population [15]. The Phadia-top™ test includes mite, pollen, mould, and animal dander allergens, but the exact allergen composition is not issued by the company [15].

The phone screening questionnaire and the medical visit took place from March 2009 to July 2010. Analyses were performed from November 2010 to August 2011. The research program was authorized by the Nancy University Hospital ethics committee and written consents were obtained from the young workers themselves.

Exposure assessment

Exposure scores and duration were obtained from the occupational exposure questionnaires [16,17]. A score of *exposure intensity* depends on the average number of tasks declared to be realized each day. For bakers, the daily tasks were bread-making (kneading-machine loading, transfer by shovel, dough division, dough shaping, bread put in the oven), pastry-making (pastry preparation) and cleaning activities, and were scored (0, 1 or 2) using tertiles [see Additional file 1: Table S1 and Table S2 for more precision]. The sum of these 7 notes (from 0 to 2) defined the score of exposure intensity, a score of 0 reflecting a low exposure, a score of 14 a very high exposure. Calculation of exposure duration entailed reconstruction of the occupational history of each subject since inception of apprenticeship (duration of apprenticeship, diplomas obtained, hiring date, cumulative length of unemployment, date of sector dropout and date of administration of the phone questionnaire). This exposure duration corresponds to the cumulative periods of exposure since engaging in apprenticeship (excluding classroom periods during apprenticeship or periods of inactivity) until the date of the telephone interview. Hence, by construction, one year exposure duration encompasses more than one calendar year.

For hairdressers, a corresponding intensity score was based on the following four activities: perm, hair dyes, hair bleached and rinsing, with a note of 0, 1 or 2 according to tertiles of the average number of hairdressing tasks reported per day. The sum of these 4 scores (from 0 to 2) defined the score of exposure intensity among hairdressers, a score of 0 reflecting a low exposure, a score of 8 a very high exposure [see Additional file 1: Table S1 and S2 for more precision].

Nutritional intake

A food frequency questionnaire (Suvimax 2) [18] was used to evaluate dietary imbalance of nutritional factors during the 12 months prior to the medical visit. Briefly, this semi-quantitative food frequency questionnaire

(FFQ) was developed for self-administered assessment of usual dietary intake over the past year among French adults at an individual level. The food list contained 240 food and beverage items categorized into 22 categories. Validity and reproducibility of this questionnaire has been described elsewhere [18]. The frequency of consumption referred to usual consumption over the past year on an increasing scale including yearly, monthly, weekly or daily units, as suitable. The FFQ was self-administered and completed at home. Questionnaires were recovered and verified during the medical visit in order to complete eventual missing information and correct ambiguities.

French recipes, validated by food and nutrition professionals, were used to estimate amounts of simple items consumed among mixed foods. Frequencies were converted into numbers of servings per day and multiplied by the standard portion size or by the portion size declared using photographs. An ad hoc composition table was developed to calculate weighted mean nutrient values. The weights were derived from the gender-specific mean frequency of each item that was declared [18].

Statistical analysis

The data were analysed using SAS® 9.2 software. Proportions are expressed as percentages and quantitative data as means with standard deviations (SD). Quantitative data were tested for linearity. For non linear variables, they were divided into categories using quartiles. Comparisons used chi-square or Fisher exact tests, Student or Kruskal-Wallis tests, as appropriate. Logistic regression was used to calculate odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals, while adjusting for confounders or exploring effect modification. The significance level to remain in the model was fixed to 0.20, not to overlook confounding and weak associations.

Personal characteristics such as gender, age, BMI and smoking habits were compared between cases and controls. Medical characteristics such as atopy, respiratory, ENT and skin symptoms were also compared between these two groups. The role of nutritional intakes was explored in a second step. Crude ORs and, when appropriate, ORs adjusted for potential confounders such as atopy and body mass index are presented. Work-related symptoms were not retained for the multivariate model because of their strong association with the OA status.

Because of differences in the mechanisms involved in the onset of OA between the two occupational sectors, determinants of OA can vary according to the sector. Hence, the analysis was conducted separately according to sector, after a global assessment.

Results

Demographics

31 cases met the inclusion criteria. Respiratory symptoms had begun between less than 1 year to 7.4 years prior to the medical visits. Among the 202 control subjects meeting the inclusion criteria, 6 were excluded because of airway responsiveness whose association with occupational nature could not be investigated (absence of specific IgE assays), bringing the total number to 196 controls. Demographic and other relevant characteristics of the 227 subjects (mean age: 25.2 years, 40.5% hairdressers) retained in the analysis are summarised in Table 1.

Differences were observed between cases and controls concerning occupational sector and gender (more hairdressers and therefore more women among controls, respectively $p=0.03$ and $p=0.02$) and sector dropout (higher among cases [$p=0.002$]). Among hairdressers retained for the case-control study, 96.7% are women while, among bakers and pastry-makers, 90.4% are men. Because gender and occupational sectors are so strongly associated, no adjustment for sex will be done in sector specific analyses.

Atopy, exposure and symptoms

Crude associations are summarised in Table 2, separately for bakers and pastry-makers on the one hand, and hairdressers on the other hand. Atopy is significantly more frequent among cases than among controls in the bakery and pastry-making sectors; the same pattern is seen in hairdressers, but fails to reach significance. Exposure intensity is higher among hairdressing cases.

After multivariate analysis, only atopy remains an independent risk factor of OA among bakers and pastry-makers (OR = 10.07 95%CI [2.76 – 36.65]). Among hairdressers, atopy is weakly associated with OA (OR = 4.94

[0.66 – 36.75]), while BMI (unit OR = 1.24 [1.03 – 1.48]) and the score of exposure intensity (unit OR = 1.79 [1.05 – 3.05]) are independent predictors of OA.

OA and nutrient intakes

Associations between OA and nutrients intake are presented in Table 3. Overall, the associations of OA with vitamins D and E are borderline significant ($p=0.06$ for the two vitamins: 3.8 μg [SD = 3.0] among cases, vs 2.9 μg [2.1] among controls for vitamin D; respectively 21.1 mg [16.7] and 16.3 mg [11.0] for vitamin E), but vanishes after adjustment for body mass index and personal atopy. Adding exposure intensity in the model does not change the effect measures of nutrients intake (data not shown).

Among bakers and pastry-makers alone, no nutrient intake is associated with OA, whether prior to or after adjustment. On the other hand, among hairdressers, intake of vitamin A is higher among OA cases before adjustment ($p=0.002$; 1.9 mg [1.2] among cases, vs 0.7 μg [0.6] among controls) and after ($p=0.01$). The same association is found with vitamin D, whether before ($p=0.004$; 5.5 μg [2.5] among cases, vs 2.5 μg [1.7] among controls) or after adjustment ($p=0.01$).

Discussion

Our results show that among hairdressers, intensity of exposure, measured by the daily number of specific tasks, and body mass index are risk factors of OA. Also, vitamin A and D intakes are greater among cases than among controls in this group. On the other hand, nutritional patterns showed no association with OA among bakers and pastry-makers. While the well known role of atopy on the occurrence of OA is confirmed in this sector, it is also suggested among hairdressers.

Table 1 Descriptive characteristics of cases and controls

Characteristic		Cases (N = 31)	Controls (N = 196)	Total (N = 227)	p	Test used ^Q
Women	%	8 (25.8%)	94 (48.0%)	102 (44.9%)	0.02	Chi2
Age (years)	Mean [SD]	26.1 [2.5]	25.1 [3.0]	25.2 [2.9]	0.06	T
Height (cm)	Mean [SD]	173.4 [8.0]	170.1 [9.2]	170.5 [9.1]	0.06	T
Weight (kg)	Mean [SD]	77.5 [15.5]	70.2 [14.1]	71.2 [14.5]	0.009	T
Tobacco smoking (at visit):						
Never smokers	%	10 (32.2%)	76 (38.8%)	86 (37.9%)		
Ex smokers	%	7 (22.6%)	26 (13.3%)	33 (14.5%)	0.38	Chi2
Current smokers	%	14 (45.2%)	94 (48.0%)	108 (47.6%)		
Occupation:						
Hairdressers	%	7 (22.6%)	85 (43.4%)	92 (40.5%)	0.03	Chi2
Exposure duration (years)	Mean [SD]	6.1 [3.1]	6.7 [2.2]	6.6 [2.4]	0.25	KW
Sector dropout [†]	%	10 (32.3%)	22 (11.2%)	32 (14.1%)	0.004	F

Q Chi2 = chi-square test – T = Student test – KW = Kruskal-Wallis test – Fisher = fisher test.

† From the sector in which the subjects graduated.

Table 2 Distribution of symptoms and of putative risk factors among cases and controls according to the occupational sector

Variable		All			Bakers and pastry-makers			Hairdressers			Test used ^Ω
		Cases (N=31)	Controls (N=196)	p	Cases (N=24)	Controls (N=111)	p	Cases (N=7)	Controls (N=85)	p	
Body mass index (kg/m ²)	Mean [SD]	25.9 [5.9]	24.2 [3.9]	0.13	25.6 [5.8]	25.1 [4.1]	0.94	27.2 [6.3]	23.1 [3.4]	0.07	KW
Work-related rhinitis symptoms	%	28 (90.3%)	77 (39.3%)	<0.001	22 (91.7%)	45 (40.5%)	<0.001	6 (85.7%)	32 (37.7%)	0.02	Chi2
Work-related eczema symptoms	%	11 (35.5%)	23 (11.7%)	0.002	7 (29.2%)	7 (6.4%)	<0.001	4 (57.1%)	16 (18.8%)	0.04	Chi2
Work-related urticaria symptoms	%	7 (22.6%)	12 (6.1%)	0.007	6 (25.0%)	4 (3.6%)	0.002	1 (14.3%)	8 (9.4%)	0.53	Fisher
Personal atopy	%	26 (83.9%)	78 (39.8%)	<0.001	21 (87.5%)	44 (39.6%)	<0.001	5 (71.4%)	34 (40.0%)	0.13	Chi2
Family atopy	%	12 (38.7%)	82 (41.8%)	0.74	8 (33.3%)	37 (33.3%)	1.00	4 (57.1%)	45 (52.9%)	1.00	Chi2
Exposure duration (year)											
0 - 4.7 (Q1)	%	14 (45.1%)	42 (21.4%)		11 (45.8%)	29 (26.1%)		3 (42.9%)	13 (15.3%)		
4.8 - 6.6 (Q2)	%	3 (9.7%)	55 (28.1%)	0.02	2 (8.3%)	33 (29.7%)	0.11	1 (14.3%)	22 (25.9%)	0.40	Chi2
6.7 - 8.2 (Q3)	%	7 (22.6%)	49 (25.0%)		6 (25.0%)	25 (22.5%)		1 (14.3%)	24 (28.2%)		
8.3 - 13.8 (Q4)	%	7 (22.6%)	50 (25.5%)		5 (20.8%)	24 (21.6%)		2 (28.6%)	26 (30.6%)		
Score of exposure intensity											
Among bakers/ pastry-makers§	Mean [SD]	-	-	-	5.0 [3.1]	5.5 [3.5]	0.59	-	-	-	KW
Among hairdressers†	Mean [SD]	-	-	-	-	-	-	6.9 [1.3]	4.5 [2.4]	0.01	KW

Ω KW = Kruskal-Wallis test – Chi2 = chi-square test – Fisher = fisher test.

§ Score max = 14.

† Score max = 8.

In our study, “work intensity” is positively associated with OA incidence among hairdressers and reflects the number and variety of techniques (discoloration, colouring, perms) performed in a typical day. Akpinar-Elci and coworkers also found a higher risk of OA in high work intensity hairdressers [19], in accord with another study that showed an increased risk of OA, thought not significant, among hairdressers often performing hair bleaching treatments or using hair spray, compared with more infrequent users [20]. We found no such association among bakers and pastry-makers. For Brisman

et al., the risk of asthma or rhinitis is less dependent on the cumulative dose of inhaled flour dust than on current exposure [21]; also, a longitudinal study showed significant associations between dust concentrations at onset of disease and the risk of asthma and rhinitis [22]. Discrepancies in the job dropout process due to OA symptoms could in part explain these differences in the time sequence between exposure and disease incidence across occupational sectors, since bakers have more opportunities for job reclassification than hairdressers, in particular by switching to pastry-making,

Table 3 Associations between OA and nutrients intake, by occupational sector

Nutrient intake	Unit	All		Bakers and pastry makers		Hairdressers	
		Crude odds ratio*	Adjusted [†] odds ratio*	Crude odds ratio*	Adjusted [†] odds ratio*	Crude odds ratio*	Adjusted [†] odds ratio*
Energy intake	Mcal	1.33 [1.07 - 1.65]	1.28 [1.01 - 1.60]	1.12 [0.86 - 1.44]	1.07 [0.81 - 1.41]	2.16 [1.15 - 4.07]	1.94 [1.00 - 3.72]
n-6:n-3 PUFA ^λ	g	1.02 [0.91 - 1.13]	1.01 [0.91 - 1.13]	1.11 [0.96 - 1.28]	1.08 [0.92 - 1.25]	0.77 [0.56 - 1.06]	0.74 [0.50 - 1.10]
Vitamin A	mg	1.16 [0.89 - 1.52]	1.22 [0.90 - 1.65]	0.93 [0.61 - 1.41]	0.90 [0.50 - 1.60]	4.08 [1.64 - 10.14]	3.47 [1.30 - 9.22]
Vitamin C	dg	1.04 [0.81 - 1.33]	1.00 [0.76 - 1.33]	1.04 [0.78 - 1.39]	1.00 [0.69 - 1.43]	1.05 [0.63 - 1.73]	1.08 [0.63 - 1.85]
Vitamin D	μg	1.15 [0.99 - 1.35]	1.13 [0.95 - 1.34]	1.01 [0.83 - 1.23]	1.01 [0.82 - 1.23]	1.75 [1.20 - 2.56]	1.71 [1.12 - 2.59]
Vitamin E	cg	1.30 [0.98 - 1.71]	1.23 [0.90 - 1.67]	1.20 [0.86 - 1.68]	1.09 [0.76 - 1.57]	1.49 [0.89 - 2.50]	1.64 [0.91 - 2.94]

* OR per unit increase of each variable.

† For personal atopy and body mass index.

^λ Ratio polyunsaturated fatty acids of omega 6 (n-6 PUFA)/polyunsaturated fatty acids of omega 3 (n-3 PUFA).

an activity where exposure levels are lower [23], or to industrial bread processing rather than in the small, solo-bakeries that composed the vast majority of our study settings.

BMI was positively associated with OA among our study hairdressers (unit OR = 1.24 [1.03 – 1.48]). While data on OA are scarce, many studies explored the possible link between BMI and non occupational asthma or airway inflammation [24–31], showing a positive association where weight gain occurs before the onset of asthma and respiratory symptoms. This relationship between BMI and asthma could depend on gender, with a greater risk among women [32,33]. This might explain why we found an association between BMI and asthma in hairdressers, a predominantly female population, and not among bakers/pastry-makers, a predominantly male population.

Atopy is a well known risk factor of work-related sensitization, especially for high molecular weight agents. The odds ratio among bakers/pastry-makers is high (10.07 [2.76 – 36.65]). Among hairdressers, the association is more uncertain, possibly due to small numbers (OR = 4.94 [0.66 – 36.75]), but the role of atopy is still controversial in the literature [34].

In occupational settings, nutritional factors could significantly modify host responses to environmental toxicants. According to Romieu *and coll.*, “an adequate diet may inhibit, arrest, or even reverse the chain of events in toxicity, while a deficient diet could increase persons’ susceptibility to adverse environmental exposures, such as occupational allergens” [35].

To the best of our knowledge, this is the first study that explored the association between nutrient intakes, vitamins in particular, and OA. There are controversies about the relation between diet antioxidant intake and asthma [5]. Some authors assert that the increase of asthma is a consequence of a decline in antioxidant intake associated with the transition from a traditional to the modern diet [36]. An experimental study conducted by Gu found that supplementation with antioxidant vitamins in toluene diisocyanate-treated animals, mimicking an occupational exposure, ameliorated the respiratory eosinophilia [7]. In contrast, our results are consistent with the hypothesis that the increase in asthma and allergic diseases is favoured by an enhanced antioxidant intake associated with the greater availability of functional and antioxidant-enriched foods that might switch the balance of Th1 and Th2 towards a Th2 response [37].

Our findings suggest that the role of nutritional factors might depend on the exposure context. While exposure to flour dust and atopy, but not diet, are the key predictors of OA among bakers and pastry makers, nutritional factors are associated with OA among hairdressers, subjects who encounter several pro-oxidant chemicals

agents in the work place. In a normal lung, there is a balance between the toxicity of oxidants (generated through normal cellular function or exposure to an oxygen-rich environment) and the protective activities of several intracellular and extracellular antioxidant defense systems [38]. Oxidative stress occurs when there is an imbalance between the antioxidant defense system of the body and oxidant insults, such as cigarette smoke, air pollution and infections [35]. Chemicals agents may cause disequilibrium in this balance, through an increase in oxidant stress and a compromise of antioxidant resources, and this might result in pathophysiologic events in the lung that culminate in cellular death and pulmonary dysfunction [35].

Concerning vitamin D, results are also contradictory in the literature: a first hypothesis proposed that the increase in allergy and asthma is a consequence of widespread vitamin D insufficiency [39]. A second one, more in line with our results, links this increase to a widespread early life vitamin D supplementation for rickets prophylaxis in developed countries [39]; now, high dose in vitro vitamin D supplementation was shown to promote Th2 differentiation [40]. Another study also showed that vitamin D is associated with a dose-dependent reduction in transcription of Th1 cytokines, and increased expression of the Th2 cytokines [41]. Studies on molecular epigenetic mechanisms of dietary vitamin D in lung cellular function (senescence, apoptosis, autophagia, proliferation, phagocytosis) are still ongoing. Such data might shed light on how dietary vitamin D supplementation might interact with environmental agents and give place to chronic lung diseases like asthma [42]. Prospective studies of supplementation therapy or sub-optimal nutrient intake are needed to confirm these hypotheses.

Strengths and weaknesses of the study

The main limitation is the small number of cases which affects the statistical power of our study, possibly explaining the unstable (non significant) association between atopy and OA among hairdressers where absence of biomarkers of sensitization (specific IgE) precluded a clear assessment of asthma-like symptoms in relation to work. As in all case-control studies with other than incident cases, one should be cautious about the measures of associations since the information is collected some time after declaration of the disease. Although nested in a cohort, cases had started their symptoms with varying anteriority, due to the retrospective nature of the cohort. Thus, assessment of some risk factors might be affected by potential changes in behaviours or practices following onset of the disease (e.g. regarding the smoking status, the occupational tasks that are performed or dietary habits).

Strengths of this study lie in its design, with cases and controls coming from the same retrospective cohort study, in the accurate exposure duration history and in the diagnostic criteria we used for OA ascertainment. An interesting aspect of our study stems from the comparison of bakers/pastry-makers and hairdressers since the physical and chemical nature of the agents involved in the job processes and possibly the underlying mechanisms of asthma development differ substantially. Moreover, for the first time, nutritional factors were assessed as potential risk factors for OA. Food Frequencies Questionnaires are considered to be reproducible and to provide a useful scale for categorizing individuals according to their intake of energy and nutrients over one year [18,43]. Although respiratory symptoms had begun up to 7 years prior to the medical visits, food habits are not likely to have changed so that the data provided by the questionnaires is a good proxy for nutrient intake at the time OA subjects became cases.

Conclusion

This study suggests that the role of several factors that influence the incidence of occupational asthma, including dietary vitamins, might vary across exposure settings. Asthmatic cases declared higher intakes of vitamins A and D than controls, among hairdressers. The risk of OA also increases with intensity of exposure and with the body mass index in this predominantly female group. Among bakers and pastry makers, no other risk factor than the atopic status emerged.

Additional file

Additional file 1: Table S1. Metric for exposure intensity: variables coding for each task in the bakery and pastry-making sectors.

Table S2. Metric for exposure intensity: variables coding for each task in the hairdressing sector.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

This projects received funds from AFSSET (contract EST-08-03), the national PHRC-Hospital clinical research programme (2008), the Lorraine Region, the Grand Nancy Urban Community and the Meurthe et Moselle Département. The authors thank Jean-Louis Guéant and Rosa-Maria Guéant (biochemical analyses at Inserm-U954 unit and Nancy University Hospital), and Serge Herberg and Pilar Galan (coordinators of the Suvimax 2 project, UMR U557 Inserm/U1125 Inra/Cnam/University Paris13) for their important contributions.

Dovi-Stéphanie Acouetey and Thomas Remen were recipients of doctoral grants from the Lorraine Region.

Author details

¹Inserm U954 (Institut National de la santé et de la Recherche Médicale), School of Medicine, Nancy, France. ²Lorraine University Medical School, Nancy, France. ³EHESP School of Public Health, Sorbonne-Paris Cité, Rennes, France. ⁴INSERM U954, Faculté de Médecine, Bâtiment E, 2ème étage, 9 avenue de la forêt de Haye, 54505, VANDOEUVRE-LES-NANCY, France.

Authors' contributions

TR and DSA carried out the epidemiologic study. They participated in the medical visits and performed the statistical analysis. CP and DZN designed the study and participated to the interpretation of results. All co-authors wrote and approved the final manuscript.

Received: 16 December 2011 Accepted: 29 May 2012

Published: 29 May 2012

References

- Bernstein IL, Bernstein DI, Chan-Yeung M, Malo J-L: **Definition and classification of asthma in the workplace.** In *asthma in the workplace*. 3rd edition. Edited by Bernstein L, Chan-Yeung M, Malo J-L, Bernstein DI. New York: Taylor & Francis Group; 2006:1-8.
- Mapp CE, Boschetto P, Maestrelli P, Fabbri LM: **Occupational asthma: state of art.** *Am J Respir Crit Care Med* 2005, **172**:280-305.
- Malo JL, Ghezzo H, D'Aquino C, L'Archevêque J, Cartier A, Chan-Yeung M: **Natural history of occupational asthma: relevance of type of agent and other factors in the rate of development of symptoms in affected subjects.** *J Allergy Clin Immunol* 1992 Dec, **90**(6 Pt 1):937-944.
- Black PN, Sharpe S: **Dietary fat and asthma: is there a connection?** *Eur Respir J* 1997 Jan, **10**(1):6-12.
- Allan K, Devereux G: **Diet and asthma: nutrition implications from prevention to treatment.** *J Am Diet Assoc* 2011 Feb, **111**(2):258-268.
- Nurmatov U, Devereux G, Sheikh A: **Nutrients and foods for the primary prevention of asthma and allergy: systematic review and meta-analysis.** *J Allergy Clin Immunol* 2011 Mar, **127**(3):724-733. e1-30. Epub 2010 Dec 24.
- Gu H, Itoh M, Matsuyama N, Hayashi S, Iimura A, Nakamura Y, Miki T, Takeuchi Y: **Toluene diisocyanate exposure induces laryngo-tracheal eosinophilia, which can be ameliorated by supplementation with antioxidant vitamins in guinea pigs.** *Acta Otolaryngol* 2003 Oct, **123**(8):965-971.
- Gautrin D, Newman-Taylor AJ, Nordman H, Malo JL: **Controversies in epidemiology of occupational asthma.** *Eur Respir J* 2003 Sep, **22**(3):551-559.
- Rémen T, Coevoet V, Acouetey DS, Guéant JL, Guéant-Rodriguez RM, Paris C, Zmirou-Navier D: **Early incidence of occupational asthma among young bakers, pastry-makers and hairdressers: design of a retrospective cohort study.** *BMC Publ Health* 2010 Apr 26, **10**:206.
- Rémen T, Acouetey DS, Paris C, Hannhart B, Poussel M, Chenuel B, Barbaud A, Zmirou-Navier D: **Early incidence of occupational asthma in the bakery, pastry and hairdressing sectors.** *Prim Care Respir J* 2006, **15**(1):20-34.
- Levy ML, Fletcher M, Price DB, Hausen T, Halbert RJ, Yawn BP: **International Primary Care Respiratory Group (IPCRG) Guidelines: diagnosis of respiratory diseases in primary care.** *Prim Care Respir J* 2006 Feb, **15**(1):20-34.
- Kauffmann F, Annesi-Maesano I, Liard R, Paty E, Faraldo B, Neukirch F, et al: **Construction and validation of a respiratory epidemiological questionnaire.** *Rev Mal Respir* 2002 Jun, **19**(3):323-333.
- Delclos GL, Arif AA, Aday L, Carson A, Lai D, Lusk C, et al: **Validation of an asthma questionnaire for use in healthcare workers.** *Occup Environ Med* 2006 Mar, **63**(3):173-179.
- Vandenplas O, Ghezzo H, Munoz X, Moscato G, Perfetti L, Lemiere C, et al: **What are the questionnaire items most useful in identifying subjects with occupational asthma?** *Eur Respir J* 2005 Dec, **26**(6):1056-1063.
- Vidal C, Gude F, Boquete O, Fernandez-Merino MC, Meijide LM, Rey J, et al: **Evaluation of the phadiatop test in the diagnosis of allergic sensitization in a general adult population.** *J Investig Allergol Clin Immunol* 2005, **15**(2):124-130.
- Mounier-Geyssant E, Barthelemy JF, Mouchot L, Paris C, Zmirou-Navier D: **Exposure of bakery and pastry apprentices to airborne flour dust using PM2.5 and PM10 personal samplers.** *BMC Publ Health* 2007, **7**:311.
- Mounier-Geyssant E, Oury V, Mouchot L, Paris C, Zmirou-Navier D: **Exposure of hairdressing apprentices to airborne hazardous substances.** *Environ Health* 2006, **5**:23.
- Kesse-Guyot E, Castetbon K, Touvier M, Hercberg S, Galan P: **Relative validity and reproducibility of a food frequency questionnaire designed for French adults.** *Ann Nutr Metab* 2010, **57**(3-4):153-162. Epub 2010 Nov 16.

19. Akpinar-Elci M, Cimrin AH, Elci OC: **Prevalence and risk factors of occupational asthma among hairdressers in Turkey.** *J Occup Environ Med* 2002, **44**:585–590.
20. Albin M, Rylander L, Mikoczy Z, Lillienberg L, Dahlman Hoglund A, Brisman J, et al: **Incidence of asthma in female Swedish hairdressers.** *Occup Environ Med* 2002 Feb, **59**(2):119–123.
21. Brisman J, Jarvholm B, Lillienberg L: **Exposure-response relations for self reported asthma and rhinitis in bakers.** *Occup Environ Med* 2000 May, **57**(5):335–340.
22. Cullinan P, Cook A, Nieuwenhuijsen MJ, et al: **Allergen and dust exposure as determinants of work-related symptoms and sensitization in a cohort of flour-exposed workers; a case-control analysis.** *Ann Occup Hyg* 2001, **45**:97–103.
23. Mounier-Geyssant E, Barthélemy JF, Mouchot L, Paris C, Zmirou-Navier D: **Exposure of bakery and pastry apprentices to airborne flour dust using PM2.5 and PM10 personal samplers.** *BMC Publ Health* 2007 Nov 1, **7**:311.
24. Camargo CA Jr, Weiss ST, Zhang S, Willett WC, Speizer FE: **Prospective study of body mass index, weight change, and risk of adult-onset asthma in women.** *Arch Intern Med* 1999 Nov 22, **159**(21):2582–2588.
25. Castro-Rodriguez JA, Holberg CJ, Morgan WJ, Wright AL, Martinez FD: **Increased incidence of asthmatic symptoms in girls who become overweight or obese during the school years.** *Am J Respir Crit Care Med* 2001 May, **163**(6):1344–1349.
26. Chinn S, Jarvis D, Burney P: **Relation of bronchial responsiveness to body mass index in the ECRHS.** *European Community Respiratory Health Survey.* *Thorax* 2002 Dec, **57**(12):1028–1033.
27. Gilliland FD, Berhane K, Islam T, McConnell R, Gauderman WJ, Gilliland SS, et al: **Obesity and the risk of newly diagnosed asthma in school-age children.** *Am J Epidemiol* 2003 Sep 1, **158**(5):406–415.
28. Gold DR, Damokosh AI, Dockery DW, Berkey CS: **Body-mass index as a predictor of incident asthma in a prospective cohort of children.** *Pediatr Pulmonol* 2003 Dec, **36**(6):514–521.
29. Guerra S, Wright AL, Morgan WJ, Sherrill DL, Holberg CJ, Martinez FD: **Persistence of asthma symptoms during adolescence: role of obesity and age at the onset of puberty.** *Am J Respir Crit Care Med* 2004 Jul 1, **170**(1):78–85.
30. Oddy WH, Sherriff JL, de Klerk NH, Kendall GE, Sly PD, Beilin LJ, et al: **The relation of breastfeeding and body mass index to asthma and atopy in children: a prospective cohort study to age 6 years.** *Am J Public Health* 2004 Sep, **94**(9):1531–1537.
31. Romieu I, Avenel V, Leynaert B, Kauffmann F, Clavel-Chapelon F: **Body mass index, change in body silhouette, and risk of asthma in the E3N cohort study.** *Am J Epidemiol* 2003 Jul 15, **158**(2):165–174.
32. Schaub B, von Mutius E: **Obesity and asthma, what are the links?** *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005 Apr, **5**(2):185–193.
33. McLachlan CR, Poulton R, Car G, Cowan J, Filsell S, Greene JM, Taylor DR, Welch D, Williamson A, Sears MR, Hancox RJ: **Adiposity, asthma, and airway inflammation.** *J Allergy Clin Immunol* 2007 Mar, **119**(3):634–639.
34. Moscato G, Galdi E: **Asthma and hairdressers.** *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006 Apr, **6**(2):91–95.
35. Romieu I, Trenga C: **Diet and obstructive lung diseases.** *Epidemiol Rev* 2001, **23**(2):268–287.
36. Seaton A, Godden DJ, Brown K: **Increase in asthma: A more toxic environment or a more susceptible population?** *Thorax* 1994, **49**:171–174.
37. Murr C, Schroeksnadel K, Winkler C, Ledochowski M, Fuchs D: **Antioxidants may increase the probability of developing allergic diseases and asthma.** *Med Hypotheses* 2005, **64**(5):973–977.
38. Romieu I: **Nutrition and lung health.** *Int J Tuberc Lung Dis* 2005 Apr, **9**(4):362–374.
39. Litonjua AA, Weiss ST: **Is vitamin D deficiency to blame for the asthma epidemic?** *J Allergy Clin Immunol* 2007, **120**:1031–1035.
40. Lemire JM, Archer DC, Beck L, Spiegelberg HL: **Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxy vitamin D3: preferential inhibition of Th1 functions.** *J Nutr* 1995, **125**(suppl):1704S–1708S.
41. Jirapongsananuruk O, Melamed I, Leung DY: **Additive immunosuppressive effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and corticosteroids on TH1, but not TH2, responses.** *J Allergy Clin Immunol* 2000, **106**:981–985.
42. Lehoucq A, Mathieu C, Bouillon R, Verhaegen J, Van Eldere J, Decallonne B, Carremans C, Baeke F, Decramer M, Janssens W: **High doses of vitamin D for the treatment of COPD exacerbations: an intervention trial.** *Am J Respir Crit Care Med* 2011, **183**:A5372.
43. Molag ML, de Vries JH, Ocké MC, Dagnelie PC, van den Brandt PA, Jansen MC, van Staveren WA, van't Veer P: **Design characteristics of food frequency questionnaires in relation to their validity.** *Am J Epidemiol* 2007 Dec 15, **166**(12):1468–1478. Epub 2007 Sep 18.

doi:10.1186/1471-2458-12-387

Cite this article as: Rémen et al.: Diet, occupational exposure and early asthma incidence among bakers, pastry makers and hairdressers. *BMC Public Health* 2012 **12**:387.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- **Convenient online submission**
- **Thorough peer review**
- **No space constraints or color figure charges**
- **Immediate publication on acceptance**
- **Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar**
- **Research which is freely available for redistribution**

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



RESUME

L'asthme professionnel (AP) est la maladie respiratoire d'origine professionnelle la plus fréquente dans les pays industrialisés. Il s'agit d'une pathologie complexe dite « multifactorielle » mettant en jeu un grand nombre de facteurs de risques génétiques, constitutionnels, comportementaux et environnementaux.

Sur le plan génétique, l'asthme professionnel représente un bon modèle pour l'étude de l'asthme chez l'adulte et les mécanismes d'interactions gène-gène-environnement masquant ou modulant l'effet de la génétique restent encore à élucider. Aucune étude épidémiologique sur l'asthme professionnel n'a examiné le rôle des facteurs génétiques à un stade très précoce de l'exposition aux allergènes et aux irritants aéroportés.

Nous avons donc cherché dans un premier temps à évaluer le rôle de certains polymorphismes génétiques en rapport avec l'inflammation et l'allergie, à savoir les IL4RA, IL13, TNFa, IL1A et IL5, sur le déclin de la fonction pulmonaire, l'apparition d'une obstruction ou d'une hyperréactivité bronchiques et l'évolution du monoxyde d'azote exhalé (FeNO) chez 441 apprentis boulangers/pâtisseries et coiffeurs (étude MIBAP). Dans cette première partie nous observons des interactions entre *IL13 R130Q/IL4RA S478P* et *IL13 R130Q/IL4RA Q551R* et la diminution du volume expiratoire forcé ou de la capacité vitale forcée. Le génotype GG du TNFa-308 a été trouvé associé à l'hyperactivité bronchique dans l'ensemble de la population et chez les sujets non atopiques ; nous avons aussi observé que certaines interactions gène-gène étaient associées à une modification du FeNO au cours des deux années d'apprentissage.

Dans un deuxième temps, des déterminants nutritionnels de l'asthme ont été explorés dans une population de jeunes travailleurs engagés dans ces métiers à risque depuis 3 à 10 ans (étude ABCD). Les apports en vitamines, principalement les vitamines A, C, E D, et en acides gras polyinsaturés oméga 3 et 6 ont été étudiés par questionnaire de fréquence, le diagnostic d'asthme professionnel étant réalisé au moyen d'une batterie d'outils (examen clinique, spirométrie et test de réversibilité d'une obstruction bronchique, mesure du FeNO et examen des taux sériques d'IgE spécifiques). Les résultats portant sur 31 cas d'asthme professionnel et 196 témoins montrent une différence en fonction de la filière : chez les boulangers-pâtisseries, aucun facteur nutritionnel n'est objectivé, contrairement au groupe des coiffeuses chez qui les asthmatiques présentent des apports plus élevés des vitamines A et D. Un déficit en B12 semble être un facteur de risque de survenue d'asthme professionnel et ce indépendamment de la filière. En revanche, aucune corrélation n'est trouvée avec les taux sériques de l'homocystéine et la vitamine B9.

A travers ces études au sein de ces jeunes populations à risque, il ressort que l'expression de certains facteurs de risque de l'asthme professionnel sont modulables en fonction du type d'exposition. Des comportements alimentaires à l'environnement de travail, l'émergence d'une maladie telle que l'asthme professionnel fait appel à des facteurs multiples dont la plupart peuvent être contrôlés et limités par des mesures de prévention efficaces.

MOTS CLEFS : Asthme professionnel, Cytokines, Vitamines, Homocystéine Boulangerie, Coiffure

ABSTRACT

Occupational asthma (OA) is the occupational respiratory disease most common in industrialized countries. It is a multifactorial disease involving a large number of risk factors genetic, constitutional, behavioral and environmental.

At the genetic level, occupational asthma is a good model for the study of adult asthma and the mechanisms of interaction gene-gene-environment masking or modulating effect of genetic remain to be elucidated.

None epidemiological studies on occupational asthma have examined the role of genetic factors in a very early exposure to allergens and airborne irritants.

We initially assess the role of genetic polymorphisms related to inflammation and allergy, namely IL4RA, IL13, TNF, IL1A and IL5, on the decline of lung function, bronchial hyperresponsiveness and increasing of exhaled nitric oxide (FeNO) in 441 apprentice bakers / pastry-makers and hairdressers (MIBAP study). In this first part we observed interactions between IL13 and IL13 R130Q R130Q/IL4RA S478P // IL4RA Q551R and decreased forced expiratory volume or forced vital capacity. The GG genotype of TNF-308 was found associated with bronchial hyperreactivity in the general population and in non-atopic subjects, we also observed that some gene-gene interactions were associated with a change in the FeNO after two years of training.

In a second time, nutritional determinants of asthma were investigated in a population of young workers employed in these occupations at risk from 3 to 10 years (ABCD study). Intake of vitamins, especially vitamins A, C, E,D, and polyunsaturated fatty acids omega 3 and 6 were studied by frequency questionnaire, the diagnosis of occupational asthma is achieved through a battery of tools (review clinical spirometry and reversibility of bronchial obstruction, FeNO measurement and examination of serum specific IgE). The results on 31 cases of occupational asthma and 196 controls showed a difference in terms of the sector: among bakers, no nutritional factor is objectified, unlike the hairdresser's asthmatics that have higher intakes vitamins A and D. B12 deficiency appears to be a risk factor for onset of occupational asthma regardless of the sector. In contrast, no correlation was found with serum levels of homocysteine and vitamin B9.

Through studies in these young people at risk, it appears that the expression of certain risk factors of occupational asthma is flexible, depending on the type of exposure.

The emergence of a disease such as occupational asthma involves multiple factors, most of which can be controlled and limited by effective preventive measures.

KEY WORDS: Occupational asthma, Cytokine, Vitamin, Homocysteine, Bakery, Hairdressing