



Expectoration induite et Inflammation bronchique

Module Hermes 3; Bronchiectasies and other airway diseases

Evaluation non invasive de l'inflammation bronchique

Biomarqueurs sanguins, FeNO, expectoration induite

DES Pneumologie

Lyon, le 13/10/2015



Gilles Devouassoux

Service de Pneumologie, Hôpital de la Croix-Rousse

Hospices Civils de Lyon

Faculté de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux

& INSERM U1111 CIRI

Expectoration induite: Historique, état des lieux

Asthme et analyse de l'expectoration

Tentatives 1950-70s: Analyse difficile → Echec et abandon
Redécouverte et améliorée au début des années 1990s



Induction par inhalation de sérum salé
Dissolution du mucus *(Pin, Thorax 1992)*



Exploration de la pathologie asthmatique
Reproductible, validée et bien tolérée

Expectoration induite: Historique, état des lieux

Evaluation de l'inflammation bronchique +++

A priori, particulièrement bien adaptée à l'évaluation de la pathologie bronchique !!!!

Directe

BB et biopsies

LBA

LB

EI, ES

Indirecte

Symptômes

EFR, DEP

HRB

NO exhalé

Marqueurs sanguins périphérique

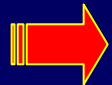
...

Expectoration induite: Etat des lieux

Applications cliniques

Multiples ++++

Pathologies inflammatoires broncho-pulmonaires +++



Asthme ++

BPCO

Bronchite à éosinophile

Toux chronique

Sarcoidose, fibrose pulmonaire

Cancer broncho-pulmonaire

Maladie de surcharge (inclusion lipidique)

Défaillance ventriculaire gauche (hémosidérine)

...

Intérêts ?, limites ? **Reste souvent A VALIDER**

Expectoration induite: Etat des lieux

Principaux résultats publiés



Eosinophile

Asthme (phénotype, contrôle, sévérité, exacerbation, réponses...)
Bronchite à éosinophile
Exposition sensibilisante à des allergènes ou à des chimiques
Obstructions bronchiques chroniques «cortico-sensibles»



Neutrophile

Tabagisme, exposition à l'ozone
Endotoxines et processus infectieux
Asthmes «cortico-résistants» et autres phénotypes
BPCO



Lymphocyte

Sarcoïdose
Infection à *Chlamydiae pneumoniae*

Expectoration induite: Technique

Deux étapes principales

PHASE I: INDUCTION

Prémédication / β_2 CDA

Inhalation

Sérum salé hypertonique

3 x 7 min

Surveillance

Clinique

Fonctionnelle

Limiter contaminations

Rinçage de la bouche

Mouchage

Stimuler le patient

Toux

Expectoration



Expectoration induite: Technique

INDUCTION:

Protocole de réalisation et de surveillance *en pathologie asthmatique*

VEMS pré et post- β -2 mimétique (valeur de référence)

Si VEMS post- β -2 mimétique < 1500 ml ??? : **ABSTENTION**

Inhalation sérum salé: nébuliseur ultrasonique (Fisoneb^R)

x 7 minutes

Concentrations de départ:

3%

VEMS > 70% prédite et VEMS/CV > 70%

VEMS > 70% prédite et VEMS/CV < 70% et réversibilité < 12%

0,9%

VEMS > 70% prédite et VEMS/CV < 70% et réversibilité > 12%

VEMS < 70% prédite

Réversibilité > 15%, β -2 LDA, surinfections bronchiques

VEMS post- β -2 < de 15% aux meilleures valeurs des 2 dernières années



Expectoration induite: Technique

INDUCTION:

Protocole de réalisation et de « surveillance » *en pathologie asthmatique*

Au terme des 7 premières minutes

Mesure du VEMS

Modalités de poursuite de l'examen

Si chute < 10% du VEMS

Concentration supérieure, x 7 minutes

Si 10% < chute < 20%

Concentration identique, x 7 minutes

Si chute > 20%

Arrêt de l'examen et β -2 CDA



Au total

3 x 7 minutes (0,9-3-4-5%)

En fin de test, β -2 CDA, si chutes > **5%** du VEMS

PROTOCOLE DE L'EXPECTORATION INDUITE

PC ₂₀ : _____ mg/ml Visite : _____ Etude : _____ DATE : _____ HEURE : _____	Nom : _____ Prénom : _____ Taille : _____ cm Poids : _____ kg Age : _____ Date de naissance : ____ / ____ / ____																						
VEMS/CV prédite : _____ VEMS/CV observée : _____ % de la prédite : _____ VEMS/CV % _____ 10% de chute de _____ égale (continuer à la même concentration) 20% de chute de _____ égale (arrêter du test, et donner 2 bouffées de ventoline) Température ambiante : _____ Hygrométrie : _____ Nébuliseur (type) : _____ Expérimentateur : _____	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Traitement/Dose</th> <th style="text-align: left;">Date/heure dernière prise</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td></tr> </tbody> </table>	Traitement/Dose	Date/heure dernière prise																				
Traitement/Dose	Date/heure dernière prise																						

	Base	Après 10' de ventoline	3.5' induction concentration %chute	7' induction concentration %chute	10.5' induction concentration %chute
VEMS					
CV					
	14' induction concentration %chute	17.5' induction concentration %chute	21' induction concentration %chute	Echantillon obtenu : OUI _____ NON _____	
VEMS				Induit _____ Spontané _____	
CV				Envoi au laboratoire : Heure : _____ Commentaires : _____	

Expectoration induite: Technique

INDUCTION: Recueil des données



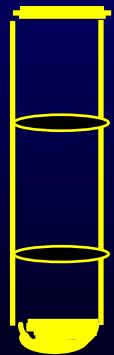
Expectoration induite: Technique

1) Sélectionner
Vue ou microscope inversé



2) Peser (200-500 mg)

3) Solubiliser



DTT 0,1%
(4 volumes)
25°C, x 15 minutes

Arrêt réaction
PBS
(4 volumes)



PHASE II: ANALYSE



2 heures à 4°C

4) Filtrer
Nylon 38µm

Viabilité
CCT
Ajuster [cellules] à 10^6 /ml

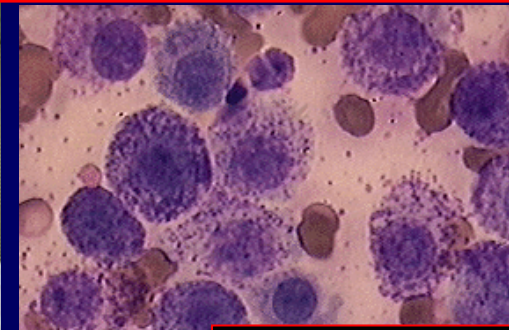
Expectoration induite: Technique

5) Centrifugation
(cytopspin)
450 rpm, x 5 min

6) Sécher les lames

7) Colorer
MGG
Bleu Alcian
Bleu Toluidine

8) Compter
CC différentiel
Populations particulières
....

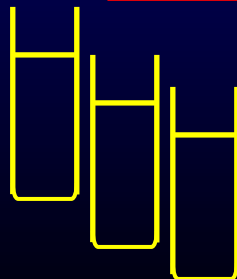
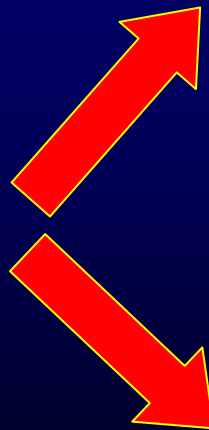
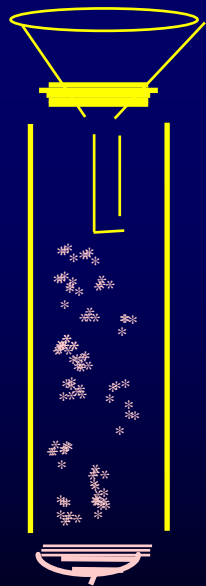


/400 cellules
/1500 cellules

9) Centrifuger
Analyse du surnageant

ELISA, HIS, IHC, CF...

LT, ECP
cytokines....



Expectoration induite: Technique

ANALYSE: Recueil des résultats

PROTOCOLE D'ANALYSE DU PRODUIT DE L'EXPECTORATION INDUITE

Nom : _____ Prénom : _____ Date : _____

Heure d'induction : _____ Heure d'analyse cytologique : _____

Expectoration spontanée _____, induite _____, analysable _____

Couleur : sans _____, blanche _____, grise _____, jaune _____ brune _____, rouge _____

Aspect :

Muqueux _____, Purulent _____, Intermédiaire M/P _____

Commentaires _____

Nécessité d'utilisation du microscope inversé _____

Echantillon

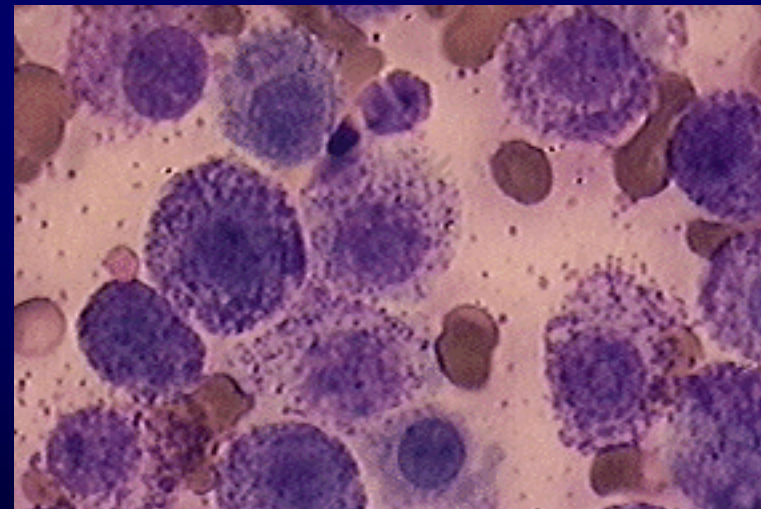
Poids de l'échantillon sélectionné (A) _____ (mg)	Normales
Poids de la suspension après filtration (B) _____ (mg)	
Compte cellulaire total x 2.222 (C) _____ x 10 ⁶ cel / ml	
Nombre absolu de cellules (D) = B x C _____ x 10 ⁶ cel	
Compte cellulaire total / poids de l'expectoration (D/A) _____ x 10 ⁶ cel / mg	< 5.5
Viabilité _____ %	40-100
Contamination cellules épithéliales _____ %	< 20%

Compte cellulaire différentiel

Neutrophiles _____ %		14.9-33.7
Eosinophiles _____ %	Granules :	< 2
Macrophages _____ %	Aspect :	49.8-80.1
Lymphocytes _____ %		0.3-2.5
Basophiles / Mastocytes _____ %		0.1
Cellules épithéliales _____ %		< 1.2

Commentaires :

Examineur : _____

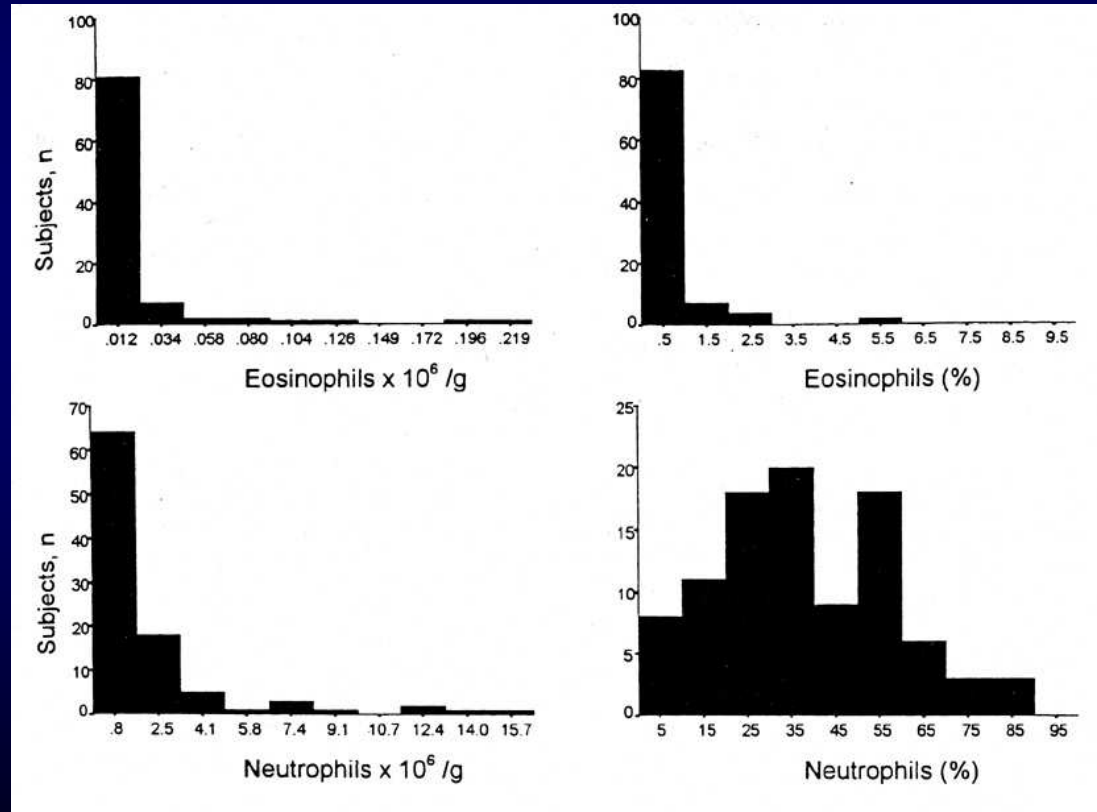


Expectoration induite: Aspects techniques

Cellularité et compte cellulaire différentiel « valeurs normales »

Sujet sain

CCT (/ml)	1.2 10 ⁶
Epithéliale (%)	6
Macrophage (%)	57.3
Neutrophile (%)	35.7
Lymphocyte (%)	3.5
Eosinophile (%)	0.2

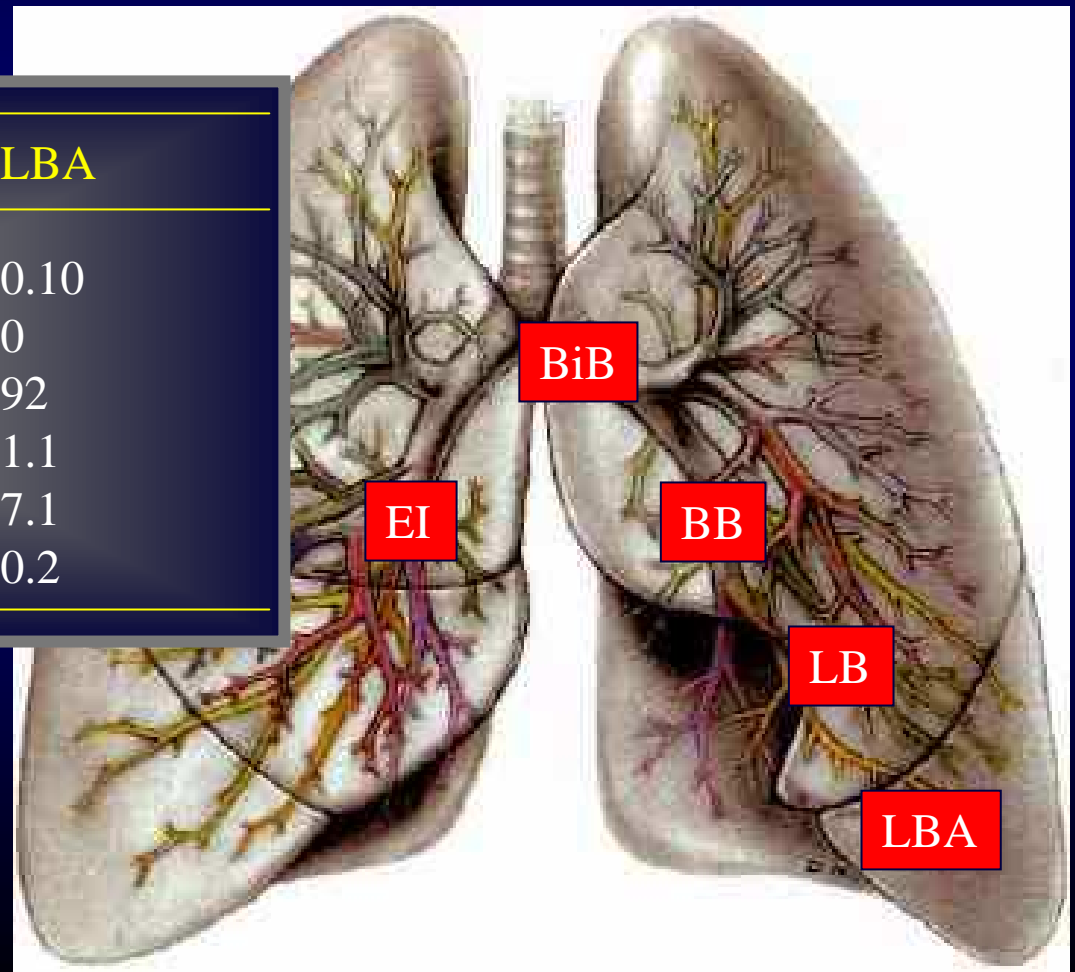


(Belda, AJRCCM 2000)

Expectoration induite: Aspects techniques

Comparaison des techniques

Sujet sain	EI	LB	LBA
CCT (/ml)	1.2	0.06	0.10
Epithéliale (%)	6	0	0
Macrophage (%)	57.3	72	92
Neutrophile (%)	35.7	3.4	1.1
Lymphocyte (%)	3.5	7.9	7.1
Eosinophile (%)	0.2	0	0.2



(Rutgers, ERJ 2000)

Expectoration induite: Aspects techniques

Comparaison des techniques

Sujet BPCO

	E spontanée	E induite (7 min)	E induite (14 min)
CCT (/g)	3.43 (1.66-7.17)	1.91 (0.76-5.15)	2.10 (1.31-5.91)
PNN (%)	88 (72.5-89.5)	88.8 (70-93.5)	81.3 (77.8-91.8)
Mac (%)	11 (6.3-23.5)	10.3 (4.8-22.5)	9 (6.5-18.3)
Lym (%)	1.5 (0.8-3.8)	2 (0.5-5.3)	2 (1-2.5)
Eo (%)	0.3 (0.3-0.5)	0.3 (0-1.3)	0.5 (0-0.8)
Viabilité (%)	41.2 (11.7-71.8)	62.8 (35.5-76.5)	65 (54-76.2)

(Bhowmik, Thoraw 1998)

Résultats comparatifs identiques en pathologie asthmatique

Expectoration induite: Aspects techniques

Utilisation de β -2 CDA

Sérum salé bronchoconstricteur

200-400 μ g, utilisation +/- généralisée



Pas d'effet sur la cellularité totale et le CC différentiel
Effets sur [médiateurs solubles] ? (\searrow Histamine)

[sérum salé], type de nébuliseur

Isotonique, hypertonique ?

Concentrations stables ou croissantes ?



Rentabilité supérieure si, Hypertonique
 Nébuliseur ultrasonique



Pas d'influence sur la cellularité totale et différentielle

Expectoration induite: Aspects techniques

Monitoring de la fonction respiratoire ou tolérance de l'examen



Fréquence: Pas de consensus
/5-10 minutes
Uniquement si symptômes
/cycles



Mode: DEP vs VEMS++ ?



Probablement à adapter aux situations cliniques
Pathologies mal contrôlées
Fonction respiratoire limitée
Pathologie surajoutée.....

Expectoration induite: Aspects techniques

Tolérance de l'examen



Asthme: Bonne

(*Tarodo, AJRCCM 1998*)



BPCO: Meilleure !!!!!

*Excellente (*Peleman, ERJ 1999*)

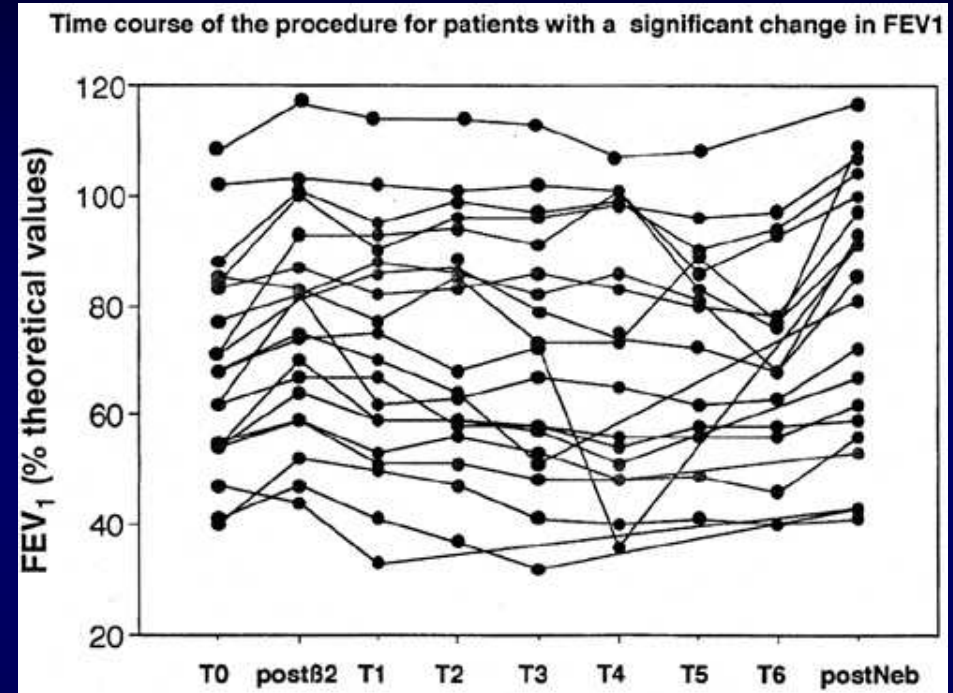
0.7 l/min (23%) < VEMS < 2,8 l/min (80%)

Sérum salé hypertonique 3-5%

Induction 3 x 10 minutes

*Bonne (*Silkoff, Chest 2001*)

Chute isolée et transitoire du VEMS



Expectoration induite: Aspects techniques

Durée de nébulisation

Variable la plus importante pour la composition de l'échantillon

*Début: central

Neutrophile et éosinophile ++

Mucines +

*Fin: périphérique

Lymphocytes ++

Macrophages +

Surfactant +

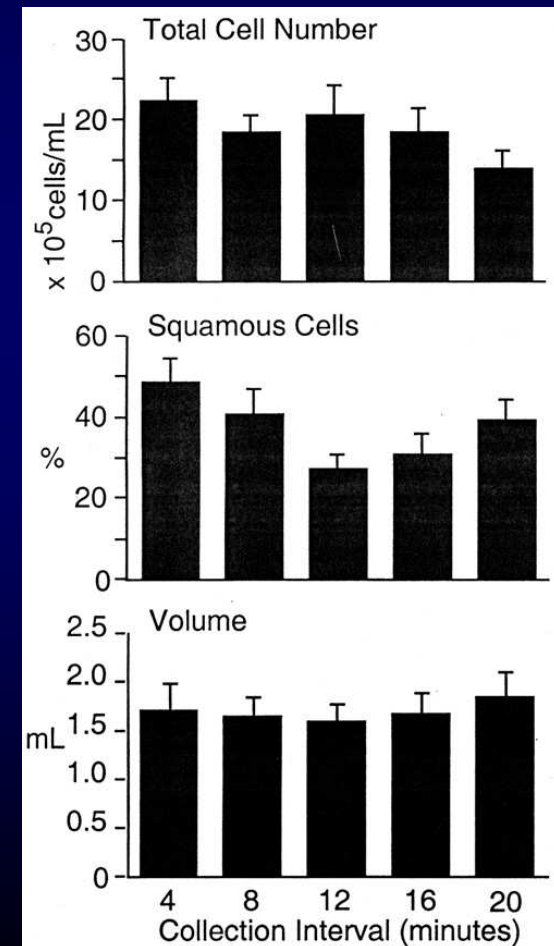
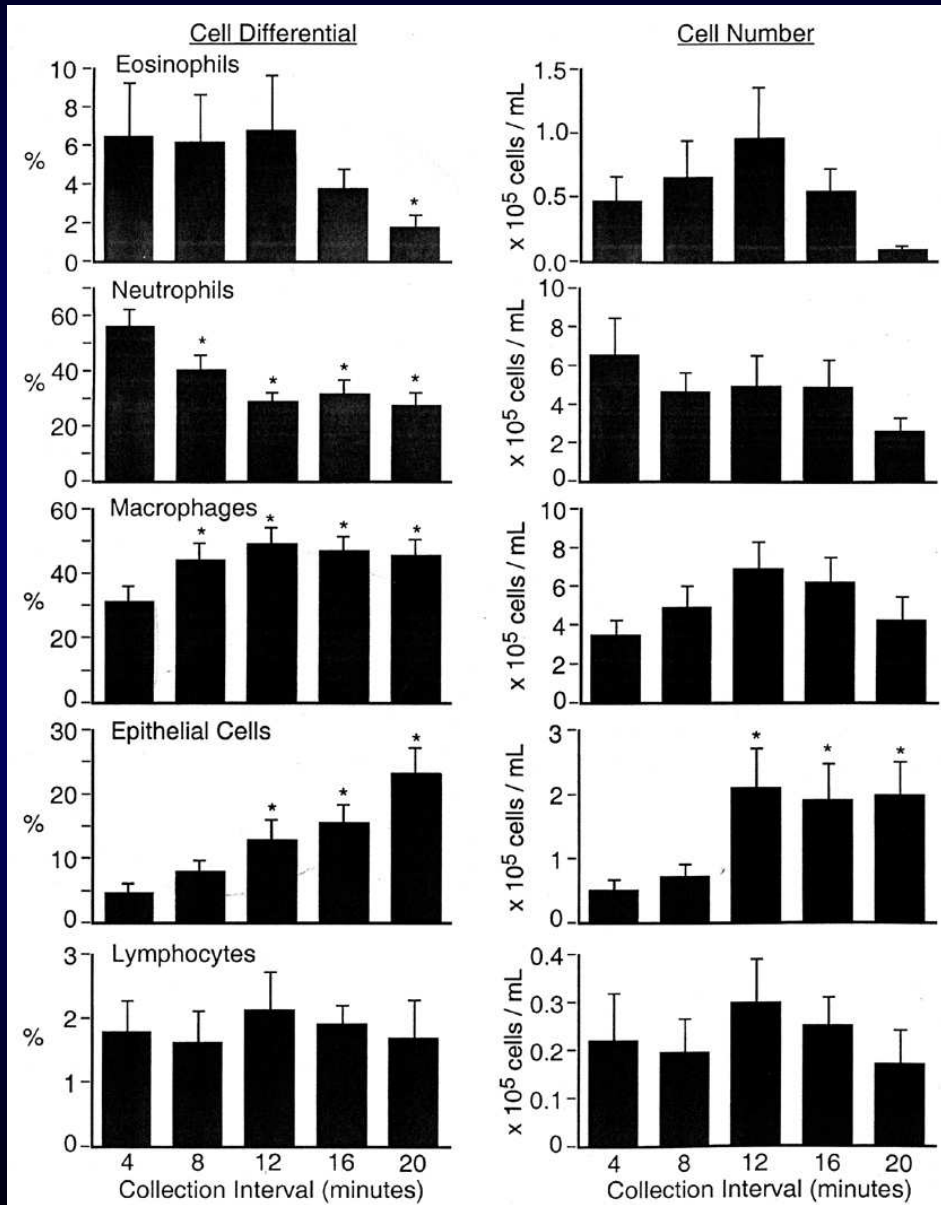
N'influence pas le % de réussite de l'induction

(80% sujet sain, 100% sujet asthmatique)

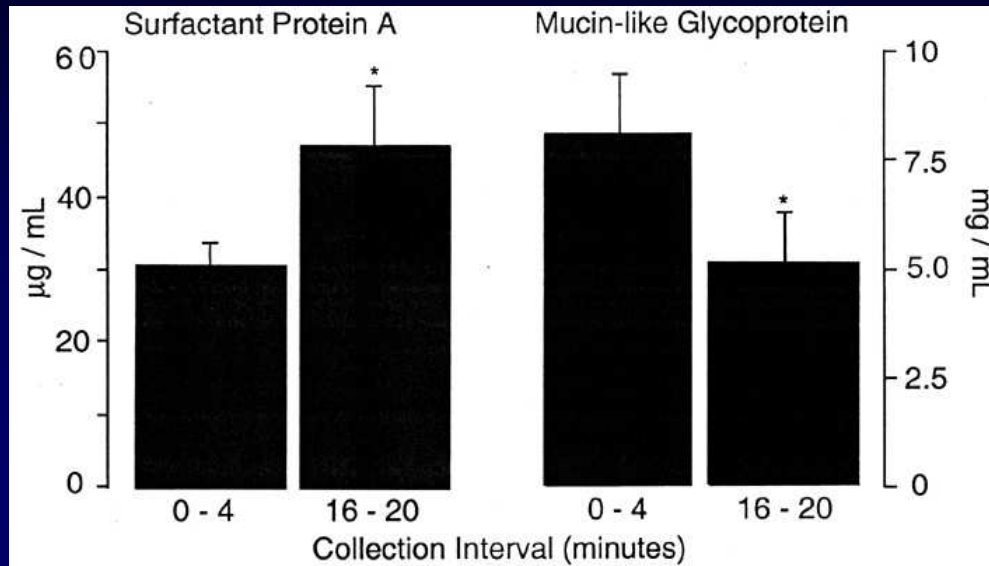
Expectoration induite: Aspects techniques

Durée de nébulisation

(Gershman, JACI 1999)

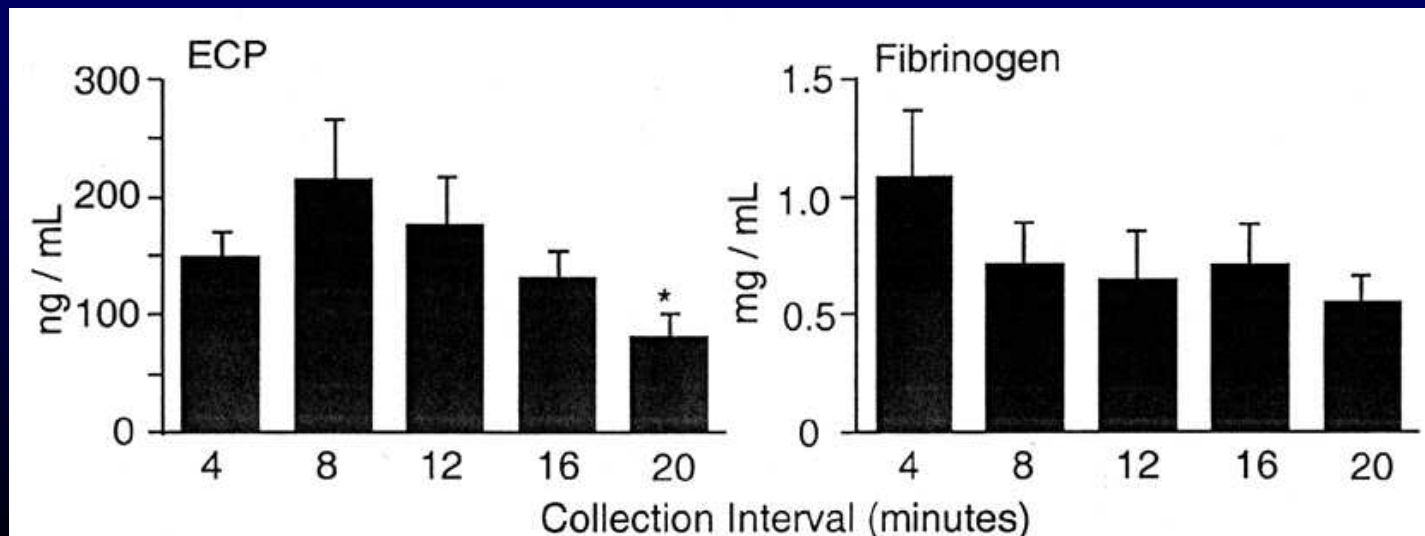


Expectoration induite: Aspects techniques



Durée de nébulisation

(Gershman, JACI 1999)



Expectoration induite: Aspects techniques

Techniques de processing de l'échantillon

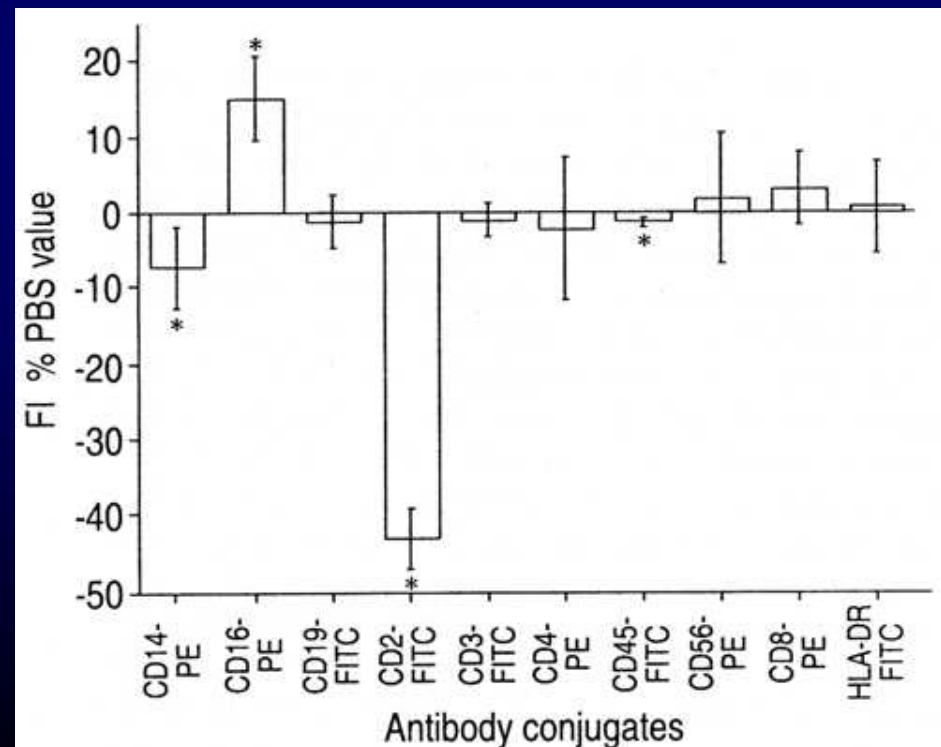
DTT (dithiothréitol)

- N'affecte pas le compte cellulaire total et différentiel

- Affecte la viabilité cellulaire

- Affecte l'expression de certains marqueurs leucocytaires

(Loppow, ERJ 2000)



Conclusions

Intérêts

Technique peu invasive et peu coûteuse

Reproductible pour l'analyse cytologique

Permet une évaluation directe de l'inflammation

Analyse cytologique classique ++

Accès à d'autres cibles ++

Médiateurs variés de l'inflammation

Matériel « génétique » (DNA, mRNA) ???

Limites et inconvénients

Manque de standardisation, comparaison inter-centres difficiles

Intérêts dans d'autres pathologie ??? A valider

Chronophage (1h30-2h20/patient), technique à simplifier ++++

Prélever, homogénéiser et fixer (*Papov, ERJ 1998*)

Lyse cellulaire et mesure automatiser ECP (*Gibson, Clin Exp Allergy 1998*)

Analyse CF des seuls éosinophiles (*Hansel, Clin Exp Allergy 1991*)