

Marqueurs de l'inflammation pulmonaire dans les condensats de l'air exhalé

N. Chérot-Kornobis¹, J.L. Edmé¹, V. de Broucker², S. Hulo¹, R. Nevière², R. Matran², A. Sobaszek¹

¹ Laboratoire universitaire de médecine du travail - EA 2690 - CHRU- Université Lille 2
Faculté de Médecine, 1 place de Verdun, 59045 Lille
jean-louis.edme@univ-lille2.fr; nathalie.cherot@univ-lille2.fr; sebastien.hulo@univ-lille2.fr,
annie.sobaszek@univ-lille2.fr; a-sobaszek@chru-lille.fr

² Département de physiologie - EA 2689 Université - Lille 2
Faculté de Médecine, 1 place de Verdun, 59045 Lille
virginie.debroucker-2@univ-lille2.fr; remi.neviere@univ-lille2.fr; regis.matran@univ-lille2.fr

Objectifs, situation du sujet

Le propos de notre étude est la validation de nouveaux indicateurs d'atteinte inflammatoire du poumon profond au moyen des condensats de l'air exhalé. Cette nouvelle approche apparaît complémentaire des explorations traditionnelles de la fonction ventilatoire et d'expression plus précoce que ces dernières. L'analyse des condensats, au travers des anomalies attendues reflète des modifications biochimiques pulmonaires et témoins de l'activité des médiateurs de l'inflammation et du stress oxydatif (1-5) constitue une exploration non invasive prometteuse et complémentaire à celle du NO exhalé (FeNO). Pour ce faire, nous nous sommes intéressés en première intention à des patients atteints de maladies respiratoires inflammatoires telles que l'asthme et la Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO).

L'objectif initial de l'étude est de comparer les marqueurs de l'inflammation et du stress oxydant de l'air expiré par la méthode des condensats de 3 populations : témoins, BPCO et asthme, en tenant compte des profils fonctionnels respiratoires. Cela impliquait de tester dans le condensat la faisabilité d'analyses biologiques reconnues comme fiables, sensibles et reproductibles dans d'autres matériels biologiques.

Les objectifs secondaires étaient de comparer ces marqueurs avec d'une part les profils cliniques (sévérité, évolutivité, contrôle de l'asthme) et d'autre part avec les profils respiratoires fonctionnels habituels.

La première partie du projet a été consacrée à consolider la mesure de NO exhalé, le recueil des condensats de l'air expiré et à valider les procédures d'analyses biochimiques du condensat.

Pour chaque procédure, nous avons testé la stabilité dans le temps et la reproductibilité des mesures.

Matériels et méthodes

Population

Les résultats que nous présentons portent sur une population de 22 asthmatiques, 19 BPCO et 38 témoins (18 témoins fumeurs et 20 non fumeurs). La caractérisation des populations a été réalisée sur l'âge, poids taille, BMI et explorations fonctionnelles respiratoires chez tous les sujets.

Les asthmatiques ont été caractérisés selon la classification GINA (Global Initiative for Asthma) (6). Le contrôle de l'asthme a été étudié par le score de Juniper (7), en considérant le score de 1.25 au delà duquel l'asthme est mal contrôlé (8).

Les BPCO ont été caractérisées par le GOLD (global initiative for chronic obstructive lung disease) (9) ainsi que l'index BOD composé du BMI, du VEMS et du score de dyspnée du MRC (Medical research council) afin de d'apprécier l'impact systémique de l'inflammation (10).

Explorations ventilatoires

Les explorations fonctionnelles respiratoires ont été effectuées le jour du recueil des condensats et comportent une spirométrie lente et forcée. Les critères d'acceptabilité et de reproductibilité sont ceux de L'European Respiratory Society de 1993. La capacité vitale lente (SVC), le volume expiratoire maximum seconde (FEV1), la capacité pulmonaire totale (TLC), le rapport FEV1/SVC, le coefficient de transfert du CO en apnée (TLCO) et le volume résiduel (VR) ont été retenus pour déterminer les profils fonctionnels respiratoires.

NO Exhalé (FeNO)

Les concentrations de NO dans l'air expiré ont été mesurées avec un analyseur de NO en chimiluminescence (NOx 8000, SERES Aix en Provence, France). La production de NO alvéolaire et bronchique a été déterminée à partir du modèle à deux compartiments de TSOUKIAS (11), méthode on-line. Les mesures de concentration de FeNO sont effectuées « en duplicate » pour des débits ventilatoires de 25, 50 100 et 150ml/s.

Les tests de reproductibilité ont été effectués sur 31 témoins avec 2 mesures de NO exhalé le matin et 2 mesures l'après midi. Les coefficients de corrélation intra classe, tous supérieurs à 0.98 sont excellents.

Recueil des condensats de l'air exhalé (EBC)

Les condensats sont collectés par un dispositif Ecoscreen, (JaegerTM, Würzburg, Germany). Un piège à salive évite une contamination salivaire. L'air expiré est isolé et refroidi par un condenseur à -20°C. La condensation ainsi obtenue s'écoule le long d'une lamelle pour être collectée dans une cupule. A 200 litres d'air expiré, le recueil est terminé et correspond à un volume de liquide de 4ml en moyenne. Les condensats sont, dès le recueil, aliquotés dans des cryotubes puis stockés dans un congélateur à -80°C.

Ce protocole a été défini après une étape importante de standardisation du recueil et d'analyse des condensats : plusieurs modalités de maintien de la chaîne de froid, d'agents couvrants dits de « coating » et matériaux de recueil ont été testées en considérant l'impact de la lyophilisation et de la resolubilisation (recherche d'absence d'interférence sur les dosages).

L'absence de contamination d'origine salivaire a été testée par dosage de l'activité alfa-amylasique en colorimétrie cinétique UV avec une limite théorique de détectabilité d'une contamination salivaire à 0,02µl de salive pour 500µl de condensât (soit une contamination 1/25 000^{ème}).

Pour répondre à la problématique de la conservation à long terme des biomarqueurs dans le condensat, nous avons dosé les oxydes d'azote (NOx) ainsi que les protéines totales présents dans des aliquots issus d'un même recueil, conservés à -80°C et décongelés, 1 jour (J1), 7 jours

(J7), 1 mois (M1) et 2 mois (M2) après le recueil. Nous retrouvons une bonne stabilité de 93% pour les NOx et 90% pour les protéines totales ce qui équivaut à des pertes très faibles par rapport aux valeurs obtenues le jour du recueil.

Concernant l'étude de la stabilité à court terme des biomarqueurs après 1 cycle de décongélation des aliquots, nous avons dosé les NOx sur 3 jours successifs avec conservation à 4°C. La stabilité est de 98%. Ces résultats sont conformes à ceux objectivés par d'autres équipes lorsque ces critères ont été publiés (12; 13).

Analyses biochimiques dans les EBC

Dosage des protéines dans les EBC

La méthode μ BCA (MicroBC Assay Protein Quantitation Small kit, Uptima, Interchim, Montluçon, France) a été retenue du fait de sa sensibilité avec une limite de détection à 1 μ g/ml, permettant ainsi le dosage des protéines total sur condensat brut, décongelé avec une détectabilité de 90%. Il s'agit d'un test colorimétrique.

Des tests de reproductibilité ont été réalisés sur 10 sujets témoins volontaires en duplicate pour l'étude de la reproductibilité intra assay et sur deux jours consécutifs à la même heure pour la reproductibilité intra individu. Les coefficients de variation moyens (écart-type) intra assay et intra individu sont respectivement de 14.8% (14.9) et de 28.0% (19.8). Le coefficient de variation inter jour sur l'ensemble des témoins est de 15%.

Dosage des NOx dans les EBC

Le dosage des nitrites totaux a été réalisé par une méthode de Griess modifiée. L'ensemble des réactifs provient de la société Sigma (St. Louis MO). Le dosage des nitrites totaux s'effectue après réduction des nitrates en nitrites. Ces nitrites s'ajoutent aux nitrites déjà présents dans le condensat. La mesure des nitrites totaux correspond donc aux nitrites présents initialement dans le condensat auxquels s'ajoutent les nitrites obtenus après transformation des nitrates. La limite de détection est de 5 μ M et la détectabilité est de 100%.

Selon le même protocole que pour les protéines totales, les tests de reproductibilité ont été réalisés qui retrouvent des coefficients de variation moyens (écart-type) intra assay et intra individu respectivement de 6.8% (5.4) et de 38.8% (23.9). Le coefficient de variation inter jour sur l'ensemble des témoins est de 33%.

Dosage du 8-isoprostane

Nous avons utilisé le 8-isoprostane EIA kit (Cayman, Interchim, Montluçon, France) qui est une méthode immuno-enzymatiques largement utilisées dans la littérature. La quantification est représentée par l'intensité objectivée par le spectrophotomètre. Les données sont analysées à l'aide d'un logiciel (Cayman). La limite de détection du kit est de 4pg/ml.

Les tests de reproductibilité ont été effectués par duplicate sur condensat décongelé sur une population (N=12) de sujets. La moyenne des coefficients de variation intra assay (écart-type) est de 7.1% (4.98%).

En revanche, nous avons une variabilité des résultats liés probablement à des kits défectueux.

Résultats scientifiques

Standardisation méthodologique du recueil du condensat à l'analyse

Deux approches de recueil des composés gazeux de l'air expiré sont développées et aujourd'hui standardisées par notre équipe: le NO exhalé et les condensats sur des populations homogènes de patients adultes atteintes de pathologies inflammatoires pulmonaires chroniques (asthme et BPCO) et de témoins. S'agissant d'une technique d'exploration relativement récente, les modalités méthodologiques de réalisation du condensat font encore l'objet à ce jour de nombreux travaux, les premières recommandations internationales étant apparues en 2005 (14). Les écueils méthodologiques sont nombreux et décrits dans la littérature (15; 16). Ils concernent toutes les étapes du processus du recueil et d'analyses.

Notre recherche a permis de mettre au point la méthodologie de recueil au CHRU de Lille. Grâce au financement de l'ANR, de nombreux essais ont été réalisés sur l'étape essentielle de standardisation du recueil de l'air expiré. Elle a porté sur le choix des matériaux, le « coating » du système de prélèvement, la détermination de la concentration nécessaire et non délétère du coquant pour les analyses et enfin la nécessité de tenir compte du régime ventilatoire des sujets. Pour ce dernier critère, nous avons retenu la mesure du volume expiré cumulé. Ce travail publié, nous permet aujourd'hui d'appliquer une standardisation méthodologique du recueil à l'analyse(17). Les analyses des marqueurs tels les NOx et les protéines totales sont aujourd'hui bien maîtrisées par notre équipe avec une excellente détectabilité respectivement de 100% et 90%. L'étude de la conservation des marqueurs dans le condensat, peu explorée à ce jour, conclue à une bonne stabilité des NOx à court terme, supérieure à celle retrouvée par Chladkova *et al*/ dans une étude publiée en 2006 (12) ou par Vogelberg *et al*/ en 2008 (13) ainsi qu'une bonne stabilité à long terme. L'étude de la reproductibilité des dosages est toute à fait satisfaisante concernant l'intra assay en comparaison de l'étude de Ratnavati *et al* en 2006 (18). Concernant la reproductibilité intra sujet et inter jour, nous obtenons de meilleurs résultats que d'autres auteurs (12; 19-21).

Identification des médiateurs de l'inflammation et du stress oxydant de l'air exhalé sur 2 populations présentant une pathologie pulmonaire (asthme, BPCO) versus témoins en tenant compte des profils fonctionnels respiratoires.

Les caractéristiques générales de la population globale n'objectivent pas de différence pour l'âge [moyenne (SD)= 41.2 (14.9) ans], poids, taille et BMI entre les témoins et les asthmes. En revanche, les BPCO sont significativement plus âgés du reste de la population (moyenne (SD)= 59.3 (10.6) ans). Concernant les caractéristiques du recueil des EBC, les régimes ventilatoires des 3 groupes sont comparables au moment du recueil.

Compte tenu du design de notre population, et des données de la littérature (22), nous avons considéré le facteur âge et tabac sur les résultats des dosages biologiques analytiques : protéines totales, nitrites - nitrates, 8-isoprostanes et FeNO₅₀.

Influence de l'âge et du tabac sur les paramètres inflammatoires

Afin de mettre en évidence l'influence de la pathologie sur les paramètres de l'inflammation, nous avons évalué sur la population saine des témoins fumeurs et non fumeurs l'effet potentiel de l'âge

et du tabac. Nous n'avons pas observé de différence significative selon le statut tabagique sur l'ensemble des marqueurs testés, y compris sur le FeNO. Nous n'avons trouvé qu'une corrélation faible mais significative entre l'âge et les protéines [$r=0.33$ $p(r)=0.03$]. Si on tient compte simultanément des 2 facteurs âge et tabac, on retrouve un effet âge persistant à la limite de la significativité [$F=3.97$; $p(F)= 0.054$] pour les protéines. Il est à noter que ce taux de protéines est extrêmement faible, en moyenne (écart-type) de 2.7 (1.9) $\mu\text{g/ml}$.

Influence de la pathologie sur les paramètres inflammatoires

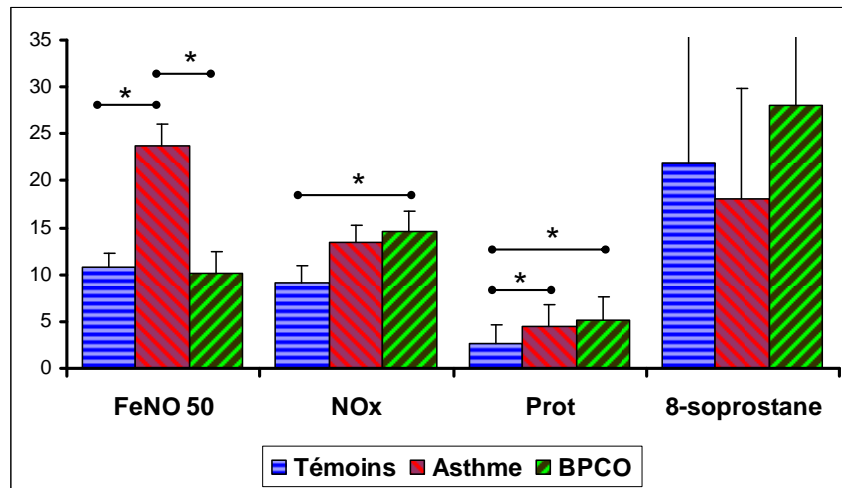


Figure 1 : Valeurs moyennes (barre-écart-type) des concentrations de NO exhalé (en ppb), des concentrations dans les EBC des NOx (en μM), des protéines totales dans les EBC (en $\mu\text{g/ml}$) et des 8-isoprostanes (en pg/ml) en fonction des groupes de sujets.

Sur l'ensemble de la population, les analyses statistiques sur les résultats des marqueurs de l'inflammation montrent des différences entre les 3 populations (asthme, BPCO et témoins).

Le FeNO₅₀ est plus élevé significativement chez les asthmes [23.7 (2.4)ppb] par rapport aux témoins [10.8 (1.5) ppb] et aux BPCO [10.2 (2.2) ppb] [$F=8.5$; $p(F)<0.001$]. De façon conforme à la littérature, les asthmatiques de notre population ont un FeNO₅₀ souvent supérieur à 20ppb, valeur cut-off que nous avons observée dans une étude antérieure menée sur les relations entre l'hyperréactivité bronchique non spécifique (gold standard actuelle de l'évaluation de l'asthme) et le NO exhalé (15,23).

Les analyses de variance sur les valeurs de NOx montrent des moyennes significativement différentes. Les analyses post - hoc montrent des valeurs significativement plus élevés chez les BPCO [14.6 (2.2) μM] par rapport aux témoins [9.2 (1.8) μM] [$p=0.03$] mettant en évidence l'état inflammatoire chez les BPCO au travers du stress nitrosant.

Les protéines sont significativement différentes dans les 3 populations [$p=0.008$], pour les asthmes [4.5 (2.3) $\mu\text{g/ml}$] par rapport aux témoins et pour les BPCO [5.1 (2.6) $\mu\text{g/ml}$] par rapport aux témoins [2.7 (1.9) $\mu\text{g/ml}$]. Comme les analyses chez les témoins ont montré l'influence de l'âge sur les protéines, nous avons effectué les tests en tenant compte de l'âge. Avec cet ajustement, nous retrouvons les mêmes différences [$p=0.003$].

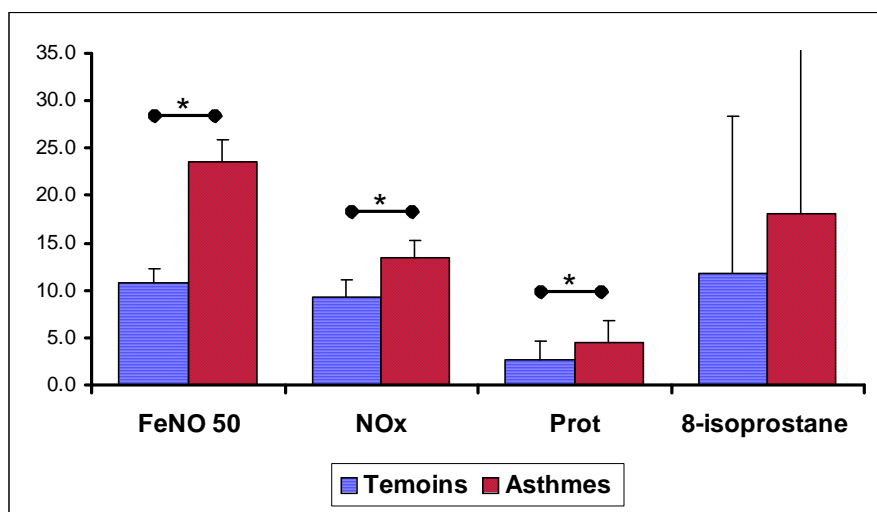
L'élévation du taux d'isoprostanes est régulièrement démontrée dans la littérature chez les asthmatiques (24). Nous ne retrouvons pas ces résultats sur l'ensemble de la population puisque aucune différence n'est objectivée pour les isoprostanes entre les 3 populations.

Comparaison des marqueurs de l'inflammation et du stress oxydant avec les profils respiratoires fonctionnels habituels

Nous avons recherché les corrélations entre les profils fonctionnels traditionnels et les marqueurs étudiés sur les 3 groupes. Nous n'avons pas retrouvé de corrélation entre le VEMS, les débits à bas volume pulmonaire ou le TLCO. Seul un coefficient de corrélation, significatif mais peu importante a été objectivé pour les protéines [(r= -0.23, p(r)=0.03)] avec le VEMS, D25-75 et TLCO. La faible représentativité de cette corrélation ne permet pas d'évoquer une relation robuste même si elle est cohérente et significative. Ces résultats ne sont pas surprenants puisque les EFR traditionnelles sont l'expression indirecte et plus tardive des atteintes respiratoires présentes ou passées contrairement aux paramètres inflammatoires mesurés (17).

Comparaison des marqueurs de l'inflammation et du stress oxydant selon les groupes pathologiques et les profils cliniques (sévérité, évolutivité, contrôle de la maladie).

Asthme et témoins (figure 2)



Valeurs moyennes (barre=écart-type) des concentrations de NO exhalé (en ppb), des concentrations dans les EBC des NOx (en µM), des protéines totales dans les EBC (en µg/ml) et des 8-isoprostanes (en pg/ml) chez les témoins et les asthmatiques.

En comparaison deux à deux, les asthmatiques et témoins sont significativement différents pour le FeNO₅₀ (respectivement 23.7 (2.4) ppb vs 10.8 (1.5) ppb), les NOx (respectivement 13.5 (1.8) µM et 9.2 (1.8) µM), les protéines totales (respectivement 4.5 (2.3) µg/ml vs 2.7 (1.9) µg) avec des taux significativement plus élevés chez les malades. Cette relation persiste après ajustement sur le tabagisme actuel. De même si l'on considère les asthmes par classes GINA, les taux 8-isoprostanes des asthmes GINA3 sont significativement plus bas par rapport aux asthmes

GINA4 [6.9 v 23.9], ce qui est conforme à la littérature mais qui dans notre étude présente une limite compte tenu du faible effectif (n=8) des échantillons dosés pour le 8-isoprostane.

Nous avons considéré le contrôle de l'asthme au moyen du score de Juniper (7). Comme d'autres auteurs, nous avons fixé notre cut-off à 1.25 (8). Nous n'avons pas observé de différences significatives pour les différents marqueurs biologiques d'inflammation entre les asthmes contrôlés et non contrôlés, les valeurs manquantes des isoprostanes peuvent expliquer cette absence de résultat.

BPCO

La même démarche a été effectuée pour les BPCO en considérant le score clinique BOD (10) (BODE sans épreuve de marche) composé de l'index de masse corporelle, le VEMS, le score de dyspnée (RMC). Nous n'avons pas obtenu de résultat significatif ni en considérant le BOD ni en considérant les thérapeutiques.

Nous considérons cependant que le score de Juniper pour le contrôle de l'asthme comme le score de BOD(E) pour la BPCO sont probablement de bonnes approches de l'impact systémique de l'inflammation. A ce titre, des corrélations entre ces scores et les marqueurs recherchés pourraient s'exprimer sur des effectifs plus grands.

Faits marquants, retombées prévisibles et les perspectives de valorisation

Les résultats encourageants de notre étude sont en cours de publication et nous amène à poursuivre le développement des techniques de dosage d'autres biomarqueurs témoins du stress oxydant et de l'inflammation afin mieux comprendre les schémas physiopathologiques dans notre population. Ainsi, le projet ANR a permis l'émergence de nouvelles collaborations telles que celle avec le laboratoire d'immunologie pour le dosage en cytométrie des cytokines dont nous effectuons actuellement la mise au point depuis la livraison durant l'été 2009 d'un nouveau cytomètre. Le dosage des cytokines s'effectue également en parallèle selon une technique ELISA dans notre laboratoire et si les premiers résultats sont concluants, la validation méthodologique reste à finaliser. De même, concernant la mise au point du dosage du malondialdéhyde (MDA), produit du stress oxydant, nous travaillons avec le centre universitaire de mesures et d'analyses (CUMA) de Lille 2 qui a été équipé en octobre 2009 d'un nouveau spectromètre de masse qui va permettre cette analyse.

La poursuite de notre recherche concerne, chez l'homme, le retentissement fonctionnel et l'inflammation respiratoires liés à l'exposition à des nuisances environnementales et/ou professionnelles. Pour ce qui concerne les perspectives d'étude en milieu professionnel, la rencontre de ces nouvelles équipes au sein du CUMA nous a permis de tester la faisabilité du dosage de métaux lourds et de minéraux tels que le MICA ou le béryllium que nous prévoyons, pour ce dernier, d'étudier chez des salariés exposés sur un projet commun avec l'INRS de Nancy. Concernant les nuisances environnementales, une enquête épidémiologique de population sur la relation entre santé respiratoire et pollution atmosphérique d'origine industrielle doit débiter prochainement (projet ELISABET). Cette étude permettra parallèlement avec les chercheurs de l'Université du littoral d'évaluer les effets de la pollution sur des marqueurs biologiques dont le

condensat afin de mieux connaître les relations entre risque de troubles ventilatoires obstructifs (TVO) et pollution atmosphérique d'origine industrielle.

Les collaborations étroites avec le laboratoire universitaire de physiologie nous ont également amené à développer un modèle animal expérimental avec exposition à des aéro-contaminants et recueil des condensats (programme santé recherche 2008 soutenu par le Conseil Régional). Le développement de ce modèle animal et des modalités de recueil du condensat présente le double avantage de répéter plus facilement les manipulations de recueil d'EBC à des fins méthodologiques et d'analyser expérimentalement chez l'animal le retentissement respiratoire inflammatoire des différents composants des aéro-contaminants testés.

Publications et présentations

- Edmé JL, Tellart AS, Launay D, Nevriere R, Grutzmacher C, Boulenguez C, Labalette M, Hachulla E, Hatron PY, Dessaint J, Matran R, Sobaszek A. Cytokine concentrations in exhaled breath condensates in systemic sclerosis. *Inflamm Res*. 2008 Avr ;57(4):151-6.
- Chérot-Kornobis N, Edmé J, Briand G, Sobaszek A, Nevriere R, Matran R. How to measure exhaled breath MDA in normal subjects: assessment of two ionisation modes used by LC-MS/MS. *Eur Respir J*. 2008 ;32(Supplément 52):723.
- DeBroucker V, Boulenguez C, Lartigau-Sezary I, Sobaszek A, Matran R, Edmé JL. Inflammation du poumon profond et santé au travail ; apport d'une nouvelle technique : analyse du NO dans l'air expiré. *Arch Mal Prof Env*. 2008 ;69(2):401.
- DeBroucker V, Boulenguez C, Facq J, Nevriere R, Sobaszek A, Matran R. Reproductibilité de la mesure du NO exhalé. Influence du taux d'ozone. *Rev Mal Respir*. 2008 Jan ;25(Supplément1) :103.
- DeBroucker V, Boulenguez C, Edmé J, Faure A, Legrand-Cattan K, Perez T, Sobaszek A, Matran R. Test à la méthacholine et NO exhalé. *Rev Mal Respir*. 2007 Jan ;24(Supplément 4):16.
- Edmé J, Nisse C, Lepage N, Matran R, Sobaszek A, Boulenguez C. Évaluation de la mesure du NO expiré par deux techniques : étude de reproductibilité. *Rev Mal Respir*. 2006 Jan ;23(Supplément 1):115.
- Tellart A, Grutzmacher C, Labalette M, Edmé J, Perez T, Boulenguez C, Nevriere R, Crunelle S, Sobaszek A, Matran R. Sclérodémie et cytokines dans le condensat d'air expiré. *Rev Mal Respir*. 2006 Jan ;23(Supplément 1):122.
- Crunelle S, Edmé J, Perez T, Boulenguez C, Nevriere R, Briant G, Tellart A, Sobaszek A, Matran R. Analyse en spectrométrie de masse des condensats d'air expiré. *Rev Mal Respir*. 2006 Jan ;23(Supplément 1):92.
- Tellart AS, Launay D, Edme J, Grutzmacher C, Hachulla E, Labalette M, Perez T, Boulenguez C, Nevriere R, Matran R, Hatron PY, Sobaszek A. Evaluation des cytokines dans les condensats au cours de la sclérodémie systémique. *Rev Med Int*. 2006 ;27 ; S85 -87
- Edme J, Launay D, Nevriere R, Kornobis N, Hachulla E, Grutzmacher C, Labalette M, Perrez T, Boulenguez C, Hatron P, Sobaszek A, Matran R. Evaluation des cytokines dans les condensats de l'air expiré : comparaison entre un groupe de patients atteints de sclérodémie et un groupe témoin. *Rev Mal Respir*. 2006 Nov ;23(5):560.

Bibliographie

1. Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled markers of pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Jun ;163(7):1693-722.
2. Kharitonov SA, Barnes PJ. Biomarkers of some pulmonary diseases in exhaled breath. *Biomarkers*. 2002 ;7(1):1-32.
3. Montuschi P, Barnes PJ. Analysis of exhaled breath condensate for monitoring airway inflammation. *Trends Pharmacol Sci*. 2002 Mai ;23(5):232-7.
4. Ueno T, Kataoka M, Hirano A, Iio K, Tanimoto Y, Kanehiro A, et al. Inflammatory markers in exhaled breath condensate from patients with asthma. *Respirology*. 2008 Sep ;13(5):654-663.
5. Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled biomarkers. *Chest*. 2006 Nov ;130(5):1541-1546.
6. Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousquet J, Drazen JM, FitzGerald M, et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J*. 2008 Jan ;31(1):143-78.
7. Juniper EF, Bousquet J, Abetz L, Bateman ED. Identifying 'well-controlled' and 'not well-controlled' asthma using the Asthma Control Questionnaire. *Respir Med*. 2006 Avr ;100(4):616-21.
8. Martinat Y, Rogeaux Y, Giraud V, Mezzi K. Maîtrise de l'asthme et atteinte des petites voies aériennes : enquête transversale Jacinte (Juniper Asthma

- Control In a National Transversal Evaluation) en pneumologie libérale. *Rev fr allergol immunol clin.* 2002 Juin ;42(4):358-366.
9. Pauwels RA, Buist AS, Ma P, Jenkins CR, Hurd SS. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: National Heart, Lung, and Blood Institute and World Health Organization Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD): executive summary. *Respir Care.* 2001 Aoû ;46(8):798-825.
 10. Tillie Leblond I, Masure F, Housset B, Roche N, Perez T, Birraux G, et al. Utilisation de l'index BOD comme facteur prédictif des hospitalisations pour exacerbation chez des patients atteints de BPCO suivis dans l'étude EXACO. *Rev Mal Respir.* 2009 ;26(Supplement 1):146.
 11. Tsoukias NM, Tannous Z, Wilson AF, George SC. Single-exhalation profiles of NO and CO₂ in humans: effect of dynamically changing flow rate. *J Appl Physiol.* 1998 Aoû ;85(2):642-52.
 12. Chladkova J, Krcmova I, Chladek J, Cap P, Micuda S, Hanzalkova Y. Validation of nitrite and nitrate measurements in exhaled breath condensate. *Respiration.* 2006 ;73(2):173-9.
 13. Vogelberg C, Kahlert A, Würfel C, Marx K, Böhm A, Range U, et al. Exhaled breath condensate nitrite--methodological problems of sample collection. *Med Sci Monit.* 2008 Aoû ;14(8):CR416-22.
 14. Horváth I, Hunt J, Barnes PJ, Alving K, Antczak A, Baraldi E, et al. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J.* 2005 Sep ;26(3):523-48.
 15. Snell N, Newbold P. The clinical utility of biomarkers in asthma and COPD. *Curr Opin Pharmacol.* 2008 Jun ;8(3):222-35.
 16. Rosias PP, Robroeks CM, Niemarkt HJ, Kester AD, Vernooy JH, Suykerbuyk J, et al. Breath condenser coatings affect measurement of biomarkers in exhaled breath condensate. *Eur Respir J.* 2006 Nov ;28(5):1036-41.
 17. Edmé JL, Tellart AS, Launay D, Neviere R, Grutzmacher C, Boulenguez C, et al. Cytokine concentrations in exhaled breath condensates in systemic sclerosis. *Inflamm Res.* 2008 Avr ;57(4):151-6.
 18. Ratnawati, Morton J, Henry RL, Thomas PS. Exhaled breath condensate nitrite/nitrate and pH in relation to pediatric asthma control and exhaled nitric oxide. *Pediatr Pulmonol.* 2006 Oct ;41(10):929-36.
 19. Nightingale JA, Rogers DF, Barnes PJ. Effect of inhaled ozone on exhaled nitric oxide, pulmonary function, and induced sputum in normal and asthmatic subjects. *Thorax.* 1999 Déc ;54(12):1061-1069.
 20. Chow S, Yates DH, Thomas PS. Reproducibility of exhaled breath condensate markers. *Eur Respir J.* 2008 Oct ;32(4):1124-6.
 21. Franklin P, Moeller A, Hall GL, Horak F, Patterson H, Stick SM. Variability of nitric oxide metabolites in exhaled breath condensate. *Respir Med.* 2006 Jan ;100(1):123-129.
 22. Cruz M, Sánchez-Vidaurre S, Romero P, Morell F, Muñoz X. Impact of age on pH, 8-isoprostane, and nitrogen oxides in exhaled breath condensate. *Chest.* 2009 Fév ;135(2):462-467.
 23. Debroucker V, Boulenguez C, Edmé J, Faure A, Legrand-Cattan K, Perez T, et al. Test à la méthacholine et NO exhalé. *Rev Mal Respir.* 2007 Jan ;24(Supplement 4):16.
 24. Samitas K, Chorianopoulos D, Vittorakis S, Zervas E, Economidou E, Papatheodorou G, et al. Exhaled cysteinyl-leukotrienes and 8-isoprostane in patients with asthma and their relation to clinical severity. *Respir Med.* 2009 Mai ;103(5):750-756.