

Mémoire de Maîtrise en médecine no. 3404

*Valeurs comparées d'oxyde  
nitrique nasal dans la  
mucoviscidose et la dyskinésie  
ciliaire primitive*

**Etudiant**

Erwin Samutelela Pires

**Tuteur**

Dr. Romain Lazor  
Service de pneumologie du CHUV

**Co-tuteur**

Dr. Alain Sauty  
Service de pneumologie de Morges

**Expert**

Prof. Jean-William Fitting

Lausanne, janvier 2017

**Titre:** Valeurs comparées d'oxyde nitrique nasal dans la mucoviscidose et la dyskinésie ciliaire primitive

## **Abstract**

### Contexte

Dans un précédent travail de master, il a été déterminé des valeurs de référence de l'oxyde nitrique nasal (nNO) chez 200 sujets sains à l'aide d'un analyseur portable (NIOX MINO) pour pouvoir utiliser cette méthode de mesure à des fins de dépistage simple et non invasif de la dyskinésie ciliaire primitive (DCP). Néanmoins, des valeurs de nNO abaissées ne sont pas spécifiques de la DCP et ont également été observées dans la mucoviscidose.

Ainsi, il est pertinent d'évaluer la sensibilité et spécificité de la mesure du nNO avec le NIOX MINO pour distinguer la DCP de la mucoviscidose, une autre cause de bronchectasies ayant des caractéristiques cliniques similaires.

### Objectifs principaux

La présente étude a pour buts principaux de: 1) déterminer si les valeurs de nNO des patients atteints de mucoviscidose, celles de patients atteints de DCP et celles de sujets sains sont significativement différentes; 2) déterminer la distribution des valeurs de nNO des patients atteints de mucoviscidose et de DCP sur les courbes de valeurs de référence établies précédemment dans notre laboratoire. 3) déterminer la valeur qui discrimine au mieux une DCP d'une mucoviscidose et/ou des sujets sains.

### Méthodes

Les mesures ont été réalisées avec le NIOX MINO, un appareil portable disponible au laboratoire des fonctions pulmonaires du Service de Pneumologie du CHUV. Les mesures ont été effectuées chez 22 patients adultes atteints de mucoviscidose et 11 patients adultes atteints de DCP n'ayant pas eu d'exacerbation dans les trois dernières semaines, ainsi que 10 sujets sains adultes.

### Résultats principaux

Les valeurs de nNO étaient statistiquement différentes dans les trois groupes ( $p < 0,0001$ ). Les valeurs moyennes de nNO dans la DCP et dans la mucoviscidose étaient respectivement 554 ppm ( $p < 0,0001$ ) et 261 ppm ( $p < 0,0001$ ) plus basses que celles des contrôles sains. La distribution des valeurs de nNO sur les courbes des valeurs de référence précédemment établies dans notre laboratoire était statistiquement différente pour les trois groupes ( $p < 0,0001$ ). 117 ppm est la valeur seuil qui discrimine au mieux une DCP d'une mucoviscidose et/ou des sujets sains, avec une sensibilité de 90,7% et une spécificité de 93%.

### Conclusion

La mesure du nNO à l'aide du NIOX MINO permet de discriminer les patients atteints de DCP des sujets non atteints de DCP (mucoviscidose et sujets sains), et suggère que cette mesure pourrait être un test de dépistage de la DCP valable et reproductible.

### Mots-clés

Mucoviscidose; Dyskinésie ciliaire primitive; Bronchectasies; Oxyde nitrique; Nez

## 1. Introduction

La mucoviscidose et la dyskinésie ciliaire primitive (DCP) sont deux maladies génétiques caractérisées par le développement de broncheectasies. La première est une maladie autosomique récessive résultant de mutations dans le gène cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) localisé sur le chromosome 7 et fréquemment rencontrée dans la population caucasienne européenne (1/3000 naissances vivantes). Le gène CFTR code pour une protéine à simple chaîne constituée de 1480 acides aminés qui fonctionne comme canal au chlore régulé par l'AMP cyclique et qui régule lui-même d'autres canaux ioniques. Une fois formée, la protéine CFTR se place dans la membrane cytoplasmique des cellules épithéliales normales. Une mutation du gène CFTR entraîne une absence ou dysfonction de la protéine CFTR. La mutation la plus fréquente (environ 70% des mutations) est une délétion de 3 paires de base qui se traduit par une absence de phénylalanine au niveau de l'acide aminé 508 (F508del). Dans l'épithélium respiratoire, la conséquence est une augmentation du transport de sodium et une diminution de la perméabilité au chlore. Cliniquement, la mucoviscidose se traduit par un dysfonctionnement généralisé des glandes exocrines conduisant à un épaissement et à une accumulation des sécrétions muqueuses, ce qui provoque notamment une altération de la motilité ciliaire de l'épithélium respiratoire. Ainsi, dans les poumons, les premiers signes et symptômes surviennent généralement dans l'enfance avec une toux produisant des expectorations visqueuses et purulentes. Le diagnostic de mucoviscidose repose sur des critères cliniques et la démonstration d'une fonction CFTR anormale, documentée par l'analyse génétique, par le test à la sueur et dans des rares cas par la mesure de la différence de potentiel transépithélial nasal. En général, la maladie est diagnostiquée chez les enfants en bas âge. Toutefois, 5% des cas sont diagnostiqués à l'âge adulte (1). Le grand nombre de mutations (plus de 1500) rares identifiées du gène CFTR rend difficile le dépistage génétique de la mucoviscidose. En effet, il ne s'agit pas d'une maladie exclusivement pédiatrique et le diagnostic différentiel doit intégrer les broncheectasies de cause indéterminée chez l'adulte.

La DCP est une maladie génétique rare caractérisée par des anomalies de la motilité des cils vibratiles tapissant l'épithélium respiratoire. Ces anomalies résultent de mutations des gènes dynein axonemal heavy chain (DNAH5 et DNAH11), dyneine axonemal intermediate chain (DNAI1 et DNAI2) et dyneine axonemal assembly factor (DNAAF2) codant pour les éléments du bras de dynéine, une protéine importante dans la structure de l'axonème des cils vibratiles. Des mutations des gènes radial spoke head (RSPH9 et RSPH4A) codant pour la tête des ponts radiaires, également importants dans la structure et fonction de l'axonème, ont été associées à la DCP. Cliniquement, cette pathologie se traduit par une diminution de la clairance

mucociliaire des voies aériennes conduisant à l'accumulation de sécrétions et de bactéries, des infections bronchiques et des sinus paranasaux récidivantes, ainsi que le développement de bronchectasies diffuses. Dans 50% des cas, il existe un situs inversus et on parle alors de syndrome de Kartagener. Le diagnostic de la DCP est difficile et requiert des techniques complexes comprenant: l'analyse génétique, la microscopie électronique pour la visualisation de l'ultrastructure ciliaire, la vidéomicroscopie de cellules ciliées fraîches pour l'évaluation de la fréquence et du pattern de battement ciliaire et en dernier recours, la culture de cellules épithéliales.

L'oxyde nitrique (NO) est une molécule de signalisation intra et inter-cellulaire impliquée dans plusieurs processus physiologiques et pathophysiologiques, comme la régulation du tonus vasculaire, l'activité des cellules immunitaires, la protection contre les infections bactériennes, la fonction plaquettaire et la neurotransmission. Le NO est notamment produit à des concentrations élevées dans les fosses nasales et cette production peut être mesurée de manière non invasive (2 – 3).

Une diminution significative de l'oxyde nitrique nasal (nNO) a été observée chez les patients atteints de DCP compare à des sujets sains, et la mesure du nNO a été proposée comme test de dépistage simple, rapide et non invasif à la recherche d'une DCP (4 – 11). Dans cette optique, l'European Respiratory Society (ERS) préconise l'utilisation d'appareils de mesure de nNO par chimiluminescence (2). Il s'agit d'analyseurs volumineux qui doivent être régulièrement calibrés, les frais d'achat et de manutention dépassant les 30 000 CHF (12). L'alternative à ces analyseurs réside en l'utilisation d'appareils de mesure portables et moins onéreux (environ 2100 CHF), tel que le NIOX MINO (12). Cet appareil est couramment utilisé par les professionnels de la santé dans le suivi de l'état inflammatoire des voies aériennes chez patients asthmatiques. Quelques études ont montré que l'utilisation du NIOX MINO est également possible dans la mesure du nNO dans le but de dépister une DCP (12 – 14).

Dans un précédent travail de master, des valeurs de référence de nNO ont été établies avec le NIOX MINO. Aucune corrélation n'a été trouvée entre les valeurs de nNO et le sexe, le poids, la taille et le BMI (respectivement), l'heure du jour et la date à laquelle les mesures ont été effectuées (15). En revanche, une corrélation négative entre les valeurs de nNO et l'âge a été trouvée. Finalement, Ribeiro *et al.* ont également effectué une première comparaison entre les valeurs de nNO de 8 patients adultes atteints de DCP et les valeurs de référence. Tous les patients avaient un nNO abaissé, comme attendu (15). Néanmoins, Ribeiro *et al.* proposent de réaliser une étude portant sur les valeurs de nNO chez des patients atteints d'autres causes de bronchectasies que la DCP, afin d'évaluer la spécificité de la méthode de mesure du nNO au moyen du NIOX MINO.

Le diagnostic différentiel des broncheectasies diffuses est extrêmement vaste et comprend: les déficits immunitaires (hypogammaglobulinémie et infection par le VIH), des maladies génétiques (DCP, mucoviscidose, déficit en  $\alpha$ 1-antitrypsine), les maladies auto-immunes ou rhumatologiques (polyarthrite rhumatoïde), les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (rectocolite ulcéro-hémorragique et maladie de Crohn), l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique et d'autres causes rares comme la panbronchiolite diffuse et le syndrome des ongles jaunes. Dans 25 à 50% des cas aucune cause évidente n'est retrouvée malgré un bilan étiologique détaillé (1). Parmi ces causes de broncheectasies, trois maladies ont été associées à une diminution plus ou moins importante du nNO comparé aux sujets sains: la DCP, la mucoviscidose et la panbronchiolite diffuse (PBD). La PBD est une maladie inflammatoire pulmonaire extrêmement rare dans les pays occidentaux; seuls 6 cas ont été décrits aux Etats-Unis et en Europe entre 1988 et 1995, majoritairement chez des sujets d'origine asiatique ou ayant séjourné en Asie (16). Les études ayant examiné les valeurs de nNO chez les patients atteints de mucoviscidose ne sont pas concordantes. Plusieurs études rapportent des valeurs de nNO normales alors que dans d'autres elles sont abaissées. De plus, un chevauchement entre les valeurs de nNO de sujets atteints de mucoviscidose et ceux atteints de DCP a été décrit (4 – 11).

Ainsi, il est pertinent d'évaluer la sensibilité et la spécificité de la méthode de mesure du nNO au moyen du NIOX MINO telle que décrite par Ribeiro *et al.*, dans le but de discriminer la DCP de la mucoviscidose.

### 1.1. Objectifs

Les objectifs de ce travail ont été: 1) de déterminer si les valeurs de nNO des patients atteints de mucoviscidose, celles de patients atteints de DCP et celles de sujets sains sont significativement différentes; 2) de déterminer la distribution des valeurs de nNO des patients atteints de mucoviscidose et de DCP sur les courbes de valeurs de référence établies précédemment dans notre laboratoire; 3) de déterminer si, à l'intérieur de chaque groupe de sujets malades (mucoviscidose et DCP), il existe une corrélation entre les valeurs de nNO et respectivement l'âge, le sexe, la taille, le poids, l'index de masse corporelle (IMC), le volume expiratoire maximum par seconde (VEMS), l'existence d'une polypose nasale, d'un antécédent de chirurgie des sinus, d'une rhinoconjonctivite allergique, d'un asthme, d'un tabagisme actif et l'administration de corticoïdes topiques nasaux; 4) de déterminer la valeur de nNO qui permettra de discriminer au mieux les patients atteints de DCP des sujets non atteints de DCP (patients atteints de mucoviscidose et sujets sains); 5) d'estimer la reproductibilité de la méthode de mesure du nNO utilisée.

## 2. Population étudiée et méthodes

Cette étude a été approuvée par la Commission cantonale d'éthique de la recherche sur l'être humain du canton de Vaud (CER-VD 2016 – 00493). Tous les participants ont donné leur consentement éclairé par écrit, après avoir reçu une information écrite et orale à propos du projet.

### 2.1. Population étudiée

Lors de la réalisation de ce travail, trois groupes distincts ont été formés: un groupe mucoviscidose, un groupe DCP et un groupe de contrôles sains. Le premier comprenait un collectif de 22 individus adultes atteints de mucoviscidose (10 femmes et 12 hommes) recrutés à la consultation ambulatoire de mucoviscidose du Centre hospitalier universitaire vaudois (CHUV) et de l'Hôpital de Morges. Tous les individus avaient un diagnostic de mucoviscidose préalablement confirmé par une analyse génétique. Le groupe DCP a été formé un à deux ans avant la réalisation de cette étude. Il était constitué de 11 patients adultes (6 femmes et 5 hommes) diagnostiqués avec la DCP selon l'algorithme de prise en charge recommandé par l'ERS/ATS (17). Les données ont été recueillies au sein du Service de Pneumologie du CHUV, dont 8 données ont été récoltées lors de la réalisation d'un travail de master précédent. Un groupe contrôle de 10 sujets sains adultes (5 femmes et 5 hommes) recrutés au sein de la population lausannoise a été constitué pour comparaison.

### 2.2. Matériel et méthodes

Le protocole de mesure décrit ci-dessous a été validé par une étude précédente (15). Les mesures du nNO ont été effectuées avec le NIOX MINO (Nitric oxide monitoring system; *Aerocrine*<sup>®</sup>, Solna, Sweden). Cet analyseur utilise une technique de mesure ampérométrique grâce à un capteur électrochimique, et détecte des concentrations de nNO variant de 5 à 1700 parties par milliard (ppm). Afin de réaliser des mesures en mode nasal, une sonde nasale à usage unique est reliée à l'appareil. Cette sonde se termine par une olive nasale qui est maintenue appuyée contre la narine et permet de relier de manière étanche la cavité nasale à l'appareil de mesure. Durant la mesure de nNO, de l'air est aspiré dans l'appareil à un débit de 5 ml/sec durant 45 secondes. L'air ambiant entre par la narine gauche, circule par la partie postérieure de la cavité nasale puis la narine droite, traverse la sonde nasale et atteint l'appareil de mesure.

Afin d'éviter une contamination de l'échantillon d'air circulant dans les fosses nasales par de l'air alvéolaire, il était demandé aux sujets de respirer spontanément à travers une paille de 0,5 cm de diamètre et 11 cm de longueur, produisant une pression positive buccale

uniquement à l'expiration. Chez les patients atteints de mucoviscidose et de DCP, une spirométrie a été réalisée uniquement après la mesure du nNO.

Le même protocole a été utilisé pour les trois groupes. Pour chaque sujet, trois mesures consécutives du nNO et une mesure du NO ambiant ont été effectuées. Les mesures ont été réalisées entre juillet et septembre 2016 par deux opérateurs (un pour chaque site).

Les patients souffrant de bronchectasies d'autres causes qu'une mucoviscidose ou une DCP ont été exclus de l'étude. Les patients ayant eu une exacerbation au cours des trois dernières semaines avant la réalisation des mesures de nNO ont aussi été écartés de l'étude. Une exacerbation a été définie comme une augmentation de la toux, un état fébrile et/ou une augmentation du volume des expectorations ayant nécessité un traitement par antibiotiques. Concernant les contrôles sains, les critères d'exclusion étaient les suivants: tabagisme actif, asthme, sinusite aigue ou chronique, polypose nasale, antécédents de chirurgie des sinus, infection des voies respiratoires supérieures et/ou utilisation de corticoïdes nasaux dans les trois dernières semaines, antécédents d'uvulo-pharyngo-palato-plastie, troubles neuromusculaires et maladies respiratoires inflammatoires chroniques. La perméabilité des narines et le mouvement symétrique du palais ont été examinés avant chaque mesure réalisée.

### 2.3. Analyse statistique

La valeur de nNO de chaque sujet sain ou malade a été calculée comme la moyenne de trois mesures consécutives du nNO moins le NO ambiant. Cette valeur a été exprimée en ppm. Les données sont résumées sous forme de moyenne (*mean*) et écart-type (*sd*) pour chaque groupe. L'appareil NIOX MINO ne mesurant pas des concentrations de NO inférieures à 5 ppm, la valeur 0 ppm a été utilisée arbitrairement lorsque le NO ambiant mesuré était inférieur à 5 ppm. L'analyse par le modèle de régression linéaire a été utilisée afin d'explorer d'éventuels associations entre les valeurs de nNO et les covariables (tableau 1). Cette analyse a été complétée par un test de Wald en post-estimation afin de comparer les valeurs moyennes de nNO entre les trois groupes, avant et après correction par rapport à l'âge.

La distribution des valeurs de nNO des trois groupes sur les courbes de valeurs de référence précédemment établies dans notre laboratoire a été déterminée en utilisant 7 quantiles des valeurs de référence formant huit classes. Les sujets ont été affectés à la classe correspondante selon leur âge et leur valeur de nNO. Dans chaque classe, la proportion de sujets de chaque groupe a été déterminée et l'association entre la classe et le groupe a été analysée avec un test exact de Fischer.

Dans chaque groupe de patients malades (atteints de mucoviscidose ou de DCP), l'association entre les valeurs de nNO et respectivement l'âge, le poids, la taille, l'IMC et le

VEMS (exprimé en pourcentage de la valeur prédite) a été examinée par la corrélation de Spearman. Pour les variables dichotomiques (sexe, polypose nasale, antécédents de chirurgie des sinus, administration de corticoïdes nasaux dans les trois dernières semaines, asthme, rhinoconjonctivite allergique et tabagisme actif) l'association a été examinée avec un test de Wilcoxon.

La valeur qui discrimine au mieux les patients atteints de DCP des patients non atteints de DCP a été déterminée par un modèle de régression logistique. La reproductibilité de la mesure a été estimée par une analyse de variance et exprimée en coefficient de corrélation intraclasse (CCI).

Une valeur  $p$  inférieure à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative pour les différents tests effectués. Tous les calculs ont été effectués avec le logiciel STATA 14.1 (StataCorp. 2015. Stata Statistical Software: Release 14. College Station, TX: StataCorp)

### 3. Résultats

Les caractéristiques générales et les valeurs de nNO dans les trois groupes sont présentées dans le tableau 1. Caractéristiques des trois groupes étudiées. Globalement, la différence des valeurs de nNO entre les trois groupes était statistiquement significative ( $p < 0,0001$ ). Dans le groupe DCP, les valeurs du nNO étaient en moyenne 554 ppm plus basses que celles du groupe contrôles sains ( $p < 0,0001$ ). Un léger chevauchement entre les valeurs de nNO des sujets du groupe mucoviscidose et celles des sujets du groupe DCP a été observé. Ce chevauchement a été légèrement plus important entre les valeurs de nNO des sujets du groupe mucoviscidose et celles des sujets du groupe contrôles sains (figure 1. Différence des valeurs individuelles de nNO entre les trois groupes). Malgré ce chevauchement, les valeurs de nNO du groupe mucoviscidose étaient en moyenne 261 ppm plus basses que celles du groupe contrôles sains ( $p < 0,0001$ ). Les mêmes résultats ont été trouvés après ajustement des valeurs de nNO à l'âge: les valeurs de nNO étaient en moyenne 577 ppm plus basses dans le groupe DCP et 272 ppm plus basses dans le groupe mucoviscidose, comparées au groupe contrôles sains ( $p < 0,0001$  pour les deux groupes).

En tenant compte des courbes de valeurs de nNO de référence précédemment établies dans notre laboratoire, les valeurs de nNO des sujets atteints de mucoviscidose se distribuaient principalement entre le q50 et le q2.5 (figure 2. Distribution des valeurs de nNO du groupe mucoviscidose sur les courbes des valeurs de référence). Dans le groupe DCP, toutes les valeurs de nNO étaient au-dessous du q2.5, hormis une seule valeur de nNO qui se situait au-dessous du q5 (figure 3. Distribution des valeurs de nNO du groupe DCP sur les



courbes des valeurs de référence). A l'inverse, toutes les valeurs de nNO du groupe contrôles sains étaient comprises entre le q25 et le q95 des courbes des valeurs de référence (figure 4. Distribution des valeurs de nNO du groupe contrôle sur les courbes des valeurs de référence).

La distribution des sujets parmi les classes des courbes des valeurs des référence n'étant pas aléatoire, l'association entre le groupe et la classe est statistiquement significative ( $p < 0,0001$ ) (figure 5. Proportion de sujets de chaque groupe par classe de courbes des valeurs de référence). Ainsi, dans le groupe mucoviscidose, 55% des sujets se trouvaient dans les classes 3 et 4, environ le tiers des sujets (32%) était situé dans les classes 1 et 2 et le sixième des sujets (18%) était compris dans les classes 5 et 6. Dans le groupe DCP, pratiquement tous les sujets étaient dans la classe 1 (91%) et seulement un sujet se trouvait dans la classe 2 (9%). Dans le groupe contrôles sains, plus de la moitié des sujets étaient dans la classe 4 (60%) et le restant des sujets se situaient dans les classes 5 et 6 (40%). Aucun sujet de l'étude ne se trouvait dans les classes 7 et 8.

La valeur permettant de discriminer au mieux les patients atteints de DCP des patients non atteints DCP indépendamment de l'âge était de 117 ppm (figure 1. Différence des valeurs individuelles de nNO entre les trois groupes). Si cette valeur était considérée comme valeur seuil de dépistage de la DCP, la sensibilité serait de 90,7% et la spécificité de 93%.

Dans les trois groupes (tableau 2. Analyse par régression linéaire des facteurs pouvant influencer les valeurs de nNO sur les trois groupes), seul l'âge a montré une tendance à faire diminuer la valeur de nNO en moyenne de 4,9 ppm par année de vie supplémentaire, cependant cette tendance était statistiquement non significative ( $p = 0,165$ ). A l'intérieur de chaque groupe de sujets malades (mucoviscidose et DCP), aucune corrélation statistiquement significative n'a été trouvée entre les valeurs de nNO et les différentes variables continues et dichotomiques (tableau 3. Test de Wilcoxon dans la recherche d'une association entre le nNO et les variables dichotomiques et tableau 4. Corrélation de Spearman entre le nNO et les variables continues). Néanmoins, dans le groupe mucoviscidose, les patients ayant reçu des corticostéroïdes dans les trois dernières semaines avaient tendance à avoir des valeurs de nNO plus élevées ( $p = 0,1404$ ). Au contraire, dans le groupe DCP, cette variable avait tendance à faire diminuer les valeurs de nNO ( $p = 0,1824$ ). Les patients ayant subi une intervention chirurgicale des sinus ont montré une tendance à avoir des valeurs de nNO plus basses dans les deux groupes de sujets malades ( $p = 0,2623$  dans le groupe mucoviscidose; et  $p = 0,0662$  dans le groupe DCP).

La méthode de mesure utilisée était reproductible, le CCI étant de 94%.

#### 4. Discussion

Le NO est synthétisé par une réaction d'oxydation de L-arginine en L-citrulline catalysée par trois isoenzymes, les NO synthases (NOS), en présence de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), d'oxygène (O<sub>2</sub>) et d'autres co-facteurs. Il existe trois NOS différentes dont deux sont dites constitutives (NOS-1 et NOS-3) et une inductible (NOS-2). Les NOS constitutives sont dépendantes de la liaison à la calmodulin-binding protein (CaM-binding protein) pour être activées et, par conséquent, de la concentration de calcium à l'intérieur de la cellule. De ce fait, leur production de NO est très faible, rapide et transitoire. A l'inverse, la NOS-2 (inductible) est indépendante de cette liaison et son expression se fait au niveau de la transcription qui dépend entre autres du facteur nucléaire kB (NF-kB). Ce facteur est activé par des cytokines pro-inflammatoires, à savoir le tumor necrosis factor (TNF) et l'interleukine-1b (IL-1b). Ce mécanisme entraîne une production très importante de NO qui reste stable pendant plusieurs jours. Cette production de NO peut être diminuée par l'administration de corticoïdes chez les asthmatiques (18). Les plus grandes sources de NO de notre organisme sont les sinus paranasaux : la concentration de NO à l'intérieur des sinus atteint une dizaine de milliers de ppm (3). Lundberg *et al.* ont essayé d'apporter une explication à ce phénomène en suggérant l'existence dans les sinus paranasaux d'une NOS indépendante de la liaison à la CaM-binding protein comme la NOS-2, mais également résistante aux corticoïdes et exprimée constitutivement comme la NOS-1 (19). Dans leur revue de littérature concernant le NO et les maladies inflammatoires des voies respiratoires supérieures, Maniscalco *et al.* soutiennent cette hypothèse (3). En outre, plusieurs études n'ont pas trouvé de corrélation entre les valeurs de nNO et l'administration de corticoïdes topiques et/ou systémiques (11, 19, 20 – 22). Les mêmes résultats ont pu être vérifiés dans la présente étude, ce qui est cohérent avec l'hypothèse élaborée par Lundberg *et al.* (19).

Les résultats de la présente étude confirment que les valeurs de nNO des patients atteints de mucoviscidose sont significativement plus élevées que celles de patients atteints de DCP, mais significativement plus basses que celles des contrôles sains.

Dans cette étude, aucun sujet des trois groupes cliniques ne se trouvait dans les classes 7 et 8 des valeurs de référence. Ces deux classes correspondent à des valeurs de nNO égales ou supérieures au q95 des valeurs de référence (environ 900 ppm). Des valeurs aussi élevées de nNO sont le plus souvent mesurées chez des patients atteints de maladies pulmonaires chroniques ou des sinus paranasaux autres que la mucoviscidose et la DCP, comme l'asthme ou la rhino-conjonctivite allergique (13). Ces deux affections faisaient partie des critères d'exclusion du groupe contrôles sains de cette étude.

Quatre hypothèses ont été évoquées pour expliquer les valeurs de nNO diminuées chez les patients atteints de mucoviscidose.

1) Du point de vue pathophysiologique, la présence d'un mucus épais pourrait empêcher la bonne diffusion du NO en phase gazeuse, malgré une biosynthèse du NO intacte. En effet, la dégradation du NO en phase aqueuse est très rapide et l'accumulation de sécrétions au niveau des voies aériennes augmente son catabolisme, contribuant à des taux de nNO abaissés. Cette hypothèse est soutenue par des études montrant de hautes concentrations de nitrate et nitrites (métabolites du NO) dans les sécrétions des voies aériennes et dans le condensat de l'air expiré de patients atteints de mucoviscidose comparés à des sujets sains (23, 24). Toutefois, dans d'autres pathologies respiratoires entraînant des bronchectasies associées à une production accrue de sécrétions pulmonaires muqueuses, les taux de nNO étaient normaux, voire augmentés (6, 8, 9, 10, 21), contrairement à la mucoviscidose. Les taux de nNO diminués associés à des concentrations élevées de métabolites du NO chez les patients atteints de mucoviscidose pourraient également être le résultat de l'activité de bactéries dotées d'une NO réductase et capables de dénitrification, comme *Pseudomonas aeruginosa*. Cependant, les patients atteints de DCP sont moins souvent colonisés par des bactéries que les patients atteints de mucoviscidose, alors que les taux de nNO sont plus bas chez les premiers. Ainsi, un catabolisme augmenté du NO dû à un piégeage dans le mucus de l'appareil respiratoire, ou résultant d'une activité enzymatique bactérienne n'explique pas à lui seul les valeurs de nNO abaissées dans la mucoviscidose.

2) Du point de vue biochimique, le lien entre la mutation de la protéine CFTR et l'expression de la NOS-2 a été investigué. Une étude a montré une diminution de l'expression de la NOS-2 chez les patients atteints de mucoviscidose. De plus, cette expression était insensible à la stimulation par des cytokines pro-inflammatoires (25). Une autre étude chez un modèle murin a montré que l'expression de NOS-2 dans l'épithélium nasal et intestinal dépend de la présence et de la fonction normale de la protéine CFTR (26). De plus, une corrélation entre la fonction normale de la protéine CFTR et l'expression de la chémokine CCL-5 responsable du recrutement d'éosinophiles, basophiles et lymphocytes T CD45, a également été décrite (27). Or l'expression de CCL-5 et celle de la NOS-2 empruntent la même voie de signalisation, qui commence par le NF-kB (26). Ainsi, la possibilité d'une altération du NF-kB chez les patients atteints de mucoviscidose entraînant une diminution de l'expression de la NOS-2 a été envisagée (28). Une étude a cependant montré qu'une accumulation de la protéine CFTR mutée dans le réticulum endoplasmique des cellules épithéliales provoque un stress intra-cellulaire, conduisant à une forte stimulation de l'expression de NF-kB, ce qui contredit cette hypothèse.

3) Sur le plan métabolique, il a été suggéré que, dans la mucoviscidose, la malnutrition chronique secondaire à une insuffisance pancréatique pourrait mener à une diminution des taux de L-arginine, le substrat nécessaire à la synthèse de NO. Ceci pourrait expliquer les valeurs abaissées de nNO chez les patients atteints de mucoviscidose avec insuffisance pancréatique et suggère qu'une supplémentation en L-Arginine pourrait contribuer à l'augmentation du nNO chez ces patients (19). Dans notre étude, l'état de nutrition ne semble pas être associé aux taux de nNO chez les patients atteints de mucoviscidose, puisqu'aucune corrélation entre les valeurs de nNO et l'IMC n'a pu être objectivée. Ces résultats sont non seulement en accord avec les conclusions d'autres études (21 – 22), mais également avec ceux trouvés chez des sujets sains lors de l'établissement des valeurs de référence de nNO de notre laboratoire (15). Ainsi, la malnutrition ne peut pas expliquer à elle seule les valeurs de nNO abaissées observées chez les patients atteints de mucoviscidose.

4) Du point de vue anatomique, une diminution des taux de nNO dans la mucoviscidose pourrait être due à une obstruction nasale. Chez les patients atteints de polypose nasale, des valeurs de nNO abaissées ont en effet été observées en comparaison à des sujets sains, malgré une expression de NOS-2 augmentée (29). De plus, les patients atteints de mucoviscidose avec polypose nasale ont des taux de nNO plus bas que ceux sans polypose nasale (20 – 21). Cette affection de la sphère ORL fait partie du tableau clinique de la mucoviscidose et provoque une obstruction des ostia méataux et un œdème de la muqueuse nasale, contribuant à la diminution de la concentration de NO dans la cavité nasale. Cette hypothèse est soutenue par des études qui montrent une augmentation du nNO chez les patients ayant subi une exérèse des polypes nasaux par voie endoscopique. Cette augmentation est proportionnelle à l'étendue de l'ablation des polypes (21, 29). Ce mécanisme semble être propre à la mucoviscidose, puisqu'une corrélation entre la polypose nasale et les valeurs de nNO n'a pas été observée chez les patients atteints de DCP (20). En outre, deux études rapportent respectivement, des hypoplasies et des aplasies des sinus frontaux et sphénoïdaux chez 38/45 (84,4%) patients atteints de mucoviscidose et 30/41 (73%) patients atteints de DCP (30,31). La ventilation nasale contribue fortement au développement des sinus frontaux et sphénoïdaux qui, contrairement aux autres sinus paranasaux, ne se pneumatisent qu'après la naissance. Ainsi, leur obstruction pourrait entraîner une hypoplasie/aplasie des sinus qui pourrait être la cause de taux de nNO diminués. Dans notre étude, aucune corrélation statistiquement significative entre les valeurs de nNO et, respectivement, la polypose nasale et les antécédents de chirurgie des sinus n'a cependant été trouvée.

Dans la présente étude, la valeur seuil qui permet de discriminer au mieux une DCP d'une mucoviscidose et/ou d'un patient sain est de 117 ppm (indépendamment de l'âge), avec

une sensibilité de 91% et une spécificité de 93%. La sensibilité étant satisfaisante, des valeurs normales à élevées de nNO permettraient ainsi d'exclure raisonnablement une DCP devant un cas de bronchectasies de cause indéterminée. La spécificité étant également satisfaisante mais imparfaite, des investigations complémentaires devraient toujours être effectuées afin de confirmer le diagnostic de DCP. Néanmoins, devant un tableau clinique extrêmement suggestif de DCP (ex : *situs inversus*) associé à des valeurs de nNO légèrement diminuées ou normales, des investigations complémentaires devraient également être réalisées pour établir le diagnostic.

Dans la littérature, les valeurs seuil permettant de distinguer un cas de DCP d'un sujet sain varient entre 105 et 290 ppm, dépendant de la technique de mesure, de l'appareil et du débit d'aspiration utilisés, ainsi que de l'inclusion ou non de contrôles malades et de sujets d'âge pédiatrique (32, 33). La grande majorité de ces études n'a cependant pas inclus de patients atteints de bronchectasies d'autre cause que la DCP lors de la détermination de la valeur seuil. L'étude avec la plus grande cohorte de patients atteints de DCP (n = 227) a trouvé qu'une valeur seuil de 257 ppm pour distinguer une DCP d'un sujet sain était associée à une sensibilité de 98% et une spécificité de 99,9% (4). Corbelli *et al.* ont rapporté une valeur seuil de 105 ppm pour distinguer une DCP d'un sujet sain avec une sensibilité de 94% et une spécificité de 88% (33). Cette étude ne comprenait pas non plus de cohortes de patients malades autres que la DCP. Néanmoins, l'étude a été réalisée sur une population pédiatrique ayant des valeurs de nNO plus basses que celles des adultes.

La méthode de mesure du nNO utilisée dans la présente étude avait une excellente reproductibilité, le CCI étant de 94%. Cette reproductibilité avait déjà été évaluée dans une étude précédente qui a utilisé la même méthode de mesure pour établir les valeurs de référence de notre laboratoire (CCI = 85%) (6).

#### 4.1. Limites de l'étude

Contrairement aux appareils classiques de mesure du nNO, le NIOX MINO ne permet pas de connaître la valeur de nNO en temps réel durant l'acquisition des données, ce qui empêche l'opérateur d'être certain que le taux nNO mesuré n'a pas été dilué par de l'air pulmonaire.

Le groupe mucoviscidose était constitué de patients cliniquement stables. De ce fait, un possible biais de sélection des cas de mucoviscidose moins sévères a pu survenir. En raison de cet éventuel biais, la spécificité de la mesure du nNO comme test de dépistage de la DCP a éventuellement été surestimée.

En raison du nombre restreint de participants, les résultats de cette étude ont un caractère purement d'orientation non pas démonstratif.

## **5. Conclusion**

La présente étude montre que la mesure du nNO permet de discriminer une DCP d'une mucoviscidose et d'un sujet sain chez l'adulte. Cela suggère que dans la pratique clinique, la mesure du nNO à l'aide de la NIOX MINO pourrait être utilisée comme test de dépistage simple, non-invasif et reproductible de la DCP.

**Tableau 1. Caractéristiques des trois populations étudiées.**

<b>Covariables</b>	<b>Mucoviscidose</b>	<b>DCP</b>	<b>Contrôles sains</b>
N	22	11	10
nNO moyen $\pm$ SD (ppm)	351 $\pm$ 162	58 $\pm$ 45	612 $\pm$ 147
Sexe masculin	12 (55%)	5 (45%)	5 (50%)
Age moyen (années)	31 $\pm$ 11	37 $\pm$ 11	26 $\pm$ 6
Poids moyen (kilos)	62 $\pm$ 11	67 $\pm$ 12	66 $\pm$ 11
Taille (centimètres)	170 $\pm$ 9	173 $\pm$ 11	172 $\pm$ 11
IMC moyen (kg/m <sup>2</sup> )	21 $\pm$ 2	22 $\pm$ 3	22 $\pm$ 2
VEEMS moyen (% du prédit)	74 $\pm$ 26	83 $\pm$ 25	-
Polypose nasale	7 (32%)	5 (45%)	-
S/P chirurgie des sinus	10 (45%)	3 (27%)	-
CNT 3 dernières semaines	6 (27%)	2 (18%)	-
N = population SD = écart-type IMC = index de masse corporelle VEEMS = volume expiratoire maximal par seconde S/P chirurgie des sinus = antécédents de chirurgie des sinus CNT = corticoïdes nasaux topiques dans les trois dernières semaines avant les mesures			

**Tableau 2. Analyse par régression linéaire des facteurs pouvant influencer les valeurs de nNO sur les trois groupes confondus (mucoviscidose n = 22; DCP n =11; contrôles n = 10).**

<b>Variables</b>	<b>Valeur p</b>	<b>Coefficient</b>
Sexe (masculin)	p = 0,621	36,5 ppm
Age	P = 0,165	- 4,9 ppm
Poids	P = 0,948	0,2 ppm
Taille	P = 0,738	1,3 ppm
IMC moyen	P = 0,830	- 3,6 ppm
VEMS	P = 0,574	- 0,8 ppm



**Tableau 3. Test de Wilcoxon dans la recherche d'une association entre le nNO et les variables dichotomiques.**

	<b>MUCOVISCIDOSE</b>	<b>DCP</b>
<b>Variables catégorielles</b>	<b>Valeur p</b>	<b>Valeur p</b>
Sexe	p = 1	p = 0,8551
Polypose nasale	P = 0,8601	P = 0,3613
Asthme	P = 0,7984	P = 0,7518
Antécédents de chirurgie des sinus	P = 0,2623	P = 0,0662
Corticoïdes nasaux topiques dans les 3 dernières semaines avant les mesures	P = 0,1404	P = 0,1824
Rhinoconjonctivite allergique	P = 0,3413	P = 0,6831
Tabagisme actif	P = 0,5089	P = 0,7518

**Tableau 4. Corrélation de Spearman entre le nNO et les variables continues.**

	<b>MUCOVISCIDOSE</b>	<b>DCP</b>
<b><i>Variables continues</i></b>	<b>Valeur p</b>	<b>Valeur P</b>
Age	P = 0,1884	P = 0,4821
Poids	P = 0,6166	P = 0,7856
Taille	P = 0,9721	P = 0,3504
IMC moyen	P = 0,6160	P = 0,4523
VEMS	P = 0,5526	P = 0,7599

Figure 1. Différence des valeurs individuelles de nNO entre les trois groupes.

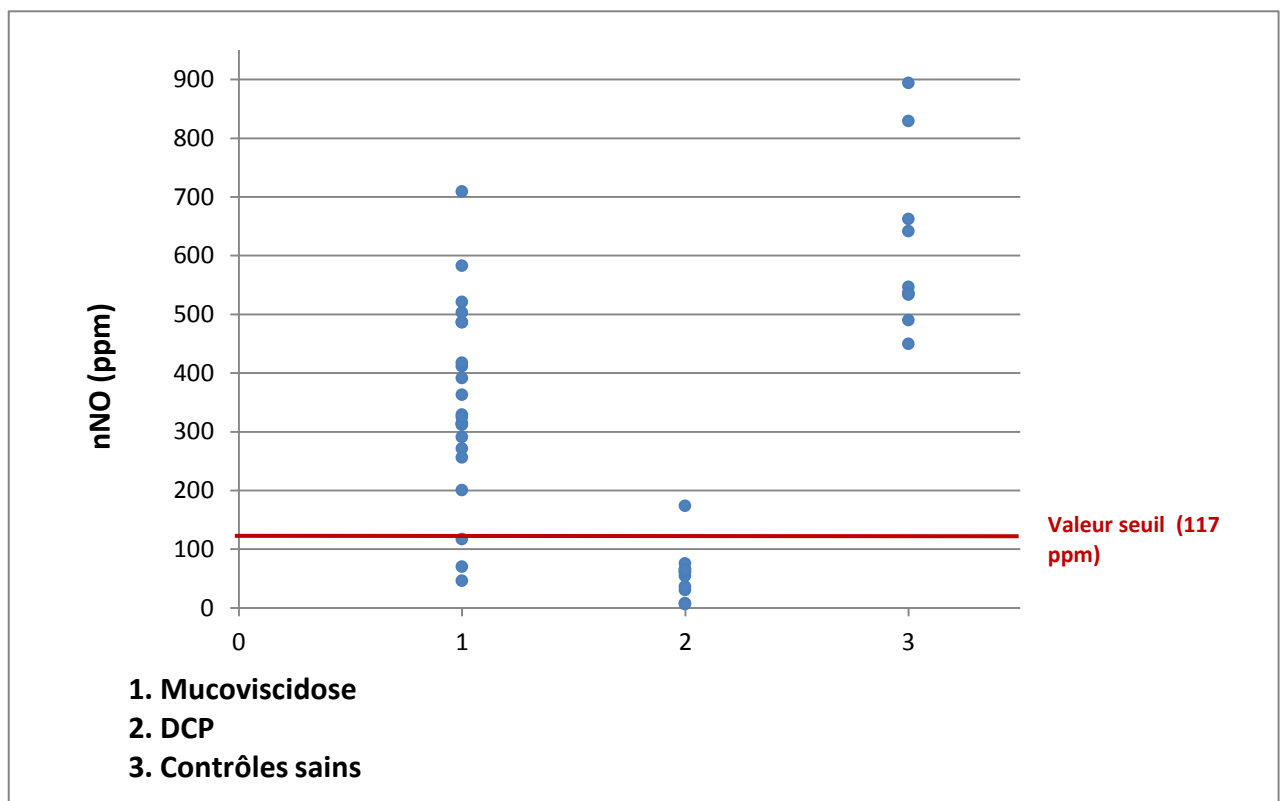


Figure 2. Distribution des valeurs de nNO du groupe mucoviscidose sur les courbes des valeurs de référence.

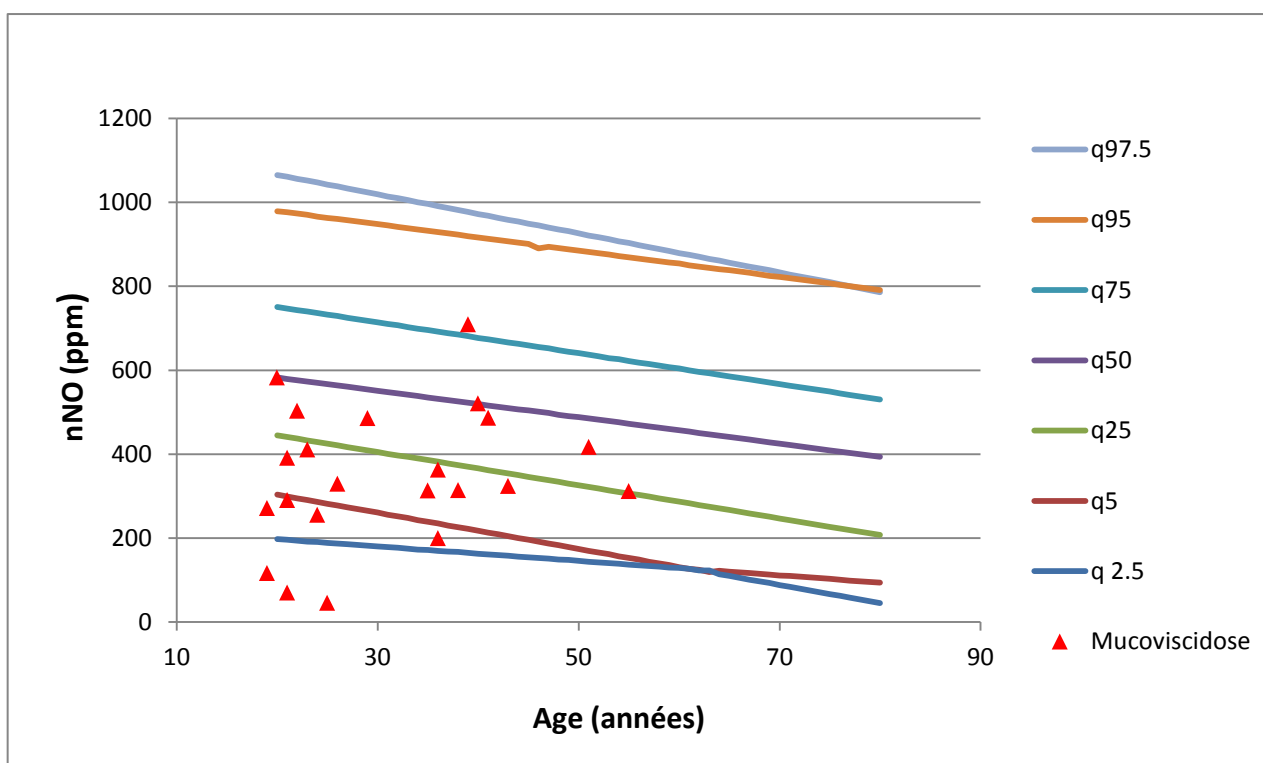


Figure 3. Distribution des valeurs de nNO du groupe DCP sur les courbes des valeurs de référence.

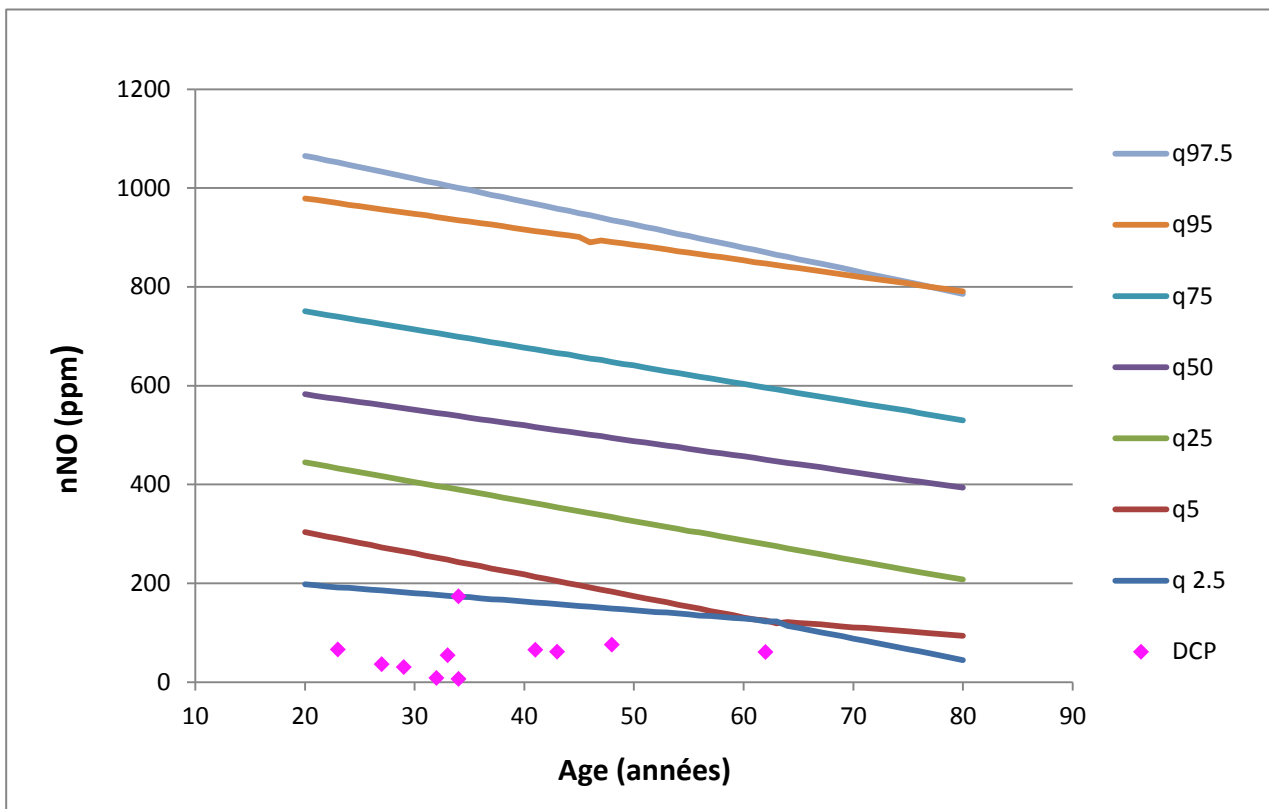


Figure 4. Distribution des valeurs de nNO du groupe contrôle sur les courbes des valeurs de référence.

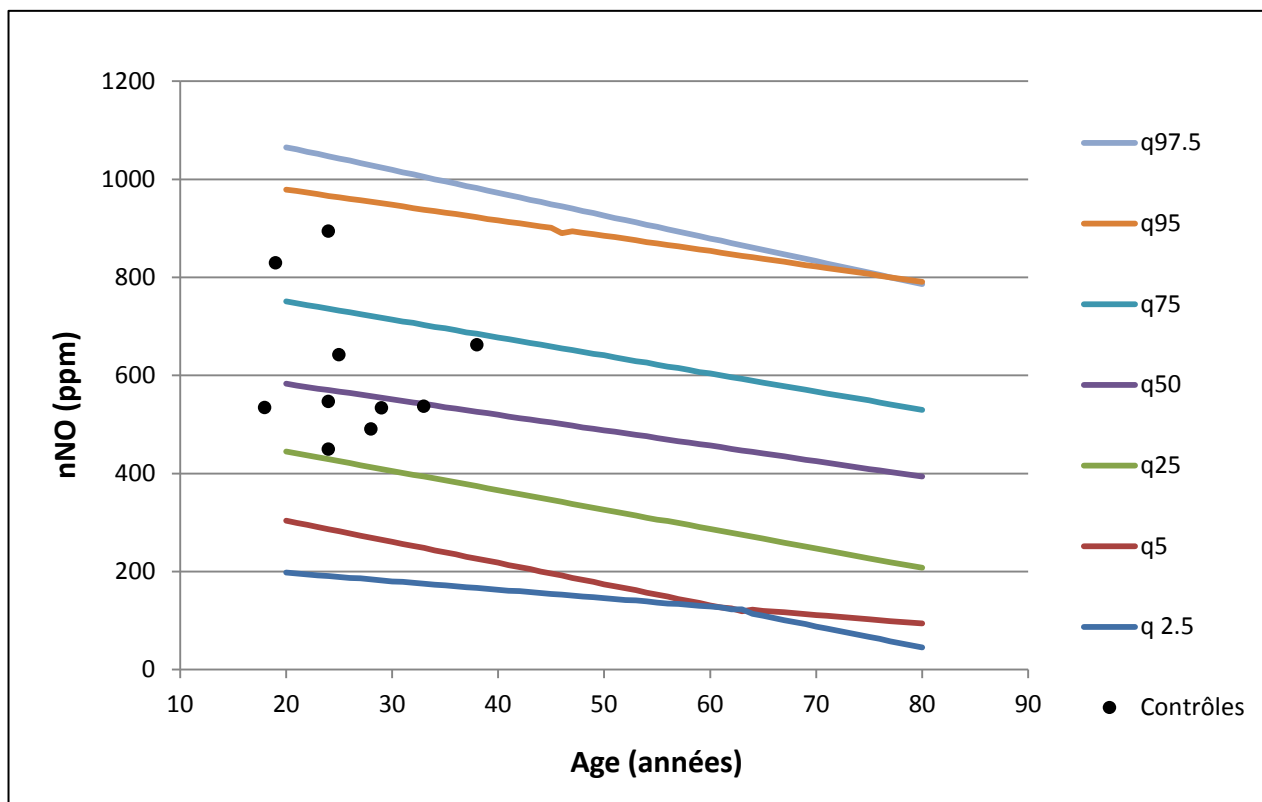
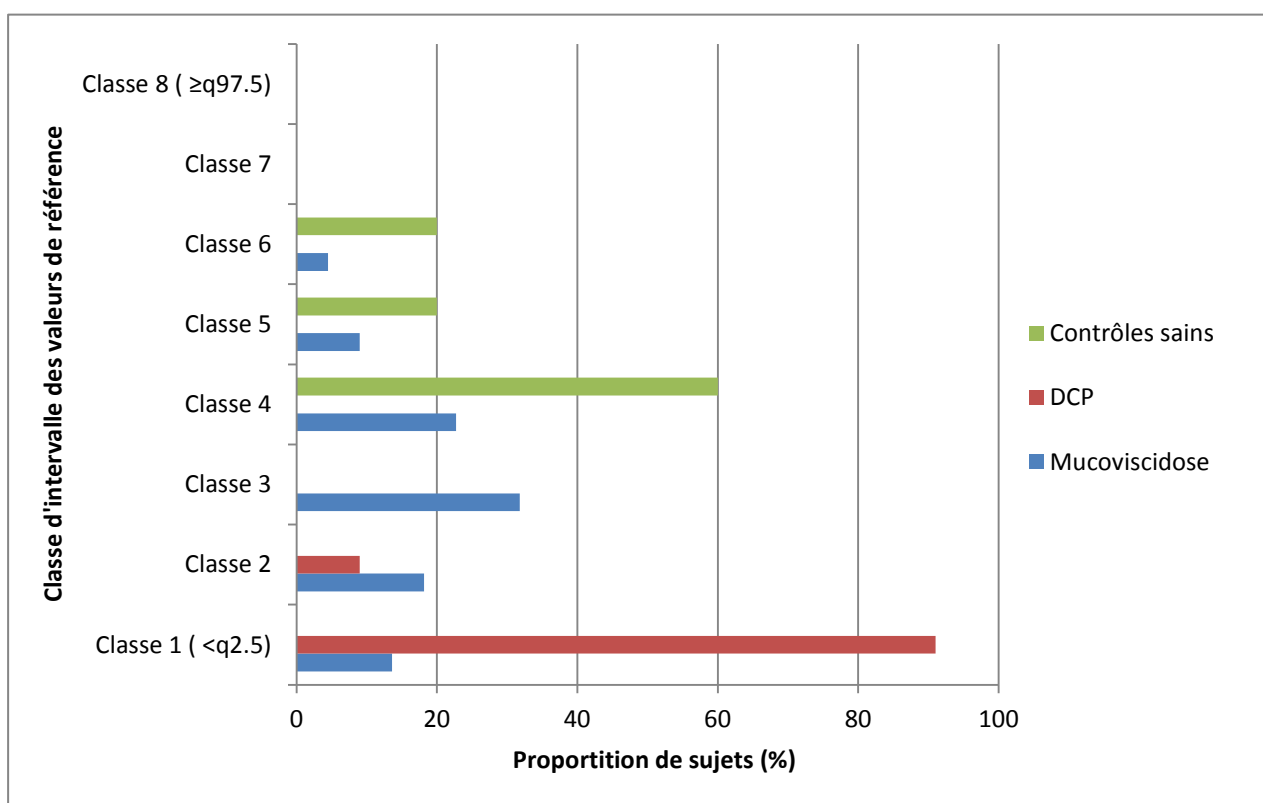


Figure 5. Proportion de sujets de chaque groupe par classe de courbes des valeurs de référence.



## 6. Bibliographie

1. Drain M & Elborn JS. Assessment and investigation of adults with bronchiectasis. ERS Monograph 2011 52: 32.
2. American Thoracic Society; European Respiratory Society. 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.
3. Maniscalco M, Sofia M & Pelaia G. Nitric oxide in upper airways inflammatory diseases. *Inflamm Res* 2007; 56(2): 58 – 69.
4. Leigh MW, Hazucha MJ, Chawla KK, *et al.* Standardizing nasal nitric oxide measurement as a test for primary ciliary dyskinesia. *Ann Am Thorac Soc* 2013; 10: 574 – 581.
5. Walker WT, Liew A, Harris A *et al.* Upper and lower airway nitric oxide levels in primary ciliary dyskinesia, cystic fibrosis and asthma. *Respir Med* 2013; 107(3): 380 – 386.
6. Mateos-Corral D, Coombs R, Grasemann H, *et al.* Diagnostic value of nasal nitric oxide measured with non velum closure techniques for children with primary ciliary dyskinesia. *J Pediatr* 2011; 159: 420 – 424.
11. Noone PG, Leigh MW, Sannuti A, *et al.* Primary ciliary dyskinesia: diagnostic and phenotypic features. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169(4): 459 – 467.
7. Marthin JK & Nielsen KG. Hand-held tidal breathing nasal nitric oxide measurement – a promising targeted case-finding tool for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *PLoS One* 2013; 8: e 57262.
8. Wodehouse T, Kharitov SA, Mackay IS, *et al.* Nasal nitric oxide measurements for the screening or primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J* 2003; 21: 43 – 47.
9. Horvath I, Loukides S, Wodehouse T, *et al.* Comparison of exhaled and nasal nitric oxide and exhaled carbon monoxide levels in bronchiectatic patients with and without primary ciliary dyskinesia. *Thorax* 2003; 58(1): 68 – 72.



10. Narang I, Ersu R, Wilson NM, *et al.* Nitric oxide in chronic airway inflammation in children: diagnostic use and pathophysiological significance. *Thorax* 2002; 57: 586 – 589.
11. Balfour-Lynn IM, Lavery A, Dinwiddie R, *et al.* Reduced upper airway nitric oxide in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1996; 75: 319 – 322.
12. Marthin JK & Nielsen KG. Hand-held tidal breathing nasal nitric oxide measurement – a promising targeted case-finding tool for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *PLoS One* 2013; 8: e 57262.
13. Montella S, Alving K, Maniscalco M, *et al.* Measurement of nasal nitric oxide by hand-held and stationary devices. *Eur J Clin Invest* 2011; 41: 1063 – 1070.
14. Harris A, Bhullar E, Gove K, *et al.* Validation of a portable nitric oxide analyzer for screening in primary ciliary dyskinesias. *BMC Pulm Med* 2014; 14: 18.
15. Ribeiro K, Fitting J-W, Lazor R, *et al.* Normal Values of Nasal nitric oxide measured with a handheld analyzer in adults. *Service de Pneumologie du CHUV* 2015 (données internes, non publiées).
16. Fitzgerald JE, King Jr TE, Lynch DA, *et al.* Diffuse panbronchiolitis in the United States. *Am J Respir Crit Care* 1996; 154(2): 497 – 503.
17. Barbato A, Frischer T, Kuehni CE, *et al.* Primary ciliary dyskinesia: a consensus statement on diagnostic and treatment approaches in children. *Eur Respir J* 2009; 34: 1264-76.
18. Lundberg JO, Nordvall SL, Weitzberg E, *et al.* Exhaled nitric oxide in pediatric asthma and cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1996; 75: 323 – 326.
19. Lundberg JO, Weitzberg E, Rinder J, *et al.* Calcium-independent and steroid-resistant nitric oxide synthase activity in human paranasal sinus mucosa. *Eur Respir J* 1996; 9(7): 1344 – 1347.
20. Boon M, Meyts I, Proesmans M, *et al.* Diagnostic accuracy of nitric oxide measurements to detect primary ciliary dyskinesia. *Eur J Clin Invest* 2014; 44(5): 477 – 485.

21. De Winter-de Groot KM, Noman SVH, Speleman L, *et al.* Nasal nitric oxide levels and nasal polyposis in children and adolescents with cystic fibrosis. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 2013; 139 (9): 931 – 936.
22. Michl RK, Hentschel J, Fischer C, *et al.* Reduced nasal nitric oxide production in cystic fibrosis patients with elevated systemic inflammation markers. *PloS one* 2013; 8(11): e79141.
23. Grasemann H, Ioannidi I, Tomkiewicz RP, *et al.* Nitric oxide metabolites in cystic fibrosis lung disease. *Arch Dis Child* 1998; 78(1): 49 – 53.
24. Ho LP, Innes JA & Greening G AP. Nitrite levels in breath condensate of patients with cystic fibrosis is elevated in contrast to exhaled nitric oxide. *Thorax* 1998; 53(8): p. 680 – 684.
25. Morgan K, Habib S & Gruenert DC. Lack of inducible nitric oxide synthase in bronchial epithelium: a possible mechanism of susceptibility to infection in cystic fibrosis. *J Pathol* 1998; 184: 323 – 331.
26. Steagall WK, Elmer HI, Brady KG, *et al.* Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator–dependent regulation of epithelial inducible nitric oxide synthase expression. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000; 22(1): 45 – 50.
27. Schwiebert LM, Estell K & Propst SM. Chemokine expression in CF epithelia: implications for the role of cftr in rantes expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 1999; 276(3): c700 - c710.
28. Weber AJ, Soong G, Bryan R, *et al.* Activation of NF-κB in airway epithelial cells is dependent on CFTR trafficking and Cl<sup>-</sup> channel function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281(1): L71 - L78.
29. Colantonio D, Brouillette L, Parikh A, *et al.* Paradoxical low nasal nitric oxide in nasal polyposis. *Clin Exp Allergy*, 2002; 32(5): 698 – 701.
30. Pifferi M, Bush A, Caramella D, *et al.* Agenesis of paranasal sinuses and nasal nitric oxide in primary ciliary dyskinesia. *Eur Resp J* 2011; 37(3): 566 – 571.
31. Orlandi RR. & Wiggins RH. Radiological sinonasal findings in adults with cystic fibrosis. *Am J Rhinol Allergy* 2009; 23(3): 307 – 311.

32. Pifferi M, Bush A, Maggi F, et al. Nasal nitric oxide and nitric oxide synthase expression in primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J* 2011; 37: 572 – 7.

33. Corbelli R, Bringolf-isler B, Amacher A, et al. Nasal nitric oxide measurements to screen children for primary ciliary dyskinesia. *CHEST Journal* 2004; 126(4): 1054 – 1059.

## 7. Remerciements

Au terme de ce travail de master, nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à son élaboration.

Nous tenons à remercier Mme Marie Hofer qui, en tant qu'infirmière spécialiste de la mucoviscidose, s'est montrée disponible pour réaliser des mesures sur les patients atteints de mucoviscidose à l'Hôpital de Morges. Nos remerciements s'adressent également à Mme Morgane Meire-Brand, Mme Delphine Grobety et Mme Magali Bilien pour leur gentillesse et leur disponibilité, malgré leurs charges professionnelles. Nous exprimons notre gratitude aussi à M. Faouzi et M. Aeschlimann pour nous avoir aidés à effectuer l'analyse statistique. Nous adressons enfin nos plus sincères remerciements à toutes les personnes ayant accepté de participer à l'étude.

Un grand MERCI à toutes et à tous!