

## Effets de polymorphismes génétiques d'enzymes anti-oxydantes sur les modifications de la fonction ventilatoire induite par l'ozone

### **Effects of antioxidant enzyme polymorphisms on ozone-induced lung function changes**

Chen C, Arjomandi M, Tager IB, Holland N, Balmes JR.

*Eur Respir J.* 2007;30(4):677-83.

Analyse commentée par

Alain Person<sup>1</sup> et Estelle Rage<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire d'Hygiène de la Ville de Paris (LHVP), Paris

<sup>2</sup> Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm) U780, Villejuif

### ■ Contexte

L'ozone (O<sub>3</sub>) est un composant gazeux majeur de la pollution atmosphérique, dont les propriétés oxydantes sont connues pour causer des dommages au niveau des voies aériennes respiratoires de l'homme par la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). L'organisme met en jeu un système d'enzymes anti-oxydantes pour lutter contre les agents oxydants et peut se trouver en situation de stress oxydant contribuant au mécanisme physiopathologique des maladies respiratoires, lorsque ce système anti-oxydant est submergé par les ROS. La réponse du système anti-oxydant est en partie déterminée génétiquement. Cette variabilité génétique pourrait jouer un rôle dans les

réponses de l'appareil respiratoire à l'ozone (fonction ventilatoire, inflammation)

### ■ Résumé de l'étude

#### Objectifs

L'objectif de cette étude était de déterminer si le polymorphisme génétique des enzymes anti-oxydantes Gluthation S-Transférase (GSTM1 et GSTP1) et nicotinamide quinone oxidoreductase (NQO1) influe sur le risque de modification de la fonction ventilatoire en réponse à une exposition chronique à l'O<sub>3</sub>.

#### Matériels et méthodes

##### Population

210 étudiants californiens âgés de 16 à 19 ans ont été sélectionnés en 2000, 2001 et 2002, au cours de trois périodes de 2 à 4 mois se terminant la première semaine de juin. Ainsi, les sujets n'étaient pas exposés aux concentrations estivales d'O<sub>3</sub> préalablement aux tests spirométriques. Quatre critères de sélection devaient être remplis : avoir toujours vécu à Los Angeles ou dans

la baie de San Francisco, n'avoir jamais fumé, n'avoir aucun antécédent de maladies respiratoire, n'avoir aucun handicap physique pouvant interférer avec la mesure de la fonction ventilatoire.

### Estimation de l'exposition à la pollution

L'exposition cumulative de chaque étudiant a été reconstituée pour l'ozone ( $O_3$ ), le dioxyde d'azote ( $NO_2$ ) et la concentration pondérale des particules en suspension de diamètre aérodynamique inférieur ou égal à  $10 \mu m$  ( $PM_{10}$ ). Les auteurs n'explicitent pas la démarche complète de l'évaluation de l'exposition individuelle aux différents polluants. Celle-ci a fait l'objet de publications antérieures. Ils rappellent brièvement que deux approches ont été testées pour modéliser l'exposition cumulée à  $O_3$ ,  $NO_2$ ,  $PM_{10}$  et que les associations obtenues entre exposition à  $O_3$  et fonction ventilatoire n'étaient pas significativement différentes selon les approches. Dans le cas présent, les auteurs utilisent une simple démarche écologique basée sur un modèle d'interpolation spatiale utilisant les concentrations mensuelles des polluants mesurés dans l'air extérieur, en sites fixes, à proximité des lieux d'habitation (données fournies par le California Air Resources Board). Pour chaque domicile, le calcul a été effectué en utilisant trois sites au maximum, éloignés au plus de 50 km du domicile des sujets. La contribution de chaque station a été pondérée selon l'inverse de sa distance au domicile. Par référence aux articles publiés précédemment, il est vraisemblable que l'exposition cumulée à  $O_3$  a été calculée en ne retenant que la plage de 10 à 18 heures correspondant à la période d'ensoleillement pendant laquelle les niveaux sont significatifs au cours de la journée.

### Spirométrie

La fonction ventilatoire était évaluée par la mesure de la capacité vitale forcée (CVF), du volume maximal expiratoire par seconde (VEMS), du débit expiratoire médian ( $DEM_{25-75}$ ) et du débit expiratoire maximal à 75 % de la CVF ( $DEM_{75}$ ) et à 25 % de la CVF ( $DEM_{25}$ ).

### Génotypage

Le génotypage de GSTM1, GSTP1 et NQO1 a été réalisé selon des techniques d'amplification en chaîne par polymérase (PCR). La fréquence allélique de GSTM1, GSTP1 et NQO1 respectait l'équilibre de Hardy-Weinberg.

### Analyses statistiques

Le codage des génotypes était le suivant : GSTM1=0 (homozygote pour l'allèle sauvage) et GSTM1=1 (hétérozygote ou homozygote pour l'allèle variant - expression nulle-); GSTP1=0 (homozygote pour l'allèle sauvage Ile105) et GSTP1=1 (hétérozygote ou homozygote pour l'allèle variant Val105). Pour les sujets GSTM1=1, une combinaison était considérée : GSTM1=1/NQO1=0 (homozygote pour l'allèle sauvage

Pro187) et GSTM1=1/NQO1=1 (hétérozygote ou homozygote pour l'allèle variant Ser187).

Les relations entre les paramètres de la fonction ventilatoire, le génotype et l'exposition à l'ozone ont été évaluées à l'aide de modèles de régression logistique multivariée. Les analyses ont été stratifiées sur le sexe. Des transformations logarithmiques ont été réalisées pour tous les paramètres de la fonction ventilatoire à l'exception du VEMS.

Les modèles finaux incluaient la taille, le poids, l'ethnie, le génotype et l'exposition durant la vie à  $O_3$ ,  $NO_2$  et  $PM_{10}$ . Pour l'étude des effets du polymorphisme génétique et de l'exposition à l'ozone sur la fonction ventilatoire, le modèle final incluait en plus un terme d'interaction entre  $O_3$  et rapport  $DEM_{25-75}/CVF$ .

### Résultats

Parmi les 210 sujets, environ 43 % étaient des hommes et environ 60 % des étudiants avaient vécu plus longtemps dans la région de Los Angeles que dans celle de San Francisco. L'exposition cumulée à  $O_3$ ,  $NO_2$ , et  $PM_{10}$  n'était pas considérée significativement différente selon le sexe. Les plages des valeurs d'exposition estimées pour  $O_3$  étaient respectivement de 28 à  $118 \mu g/m^3$  pour les hommes (moyenne :  $74 \mu g/m^3$ ) et de 52 à  $88 \mu g/m^3$  pour les femmes (moyenne :  $66 \mu g/m^3$ ).

### Effet du génotype sur la fonction ventilatoire

Chez les hommes, le génotype GSTM1=1 était significativement associé à une diminution du  $DEM_{25-75}$  ( $-98 mL.s^{-1}$  IC95 % [-15;-181]), ainsi qu'à une diminution du  $DEM_{25}$  ( $-133 mL.s^{-1}$  [-27;-240]). En revanche, la combinaison GSTM1=1/NQO1=0 n'était pas significativement associée au  $DEM_{25-75}$  ni au  $DEM_{25}$ . Chez les femmes, aucune association n'était observée entre le génotype GSTM1=1 et le  $DEM_{25-75}$  ou le  $DEM_{25}$ . En revanche, la combinaison GSTM1=1/NQO1=0 était significativement associée à une diminution du  $DEM_{25-75}$  ( $-136 mL.s^{-1}$  [-29;-243]) et du  $DEM_{25}$  ( $-125 mL.s^{-1}$  [-2;-253]).

Aucune association n'était observée entre le VEMS et les génotypes GSTM1=1 ou la combinaison GSTM1=1/NQO1=0, quel que soit le sexe.

Le génotype GSTP1=1 n'était pas significativement associé à la diminution du  $DEM_{25-75}$ , ni du  $DEM_{25}$  chez les hommes, alors que chez les femmes, on observait une tendance à l'augmentation de ces paramètres.

### Effet du génotype et de l'exposition à l'ozone sur la fonction ventilatoire durant la vie

Concernant le génotype GSTM1=1 et la combinaison GSTM1=1/NQO1=0, seule une association significative était observée entre la diminution du  $DEM_{25-75}$  et l'exposition à l' $O_3$  chez les femmes génotypées GSTM1=1/NQO1=0.

Concernant le génotype GSTP1=1, aucune association n'était observée chez les femmes. En revanche, un risque plus élevé de diminution du  $DEM_{25-75}$  ( $p < 0,11$ )

et du  $DEM_{25}$  ( $p < 0,04$ ) liées à l'exposition à l' $O_3$  était observé chez les hommes : une exposition chronique de  $34 \mu\text{g}/\text{m}^3$  d' $O_3$  était associée à une diminution du  $DEM_{25}$  de  $20 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$  [-18;-22] parmi les sujets génotypés  $GSTP1=0$ , alors que la diminution observée du  $DEM_{25}$  était de  $28 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$  [-26;-30] parmi les sujets génotypés  $GSTP1=1$ .

### Discussion et conclusions des auteurs

Les auteurs soulignent qu'un nouveau résultat était mis en évidence avec l'observation d'un risque plus élevé de présenter une fonction ventilatoire diminuée liée à l'exposition durant la vie à l' $O_3$ , pour les hommes génotypés  $GSTP1=1$  par rapport aux hommes  $GSTP1=0$ .

Les auteurs confrontent leurs résultats à deux études qui montraient une association entre l'exposition aiguë à l' $O_3$  et la diminution de la fonction ventilatoire ou la modification de marqueurs du stress oxydant, à la fois chez des sujets hommes et femmes génotypés  $GSTM1=1/NQO1=0$ . Les auteurs n'observaient d'association entre le  $DEM_{25-75}$  et l'exposition à l' $O_3$  que parmi les femmes génotypées  $GSTM1=1/NQO1=0$ . Ils expliquent ce manque de concordance de résultats concernant les hommes par des différences liées au recrutement de la population (durée de l'exposition aiguë ou chronique à l' $O_3$ , taille de la population, ethnique).

Les auteurs discutent ensuite des limitations de l'étude. Ils expliquent que l'étude manque de puissance statistique pour aboutir à des conclusions définitives. Une seconde limitation était liée au fait que d'autres gènes pourraient être impliqués dans la détermination de la susceptibilité à l'exposition chronique à l' $O_3$ . Enfin les auteurs remarquent que la différence entre groupes ethniques aurait pu être mieux prise en compte par l'utilisation de marqueurs génétiques.

Les auteurs concluent que les résultats observés suggèrent que le polymorphisme génétique des enzymes anti-oxydantes intervenant dans la relation entre l'exposition à l' $O_3$  et la fonction ventilatoire est dépendant de facteurs liés au sexe. Ces résultats sont étayés, d'une part, par le fait que les adolescents en bonne santé de sexe masculin génotypés  $GSTP1=1$  présentaient plus de risque face aux effets délétères de l'exposition chronique à l' $O_3$  sur la diminution de la fonction ventilatoire ; d'autre part, les étudiantes génotypées  $GSTM1=1/NQO1=0$  avaient un risque plus élevé d'avoir un  $DEM_{25-75}$  diminué associé à l'exposition chronique à l' $O_3$ .

### ■ Commentaires et conclusions des analystes

D'un point de vue métrologique, estimer une exposition cumulée rétrospective conduit à des incertitudes importantes, quelle que soit la procédure. Les auteurs

ont reconstitué l'exposition à la pollution tout au long de la vie à partir de l'histoire résidentielle des sujets. Ils ont préféré utiliser une démarche simple, indicatrice de l'exposition aux polluants atmosphérique, basée sur des méthodes d'interpolation, sans tenir compte de facteurs importants tels que l'activité des sujets pendant la journée ou le temps passé à l'intérieur des locaux (domicile, écoles...). Dans une publication antérieure, les auteurs avaient testé un modèle d'exposition plus complexe qui tenait compte de l'activité physique, du temps passé à l'extérieur et à l'intérieur du domicile et de la réactivité de  $O_3$  dont les concentrations intérieures sont généralement inférieures à celles de l'air extérieur. En s'appuyant sur les résultats d'enquêtes régionales complétées par des questionnaires individualisés ciblés sur les étudiants sélectionnés, les auteurs avaient conclu à des valeurs d'exposition cumulées très différentes selon la stratégie choisie. En définitive, dans l'article présent, les auteurs ont fait le choix d'une démarche simplifiée, sans que le lecteur ne sache vraiment si la prise en compte d'un modèle plus complexe était susceptible de modifier les conclusions obtenues.

D'un point de vue statistique, les auteurs ont ajusté leurs analyses sur deux autres principaux polluants connus pour leurs propriétés oxydantes ( $NO_2$  et  $PM_{10}$ ). Le choix est contraint par les bases de données disponibles au début des années 1980. Dans l'hypothèse d'études à venir qui porteraient sur des années plus récentes, et sous réserve de disposer de données suffisamment représentatives, d'autres polluants irritants mériteraient d'être considérés (aldéhydes, peroxy alkyl nitrates, acide nitrique...). La prise en compte des particules pourrait aussi être améliorée en ciblant des fractions granulométriques de taille inférieure (ex :  $PM_{2,5}$ ).

D'autres aspects pouvant influencer sur la validité des associations statistiques méritent d'être signalés, tel que le tabagisme passif dont de nombreux travaux suggèrent une altération des voies respiratoires, en particulier chez les enfants. La population d'étudiants est constituée de deux sous-groupes d'origines ethniques contrastées qui ont vécu dans des conditions d'environnement sensiblement différentes. D'après un article publié précédemment, les étudiants originaires de la région de Los Angeles ont été exposés à des niveaux d' $O_3$  environ deux fois supérieurs à ceux qui ont habité dans la région de San Francisco. Si le protocole d'étude mentionne bien un ajustement par rapport au groupe ethnique des individus, il ne semble pas a priori que la localisation géographique ait été introduite comme paramètre du modèle de régression.

Les résultats apportés par cet article sont novateurs car, d'une manière générale, peu d'études épidémiologiques ont porté sur les effets de l'exposition chronique à l' $O_3$  sur la fonction ventilatoire, ni sur le rôle des polymorphismes génétiques des enzymes anti-oxydantes. Plus spécifiquement, aucune étude n'avait considéré le polymorphisme génétique  $GSTP1$  pour analyser les

relations entre la fonction ventilatoire et  $O_3$  chez des sujets non asthmatiques. Les études portant sur les génotypes GSTM1 et GSTM1/NQO1 n'avaient porté, comme le spécifient à juste titre les auteurs, que sur de faibles effectifs et sur une exposition à court terme. Néanmoins la conclusion concernant la diminution

du  $DEM_{25}$  associée à l' $O_3$  observée chez les hommes GSTP1=1 aurait pu être nuancée, une diminution du  $DEM_{25}$ , bien que moins importante, étant également observée chez les hommes GSTP1=0. Ainsi des études ultérieures sont nécessaires pour confirmer ces résultats.