

MARIE-CLAIRE ROUSSEAU

**RELATIONS ENTRE L'INFLAMMATION DES VOIES
AÉRIENNES SUPÉRIEURES ET INFÉRIEURES**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en médecine expérimentale
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2010

Résumé

Les travaux présentés consistaient à étudier l'impact de l'inflammation des voies aériennes supérieures sur l'inflammation des voies aériennes inférieures, grâce à un modèle de provocations allergéniques nasales multiples.

Dans la première partie, une revue de littérature a été effectuée pour repérer des instruments validés pour l'évaluation des symptômes lors de provocations allergéniques nasales. Aucun instrument validé n'a été trouvé, démontrant la difficulté de comparer les études portant sur ce sujet.

Dans la deuxième partie, les réponses physiologiques et inflammatoires suite à des provocations allergéniques nasales multiples chez des sujets rhinitiques avec ou sans asthme ont été comparées. Chez les sujets non-asthmatiques, nous avons noté un écoulement nasal plus important que chez les sujets asthmatiques quoique ces derniers avaient davantage d'obstruction nasale. Une augmentation de l'inflammation des voies aériennes supérieures après 4 jours de provocations antigéniques a été observée dans les 2 groupes, mais sans induire d'augmentation significative de l'inflammation des voies aériennes inférieures.

Nous avons noté une insuffisance de standardisation des études portant sur les provocations nasales. Un modèle de provocation allergénique nasale a ensuite été développé pour comparer les réponses physiologiques et inflammatoires de sujets rhinitiques avec ou sans asthme et des différences ont été notées entre les deux groupes étudiés pour ce qui est de ces dernières caractéristiques. Des études additionnelles sont requises afin de déterminer quelles seraient les méthodes optimales de provocation nasale afin de pouvoir mieux comparer les études entre elles, de mieux standardiser ces méthodes et ainsi aider à comprendre l'impact de la rhinite allergique sur l'asthme.

Abstract

This project aimed to study the impact of upper airways inflammation on lower airways inflammation, using a repeated nasal allergen challenge model.

In the first part, the published literature was reviewed looking for instruments with a reported validation process that evaluated symptoms during nasal allergen challenges. No validated instrument was found, demonstrating the difficulty to compare studies on this topic.

In the second part, a comparison of the physiological and inflammatory responses following repeated nasal allergen challenges in rhinitic subjects with or without asthma was done. Non-asthmatic subjects had a higher level of rhinorrhea and nasal obstruction was more important in asthmatic subjects. An increase in upper airways inflammation was observed after 4 days of nasal allergen challenges in the 2 groups, without inducing a significant increase in lower airway inflammation.

A lack of standardization of studies on nasal allergen challenges was observed. Then, a nasal allergen challenge model was developed to compare physiological and inflammatory responses of rhinitic subjects with or without asthma. Between groups, a different physiological response was observed, although there were no differences in the inflammatory response. Improvements in the method of nasal bronchoprovocation and their standardization should allow to better compare studies and increase our understanding of the impact of allergic rhinitis on asthma.

Avant-propos

Tout d'abord, j'aimerais remercier Dr Louis-Philippe Boulet, mon directeur de maîtrise, de m'avoir fait confiance et de m'avoir acceptée dans son équipe de recherche. Il a été un modèle de professionnalisme pour moi et influencera sans aucun doute de façon positive ma future carrière. Grâce à lui, j'ai pu réaliser cette belle aventure et je lui en suis grandement reconnaissante.

Marie-Ève Boulay, professionnelle de recherche, m'a encadrée d'une façon exceptionnelle pendant mes études. Elle m'a fait découvrir le monde de la recherche et m'a donné le goût de continuer dans cette voie. Elle a fait preuve d'une grande générosité de son temps pour répondre à mes milliers de questions, sans jamais démontrer d'impatience. J'ai adoré sa façon de travailler, et je peux affirmer qu'elle influence grandement le travail que j'effectue aujourd'hui. Philippe Prince, professionnel de recherche, a également été très important pour moi. Il était toujours là pour m'aider, pas une seule fois sa porte ne m'a été fermée. Il m'a fourni de judicieux conseils tant sur le plan personnel que professionnel. Merci beaucoup à vous deux.

J'aimerais remercier les infirmières de l'équipe, qui m'ont accueillie chaleureusement et avec qui j'ai eu de très belles expériences de travail. Merci aussi à Mylène Bertrand, qui m'a appris des techniques de laboratoire et qui a participé à la réalisation de mon projet. J'aimerais aussi remercier Christine Racine et Sabrina Biardel pour leur dynamisme et leur support.

Bien-sûr, j'ai eu la chance de croiser le chemin de plusieurs étudiants, qui m'ont tous appris un petit quelque chose à leur façon. Je pense notamment ici à Julie St-Laurent, Julie Turmel, Marie-Ève Ducharme, Andréa Lessard, Marie-Ève Doucet, Akli Zetchi et Valérie Bougault. Sans vous cette aventure n'aurait pas été aussi agréable.

Merci également aux sujets ayant participé à mon projet de recherche pour leur temps, sans eux la science ne pourrait progresser à ce rythme.

Finalement, je remercie mes parents de m'avoir toujours encouragée à poursuivre mes études, d'avoir eu confiance en mes choix de carrière et de m'avoir continuellement soutenue. Bien-sûr, merci à Jean-Sébastien d'être toujours là pour moi.

Table des matières

Résumé.....	II
Abstract	III
Avant-propos.....	IV
Table des matières	V
Liste des figures.....	VIII
Liste des tableaux.....	IX
Liste des abréviations	X
CHAPITRE I.....	1
INTRODUCTION.....	1
1.1 Asthme.....	2
1.1.1 Définition	2
1.1.2 Prévalence et impact économique	2
1.1.3 Facteurs de risque.....	3
1.1.4 Description clinique.....	4
1.1.5 Diagnostic.....	6
1.1.6 Pathophysiologie.....	8
1.1.6.1 Hyperréactivité bronchique.....	8
1.1.6.2 Histologie	8
1.1.6.3 Inflammation	9
1.1.6.3.1 Cellules inflammatoires	12
1.1.6.3.1.1 Éosinophile.....	12
1.1.6.3.1.2 Neutrophile.....	13
1.1.6.3.1.3 Mastocyte	14
1.1.6.3.1.4 Macrophage alvéolaire	14
1.1.6.3.1.5 Lymphocyte.....	15
1.1.6.3.1.6 Cellule épithéliale.....	16
1.1.6.3.1.7 Muscle lisse bronchique.....	16
1.1.6.4 Remodelage.....	17
1.2 Rhinite allergique.....	17
1.2.1 Définition	17
1.2.2 Prévalence et impact économique	18
1.2.3 Description clinique.....	18
1.2.4 Diagnostic.....	19
1.2.5 Pathophysiologie.....	20
1.2.5.1 Réaction inflammatoire.....	20
1.3 Relations entre l'asthme et la rhinite allergique	22
1.3.1 Évidences épidémiologiques.....	22
1.3.2 Évidences physiopathologiques.....	23
1.3.3 Évidences thérapeutiques.....	24

1.4 Provocations allergéniques	25
1.4.1 Provocations allergéniques bronchiques	25
1.4.2 Provocations allergéniques nasales	26
1.5 Problématique	27
1.6 Hypothèses	27
1.7 Buts	28
 CHAPITRE 2	 29
Review of Symptoms Assessment During Nasal Allergen Provocation in Patients with Allergic Rhinitis	29
Mise en contexte de l'étude	30
Implication des auteurs	31
ABSTRACT	34
INTRODUCTION.....	35
METHODS	35
RESULTS.....	37
DISCUSSION	38
CAPTIONS	40
References	43
 CHAPITRE 3	 54
Comparative Responses to Nasal Allergen Challenge in Allergic Rhinitic Subjects With or Without Asthma À soumettre	54
Mise en contexte de l'étude	55
Implication des auteurs	56
ABSTRACT	58
INTRODUCTION.....	59
METHODS	60
RESULTS.....	65
DISCUSSION	66
ACKNOWLEDGMENTS	69
CAPTIONS	72
References	75

CHAPITRE 4	78
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	78
4.1 Résumé	79
4.2 Discussion	80
4.3 Perspectives	80
RÉFÉRENCES	82

Liste des figures

Figure 1 : Score de maîtrise de l'asthme.....	5
Figure 2 : Comparaison de la muqueuse bronchique d'un sujet sain et d'un sujet asthmatique.....	9
Figure 3 : Réaction inflammatoire induite par les allergènes.....	11
Figure 4 : Pathophysiologie de la rhinite allergique.....	21
Figure 5 : Influence potentielle de l'inflammation nasale sur l'inflammation bronchique.....	24

Chapitre 2

Figure 1 : Details of the literature search results.....	41
Figure 2 : Characteristics of the tools assessing allergic rhinitis symptoms.....	42

Chapitre 3

Figure 1 : Study design.....	73
Figure 2 : Effect of nasal challenge with saline (control day) or allergen (days 1-4) on NBI for rhinitics (a) and asthmatics (b) at 0 min and over 7 hours post-challenge.....	74

Liste des tableaux

Chapitre 3

Tableau 1 : Characteristics of subjects..... 70

**Tableau 2 : Inflammatory parameters following nasal control challenge, and 1 and
4 days of nasal allergen challenges..... 71**

Liste des abréviations

A	Rhinitic subject with asthma
ARIA	<i>Allergic rhinitis and its impact on asthma</i>
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
CAM	Molécule d'adhésion cellulaire (<i>Cell adhesion molecule</i>)
CP ₂₀	Dose de méthacholine requise pour causer une chute de 20% du VEMS
D-PBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
ECP	<i>Eosinophilic cationic protein</i>
F	<i>Female</i>
FVC	<i>Forced vital capacity</i>
FEV ₁	<i>Forced expiratory volume in one second</i>
GM-CSF	Facteur de stimulation de colonies de granulocytes-monocytes (<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>)
ICAM-1	Molécule d'adhésion intracellulaire-1 (<i>Inter-cellular adhesion molecule 1</i>)
IgE	Immunoglobuline E
IL	Interleukine
MCP	<i>Monocyte chemoattractant protein</i>
M	<i>Male</i>
MMP	<i>Metalloproteinase</i>
MPOC	Maladie pulmonaire obstructive chronique
NAC	<i>Nasal allergen challenge</i>
NBI	<i>Nasal blockage index</i>
NPIF	<i>Nasal peak inspiratory flows</i>
NPT	<i>Nasal provocation test</i>
PAF	Facteur d'activation plaquettaire (<i>Platelet-activating factor</i>)
PC ₂₀	<i>Provocative concentration of methacholine causing a 20% fall in FEV₁</i>
PEF	<i>Peak expiratory flow</i>
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
R	<i>Rhinitic subject without asthma</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
TGF- β	Facteur de croissance transformant- β (<i>Transforming growth factor-β</i>)
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF- α	Facteur de nécrose de tumeurs- α (<i>Tumor necrosis factor-α</i>)
VAS	<i>Visual analog scale</i>
VCAM-1	Molécule d'adhésion vasculaire-1 (<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>)
VEMS	Volume expiratoire maximal en 1 seconde

CHAPITRE I
INTRODUCTION

1.1 Asthme

1.1.1 Définition

L'asthme est une maladie chronique des voies aériennes dont les principaux symptômes sont la toux, les sifflements, la production exagérée de mucus, l'oppression thoracique et la dyspnée. D'un point de vue physiologique, l'asthme se caractérise par une obstruction bronchique variable et une hyperréactivité des voies respiratoires à divers stimuli. Les voies aériennes de sujets asthmatiques présentent également une inflammation, qui contribue à la pathophysiologie de la maladie, mais également à sa persistance [1]. Ces caractéristiques interagissent et contribuent à l'apparition et au maintien des symptômes d'asthme. Leur amplitude peut toutefois varier d'un asthmatique à l'autre et chez un même sujet au cours de sa vie. Cette maladie ne se guérit pas, mais il est possible d'apprendre à la maîtriser et la traiter afin de minimiser ses conséquences, réduire le risque d'exacerbations et ainsi améliorer la qualité de vie des sujets.

1.1.2 Prévalence et impact économique

Dans le monde, la prévalence de l'asthme s'élève à plus de 300 millions de personnes et n'a cessé d'augmenter au cours des dernières décennies. En tenant compte de l'accroissement de la population mondiale, il est estimé que 100 millions de personnes de plus souffriront d'asthme d'ici 2025 [2]. Au Canada uniquement, selon des données obtenues par Statistique Canada en 2005, 8,3% de la population âgée de 12 ans et plus avaient reçu un diagnostic d'asthme d'un professionnel de la santé [3].

Puisque l'asthme est une maladie touchant un grand nombre de personnes, elle engendre des coûts de santé énormes. En effet, en ne considérant que les coûts directs associés à la maladie, qui englobent les frais du personnel médical, les séjours et les visites en milieu hospitalier, les traitements, les tests diagnostiques, la recherche et l'éducation, le montant était estimé entre 306 et 405 millions de dollars en 1990 au Canada [4]. Pour ce qui est des coûts indirects liés aux absences en milieu de travail, à l'incapacité à

s'acquitter des tâches domestiques, à la mortalité et à l'invalidité à long terme, les coûts pour le Canada en 1990 étaient encore plus importants, représentant une somme évaluée entre 504 et 648 millions de dollars [4]. Une étude effectuée aux États-Unis, publiée en 2003, et évaluant les coûts associés à l'asthme par personne, rapportait une moyenne s'élevant à plus de 4 900 dollars par année. D'après cette étude, le coût des traitements pharmaceutiques représentait la dépense directe la plus importante, soit en moyenne 1 605 dollars par année par personne [5].

1.1.3 Facteurs de risque

Les facteurs étiologiques impliqués dans le développement de l'asthme sont encore aujourd'hui méconnus. Cependant, la recherche dans ce domaine a permis de cibler les facteurs qui contribuent à son développement. Les principaux facteurs prédisposant comprennent l'atopie, la génétique et le sexe [1]. En effet, les sujets atopiques ont plus de risques que les sujets non-atopiques de développer de l'asthme au cours de leur vie. Appuyant cette affirmation, Settupane *et al.* ont effectué un suivi chez des sujets pour lesquels ils avaient réalisé un test d'allergie cutané 23 ans plus tôt. Ils ont observé que pour les sujets ayant eu un test initial positif, la probabilité qu'ils aient développé de l'asthme au cours de cette période était 3 fois plus grande que pour les sujets ayant eu un test cutané initial négatif [6].

Le bagage génétique a également une influence sur les probabilités d'un sujet de souffrir d'asthme. Le fait d'avoir un parent proche souffrant d'asthme augmente ainsi de 2 à 4 fois les risques d'être soi-même atteint par cette maladie [7]. L'étude des gènes impliqués dans la maladie reste toutefois complexe pour plusieurs raisons [8]. Tout d'abord, de nombreux gènes semblent impliqués et il est difficile de tous les identifier. Il est également laborieux de déterminer les mécanismes sous-jacents aux différents phénotypes, considérant l'hétérogénéité de la maladie. En effet, les études effectuées dans le passé ont eu de la difficulté à établir un lien évident entre le génotype des patients et le phénotype observé. Finalement, le rôle de l'interaction entre l'environnement et la variation du bagage génétique dans le développement de l'asthme est complexe, car il faut tenir compte de plusieurs facteurs environnants, mais également de plusieurs gènes. Malgré ces difficultés, certains gènes ont été identifiés comme étant particulièrement impliqués dans la susceptibilité à développer de l'asthme,

dont ADAM33, DPP10, PHF11 et GPRA [9]. Le gène ADAM33 aurait un rôle à jouer dans le remodelage bronchique par les fibroblastes et dans l'hyperréactivité des muscles lisses bronchiques [10]. Pour ce qui est du DPP10, du PHF11 et du GPRA, ils interviendraient au niveau de l'immunorégulation de la maladie [11-13].

Le sexe du sujet est également un facteur prédisposant important dans la pathologie de l'asthme. En effet, jusqu'à l'âge de 16 ans, la prévalence de l'asthme est plus élevée parmi les garçons comparativement aux filles [14]. Pendant l'enfance, les garçons sont 2 fois plus susceptibles d'être touchés par cette maladie comparativement aux filles. Cependant, à l'âge adulte, l'opposé peut être observé alors que la prévalence d'asthme est plus importante parmi les femmes que les hommes. Le sexe féminin devient alors un facteur de risque important dans le développement de la maladie.

Certains facteurs environnementaux peuvent également intervenir dans l'accroissement du risque de développer de l'asthme [15]. Parmi ceux-ci, notons que les enfants ayant un poids à la naissance inférieur à 2,5 kg sont plus susceptibles, ainsi que ceux ayant présenté des infections respiratoires en bas âge. Le style de vie d'une personne peut également influencer le développement de l'asthme. En effet, les sujets qui fument, qui ont déjà fumé ou qui sont exposés à la fumée secondaire sont plus susceptibles, ainsi que ceux ayant une surcharge pondérale. L'environnement de travail peut également devenir un facteur de risque si le sujet y est exposé à des particules telles que la poussière, la fumée ou certaines vapeurs, mais surtout si exposé à des substances sensibilisantes.

1.1.4 Description clinique

Les manifestations cliniques de l'asthme peuvent se traduire par divers symptômes (voir Section 1.1.1), des perturbations du sommeil, une limitation des activités quotidiennes, une diminution de la fonction pulmonaire et l'utilisation d'une médication de secours [16]. Cependant, il est possible de s'assurer d'un bon contrôle de ces manifestations en traitant la maladie de façon adéquate, en éduquant le patient pour s'assurer qu'il comprenne bien sa maladie et en minimisant les contacts avec divers facteurs déclenchant.

Un contrôle optimal de l'asthme serait atteint si le patient ne présentait plus de symptômes respiratoires et qu'il n'avait plus besoin d'utiliser une médication de secours tel qu'un bronchodilatateur. Cependant, il n'est pas possible d'atteindre cet état chez tous les asthmatiques. Afin de quantifier le contrôle (maîtrise) de l'asthme, Boulet *et al.* ont développé un outil, présenté à la Figure 1, permettant d'obtenir un score de maîtrise de l'asthme en pourcentage [17].

Maîtrise de l'asthme (au cours de la dernière semaine)

	25%	20%	15%	10%	5%	résultats
Symptômes de JOUR (jours par semaine)	0	1 - 3	4 - 6	7	sevère	
Symptômes de NUIT (nuits par semaine)	0	rarement	1 - 3	4 - 7	sevère	
β2-agonistes (doses par semaine)	0	1 - 3	4 - 6	1-3 d/j	≥ 4 d/j	
Activité physique (limitation)	aucune	très peu	un peu	modérée	sevère	
*excluant 1 dose/jour avant exercice						Score clinique (A) :

	100%	80%	60%	40%	20%	résultats
DEP prédite <input type="checkbox"/> (%) optimale <input type="checkbox"/>	≥ 90	80 - 89	70 - 79	61 - 69	≤ 60	
VEMS prédite <input type="checkbox"/> (%) optimale <input type="checkbox"/>	≥ 90	80 - 89	70 - 79	61 - 69	≤ 60	
ΔDEP quotidienne (%) DEP (max-min)/max x 100	≤ 10	11 - 15	16 - 20	21 - 24	≥ 25	
						Score physiologique (B)* :
						* Diviser par le nombre de paramètres utilisés

	100%	80%	60%	40%	20%	résultats
Éosinophiles dans l'expectoration (%)	0	< 2	2-5]	5-8]	> 8	
						Score inflammatoire (C) :

RÉSULTAT :	$[A() + B() + C()] \div N^{**} :$	
-------------------	--------------------------------------	--

** Nombre de sections utilisées

Figure 1 : Score de maîtrise de l'asthme. Outil permettant de quantifier le contrôle de l'asthme en se basant sur l'évaluation de facteurs cliniques, physiologiques et inflammatoires. Cet outil permet l'obtention d'un score final en pourcentage. *Adapté de Boulet LP et al., CHEST. 2002 ;122 :2217-2223 [17]*

Les exacerbations, chez les asthmatiques, sont susceptibles d'être déclenchées par divers facteurs, pouvant varier entre les sujets et également dans le temps. Parmi ceux-ci, les aéroallergènes peuvent être à l'origine de symptômes d'asthme si le sujet asthmatique y a été préalablement sensibilisé. Les aéroallergènes peuvent être classifiés en deux principales catégories, soient les allergènes domestiques et les allergènes saisonniers [18].

Les exacerbations peuvent également survenir lors d'infections respiratoires, créant une aggravation des symptômes d'asthme et une détérioration de la fonction respiratoire. Les principaux virus impliqués dans ces épisodes sont le virus respiratoire syncytial, le rhinovirus et les virus de l'influenza. Certaines bactéries peuvent également être à l'origine de ces exacerbations, telles que *Chlamydia pneumoniae* et *Mycoplasma pneumoniae* [19]. Plusieurs autres facteurs peuvent être impliqués, dont l'exercice, certains agents dans le milieu de travail, les variations de température, les polluants, la nourriture et les médicaments [1]. La maîtrise de l'asthme dépend donc également du niveau d'exposition à ces différents facteurs.

1.1.5 Diagnostic

Au cours des dernières années, de nombreuses discussions ont eu lieu quant à la façon de faire un diagnostic de l'asthme. La maladie étant hétérogène, des chemins différents peuvent conduire au diagnostic de la maladie par le clinicien. Au Canada, un groupe de spécialistes dans le domaine de l'asthme ont établi un consensus pouvant aider les cliniciens pour établir un diagnostic de la maladie approprié chez leurs patients [18].

Selon le consensus canadien, la présence d'asthme se manifeste par 3 principaux éléments, soient la présence de symptômes, une obstruction bronchique variable et une inflammation des voies aériennes [18]. Cependant, la confirmation du diagnostic ne requiert que les 2 premiers critères, l'évaluation de la présence d'inflammation n'étant d'ailleurs pas encore un test de routine lors de l'établissement du diagnostic de la maladie par le clinicien.

Les principaux symptômes rapportés par le patient sont la toux, les sifflements, la dyspnée et l'oppression thoracique [18]. Il est important de questionner le patient pour

bien caractériser ces symptômes, en établissant quels sont les facteurs déclenchants, à quel moment dans la journée ils surviennent et à quelle fréquence. D'autres conditions, le plus souvent d'origine allergique, peuvent être également observées chez ces patients, telles que la rhinite, la conjonctivite et l'eczéma. Ces conditions ne sont toutefois pas spécifiques à la maladie.

Pour évaluer la présence d'obstruction bronchique variable, différentes méthodes peuvent être utilisées [18]. Tout d'abord, la réversibilité de l'obstruction bronchique en réponse à un bronchodilatateur peut être évaluée. Pour cette technique, il s'agit d'effectuer une spirométrie avant et 15 minutes suivant l'inhalation d'un bronchodilatateur d'action rapide. La spirométrie est un test physiologique permettant d'évaluer les débits expiratoires et ainsi détecter une obstruction bronchique [20]. Plusieurs paramètres peuvent être caractérisés grâce à cette méthode, dont le volume expiratoire maximal en 1 seconde (VEMS), qui correspond au volume d'air expiré dans la première seconde d'une manoeuvre expiratoire forcée après inspiration maximale (à la capacité pulmonaire totale). Si la différence entre la valeur précédant et suivant la prise de bronchodilatateur est égale ou supérieure à 12%, la présence d'obstruction bronchique variable chez le patient peut être confirmée [18].

L'obstruction bronchique variable peut également être évaluée grâce à un appareil portatif servant à mesurer les débits respiratoires, dans ce cas-ci le débit expiratoire de pointe [18]. Ces mesures peuvent aider à déterminer la variation circadienne des débits expiratoires ou leur fluctuation avec le temps, dans lequel cas un changement de 20% est considéré significatif.

Finalement, divers tests de provocation bronchique peuvent identifier une hyperréactivité bronchique suggérant la présence d'asthme, un des plus fréquemment utilisés étant le test de provocation bronchique à la métacholine. Brièvement, la méthode consiste à faire inhaler des doses croissantes de métacholine et d'effectuer, entre chaque inhalation, une spirométrie. Cette procédure est répétée jusqu'à l'obtention d'une chute de 20% ou plus du VEMS, comparativement à la valeur initiale, qui correspond au VEMS obtenu après l'inhalation d'une solution saline. Un calcul est ensuite effectué pour déterminer la dose de métacholine requise pour causer une chute de 20% du VEMS (CP₂₀) [21]. D'après le consensus canadien sur l'asthme, une CP₂₀

inférieure à 4 mg/mL correspondrait à un test positif [22] alors qu'une zone grise existe entre 4 et 16 mg/mL.

1.1.6 Pathophysiologie

1.1.6.1 Hyperréactivité bronchique

L'hyperréactivité bronchique est une caractéristique importante de l'asthme. Il s'agit d'une réponse exagérée des bronches à un agent provocateur et qui résulte en une bronchoconstriction, causant les symptômes d'asthme. L'hyperréactivité bronchique peut être quantifiée avec le test de provocation à la métacholine, tel que décrit précédemment, ou encore en utilisant du mannitol, de l'histamine ou de l'adénosine monophosphate. L'utilisation de stimuli naturels peut également être considérée, en évaluant par exemple la réactivité bronchique à l'exercice. Dans le milieu de la recherche, les tests de réactivité bronchique peuvent servir à poser un diagnostic objectif d'asthme ou à évaluer l'efficacité de divers traitements [23].

1.1.6.2 Histologie

L'asthme est une maladie causant plusieurs changements histologiques typiques de la muqueuse bronchique. Les principaux changements observés sont une desquamation de l'épithélium, une hyperplasie des glandes à mucus, une fibrose sous-épithéliale, un infiltrat de cellules inflammatoires, une hyperplasie et une hypertrophie des muscles lisses bronchiques et des changements dans la vascularisation des tissus bronchiques (Voir Figure 2) [24].

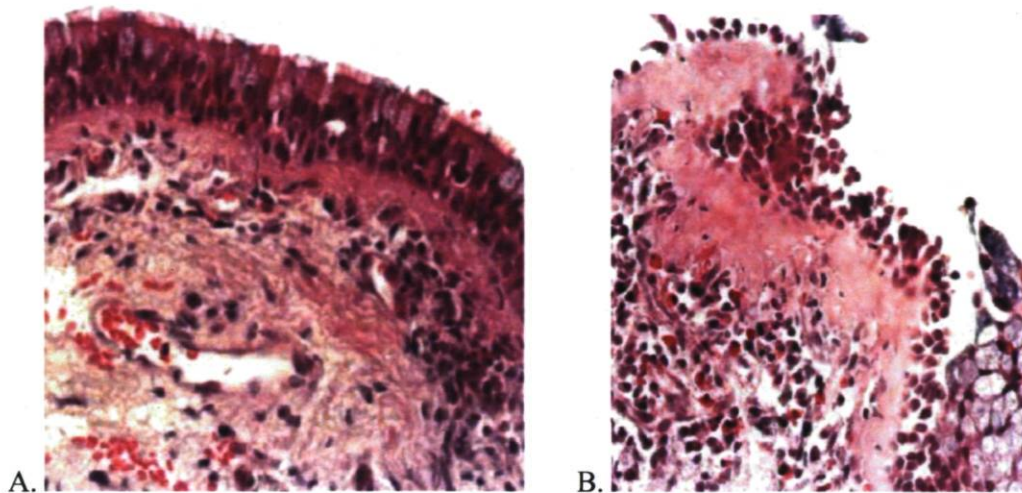


Figure 2 : Comparaison de la muqueuse bronchique d'un sujet sain et d'un sujet asthmatique. La muqueuse du sujet sain (A) est caractérisée par un épithélium intact et par un petit nombre de cellules à gobelet et de cellules inflammatoires. La muqueuse du sujet asthmatique (B) présente ici une accumulation de mucus, un épaissement de la membrane sous-épithéliale, une desquamation épithéliale et une infiltration de cellules inflammatoires. *Adapté de Hamid Q., J Allergy Clin Immunol. 2003 ;111(2) :431-432 [24]*

1.1.6.3 Inflammation

L'inflammation est une composante importante dans le développement et le maintien de l'asthme, et ce sont dans les années 1800 que les premiers liens avec la maladie ont été établis. Initialement, la composante inflammatoire de l'asthme était associée aux cas sévères, car les études étaient surtout effectuées chez des patients dont la maladie avait été fatale. Cependant, grâce au développement de la bronchoscopie, l'obtention de spécimens provenant de sujets vivants avec asthme moins grave a permis de démontrer que l'inflammation est une caractéristique universelle de l'asthme et qu'elle est présente également chez les sujets souffrant d'asthme léger et modéré [25].

L'inflammation est souvent présente à l'état basal, mais peut augmenter suite à un contact avec un facteur déclenchant se trouvant dans l'environnement, par exemple un allergène, et pour lequel le patient asthmatique développe une réponse immunitaire exagérée. Cette réponse immunitaire peut être associée à une chronicisation de la maladie. Différents médiateurs et cellules inflammatoires sont impliqués dans ce processus, conduisant à l'hyperréactivité bronchique et à l'apparition de symptômes

[26]. Puisque ces différents médiateurs et cellules inflammatoires interagissent grandement entre eux, l'inflammation dans l'asthme est un processus complexe qui n'est pas encore tout à fait bien compris. La Figure 3 présente un résumé des étapes impliquées dans l'inflammation induite par l'inhalation d'allergènes. Les prochains paragraphes décriront le rôle des principales cellules impliquées dans la réaction inflammatoire allergénique.

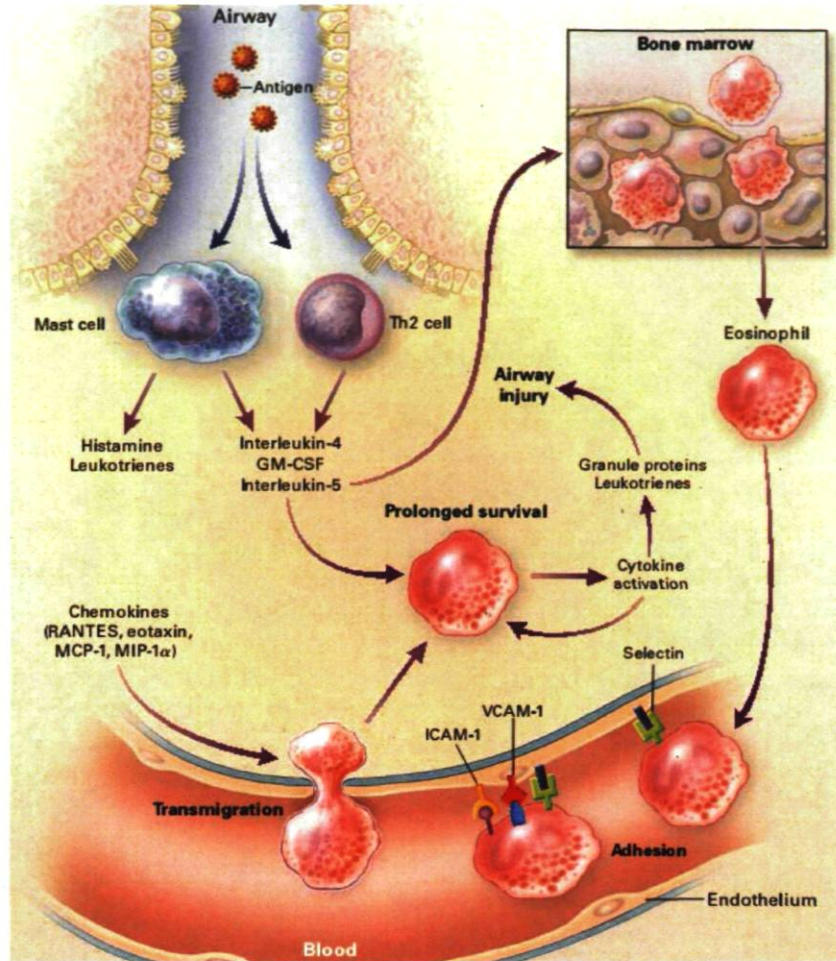


Figure 3 : Réaction inflammatoire induite par les allergènes. L'inhalation d'antigènes chez un sujet atopique active les mastocytes et les lymphocytes T, qui sécréteront des médiateurs favorisant la survie cellulaire et la production d'éosinophiles dans la moelle osseuse. L'interleukine-5 (IL-5) agit sur la moelle osseuse en induisant la différenciation des éosinophiles. Les éosinophiles traversent ensuite vers le système sanguin et migrent au site d'inflammation. Ils adhèrent à la surface grâce aux sélectines, molécules d'adhésion intracellulaires-1 (ICAM-1s) et molécules d'adhésion vasculaires-1 (VCAM-1s). Leur survie est prolongée par l'IL-5 et le facteur de stimulation de colonies de granulocytes-monocytes (GM-CSF). Les éosinophiles activés libèrent des médiateurs créant des dommages aux tissus environnants. Tiré de Busse W.W. et al., *N Engl J Med.* 2001; 344(5) :350-362 [27]

1.1.6.3.1 Cellules inflammatoires

1.1.6.3.1.1 Éosinophile

L'éosinophile est un leucocyte jouant plusieurs rôles clés dans la pathophysiologie de l'asthme. Plusieurs études ont démontré sa présence en nombre augmenté chez les sujets asthmatiques comparativement aux sujets contrôles, et ce tant dans les bronches que dans la circulation sanguine [28-30]. L'éosinophile, lorsqu'il est activé, libère des granules contenant plusieurs types de médiateurs, dont des facteurs de croissance fibrogéniques, des chimiokines, des médiateurs lipidiques, des protéines basiques et autres [31]. Ces médiateurs agissent sur divers aspects de la maladie, soient au niveau du remodelage, de l'hyperréactivité bronchique et des exacerbations.

Le rôle de l'éosinophile dans le remodelage bronchique et la physiopathologie des réactions asthmatiques a pu récemment être étudié grâce à une thérapie anti-IL-5, le mepolizumab. L'IL-5 est un médiateur impliqué entre autres dans la différenciation des éosinophiles dans la moelle osseuse. Suite au traitement, les auteurs ont remarqué une diminution non-significative des éosinophiles présents dans la muqueuse bronchique, conduisant tout de même à une diminution significative des protéines de la matrice extracellulaire [32]. Dans l'hyperréactivité bronchique, le rôle de l'éosinophile reste controversé. En effet, les résultats portant sur la corrélation entre le degré de réactivité bronchique et le nombre d'éosinophiles chez l'humain sont contradictoires [33-35] et le fait de bloquer l'IL-5 avec un anticorps monoclonal n'influence pas la réactivité bronchique [36]. Toutefois, plusieurs études effectuées chez les animaux ont démontré l'importance de l'éosinophile dans le processus d'hyperréactivité bronchique [31].

Le rôle de l'éosinophile et les effets d'un traitement visant à réduire leur nombre sur la maîtrise de l'asthme et les exacerbations a été étudié par Green *et al.* dans un protocole visant à réduire le nombre d'éosinophiles présents dans les expectorations [37]. Leur étude a clairement démontré qu'il était possible de diminuer les exacerbations asthmatiques en réduisant le nombre d'éosinophiles dans les expectorations.

Dans un même ordre d'idées, Jayaram *et al.* ont évalué la possibilité de traiter des asthmatiques en se basant sur le pourcentage d'éosinophiles présents dans leurs

expectorations [38]. Les patients ainsi traités ont présenté une diminution du nombre d'exacerbations éosinophiliques et une diminution de la sévérité des exacerbations éosinophiliques et non-éosinophiliques, suggérant que la diminution du pourcentage d'éosinophiles dans les expectorations peut être bénéfique dans le contrôle de l'asthme.

1.1.6.3.1.2 Neutrophile

Le rôle du neutrophile devient de plus en plus évident dans la pathophysiologie de l'asthme, mais ce dernier reste toutefois moins bien connu que celui de l'éosinophile dans cette maladie. En effet, le neutrophile est une cellule ayant été clairement associée à la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC), mais moins à l'asthme [39]. Depuis quelques années, des études ont cependant évalué le rôle du neutrophile dans un profil particulier de la maladie, soit l'asthme non-éosinophilique, qui peut être observé chez environ la moitié des sujets asthmatiques, selon Douwes *et al.* [40]. Dans une étude désirant qualifier ce profil d'asthme, Gibson *et al.* ont observé que le nombre de neutrophiles et la quantité de certains médiateurs qu'ils sécrètent étaient plus élevés dans les expectorations d'asthmatiques ayant un asthme défini comme non-éosinophilique, supportant la théorie suggérant que le neutrophile serait une cellule importante de ce type particulier d'inflammation [41].

Le neutrophile est un leucocyte connu principalement pour son implication dans la première ligne de défense contre les infections, grâce à sa capacité de phagocytose. Le fait qu'il puisse également sécréter différents médiateurs inflammatoires suggère un rôle potentiel dans l'asthme. Il peut ainsi sécréter des médiateurs contribuant à l'inflammation bronchique tels que le facteur de nécrose de tumeurs- α (TNF- α), l'IL-1 β , -6, -8 et des leucotriènes B₄, mais également des protéases capables d'endommager la matrice extra-cellulaire, tels que diverses metalloproteinases (MMPs) [42].

Des études cliniques se sont intéressées à la présence de cette cellule en fonction de l'état respiratoire des sujets, et certaines observations ont pu être établies. Ainsi, Shaw *et al.* ont observé qu'un nombre élevé de neutrophiles dans les expectorations de sujets asthmatiques était associé à une moins bonne fonction respiratoire pré- et post-bronchodilatateur, définie par le VEMS [43].

1.1.6.3.1.3 Mastocyte

Le mastocyte est une cellule inflammatoire importante dans l'asthme, et il a été démontré qu'elle se retrouve en plus grand nombre dans les bronches de sujets asthmatiques comparativement aux sujets témoins, tel qu'observé dans des spécimens de biopsies bronchiques [29]. Son principal rôle dans l'asthme semble résider dans sa capacité à induire une bronchoconstriction. Il peut libérer des médiateurs préformés ou nouvellement formés suite à une stimulation allergénique [44]. La libération de ces médiateurs, dont l'histamine, lors de la dégranulation du mastocyte induit une bronchoconstriction [45]. Le niveau d'histamine dans le lavage bronchoalvéolaire correspondrait également au degré d'hyperréactivité bronchique [46]. Les mastocytes peuvent de plus sécréter de l'IL-4, -5, -6 et du TNF- α , des cytokines impliquées dans la chronicité de l'inflammation bronchique observée dans l'asthme [47]. La tryptase libérée par le mastocyte lors de sa dégranulation possède quant à elle des propriétés favorisant la dégradation de la fibrine, la croissance des fibroblastes et des muscles lisses bronchiques, la déposition de collagène et subséquemment l'épaississement membranaire (fibrose sous-épithéliale), un ensemble de caractéristiques associées au remodelage bronchique [44].

1.1.6.3.1.4 Macrophage alvéolaire

Présent en grand nombre dans les voies aériennes, le macrophage alvéolaire possède un rôle crucial dans la défense de l'organisme, en étant notamment une cellule importante dans l'initiation de la réponse inflammatoire [48]. Cependant, cette cellule semble également avoir un rôle à jouer dans l'asthme, bien qu'il soit moins bien défini que celui des cellules décrites précédemment.

Le macrophage peut sécréter différents médiateurs pouvant influencer la pathologie de l'asthme. Parmi les médiateurs sécrétés, certains peuvent avoir un effet direct chez le sujet asthmatique, tels que le thromboxane A₂ et le facteur d'activation plaquettaire (PAF), deux spasmogènes pouvant intervenir dans la bronchoconstriction. Par ailleurs, le macrophage peut sécréter des médiateurs qui initient la réponse inflammatoire, en attirant d'autres cellules inflammatoires, tels que l'éosinophile et les mastocytes, à

migrer dans les voies aériennes. De ceux-ci, notons le leucotriène B₄, le PAF, les interleukines, le TNF et le GM-CSF [49].

D'autre part, le macrophage alvéolaire possède également des caractéristiques anti-inflammatoires. Il est en mesure de libérer des médiateurs de type Th1 entraînant la suppression de l'hyperréactivité bronchique. De plus, la phagocytose des leucocytes du milieu par les macrophages alvéolaires contribue à la création d'un milieu anti-inflammatoire, grâce à la libération de molécules telles que la prostaglandine E₂ (PGE₂) et le facteur de croissance transformant- β (TGF- β) [48].

1.1.6.3.1.5 Lymphocyte

Plusieurs types de lymphocytes sont impliqués dans la pathophysiologie de l'asthme, mais ce sont particulièrement les lymphocytes de type Th2 qui y sont étudiés et dont le rôle a été clairement associé à la maladie. Lorsque celui-ci est activé, par exemple lors d'une réaction allergique, il sécrète divers médiateurs responsables de la réaction inflammatoire exagérée observée dans l'asthme, en induisant notamment la prolifération, la différenciation et l'activation de diverses cellules inflammatoires. Les cytokines sécrétées peuvent également contribuer à l'hyperréactivité bronchique, à la production de mucus et au remodelage bronchique [50]. Le lymphocyte Th2 est en effet reconnu comme la principale cellule qui orchestre la réaction inflammatoire dans l'asthme. Confirmant son rôle dans la pathophysiologie de l'asthme, plusieurs études ont clairement démontré que la production de cytokines de type Th2, soient l'IL-4, -5, et -13, était augmentée chez les sujets asthmatiques comparativement aux sujets témoins [30, 51].

Les lymphocytes B peuvent également intervenir, de façon indirecte, dans la régulation de la réponse inflammatoire. Lorsqu'ils sont activés, ils ont la capacité de sécréter des immunoglobulines E (IgE) qui, une fois liés aux antigènes, stimuleront à leur tour les mastocytes à sécréter des médiateurs agissant au niveau de la bronchoconstriction, de l'hyperréactivité bronchique et du remodelage bronchique [52].

1.1.6.3.1.6 Cellule épithéliale

Le rôle des cellules épithéliales bronchiques s'est longtemps résumé à sa fonction de barrière biologique contre des agents de l'environnement afin qu'ils ne traversent pas vers la muqueuse sous-épithéliale. Cependant, il a été observé que lorsque les cellules épithéliales sont stimulées, par exemple lors d'une réaction allergique, elles peuvent également contribuer à la réaction inflammatoire [53].

L'exposition allergénique pourrait particulièrement contribuer à la réaction inflammatoire en brisant les jonctions serrées unissant les cellules épithéliales les unes aux autres [54, 55]. Le bris de ces jonctions serrées rend la barrière plus perméable, permettant l'infiltration de la muqueuse sous-épithéliale par les cellules inflammatoires. De plus, les réactions allergiques peuvent stimuler les cellules épithéliales à se différencier en cellules à gobelet, augmentant ainsi la production de sécrétions bronchiques, une caractéristique importante de l'asthme. Les cellules épithéliales ont également la capacité de sécréter des médiateurs influençant la migration des éosinophiles, neutrophiles, cellules dendritiques et lymphocytes de type Th2 [53].

1.1.6.3.1.7 Muscle lisse bronchique

Tout comme la cellule épithéliale, la cellule musculaire lisse bronchique est une cellule structurale qui peut également contribuer à la réponse inflammatoire. Elle a la capacité de sécréter des chimiokines impliquées dans le recrutement et le maintien de cellules inflammatoires suite à la stimulation par des allergènes, intervenant ainsi dans la régulation de la réponse inflammatoire observée dans l'asthme [56].

L'expression de molécules d'adhésion cellulaires (CAMs) à la surface des muscles lisses permettent l'adhésion et l'interaction avec les cellules inflammatoires bronchiques telles que les éosinophiles, les lymphocytes, les mastocytes et les neutrophiles. De plus, de nouvelles études suggèrent que les muscles lisses seraient une source importante de chimiokines dans la sous-muqueuse [56]. En effet, il a été démontré que suite à divers stimuli inflammatoires, les muscles lisses peuvent sécréter différentes chimiokines, telles que l'éotaxine et le GM-CSF, qui encouragent la migration et la survie des éosinophiles, l'IL-8 et le *monocyte chemoattractant protein*(MCP)-1, -2 et -3, qui

participent au recrutement de cellules inflammatoires monocytaires [57]. La sécrétion de chimiokines pourrait avoir un effet sur la régulation de l'inflammation en attirant et en retenant les cellules inflammatoires jusqu'aux bronches et en amplifiant certains marqueurs pro-inflammatoires. Également, des *toll-like receptors* (TLRs) qui sont retrouvés à la surface des muscles lisses peuvent être activés, induisant ainsi la sécrétion de diverses cytokines inflammatoires et augmentant la réponse bronchomotrice à certains agonistes [56].

1.1.6.4 Remodelage

Les voies respiratoires des sujets asthmatiques, en plus de subir les conséquences directes de l'influx de cellules inflammatoires qui y sont présentes, présentent des changements structuraux pouvant avoir des effets significatifs sur leur fonction respiratoire, tels que le développement d'une obstruction bronchique parfois en partie irréversible et d'une accélération de la perte de la fonction pulmonaire [58]. Ces changements, décrits précédemment dans la section 1.1.6.2, sont probablement le résultat des atteintes chroniques portées contre le tissu bronchique. Chez les asthmatiques, le processus de réparation tissulaire ne se ferait pas de façon optimale. Ainsi, les cellules lésées ne seraient pas toujours remplacées par des cellules fonctionnelles et il y aurait également un déséquilibre entre l'apoptose et la prolifération de certains types cellulaires, contribuant notamment à l'épaississement de la paroi bronchique [59].

1.2 Rhinite allergique

1.2.1 Définition

La rhinite allergique est une maladie des voies respiratoires, tout comme l'asthme, qui affecte cependant les voies respiratoires supérieures et qui résulte d'une réaction inflammatoire. Cette réaction inflammatoire, médiée par les IgE, survient suite à une réaction allergique au niveau de la muqueuse nasale. Les principaux symptômes associés à cette pathologie sont l'écoulement nasal, l'obstruction nasale, le prurit nasal et les éternuements [60].

1.2.2 Prévalence et impact économique

La rhinite allergique est un problème de santé mondial affectant des personnes de tous âges et de toutes nationalités. La prévalence de la maladie peut varier de façon considérable d'une étude à une autre, car les critères d'évaluation de la rhinite ne sont pas clairement établis. Cependant, il est estimé que la rhinite allergique affecterait environ 500 millions de personnes dans le monde. De plus, la prévalence de la maladie serait en augmentation dans les pays où elle se situe à un plus bas niveau, tandis qu'elle pourrait avoir atteint un plateau ou même être en diminution dans les pays les plus affectés jusqu'à aujourd'hui [61].

Affectant des millions de personnes autour du monde, la rhinite allergique devient inévitablement une maladie qui engendre des coûts substantiels pour les sociétés. Une revue de littérature effectuée par Reed *et al.* en 2004 a estimé le coût de cette maladie aux États-Unis entre 2 et 5 milliards de dollars américains annuellement, démontrant clairement l'impact économique que peut engendrer la rhinite allergique [62].

1.2.3 Description clinique

Les principales manifestations de la maladie chez les personnes atteintes surviennent au niveau nasal, tel que mentionné dans la section 1.2.1. Ainsi, les symptômes nasaux les plus souvent mentionnés sont la congestion nasale, les éternuements, le prurit et l'écoulement nasal. De plus, les patients rhinitiques peuvent souffrir de prurit aux yeux, au palais et aux oreilles, et également être incommodés par du larmolement. Selon une étude effectuée en 2002 chez des sujets atteints de rhinite allergique, la congestion nasale a été définie par 48% des répondants adultes comme le symptôme le plus dérangent, suivi par le prurit oculaire et l'écoulement nasal [63].

Certains rhinitiques peuvent également présenter d'autres conditions pathologiques associées à la maladie, telles que la perte de l'odorat, le ronflement, des problèmes de sommeil, l'écoulement post-nasal et la toux chronique [60]. À la section 1.3, une description détaillée sera également présentée sur le lien observé entre la rhinite allergique et l'asthme.

La rhinite allergique peut être divisée en 2 grandes catégories, soit la rhinite allergique saisonnière ou perannuelle, selon que les allergènes causant les symptômes sont, respectivement, de nature saisonnière ou s'ils peuvent se retrouver dans l'environnement du sujet pendant toute l'année, le plus souvent sous forme d'allergènes domestiques. Ces 2 formes de rhinite allergique peuvent coexister chez le même sujet [64]. Certaines sous-catégories de rhinite sont également décrites telle la rhinite polypoïde, médicamenteuse ou autres, mais ces entités sont moins fréquentes.

1.2.4 Diagnostic

Un des éléments les plus importants, lors d'une consultation pour un problème de rhinite allergique, est l'historique du patient. Il est en effet important de demander au patient quels sont ses symptômes de rhinite, leur magnitude, leur durée, leur temps d'apparition suite à une exposition et leurs effets sur leur qualité de vie. Il faut également questionner le sujet sur les allergènes suscitant des réactions allergiques et si leur environnement est propice à les mettre en contact avec ces allergènes. D'autres pathologies pouvant résulter d'une réaction allergique telle la conjonctivite et l'eczéma doivent être documentées. Il est important de vérifier quels sont les traitements utilisés par le patient et de poser des questions sur l'efficacité de ceux-ci à traiter leurs symptômes. Des questions sur l'historique familial peuvent également être posées [64].

Un examen du nez peut être effectué par le professionnel, afin de vérifier l'anatomie générale des voies aériennes supérieures, mais aussi pour examiner l'aspect et la quantité de mucus présent ou encore la présence de polypes nasaux [60].

Afin d'établir un diagnostic précis, il est fortement suggéré de procéder à des tests d'allergie, afin de vérifier si les symptômes sont effectivement causés par une réaction allergique. Les tests d'allergie les plus couramment utilisés sont les tests cutanés dits « à la piqûre », qui consistent brièvement à déposer des gouttes de différents allergènes sur la peau de l'avant-bras des patients et d'aller soulever légèrement la peau, pour bien mettre l'allergène en contact avec la sous-muqueuse. Si une réaction allergique se produit, l'inflammation présente créera de la rougeur et une enflure (œdème) au site de la réaction. Le diamètre de l'induration pourra ensuite être mesuré et, selon les critères

en vigueur, déterminera la positivité du test. Le test cutané d'allergie est largement utilisé car il est simple, facile, rapide à exécuter, spécifique et peu coûteux [64].

Il est également possible de doser les les niveaux d'IgE présents dans le sérum. La mesure du niveau d'IgE total dans le sérum peut être effectuée, mais il n'est pas recommandé car ce test est peu spécifique. Parallèlement, les niveaux d'IgEs spécifiques à des allergènes peuvent être testés, en particulier dans le sérum. La motivation du spécialiste à procéder à un test spécifique des IgEs serait principalement reliée à la sévérité des symptômes du patient ainsi qu'à l'histoire familiale [65]. Cependant ces derniers tests sont plus coûteux et n'évaluent qu'un allergène à la fois.

Surtout utilisés en recherche, les tests de provocation allergénique nasale pourraient toutefois s'avérer utiles dans certains cas particuliers. En effet, il arrive que le test cutané d'allergie ou des niveaux d'IgE dans le sérum soient contradictoires ou encore ne donnent pas les résultats soupçonnés. Dans ces cas particuliers, une provocation nasale avec des allergènes spécifiques afin d'évaluer la réponse symptomatique ou inflammatoire qui s'ensuit pourrait être effectuée mais tel que mentionné, ces tests sont rarement nécessaires [66].

1.2.5 Pathophysiologie

1.2.5.1 Réaction inflammatoire

La rhinite allergique est la conséquence d'une réaction allergique qui survient suite à une exposition à un allergène pour lequel le malade a été sensibilisé. Plusieurs cellules et médiateurs interviennent dans ce processus, tel que décrit ci-dessous.

La première étape de cette cascade inflammatoire est l'inhalation de l'allergène et la présentation de cet antigène par les cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes Th2. Les cellules dendritiques sont les principales cellules présentatrices d'antigènes de la réaction allergique. Un plus grand nombre de cellules dendritiques activées est d'ailleurs retrouvé dans la muqueuse nasale de sujets souffrant de rhinite allergique comparativement à des sujets témoins [67]. De plus, une déplétion des cellules dendritiques chez des souris malades a permis d'inhiber la réaction inflammatoire

allergique suite à une exposition allergénique, confirmant l'importance de cette cellule dans la réaction allergique [67].

Les cellules dendritiques présentent ainsi l'allergène aux lymphocytes Th2, qui sont les cellules centrales de la réponse allergique, ayant la capacité de déclencher la cascade d'évènements inflammatoires conduisant à l'apparition des symptômes de rhinite chez les sujets touchés par la maladie (Figure 4). Suite à son activation, le lymphocyte Th2 sécrète des médiateurs qui activeront à leur tour d'autres cellules inflammatoires, dont les éosinophiles, les lymphocytes B et les mastocytes.

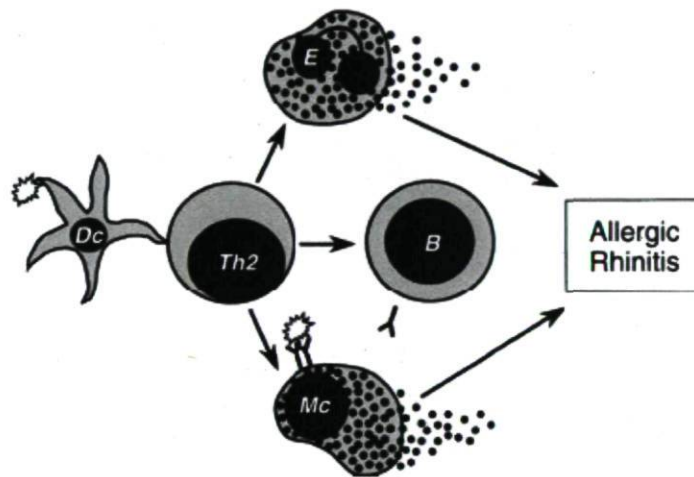


Figure 4 : Pathophysiologie de la rhinite allergique. La cellule dendritique présente son antigène au lymphocyte Th2, qui, une fois activé, sécrète des médiateurs qui activeront à leur tour l'éosinophile, le lymphocyte B et le mastocyte, créant ainsi la réponse inflammatoire observée dans la rhinite allergique. Tiré de Benson M. et al., *Clin Exp All.* 2001 ; 31 :361-367 [68]

Le recrutement et l'activation des éosinophiles se fait en grande partie par des cytokines de type Th2, telles que l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5 et le GM-CSF, mais l'éosinophile peut lui-même sécréter l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF [69]. Suite à leur activation, les éosinophiles vont à leur tour sécréter des médiateurs ayant pour effet d'augmenter la cytotoxicité et de favoriser la réaction d'inflammation, en diminuant l'apoptose des cellules inflammatoires, en augmentant la vasodilatation et en attirant d'autres cellules inflammatoires grâce au pouvoir chimioattractant des médiateurs éosinophiliques [60, 70].

Les lymphocytes B possèdent également un rôle important dans la réaction inflammatoire de la rhinite allergique. Ils sont activés par des cytokines de type Th2 dont l'IL-4 et l'IL-13 et, suite à leur activation, sécrèteront des IgE, une molécule clé dans la cascade inflammatoire allergique [71].

Les mastocytes, une fois activés par des cytokines de type Th2 ou encore par des IgE produits par les lymphocytes B qui se sont liés à des antigènes, relâcheront le contenu de leurs granules dans l'environnement extra-cellulaire [72]. Plusieurs médiateurs relargués par le mastocyte ont été décrits, tels que l'histamine, la tryptase, le leucotriène, différentes cytokines inflammatoires, des chimiokines et des facteurs de croissance. Parmi les cytokines inflammatoires retrouvées, certaines sont de type Th2, comme l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13, et d'autres sont des cytokines pro-inflammatoires. L'ensemble des médiateurs sécrétés par le mastocyte lui confère différents rôles dans la pathologie de la rhinite allergique, soient au niveau de la vasodilatation et au niveau du recrutement et de la prolifération de cellules inflammatoires.

1.3 Relations entre l'asthme et la rhinite allergique

Plusieurs évidences épidémiologiques, physiopathologiques et thérapeutiques ont conduit les scientifiques à penser que l'asthme et la rhinite allergique seraient la manifestation d'une seule et même pathologie, parlant ainsi du « *One airway, one disease* » [73]. Selon ce concept, une réaction inflammatoire se produisant au niveau des voies aériennes supérieures aurait une influence sur l'inflammation des voies aériennes inférieures et vice-versa. Il est donc important de bien comprendre ces liens, afin de prévenir et traiter adéquatement les patients souffrant de l'une ou l'autre de ces pathologies respiratoires.

1.3.1 Évidences épidémiologiques

Plusieurs données épidémiologiques permettent d'établir un lien évident entre la rhinite allergique et l'asthme. Tout d'abord, la majorité des sujets asthmatiques souffrent également de rhinite allergique, cette prévalence pouvant s'élever à plus de 70% [74]. Inversement, il est également vrai que parmi les sujets souffrant de rhinite allergique, il

y a un plus grand pourcentage de sujets asthmatiques comparativement à un groupe sans rhinite allergique [75]. Finalement, il a été démontré que la rhinite allergique précède souvent l'apparition de l'asthme. En effet, les sujets souffrant de rhinite allergique voient leur risque de développer de l'asthme au cours de leur vie multiplié par 3 comparativement à un groupe contrôle [76].

1.3.2 Évidences physiopathologiques

Suite à l'établissement des évidences épidémiologiques reliant l'asthme et la rhinite allergique, divers mécanismes ont été proposés pour expliquer ce concept.

Tout d'abord, il a été proposé que chez les sujets rhinitiques, il y aurait une aspiration des sécrétions nasales, contenant des cellules et des médiateurs inflammatoires, vers les voies aériennes inférieures. Ces cellules et médiateurs inflammatoires contribueraient à l'apparition et au maintien de l'asthme. Cette théorie n'a toutefois jamais été prouvée et pour l'instant est incertaine [77].

La deuxième théorie présentée concerne le mode de respiration chez les sujets rhinitiques [77]. Présentant une congestion nasale fréquente, les rhinitiques respireraient davantage par la bouche que les sujets sains. L'air respiré ne serait donc pas humidifié et réchauffé adéquatement avant d'atteindre les voies aériennes inférieures. De plus, les aéroallergènes et les polluants de l'air pénétreraient directement dans les voies aériennes inférieures et ne seraient pas filtrés au niveau du nez. Des études seraient toutefois nécessaires pour prouver ce concept.

Il se pourrait également que l'asthme et la rhinite allergique soient inter-reliés par un réflexe neurologique naso-bronchique. Cette théorie stipule qu'une stimulation au niveau du nez pourrait engendrer un réflexe nerveux induisant une bronchoconstriction [77]. Cette explication reste toutefois à être prouvée.

Finalement, la dernière hypothèse est celle sur laquelle le plus d'études sont effectuées présentement. Selon cette hypothèse, l'inflammation nasale présente dans la rhinite allergique influencerait l'inflammation systémique et bronchique observée dans l'asthme [78] (Voir Figure 5). Selon cette hypothèse, des cellules inflammatoires en

circulation pourraient être activées par des cellules endothéliales de la muqueuse nasale et contribuer à l'inflammation bronchique. Les cellules inflammatoires systémiques activées seraient ensuite attirées par des sites où l'inflammation est déjà présente, se dirigeant donc vers les bronches et retournant également vers la muqueuse nasale. Parallèlement, des cytokines libérées par les cellules inflammatoires nasales iraient stimuler la moelle osseuse pour augmenter la production de cellules inflammatoires systémiques, contribuant également à l'inflammation bronchique.

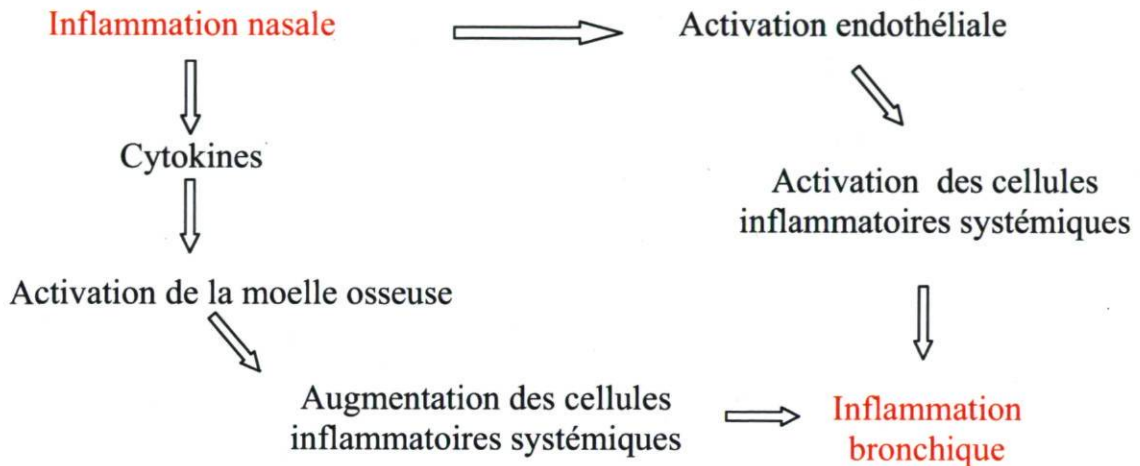


Figure 5 : Influence potentielle de l'inflammation nasale sur l'inflammation bronchique. Illustration de l'influence potentielle de l'inflammation nasale, présente dans la rhinite allergique, sur l'inflammation systémique et, finalement, bronchique, observée dans l'asthme. Adapté de *Togias A., Allergy. 1999 ; 54 :S94-105* [78]

1.3.3 Évidences thérapeutiques

Certaines thérapies peuvent être efficaces à la fois dans le traitement de l'asthme et de la rhinite allergique. C'est le cas pour les corticostéroïdes oraux et nasaux et les anti-leucotriènes. Toutefois, certaines thérapies ne sont efficaces que pour l'une ou l'autre des maladies. C'est le cas pour les anti-histaminiques et les agonistes β_2 de longue durée, efficaces dans le traitement de la rhinite allergique et de l'asthme, respectivement [79].

1.4 Provocations allergéniques

Des modèles expérimentaux ont été développés dans le but de mieux comprendre l'impact d'une stimulation allergénique sur des maladies inflammatoires des voies aériennes telles que l'asthme et la rhinite allergique. Les provocations allergéniques sont des outils utilisés en laboratoire pour simuler un contact allergénique chez des sujets sensibilisés, pour ainsi étudier le processus inflammatoire précédant l'apparition des symptômes chez ces sujets ou pour tester l'efficacité de médicaments. Il existe plusieurs types de provocations allergéniques, dont les provocations allergéniques bronchiques et nasales, qui seront décrites aux sections 1.4.1 et 1.4.2.

1.4.1 Provocations allergéniques bronchiques

Les provocations allergéniques bronchiques sont utilisées en recherche clinique pour étudier les mécanismes physiopathologiques de la réaction inflammatoire induite par les allergènes au niveau des bronches. La méthode habituellement utilisée consiste, en bref, à faire inhaler des doses croissantes d'allergène à un sujet sensible à cet allergène jusqu'à ce qu'une chute de 20% du VEMS soit observée. Cet outil a permis d'améliorer grandement les connaissances sur la cascade inflammatoire présente dans l'asthme. De plus, les provocations allergéniques bronchiques sont utilisées pour évaluer l'efficacité d'agents thérapeutiques dans le traitement des symptômes et de l'inflammation qui surviennent suite à une réaction allergique [80].

Les provocations allergéniques bronchiques peuvent induire 2 types de réponses chez les patients. De 15 à 30 minutes suivant une provocation allergénique bronchique, une réaction allergique immédiate peut survenir, se traduisant par un épisode de bronchoconstriction qui disparaît cependant dans les 2 heures suivant la provocation [80]. De plus, il est possible d'observer chez certains sujets une réponse allergique retardée, survenant environ 3 à 8 heures suivant la provocation, se présentant également sous forme de bronchoconstriction et d'une augmentation de la réactivité bronchique [81]. La réponse allergique immédiate est induite par les médiateurs relâchés lors de la dégranulation des mastocytes dans les minutes suivant le contact avec l'allergène. Pour ce qui est de la réponse allergique retardée, il s'agirait plutôt d'une réaction survenant

suite à une augmentation du recrutement de cellules inflammatoires, de la perméabilité vasculaire et de la sécrétion de mucus.

Des provocations bronchiques à faibles doses, dont le but est d'induire une baisse de la fonction respiratoire de seulement 5%, peuvent également être utiles pour étudier les mécanismes physiopathologiques induits par les allergènes au niveau des voies aériennes inférieures [80]. Ce type de provocation pourrait mimer davantage une exposition naturelle à un allergène. Une étude de Boulay *et al.* a d'ailleurs démontré qu'il est possible d'induire une inflammation de type éosinophilique des voies aériennes inférieures chez des sujets rhinitiques sans asthme, sans induire pour autant de baisse de la fonction respiratoire [82].

Les méthodes proposées pour administrer l'allergène varient selon les études, mais la plus utilisée est l'inhalation de doses croissantes de solutions contenant l'allergène dilué dans du salin physiologique [80]. Le patient inhale la solution comprenant l'allergène dans un nébuliseur préalablement calibré, ce qui permet de connaître la quantité d'allergène qui sera inhalée par le patient, et standardisant ainsi la procédure.

1.4.2 Provocations allergéniques nasales

Les provocations allergéniques nasales sont généralement utilisées pour étudier les mécanismes de la rhinite allergique. Plusieurs techniques peuvent être employées pour simuler une réaction allergique chez les rhinitiques. Parmi celles-ci, il y a l'application directe de l'allergène sur une surface précise de la muqueuse nasale à l'aide d'une pipette ou de disques préalablement imbibés. D'autres méthodes existent cependant pour distribuer l'allergène uniformément sur toute la surface de la muqueuse nasale. L'utilisation d'un atomiseur, par exemple, permet de vaporiser l'allergène sur une grande surface à l'intérieur du nez, imitant davantage une exposition naturelle [83, 84].

Les allergènes utilisés dans ce type de provocation sont le plus souvent sous forme aqueuse, étant ainsi faciles d'utilisation, peu importe la méthode utilisée pour provoquer la réaction allergique. D'autres formes sont parfois utilisées dans certaines études, telles que les allergènes en poudre ou encore en capsules [83]. Il est important d'utiliser des allergènes standardisés, afin que les expérimentations soient reproductibles entre elles.

1.5 Problématique

Les provocations allergéniques nasales représentent un bon modèle pour étudier l'influence des voies aériennes supérieures sur les voies aériennes inférieures. Il s'agit en effet d'une méthode pouvant aider à étudier les liens existant entre la rhinite allergique et l'asthme. Il n'existe cependant aucune méthode standardisée pour réaliser ce type de provocations. Il est donc difficile de comparer les résultats des différentes études portant sur les provocations allergéniques nasales entre eux. Dans cette optique, la littérature a été scrutée à la recherche d'articles possédant des instruments pour l'évaluation de symptômes validés lors de provocations allergéniques nasales. Une revue de littérature à ce sujet est présentée au Chapitre 2.

Dans le passé, les provocations allergéniques nasales ont démontré des résultats contradictoires. Braunstahl *et al.* ont utilisé les provocations allergéniques nasales chez des sujets rhinitiques allergiques sans asthme et ont observé une augmentation des éosinophiles et de l'ICAM-1 dans les biopsies nasales et bronchiques comparativement aux sujets témoins [85]. Dans une autre étude, Wilson *et al.* n'ont cependant pas observé une augmentation du nombre d'éosinophiles présents dans les expectorations induites de sujets souffrant de rhinite allergique suite à une seule provocation nasale allergénique, et ce malgré une augmentation de l' ICAM-1 [86].

De plus, à notre connaissance, aucune étude n'a été effectuée pour comparer les réponses symptomatiques et inflammatoires à des provocations allergéniques nasales multiples de sujets rhinitiques avec ou sans asthme. Des études sont nécessaires afin d'éclaircir ces résultats et ainsi améliorer la compréhension de l'impact de l'inflammation des voies aériennes supérieures sur l'inflammation des voies inférieures. Une étude dans ce sens a été réalisée et est présentée au Chapitre 3.

1.6 Hypothèses

1) Dans la littérature, il existe des outils d'évaluation des symptômes validés dans le cadre de provocations allergéniques nasales (Chapitre 2)

2) La réponse symptomatique à des provocations allergéniques nasales multiples est différente en regard du type et l'intensité des symptômes chez les sujets rhinitiques sans asthme comparativement aux sujets rhinitiques avec asthme. (Chapitre 3)

3) Les provocations allergéniques nasales multiples causent une augmentation de l'inflammation des voies aériennes supérieures et inférieures, et ce changement est davantage marqué chez les sujets souffrant d'asthme. (Chapitre 3)

1.7 Buts

1) Vérifier, en effectuant une revue de la littérature scientifique sur Embase et PubMed, s'il existe des outils d'évaluation des symptômes pour effectuer des tests de provocations allergéniques nasales.

2) Évaluer la réponse symptomatique à des provocations allergéniques nasales multiples chez des sujets rhinitiques avec et sans asthme, en analysant les symptômes notés par les sujets dans la période suivant les provocations nasales.

3) Évaluer la réponse inflammatoire à des provocations allergéniques nasales multiples chez des sujets rhinitiques avec et sans asthme, dans les expectorations induites et les lavages nasaux suivant les provocations nasales.

CHAPITRE 2

Zetchi A, Rousseau MC, Leblanc A, Boulay ME, Boulet LP

**Review of Symptoms Assessment During Nasal Allergen Provocation
in Patients with Allergic Rhinitis**

The Open Allergy Journal 2010 ;3 :1-6

Mise en contexte de l'étude

Les provocations nasales sont des outils pouvant être utilisés en recherche clinique pour étudier la pathophysiologie de la rhinite allergique. Cependant, aucune méthode standardisée n'a été élaborée et les études restent difficilement comparables entre elles. Une revue de la littérature a été effectuée à la recherche d'instruments validés établissant les symptômes nasaux suivant une provocation nasale chez des sujets rhinitiques. Dans les bases électroniques de données de *Pubmed* et d'*Embase*, 520 études ont été trouvées. Parmi celles-ci, 81 instruments ont répondu aux critères établis, provenant de 81 études différentes. Aucun instrument validé n'a cependant été trouvé. Cette revue a tout d'abord permis de constater la grande variété des instruments utilisés. De plus, il y a une absence d'outils validés, suggérant le besoin de développer une méthode validée et standardisée d'évaluation des symptômes.

Implication des auteurs

- Akli Zetchi a participé à la revue de littérature et à l'analyse des résultats et a écrit le manuscrit.
- J'ai participé à la revue de littérature et à l'analyse des résultats.
- Annie Leblanc a développé l'idée du projet de recherche, élaboré le protocole et a participé à l'analyse des résultats.
- Marie-Ève Boulay a participé à l'écriture du manuscrit et à l'analyse des données.
- Dr. Louis-Philippe Boulet a été le principal investigateur du projet.

Title: Review of Symptoms Assessment During Nasal Allergen Provocation in Patients with Allergic Rhinitis

Short Title: Symptom Evaluation Tools During Nasal Allergen Challenges

Authors: Akli Zetchi, akli.zetchi.1@ulaval.ca
Marie-Claire Rousseau, BSc, marie-claire.rousseau@criucpq.ulaval.ca
Annie LeBlanc, MSc, annie.leblanc.7@ulaval.ca
Marie-Eve Boulay, MSc, marie-eve.boulay@criucpq.ulaval.ca
Louis-Philippe Boulet, MD, FRCPC, lpboulet@med.ulaval.ca

From: Centre de Recherche, Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec.

Address for Correspondence:

Dr. Louis-Philippe Boulet
Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec
2725, Chemin Ste-Foy
Québec, Canada, G1V 4G5
Tel: 418-656-4747 Fax: 418-656-4762
Email: lpboulet@med.ulaval.ca

Word count (abstract): 246

Word count (text): 1946

Number of figures: 2

Supported by: Local funds

Potential Financial Conflicts of Interests : Advisory Boards: L.-P. Boulet (Altana, AstraZeneca, GlaxoSmithKline, Merck Frosst, Novartis); **Lecture fees:** L.-P. Boulet (3M, Altana, AstraZeneca, GlaxoSmithKline, Merck Frosst, Novartis); **Sponsorship for investigator-generated research:** L.-P. Boulet (AstraZeneca, GSK, Merck Frosst, Schering); Research funding for participating in multicenter studies: L.P. Boulet (3M, Altana, AsthmaTx, AstraZeneca, Boehringer-Ingelheim, Dynavax, Genentech, GlaxoSmithKline, IVAX, Merck Frosst, MedImmune, Novartis, Roche, Schering, Topigen, Wyeth); **Support for the production of educational materials:** L.-P. Boulet (AstraZeneca, GlaxoSmithKline, Merck Frosst); **Governmental:** L.-P. Boulet (Adviser for the Conseil du Médicament du Québec, Member of the Quebec Workmen Compensation Board Respiratory Committee); **Organisational:** L.-P. Boulet (Chair of the Canadian Thoracic Society Guidelines Dissemination and Implementation Committee, Co-leader of the Therapeutics Theme of the Canadian AllerGen Network of Centers of Excellence, Holder of the Laval University Chair on Knowledge Transfer, Prevention and Education in Respiratory and Cardiovascular Health).

A. Zetchi, M.C. Rousseau, A. LeBlanc, M.E. Boulay: have none to declare.

ABSTRACT

Background: Allergic rhinitis is the most prevalent allergic disease. Nasal provocation tests (NPTs) may be useful for its clinical diagnostic and therapy monitoring although they are mostly used in clinical research. However, the lack of standardisation in the symptoms assessed and the variety of instruments used make effective comparison between studies difficult. **Objective:** To review the published literature searching for instruments assessing nasal symptoms during NPTs for allergic rhinitis. **Methods:** Pubmed and Embase electronic databases were reviewed, looking for all methods including an instrument assessing symptoms during or following NPTs. Studies on animal models, pediatric subjects, and patients without allergic rhinitis were excluded. Studies were also excluded if they did not assess nasal symptoms during or following the NPT. Only NPT studies performed with allergen extracts or histamine were included. **Results:** A total of 520 studies were retrieved, from which 81 different instruments from 81 studies were included in the present analysis, There was no instrument reporting a validation process for the assessment of symptoms during NPTs. From the remaining instruments, the most common symptoms assessed were rhinorrhea (67), sneezing (70), congestion (67), and nasal pruritus (50). The most frequently used type of scales among those instruments was the four-point Likert scale (39), although different methods were used. **Conclusions:** This review illustrates the large variety of symptoms and methods used to assess the aforementioned NPTs. The lack of validation studies suggests the need to develop and validate a standardized instrument assessing symptoms following NPTs.

Keywords: rhinitis; symptoms; symptom score; allergen challenge; nasal provocation test.

INTRODUCTION

Several techniques have been developed to study the clinical and pathophysiological mechanisms of rhinitis. Among those being commonly used, are direct challenges to histamine or allergens [1]. Nasal provocation tests (NPTs) have the advantage of reproducing an exposure in a controlled setting, making possible the use of the same procedure for all subjects with standardized agents. They are particularly used to monitor treatment of allergic rhinitis [2]. Although rarely performed in clinical practice, NPTs are often used for research purposes on nasal diseases mainly to evaluate efficacy of anti-allergic medication [2-4]. They are also important in the diagnosis of occupational rhinitis.

The evaluation of response during NPTs can be both objective and subjective. With respect to objective methods, biochemical marker measures in nasal secretions have been used [5-7], as well as anterior rhinomanometry, acoustic rhinometry, and rhinostereometry which allow to assess nasal obstruction during NPT [2]. Subjective symptom ratings using Likert or visual analogue scales have been widely used. However, the lack of standardisation in the symptoms assessed and the large spectrum of scales lacking a validation process make effective comparison between studies difficult. Although some scoring systems have been proposed for standardised quantification of clinical parameters [8-11], and the importance of a rigorous validation process reported, there is, to our knowledge, no “gold standard” for the evaluation of response to NPTs.

The aim of this work was to review published reports on NPTs, searching for instruments with a reported validation process that evaluated symptoms during or after NPTs and to assess the validation process when available.

METHODS

Search strategy and inclusion criteria

A systematic literature search was performed by an information specialist, using Pubmed and Embase databases, to identify reports where the evaluation of symptoms in

patients with allergic rhinitis during NPT was assessed regardless of study design. The following keywords and/or medical heading terms and/or text words were used when applicable: 1) *rhinitis* and 2) *symptoms*, and 3) *evaluation or questionnaire or score or scale or instrument*, and 4) *nasal provocation test* or *nasal allergen provocation*. The limit feature was used to select human studies published between 1980 and 2006 written in English or French. Reference lists of included studies and review articles were hand searched afterwards. Studies were included if 1) patients had allergic rhinitis; 2) they included NPTs with allergen extracts or histamine; and 3) they were original publications using tools to assess symptoms during or following NPTs in patients with allergic rhinitis.

Data Extraction and Tool Assessment

The database was analysed independently by two reviewers. General information on the study goal, the study type, the clinical setting, the treatment provided (medical or surgical), and the patient population and inherent characteristics was first collected. Subjects' diagnosis of allergic rhinitis and asthma were also considered. The presence of allergic asthma was noted. The number of symptom evaluation tools used by each study was recorded.

For each symptom assessment instrument used in the studies, information was abstracted on the number of items, the subscales or domains, the scoring method and the mode of administration. If mentioned, the performance characteristics of each instrument including validity, reliability and responsiveness was noted. Therefore, information on nasal and ocular manifestations evaluated by the different tools was precisely noted. Regarding the mode of administration, we noted if the patients completed independently the questionnaire or scale or if an interviewer was involved in the process. If a scale was described, the grading system and the number of items scored were recorded. In the case of visual analog scales (VASs), we were interested in its grading (e.g. 0 to 10, 0 to 100) and the items assessed. Finally, we analyzed if the VAS assessed the patient's overall feeling of symptoms or precise clinical manifestations.

RESULTS

Literature Search Results

At first, 520 articles were identified through the query of the Embase and Pubmed databases. We first excluded 120 duplicates, 38 articles in other languages than French or English, 1 without abstract and 12 reviews (Figure 1). From the remaining 349 articles, we excluded 6 studies on animals and 41 which focused on pediatric patients. We discarded 22 studies on patients without any form of allergic rhinitis and 65 which did not perform a nasal provocation test. Fifteen studies used other substances than allergens or histamine while 68 did not include an instrument to assess symptoms during NPTs. Finally, 51 studies were not the original article describing the instrument used to assess symptoms and referred to previous studies which were included in this analysis. Hence, 81 studies used instruments to assess nasal symptoms following NPTs among subjects with rhinitis.

Instrument Characteristics

Zero out of these 81 studies used a validation process for their instruments measuring nasal symptoms [12-92]. Indeed, we found no description of a validated symptom scoring method. Studies using non-validated tools were reviewed and described in order to find any similarities and repetitive characteristics in nasal symptom assessment which may be useful for further instrument development and validation.

Likert scales were the predominant instrument to assess symptoms following or during NPTs. Sixty one studies included any form of numeric scale while 17 of them used visual analogue scale (VAS). Six studies used other scoring systems, which consisted mostly in a combination of Likert scales depending on the symptom assessed. A scale grading symptoms from 0 to 3 was used in 38 of the 61 studies with Likert scales. Symptom severity was subjectively assessed with the following gradation: 0 corresponded to the absence of symptoms, 1 to mild, 2 to moderate, and 3 to severe symptoms (Figure 2).

The symptoms most frequently evaluated were, in order of prevalence, rhinorrhea (73), sneezing (70), nasal blockage (67), and nasal pruritus (50). The prevalence of these four upper airway symptoms was clearly higher compared to the others. Tearing (12) and

itching of the eyes (9) as well as bronchial symptoms (6) were the following most prevalent symptoms assessed during NPTs. Bronchial symptoms, relating to lower airway symptoms, included cough, wheezing and shortness of breath. In 39 studies, the symptom evaluation tool was auto-administered. Nineteen studies used an interviewer to complete the symptom assessment tool. Twenty three studies did not mention the mode of administration.

DISCUSSION

This review confirms the lack of standardization and validity assessment of the different tools used to assess the upper airway response to nasal allergen challenges. No validation process for an instrument was found following the review of 81 original manuscripts meeting the previously described criteria. Nevertheless, the publications using non-validated tools were reviewed to find any common characteristics in nasal symptom assessment.

When analysing data extracted from the non-validated tools, the four-point Likert scale was the most commonly used instrument to assess symptoms following NPTs. Moreover, rhinorrhea, sneezing, nasal blockage and nasal pruritus were the most frequently evaluated symptoms. Even though these results come from studies which lacked a validation process, the four symptoms most frequently assessed during or after NPTs correspond to the definition of allergic rhinitis according to the Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma workshop report [93]. Allergic rhinitis may be described as a symptom complex characterized by paroxysms of sneezing, rhinorrhea, nasal obstruction, and itching of the eyes, nose and palate [94]. In a more recent evaluation of clinical parameters for the definition of allergic rhinitis, Ng *et al.* suggested that the most important factors to be considered in the diagnosis of allergic rhinitis are those related to nasal and ocular symptoms; for example, the symptoms of rhinorrhea, sneezing, sniffing, impaired sense of smell, blocked nose, watery eyes, red eyes, mouth breathing and itchy nose [95]. Therefore, the symptoms commonly assessed in studies using NPTs seem to be relevant in the evaluation of patients with allergic rhinitis.

Another important finding of the study was the diversity of the methods to assess symptoms. In some instances, the same author used different instruments to evaluate symptoms during NPTs. However, the use of more than one instrument to assess symptoms following NPTs was rarely noted. Multiple scales could be used to assess the various components of the nasal response. On one side, specific symptoms could, for instance, be individually assessed with a Likert scale.

The data collected in this study are most valuable for the future construction and validation of a new symptom score as they reflect the perception of most authors on rhinitis' key features. This review stresses the need to develop and most importantly, validate a common tool to assess symptoms severity and evolution during or following NPTs in patients with allergic rhinitis. Since no standardized and common tool has been produced for this purpose, the evaluation and comparison of studies using various methods to assess NPTs remain difficult and less reliable.

CAPTIONS

Figure 1: Details of the literature search results

Figure 2: Characteristics of the tools assessing allergic rhinitis symptoms

Figure 1

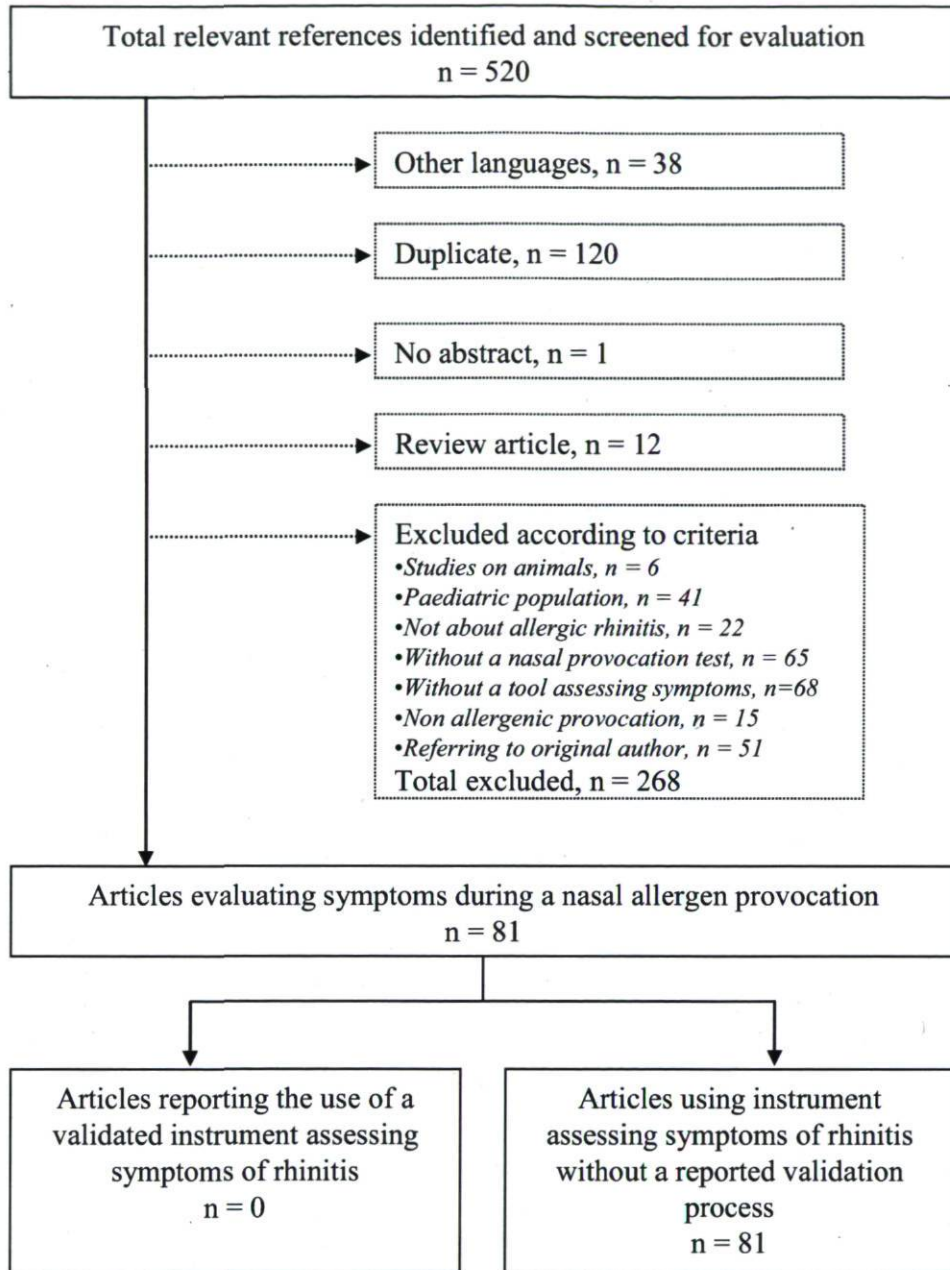
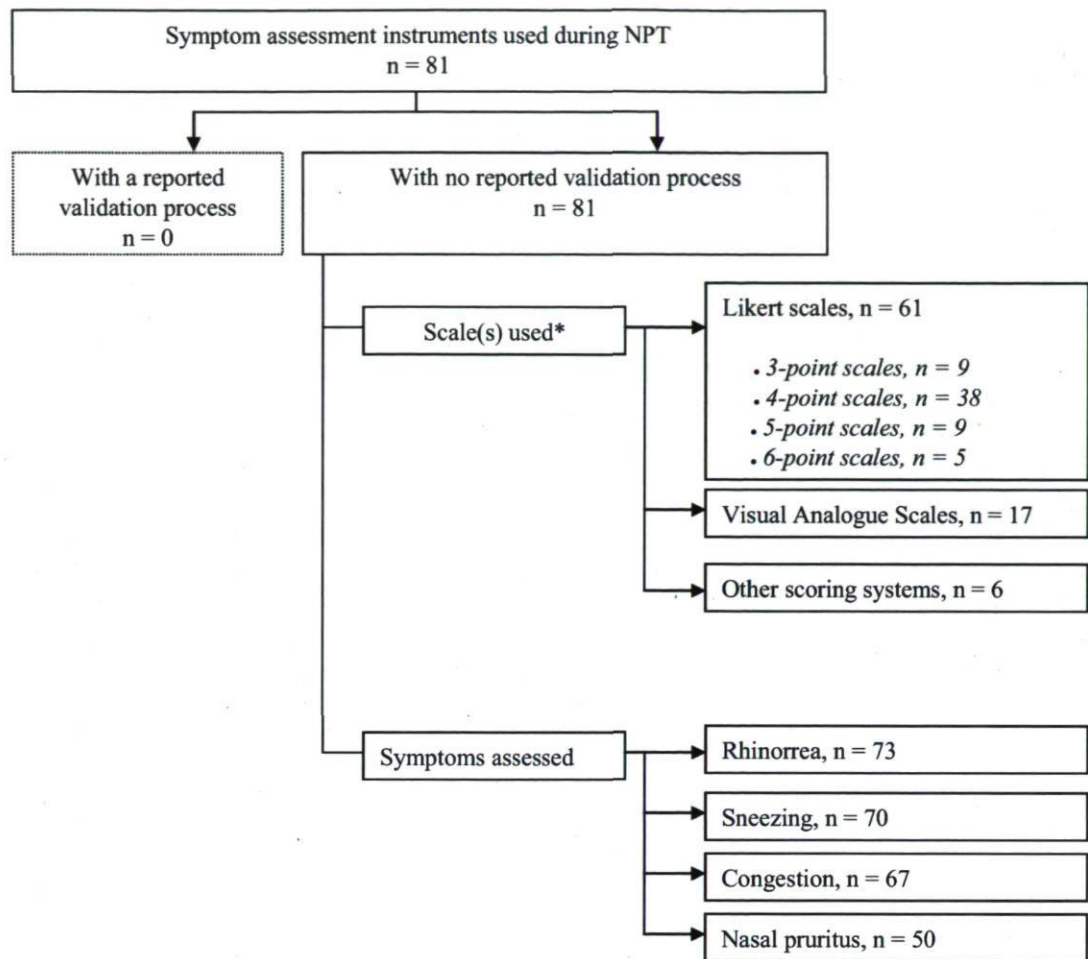


Figure 2



* Some studies used more than one type of scale

References

1. Day JH, Ellis AK, Rafeiro E, Ratz JD, Briscoe MP. Experimental models for the evaluation of treatment of allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006;96:263-278.
2. Wojdas A, Rapiejko P, Zielnik-Jurkiewicz B, Kantor I. Nasal provocative test in patients allergic to pollen. *Ann Agric Environ Med* 2005;12:173-176.
3. Gendo K, Larson EB. Evidence-based diagnostic strategies for evaluating suspected allergic rhinitis. *Ann Intern Med*;2004;140:278-289.
4. Fernandes FR, Sole D, Naspitz C, Munoz-Lopez F. Diagnostic value of nasal provocation testing and rhinomanometry in allergic rhinitis. *J Investig.Allergol Clin Immunol* 1996;6:184-188.
5. Naclerio, R. M., H. L. Meier, A. Kagey-Sobotka, N. F. Adkinson, Jr., D. A. Meyers, P. S. Norman, and L. M. Lichtenstein. 1983. Mediator release after nasal airway challenge with allergen. *Am.Rev.Respir.Dis.* 128:597-602.
6. Shaw RJ, Fitzharris P, Cromwell O, Wardlaw AJ, Kay AB. Allergen-induced release of sulphidopeptide leukotrienes (SRS-A) and LTB₄ in allergic rhinitis. *Allergy* 1985;40:1-6.
7. Linder A, Strandberg K, Deuschl H. Histamine concentrations in nasal secretion and secretory activity in allergic rhinitis. *Allergy* 1987;42:126-134.
8. Riechelmann H, Bachert C, Goldschmidt O, Hauswald B, Klimek L, Schlenker WW, Tasman AJ, Wagenmann M. Application of the nasal provocation test on diseases of the upper airways. Position paper of the German Society for Allergology and Clinical Immunology (ENT Section) in cooperation with the Working Team for Clinical Immunology. *Laryngorhinootologie* 2003;82:183-188.
9. Linder A. Symptom scores as measures of the severity of rhinitis. *Clin.Allergy* 1988;18:29-37.

10. Hytonen M, Sala E. Nasal provocation test in the diagnostics of occupational allergic rhinitis. *Rhinology* 1996;34:86-90.
11. Bachert C. Nasal Provocation Test: critical evaluation. In Vieluf. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, editor *New trends in allergy* 1997; IV:277-280.
12. Linder A.. Symptom scores as measures of the severity of rhinitis. *Clin.Allergy* 1988;18:29-37.
13. Ahman M, Holmstrom M. Nasal histamine reactivity in woodwork teachers. *Rhinology* 2000;38:114-119.
14. Andersson M, Andersson P, Pipkorn U. Allergen-induced specific and non-specific nasal reactions. Reciprocal relationship and inhibition by topical glucocorticosteroids. *Acta Oto-Laryngologica* 1989;107:270-277.
15. Andersson M, Svensson C, Persson C, Akerlund A, Greiff L. Dose-dependent effects of budesonide aqueous nasal spray on symptoms in a daily nasal allergen challenge model. *Ann.Allergy Asthma Immunol* 2000;85:279-283.
16. Avila PC, Abisheganaden JA, Wong H, Liu J, Yagi S, Schnurr D, Kishiyama JL, Boushey HA. Effects of allergic inflammation of the nasal mucosa on the severity of rhinovirus 16 cold. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:923-932.
17. Bachert C, Wagenmann M, Vossen-Holzenkamp S. Intranasal levocabastine provides fast and effective protection from nasal allergen challenge. *Rhinology* 1996;34:140-143.
18. Baroody FM, Ford S, Lichtenstein LM, Kagey-Sobotka A, Naclerio RM. Physiologic responses and histamine release after nasal antigen challenge. Effect of atropine. *Am.J Respir Crit Care Med* 1994;149:1457-1465.
19. Baroody FM, Assanasen P, Chung J, Naclerio RM. Hot, humid air partially inhibits the nasal response to allergen provocation. *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery* 2000;126:749-754.
20. Bellussi L, Marcucci F, Sensi LG, Passali GC, Lauriello M, Passali FM, Giannuzzi AL, Passali D. Do tryptase, ECP and specific IgE measurement by

nasal incubation increase the specific nasal provocation test sensitivity? *Int.J Immunopathol Pharmacol* 2004;17:201-208.

21. Bensch GW, Nelson HS, Borish LC. Evaluation of cytokines in nasal secretions after nasal antigen challenge: lack of influence of antihistamines. *Ann.Allergy Asthma Immunol* 2002;88:457-462.
22. Berkowitz, RB, Braker S, Lutz C, Jones P, Meeves S, Qiu C, Varghese ST, Georges G. Efficacy of fexofenadine in the prophylactic control of cat allergen-induced allergic rhinitis. *Ann.Allergy Asthma Immunol* 2006;96:327-333.
23. Bodtger U, Poulsen LK, Jacobi HH, Mailing HJ. The safety and efficacy of subcutaneous birch pollen immunotherapy - A one-year, randomised, double-blind placebo-controlled study. *Allergy* 2002;57:297-305.
24. Ciprandi G, Pronzato C, Ricca V, Passalacqua G, Bagnasco M, Canonica GW. Allergen-specific challenge induces intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1 or CD54) on nasal epithelial cells in allergic subjects. Relationships with early and late inflammatory phenomena. *Am.J.Respir.Crit Care Med* 1994;150:1653-1659.
25. Dave NK, McMahon SC, Grubbe RE, Bewtra AK, Hopp RJ, Nair NM, Smith J, Townley RG. A controlled, double-blind study of the effect of quazolast on nasal challenge with ragweed antigen. *Ann.Allergy* 1990;65:298-302.
26. Day, JH, Buckeridge DL, Clark RH, Briscoe MP, Phillips R. A randomized, double-blind, placebo-controlled, controlled antigen delivery study of the onset of action of aerosolized triamcinolone acetonide nasal spray in subjects with ragweed-induced allergic rhinitis. *J.Allergy Clin.Immunol* 1996;97:1050-1057.
27. Day JH, Briscoe M, Widlitz MD. Cetirizine, loratadine, or placebo in subjects with seasonal allergic rhinitis: Effects after controlled ragweed pollen challenge in an environmental exposure unit. *J.Allergy Clin.Immunol* 1998;101:638-645.
28. Doyle WJ, Skoner DP, Seroky JT, Fireman P, Gwaltney JM. Effect of experimental rhinovirus 39 infection on the nasal response to histamine and cold air challenges in allergic and nonallergic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 1994;93:534-542.

29. Dreskin SC, Dale SN, Foster SM, Martin D, Buchmeier A, Nelson HS. Measurement of changes in mRNA for IL-5 in noninvasive scrapings of nasal epithelium taken from patients undergoing nasal allergen challenge. *Journal of Immunological Methods* 2002;268:189-195.
30. Ewan PW, Alexander MM, Snape C, Ind PW, Agrell B, Dreborg S. Effective hyposensitization in allergic rhinitis using a potent partially purified extract of house dust mite. *Clinical Allergy* 1988;18:501-508.
31. Ferreira MB, Carlos AG. Anterior rhinomanometry in nasal allergen challenges. *Allerg.Immunol.(Paris)* 1998;30:295-297.
32. Flowers BK, Proud D, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM, Naclerio RM. Localized antigen challenge of the nasal mucosa. *Arch.Otolaryngol.Head Neck Surg* 1990;116:1407-1410.
33. Fransson M, Benson M, Wennergren G, Cardell LO. A role for neutrophils in intermittent allergic rhinitis. *Acta Oto-Laryngologica* 2004;124:616-620.
34. Frieri M, Madden J, Zitt M, Kumar NS, Knapik M. Late phase inflammation during nasal grass and ragweed challenge in a double-blind placebo controlled trial with astemizole. *American Journal of Rhinology* 1995;9:169-173.
35. Frieri M, Therattil J, Chavarria V, Cosachov J, Kumar NS, Wang SF, Sansone G, Etzel J, Dellevecchia D, Zitt M, Mesarina-Wicki B, Nolop KB. Effect of mometasone furoate on early and late phase inflammation in patients with seasonal allergic rhinitis. *Ann.Allergy Asthma Immunol* 1998;81:431-437.
36. Ganslmayer M, Spertini F, Rahm F, Terrien MH, Mosimann B, Leimgruber A. Evaluation of acoustic rhinometry in a nasal provocation test with allergen. *Allergy* 1999;54:974-979.
37. Garrelds I, de Graaf-in 't Veld M, Nahori MA, Vargaftig BB, van Wijk RG, Zijlstra FJ. Interleukin-5 and eosinophil cationic protein in nasal lavages of rhinitis patients. *European Journal of Pharmacology* 1995;275:295-300.

38. Gorski P, Wittczak T, Walusiak J, Palczynski C, Ruta U, Kuna P, Alam R. Eotaxin but not MCP-3 induces eosinophil influx into nasal fluid in allergic patients. *Allergy* 2002;57:519-528.
39. Hallen, H. and J.-E. Juto. Correlation between subjective and objective assessment of nasal hyperreactivity. *ORL* 1994;56:51-54.
40. Hanf G, Noga O, O'Connor A, Kunkel G. Omalizumab inhibits allergen challenge-induced nasal response. *Eur.Respir J* 2004;23:414-418.
41. Hilberg O. Effect of terfenadine and budesonide on nasal symptoms, olfaction, and nasal airway patency following allergen challenge. *Allergy* 1995;50:683-688.
42. Holmberg K, Bake B, Pipkorn U. Reflex activation in allergen-induced nasal mucosal vascular reactions. *Acta Otolaryngol* 1989;108:130-135.
43. Horak F, Stuebner P, Zieglmayer R, McWhirter CL, Gekkieva M. Efficacy and safety of ketotifen eye drops as adjunctive therapy to mometasone nasal spray in subjects with seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *Clinical Drug Investigation* 2003;23:597-604.
44. Horak F, Zieglmayer PU, Zieglmayer R, Kavina A, Lemell P. Levocetirizine has a longer duration of action on improving total nasal symptoms score than fexofenadine after single administration. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2005;60:24-31.
45. Juliusson S, Pipkorn U, Karlsson G, Enerback L. Mast cells and eosinophils in the allergic mucosal response to allergen challenge: changes in distribution and signs of activation in relation to symptoms. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90:898-909.
46. Kaulbach HC, Igarashi Y, Mullol J, White MV, Kaliner MA. Effects of nedocromil sodium on allergen-induced rhinitis in humans. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89:599-610.
47. Klaewsongkram J, Ruxrungtham K, Wannakrairot P, Ruangvejvorachai P, Phanupak P. Eosinophil count in nasal mucosa is more suitable than the number of. *International Archives of Allergy and Immunology* 2003;132:68-75.

48. Klementsson H, Andersson M, Baumgarten CR, Venge P, Pipkorn U. Changes in non-specific nasal reactivity and eosinophil influx and activation after allergen challenge. *Clin Exp.Allergy* 1990;20:539-547.
49. Klimek L, Wolf H, Mewes T, Dormann D, Reske-Kunz A, Schnitker J, Mann W. The effect of short-term immunotherapy with molecular standardized grass and rye allergens on eosinophil cationic protein and tryptase in nasal secretions. *J.Allergy Clin.Immunol* 1999;103:47-53.
50. Koh YI, Choi IS. Relationship between nasal and bronchial responsiveness in perennial allergic rhinitic patients with asthma. *Int.Arch.Allergy Immunol* 2002;129:341-347.
51. Krakowiak A, Ruta U, Gorski P, Kowalska S, Palczynski C. Nasal lavage fluid examination and rhinomanometry in the diagnostics of occupational airway allergy to laboratory animals. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* 2003;16:125-132.
52. Krouse JH, Shah AG, Kerswill K. Skin testing in predicting response to nasal provocation with alternaria. *Laryngoscope* 2004;114:1389-1393.
53. Krug N, Hohlfeld JM, Larbig M, Buckendahl A, Badorrek P, Geldmacher H, Behnke W, Dunkhorst W, Windt H, Loedding B, Luettig B, Koch W. Validation of an environmental exposure unit for controlled human inhalation studies with grass pollen in patients with seasonal allergic rhinitis. *Clin Exp.Allergy* 2003;33:1667-1674.
54. Kyrein HJ, Horak F, Nimberger G, Rehn D. Efficacy of intranasally applied dimethindene maleate solution as spray in adult volunteers with symptoms of seasonal allergic rhinitis in the Vienna Challenge Chamber. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research* 1996;46:794-799.
55. Lebel B, Bousquet J, Morel A, Chanal I, Godard P, Michel FB. Correlation between symptoms and the threshold for release of mediators in nasal secretions during nasal challenge with grass-pollen grains. *J.Allergy Clin.Immunol* 1988;82:869-877.

56. Linden M, Svensson C, Andersson E, Andersson M, Greiff L, Persson CG. Immediate effect of topical budesonide on allergen challenge-induced nasal mucosal fluid levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5. *Am.J.Respir.Crit Care Med* 2000;162:1705-1708.
57. Majchel AM, Proud D, Freidhoff L, Creticos PS, Norman PS, Naclerio RM. The nasal response to histamine challenge: Effect of the pollen season and immunotherapy. *J.Allergy Clin.Immunol* 1992;90:85-91.
58. Mori S, Fujieda S, Igarashi M, Fan GK, Saito H. Submucous turbinectomy decreases not only nasal stiffness but also sneezing and rhinorrhea in patients with perennial allergic rhinitis. *Clin Exp.Allergy* 1999;29:1542-1548.
59. Otsuka H, Mezawa A, Ohnishi M, Okubo K, Seki H, Okuda M. Changes in nasal metachromatic cells during allergen immunotherapy. *Clin.Exp.Allergy* 1991;21:115-119.
60. Pipkorn U. Budesonide and nasal allergen challenge testing in man. *Allergy* 1982;37:129-134.
61. Pipkorn U. The effect of budesonide on the immediate reaction to allergen challenge - a rhinomanometric study. *Eur.J Respir Dis.Suppl* 1982;122:185-91.
62. Pipkorn U, Proud D, Lichtenstein LM, Kagey-Sobotka A, Norman PS, Naclerio RM. Inhibition of mediator release in allergic rhinitis by pretreatment with topical glucocorticosteroids. *N.Engl.J Med* 1987;316:1506-1510.
63. Pipkorn U, Karlsson G, Enerback L. Nasal mucosal response to repeated challenges with pollen allergen. *American Review of Respiratory Disease* 1989;140:729-736.
64. Proud D, Naclerio RM, Meyers DA, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM, Valentine MD. Effects of a single-dose pretreatment with captopril on the immediate response to nasal challenge with allergen. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 1990;93:165-170.

65. Reinartz SM, Overbeek SE, KleinJan A, van Drunen CM, Braunstahl GJ, Hoogsteden HC, Fokkens WJ. Desloratadine reduces systemic allergic inflammation following nasal provocation in allergic rhinitis and asthma patients. *Allergy* 2005;60:1301-1307.
66. Riechelmann H, Epple B, Gropper G. Comparison of conjunctival and nasal provocation test in allergic rhinitis to house dust mite. *Int.Arch.Allergy Immunol* 2003;130:51-59.
67. Saengpanich S, Assanasen P, deTineo M, Haney L, Naclerio RM, Baroody FM. Effects of intranasal azelastine on the response to nasal allergen challenge. *Laryngoscope* 2002;112:47-52.
68. Saraclar Y, Sekerel BE, Kalayci O, Adalioglu G, Tuncer A. The effect of house dust mite specific immunotherapy on cysteinyl leukotriene production by blood leukocytes in subjects with perennial allergic rhinitis and asthma. *J Investig.Allergol Clin Immunol* 1998;8:98-104.
69. Sastre J, Fernandez-Nieto M, Rico P, Martin S, Barber D, Cuesta J, De Las HM, Quirce S. Specific immunotherapy with a standardized latex extract in allergic workers: A double-blind, placebo-controlled study. *J.Allergy Clin.Immunol* 2003;111:985-994.
70. Scadding GK, Darby YC, Austin CE. Effect of short-term treatment with fluticasone propionate nasal spray on the response to nasal allergen challenge. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1994;38:447-451.
71. Schmidt BM, Timmer W, Georgens AC, Hilt M, Mattinger C, Wurst W, Hormann K, Wehling M. The new topical steroid ciclesonide is effective in the treatment of allergic rhinitis. *J Clin Pharmacol* 1999;39:1062-1069.
72. Schwetz S, Olze H, Melchisedech S, Grigorov A, Latza R. Efficacy of pollen blocker cream in the treatment of allergic rhinitis. *Arch.Otolaryngol.Head Neck Surg* 2004;130:979-984.

73. Sim TC, Grant JA, Hilsmeier KA, Fukuda Y, Alam R. Proinflammatory cytokines in nasal secretions of allergic subjects after antigen challenge. *Am.J Respir Crit Care Med* 1994;149:339-344.
74. Simola M, Malmberg H. Sensation of nasal airflow compared with nasal airway resistance in patients with rhinitis. *Clinical Otolaryngology and Allied Sciences* 1997;22:260-262.
75. Simola M, Malmberg H. Nasal histamine reactivity; relationships to skin-test responses, allergen provocation and symptom severity in patients with long-continuing allergic rhinitis. *Acta Otolaryngol* 2000;120:67-71.
76. Spaeth J, Schultze V, Klimek L, Lengersdorf A, Mosges R. Azelastine reduces histamine-induced swelling of nasal mucosa. *ORL J Otorhinolaryngol.Relat Spec* 1996;58:157-163.
77. Stjarne P, Rinder J, Heden-blomquist E, Cardell LO, Lundberg J, Zetterstrom O, Anggard A. Capsaicin desensitization of the nasal mucosa reduces symptoms upon allergen challenge in patients with allergic rhinitis. *Acta Oto-Laryngologica* 1998;118:235-239.
78. Stubner P, Zieglmayer R, Horak F. A direct comparison of the efficacy of antihistamines in SAR and PAR: Randomised, placebo-controlled studies with levocetirizine and loratadine using an environmental exposure unit - The Vienna Challenge Chamber (VCC). *Curr.Med.Res.Opin* 2004;20:891-902.
79. Terrien MH, Rahm F, Fellrath JM, Spertini F. Comparison of the effects of terfenadine with fexofenadine on nasal provocation tests with allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:1025-1030.
80. Togias A, Lykens K, Kagey-Sobotka A, Eggleston PA, Proud D, Lichtenstein LM, Naclerio RM. Studies on the relationships between sensitivity to cold, dry air, hyperosmolal solutions, and histamine in the adult nose. *Am.Rev.Respir Dis* 1990;141:1428-1433.

81. Tonnel AB, Scherpereel A, Douay B, Mellin B, Leprince D, Goldstein N, Delecluse P, Andre C. Allergic rhinitis due to house dust mites: evaluation of the efficacy of specific sublingual immunotherapy. *Allergy* 2004;59:491-497.
82. Van Deusen MA, Angelini BL, Cordoro KM, Seiler BA, Wood L, Skoner DP. Efficacy and safety of oral immunotherapy with short ragweed extract. *Ann.Allergy Asthma Immunol* 1997;78:573-580.
83. Vancheri C, Mastruzzo C, Armato F, Tomaselli V, Magri S, Pistorio MP, Lamicela M, D'Amico L, Crimi N. Intranasal heparin reduces eosinophil recruitment after nasal allergen challenge in patients with allergic rhinitis. *J.Allergy Clin.Immunol* 2001;108:703-708.
84. Vitcheva D. Diagnosis of allergic rhinitis measured by acoustic rhinometry. *Acta Medica Bulgarica* 2004;31:32-36.
85. Voltolini S, Modena P, Minale P, Bignardi D, Troise C, Puccinelli P, Parmiani S. Sublingual immunotherapy in tree pollen allergy. Double-blind, placebo-controlled study with a biologically standardised extract of three pollens (alder, birch and hazel) administered by a rush schedule. *Allergologia et Immunopathologia* 2001;29:103-110.
86. Wagenmann M, Schumacher L, Bachert C. The time course of the bilateral release of cytokines and mediators after unilateral nasal allergen challenge. *Allergy* 2005;60:1132-1138.
87. Waitzinger J, Lenders H, Pabst G, Reh C, Ulbrich E. Three explorative studies on the efficacy of the antihistamine mebhydroline (Omeril). *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1995;33:373-383.
88. Wang DY, Goh DY, Ho AK, Chew FT, Yeoh KH, Lee BW. The upper and lower airway responses to nasal challenge with house-dust mite *Blomia tropicalis*. *Allergy* 2003;58:78-82.
89. Wedback A, Enbom H, Eriksson NE, Moverare R, Malcus L. Seasonal non-allergic rhinitis (SNAR)--a new disease entity? A clinical and immunological

comparison between SNAR, seasonal allergic rhinitis and persistent non-allergic rhinitis. *Rhinology* 2005;43:86-92.

90. Weido AJ, Reece LM, Alam R, Cook CK, Sim TC. Intranasal fluticasone propionate inhibits recovery of chemokines and other cytokines in nasal secretions in allergen-induced rhinitis. *Ann.Allergy Asthma Immunol* 1996;77:407-415.
91. Wuestenberg EG, Hauswald B, Huettenbrink KB. Thresholds in nasal histamine challenge in patients with allergic rhinitis, patients with hyperreflectory rhinopathy, and healthy volunteers. *Am.J Rhinol* 2004;18:371-375.
92. Resta O, Foschino MP, Picca V, Carnimeo N. Evaluation of the effects of ketotifen and clemastine against nasal provocation challenges with allergen. *Current Therapeutic Research - Clinical and Experimental* 1984;35:235-238.
93. Bousquet J, Van CP, Khaltaev N. 2001. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J.Allergy Clin.Immunol* 2001;108:S147-S334.
94. Dykewicz MS, Fineman S, Skoner DP, Nicklas R, Lee R, Blessing-Moore J, Li JT, Bernstein IL, Berger W, Spector S, Schuller D. Diagnosis and management of rhinitis: complete guidelines of the Joint Task Force on Practice Parameters in Allergy, Asthma and Immunology. American Academy of Allergy, Asthma, and Immunology. *Ann.Allergy Asthma Immunol* 1998;81:478-518.
95. Ng, M LS, Warlow RS, Chrishanthan N, Ellis C, Walls R. Preliminary criteria for the definition of allergic rhinitis: A systematic evaluation of clinical parameters in a disease cohort (I). *Clin.Exp.Allergy* 2000;30:1314-1331.

CHAPITRE 3

Rousseau MC, Boulay ME, Goronfolah L, Denburg J, Keith P, Boulet LP

**Comparative Responses to Nasal Allergen Challenge in Allergic
Rhinitic Subjects With or Without Asthma À soumettre**

Mise en contexte de l'étude

Les provocations allergéniques nasales peuvent être utilisées pour étudier la pathophysiologie de la rhinite allergique. Cependant, des provocations allergéniques répétées seraient possiblement plus représentatives d'une exposition naturelle. Cette étude consistait donc à déterminer l'effet d'une provocation allergénique répétée sur 4 jours sur des paramètres cliniques et inflammatoires de sujets rhinitiques avec et sans asthme. Des symptômes semblables ont été induits chez les 2 groupes de sujets, sauf pour l'écoulement nasal, davantage marqué chez les rhinitiques sans asthme, et la congestion nasale, davantage marquée chez les rhinitiques avec asthme. Une augmentation des éosinophiles dans les voies aériennes supérieures a été observée après 4 jours de provocations, mais pas dans les voies aériennes inférieures. Une augmentation du nombre de jours de provocation ou de la dose donnée pourrait améliorer le modèle et aider à mieux comprendre les mécanismes reliant l'inflammation des voies aériennes supérieures et inférieures.

Implication des auteurs

- J'ai recruté et évalué la plupart des sujets à Québec, j'ai analysé les données et écrit la majorité du manuscrit.
- Marie-Ève Boulay a élaboré le protocole, recruté et évalué quelques sujets à Québec et a été impliqué dans les analyses de données.
- Dr. Loie Goronfolah a évalué les sujet à Hamilton (McMaster University).
- Dr. Judah Denburg est un des investigateurs du projet.
- Dr. Paul Keith est un des investigateurs du projet et a participé aux analyses des lavages nasaux.
- Dr. Louis-Philippe Boulet est l'investigateur principal du projet.

TITLE: Comparative Responses to Nasal Allergen Challenge in Allergic Rhinitic Subjects With or Without Asthma

AUTHORS: Marie-Claire Rousseau¹, B.Sc.
Marie-Ève Boulay¹, M.Sc.
Loie Goronfolah², MD
Judah Denburg², MD, FRCP(C)
Paul Keith², MD, FRCP(C)
Louis-Philippe Boulet¹, MD, FRCP(C), FCCP

FROM: ¹Centre de recherche, Hôpital Laval
Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec
Québec, Québec, Canada
²McMaster University, Health Sciences, 1200 Main Street West,
Hamilton, ON, L8N 3Z5

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE:

Louis-Philippe Boulet, MD FRCPC FCCP
Institut de cardiologie et de pneumologie de l'Université Laval
2725, Chemin Sainte-Foy
Québec (Québec), Canada G1V 4G5

Tel.: 418-656-4747
Fax: 418-656-4762

KEYWORDS: *Asthma, allergic rhinitis, nasal allergen challenge*

SUPPORTED BY: AllerGen NCE Inc. Allergy, Genes and Environment Network

ABSTRACT

Background: Nasal allergen challenge can be used to study the pathophysiology of rhinitis, but since single dose challenge may not adequately approximate natural exposure, multiple challenges could be more helpful. **Objective:** To determine the effect of daily nasal allergen challenge over 4 consecutive days on clinical and inflammatory parameters in rhinitic subjects with or without asthma. **Methods:** Thirty two subjects with allergic rhinitis were recruited: 19 with mild asthma and 13 without asthma. Subjects underwent a nasal control challenge with normal saline followed by 4 consecutive daily allergen challenges. During each allergen challenge day, an allergen extract was sprayed into each nostril, beginning at the concentration pre-determined by skin titration (1:10,000 to non-diluted), until a positive nasal response occurred. Patients recorded their symptoms (nasal obstruction, rhinorrhea, sneezing, nasal itching and cough) on a Likert scale, as well as oral peak expiratory and nasal peak inspiratory flows, allowing an assessment of a nasal blockage index (NBI), for a period of 7 hours. Induced sputum and nasal lavage were done on control day and after 1 and 4 days of allergen challenges. **Results:** Compared with the control day, there was a significant increase in NBI and symptom scores 10 minutes after each last daily allergen exposure for the two groups ($p < 0.05$). No cumulative effect or any late response was observed in any of the 2 groups during the challenge period. NBI and symptom scores were similar for the 2 groups, except for nasal obstruction and rhinorrhea, which were more marked in subjects with asthma and rhinitis, respectively. An increase in eosinophils was observed in nasal lavage after 4 days of challenges in both groups, but not in induced sputum. **Conclusion:** Multiple nasal allergen challenges may be a useful tool to study the impact of interventions on nasal responses, and to study the pathophysiology of allergic rhinitis or its relationships with asthma.

INTRODUCTION

Asthma and rhinitis are two airway inflammatory diseases that often coexist in the same patient. Up to 80% of asthmatic patients also suffer from allergic rhinitis [1, 2] and the risk to develop asthma is almost three times higher among allergic rhinitic subjects compared to controls [3]. Asthma and allergic rhinitis involve common inflammatory mediators that may contribute both to upper and lower airway inflammation [4]. These epidemiological and pathophysiological observations support the concept of the 'United Airways' in which upper and lower airways should be considered as a continuum, rather than 2 distinct units. However, the mechanisms by which some rhinitic subjects will subsequently develop asthma are still to be understood.

Several techniques have been developed to study the clinical and pathophysiological mechanisms of allergic rhinitis. Among those being commonly used, are direct challenges to histamine or allergens and natural exposure models [5]. Nasal allergen challenge (NAC) is a classical model that has the advantage to reproduce a direct high dose allergen contact in a controlled setting, making possible the use of the same procedure for all subjects with standardized allergens. In comparison with challenges in exposure chambers, NAC helps to understand specifically the effect of challenging the upper airways on systemic or lower airway inflammation, since the allergen is delivered locally in the nose. This method seems therefore appropriate to study the link between an upper airway disease, such as allergic rhinitis, and a lower airway disease, such as asthma.

Single dose NAC may limit the efficiency of this model, since it may not reproduce the chronicity of a natural allergen exposure. In the past, conflicting results were obtained regarding the impact of upper airway inflammation on the induction of lower airway inflammation. Braunstahl *et al.* performed single nasal allergen challenge in rhinitic subjects without asthma, and observed a significant increase in eosinophils and in the expression of intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in nasal and bronchial biopsies [6]. However, Wilson *et al.* did not observe any increase in the number of eosinophils in induced sputum following a single nasal allergen challenge, despite an increase in ICAM-1 [7]. The need to find a model closer to natural allergen exposure has

lead to the development of repeated allergen challenges [8]. These challenges consist in performing a daily challenge with the chosen allergen and to repeat the procedure over a few consecutive days [8]. This type of challenge has previously been used to investigate the efficiency of different therapies in subjects suffering from seasonal allergic rhinitis [9, 10, 11], although they could also be helpful to determine the type of clinical response (e.g. nasal obstruction vs. rhinorrhea) and to compare these features in allergic rhinitics with or without asthma. Whether performing single or repeated NAC, it is difficult to establish an effective comparison between studies, considering that different types of allergens, challenge methods and assessment of symptoms scores have been used in the past, no standardized NAC method being available up to now.

It would be of interest to investigate the effect of a repeated allergen challenge model in rhinitic subjects with or without asthma, considering that, to our knowledge, no studies are available to compare nasal responses in these two different groups following a repeated NAC. This study could also help to compare the nasal response of these 2 groups in regard to a possible cumulative effect, the presence of a late response and the type of response. The aim of the present study was to compare the effects of a repeated daily NAC with perennial standardized allergens, on clinical and inflammatory parameters, between allergic rhinitic subjects with or without asthma.

METHODS

Subjects

Thirty-two non-smoking subjects were recruited: 19 had mild stable asthma associated to allergic rhinitis (A) and 13 allergic rhinitics (R) without asthma. Rhinitis was defined according to the ARIA guidelines [12]. All subjects had a positive reaction to cat hair and/or house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) aeroallergens on allergy skin prick tests and reported rhinitis symptoms when exposed to an environment containing this allergen. Asthma was defined according to the criteria proposed by the American Thoracic Society (ATS) [13]. At entry into the study, all subjects had baseline forced expiratory volume in one second (FEV₁) >70% predicted. Asthmatic subjects had a

provocative concentration of methacholine causing a 20% fall in FEV₁ (PC₂₀) ≤ 16 mg/mL and non-asthmatic subjects had a PC₂₀ >16 mg/mL.

Patients who had received oral or inhaled corticosteroids in the past 6 months, nasal corticosteroids in the past 3 months, and anti-inflammatory or antihistamine drugs in the past 7 days were excluded from the study. Asthmatic subjects did not use any rescue medication 7 h prior to each visit and 7 h following every challenge. None of the subjects experienced upper or lower respiratory tract infection within one month preceding beginning of the study. All subjects provided a written informed consent and the study was approved by the institutional Ethics Committee.

Study design

The study design is presented in Figure 1. The study was performed outside the pollen season. On a baseline visit, 2 to 7 days prior to control challenge, allergy skin prick tests and methacholine inhalation test were done. Prior to first allergen challenge, skin titration was done using dilutions of the allergen chosen for nasal challenges. Subsequent to baseline visit, a control challenge was done, followed, a week later, by repeated NACs. NACs were done over 4 consecutive days, in the morning. Nasal peak inspiratory flows (NPIF), oral peak expiratory flows (PEF), and symptoms were recorded at baseline and at regular intervals over 7 h post-challenge on each challenge day. Induced sputum and nasal lavage specimen were obtained 7 h following the control challenge and the first and last NAC.

Skin prick tests and titration

Atopy was determined using skin prick tests procedure for common aeroallergens. Normal saline and histamine were used as negative and positive controls, respectively. Skin wheal diameter was recorded at 10 min as the mean of 2 perpendicular measurements. A positive response was defined as a skin wheal diameter of 3-mm or more. The choice of the allergen for NAC, either cat hair or *D. pteronyssinus*, was based upon the intensity of the sensitisation, determined by skin prick tests, and questions about their rhinitis symptoms to these allergens.

Skin titration was done prior to allergen challenge in order to determine the starting allergen concentration for NAC. The titration was done in the same way as for skin prick tests, but using a series of dilutions of the chosen allergen. The procedure was done in duplicate. The starting concentration was the one giving a minimum of 2-mm wheal diameter.

Spirometry and methacholine inhalation test

Baseline FEV₁ and forced vital capacity (FVC) were measured according to the ATS criteria [14] and predicted values were obtained from Knudson [15]. Methacholine bronchial challenge was done as described by Juniper [16].

Nasal challenge

NAC was performed as previously described by Wilson *et al.* [7] using perennial allergens (cat hair or *D.pteronyssinus*; Omega Laboratories, Montreal, QC, Canada). Briefly, the nasal control challenge was done using 4 exposures of 0.9% saline at 10 min intervals in the same way as for allergens. Nasal allergen challenge was done using tenfold increasing concentrations of the allergen extract chosen, either cat hair or *D.pteronyssinus*, beginning with the concentration pre-determined by skin titration. Before spraying, subjects were asked to inhale through their mouth to total lung capacity and to hold their breath, in order to avoid lower airway contamination by the test agent [6, 17]. Then, one squirt (0.1 mL) of the starting concentration was sprayed into each nostril from a metered-dose pump spray (Aventis Pharma, Laval, QC, Canada).

Symptoms scores derived from: blockage 0-2 (absence = 0, moderate = 1, severe = 2), secretion 0-2 (absence = 0, moderate = 1, severe = 2), sneezing 0-2 (< 3 sneezes = 0, 3-5 sneezes = 1, > 5 sneezes = 2), itching eye or throat 0-1 (absence = 0, presence = 1), and conjunctivitis, cough, urticaria or dyspnea 0-1 (absence = 0, presence = 2), were recorded 10 min after each provocation. The total score of symptoms was calculating by adding up the score previously registered. The procedure was repeated with tenfold increasing concentrations until the highest concentration was given or a positive response occurred. A positive response was achieved when the total score of symptoms

reached a minimum of 3 points. If this was not obtained with the highest concentration, then the dose was increased by giving 2 squirts and, if necessary, 3 squirts in each nostril.

Nasal obstruction was measured quantitatively using NPIF and PEF before provocation and at determined time-points for 7 h post-provocation. At these same time-points, subjects evaluated the intensity of their symptoms for nasal obstruction, rhinorrhea, sneezing, nasal itching and cough. A score was given for each of these symptoms, using a 7-points Likert scale, graduated from 0 = Not troubled, to 6 = Severely troubled.

Peak Flows

NPIF was measured with a nasal peak flow meter (In Check, Clement-Clarke International Ltd, Harlow, Essex, UK), using the method previously described by Youlten [18]. The best of three measurements was recorded. The use of NPIF and PEF (Mini Wright Peak Flow Meter, Clement-Clarke) allowed obtaining the nasal blockage index (NBI), using a modified equation from Taylor *et al.* [19]:

$$\text{NBI} = \frac{\text{PEF} - \text{NPIF}}{\text{PEF}}$$

Induced Sputum

Sputum induction was performed using the method described by Pin *et al.* [20] and modified by Pizzichini *et al.* [21]. Sputum was processed within 2 h following induction. Briefly, mucus plugs were selected from saliva, weighed, treated with 4 times their volume of dithiothreitol (DTT) and rocked for 15 min. The reaction was stopped with an equal volume of Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS) 1X, filtered and counted to determine total cell count and viability. Suspension was adjusted to 1×10^6 cells/mL and 2 slides were prepared and stained with Diff-Quik for differential cell count. Following centrifugation, sputum supernatants were aliquoted and frozen.

Nasal Lavage

Nasal lavage was performed as described by Cormier *et al.* [22]. Briefly, subjects were in a sitting position with the neck flexed at 45° from horizontal. Subjects were asked to blow their nose before 5 mL of 0.9% saline solution were instilled into each nostril with a needleless syringe. Subjects the flexed the neck and expelled nasal lavage fluid into a sterile dish. Throughout the procedure, subjects were asked to refrain from breathing or swallowing.

Mediator measurements

The presence of eosinophilic cationic protein (ECP) in induced sputum and nasal wash supernatants was measured by ELISA kit (Measacup ECP, MBL International Corporation, Woburn, MA). ELISA was done according to manufacturer's instructions.

Statistical Analysis

Values are reported as mean \pm SEM. Two different statistical procedures were completed 1) to compare asthmatic to rhinitic subjects over a time course at specific visits 2) to compare asthmatic to rhinitic subjects over a time course from different visits. 1) Subjects were considered as random block effects. For each visit, values were measured at time 0, 10, 20 30, 45, 60, 90, 120 min, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, and 7 h. The statistical approach used was to perform a three-way repeated measures design where group and time were analysed as fixed factors. A symmetric component variance-covariance structure was defined to analyse repeated measurements as time points were not equally spaced. The multivariate normality was verified using the Mardia's test. 2) We considered subjects as random block effects. The statistical approach used was to perform a four-way doubly-repeated measures design where group, visit and time were analysed as fixed factors. The unstructured compound symmetry structure was used to analyse repeated measurements. Tukey's comparisons were preformed to compare visits and time points. The multivariate normality was verified using the Mardia's test. The results were considered significant with p-values \leq 0.05. The data were analysed using the statistical package program SAS v9.1.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC)

RESULTS

Subjects

The characteristics of the subjects are presented in Table 1. Age and baseline FEV₁ were similar between the 2 groups. Lower initial dilutions of allergen given for challenge were used for asthmatics compared to rhinitics. Allergens used for challenge were equally distributed within and between groups.

Nasal blockage index

Over the 4 challenge days, no difference in baseline NBI values was detected between and within subjects, irrespective of their group (Figure 2). On control day, no significant change in NBI was observed over time and the response was similar between groups. Ten minutes after obtaining a positive response on each allergen challenge day, an increased NBI value was observed for the two groups compared with baseline value ($p < 0.05$) and the response was similar for the 2 groups. Moreover, the comparison of each allergen challenge day with control day showed a significant increase in NBI from 10 min to 1.5 h post-challenge.

Symptoms scores

All subjects recorded their symptoms for a 7-h period post-challenge. In regard to nasal obstruction score, on control day, no symptoms were observed for any of the 2 groups. When comparing each allergen challenge day with control day, the score remained significantly increased until 90 min post-challenge for the 2 groups ($p < 0.05$). Overall, asthmatic subjects had a higher nasal obstruction score than rhinitics ($p = 0.04$).

No symptoms of rhinorrhea were observed on control day in any of the 2 groups, while a significant increase was observed until one hour post-challenge on each allergen challenge day, in comparison with control day, for both rhinitics and asthmatics ($p < 0.05$). Overall, subjects with rhinitis only had a higher rhinorrhea score than those with rhinitis and asthma ($p = 0.03$).

The nasal itching score was significantly increased until one hour following allergen challenge for rhinitics and for 30 min following challenge for asthmatics, compared with control day. Overall, no difference was observed between groups ($p > 0.05$).

No significant change for sneezing and cough symptoms scores were observed on any of the 4 allergen challenge days in the two groups, compared with control day. However, a limited number of subjects experimented cough symptoms at least at one time-point on allergen challenge days (A = 9/19 (47%) and R = 7/13 (54%)).

No late response was observed in any of the two groups during the challenge period.

Induced Sputum and nasal wash

Data for changes in inflammatory parameters after 1 and 4 days of nasal allergen challenges are presented in Table 2. There was no inflammatory change in the percentage of eosinophils and in ECP levels in induced sputum after both the first and last allergen challenges compared with control challenge. There was a significant increase in the percentage of eosinophils in nasal wash after 4 days of nasal allergen challenge in rhinitics and asthmatics compared with control challenge. The levels of ECP in nasal wash was significantly increased after 1 day of nasal allergen challenge in both groups, but not after 4 days.

DISCUSSION

Asthma is one of the most common respiratory diseases worldwide, affecting approximately 300 millions of people and its prevalence is still increasing[23]. Given that allergic rhinitis is a risk factor for the development of asthma, effective methods should be developed to study the mechanisms linking these two diseases. In this regard, nasal allergen challenge is a useful tool to study the specific effect of upper airway allergen stimulation on the lower airways. However, nasal challenges performed on a single occasion may not represent accurately a natural allergen exposure, leading to the development of multiple challenges, done over a few consecutive days, which could be more representative of the reality. This type of nasal challenge has been used in few

studies in the past [9-11, 24]. In these last, only allergic rhinitic subjects were recruited and three out of four were done to compare the effect of different types of rhinitis medications [9-11]. To our knowledge, the present study is the first to compare the effect of multiple NAC in rhinitic subjects with or without asthma. This study showed that this method is effective to induce rhinitis symptoms in these two groups.

One of the objective of this study was to determine how allergic rhinitic subjects with or without asthma would react following a multiple NAC, regarding the type and duration of induced symptoms. Our results showed that the two groups responded in the same way, except for nasal obstruction and rhinorrhea symptoms. Asthmatics were more likely to report nasal obstruction, whereas rhinitics had more symptoms of rhinorrhea. This is of interest, since nasal obstruction may lead to mouth breathing, allowing an increased quantity of allergens to penetrate into the lower airways, inducing inflammation, and potentially triggering asthma symptoms. At an early state of rhinitis, subclinical airway inflammation may lead to airway remodelling and contribute to the development of asthma.

The other objective was to compare the inflammatory response of allergic rhinitic subjects with and without asthma following a repeated nasal allergen challenge. No significant change in lower airway inflammation was observed, determined by sputum eosinophils and ECP. However, an increase in upper airway eosinophils was observed after 4 days of challenge in both groups. Since upper airway inflammation appeared only at the last challenge day, it could be of interest to continue this type of challenge over a few more days to be able to induce lower inflammation by stimulating upper airways.

Perennial allergens (cat hair and *D.pteronysinus*) were used to perform allergen challenges since these allergens are more associated with lower airway hyperreactivity [10] and lower airway inflammation than outdoor ones [25]. Therefore, it is of interest to observe the effect of upper airway challenge with perennial allergen on lower airway symptoms given that no study used perennial allergens to perform multiple nasal allergen challenges. A limited number of subjects experienced cough symptoms following nasal challenge, reflecting the link between upper airway stimulation and

lower airway symptoms. It could be interesting to study if rhinitic subjects experiencing these symptoms are more at risk to develop asthma than the others.

Several techniques have been used to deliver the allergen to the nose [26]. In our study, the nasal pump spray technique was used for two main reasons. First, it has the advantage of delivering the allergen over the entire nasal mucosa, instead of a localized area, as it can be observed, for example, with pipettes or paper discs [27]. Second, the exact quantity of solution sprayed into the nose is known. With the pump spray delivery method, no allergen should penetrate in the lower airways if the patient previously inhale to total lung capacity and hold their breath before spraying the solution [17]. Considering this, the results obtained in this study are the specific consequences of upper airway stimulation.

To be sure that the results were not influenced by outdoor allergens, subjects sensitized to seasonal allergens were tested out of the pollen season. Obviously, some indoor allergens, such as dust mites, cannot be avoided completely. In this regard, subjects were asked to keep their life habits as stable as possible throughout the study. In addition, the allergen challenge results were compared with the control challenge results, which were done in the same way. These precautions helped to better assess the specific effect of the allergens tested, independently of the presence of perennial allergens in subjects' environment.

The challenge was repeated over 4 consecutive mornings allowing to determine if there was a priming effect. The concept of priming is defined as an increase in the response to the same quantity of allergen [24]. In our study, this effect was not observed over the 4 days of challenge, in any of the two groups. Symptoms obtained following each challenge were similar to the challenges of the other days. These results do not agree with those obtained by Wachs *et al.* who observed, over three consecutive challenge days, a significant increase in the number of sneezes at each day compared with the previous one, revealing a priming effect for this symptom [24]. However, the dose administered, the type of allergens and the mode of administration were different from our study.

Furthermore, the development of late nasal or bronchial responses were not observed in the hours following challenge, even on last provocation days. Our results differ from those obtained by Pelikan *et al.*, who observed a bronchial late phase or delayed reaction in the majority of the subjects with a positive nasal challenge [28]. An extension in the collection of data over 7 h post-challenge could have been appropriate to observe a late response in some subjects.

In conclusion, this study showed that multiple nasal challenges with perennial allergens are effective to induce rhinitis symptoms in rhinitic subjects with or without asthma. We found no evidence of cumulative effect or late response after multiple nasal challenges in both groups. We think that this method could be useful to assess the effect of treatment on symptoms. However, future studies are needed to improve this protocol of repeated nasal allergen challenge to induce lower airway inflammation, maybe by extending the challenge period or increasing the dose given.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to acknowledge AllerGen NCE for their financial support and Serge Simard for the statistical analysis.

TABLE 1. Characteristics of subjects

	Rhinitics	Asthmatics
n	13	19
Age (years)	24 (19-32)	24 (19-41)
Gender (M : F)	7 : 6	5 : 14
Allergen used for NAC (Cat hair : <i>D.pteronyssinus</i>)	5 : 8	11 : 8
Initial dilution given (non-diluted, 1:10, 1:100, 1:1000)	1, 5, 2, 5	0, 3, 5, 11
FEV ₁ (% predicted)	108 (87-125)	103 (87-125)

Data are presented as mean (range)

FEV₁: Forced expiratory volume in one second

TABLE 2. Inflammatory parameters following nasal control challenge, and 1 and 4 days of nasal allergen challenges

Parameters	Rhinitics			Asthmatics		
	Control	Day 1	Day 4	Control	Day 1	Day 4
Induced sputum eosinophils (%)	2.0 ± 1.3	1.3 ± 1.5	1.6 ± 1.0	5.6 ± 1.8	6.0 ± 1.7	4.1 ± 1.4
Induced sputum ECP (ng/mL)	72 ± 20	112 ± 41	98 ± 36	146 ± 43	171 ± 41	242 ± 106
Nasal lavage eosinophils (%)	1.3 ± 0.9	3.0 ± 1.3	15.5 ± 9.6 *	2.1 ± 0.6	7.5 ± 4.3	15.7 ± 5.4*
Nasal lavage ECP (ng/mL)	4 ± 2	9 ± 3 *	8 ± 3	9 ± 3	10 ± 3 *	9 ± 4

Data are presented as means ± SEM

* p<0.05 vs control challenge

CAPTIONS

FIGURE 1. Study design. The protocol was divided into 3 different parts: a baseline visit, a control day (nasal challenge with 0.9% saline) and 4 consecutive days of nasal allergen challenge (days 1-4).

FIGURE 2. Effect of nasal challenge with saline (control day) or allergen (days 1-4) on NBI for rhinitics **(a)** and asthmatics **(b)** at 0 min and over 7 hours post-challenge. * $p < 0.05$; 0 min vs 10 min on days 1-4. ** $p < 0.05$; Control day vs days 1-4.

FIGURE 1

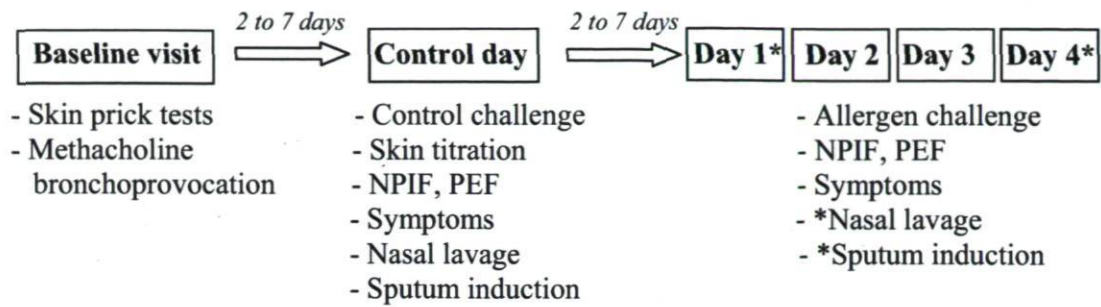
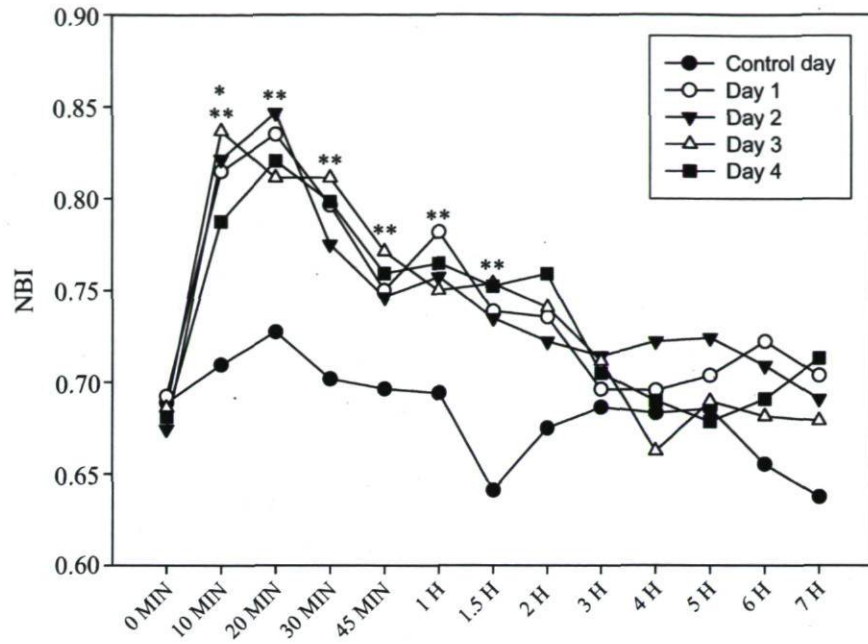
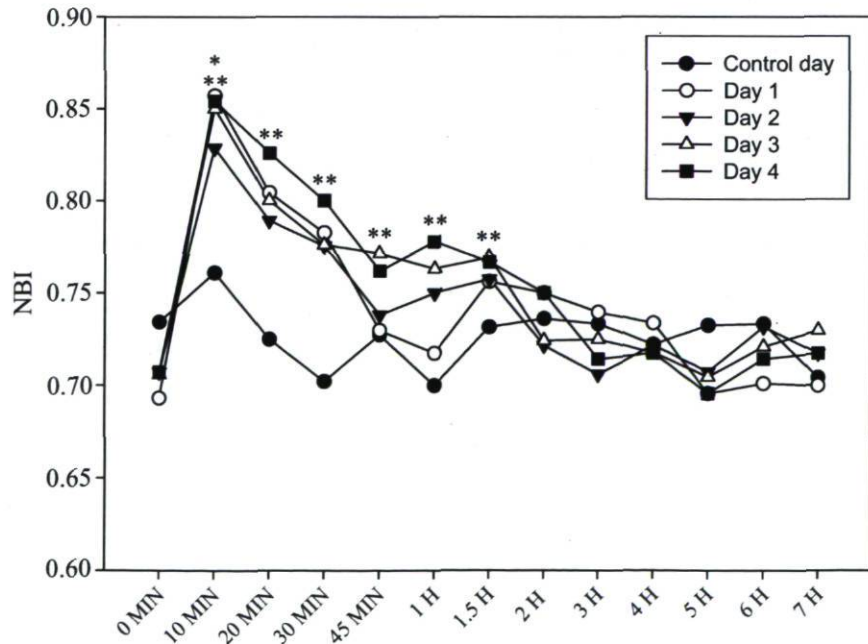


FIGURE 2

a)



b)



References

1. Leynaert B, Neukirch C, Liard R, Bousquet J, Neukirch F. Quality of life in allergic rhinitis and asthma . A population-based study of young adults. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1391-6.
2. Bugiani M, Carosso A, Migliore E, et al. Allergic rhinitis and asthma comorbidity in a survey of young adults in Italy. *Allergy* 2005;60:165-70.
3. Settipane RJ, Hagy GW, Settipane GA. Long-term risk factors for developing asthma and allergic rhinitis: a 23-year follow-up study of college students. *Allergy Proc* 1994;15:21-5.
4. Grossman J. One airway, one disease. *Chest* 1997;111:11S-16.
5. Day JH, Ellis AK, Rafeiro E, Ratz JD, Briscoe MP. Experimental models for the evaluation of treatment of allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006;96:263-78.
6. Braunstahl GJ, Overbeek SE, Kleinjan A, Prins JB, Hoogsteden HC, Fokkens WJ. Nasal allergen provocation induces adhesion molecule expression and tissue eosinophilia in upper and lower airways. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:469-76.
7. Wilson AM, Duong M, Crawford L, Denburg J. An evaluation of peripheral blood eosinophil/basophil progenitors following nasal allergen challenge in patients with allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2005;35:39-44.
8. De Bruin-Weller MS, Weller FR, De Monchy JGR. Repeated allergen challenge as a new research model for studying allergic reactions. *Clinical & Experimental Allergy* 1999;29:159-65.
9. Ahlstrom-Emanuelsson C, Persson CGA, Svensson C, et al. Establishing a model of seasonal allergic rhinitis and demonstrating dose-response to a topical glucocorticosteroid. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002;89:159-65.
10. Korsgren M, Andersson M, Borga O, et al. Clinical efficacy and pharmacokinetic profiles of intranasal and oral cetirizine in a repeated allergen challenge model of allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007;98:316-21.
11. Andersson M, Svensson C, Persson C, Akerlund A, Greiff L. Dose-dependent effects of budesonide aqueous nasal spray on symptoms in a daily nasal allergen challenge model. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000;85:279-83.
12. Bousquet J, van Cauwenberge P, Khaltaev N. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:S147-S334.
13. American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:225-44.

14. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, et al. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005;26:319-38.
15. Knudson RJ, Lebowitz MD, Holberg CJ, Burrows B. Changes in the normal maximal expiratory flow-volume curve with growth and aging. *Am Rev Respir Dis* 1983;725-34.
16. Juniper EF, Cockcroft DW, Hargreave FE. Histamine and metacholine inhalation test: a laboratory tidal breathing protocol. *Astra Draço AB* 1994;1-49.
17. Corren J, Adinoff AD, Irvin CG. Changes in bronchial responsiveness following nasal provocation with allergen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1992;89:611-8.
18. Youlten LJF. The peak nasal inspiratory flow meter: a new instrument for the assessment of the response to immunotherapy in seasonal allergic rhinitis. *Allergol Immunopathol* 1980;8:344.
19. Taylor G, Macneil AR, Freed DLJ. Assessing degree of nasal patency by measuring peak expiratory flow rate through the nose. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1973;52:193-8.
20. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992;47:25-9.
21. Pizzichini E, Pizzichini MMM, Efthimiadis A., et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproductibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:308-17.
22. Cormier Y, Laviolette M, Bedard G, Dosman J, Israel-Assayag E. Effect of route of breathing on response to exposure in a swine confinement building. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1512-21.
23. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 2004;59:469-78.
24. Wachs M, Proud D, Lichtenstein LM, Kagey-Sobotka A, Norman PS, Naclerio RM. Observations on the pathogenesis of nasal priming. *J Allergy Clin Immunol* 1989;84:492-501.
25. Boulay ME, Boulet LP. Influence of natural exposure to pollens and domestic animals on airway responsiveness and inflammation in sensitized non-asthmatic subjects. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;128:336-43.
26. Andersson M, Greiff L, Svensson C, Persson C. Various methods for testing nasal responses in vivo: a critical review. *Acta Otolaryngol* 1995;115:705-13.
27. Litvyakova LI, Baraniuk JN. Nasal provocation testing: a review. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001;86:355-65.

28. Pelikan Z. Asthmatic response induced by nasal challenge with allergen. *Int Arch Allergy Immunol* 2008;148:330-8.

CHAPITRE 4
CONCLUSIONS GÉNÉRALES

4.1 Résumé

La rhinite allergique et l'asthme sont 2 maladies inflammatoires des voies aériennes qui affectent un grand nombre de personnes dans notre société. Pour mieux comprendre l'influence de l'inflammation des voies aériennes supérieures sur l'inflammation des voies aériennes inférieures, un modèle de provocations allergéniques nasales multiples a été l'objet de la présente étude.

Tout d'abord, une revue de littérature a été effectuée à la recherche d'outils validés pour l'évaluation de symptômes lors de provocations allergéniques nasales. (Voir Chapitre 2) Parmi les 520 études répondant à nos critères de recherche, 81 instruments ont été répertoriés, provenant de 81 études différentes. Contrairement à notre hypothèse de départ, aucun outil validé n'a cependant été trouvé. Il a ainsi été constaté qu'une grande variété d'instruments est utilisée, mais qu'il y a une absence d'outils validés dans la littérature. Un outil d'évaluation des symptômes suite à une provocation allergénique nasale devrait être développé et validé. Cela permettrait de pouvoir mieux évaluer et comparer les études.

Dans le Chapitre 3, un projet a été présenté, portant sur la réponse symptomatique et inflammatoire de sujets rhinitiques avec ou sans asthme suite à une provocation allergénique nasale multiple. D'un point de vue symptomatique, l'écoulement nasal était plus important chez les sujets rhinitiques sans asthme alors que les sujets rhinitiques avec asthme présentaient davantage d'obstruction nasale. Ce modèle s'est révélé efficace pour induire des symptômes de rhinite qui perduraient 1,5 heure suivant la provocation chez ces 2 groupes, à tous les jours de provocation. Au niveau inflammatoire, une augmentation du pourcentage d'éosinophiles a été observée dans les voies aériennes supérieures après 4 jours de provocation dans les 2 groupes. Cependant, contrairement à l'hypothèse initiale, le pourcentage d'éosinophiles dans les voies aériennes inférieures est resté stable pour les 2 groupes. Puisque le modèle s'est révélé efficace dans l'induction des symptômes, mais que cela ne s'est pas traduit par une augmentation de l'inflammation, tout indique que ce modèle pourrait être amélioré afin de mieux représenter ce qui se passe lors d'une réaction allergique naturelle.

4.2 Discussion

Il a été démontré, au Chapitre 2, que plusieurs études ont été réalisées sur les provocations allergéniques nasales. Toutefois, elles utilisent des méthodes différentes pour évaluer l'amplitude et la diversité des symptômes. Bien que les provocations allergéniques nasales soient utilisées par plusieurs équipes de recherche, il est difficile de comparer les études entre elles car chacune des équipes possède son propre modèle. Suite à ces observations, au Chapitre 3, un modèle de provocation allergénique nasale multiple a été élaboré. Ce modèle pourra être amélioré et servir de référence pour la création d'un modèle qui devra être standardisé.

Le modèle de provocations allergéniques nasales multiples développé pourrait être utilisé dans de prochaines études pour étudier les mécanismes reliant l'inflammation des voies aériennes supérieures et inférieures. Ce modèle présente plusieurs avantages : il est facile à utiliser, cause peu d'inconvénients aux sujets de recherche et demande peu d'équipements spécialisés.

L'étude présentée au Chapitre 3 a été la première à utiliser les provocations allergéniques nasales multiples pour comparer les réponses symptomatiques et inflammatoires de sujets rhinitiques avec et sans asthme. Bien qu'un profil symptomatique différent a été observé entre les 2 groupes, aucune différence au niveau inflammatoire n'a été obtenue entre les 2 groupes. Il serait toutefois possible d'améliorer le modèle afin de caractériser plus efficacement le type de réponse chez ces 2 groupes de sujets. Parmi les améliorations possibles, notons le développement d'une méthode validée et standardisée et l'optimisation des doses à donner et du nombre de jours durant lesquels il faudrait répéter la provocation nasale. Cela permettrait de reproduire davantage une provocation allergénique naturelle, tout en restant dans un milieu contrôlé.

4.3 Perspectives

En conclusion, il serait important d'améliorer les modèles de provocations allergéniques nasales afin de reproduire le plus fidèlement possible les réactions naturelles. Il faut en

effet continuer la recherche sur le lien existant entre la rhinite allergique et l'asthme. Une meilleure connaissance des mécanismes reliant l'inflammation des voies aériennes supérieures et inférieures nous permettrait peut-être de prévenir l'apparition de ces maladies chez les sujets prédisposés ou encore de mieux contrôler les symptômes chez les personnes atteintes.

RÉFÉRENCES

1. The Prevention and Management of Asthma in Canada. 2000.
2. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 2004;59:469-78.
3. Statistique Canada. 2006.
4. Krahn MD, Berka C, Langlois P, Detsky AS. Direct and indirect costs of asthma in Canada, 1990. *CMAJ* 1996;154:821-31.
5. Cisternas MG, Blanc PD, Yen IH, et al. A comprehensive study of the direct and indirect costs of adult asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2003;111:1212-8.
6. Settipane RJ, Hagy GW, Settipane GA. Long-term risk factors for developing asthma and allergic rhinitis: a 23-year follow-up study of college students. *Allergy Proc* 1994;15:21-5.
7. Burke W, Fesinmeyer M, Reed K, Hampson L, Carlsten C. Family history as a predictor of asthma risk. *Am J Prev Med* 2003;24:160-9.
8. Vercelli D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat Rev Immunol* 2008;8:169-82.
9. Kere J. Mapping and identifying genes for asthma and psoriasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2005;360:1551-61.
10. Van EP, Little RD, Dupuis J, et al. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* 2002;418:426-30.
11. Allen M, Heinzmann A, Noguchi E, et al. Positional cloning of a novel gene influencing asthma from chromosome 2q14. *Nat Genet* 2003;35:258-63.
12. Zhang Y, Leaves NI, Anderson GG, et al. Positional cloning of a quantitative trait locus on chromosome 13q14 that influences immunoglobulin E levels and asthma. *Nat Genet* 2003;34:181-6.
13. Laitinen T, Polvi A, Rydman P, et al. Characterization of a common susceptibility locus for asthma-related traits. *Science* 2004;304:300-4.
14. Postma DS. Gender differences in asthma development and progression. *Gend Med* 2007;4 Suppl B:S133-S146.
15. King ME, Mannino DM, Holguin F. Risk factors for asthma incidence. A review of recent prospective evidence. *Panminerva Med* 2004;46:97-110.
16. Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J* 2008;31:143-78.

17. Boulet LP, Boulet V, Milot J. How should we quantify asthma control? A proposal. *Chest* 2002;122:2217-23.
18. Boulet LP, Becker A, Berube D, Beveridge R, Ernst P. Canadian Asthma Consensus Report, 1999. Canadian Asthma Consensus Group. *CMAJ* 1999;161:S1-61.
19. Pelaia G, Vatrella A, Gallelli L, et al. Respiratory infections and asthma. *Respir Med* 2006;100:775-84.
20. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, et al. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005;26:319-38.
21. Juniper EF, Cockcroft DW, Hargreave FE. Histamine and metacholine inhalation test: a laboratory tidal breathing protocol. *Astra Draco AB* 1994;1-49.
22. Becker A, Lemiere C, Berube D, et al. Summary of recommendations from the Canadian Asthma Consensus guidelines, 2003. *CMAJ* 2005;173:S3-11.
23. Currie GP, Jackson CM, Lipworth BJ. Does bronchial hyperresponsiveness in asthma matter? *J Asthma* 2004;41:247-58.
24. Hamid Q. Gross pathology and histopathology of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:431-2.
25. Hegele RG. The pathology of asthma: brief review. *Immunopharmacology* 2000;48:257-62.
26. Boulet LP. *L'asthme*. Les Presses de l'Université Laval 1997;388 pages.
27. Busse WW, Lemanske RF Jr. Asthma. *N Engl J Med* 2001;344:350-62.
28. Malakauskas K, Bajoriuniene I. Nonspecific bronchial hyperreactivity in asthma patients with or without allergic rhinitis. *Medicina (Kaunas)* 2003;39:237-43.
29. Brown JL, Behndig AF, Sekerel BE, et al. Lower airways inflammation in allergic rhinitis: a comparison with asthmatics and normal controls. *Clin Exp Allergy* 2007;37:688-95.
30. Braunstahl GJ, Fokkens WJ, Overbeek SE, Kleinjan A, Hoogsteden HC, Prins JB. Mucosal and systemic inflammatory changes in allergic rhinitis and asthma: a comparison between upper and lower airways. *Clin Exp Allergy* 2003;33:579-87.
31. Kay AB. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Trends Mol Med* 2005;11:148-52.
32. Flood-Page P, Menzies-Gow A, Phipps S, et al. Anti-IL-5 treatment reduces deposition of ECM proteins in the bronchial subepithelial basement membrane of mild atopic asthmatics. *J Clin Invest* 2003;112:1029-36.

33. Tatar M, Petriskova J, Zucha J, et al. Induced sputum eosinophils, bronchial reactivity, and cough sensitivity in subjects with allergic rhinitis. *J Physiol Pharmacol* 2005;56 Suppl 4:227-36.
34. Foresi A, Leone C, Pelucchi A, et al. Eosinophils, mast cells, and basophils in induced sputum from patients with seasonal allergic rhinitis and perennial asthma: relationship to methacholine responsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:58-64.
35. Choi SH, Kim DK, Yu J, Yoo Y, Koh YY. Bronchial responsiveness to methacholine and adenosine 5'-monophosphate in young children with asthma: their relationship with blood eosinophils and serum eosinophil cationic protein. *Allergy* 2007;62:1119-24.
36. Leckie MJ, ten BA, Khan J, et al. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 2000;356:2144-8.
37. Green RH, Brightling CE, McKenna S, et al. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360:1715-21.
38. Jayaram L, Pizzichini MM, Cook RJ, et al. Determining asthma treatment by monitoring sputum cell counts: effect on exacerbations. *Eur Respir J* 2006;27:483-94.
39. Barnes PJ. Pathophysiology of asthma. *Br J Clin Pharmacol* 1996;42:3-10.
40. Douwes J, Gibson P, Pekkanen J, Pearce N. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax* 2002;57:643-8.
41. Gibson PG, Simpson JL, Saltos N. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma : evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest* 2001;119:1329-36.
42. Ennis M. Neutrophils in asthma pathophysiology. *Curr Allergy Asthma Rep* 2003;3:159-65.
43. Shaw DE, Berry MA, Hargadon B, et al. Association between neutrophilic airway inflammation and airflow limitation in adults with asthma. *Chest* 2007;132:1871-5.
44. Rossi GL, Olivieri D. Does the mast cell still have a key role in asthma? *Chest* 1997;112:523-9.
45. Casale TB, Wood D, Richerson HB, Zehr B, Zavala D, Hunninghake GW. Direct evidence of a role for mast cells in the pathogenesis of antigen-induced bronchoconstriction. *J Clin Invest* 1987;80:1507-11.
46. Casale TB, Wood D, Richerson HB, et al. Elevated bronchoalveolar lavage fluid histamine levels in allergic asthmatics are associated with methacholine bronchial hyperresponsiveness. *J Clin Invest* 1987;79:1197-203.

47. Bradding P, Roberts JA, Britten KM, et al. Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor-alpha in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994;10:471-80.
48. Peters-Golden M. The alveolar macrophage: the forgotten cell in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;31:3-7.
49. Fuller RW. Asthma. Macrophages. *Br Med Bull* 1992;48:65-71.
50. Baraldo S, Lokar OK, Turato G, Zuin R, Saetta M. The Role of Lymphocytes in the Pathogenesis of Asthma and COPD. *Curr Med Chem* 2007;14:2250-6.
51. Olivenstein R, Taha R, Minshall EM, Hamid QA. IL-4 and IL-5 mRNA expression in induced sputum of asthmatic subjects: comparison with bronchial wash. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:238-45.
52. Larche M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:450-63.
53. Gershwin LJ. Effects of allergenic extracts on airway epithelium. *Curr Allergy Asthma Rep* 2007;7:357-62.
54. Tai HY, Tam MF, Chou H, et al. Pen h 13 allergen induces secretion of mediators and degradation of occludin protein of human lung epithelial cells. *Allergy* 2006;61:382-8.
55. Wan H, Winton HL, Soeller C, et al. Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *J Clin Invest* 1999;104:123-33.
56. Tliba O, Amrani Y, Panettieri RA, Jr. Is airway smooth muscle the "missing link" modulating airway inflammation in asthma? *Chest* 2008;133:236-42.
57. Lazaar AL, Panettieri RA, Jr. Airway smooth muscle as a regulator of immune responses and bronchomotor tone. *Clin Chest Med* 2006;27:53-69, vi.
58. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1720-45.
59. Benayoun L, Pretolani M. Airway remodeling in asthma: mechanisms and therapeutic perspectives. *Med Sci (Paris)* 2003;19:319-26.
60. Bousquet J, van Cauwenberge P, Khaltayev N. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:S147-S334.
61. Bousquet J, Khaltayev N, Cruz AA, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy* 2008;63 Suppl 86:8-160.
62. Reed SD, Lee TA, McCrory DC. The economic burden of allergic rhinitis: a critical evaluation of the literature. *Pharmacoeconomics* 2004;22:345-61.

63. Shedden A. Impact of nasal congestion on quality of life and work productivity in allergic rhinitis: findings from a large online survey. *Treat Respir Med* 2005;4:439-46.
64. Dykewicz MS, Fineman S, Skoner DP, et al. Diagnosis and management of rhinitis: complete guidelines of the Joint Task Force on Practice Parameters in Allergy, Asthma and Immunology. American Academy of Allergy, Asthma, and Immunology. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998;81:478-518.
65. Szeinbach SL, Harpe SE, Williams PB, Elhefni H. Testing for allergic disease: parameters considered and test value. *BMC Fam Pract* 2008;9:47.
66. Gosepath J, Amedee RG, Mann WJ. Nasal provocation testing as an international standard for evaluation of allergic and nonallergic rhinitis. *Laryngoscope* 2005;115:512-6.
67. Kleinjan A, Willart M, van Rijt LS, et al. An essential role for dendritic cells in human and experimental allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:1117-25.
68. Benson M, Adner M, Cardell LO. Cytokines and cytokine receptors in allergic rhinitis: how do they relate to the Th2 hypothesis in allergy? *Clin Exp Allergy* 2001;31:361-7.
69. Adamko D, Lacy P, Moqbel R. Mechanisms of eosinophil recruitment and activation. *Curr Allergy Asthma Rep* 2002;2:107-16.
70. Silberstein DS. Eosinophil function in health and disease. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995;19:47-77.
71. Smurthwaite L, Durham SR. Local IgE synthesis in allergic rhinitis and asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2002;2:231-8.
72. Brown JM, Wilson TM, Metcalfe DD. The mast cell and allergic diseases: role in pathogenesis and implications for therapy. *Clin Exp Allergy* 2007;38:4-18.
73. Grossman J. One airway, one disease. *Chest* 1997;111:11S-16.
74. Leynaert B, Bousquet J, Neukirch C, Liard R, Neukirch F. Perennial rhinitis: An independent risk factor for asthma in nonatopic subjects: results from the European Community Respiratory Health Survey. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:301-4.
75. Leynaert B, Neukirch C, Kony S, et al. Association between asthma and rhinitis according to atopic sensitization in a population-based study. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:86-93.
76. Settipane RJ, Hagy GW, Settipane GA. Long-term risk factors for developing asthma and allergic rhinitis: a 23-year follow-up study of college students. *Allergy Proc* 1994;15:21-5.

77. Corren J. Allergic rhinitis and asthma: how important is the link? *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:S781-S786.
78. Togias A. Mechanisms of nose-lung interaction. *Allergy* 1999;54 Suppl 57:94-105.
79. Canonica GW. Evaluation and management of patients with asthma and allergic rhinitis: exploring the potential role for leukotriene receptor antagonists. *Clin Exp All Rev* 2003;3:61-2.
80. Boulet LP, Gauvreau G, Boulay ME, O'Byrne P, Cockcroft DW. The allergen bronchoprovocation model: an important tool for the investigation of new asthma anti-inflammatory therapies. *Allergy* 2007;62:1101-10.
81. O'Byrne PM, Gauvreau GM, Brannan JD. Provoked models of asthma: what have we learnt? *Clin Exp Allergy* 2009;39:181-92.
82. Boulay ME, Boulet LP. Lower airway inflammatory responses to repeated very-low-dose allergen challenge in allergic rhinitis and asthma. *Clin Exp Allergy* 2002;32:1441-7.
83. Demoly P, Campbell A, Lebel B, Bousquet J. Experimental models in rhinitis., 29 Edn 1999.
84. Akerlund A, Andersson M, Leflein J, Lildholdt T, Mygind N. Clinical trial design, nasal allergen challenge models, and considerations of relevance to pediatrics, nasal polyposis, and different classes of medication. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:S460-S482.
85. Braunstahl GJ, Overbeek SE, Kleinjan A, Prins JB, Hoogsteden HC, Fokkens WJ. Nasal allergen provocation induces adhesion molecule expression and tissue eosinophilia in upper and lower airways. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:469-76.
86. Wilson AM, Duong M, Crawford L, Denburg J. An evaluation of peripheral blood eosinophil/basophil progenitors following nasal allergen challenge in patients with allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2005;35:39-44.