

US EPA ARCHIVE DOCUMENT

Background Materials for *Ezratty* (2014)**TABLE OF CONTENTS**

1. Table of Contents.....	p. 1
2. Article: <i>Ezratty</i> (2014).....	pp. 2-7
3. EPA Science Review of <i>Ezratty</i>	pp. 8-19
4. EPA Ethics Review of <i>Ezratty</i>	pp. 20-24
a. Appendix 1: Protocol, Consent Form, and Ethics Approvals (French).....	pp. 25-96
b. Appendix 2: Protocol Section XV and Consent Form (English translation).....	pp. 97-104

Repeated Nitrogen Dioxide Exposures and Eosinophilic Airway Inflammation in Asthmatics: A Randomized Crossover Study

Véronique Ezratty,¹ Gaëlle Guillosoy,¹ Catherine Neukirch,² Monique Dehoux,³ Serge Koscielny,⁴ Marcel Bonay,⁵ Pierre-André Cabanes,¹ Jonathan M. Samet,⁶ Patrick Mure,⁷ Luc Ropert,⁷ Sandra Tokarek,⁷ Jacques Lambrozo,¹ and Michel Aubier²

¹Service des Etudes Médicales (SEM), EDF, Levallois-Perret, France; ²Service de Pneumologie A, Clinical Center of Investigation, Inserm U700, Bichat Hospital, Université Paris Diderot, DHU FIRE, Paris, France; ³Laboratoire de Biochimie, Bichat Hospital, Paris, France; ⁴Service de biostatistiques et épidémiologie, Gustave Roussy, Villejuif, France; ⁵Department of Physiology, Bichat Hospital, Paris, France; ⁶Department of Preventive Medicine, Keck School of Medicine of the University of Southern California, Los Angeles, Los Angeles, California, USA; ⁷Center for Research & Innovation in Gas and New Energy Sources, CRIGEN, GDF SUEZ, St-Denis, France

BACKGROUND: Nitrogen dioxide (NO₂), a ubiquitous atmospheric pollutant, may enhance the asthmatic response to allergens through eosinophilic activation in the airways. However, the effect of NO₂ on inflammation without allergen exposure is poorly studied.

OBJECTIVES: We investigated whether repeated peaks of NO₂, at various realistic concentrations, induce changes in airway inflammation in asthmatics.

METHODS: Nineteen nonsmokers with asthma were exposed at rest in a double-blind, crossover study, in randomized order, to 200 ppb NO₂, 600 ppb NO₂, or clean air once for 30 min on day 1 and twice for 30 min on day 2. The three series of exposures were separated by 2 weeks. The inflammatory response in sputum was measured 6 hr (day 1), 32 hr (day 2), and 48 hr (day 3) after the first exposure, and compared with baseline values measured twice 10–30 days before the first exposure.

RESULTS: Compared with baseline measurements, the percentage of eosinophils in sputum increased by 57% after exposure to 600 ppb NO₂ ($p = 0.003$) but did not change significantly after exposure to 200 ppb. The slope of the association between the percentage of eosinophils and NO₂ exposure level was significant ($p = 0.04$). Eosinophil cationic protein in sputum was highly correlated with eosinophil count and increased significantly after exposure to 600 ppb NO₂ ($p = 0.001$). Lung function, which was assessed daily, was not affected by NO₂ exposure.

CONCLUSIONS: We observed that repeated peak exposures of NO₂ performed without allergen exposure were associated with airway eosinophilic inflammation in asthmatics in a dose-related manner.

CITATION: Ezratty V, Guillosoy G, Neukirch C, Dehoux M, Koscielny S, Bonay M, Cabanes PA, Samet JM, Mure P, Ropert L, Tokarek S, Lambrozo J, Aubier M. 2014. Repeated nitrogen dioxide exposures and eosinophilic airway inflammation in asthmatics: a randomized crossover study. *Environ Health Perspect* 122:850–855; <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1307240>

Introduction

Nitrogen dioxide (NO₂), a ubiquitous atmospheric pollutant, is a respiratory irritant that remains a matter of concern [World Health Organization (WHO) European Centre for Environment and Health and WHO Regional Office for Europe 2013]. Indoor concentrations of NO₂ often exceed those found outdoors, especially when unvented combustion appliances are used. Inside homes, peak levels of NO₂, associated with the use of gas and solid-fuel appliances for cooking and heating, have been measured in the range of 80–1,100 ppb (150–2,090 µg/m³) (Basu and Samet 1999; Dennekamp et al. 2001; Kotzias et al. 2005; Pilotto et al. 1997). Outdoors, hourly NO₂ concentrations in cities rarely exceed 200 ppb (380 µg/m³) (U.S. Environmental Protection Agency 2008), although urban levels can reach levels as high as 500 ppb (950 µg/m³) (WHO 2006), especially for short periods in streets with heavy traffic and in road tunnels (Larsson et al. 2010).

Epidemiological and controlled human exposure studies suggest that people with asthma are more susceptible to the effects of

NO₂ when compared with healthy individuals (Bauer et al. 1986; Belanger et al. 2006; Bylin et al. 1988; Hasselblad et al. 1992; Jorres and Magnussen 1990; Strand et al. 1996).

However, despite the extensive literature on NO₂-induced health effects, some inconsistencies in the results of studies have been noted (Jarvis et al. 2010). In asthmatics, NO₂ exposure without allergen challenge did not result in lung functional changes in most studies (Avol et al. 1988; Kleinman et al. 1983; Linn et al. 1986; Mohsenin 1987), and inconsistent results were found in airway responsiveness after nonspecific bronchoconstrictor challenges (Bylin et al. 1988; Hazucha et al. 1983; Jorres and Magnussen 1991; Kleinman et al. 1983; Roger et al. 1990; Strand et al. 1996). After allergen challenge, exposure to NO₂ in asthmatics increased airway hyperresponsiveness (Jenkins et al. 1999; Strand et al. 1997, 1998; Tunnicliffe et al. 1994) and eosinophilic inflammation (Barck et al. 2002, 2005).

A few studies have investigated the inflammatory response to a single exposure of NO₂ without allergen challenge in asthmatics, but the findings have been

inconsistent (Jorres et al. 1995; Solomon et al. 2004; Vagaggini et al. 1996).

We investigated whether repeated brief exposures to 200 ppb (380 µg/m³) and 600 ppb (1,130 µg/m³) NO₂, which mimic indoor NO₂ peaks, enhance airway inflammation in asthmatics. This clinical study involved 19 adults with intermittent asthma and used a randomized double-blind protocol with assessment of inflammatory response in induced sputum.

Materials and Methods

Participants. Nineteen patients [14 men and 5 women; median age, 29 years; age range, 20–69 years; median body mass index (BMI), 26 kg/m²; BMI range, 20–39 kg/m²] were included in the study (Table 1). All had intermittent asthma as defined by the Global Initiative for Asthma (2010) guidelines and were nonsmokers (18 had never smoked and 1 had stopped smoking some 10 years earlier).

Address correspondence to V. Ezratty, Service des Etudes Médicales (SEM), EDF–DRH GROUPE, 45 rue Kleber, Site Carré Vert, 92300 Levallois-Perret, France. Telephone: 00 33 (1) 82 24 84 43. E-mail: veronique.ezratty@edf.fr

Supplemental Material is available online (<http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1307240>).

We thank the following for their contributions: I. Poirier, H. Casterman, S. Billot-Bonef, M. Bonnet-Belfais, E. Pigeon, S. Maestri, B. Vandercastele, L. Alavoine, L. Nardelli, A. Boulmeau, L. Dejoie, Y. Retory, S. de Ferrières, and D. Ormandy. All statistical analyses were performed by S. Koscielny, Service de biostatistiques et épidémiologie, Gustave Roussy, Villejuif, France.

This study was supported by the Center for Research & Innovation in Gas and New Energy Sources, CRIGEN, GDF SUEZ; the Medical Studies Department of EDF; and the Clinical Center of Investigation at Bichat Hospital, Paris, France.

The authors' freedom to design, conduct, interpret and submit for publication the research described in this work was not compromised by any of the funding bodies.

V.E., G.G., P.-A.C., and J.L. are employed by EDF, Service des Etudes Médicales (SEM), Levallois-Perret, France. P.M., L.R., and S.T. are employed by GDF-SUEZ, Center for Research & Innovation in Gas and New Energy Sources CRIGEN, St-Denis, France. The other authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Received: 18 June 2013; Accepted: 15 April 2014; Advance Publication: 18 April 2014; Final Publication: 1 August 2014.

Only patients who had a diagnosis of asthma confirmed by a positive methacholine challenge performed twice at baseline 10–30 days before the first exposure were included in the study. A positive methacholine test was defined as a methacholine provocative dose causing a 20% decrease in forced expiratory volume in 1 sec (FEV₁) from control FEV₁ (PD₂₀ methacholine) < 4 mg. All participants had allergy to house dust mites (HDM) and/or pollen confirmed by a positive skin-prick test done ≥ 4 weeks before their inclusion in the study. The study was performed outside the pollen season for those who had been diagnosed with pollen allergies. Of the 19 participants, 6 had a personal history of atopic dermatitis and/or an atopic familial history. None of those six used inhaled or oral corticosteroids or other antiinflammatory therapy, and the only permitted medication was an inhaled β₂-agonist, used as needed during the study period (from baseline, i.e., 30 days before the first NO₂ exposure until the end of the study 2 weeks after the last exposure). Participants who had gas stoves and/or unvented combustion appliances at home were told not to use them at baseline and on the days of exposures and during the 2 days before and after NO₂ exposure. All participants had to be free of airway infection for at least 6 weeks before baseline measurements.

The study was registered by the French Ministry of Health (DGS 2006/0016) and approved by the Ethics Committee of Hotel-Dieu Hospital, Paris, France (project 0611398, registered on 28 February 2007). All participants signed informed consent forms before enrollment in the study.

Study design. The study had a double-blind, crossover design, with each participant

acting as his or her own control. For each participant, the study involved three series each of three exposures at rest: one series to clean air, one series to 200 ppb (380 μg/m³) NO₂, and one series to 600 ppb (1,130 μg/m³) NO₂. The order of the three series of exposures was randomized (Figure 1). The design for each series of exposures with the timing of pulmonary function testing, and sputum inductions from day 1 to day 3 is described in Figure 2. For each series, participants were exposed to the same level of NO₂ or to clean air once for 30 min on day 1, and twice for 30 min on day 2, at the same time and on the same days of the week. The two exposures performed on day 2 were separated by 1 hr. There was no exposure on day 3. There was an interval of 2 weeks between each series of exposures. Only the engineer in charge of injection into the chamber knew whether the participant was being exposed to NO₂ or clean air.

Sputum was induced twice at baseline (10–30 days before first exposure, with 1–3 weeks between the sputum inductions) and for each series of exposures, 6 hr (on day 1), 32 hr (on day 2), and 48 hr (on day 3) after the end of the first exposure. Spirometry with flow-volume curves was carried out at baseline (immediately before first exposure) and daily from day 1 to day 3, before and immediately after exposures, and immediately before sputum inductions. Allergen challenge was not performed, either before or after the exposures.

Nitrogen dioxide/clean air exposure. The exposures were performed in an 8.8-m³ exposure chamber installed in the investigation clinical center at the Hospital Bichat in Paris as previously described (Ezratty et al. 2007). The chamber was supplied with fresh, particle-free air at a mean temperature of 25°C and

a mean relative humidity of 32%. The air supply passed through HEPA and activated carbon filters. We used NO₂ concentrated at 950 ppm compressed in a 20-L gas bottle under 150 bar pressure for the 600-ppb exposures, and a gas bottle of NO₂ concentrated at 520 ppm under 150 bar pressure for the 200-ppb exposures (Air Liquide SA, Paris, France). A mass flow meter secured the stability of the injected flow at the expected concentration (200 ppb or 600 ppb).

During exposures, NO₂ concentration inside the exposure chamber was continuously monitored (chemiluminescence oxides of nitrogen analyzer, Model AC 32 M; Environnement SA, 78300 Poissy, France). The mean concentration was 581 ppb ± 3.2% for 600-ppb NO₂ exposures and 203 ppb ± 1.5% for 200-ppb NO₂ exposures. During exposures to clean air, the NO₂ concentration was < 10 ppb.

Pulmonary function and methacholine challenge testing. Flow-volume curves were obtained using a Biomedin spirometer (Biomedin srl, Padova, Italy) according to the European Community Respiratory Health Survey specifications to determine FEV₁ and peak expiratory flow (PEF) (Quanjer 1993).

Methacholine challenge tests were done twice at baseline with an automatic inhalation-synchronized Mefar MB3 dosimeter jet nebulizer (Mefar spa, Bovezzo, Italy), as described elsewhere (Aubier et al. 1992; Ezratty et al. 2007). Methacholine challenge tests at baseline were conducted 10–30 days before the start of the exposures to avoid any putative interference of the methacholine challenge with the effect of NO₂ (Jorres et al. 1995).

Sputum induction and inflammatory marker measurements. We performed sputum

Table 1. Characteristics of participants.

Participant	Age (years)	History of atopy ^a	Smoking status	Sex	Height (cm)	Weight (kg)	BMI (kg/m ²)	Asthma duration (years)	FEV ₁ at inclusion (FEV ₁ % predicted)	PD20 methacholine at baseline (μg)	Percent eosinophils in sputum at baseline ^b
1 ^c	26	Yes	N	F	164	57	21	8	3.23 (110)	1,600	NA
2	29	No	E	M	185	90	27	11	4.13 (89)	1,490	14.73
3	29	No	N	M	182	87	27	10	4.43 (99)	690	11.88
4	31	No	N	M	161	84	33	8	2.87 (81)	3,200	6.79
5	28	No	N	M	174	74	25	4	3.69 (88)	1,550	1.68
6	27	No	N	M	180	88	28	21	3.57 (80)	1,220	0.93
7	24	No	N	M	178	70	22	8	3.88 (87)	1,070	4.25
8	30	No	N	F	159	56	22	20	3.03 (103)	500	2.68
9	29	Yes	N	M	168	72	26	22	3.89 (100)	3,200	1.88
10 ^c	28	Yes	N	M	186	92	27	2	4.49 (96)	800	ANR
11	20	Yes	N	F	158	49	20	9	2.29 (76)	930	0.26
12	69	No	N	M	178	90	29	5	2.49 (78)	3,200	17.72
13	30	No	N	F	163	55	21	20	2.68 (87)	1,950	32.08
14	32	Yes	N	M	179	82	26	24	4.12 (92)	340	2.51
15	24	No	N	F	171	60	21	14	3.41 (97)	310	5.12
16	28	No	N	M	174	62	21	16	3.82 (91)	2,100	20.58
17	32	No	N	M	176	115	38	21	4.16 (100)	2,170	2.99
18 ^c	30	Yes	N	M	169	89	32	21	3.75 (95)	190	NA
19	30	No	N	M	174	115	39	23	3.16 (76)	210	1.55

Abbreviations: ANR: available but not relevant because participant 10 did not complete the three series of exposure; E, ex-smoker; N, never-smoker; NA: not available.

^aPersonal history of atopic dermatitis and/or atopic familial history. ^bPercent eosinophils at baseline (10–30 days before first exposure). ^cParticipants excluded from the analysis: participants 1 and 18 did not produce adequate sputum specimens for cell analysis at baseline (squamous cells > 20%); participant 10 did not complete the three series of exposure.

induction with an aerosol of hypertonic saline using the method of Pin et al. (1992). The sputum was analyzed within 1 hr according to Pizzichini et al. (1996), as described elsewhere (Ezratty et al. 2007). Total nonsquamous inflammatory cell counts were expressed as 10^3 cells/mg of induced sputum. Differential cell counts were performed by counting 400 cells on May Grünwald Giemsa stained slides by two expert observers blinded to the participant's exposure. Results were expressed both as percentage and as number of inflammatory cells per milligram of induced sputum. Only samples with cell viability > 70% and squamous cell contamination < 20% were considered adequate.

Sputum supernatant concentrations of eosinophil cationic protein (ECP) levels were measured by a commercially available enzyme assay (CAP-FEIA; Pharmacia, St Quentin-en-Yvelines, France), with a lower detection limit of 2 ng/mL.

Follow-up during the study period. After 0, 15, and 30 min of exposure to NO_2 or clean air in the chamber, participants were asked questions relating to respiratory symptoms and perception of discomfort.

FEV_1 and PEF were monitored twice during exposure at 15-min intervals and hourly for 6 hr after leaving the chamber, with a portable combined spirometer (One Flow Tester; Mediflux, Croissy Beaubourg, France).

During the 10–30 days between baseline measurements and first exposure and during the 2-week interval following each series of exposures, subjective symptoms and medications were recorded every day. Each participant measured FEV_1 and PEF twice daily with a portable combined spirometer.

Sample size. The primary end point was the change in the percentage of eosinophils in sputum, expressed as the ratio between the percentage after exposure and the baseline percentage. When the study was designed, literature reports were insufficient to determine the variance of the ratio, which was mandatory to estimate the sample size. Variance was estimated after inclusion of the first eight participants without unblinding. Based on the variance found of 0.10, a sample size of 18 participants was considered sufficient to demonstrate a doubling of the percentage of eosinophils in sputum with a power of 80% and a significance level of 0.05 (see Supplemental Material, Table S1). In addition, a doubling has been reported to be consistent with clinically relevant changes in clinical status of asthmatics (Green et al. 2002).

Statistical analysis. The parameters studied in sputum were the percentage of eosinophils, the number of eosinophils per milligram, ECP, the number of neutrophils per milligram, and the number of macrophages per milligram. All parameters were log-transformed to normalize

the distributions. We used a generalized linear model (GLM procedure, SAS v9.4; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) for the analyses. We included in the statistical model the effect of the participant, the time, the dose, and the interaction between the time and the dose. The interpretation of the results was based on the type III sum of squares. In case of a significant interaction between day and dose, a global analysis was performed, followed by per-day analyses. In the global analysis, all the data concerning the parameter were summarized by their geometric means (GMs) (in case of sputum inductions, this relates to three sputum inductions over 3 days, one per day), and we tested the relation between NO_2 concentration—used as a quantitative value (0, 200, and 600 ppb)—and the parameter studied. The global analysis provided the p_{trend} .

To display the results in a meaningful way, we also analyzed the data using classes of exposure (without any preconceived idea on the form of the relationship): For each class of exposure, we estimated the least-square mean (LSMEAN) and its 95% confidence limits. The LSMEANs and the confidence limits were exponentiated to obtain the changes relative to the baseline measurements and their confidence intervals (CIs). The per-day analyses were reported only when the trend in the global analysis was significant. p -Values < 0.05 were considered significant.

Results

Among the 19 participants, 18 completed the three series of exposures and were included in the analysis. Among those, two did not produce an adequate sample of sputum at all

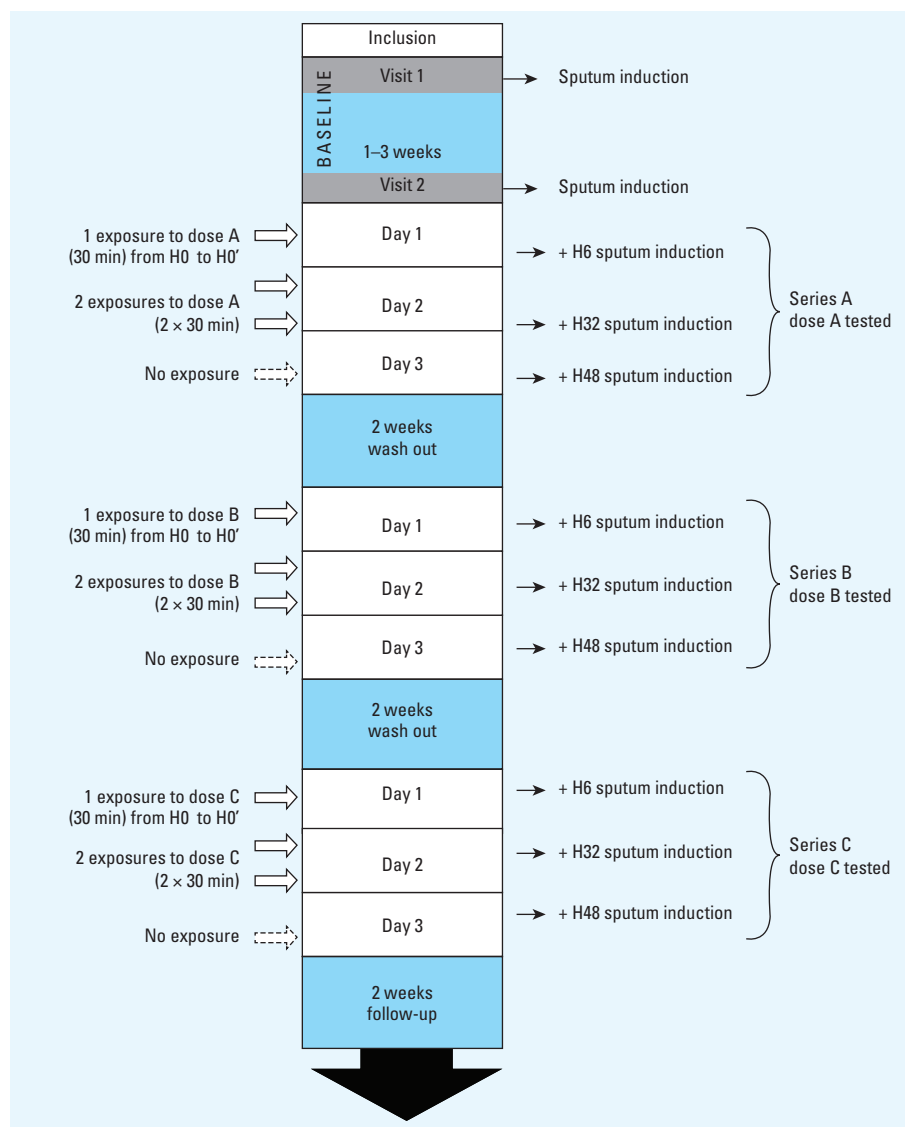


Figure 1. Flow diagram of the study period for each participant. Abbreviations: H0, immediately before 1st exposure (day 1); H0', immediately after 1st exposure (day 1); H6, 6 hr after H0' (day 1); H32, 32 hr after H0' (day 2); H48, 48 hr after H0' (day 3). The dose order was attributed randomly; so, series A, B, and C corresponds to clean air, 200-ppb NO_2 , or 600-ppb NO_2 exposure.

time points and were not included in analyses of sputum (Table 1).

Respiratory function—FEV₁ and PEF—measured by spirometry, did not significantly change after NO₂ exposure compared with clean air exposure (Table 2). No major clinical adverse reactions, such as coughing, wheezing, or chest tightness suggesting asthma attacks, were observed during exposures or follow-up. During the 2 weeks after each exposure, subjective symptoms and peak flow measurements were not significantly different regardless of exposure.

The primary analysis tested the exposure level (dose), the time (because the study design included assessment at three time points after exposure, one each day) and the interaction between time and exposure level. The dose was significantly related to the change in the percentage of eosinophils, the time was not. There was a significant interaction between time and exposure

level, meaning that the association between dose and effect on eosinophils was different according to the day. As planned in the case of a significant interaction, we performed both a global analysis, averaging the measurements over the 3 days, and per-day analyses.

In the global analysis, the slope of the association between the percentage of eosinophils and NO₂ exposure level was significant ($p = 0.04$) (Table 3).

Compared with baseline measurements, the percentage of eosinophils in sputum increased by 57% (95% CI: 18, 109%) after 600 ppb NO₂ ($p = 0.003$) but did not change significantly after clean air or after 200 ppb NO₂.

Similar results were found for the association between the number of eosinophils per milligram of sputum and NO₂ exposure level. In the global analysis, the slope of the association was significant ($p = 0.02$) (Table 3). The number of eosinophils per milligram

of sputum increased by 120% (95% CI: 60, 202%) after 600 ppb NO₂ ($p < 0.001$) but not after clean air or after 200 ppb NO₂ (Table 3).

Per-day analysis showed that the slope of the association between the percentage of eosinophils and NO₂ exposure level was not significant at day 1 ($p = 0.81$), but was significant at day 2 ($p = 0.01$) and day 3 ($p = 0.03$). A similar pattern was found for the slope of the association between the number of eosinophils per milligram of sputum and the level of exposure to NO₂, which was not significant at day 1 ($p = 0.10$), close to significance at day 2 ($p = 0.06$), and significant at day 3 ($p = 0.03$) (Table 3; see also Supplemental Material, Figure S1).

Compared with baseline measurements, there was no significant change of the percentage of eosinophils in sputum regardless of the level of exposure to NO₂ at day 1. At day 2, the percentage and the number of

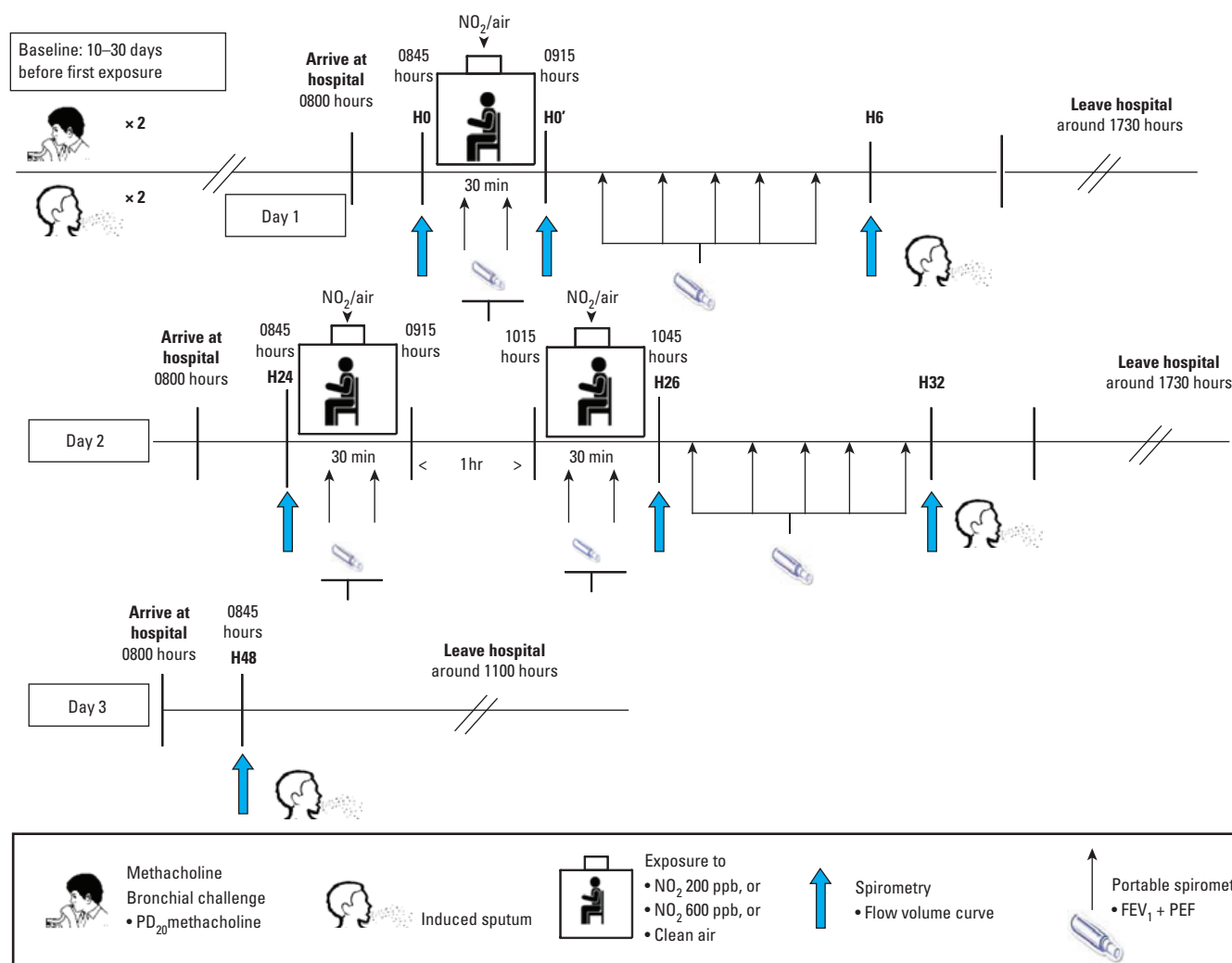


Figure 2. Study design for each of the three series of exposures separated by 2 weeks. Abbreviations: H0, immediately before 1st exposure (day 1); H0', immediately after 1st exposure (day 1); H6, 6 hr after H0' (day 1); H24, 24 hr after H0' (day 2); H26, 26 hr after H0' (day 2); H32, 32 hr after H0' (day 2); H48, 48 hr after H0' (day 3). Participants were exposed at rest in a double-blinded, randomized, crossover design to clean air, 200-ppb NO₂, or 600 ppb NO₂ once for 30 min on day 1, and twice for 30 min on day 2. There was no exposure on day 3. Time of day is expressed in military form.

eosinophils increased significantly at 600 ppb, but not at 200 ppb NO₂. At day 3, the number of eosinophils increased significantly at 200 ppb and at 600 ppb NO₂, and the increase of the percentage of eosinophils was close to significance at 600 ppb NO₂, but not significant at 200 ppb (Table 3; see also Supplemental Material, Figure S1).

Absolute values not baseline adjusted [GMs (95% CIs)] of the percentages of eosinophils are reported in Supplemental Material, Table S2. Individual plots of the percentage of eosinophils are displayed in Supplemental Material, Figure S2. In order to see if results were driven by a participant in particular, we did a sensitivity analysis: a series of analyses with one different participant removed for each analysis. The trend test that measures the relationship between the dose of NO₂ and the increase of the percentage of eosinophils in sputum from baseline was significant ($p < 0.05$) in 10 of the tests, and was close to significance ($p < 0.10$) for the other participants. Moreover, the increase of the percentage of eosinophils in sputum compared with baseline measurements was always significant at 600 ppb, regardless of which participant was removed from the analysis (see Supplemental Material, Table S3).

There was a significant correlation between the number of eosinophils per milligram of sputum and ECP (in nanograms per milliliter) ($p < 0.001$) (see Supplemental Material, Figure S3).

Compared with baseline measurements, ECP in sputum increased significantly after exposure to 600 ppb NO₂ (43%; 95% CI: 17, 75%; $p = 0.001$) but not after exposure to clean air or 200 ppb NO₂. However, the

slope of the association between ECP and the level of exposure was not significant (Table 3).

Exposure to NO₂ did not affect the other cell types (macrophages, neutrophils) measured in sputum (Table 3).

There was no correlation between methacholine challenge tests and eosinophil responses (data not shown).

Discussion

Our findings indicate that repeated brief exposures to NO₂ without allergen exposure increase eosinophilic airway inflammation in participants with intermittent asthma without inducing any changes in lung function. Because only mild asthmatics were tested, the results cannot be extrapolated to healthy individuals.

Although we cannot exclude that repeated challenges with hypertonic saline could have potentialized the effect of NO₂, the repetition of sputum inductions is not the cause of the effect because the effect is expected to be the same for each of the three series of exposures (Pavord 1998). Eosinophils in sputum increased according to NO₂ exposure level, and this significant trend supports a dose-related relationship. The effect on eosinophils and on ECP in sputum was significant at 600 ppb NO₂. We found a strong correlation between ECP and eosinophils, suggesting that eosinophils were activated.

In participants with asthma, several studies have found that NO₂ exposure increased eosinophilic inflammation in response to inhaled allergen, in the distal lower airways assessed by bronchial wash and bronchoalveolar lavage (BAL) (Barck et al. 2002), and in sputum (Barck et al. 2005). The three

previous studies that have investigated effects of NO₂ without allergen challenge in participants with asthma did not find changes in inflammatory cell distributions in BAL (Jorres et al. 1995) and in sputum (Solomon et al. 2004; Vagaggini et al. 1996). However, these studies involved small numbers of participants, and no repetition of exposure, and, in the study by Jorres et al. (1995), the evaluation of inflammation could have been performed too soon after exposure.

In the present study, participants with asthma were exposed to two realistic NO₂ concentrations: 200 ppb and 600 ppb of NO₂, which are close to NO₂ peaks likely to be found indoors during the use of combustion appliances for cooking and heating (Basu and Samet 1999; Dennekamp et al. 2001; Kotzias et al. 2005; Pilotto et al. 1997) and outdoors for short periods in streets with heavy traffic and in road tunnels (Larsson et al. 2010). Exposures lasted 30 min, close to the average time spent cooking dinner in France (38 min during the week and 46 min the weekend in a 2003 survey) (Hébel 2012). Furthermore, exposure to intermittent peaks of NO₂ may have greater effects than long-term, low-level exposure (Gardner et al. 1979).

Exposures in the present study were repeated over 2 days to mimic how exposures take place in real life and in order to assess a possible cumulative effect. At day 1, after one exposure, there was no significant change in eosinophilic airway inflammation—contrary to day 2 and day 3, after three exposures. These findings suggest that inflammatory response to NO₂ exposure may be delayed or that a single exposure may be insufficient to enhance eosinophilic airway inflammation, suggesting a cumulative effect of NO₂. These results are consistent with those of Barck et al. (2005) who found that two to three brief exposures at 260 ppb NO₂ were needed to promote an increase in the airway inflammatory response to inhaled allergens. In addition to the study by Barck et al. (2005), our study shows that NO₂, without an exposure to a high concentration of allergens, as with an allergen challenge, is sufficient to enhance inflammation in the airways. This finding could be of significance because exposure to peaks of NO₂ is common, particularly indoors, whereas exposure to both high concentrations of NO₂ and the specific stimulus for a susceptible individual is less likely (Hesterberg et al. 2009).

Many cities in Europe show an increase in concentrations of NO₂ measured close to traffic due to the increasing number of vehicles, in particular diesel vehicles. Exhaust emissions from diesel vehicles are lower for carbon monoxide, non-methanic volatile organic compounds, and particulate matter

Table 2. GMs (95% CIs) of values relative to baseline of FEV₁ and PEF evaluated in the 18 participants who completed the study.

Variable	0 ppb NO ₂ (clean air)	200 ppb NO ₂	600 ppb NO ₂	<i>p</i> -Value
FEV ₁ /baseline	1.02 (1.00, 1.05)	1.00 (0.97, 1.03)	1.00 (0.98, 1.03)	0.41
PEF/baseline	1.05 (0.99, 1.11)	1.04 (0.98, 1.10)	1.01 (0.96, 1.07)	0.36

Baseline values were measured immediately before first exposure (H0) (day 1) for each series of exposure. Each value corresponds to the GM change from baseline of the six values [H0', immediately after first exposure (day 1); H6, 6 hr after H0' (day 1); H32, 32 hr after H0' (day 2); H48, 48 hr after H0' (day 3)] obtained by spirometry with flow-volume curves. The effects of exposure, regardless of the dose, on FEV₁ and PEF were not significant.

Table 3. Changes relative to baseline measurements (performed 10–30 days before the first exposure) for parameters measured in sputum [GM % (95% CI), $n = 16$].

Variable	0 ppb NO ₂ (clean air)	200 ppb NO ₂	600 ppb NO ₂	<i>p</i> _{Trend}
Percentage of eosinophils				
Day 1	−12 (−34, 16)	−5 (−28, 26)	57 (18, 109)**	0.04
Day 2	16 (−28, 86)	−34 (−59, 6)	12 (−31, 79)	0.81
Day 3	−5 (−37, 44)	−3 (−36, 46)	102 (32, 211)**	0.01
No. of eosinophils/mg				
Day 1	−39 (−67, 13)	36 (−26, 149)	79 (−3, 230)	0.03
Day 2	−5 (−31, 29)	23 (−10, 68)	120 (60, 202)#	0.02
Day 3	−5 (−44, 60)	−24 (−55, 29)	64 (−3, 177)	0.10
ECP				
Day 1	9 (−39, 95)	23 (−31, 119)	142 (32, 344)**	0.06
Day 2	−18 (−57, 56)	99 (5, 278)*	163 (38, 398)**	0.03
Day 3	21 (−1, 47)	0 (−18, 22)	43 (17, 75)**	0.23
No. of neutrophils/mg	12 (−17, 51)	−9 (−32, 22)	10 (−19, 49)	0.97
No. of macrophages/mg	−18 (−33, 0)	−2 (−20, 21)	−6 (−24, 15)	0.46

GM percentages represent all changes of the parameter for the 3 days (one sputum induction per day).

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; and # $p < 0.001$, compared with baseline.

but may be higher for NO₂ (Guerreiro et al. 2012). Although epidemiological studies on NO₂ have several limitations in particular because of the potential for exposure misclassification and co-pollutant effects, our results provide important evidence suggesting that NO₂ alone has a direct effect on airway inflammation in asthmatics.

Conclusions

To our knowledge, this is the first study to demonstrate that repeated peaks of NO₂ at realistic concentrations without allergen exposure increase eosinophilic inflammation in the airways of asthmatics, supporting a dose-response relationship. Although it is difficult to evaluate the clinical implications of these findings in the present study, an increased eosinophilic inflammation may lead to exacerbation or loss of control of asthma (Green et al. 2002; Jacobsen et al. 2007). Therefore, we cannot rule out the effects of repeated exposures to NO₂ over a longer period of time or effects in subpopulations.

REFERENCES

- Aubier M, Levy J, Clerici C, Neukirch F, Herman D. 1992. Different effects of nasal and bronchial glucocorticosteroid administration on bronchial hyperresponsiveness in patients with allergic rhinitis. *Am Rev Respir Dis* 146(1):122–126.
- Avol EL, Linn WS, Peng RC, Valencia G, Little D, Hackney JD. 1988. Laboratory study of asthmatic volunteers exposed to nitrogen dioxide and to ambient air pollution. *Am Ind Hyg Assoc J* 49(4):143–149.
- Barck C, Lundahl J, Halldén G, Bylin G. 2005. Brief exposures to NO₂ augment the allergic inflammation in asthmatics. *Environ Res* 97(1):58–66.
- Barck C, Sandstrom T, Lundahl J, Halldén G, Svartengren M, Strand V, et al. 2002. Ambient level of NO₂ augments the inflammatory response to inhaled allergen in asthmatics. *Respir Med* 96(11):907–917.
- Basu R, Samet J. 1999. A review of the epidemiological evidence on health effects on nitrogen dioxide from gas stove. *J Environ Med* 1(4):173–187.
- Bauer MA, Utell MJ, Morrow PE, Speers DM, Gibb FR. 1986. Inhalation of 0.30 ppm nitrogen dioxide potentiates exercise-induced bronchospasm in asthmatics. *Am Rev Respir Dis* 134(6):1203–1208.
- Belanger K, Gent JF, Triche EW, Bracken MB, Leaderer BP. 2006. Association of indoor nitrogen dioxide exposure with respiratory symptoms in children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 173(3):297–303.
- Bylin G, Hedenstierna G, Lindvall T, Sundin B. 1988. Ambient nitrogen dioxide concentrations increase bronchial responsiveness in subjects with mild asthma. *Eur Respir J* 1(7):606–612.
- Dennekamp M, Howarth S, Dick CA, Cherrie JW, Donaldson K, Seaton A. 2001. Ultrafine particles and nitrogen oxides generated by gas and electric cooking. *Occup Environ Med* 58(8):511–516.
- Ezraty V, Bonay M, Neukirch C, Orset-Guillossou G, Dehoux M, Koscielny S, et al. 2007. Effect of formaldehyde on asthmatic response to inhaled allergen challenge. *Environ Health Perspect* 115:210–214; doi:10.1289/ehp.9414.
- Gardner DE, Miller FJ, Blommer EJ, Coffin DL. 1979. Influence of exposure mode on the toxicity of NO₂. *Environ Health Perspect* 30:23–29.
- Global Initiative for Asthma. 2010. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Global Initiative for Asthma (GINA) 2010. Available: http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Report_2010_1.pdf. [accessed 9 July 2014].
- Green RH, Brightling CE, McKenna S, Hargadon B, Parker D, Bradding P, et al. 2002. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet* 360(9347):1715–1721.
- Guerreiro C, de Leeuw F, Foltescu V, Schilling J, van Aardenne J, Lükewille A, et al. 2012. Air Quality in Europe — 2012 Report. Copenhagen:European Environment Agency. Available: http://www.eea.europa.eu/publications/air-quality-in-europe-2012/at_download/file. [accessed 13 March 2014].
- Hasselblad V, Eddy D, Kotchmar D. 1992. Synthesis of environmental evidence: nitrogen dioxide epidemiology studies. *J Air Waste Manag Assoc* 42(5):662–671.
- Hazucha MJ, Ginsberg JF, McDonnell WF, Haak ED Jr, Pimmel RL, Salaam SA, et al. 1983. Effects of 0.1 ppm nitrogen dioxide on airways of normal and asthmatic subjects. *J Appl Physiol* 54(3):730–739.
- Hébel P. 2012. Comportements et consommations alimentaires en France. Paris:Lavoisier.
- Hesterberg TW, Bunn WB, McClellan RO, Hamade AK, Long CM, Valberg PA. 2009. Critical review of the human data on short-term nitrogen dioxide (NO₂) exposures: evidence for NO₂ no-effect levels. *Crit Rev Toxicol* 39(9):743–781.
- Jacobsen EA, Ochur SI, Lee NA, Lee JJ. 2007. Eosinophils and asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 7(1):18–26.
- Jarvis DJ, Adamkiewicz G, Heroux ME, Rapp R, Kelly FJ. 2010. Nitrogen dioxide. In: WHO Guidelines for Indoor Air Quality: Selected Pollutants. Copenhagen:World Health Organization, Regional Office for Europe. Available: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0009/128169/e94535.pdf. [accessed 13 March 2014].
- Jenkins HS, Devalia JL, Mister RL, Bevan AM, Rusznak C, Davies RJ. 1999. The effect of exposure to ozone and nitrogen dioxide on the airway response of atopic asthmatics to inhaled allergen: dose- and time-dependent effects. *Am J Respir Crit Care Med* 160(1):33–39.
- Jorres R, Magnussen H. 1990. Airways response of asthmatics after a 30 min exposure, at resting ventilation, to 0.25 ppm NO₂ or 0.5 ppm SO₂. *Eur Respir J* 3(2):132–137.
- Jorres R, Magnussen H. 1991. Effect of 0.25 ppm nitrogen dioxide on the airway response to methacholine in asymptomatic asthmatic patients. *Lung* 169(2):77–85.
- Jorres R, Nowak D, Grimminger F, Seeger W, Oldigs M, Magnussen H. 1995. The effect of 1 ppm nitrogen dioxide on bronchoalveolar lavage cells and inflammatory mediators in normal and asthmatic subjects. *Eur Respir J* 8(3):416–424.
- Kleinman MT, Bailey RM, Linn WS, Anderson KR, Whynt JD, Shamoo DA, et al. 1983. Effects of 0.2 ppm nitrogen dioxide on pulmonary function and response to bronchoprovocation in asthmatics. *J Toxicol Environ Health* 12(4–6):815–826.
- Kotzias D, Koistinen K, Kephapopoulos S, Schlitt C, Carrer P, Maroni M, et al. 2005. The INDEX Project. Critical Appraisal of the Setting and Implementation of Indoor Exposure Limits in the EU. Luxembourg:Office for Official Publication of the European Communities. Available: [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/public-health/index_final_report/at_multi_download/file?name=1622%20-%20INDEX%20%20EUR%20201590%20EN%20report\[1\].pdf](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/public-health/index_final_report/at_multi_download/file?name=1622%20-%20INDEX%20%20EUR%20201590%20EN%20report[1].pdf). [accessed 13 March 2014].
- Larsson BM, Grunewald J, Skold CM, Lundin A, Sandstrom T, Eklund A, et al. 2010. Limited airway effects in mild asthmatics after exposure to air pollution in a road tunnel. *Respir Med* 104(12):1912–1918.
- Linn W, Shamoo D, Avol E, Whynt JD, Anderson KR, Venet TG, et al. 1986. Dose-response study of asthmatic volunteers exposed to nitrogen dioxide during intermittent exercise. *Arch Environ Health* 41(5):292–296.
- Mohsenin V. 1987. Airway responses to nitrogen dioxide in asthmatic subjects. *J Toxicol Environ Health* 22(4):371–380.
- Pavord ID. 1998. Sputum induction to assess airway inflammation: is it an inflammatory stimulus? *Thorax* 53(2):79–80.
- Pilotto L, Douglas R, Attewell R, Wilson S. 1997. Respiratory effects associated with indoor nitrogen dioxide exposure in children. *Int J Epidemiol* 26(4):788–796.
- Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Giris-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, et al. 1992. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 47(1):25–29.
- Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillace D, et al. 1996. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med* 154(2 Pt 1):308–317.
- Quanjer PH (ed). 1983. Standardized lung function testing. *Bull Eur Physiopathol Respir* 19(suppl 5):45–51.
- Roger LJ, Horstman DH, McDonnell W, Kehrl H, Ives PJ, Seal E, et al. 1990. Pulmonary function, airway responsiveness, and respiratory symptoms in asthmatics following exercise in NO₂. *Toxicol Ind Health* 6(1):155–171.
- Solomon C, Balmes JR, Kleinman M. 2004. Effects of Nitrogen Dioxide on Airway Inflammation in Allergic Asthmatic Subjects. Contract number 00-337. San Francisco:California Air Resources Board, California Environmental Protection Agency. Available: <http://www.arb.ca.gov/research/apr/past/00-337.pdf>. [accessed 13 March 2014].
- Strand V, Rak S, Svartengren M, Bylin G. 1997. Nitrogen dioxide exposure enhances asthmatic reaction to inhaled allergen in subjects with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 155(3):881–887.
- Strand V, Salomonsson P, Lundahl J, Bylin G. 1996. Immediate and delayed effects of nitrogen dioxide exposure at an ambient level on bronchial responsiveness to histamine in subjects with asthma. *Eur Respir J* 9(4):733–740.
- Strand V, Svartengren M, Rak S, Barck C, Bylin G. 1998. Repeated exposure to an ambient level of NO₂ enhances asthmatic response to a nonsymptomatic allergen dose. *Eur Respir J* 12(1):6–12.
- Tunnicliffe WS, Burge PS, Ayres JG. 1994. Effect of domestic concentrations of nitrogen dioxide on airway responses to inhaled allergen in asthmatic patients. *Lancet* 344(8939–8940):1733–1736.
- U.S. Environmental Protection Agency. 2008. Integrated Science Assessment for Oxides of Nitrogen—Health Criteria (Final Report). Washington, DC:U.S. EPA. Available: <http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?deid=194645>. [accessed 13 March 2014].
- Vagaggini B, Paggiaro PL, Giannini D, Franco AD, Cianchetti S, Carnevali S, et al. 1996. Effect of short-term NO₂ exposure on induced sputum in normal, asthmatic and COPD subjects. *Eur Respir J* 9(9):1852–1857.
- WHO (World Health Organization). 2006. Air Quality Guidelines. Global Update 2005. Copenhagen:WHO Regional Office for Europe. Available: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0005/78638/E90038.pdf. [accessed 13 March 2014].
- WHO (World Health Organization) European Centre for Environment and Health, WHO Regional Office for Europe. 2013. Review of Evidence on Health Aspects of Air Pollution—REVIHAAP Project. First Results. Copenhagen:WHO Regional Office for Europe. Available: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0020/182432/e96762-final.pdf. [accessed 13 March 2014].



UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY
WASHINGTON, D.C. 20460

OFFICE OF CHEMICAL SAFETY
AND POLLUTION PREVENTION

December 15th, 2014

MEMORANDUM

Subject: Nitrogen Dioxide: Evaluation of inhalation toxicity study, Ezratty et al 2014

PC Code: 000596	DP Barcode: 424214
Decision No.: N/A	Registration No.: N/A
Petition No.: N/A	Regulatory Action: Data Evaluation Record (DER), Toxicology Review for Product Registration, Section 3
Risk Assess Type: Single chemical, non aggregate	Case No.: 4045
TXR No.: 1003349	CAS No.: 10102-44-0
MRID No.: 49519201	40 CFR: N/A

From: Jonathan Leshin, PhD, Toxicologist
Risk Assessment and Science Support Branch (RASSB)
Antimicrobials Division (7510P)

Thru: Tim McMahon, PhD, Senior Scientist
Tim Leighton, Senior Risk Assessor
Risk Assessment and Science Support Branch (RASSB)
Antimicrobials Division (7510P)

To: Lorena Rivas, Registration Risk Manager
Regulatory Management Branch II (RMB2)
Antimicrobials Division (7510P)

Agency Conclusion: The Agency has reviewed the following journal article reporting about a study conducted with nitrogen dioxide. The study was not conducted according to the 870.3465 guidelines, but is acceptable for regulatory purposes.

Ezratty, V., Guillosoy, G., Neukirch, C., et al (2014) Repeated nitrogen dioxide exposures and eosinophilic airway inflammation in asthmatics: a randomized crossover study. Services des Etudes Medicales, EDF (France) MRID 49519201, Environmental Health Perspectives Vol 122 (8), pp 850-855

EXECUTIVE SUMMARY: In an inhalation toxicity study (MRID 49519201), nitrogen dioxide was administered to 19 people aged 20-69 with intermittent asthma at either 0, 200 or 600 ppb for 30 minutes on day one and twice for 30 minutes (separated by one hour) on the following day (day two) to determine how nitrogen dioxide exposure enhances airway inflammation. Each person was exposed to each of the three concentrations in a double blind fashion, in randomized order. Each exposure set was separated by two weeks.

Compared to baseline measurements, there was a 57% increase in eosinophil percentage after exposure to 600 ppb of nitrogen dioxide. There was no significant change at either 0 or 200 ppb. Eosinophilic cationic protein in sputum was highly correlated with eosinophil count and was increased after exposure to 600 ppb. There was no effect on lung function.

The LOAEL is 600 ppb, based on changes in eosinophil levels indicative of airway inflammation. The NOAEL is 200 ppb.

ATTACHMENT

Data Evaluation Record (DER)

Inhalation Toxicity

For

Nitrogen Dioxide

PC Code: 000596

EPA Reviewer: Jonathan Leshin, Ph.D.
RASSB, Antimicrobials Division (7510P)
Secondary Review: Tim McMahon, Toxicologist
RASSB, Antimicrobials Division (7510P)

Signature: 
Date: 12/15/2014
Signature: 
Date: 12/15/2014
Template version 02/06

Data Evaluation Record

STUDY TYPE: Inhalation Toxicity – [human]

PC CODE: 000596

DP BARCODE: 424214

TXR#: 1003349

TEST MATERIAL (PURITY): Nitrogen Dioxide

SYNONYMS: None

CITATION: Ezratty, V., Guillosoy, G., Neukirch, C., et al (2014) Repeated nitrogen dioxide exposures and eosinophilic airway inflammation in asthmatics: a randomized crossover study. Services des Etudes Medicales, EDF (France) MRID 49519201, Environmental Health Perspectives Vol 122 (8), pp 850-855

SPONSOR: Center for Research and Innovation in Gas and New Energy Sources, CRIGEN, GDF Suez, the medical studies department of EDF and the Clinical center of investigation at Bichat Hospital, Paris, France

INVESTIGATORS' EXECUTIVE SUMMARY:

In an inhalation toxicity study (MRID 49519201), nitrogen dioxide was administered to 19 people aged 20-69 with intermittent asthma at either 0, 200 or 600 ppb for 30 minutes on day one and twice for 30 minutes (separated by one hour) on the following day (day two) to determine how nitrogen dioxide exposure enhances airway inflammation. Each person was exposed to each of the three concentrations in a double blind fashion, in randomized order. Each exposure set was separated by two weeks.

Compared to baseline measurements, there was a 57% increase in eosinophil percentage after exposure to 600 ppb of nitrogen dioxide. There was no significant change at either 0 or 200 ppb. Eosinophilic cationic protein in sputum was highly correlated with eosinophil count and was increased after exposure to 600 ppb. There was no effect on lung function.

The LOAEL is 600 ppb, based on changes in eosinophil levels indicative of airway inflammation. The NOAEL is 200 ppb.

I. MATERIALS AND METHODS

A. MATERIALS:

1. Test Material: Nitrogen Dioxide

2. Vehicle and/or positive control: Room Air

3. Participant information: Nineteen subjects [14 men and 5 women; median age, 29 years; age range, 20–69 years; median body mass index (BMI), 26 kg/m²; BMI range, 20–39 kg/m²] were included in the study (Table 1). The study was conducted at the Hospital Bichat in Paris France. All had intermittent asthma as defined by the Global Initiative for Asthma (2010) guidelines and were nonsmokers (18 had never smoked and 1 had stopped smoking some 10 years earlier). Only subjects who had a diagnosis of asthma confirmed by a positive methacholine challenge performed twice at baseline 10–30 days before the first exposure were included in the study. A positive methacholine test was defined as a methacholine provocative dose causing a 20% decrease in forced expiratory volume in 1 sec (FEV₁) from control FEV₁ (PD₂₀ methacholine) using less than 4 mg. All subjects had allergy to house dust mites (HDM) and/or pollen confirmed by a positive skin-prick test done $\geq$ 4 weeks before their inclusion in the study. The study was performed outside the pollen season for those who had been diagnosed with pollen allergies. Of the 19 subjects, 6 had a personal history of atopic dermatitis and/or an atopic familial history. None of those six used inhaled or oral corticosteroids or other anti-inflammatory therapy, and the only permitted medication was an inhaled β_2 -agonist, used as needed during the study period (from baseline, i.e., 30 days before the first NO₂ exposure until the end of the study 2 weeks after the last exposure). Subjects who had gas stoves and/or unvented combustion appliances at home were told not to use them at baseline and on the days of exposures and during the 2 days before and after NO₂ exposure. All subjects had to be free of airway infection for at least 6 weeks before baseline measurements.

The study was registered by the French Ministry of Health (DGS 2006/0016) and approved by the Ethics Committee of Hotel-Dieu Hospital, Paris, France (project 0611398, registered on 28 February 2007). All subjects signed informed consent forms before enrollment in the study.

Table 1: Participant characteristics

Participant	1 ^c	2	3	4	5	6	7	8	9	10 ^c
Age (years)	26	29	29	31	28	27	24	30	29	28
History of atopy ^a	Yes	No	No	No	No	No	No	No	Yes	Yes
Smoking status	N	E	N	N	N	N	N	N	N	N
Sex	F	M	M	M	M	M	M	F	M	M
Height (cm)	164	185	182	161	174	180	178	159	168	186

Weight (kg)	57	90	87	84	74	88	70	56	72	92
BMI (kg/m²)	21	27	27	33	25	28	22	22	26	27
Asthma duration (years)	8	11	10	8	4	21	8	20	22	2
FEV₁ at inclusion (FEV₁ % predicted)	3.23 (110)	4.13 (89)	4.43 (99)	2.87 (81)	3.69 (88)	3.57 (80)	3.88 (87)	3.03 (103)	3.89 (100)	4.49 (96)
PD20 methacholin at baseline (µg)	1,600	1,490	690	3,200	1,550	1,220	1,070	500	3,200	800
Percent eosinophils in sputum at baseline^b	NA	14.73	11.88	6.79	1.68	0.93	4.25	2.68	1.88	ANR
Participant	11	12	13	14	15	16	17	18^c	19	
Age (years)	20	69	30	32	24	28	32	30	30	
History of atopy^a	Yes	No	No	Yes	No	No	No	Yes	No	
Smoking status	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
Sex	F	M	F	M	F	M	M	M	M	
Height (cm)	158	178	163	179	171	174	176	169	174	
Weight (kg)	49	90	55	82	60	62	115	89	115	
BMI (kg/m²)	20	29	21	26	21	21	38	32	39	
Asthma duration (years)	9	5	20	24	14	16	21	21	23	
FEV₁ at inclusion (FEV₁ % predicted)	2.29 (76)	2.49 (78)	2.68 (87)	4.12 (92)	3.41 (97)	3.82 (91)	4.16 (100)	3.75 (95)	3.16 (76)	
PD20 methacholine at baseline (µg)	930	3,200	1,950	340	310	2,100	2,170	190	210	
Percent eosinophils in sputum at baseline^b	0.26	17.72	32.08	2.51	5.12	20.58	2.99	NA	1.55	

Abbreviations: ANR: available but not relevant because participant 10 did not complete the three series of exposure; E, ex-smoker; N, never-smoker; NA: not available.

^aPersonal history of atopic dermatitis and/or atopic familial history.

^bPercent eosinophils at baseline (10–30 days before first exposure).

^cSubjects excluded from the analysis: subjects 1 and 18 did not produce adequate sputum specimens for cell analysis at baseline (squamous cells > 20%); participant 10 did not complete the three series of exposure.

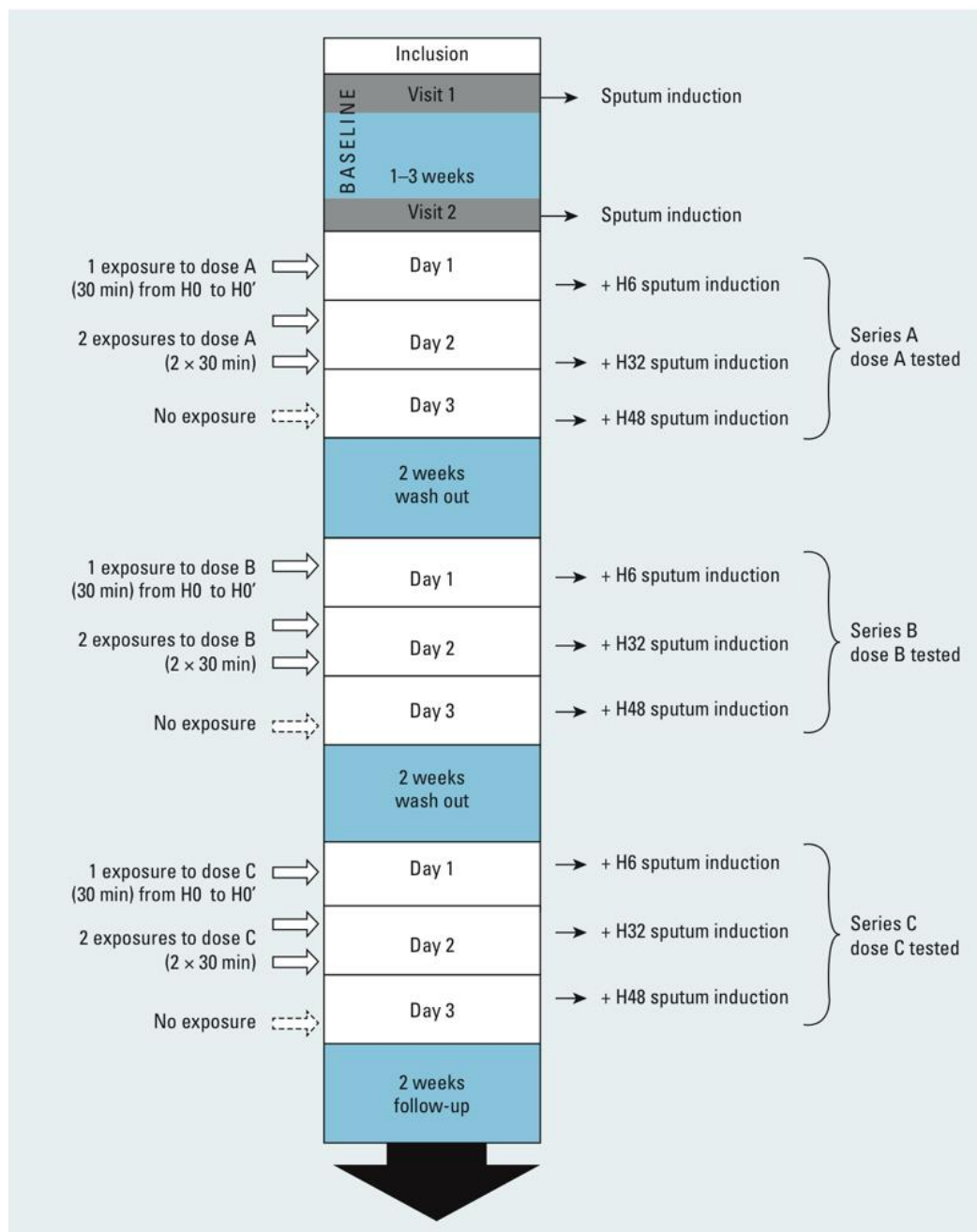
B. STUDY DESIGN:

The study had a double-blind, crossover design, with each participant acting as his or her own control. For each participant, the study involved three series each of three exposures at rest: one series to clean air, one series to 200 ppb (380 µg/m³) NO₂, and one series to 600 ppb (1,130

µg/m³) NO₂. The order of the three series of exposures was randomized (Figure 1). The design for each series of exposures with the timing of pulmonary function testing, and sputum inductions from day 1 to day 3 is described in Figure 2. For each series, subjects were exposed to the same level of NO₂ or to clean air once for 30 min on day 1, and twice for 30 min on day 2, at the same time and on the same days of the week. The two exposures performed on day 2 were separated by 1 hr. There was no exposure on day 3 but sputum was collected for analysis. There was an interval of 2 weeks between each series of three exposures. Only the engineer in charge of injection into the chamber knew whether the participant was being exposed to NO₂ or clean air.

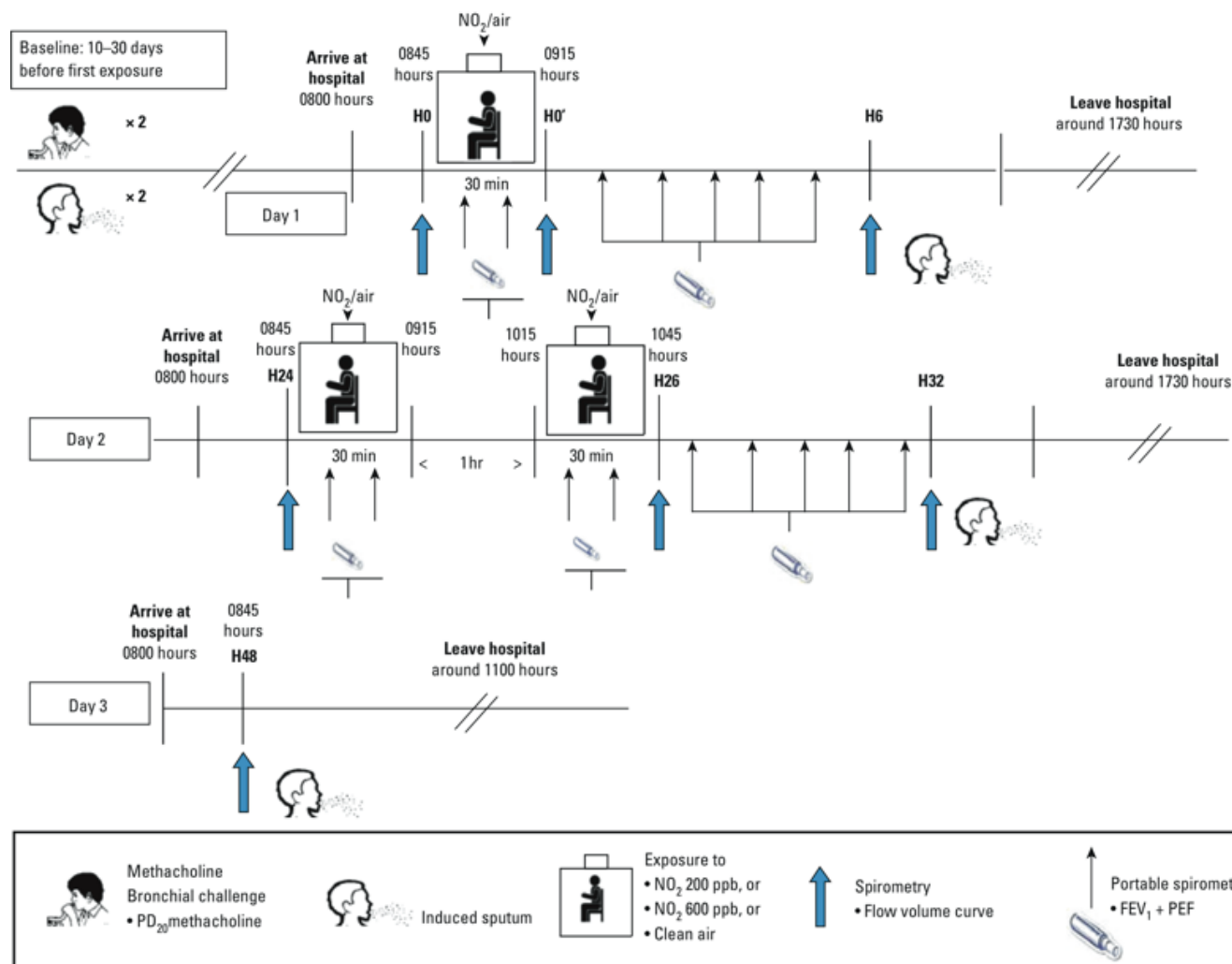
Sputum was induced twice at baseline (10–30 days before first exposure, with 1–3 weeks between the sputum inductions via aerosol administration of hypertonic saline) and for each series of exposures, 6 hr (on day 1), 32 hr (on day 2), and 48 hr (on day 3) after the end of the first exposure. Spirometry with flow–volume curves was carried out at baseline (immediately before first exposure) and daily from day 1 to day 3, before and immediately after exposures, and immediately before sputum inductions. Allergen challenge was not performed, either before or after the exposures.

The raw data for this study was not available

Figure 1 – Flow diagram of study design

Abbreviations: H0, immediately before 1st exposure (day 1); H0', immediately after 1st exposure (day 1); H6, 6 hr after H0' (day 1); H32, 32 hr after H0' (day 2); H48, 48 hr after H0' (day 3). The dose order was attributed randomly; so, series A, B, and C -corresponds to clean air, 200-ppb NO₂, or 600-ppb NO₂ exposure.

Figure 2 – Study design for each of the three exposures separated by 2 weeks



Abbreviations: H0, immediately before 1st exposure (day 1); H0', immediately after 1st exposure (day 1); H6, 6 hr after H0' (day 1); H32, 32 hr after H0' (day 2); H48, 48 hr after H0' (day 3). Subjects were exposed at rest in a double-blinded, randomized, crossover design to clean air, 200-ppb NO_2 , or 600 ppb NO_2 once for 30 min on day 1, and twice for 30 min on day 2. There was no exposure on day 3. Time of day is expressed in military form.

4. Generation of the test atmosphere / chamber description:

The exposures were performed in an 8.8-m³ exposure chamber installed in the investigation clinical center at the Hospital Bichat in Paris as previously described. The chamber was supplied with fresh, particle-free air at a mean temperature of 25°C and a mean relative humidity of 32%. The air supply passed through HEPA and activated carbon filters. NO_2 concentrated at 950 ppm compressed in a 20-L gas bottle under 150 bar pressure was used for the 600-ppb exposures, and

a gas bottle of NO₂ concentrated at 520 ppm under 150 bar pressure was used for the 200-ppb exposures (Air Liquide SA, Paris, France). A mass flow meter secured the stability of the injected flow at the expected concentration (200 ppb or 600 ppb).

During exposures, NO₂ concentration inside the exposure chamber was continuously monitored (chemiluminescence oxides of nitrogen analyzer, Model AC 32 M; Environnement SA, 78300 Poissy, France). The mean concentration was 581 ppb $\pm$ 3.2% for 600-ppb NO₂ exposures and 203 ppb $\pm$ 1.5% for 200-ppb NO₂ exposures. During exposures to clean air, the NO₂ concentration was < 10 ppb.

5. Statistics - The parameters studied in sputum were the percentage of eosinophils, the number of eosinophils per milligram, ECP, the number of neutrophils per milligram, and the number of macrophages per milligram. All parameters were log-transformed to normalize the distributions. The authors used a generalized linear model (GLM procedure, SAS v9.4; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) for the analyses. The authors included in the statistical model the effect of the participant, the time, the dose, and the interaction between the time and the dose. The interpretation of the results was based on the type III sum of squares. In case of a significant interaction between day and dose, a global analysis was performed, followed by per-day analyses. In the global analysis, all the data concerning the parameter were summarized by their geometric means (GMs) (in case of sputum inductions, this relates to three sputum inductions over 3 days, one per day), and the authors tested the relation between NO₂ concentration—used as a quantitative value (0, 200, and 600 ppb)—and the parameter studied. The global analysis provided the p-trend. To display the results in a meaningful way, the authors also analyzed the data using classes of exposure (without any preconceived idea on the form of the relationship): For each class of exposure, the authors estimated the least-square mean (LSMEAN) and its 95% confidence limits. The LSMEANs and the confidence limits were exponentiated to obtain the changes relative to the baseline measurements and their confidence intervals (CIs). The per-day analyses were reported only when the trend in the global analysis was significant. p-values < 0.05 were considered significant.

C. METHODS:

Pulmonary function and methacholine challenge testing.

Flow-volume curves were obtained using a Biomedin spirometer according to the European Community Respiratory Health Survey specifications to determine FEV₁ and peak expiratory flow (PEF).

Methacholine challenge tests were done twice at baseline with an automatic inhalation-synchronized Mefar MB3 dosimeter jet nebulizer. Methacholine challenge tests at baseline were conducted 10–30 days before the start of the exposures to avoid any putative interference of the methacholine challenge with the effect of NO₂.

Sputum induction and inflammatory marker measurements. Sputum induction was performed with an aerosol of hypertonic saline. The sputum was analyzed within 1 hr. Total

nonsquamous inflammatory cell counts were expressed as 103 cells/mg of induced sputum. Differential cell counts were performed by counting 400 cells on May Grünwald Giemsa stained slides by two expert observers blinded to the participant's exposure. Results were expressed both as percentage and as number of inflammatory cells per milligram of induced sputum. Only samples with cell viability > 70% and squamous cell contamination < 20% were considered adequate.

Sputum supernatant concentrations of eosinophil cationic protein (ECP) levels were measured by a commercially available enzyme assay, with a lower detection limit of 2 ng/mL.

Follow-up during the study period:

After 0, 15, and 30 min of exposure to NO₂ or clean air in the chamber, subjects were asked questions relating to respiratory symptoms and perception of discomfort, either during the exposure period or during the two week followup.

FEV1 and PEF were monitored twice during exposure at 15-min intervals and hourly for 6 hr after leaving the chamber, with a portable combined spirometer.

During the 10–30 days between baseline measurements and first exposure and during the 2-week interval following each series of exposures, subjective symptoms and medications were recorded every day. Each participant measured FEV1 and PEF twice daily with a portable combined spirometer.

II. RESULTS

18 of 19 subjects completed all three exposures. Two of the 18 did not produce sufficient sputum for analysis at all time-points and were not included in the analyses of sputum. There were no significant changes in any measured respiratory function when exposed to either air or either concentration (200 or 600ppb) of nitrogen dioxide, during or after the exposure. There were no changes in subjective symptoms either during or after the exposure as reported by subjects.

There was a significant increase in the percentage of eosinophils in sputum (57% increase) after exposure to 600 ppb nitrogen dioxide when examined globally. There was no significant change at either 0 or 200 ppb nitrogen dioxide when examined globally. Changes in measurements relative to baseline measurements are shown in table 2.

Per day analysis was also performed. This indicated that there was no change at 600 ppb in eosinophils after the first exposure but there was a significant percentage change after second exposure and the day following the second exposure. There was an absolute change in eosinophil number at 600 ppb on day 2 and 3. There was a trend in increase of absolute eosinophil number at 200 ppb, with day two being non-significant but increasing and day 3 being significant increase over baseline. There was no changes in the other immune cells measured (macrophages

and neutrophils). Additionally, there was an increase in the amount of eosinophil cationic protein in the sputum.

Table 2 – Changes in baseline measurements for parameters measured in sputum [GM % (95% CI), n=16]

Variable	0 ppb NO ₂ (clean air)	200 ppb NO ₂	600 ppb NO ₂	pTrend
Percentage of eosinophils	-12 (-34, 16)	-5 (-28, 26)	57 (18, 109)**	0.04
Day 1	16 (-28, 86)	-34 (-59, 6)	12 (-31, 79)	0.81
Day 2	-5 (-37, 44)	-3 (-36, 46)	102 (32, 211)**	0.01
Day 3	-39 (-67, 13)	36 (-26, 149)	79 (-3, 230)	0.03
No. of eosinophils/mg	-5 (-31, 29)	23 (-10, 68)	120 (60, 202)#	0.02
Day 1	-5 (-44, 60)	-24 (-55, 29)	64 (-3, 177)	0.1
Day 2	9 (-39, 95)	23 (-31, 119)	142 (32, 344)**	0.06
Day 3	-18 (-57, 56)	99 (5, 278)*	163 (38, 398)**	0.03
ECP	21 (-1, 47)	0 (-18, 22)	43 (17, 75)**	0.23
No. of neutrophils/mg	12 (-17, 51)	-9 (-32, 22)	10 (-19, 49)	0.97
No. of macrophages/mg	-18 (-33, 0)	-2 (-20, 21)	-6 (-24, 15)	0.46

GM percentages represent all changes of the parameter for the 3 days (one sputum induction per day).

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; and # $p < 0.001$, compared with baseline.

III. INVESTIGATORS' DISCUSSION AND CONCLUSIONS: The findings indicate that repeated exposure to nitrogen dioxide, even in the absence of allergen exposure, can increase eosinophil airway response. This is indicative of general airway inflammation, even in the absence of changes in lung function. Additionally, the increase in eosinophil cationic protein indicates that not only are eosinophils recruited to the sputum but that these eosinophils are activated. The fact that there was no significant change on day one after exposure but there was change on day two and three indicates that there is likely a delay in recruitment in response to this inflammatory insult.

The LOAEL is 600 ppb, based on changes in eosinophil levels indicative of airway inflammation. The NOAEL is 200 ppb.



UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY
WASHINGTON D.C., 20460

OFFICE OF CHEMICAL SAFETY AND
POLLUTION PREVENTION

December 23, 2014

MEMORANDUM

SUBJECT: Ethics Review of Human Toxicity Study with Nitrogen Dioxide

FROM: Kelly Sherman, Human Studies Ethics Review Officer
Office of the Director
Office of Pesticide Programs

TO: Steven Weiss, Chief
Risk Assessment Science Support Branch
Antimicrobials Division
Office of Pesticide Programs

REF: Ezratty, Veronique et al. Repeated Nitrogen Dioxide Exposures and Eosinophilic airway Inflammation in Asthmatics: A Randomized Crossover Study. *Environmental Health Perspectives*. Volume 122, Number 8, August 2014. (MRID 49519201)

I have reviewed the referenced human toxicity study with nitrogen dioxide. I conclude that if the study is determined to be scientifically valid and relevant, there is no regulatory barrier to EPA relying on this research in actions taken under FIFRA or §408 of FFDCA.

Summary Characteristics of the Research

In this study, 19 nonsmokers with asthma aged 20-69 years (5 females, 14 males) were exposed at rest in a double-blind, crossover study, in randomized order, to 200 ppb nitrogen dioxide (NO₂), 600 ppb NO₂, or clean air once for 30 minutes on day 1 and twice for 30 minutes on day 2. The series of three exposures was repeated two more times, after a washout period of two weeks between each series. The inflammatory response in sputum was measured 6 hours, 32 hours, and 48 hours after the first exposure, and compared with baseline values measured twice 10-30 days before the first exposure.

The study was registered by the French Ministry of Health and approved by the Ethics Committee of Hotel-Dieu Hospital, Paris, France. All participants signed informed consent forms before enrollment in the study.

To confirm that the study underwent an independent ethics review, I contacted Dr. Veronique Ezratty via email and requested copies of the Ethics Committee's approval, the approved protocol, and the consent form. Dr. Ezratty provided the requested documents (see Appendix 1). The study was conducted in France, and the documents are in French. I have handwritten partial translations for key sections of the documents (see pages 12, 14, 15, 21, 24, 28, and 31-35). In addition, I used Google Translate to produce a translation of Section XV of the protocol (Information for Volunteers) and the Consent Form. Please see Appendix 2 for the translated documents.

1. Value of the Research to Society:

The objective of this study was to investigate whether repeated doses of NO₂, at various concentrations, induce changes in airway inflammation in asthmatics. The study was conducted at the Bichat Hospital in Paris, France. The results were published in *Environmental Health Perspectives* in August 2014. EPA is proposing to use the study in its risk assessment for nitrogen dioxide as medical equipment sterilant.

2. Subject Selection:

- a. **Demographics.** Nineteen subjects aged 20-69 years (5 females, 14 males) participated in the study. The subjects were non-smokers with asthma who had been free of symptoms of respiratory infection for 6 weeks prior to the start of the study.
- b. **Pregnancy and Nursing Status.** Women who were pregnant or nursing were excluded from the study, per the protocol and the consent form.
- c. **Recruitment.** The subjects were recruited from patients who were treated in the respiratory unit of Bichat Hospital and who met the selection criteria, which included being older than 18 years and having stable intermittent asthma.

3. Risks and Benefits:

- a. **Risks.** The risks and possible side effects are discussed in the fact sheet for volunteers and the consent form. Risks were minimized through the inclusion and exclusion factors, by selecting dose levels that would be unlikely to cause adverse effects, and by closely monitoring the subjects during and after the procedure. Medical oversight and assistance from nursing staff at the hospital also minimized potential risks to the subjects.
- b. **Benefits.** There are no benefits to the subjects.
- c. **Risk-Benefit Balance.** The potential societal benefits of increased understanding of NO₂ toxicity and effects outweighed the small risks associated with the study.

4. Independent Ethics Review: The study was reviewed and approved by the Ethics Committee of Hotel-Dieu Hospital, Paris, France.

5. **Informed Consent:** All subjects signed the informed consent form before participating. The consent form appears to meet the requirements of 40 CFR 26.1115, including adequately characterizing the risks and discomforts to subjects, clearly articulating the right to withdraw from the research at any time, and providing measures to ensure subject comprehension.
6. **Respect for Subjects.** Subjects were paid \$1,500 Euros for participation in the study. The consent form states that subjects were free to withdraw from the study at any time. The subjects' identifies are not revealed in the study report.

Applicable Standards

Standards Applicable to the Conduct of the Research

The portions of EPA's regulations regarding the conduct of research with human subjects, 40 CFR part 26 subpart A - L, do not apply since the research was neither conducted nor supported by EPA, nor was it conducted by a person with the intention to submit the results to EPA.

The protocol states that the study would be conducted according to the principles in the Declaration of Helsinki and Huriet's Law (p. 46 of 104). Huriet's Law is not applicable here because this study did not include subjects unable to provide consent. In addition to the Declaration of Helsinki, the International Ethical Guidelines for Biomedical Research Involving Human Subjects by the Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) is also informative regarding the prevailing ethical standards. The key ethical principles in the Declaration of Helsinki and CIOMS are respect for persons, beneficence and justice.

Standards Applicable to the Documentation of the Research

EPA identified this study through a review of the public literature. No person has independently submitted the published article or any results of this research to EPA. Consequently, the requirements for the submission of information concerning the ethical conduct of completed human research contained in EPA regulations at 40 CFR part 26, subpart M do not apply.

Standards Applicable to EPA's Reliance on the Research

The Agency's rule (40 CFR part 26 subpart Q) defines standards for EPA to apply in deciding whether to rely on research—like this study—involving intentional exposure of human subjects. The applicable acceptance standards from 40 CFR part 26 subpart Q are these:

§26.1703. Except as provided in §26.1706, EPA must not rely on data from any research subject to this subpart involving intentional exposure of any human subject who is a pregnant woman (and therefore her fetus), a nursing woman, or a child.

§26.1704 EPA must not rely on data from any research subject to this section if there is clear and convincing evidence that: (1) The conduct of the research was fundamentally

unethical (e.g., the research was intended to seriously harm participants or failed to obtain informed consent); or (2) The conduct of the research was deficient relative to the ethical standards prevailing at the time the research was conducted in a way that placed participants at increased risk of harm (based on knowledge available at the time the study was conducted) or impaired their informed consent.

EPA has submitted this study for review by the Human Studies Review Board (HSRB) because 40 CFR §26.1604 requires EPA to seek HSRB review of any intentional exposure study initiated after April 7, 2006 on which the Agency intends to rely in decisions under FIFRA or FFDCA. This study meets those criteria because EPA intends to use the results of this study to inform its decision on a pending registration application for a new pesticide product containing nitrogen dioxide.

Compliance with Applicable Standards

All of the subjects in this study were adults. The five female subjects were not pregnant or nursing. Therefore, this research did not involve intentional exposure of any pregnant or nursing female subjects or any children. EPA's reliance on the research is not prohibited by 40 CFR §26.1703.

The subjects provided written informed consent and the protocol underwent independent ethics review and approval. Based on these facts, and the absence of any information suggesting that the research was fundamentally unethical or intended to harm participants, I conclude that reliance on the research is not prohibited by 40 CFR §26.1704(1).

I have also concluded that the conduct of the research was not deficient relative to the ethical standards prevailing at the time the research was conducted in a way that placed participants at increased risk of harm (based on knowledge available at the time the study was conducted) or impaired their informed consent. Therefore, reliance on this study is not prohibited by 40 CFR §26.1704(2). In reaching this conclusion, I considered the information in the published article and the documents provided by Dr. Ezratty (the protocol and the informed consent form). The documents from Dr. Ezratty are in French; I used an online translation tool (Google Translate) to partially translate the documents.

Consistent with the principle of respect for persons, the study purpose and potential risks and discomforts were explained to subjects, only subjects with the capacity to understand the potential risks were allowed to participate, subjects were offered medical care at no cost for study-related injuries, and all subjects provided written informed consent. Consistent with the principle of beneficence, the selected dose levels were unlikely to pose more than a minimal risk to subjects, subjects with medical conditions that could increase the likelihood of an adverse effect were excluded, and the research was conducted in a hospital by trained medical professionals.

Finally, there is no clear and convincing evidence to suggest undue influence or lack of fully informed, fully voluntary consent. The subjects were recruited from among patients at the hospital being treated for asthma; there is no clear and convincing evidence to suggest that these subjects were vulnerable to undue influence by the medical staff at the hospital or the researchers

regarding their decision about whether to participate in the research. The research was reviewed and approved by the Ethics committee of Hotel-Dieu Hospital, Paris, France.

Based on these facts, I conclude that the study was not deficient relative to the prevailing ethical standards in a way that placed participants at increased risk of harm or impaired their informed consent.

Conclusion

I find no barrier in law or regulation to reliance on MRID 49519201 in EPA actions taken under FIFRA or §408 of FFDCA. I defer to others for a full review of the scientific validity of this study. If it were determined not to have scientific validity, it would also not be ethically acceptable.

APPENDIX 1:

Protocol, Consent Form, and Ethics Review Approvals
for *Ezratty 2014*

PROJET DE RECHERCHE BIOMEDICALE
sans bénéfice individuel direct

Mars 2007

Titre de l'étude :

**EFFETS BRONCHIQUES DE L'EXPOSITION REPETEE A DE FAIBLES DOSES DE
DIOXYDE D'AZOTE CHEZ DES SUJETS ASTHMATIQUES INTERMITTENTS**

Promoteur : Service des Etudes Médicales de Gaz de France

Docteur Jacques LAMBROZO
Directeur du Service des Etudes Médicales de Gaz de France
22-28, rue Joubert
75009 Paris
Téléphone : 01 55 31 46 01
Télécopie : 01 55 31 46 20

Investigateur principal :

Professeur Michel AUBIER
Chef du Service de Pneumologie
Hôpital Bichat
46, rue Henri Huchard
75018 Paris
Téléphone : 01 40 25 68 00
Télécopie : 01 40 25 88 18

Co-investigateurs :

Docteur Catherine NEUKIRCH
Service de Pneumologie, Hôpital Bichat
46, rue Henri Huchard
75018 PARIS
Téléphone : 01 40 25 68 00

Docteur Marcel BONAY
Service d'Explorations Fonctionnelles
Respiratoires, Hôpital Bichat
46, rue Henri Huchard
75018 PARIS
Téléphone : 01 40 25 84 02

Docteur Véronique EZRATTY
Service des Etudes Médicales de Gaz de France
22-28, rue Joubert
75009 PARIS
Téléphone : 01 55 31 46 04
Télécopie : 01 55 31 46 20

Madame Gaëlle GUILLOSSOU
Ingénieur-chercheur
Service des Etudes Médicales de Gaz de France
22-28, rue Joubert
75009 Paris
Téléphone : 01 55 31 46 03
Télécopie : 01 55 31 46 20

Monsieur Luc ROPERT
Ingénieur-chercheur
Direction de la Recherche de Gaz de France
361 av du PdT WILSON
BOITE POSTALE 33
93211 PLAINE ST DENIS CEDEX
Téléphone : 01 49 22 51 26

Monsieur Patrick MURE
Direction de la Recherche de Gaz de France
361 av DU PdT WILSON
BOITE POSTALE 33
93211 PLAINE ST DENIS CEDEX
01 49 22 48 68

Madame Sabine MAESTRI
Direction de la Recherche de Gaz de France
361 av dU PdT WILSON
BOITE POSTALE 33
93211 PLAINE ST DENIS CEDEX
01 49 22 52 77

Monsieur Thierry BELLIN-CROYAT
Direction de la Recherche de Gaz de France
361 av dU PdT WILSON
BOITE POSTALE 33
93211 PLAINE ST DENIS CEDEX
Téléphone : 01 49 22 50 54

Monsieur Serge KOSCIELNY
Biostatisticien Institut Gustave Roussy

SOMMAIRE

I.	RESUME DU PROTOCOLE CHAMBRE NO₂	4
II.	INTRODUCTION	7
III.	POSITION DU PROBLEME ET OBJECTIF DE L'ETUDE	10
IV.	DEROULEMENT DE L'EXPERIMENTATION	11
V.	JUSTIFICATION DU DESIGN DE L'ETUDE	11
VI.	POPULATION ETUDIEE	12
VII.	CRITERES DE JUGEMENT	12
	CRITERE DE JUGEMENT PRINCIPAL	12
	CRITERES DE JUGEMENT SECONDAIRE	12
VIII.	CALCUL DU NOMBRE DE SUJETS NECESSAIRES	12
IX.	METHODES STATISTIQUES	13
	JUSTIFICATION DU CRITERE PRIMAIRE DE JUGEMENT ET DETERMINATION DU NOMBRE DE SUJETS NECESSAIRE	13
X.	CRITERES DE SELECTION	14
	CRITERES D'INCLUSION	14
	CRITERES D'EXCLUSION	15
XI.	MATERIEL ET METHODES	15
	CHAMBRE D'EXPOSITION	15
	RANDOMISATION	16
	TOLERANCE DURANT LES JOURNEES D'EXPERIMENTATION	16
	TESTS CUTANES	16
	DOSAGES SANGUINS	16
	EXPLORATIONS FONCTIONNELLES RESPIRATOIRES : EFR	17
	TEST D'HYPERREACTIVITE BRONCHIQUE A LA METACHOLINE	17
	EXPECTORATION INDUITE	18
	ANALYSE DU CONDENSAT DE L'AIR EXHALE	18
	ANALYSE DU NO EXHALE	19
	SURVEILLANCE AU DOMICILE	20
	SURVEILLANCE DE LA TENEUR EN NO ₂ DANS L'ENVIRONNEMENT DES VOLONTAIRES A LA SORTIE DE LA CABINE	20
XII.	RECUEIL DES DONNEES ET DUREE DE L'ETUDE	21
	SUIVI DE L'ETUDE	21
	DUREE DE PARTICIPATION	21
	LIEU DE REALISATION	21
	DUREE PREVISIONNELLE DE L'ETUDE	21
XIII.	IMPLICATIONS ETHIQUES	21
	AMENDEMENTS AU PROTOCOLE	22

EVALUATION DE L'OBSERVANCE	22
EVALUATION DE LA TOLERANCE PENDANT L'ETUDE	22
ATTITUDE EN CAS DE SORTIE PREMATUREE D'ESSAI.....	23
CONDUITE A TENIR EN CAS D'EVENEMENTS INDESIRABLES GRAVES	23
ECARTS AU PROTOCOLE	23
CRITERES DE SORTIE D'ESSAI	23
REGLES DE FIN D'ESSAI.....	23
RAPPORT ET PUBLICATIONS	24
CONSIDERATIONS PRATIQUES	24
INFORMATION DES DIRECTEURS D'ETABLISSEMENT	24
BONNES PRATIQUES CLINIQUES	24
ASSURANCE	24
ARCHIVAGE	24
CONFIDENTIALITE	24
SIGNATURES	
XIV. BIBLIOGRAPHIE	26
XV. NOTES D'INFORMATION ET DE CONSENTEMENT ECLAIRE	28
FICHE D'INFORMATION POUR LE VOLONTAIRE	
FORMULAIRE DE CONSENTEMENT ECLAIRE POUR PARTICIPER A UN PROJET DE RECHERCHE	
ANNEXES.....	36
ANNEXE 1 : AVIS DU CCPPRB DE L'HOTEL DIEU :	37
ANNEXE 2 : DESIGN DE L'ETUDE	46
ANNEXE 3 : SCHEMA EXPERIMENTAL	47
ANNEXE 4 : SCHEMA DE LA CHAMBRE D'EXPOSITION	48
ANNEXE 5 : METROLOGIE DU NO ₂	49
ANNEXE 6 : QUESTIONNAIRE BUDGET ESPACE ACTIVITE TEMPS.....	54
ANNEXE 7 : QUESTIONNAIRE DE TOLERANCE	59
ANNEXE 8 : CARNET DE SURVEILLANCE A DOMICILE DES SYMPTOMES ET DU DEP.....	60
ANNEXE 9 : ATTESTATION D'ASSURANCE	61
ANNEXE 10 : ATTESTATION DE VERSEMENT A LA DRASS.....	63
ANNEXE 11 : ATTESTATION D'AGREMENT DU LIEU D'ESSAI	65

I. RESUME DU PROTOCOLE CHAMBRE NO₂

POSITION DU PROBLEME

De nombreuses études en exposition contrôlée au dioxyde d'azote (NO₂) ont été conduites avec des doses croissantes et de courtes durées d'exposition (quelques minutes à quelques heures) sur des groupes de volontaires, de différents âges, sains ou sensibles. Chez les sujets asthmatiques, ces études n'ont permis d'observer que de minimes changements de la fonction respiratoire pour des expositions comprises entre 100 et 600 ppb de NO₂ (1 ppb = 1,88 µg/m³).

Cette étude a pour but d'évaluer si l'exposition au NO₂, dans des conditions représentatives de celles rencontrées dans l'habitat lorsqu'il existe une source spécifique, induit une inflammation des voies aériennes chez des sujets asthmatiques intermittents.

Cette hypothèse sera testée au moyen de techniques non invasives, reproductibles et sensibles pour évaluer l'inflammation bronchique (expectoration induite, condensat et NO exhalé). Les effets du NO₂ sur la fonction respiratoire ainsi que sur la réactivité bronchique après test à la métacholine seront également évalués.

OBJECTIF

Evaluer les effets bronchiques d'expositions brèves et répétées sur deux jours consécutifs de concentrations faibles réalistes de dioxyde d'azote (200 ppb de NO₂ et 600 ppb de NO₂ soit 376 µg/m³ et 1 128 µg/m³ de NO₂) chez des patients présentant un asthme intermittent.

PLAN EXPERIMENTAL

Etude en exposition contrôlée en cross-over, randomisée en double aveugle, comparative (deux concentrations différentes de dioxyde d'azote versus air filtré) chez 15 volontaires présentant un asthme intermittent. L'ordre des expositions est aléatoire avec 6 combinaisons possibles par sujet (cf. annexe 1).

CRITERES DE JUGEMENT

Critère de jugement principal :

- **variation du taux d'éosinophiles mesuré dans l'expectorat** après exposition au NO₂ à deux concentrations différentes (200 ppb et 600 ppb) comparé à l'air filtré.

Critères de jugement secondaire :

- **inflammation bronchique :** variation des paramètres de l'inflammation (autres que le taux d'éosinophiles) mesurés dans l'expectorat (ECP, MPO, IL4, IL5, IL10, GM-CSF, MCP1, TNF-α, IFN-γ, eotaxin-1), dans le condensat (H₂O₂, cytokines dont IL4) et dans le sang (NFS, ECP, MPO) ainsi que variation du NO exhalé, selon le type d'exposition (air filtré, 200 ppb de NO₂ et 600 ppb de NO₂).
- **hyperréactivité bronchique à la métacholine :** comparaison du PD₂₀, dose provoquant une diminution du Volume Expiré Maximal en 1 seconde (VEMS) de 20 %, après exposition à l'air filtré et après exposition à deux concentrations différentes de NO₂ (200 ppb et 600 ppb) à J3 par rapport aux PD₂₀ mesurés lors des deux tests de base réalisés à J0 et J0'.

POPULATION ETUDIEE

20 patients de plus de 18 ans présentant un asthme intermittent stable (VEMS ≥ 80 % de la valeur théorique), non traités par corticoïdes, seront recrutés afin d'avoir des données analysables pour au moins 15 patients.

SCHEMA DE L'ETUDE

Design (cf. annexe 2) : expositions répétées en double aveugle de 1 x 30 minutes le premier jour et 2 x 30 minutes le deuxième jour dans un ordre aléatoire à :

- NO₂ : 200 ppb (376 µg/m³)
- NO₂ : 600 ppb (1 128 µg/m³)
- air filtré

Chaque sujet aura respectivement 12 visites à l'hôpital Bichat :

UNE PREMIERE VISITE POUR LE RECRUTEMENT ET LE PREMIER DES DEUX TESTS A LA METACHOLINE DE BASE ET LE PREMIER DES DEUX TESTS D'EXPECTORATION INDUITE DE BASE (V0), DANS LE MOIS PRECEDANT LA PREMIERE SERIE D'EXPOSITIONS,

LE SECOND TEST DE BASE A LA METACHOLINE ET LE SECOND TEST D'EXPECTORATION INDUITE DE BASE (V0') 8 A 15 JOURS APRES (SOIT AU MOINS 8 JOURS AVANT LA PREMIERE EXPOSITION),

TROIS SERIES D'EXPOSITIONS EN CHAMBRE DE 3 VISITES (3 JOURS CONSECUTIFS), A 15 JOURS D'INTERVALLE (V1, V2, V3 – V4, V5, V6 – V7, V8, V9),

UNE VISITE DE SUIVI EN FIN D'ETUDE (V10), 15 JOURS APRES LA DERNIERE SERIE D'EXPOSITIONS.

V0 : Sélection des patients

INTERROGATOIRE,

- signature du consentement éclairé,
- vérification des critères d'inclusion et d'exclusion,
- tests cutanés aux pneumallergènes et/ou IgE spécifiques (datant de moins de 3 ans),
- épreuves fonctionnelles respiratoires (EFR) : courbe débit-volume,
- expectoration induite de base. Le test sera fait à deux reprises (V0, V0'),
- prélèvement sanguin : Numération formule sanguine (éosinophiles) / IgE totales, cytokines
- test à la métacholine. Le test de base sera fait à deux reprises (V0, V0') dans le service, d'Explorations Fonctionnelles Respiratoires (EFR) afin de vérifier sa reproductibilité,
- remise du carnet de suivi des symptômes et du Débit Expiratoire de Pointe (DEP).

V1 (J1)

EXPOSITION DANS LA CHAMBRE PENDANT 30 MINUTES DANS UN ORDRE ALEATOIRE A 200 PPB DE NO₂, A 600 PPB DE NO₂ OU A DE L'AIR FILTRE,

- avant l'exposition : NO exhalé, condensat, courbe débit-volume
- immédiatement après l'exposition : NO exhalé, condensat, courbe débit-volume
- puis 6 heures après la fin de l'exposition : NO exhalé, condensat, courbe débit-volume, expectoration induite et prélèvement sanguin (éosinophiles, cytokines),
- surveillance de la tolérance et du DEP toutes les 15 minutes lors des deux expositions en chambre (T0, T15 et T30) et toutes les heures pendant la journée d'hospitalisation.

V2 (J2)

EXPOSITION DANS LA CHAMBRE 2 FOIS 30 MINUTES A 1 HEURE D'INTERVALLE DANS UN ORDRE ALEATOIRE AU MEME COMPOSE QU'A J1 (200 PPB DE NO₂ OU 600 PPB DE NO₂ OU AIR FILTRE),

- avant l'exposition : NO exhalé, condensat, courbe débit-volume
- immédiatement après la deuxième exposition de J2: NO exhalé, condensat, courbe débit-volume
- puis 6 heures après la fin de l'exposition : NO exhalé, condensat, courbe débit-volume, expectoration induite et prélèvement sanguin (éosinophiles, cytokines),
- surveillance de la tolérance et du DEP toutes les 15 minutes lors des deux expositions en chambre (T0, T15 et T30) et toutes les heures pendant la journée d'hospitalisation.

V3 (J3)

EVALUATION DES EFFETS BRONCHIQUES RETARDES 48 HEURES APRES LA PREMIERE EXPOSITION ET 24 HEURES APRES LES DEUXIEME ET TROISIEME EXPOSITIONS,

NO EXHALE, CONDENSAT, COURBE DEBIT-VOLUME, TEST A LA METACHOLINE, EXPECTORATION INDUITE, PUIS PRELEVEMENT SANGUIN (EOSINOPILES, CYTOKINES),

REMISE D'UN CARNET DE SUIVI DES SYMPTOMES ET DU DEP AU DOMICILE.

Wash-out de 15 jours

V4, V5, V6

IDEM A V1 V2 V3 AVEC AUTRES COMPOSES NON ENCORE TESTES,

RECUPERATION DU CARNET DE SUIVI ET REMISE D'UN NOUVEAU CARNET DE SUIVI.

Wash-out de 15 jours

V7, V8, V9

IDEM A V1 V2 V3 ET A V4, V5, V6 AVEC AUTRES COMPOSES NON ENCORE TESTES,

RECUPERATION DU CARNET DE SUIVI ET REMISE D'UN NOUVEAU CARNET DE SUIVI.

V10

15 jours après V9 : interrogatoire et examen clinique avec récupération du carnet de suivi

II. INTRODUCTION

Le dioxyde d'azote (NO_2) est un polluant de l'air courant produit par les processus de combustion. Les sources principales sont à l'extérieur le trafic routier, en particulier les véhicules diesel et dans une moindre mesure, les centrales thermiques, certaines activités industrielles et la fermentation de grains humides stockés en silos. Les principales sources intérieures sont la fumée du tabac et la combustion du charbon, du bois, du fioul et du gaz pour la cuisine et/ou le chauffage.

Gaz de France se soucie depuis toujours de la qualité du gaz délivré à ses clients tant au niveau des caractéristiques énergétiques qu'environnementales. La combustion des combustibles fossiles et notamment du gaz naturel dégage de la chaleur, de la vapeur d'eau et du gaz carbonique ainsi que d'autres composés tels que les oxydes d'azote dans des concentrations moindres. En effet, la chaleur induit une réaction entre l'azote de l'air et l'oxygène pour produire des oxydes d'azote, dioxyde d'azote (NO_2) et monoxyde d'azote (NO) rapidement oxydé dans l'air en NO_2 .

Pour compléter ses connaissances sur les éventuels effets sanitaires du NO_2 sur la santé, Gaz de France souhaite conduire des travaux au moyen de techniques sensibles, reproductibles et non invasives. L'objectif est d'optimiser l'évaluation des effets sanitaires du NO_2 chez des sujets asthmatiques intermittents exposés à des concentrations réalistes représentatives des teneurs retrouvées dans les ambiances des cuisines lors de l'utilisation d'une gazinière.

VALEURS LIMITES SANITAIRES ET ENVIRONNEMENTALES

En France, le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique recommande, dans son avis du 1er octobre 1997, une valeur de précaution de $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de NO_2 en moyenne horaire.

La législation européenne (Décret N°1999/30/CE et N°2000/69/CE) a fixé les critères suivants concernant les concentrations du NO_2 :

- Valeur limite en 2005 : percentile 99,8 (18 heures de dépassement sur un an) des concentrations moyennes horaires soit une valeur de $250 \mu\text{g}/\text{m}^3$
- Valeur limite applicable à compter de 2010 : percentile 99,8 des concentrations moyennes horaires soit une valeur de $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$
- Seuil d'alerte : $400 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en moyenne horaire
- Seuil de recommandation et d'information : $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en moyenne horaire

DONNEES D'EXPOSITION

A l'intérieur des habitations, les concentrations maximales et moyennes en NO_2 dépendent de plusieurs facteurs, en particulier du combustible, du degré d'utilisation et du type d'appareil utilisés pour le chauffage et la cuisine, de l'existence d'un tabagisme, du type de ventilation et du taux de renouvellement d'air ainsi que de la concentration de NO_2 dans l'air extérieur.

Les concentrations à l'intérieur des maisons peuvent dépasser les concentrations extérieures lorsqu'il existe une source intérieure. En France, 30 % des foyers sont équipés d'une cuisinière à gaz (SOFRES). Ce taux est beaucoup plus élevé en milieu urbain et dépasse 80 % en Ile-de-France. Les données d'exposition au NO_2 sont encore assez limitées mais devraient s'enrichir prochainement des résultats de l'Observatoire de la Qualité de l'air intérieur qui vient de terminer une enquête dans 700 logements représentatifs de l'habitat résidentiel en France.

Aux Etats-Unis, des mesures en continu dans des cuisines équipées de cuisinières à gaz retrouvent des concentrations de NO_2 pendant une heure pouvant atteindre $940 \mu\text{g}/\text{m}^3$ à proximité de la source (**Harlos, 1987 ; Pilotto, 1997**).

Les données disponibles indiquent que, lorsqu'il existe une cuisinière à gaz et que la ventilation est inadaptée pendant les pics de pollution intérieure à l'heure des repas, les concentrations de NO_2 dans les cuisines (et parfois dans d'autres pièces) peuvent atteindre, voire dépasser la valeur guide recommandée par la Communauté européenne de $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ pour une heure.

DONNEES TOXICOLOGIQUES CHEZ L'HOMME/EVALUATION DES EFFETS SANITAIRES DES EXPOSITIONS AIGUES ET CHRONIQUES AU NO₂

Le NO₂ est un gaz oxydant peu hydrosoluble ce qui lui permet de pénétrer profondément dans le tractus respiratoire. Après inhalation, il se dépose le long des voies aériennes et il n'atteint les alvéoles en quantité notable que lorsqu'il est présent à des concentrations très élevées ou lors d'un exercice.

Le NO₂ est un irritant des voies respiratoires qui peut provoquer une inflammation et un œdème pulmonaire en cas d'inhalation à des concentrations élevées. Des concentrations de 2 à 17 ppm (3 926 à 33 374 µg/m³) sont sub-létales pour les cellules alvéolaires de type I et les cellules épithéliales ciliées (INERIS, 2005).

L'inhalation à des concentrations élevées de NO₂ entraîne des lésions au niveau des bronchioles terminales et des alvéoles chez l'homme (Alberts, 1994 ; Devalia, 1993).

L'exposition de sujets sains non fumeurs à des doses supérieures à 4 050 µg/m³ entraîne une augmentation du nombre de mastocytes et de lymphocytes dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (Sandstrom, 1991) ainsi que du nombre de polynucléaires neutrophiles à la 24^e heure. Ces modifications sont liées à la formation d'acide nitrique et nitreux en solution aqueuse, à la peroxydation des lipides membranaires, ainsi qu'à la formation de radicaux libres. A ces niveaux de NO₂, une diminution de la clairance mucociliaire est observée.

Les concentrations de NO₂ généralement retrouvées à l'intérieur des locaux, y compris en milieu professionnel, ne sont pas suffisamment élevées pour induire des effets aigus sérieux mais pourraient, chez certains sujets sensibles, affecter la fonction respiratoire et potentialiser la réponse allergique.

1 Effets de l'exposition aiguë au NO₂ chez l'homme/Etudes en exposition contrôlée

De nombreuses études en exposition contrôlée au NO₂ ont été conduites avec des doses croissantes et de courtes durées d'exposition (quelques minutes à quelques heures) sur des groupes de volontaires, de différents âges, sains ou sensibles : sujets asthmatiques et/ou allergiques atteints de broncho-pneumopathies chroniques obstructives (BPCO) ou d'hypertension pulmonaire (EHC, 1997).

La réponse à l'exposition au NO₂ varie selon les antécédents respiratoires des sujets. Les individus en bonne santé sont les moins réactifs à l'exposition du NO₂. Les sujets atteints de BPCO peuvent s'avérer plus réactifs que les sujets sains, mais leur réponse au NO₂ demeure généralement limitée et difficile à différencier de celle des autres sujets.

1.1-Sujets sains

Des expositions contrôlées en chambre d'exposition, pendant des durées variables, uniques ou répétées, n'ont pas montré d'effet sur la fonction respiratoire de sujets sains à des concentrations de NO₂ allant jusqu'à 1 880 µg/m³ (Hester and Harisson, 1998).

Chez des individus en bonne santé, non tabagiques, le NO₂ peut provoquer :

- une altération de la fonction respiratoire, et notamment une augmentation de la résistance respiratoire, à partir d'une concentration de 2 800 µg/m³ (1,5 ppm) pendant 2 heures. Les données ne sont cependant pas suffisantes pour caractériser la relation dose-réponse,
- une augmentation de la réponse aux agents bronchoconstricteurs à partir d'une concentration de 2 800 µg/m³ (1,45 ppm) pendant 1 heure (EHC, 1997).

1.2-Sujets sensibles

a. Sujets asthmatiques

L'exposition au NO₂ de sujets asthmatiques peut causer une augmentation de la réactivité des voies respiratoires à divers bronchoconstricteurs comme les substances cholinergiques et staminergiques, et également au SO₂ ou à l'air froid. Cet effet peut apparaître à une concentration égale à 380 µg/m³ (0,19 ppm). Une méta-analyse de 20 études en exposition contrôlée de sujets asthmatiques laisse supposer que la concentration-seuil d'apparition de l'effet pourrait être encore inférieure (jusqu'à 200 µg/m³), mais n'a pas permis d'établir une relation dose-réponse entre 350 et 1 150 µg/m³ (EHC, 1997). Cependant, plusieurs études sur des sujets asthmatiques n'ont permis d'observer que de minimes changements du point de vue spirométrique et la plethysmographique pour des expositions comprises entre 0,1 et 0,6 ppm de NO₂ (US-EPA, 1995).

b. Sujets atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)

Chez ces sujets, le NO₂ peut causer :

- une légère augmentation de la résistance respiratoire, après une exposition de courte durée (15 à 60 min) à une concentration de 2 800 µg/m³ (1,45 ppm).
- une diminution des performances spirométriques (3 à 8 % de FEV₁), pour une exposition de 3 heures à une concentration de 600 µg/m³ (0,3 ppm) **(EHC, 1997)**.

Dans plusieurs études, suite à des expositions allant jusqu'à 2 ppm pendant 1 heure, il n'a pas été observé de différences significatives au niveau des effets respiratoires entre des sujets atteints de bronchite chronique et d'emphysème, et les sujets sains **(US-EPA, 1995)**.

D'une manière générale, les résultats sont hétérogènes, et malgré le grand nombre d'études en exposition contrôlée réalisées, aucune courbe dose-réponse n'a pu être élaborée pour les effets de l'exposition aiguë au NO₂ dans l'intervalle des concentrations rencontrées dans les conditions réelles d'exposition des populations générales, à savoir 100 à 600 µg/m³, soit 0,05 à 3 ppm **(US-EPA, 1995)**.

2. Effets de l'exposition chronique au NO₂ intérieur chez l'homme/Etudes épidémiologiques

La plupart des études épidémiologiques conduites durant les années 1970 se sont focalisées sur les effets sanitaires induits par la pollution atmosphérique. Ces travaux ne sont généralement pas considérés comme très contributifs pour l'évaluation des effets dus à l'exposition intérieure au NO₂. En effet, les effets sanitaires observés dans ces études pourraient être dus au NO₂ agissant plutôt en tant que marqueur d'autres polluants plutôt qu'au NO₂ même **(COMEAP, 2004)**.

En revanche depuis plus de deux décennies, un certain nombre d'études épidémiologiques se sont également intéressées aux effets sur la santé des expositions intérieures au NO₂ qui, lorsqu'il existe des sources intérieures, contribuent largement à l'exposition totale individuelle **(Basu, 1999)**.

2.1 Chez l'enfant

Les nombreuses études réalisées chez de très jeunes enfants, des enfants scolarisés et des adolescents ont permis de classer les sources d'exposition et d'identifier les symptômes et les pathologies induites par l'exposition au NO₂.

Une méta-analyse réalisée par l'US-EPA en 1992 a combiné les résultats de 11 études ayant évalué la relation entre l'exposition au NO₂ dans l'air intérieur et les pathologies respiratoires chez l'enfant. Les résultats utilisant trois différentes méthodes d'analyse statistique sont concordants. Ils montrent que, pour une élévation de 30 µg/m³ du niveau de NO₂ chez les enfants exposés à long terme, le risque de maladies respiratoires serait augmenté de 20 %. Cette différence de 30 µg/m³ du niveau de NO₂ correspond à l'augmentation moyenne liée à l'utilisation régulière d'une cuisinière à gaz.

Depuis cette méta-analyse, d'autres études publiées ont produit des résultats discordants. Deux études prospectives nord-américaines chez 900 et 1 200 enfants, suivis respectivement pendant les 12 ou 18 premiers mois de vie, n'ont pas montré d'augmentation de la fréquence des symptômes ou maladies respiratoires lorsqu'il existe une cuisinière à gaz **(Aldous, 1996 ; Samet, 1993)**. Une étude chez 14 000 familles australiennes avec de jeunes enfants a montré une association entre utilisation d'une cuisinière à gaz et asthme, l'association n'étant pas retrouvée pour les autres sources intérieures de NO₂ **(Volkmer, 1995)**. Une autre étude australienne a évalué l'association entre les pathologies respiratoires de 388 enfants âgés de 6 à 11 ans et les niveaux d'exposition au NO₂ mesuré pendant les heures de chauffe dans 41 classes appartenant à quatre écoles ayant un chauffage au gaz et quatre écoles avec chauffage électrique. Des mesures ont également été faites dans les logements des enfants ayant des appareils au gaz à la maison lors de l'utilisation pendant quatre soirées. Une exposition à des pics horaires ≥ 80 ppb, comparée à un bruit de fond de 20 ppb, était associée à une augmentation significative des maux de gorge, des rhumes et de l'absentéisme **(Pilotto, 1997)**. Une étude chez une cohorte de 2 289 Anglais retrouvait une association significative entre exposition à une cuisinière à gaz et sifflements dans l'enfance et l'adolescence **(de Bilderling, 2005)**.

2.2 Chez l'adulte

Les études publiées sur la relation entre l'exposition au NO₂ et les symptômes ou la fonction respiratoire montrent des résultats discordants. Plusieurs études n'ont pas retrouvé d'augmentation des symptômes respiratoires chez les adultes vivant dans des logements équipés de cuisinière à gaz (Jarvis, 1996 ; Ostro, 1993 ; Viegi, 1992).

Une étude multicentrique, l'European Community Respiratory Health Survey (ECRHS), a analysé les données issues de 23 centres dans 11 pays différents recueillies chez 5 561 hommes et 6 029 femmes âgés de 20 à 44 ans. Du fait d'une variation des effets sanitaires éventuels induits par l'utilisation d'une cuisinière à gaz selon les centres, la méthodologie utilisée a été celle d'une méta-analyse. Aucune relation entre les symptômes respiratoires et la cuisine au gaz n'a été retrouvée chez les hommes. Chez les femmes, une corrélation entre l'utilisation d'une cuisinière à gaz et le symptôme « sifflements associés à un essoufflement dans l'année précédente » était légèrement positive : odds ratio (OR 1,33 (IC 95% 1,06-1,69)) (Jarvis, 1998).

Une étude s'est intéressée à la survenue de symptômes respiratoires en fonction de l'utilisation des appareils à gaz chez des sujets âgés qui constituent une population particulièrement susceptible (Dow, 1999). L'absence de corrélation conduit les auteurs à conclure que l'utilisation des appareils à gaz n'est probablement pas une cause importante de morbidité respiratoire dans cette population.

III. POSITION DU PROBLEME ET OBJECTIF DE L'ETUDE

De nombreux travaux épidémiologiques et expérimentaux ont évalué les effets sanitaires dus à l'exposition au dioxyde d'azote (NO₂) à des concentrations retrouvées dans des environnements intérieurs. Cependant, les résultats des études disponibles sont discordants et ne permettent pas, à ce jour, d'affirmer ni d'infirmer l'existence d'une relation causale entre l'exposition au NO₂ (ou l'utilisation d'une cuisinière à gaz) et une augmentation de la morbidité respiratoire.

Les discordances observées pourraient être liées aux hypothèses suivantes :

- L'impact du NO₂ sur la fonction respiratoire passerait par une interaction avec d'autres facteurs physiques, chimiques ou microbiologiques (Ayres, 1998). Cette hypothèse est renforcée par les résultats d'expositions contrôlées en chambre montrant que le NO₂ peut agir comme un agent potentialisateur en présence d'autres cofacteurs. Ainsi, une potentialisation de la réponse à l'exercice et à l'air froid (deux stimuli de la bronchoconstriction chez le sujet présentant un asthme d'effort) a été observée après exposition à 540 µg/m³ de NO₂ (Bauer, 1986). L'exposition combinée au NO₂ et à des aérosols acides pourrait altérer les mécanismes spécifiques de défense de l'hôte (Frampton, 1991). Depuis une dizaine d'années, ce sont surtout les effets de l'exposition au NO₂ sur la réponse allergique immédiate et tardive qui suscitent un intérêt particulier. Plusieurs études ont montré que le NO₂ inhalé avant un allergène (acariens, pollen) pouvait amplifier la réaction à l'allergène chez des sujets sensibles (Tunncliffe, 1994). De même, l'exposition répétée pendant 4 jours à 500 µg/m³ de NO₂ pendant 30 minutes augmentait de façon modeste mais significative la réponse allergique au pollen (Strand, 1998). Une étude récente a également montré qu'une exposition répétée brève de 15 minutes pendant deux jours à 500 µg/m³ de NO₂ augmentait la réponse inflammatoire allergique mesurée par la technique d'expectoration induite (Barck, 2005).
- Les effets sur la santé seraient induits par d'autres polluants de l'air comme l'acide nitreux (HONO) qui est produit directement par la combustion du gaz et indirectement à partir du NO₂ (Jarvis, 2005).
- Les effets induits par des niveaux faibles d'exposition retrouvés dans des ambiances intérieures seraient difficiles à mettre en évidence avec les méthodes classiques. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), il n'y aurait pas d'effet-seuil pour le NO₂. A des concentrations faibles, le NO₂ pourrait induire une inflammation sub-clinique des voies aériennes chez des sujets asthmatiques intermittents non traités par corticoïdes.

Nous nous proposons de tester cette dernière hypothèse afin d'évaluer si des expositions brèves et répétées à des concentrations réalistes dans l'environnement intérieur, lorsqu'il existe une source de NO₂, peuvent induire une augmentation de l'inflammation bronchique chez des sujets asthmatiques intermittents. L'utilisation de trois techniques non invasives, reproductibles et sensibles pour évaluer l'inflammation bronchique : l'expectoration induite, le condensat et le NO exhalé, réalisées avant,

immédiatement après et à distance de l'exposition à 200 ppb , 600 ppb de NO₂ comparée à l'air dans une étude randomisée en double aveugle devrait permettre de tester cette hypothèse de manière optimale. Les effets du NO₂ sur la fonction respiratoire ainsi que sur la réactivité bronchique après test à la métacholine seront également évalués.

Le Service des Etudes Médicales de Gaz de France, avec la collaboration du département R&D d'EDF, a installé une chambre d'exposition dans le Centre d'Investigation Clinique (CIC) de l'Hôpital Bichat en 2000 afin de mener des études en exposition contrôlée évaluant les effets sanitaires de polluants de l'air. Une première étude a évalué les effets bronchiques d'une faible dose de formaldéhyde sur la réaction allergique de sujets asthmatiques intermittents. Les résultats de cette première étude ont été présentés en avril 2005 à la conférence britannique sur la pollution intérieure et extérieure organisée par l'Institut de santé environnementale, Institute for Environment and Health, Université de Leicester (actes sur le site Internet de l'IEH : <http://www.le.ac.uk/ieh/publications/publications.html>) et en septembre 2005 au Congrès annuel de l'European Respiratory Society (ERS) (actes sur le site Internet d'ERS : <http://www.ersnet.org/ers/lr>).

IV. DEROULEMENT DE L'EXPERIMENTATION

Les conditions d'exposition ont été choisies afin d'être le plus proche possible des conditions réalistes pouvant être rencontrées dans des environnements intérieurs lorsqu'il existe une ou plusieurs sources de NO₂.

15 sujets ayant un asthme intermittent seront exposés au repos, à 200 ppb (384 µg/m³), 600 ppb (1 152 µg/m³) ou à de l'air filtré, dans un ordre aléatoire, selon un modèle d'exposition répétée. Il s'agit d'une étude en cross-over et en double aveugle dans laquelle chaque sujet est son propre témoin.

Le premier jour (J1), le sujet sera exposé à 200 ppb, 600 ppb de NO₂ ou à de l'air pendant 30 minutes. Le deuxième jour, le sujet sera exposé au même polluant qu'à J1 pendant deux fois 30 minutes séparées d'une heure.

Les trois séries d'exposition à 200 ppb, 600 ppb de NO₂ ou à l'air filtré se succéderont dans un ordre aléatoire et seront séparées par un intervalle libre de deux semaines.

La réponse inflammatoire due à l'exposition sera évaluée par le dosage des marqueurs de l'inflammation sanguins et bronchiques obtenus par l'expectoration induite, le condensat et le NO exhalé mesuré avant l'exposition, à la sortie de la chambre et 6 heures après la fin de l'exposition à J1 et J2 ainsi qu'à J3, 48 heures après la première exposition.

La fonction respiratoire (courbe débit-volume) sera mesurée au moyen d'un spiromètre selon les spécifications de l'étude européenne ECRHS, avant, à la sortie de la chambre et 6 heures après la fin de l'exposition à J1 et J2 ainsi qu'à J3, 48 heures après la première exposition.

La réponse bronchique à la métacholine sera mesurée à J3, 48 heures après la première exposition. Cette réponse sera comparée à la réactivité bronchique de base à la métacholine qui sera réalisée à deux reprises, deux jours différents (J0 et J0'), environ 8 et 15 jours avant le premier jour d'exposition. Cette répétition a pour but de tester la reproductibilité du test. De plus, la réalisation de ce test le jour de l'exposition avant l'entrée dans la chambre pourrait en soi induire une inflammation bronchique pouvant perturber les résultats.

La survenue de symptômes respiratoires ou d'un inconfort quel qu'il soit sera notée au moyen d'un questionnaire de tolérance et la fonction respiratoire (VEMS et DEP) sera mesurée au moyen d'un spiromètre portatif : à l'entrée dans la chambre, après 15 minutes, à la fin de chaque exposition en chambre puis toutes les heures pendant les deux premiers jours de l'expérimentation ainsi que deux fois par jour au domicile des sujets durant les deux semaines suivant chaque série d'exposition.

V. JUSTIFICATION DU DESIGN DE L'ETUDE

La **concentration la plus faible testée, 200 ppb de NO₂** est la valeur la plus faible à partir de laquelle des effets peuvent être retrouvés en exposition aiguë chez des sujets asthmatiques. Pour l'OMS, 200 ppb correspond à la dose minimale observée pour induire un effet (LOEL).

Cette concentration est supérieure aux concentrations retrouvées généralement dans l'air extérieur. En effet, depuis 2002, le seuil d'alerte fixé à $400 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (moyenne horaire) n'a jamais été dépassé et selon AIRPARIF, réseau francilien de mesure de la pollution atmosphérique, le niveau maximal mesuré pendant une heure (valeur moyenne) était au-dessous de 200 ppb pour toutes les stations ces dernières années.

Cependant, cette concentration peut être retrouvée dans des logements insuffisamment ventilés lorsqu'il existe des sources de NO_2 , en particulier lors de l'utilisation d'une cuisinière à gaz ou en cas de tabagisme. Ainsi, lorsqu'il existe une cuisinière à gaz, des concentrations atteignant des pics de 180 ppb en une heure et 500 ppb en 5 minutes peuvent être observés (Basu, 1999).

La **concentration maximale testée, 600 ppb de NO_2** peut donc être considérée comme un niveau maximal d'exposition à l'intérieur.

La **durée d'exposition dans la chambre de 30 minutes** correspond à la durée moyenne quotidienne passée à la préparation des repas en cuisine en France (Nedellec, 2001).

Participation in the protocol will be proposed to patients followed in pneumo-allergy consultation at Bichat Hospital and who meet the selection criteria

VI. POPULATION ETUDIEE

Mode de recrutement

Recruitment

La participation au protocole sera proposée aux patients suivis en consultation de pneumo-allergologie de l'Hôpital Bichat, répondant aux critères de sélection.

Nombre et qualité des patients

Les patients devront être des volontaires suivis en ambulatoire et présenter un asthme allergique intermittent, c'est à dire avec des symptômes de toux et de sifflements moins d'une fois par semaine, en étant asymptomatiques avec un DEP normal entre les crises, des symptômes nocturnes moins de 2 fois par mois, un VEMS ou un DEP au moins égal à 80 % et une variabilité du VEMS / DEP de moins de 20 %, selon les critères du GINA 2002.

VII. CRITERES DE JUGEMENT

CRITERE DE JUGEMENT PRINCIPAL

- **Variation du taux d'éosinophiles mesurés dans l'expectorat** après exposition à deux concentrations différentes (200 ppb ou 600 ppb) de NO_2 comparé à l'air filtré.

CRITERES DE JUGEMENT SECONDAIRE

- **Inflammation bronchique** : variation des paramètres de l'inflammation (autres que le taux d'éosinophiles) mesurés dans l'expectorat (ECP, MPO, IL4, IL5, IL10, GM-CSF, MCP1, TNF- α , IFN- γ , eotaxin-1), dans le condensat (H_2O_2 , cytokines dont IL4) et dans le sang (NFS, ECP, MPO) ainsi que variation du NO exhalé, selon le type d'exposition (air, 200 ppb de NO_2 et 600 ppb de NO_2).

- **Hyperréactivité bronchique à la métacholine** : comparaison du PD_{20} (dose provoquant une diminution du VEMS de 20 %) après exposition à l'air purifié et au NO_2 à deux concentrations différentes (200 ppb et 600 ppb) à J3 par rapport aux PD_{20} mesurés lors des deux tests de base réalisés à J0 et J0'.

VIII. CALCUL DU NOMBRE DE SUJETS NECESSAIRES

Analyses planifiées

Divers paramètres de l'inflammation et de la réactivité bronchique seront mesurés lors de chacune des visites (V1, V2, V3 – V4, V5, V6 – V7, V8, V9) de chaque série d'exposition (air, NO_2 200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, NO_2 600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). Les courbes débit volume, le condensat, le NO exhalé seront réalisés à 7 reprises pour chaque série d'exposition. L'expectoration induite et le prélèvement sanguin seront réalisés à 3 reprises pour chaque série d'expositions. Pour chacun

des 3 premiers paramètres (courbes débit volume, le condensat et le NO exhalé nous disposerons lors de chaque série d'expositions de 7 mesures :

- mesure 1 (J1base), premier jour lors de l'arrivée à Bichat
- mesure 2 (J1H0), premier jour après la première exposition
- mesure 3 (J1H6), premier jour 6 heures après la première exposition
- mesure 4 (J2base), jour 2, lors de l'arrivée à Bichat
- mesure 5 (J2H0), jour 2, après la troisième exposition
- mesure 6 (J2H6), jour 2, 6 heures après la troisième exposition
- mesure 7 (J3), jour 3, lors de l'arrivée à Bichat.

Pour les mesures 2 à 6, nous calculerons les différences par rapport au niveau de base.

Pour les 2 derniers (expectoration induite et prélèvement sanguin) nous disposerons lors de chaque série d'expositions des mesures suivantes :

- mesure 1 (V0base), lors de la 1ère visite VO à Bichat dans le mois précédant la première série d'expositions
- mesure 2 (V0'), 8 à 15 jours après (soit au moins 8 jours avant la première exposition),
- mesure 3 (J1H6), premier jour 6 heures après la première exposition
- mesure 4 (J2H6), jour 2, 6 heures après la troisième exposition
- mesure 5 (J3), jour 3, lors de l'arrivée à Bichat.

L'analyse visera à mettre en évidence un effet série d'observations, et éventuellement un effet catégorie de mesure. Nous utiliserons des analyses de variance classiques.

IX. METHODES STATISTIQUES

Les variables quantitatives seront définies par l'effectif, les moyennes, les écarts-types, les valeurs médianes, les quartiles 1 et 3, les valeurs extrêmes (minimum et maximum) et les données manquantes.

Les variables qualitatives seront décrites par l'effectif, les pourcentages et les données manquantes.

Les variables qualitatives seront comparées entre deux expositions par le test du Chi-2, ou si les conditions d'application de ce test ne sont pas vérifiées, par le test exact de Fisher.

Les variables quantitatives seront comparées entre les deux expositions par les analyses de variance.

Le seuil de signification retenu sera de 5 %.

L'analyse devra porter sur tous les sujets inclus (analyse en intention de traiter).

Une analyse intermédiaire n'est pas prévue.

Les données seront analysées sur le logiciel SAS.

Justification du critère primaire de jugement et détermination du nombre de sujets nécessaire

Le calcul du nombre de sujets nécessaire passe par l'appréciation de la variabilité du critère de jugement et par la définition de la différence que l'on souhaite pouvoir mettre en évidence.

La variation du taux d'éosinophiles mesuré dans l'expectorat est la variable choisie par les experts cliniques comme étant le marqueur biologique le mieux corrélé à la réponse clinique des voies aériennes.

Une étude préliminaire concernant des patients comparables à ceux concernés par cette étude, nous a permis d'estimer que le taux d'éosinophiles est distribué de manière lognormale, la moyenne des logarithmes base 10 est voisine de 1,12, l'écart type de 0,56 (médiane des taux : 13 ; IC : 95 % : 1–

165). Une telle variabilité rend impossible toute étude directe des taux d'éosinophiles qui ne tiendrait pas compte du taux initial (J1base).

Nous ne disposons pas de données de variabilité pour la variation des taux d'éosinophiles par rapport à J1base ; une étude préliminaire sur 3 patients nous permettra de colliger 54 données pour chaque paramètre (3 x 18 par patient) et ainsi de corriger éventuellement le nombre de patients à inclure dans l'analyse.

Le fait que la distribution du taux d'éosinophiles soit lognormale conduit à travailler à partir des logarithmes des mesures. Nous estimerons pour chaque mesure la différence (au niveau des logarithmes) avec la mesure 1 (J1base) recueillie le premier jour lors de l'arrivée à Bichat.

L'expert clinique a fixé à 10 % la variation (entre les types d'exposition) de la différence (par rapport à l'exposition de base) de taux d'éosinophiles cliniquement intéressante entre 2 types d'exposition, ce qui correspond à une différence de 0,04 entre les logarithmes base 10 des mesures. Pour simplifier, nous utilisons ci-après le terme « critère » pour désigner la différence entre les logarithmes base 10.

La variance moyenne du critère sera calculée à partir des séries d'expositions pratiquées sur les 3 premiers patients. Il n'y aura pas de levée de l'aveugle.

A priori, 20 patients au maximum seront recrutés afin d'obtenir des données exploitables pour l'analyse chez au moins 15 sujets. Avec 15 patients inclus, pour mettre en évidence une différence au niveau du critère de 0,04 entre 2 types d'exposition (α (bilatéral) = 0,05 ; puissance 90 %), il faut que la variance intra-séries d'observations du critère, mesurée sur les 3 premiers patients soit égale à 0,00109 (ce qui correspond à un écart type = 0,033).

Si l'écart type du critère est inférieur que 0,033, un nombre plus petit de patients pourra être envisagé.

Si l'écart type du critère est supérieur à 0,033, il est possible que 15 patients ne suffisent pas pour conclure.

Le tableau suivant indique l'écart type du critère si 15 sujets sont inclus dans l'étude en fonction de la puissance souhaitée et de la différence cliniquement intéressante.

		Puissance	
		90 %	80 %
Différence cliniquement intéressante	10 %	0,033	0,038
	20 %	0,065	0,075

La décision de continuer ou non l'étude sera prise en fonction des données concernant les 3 premiers patients. Il pourra aussi être envisagé d'ajuster les objectifs, soit en termes de puissance, soit de différence à mettre en évidence, ou encore de nombre de sujets à inclure.

X. CRITERES DE SELECTION

CRITERES D'INCLUSION

- patients âgés de plus de 18 ans — *older than 18 years*
- asthme intermittent stable — *stable intermittent asthma*
- allergiques, avec des tests cutanés positifs pour au moins un allergène : acariens et/ou pollens — *allergic*
- inclusion des patients allergiques aux pollens en dehors de la saison pollinique — *allergic to pollen out of the pollen season*
- VEMS supérieur ou égal à 80 % de la valeur théorique
- réversibilité après inhalation de bêta-2 agonistes : au moins 12 %, et augmentation de 200 ml du VEMS
- examen clinique sans particularité — *normal clinical examination*
- expectoration induite de base de bonne qualité technique

- test à la métacholine reproductible sur 2 examens successifs
- patients ayant accepté le principe de l'étude et a priori compliants
- consentement éclairé signé - *Sign the consent form*
- affiliation à la sécurité sociale

Patients with capacity to consent

CRITERES D'EXCLUSION

Exclusion Criteria

- asthme sévère *Severe asthma*
- VEMS de moins de 80 % de la valeur théorique
- affection grave concomitante (cardiaque, hépatique, rénale, épilepsie, néoplasie, immunodéficience) *Serious medical condition*
- claustrophobie *Claustrophobic*
- grossesse et allaitement *Pregnancy or lactation*
- tabagisme actif *Smoking*
- tabagisme passif
- utilisation de cuisinière à gaz au domicile
- utilisation d'une cheminée à foyer ouvert et/ou d'appareils de combustion non raccordés (pour la cuisine ou le chauffage) au charbon, bois, fioul ou gaz
- surinfection bronchique ou sinusite infectieuse dans les 4 semaines précédant l'étude *Bronchial or sinus infection in 4 preceding weeks*
- participation à un essai thérapeutique au cours des 3 derniers mois
- prise de médicaments dans un délai inférieur à :
 - bêtabloquants : 8 jours
 - antihistaminiques H1 par voie orale ou locale : 8 jours
 - cromoglycate de sodium per os : 8 jours
 - nédocromil sodique (Tilade) : 8 jours
 - kétotifène (Zaditen) : 8 jours
 - bromure d'ipratropium : 8 jours
 - corticoïdes per os : 1 mois
 - corticoïdes à action retard : 6 semaines
 - corticoïdes inhalés : 1 mois
 - anti-inflammatoires non stéroïdiens : 8 jours
 - théophylline : 48 heures
 - bêta-2 stimulants inhalés : 6 heures
 - bêta-2 stimulants de longue durée d'action : 12 heures
 - antibiotiques généraux : 1 mois

XI. MATERIEL ET METHODES

CHAMBRE D'EXPOSITION

La description de la chambre d'exposition et les modalités du conditionnement de l'air sont précisées en annexe 4. Le contrôle des paramètres physiques (débit de ventilation, température et hygrométrie) et le conditionnement de l'air (épuration des gaz et injection du NO₂) seront assurés par un ingénieur responsable de l'exposition pour la Direction de la Recherche de Gaz de France.

Les patients au repos seront exposés dans la chambre à une concentration connue et contrôlée de NO₂ (200 ppb et 600 ppb) ou d'air purifié, dans un ordre aléatoire en double aveugle, pendant 30 minutes le premier jour puis pendant 2 fois 30 minutes le deuxième jour d'exposition. Le double aveugle signifie que ni le patient ni les médecins effectuant l'exposition ne sauront quel est le gaz (NO₂ ou air purifié) injecté par l'ingénieur responsable des aspects techniques de l'étude.

Le seuil de détection olfactif du NO₂ correspond à une concentration d'environ 200 ppb (INRS, fiche toxicologique n°133, 1996) mais est très variable d'un individu à l'autre. La question était donc de savoir s'il ne faudrait pas masquer l'odeur du polluant afin de garantir le respect de l'aveugle. Cependant, ce « masquage » poserait en soi le problème de l'introduction d'un autre polluant de l'air.

Nous avons donc étudié ce point à l'occasion de tests préliminaires réalisés par les ingénieurs de la DR de Gaz de France. Aucune odeur n'a été détectée par aucun des sujets soumis à des expositions aux deux concentrations (200 et 600 ppb) durant des temps variant de 15 à 30 minutes.

RANDOMISATION

Les patients inclus dans l'étude lors de la visite initiale V0 seront randomisés et seront exposés dans la chambre d'exposition, lors des visites 1 et 2 puis 4 et 5, puis 7 et 8, à de l'air filtré ou au NO₂ (200 ppb puis 600 ppb), pendant 30 minutes le premier jour, puis 2 fois 30 minutes à une heure d'intervalle le deuxième jour, en double aveugle.

Chaque sujet sera donc exposé au NO₂ à deux concentrations différentes, ainsi qu'à l'air filtré, lors de 3 expositions différentes répétées sur deux jours à 30 jours d'intervalle. Le polluant (NO₂ à deux niveaux différents ou air purifié) auquel il sera tour à tour exposé sera injecté par un ingénieur, non soumis à l'aveugle, dans un ordre aléatoire (cross-over) défini par le tirage au sort.

Les enveloppes de randomisation seront conservées dans le Service de Pharmacie de l'Hôpital Bichat. L'aveugle ne sera pas levé avant la fin de l'étude sauf en cas de survenue d'événements indésirables lors de l'étude.

TOLERANCE DURANT LES JOURNEES D'EXPERIMENTATION

Un recueil de tolérance de l'exposition au NO₂ comparé à l'air purifié se fera les deux jours de l'expérimentation au moyen d'un questionnaire de tolérance (cf annexe 7), pendant les trois expositions de 30 minutes en chambre à l'entrée (T0), après 15 minutes (T15), et juste avant la sortie (T30), puis toutes les heures jusqu'à la 6ème heure (H6) après la fin de la première et de la troisième exposition.

Enfin, le troisième jour, à la 48ème heure, la tolérance sera également évaluée.

Les symptômes suivants seront notés : irritation du nez ou de l'oropharynx, obstruction nasale ou rhinorrhée, toux, odeur inhabituelle. Un score symptomatique sera établi avec la somme de tous les symptômes classés de 0 à 4 en fonction de leur sévérité.

Des mesures du Débit Expiratoire de Pointe (DEP) et du VEMS se feront aux mêmes intervalles de temps au moyen d'un spiromètre portatif.

Les symptômes ainsi que le VEMS et le DEP seront mesurés et rapportés par les sujets sur un carnet de bord durant les 15 jours suivant chaque série d'expérimentations.

TESTS CUTANES

Les tests cutanés aux pneumallergènes devront être effectués lors de la visite d'inclusion, ou auront été réalisés dans les 3 ans précédant l'inclusion des patients.

Les prick-tests aux pneumallergènes communs seront effectués sur la face antérieure des avant-bras des patients avec une lecture à 20 minutes, et mesure de la papule et de l'érythème en cas d'hypersensibilité de type immédiate aux allergènes testés. Un témoin négatif (sérum physiologique) et un témoin positif (histamine) sont nécessaires pour l'interprétation des résultats des tests cutanés.

Allergènes testés (Laboratoire Stallergènes) :

Acarie (D. pteronyssinus et D. farinae), phanères de chien et de chat, moisissures (alternaria, cladosporium, aspergillus, penicillium), blatte, latex, pollens de 5 graminées, de bétulacées, de fagacées, d'armoise, et de plantain.

La connaissance de la sensibilisation à des pneumallergènes permettra d'inclure les patients en dehors des périodes d'exposition à ces allergènes afin de ne pas induire de biais, en particulier pour les patients sensibilisés aux pollens.

DOSAGES SANGUINS

Des prélèvements sanguins pour dosage des IgE totales et de la numération formule sanguine seront effectués lors de la visite d'inclusion puis lors des visites V1, V2, V3 puis V4, V5, V6 puis V7, V8, V9 au même rythme que la courbe débit-volume, l'expectoration induite, le condensat et le NO exhalé. Le volume sanguin prélevé sera de 10 mL pour chaque examen biologique. Pour chaque série d'expositions de trois jours, un maximum de sept prélèvements sanguins est prévu. Le volume prélevé par série d'expositions sera donc au maximum de 70 mL. Un intervalle de 15 jours séparera chacune

des trois séries d'expositions. Le volume sanguin total prélevé par volontaire n'excèdera pas 210 mL pour toute la durée de sa participation à l'étude.

EXPLORATIONS FONCTIONNELLES RESPIRATOIRES : EFR

La réalisation d'une courbe débit-volume permettra de déterminer la capacité vitale (CV), le Volume Expiré Maximal en 1 seconde (VEMS), et le rapport VEMS / CV (normes théoriques CECA 1983) au moyen d'un appareil MASTERSCOPE.

Les manœuvres respiratoires doivent être techniquement acceptables :

- pas une différence de plus de 5 % entre 2 VEMS
- l'épreuve sera arrêtée si l'on n'a pas pu obtenir 2 VEMS reproductibles après 5 manœuvres
- pas de toux pendant l'épreuve
- pas de fuite d'air ou d'obstruction de l'embout buccal
- durée d'expiration d'au moins 6 secondes

TEST D'HYPERREACTIVITE BRONCHIQUE A LA METACHOLINE

Le test d'hyperréactivité bronchique à la métacholine sera effectué à l'état de base, pour chaque patient, lors de 2 examens séparés d'au moins 8 jours (J0 et J0'), afin de vérifier la bonne reproductibilité du seuil de réactivité, puis lors du troisième jour de chaque série d'expositions, c'est-à-dire 48 heures après la première exposition et 24 heures après les deuxième et troisième expositions au NO₂ ou à l'air filtré.

En cas de réponse tardive avec diminution du VEMS de moins de 70 % de la valeur théorique, le test de provocation bronchique à la métacholine ne sera pas effectué, et sera remplacé par une mesure du VEMS, avec test de réversibilité bronchique après inhalation de bêta-2 agonistes.

Le test d'hyperréactivité bronchique à la métacholine sera effectué si le VEMS de base est supérieur à 70 % de la valeur théorique, et supérieur à 1500 ml, et en l'absence de contre-indication à la métacholine :

- Infarctus du myocarde récent (< 3 mois)
- Accident vasculaire cérébral récent (< 3 mois)
- HTA mal équilibrée
- Anévrisme artériel connu
- Epilepsie sous traitement
- Asthme en crise
- Femmes enceintes ou en cours d'allaitement
- Prise de bêta-bloquants
- Patient ne comprenant pas les manœuvres respiratoires

Le test à la métacholine sera différé dans les situations suivantes :

- Rhinopharyngite ou surinfection bronchique le jour de l'examen
- Crise d'asthme le jour de l'examen
- Infection respiratoire dans les 3 semaines précédant le protocole
- Prise de bronchodilatateurs dans les 6 heures précédant le test

Des bronchodilatateurs en nébulisation ainsi que de l'oxygène doivent être immédiatement disponibles en cas de besoin.

La nébulisation du diluant (sérum physiologique) ne doit pas provoquer de bronchoconstriction significative : chute du VEMS de plus de 10 % par rapport à la valeur de base.

Des doses progressivement croissantes de métacholine, en commençant par la dose de 100 µg, seront ensuite administrées. Deux minutes après chaque inhalation, au moins deux mesures reproductibles du VEMS seront effectuées. Le test sera poursuivi jusqu'à une dose cumulative totale de métacholine de 3 200 µg, ou jusqu'à une chute d'au moins 20 % du VEMS (PD₂₀) par rapport au VEMS post-diluant. Après le test, le patient ne quittera la salle d'examen qu'après un contrôle de la réversibilité du VEMS sous bêta-2 agonistes, avec une valeur au moins égale à 90 % du VEMS initial.

Pour ce test, un dosimètre MEDIPROM sera utilisé pour la délivrance de la métacholine.

Le nombre de bouffées de métacholine varie à chaque palier. L'épreuve respiratoire sera réalisée 2 minutes après chaque délivrance de métacholine.

La métacholine sera préparée par la Pharmacie de l'Hôpital Bichat, à des concentrations progressivement croissantes, et conservée au réfrigérateur à + 4 °C jusqu'à utilisation.

EXPECTORATION INDUITE

La méthode d'induction de l'expectoration par inhalation de soluté de NaCl hypertonique est utilisée depuis plusieurs années comme méthode non invasive pour l'évaluation de l'inflammation bronchique dans l'asthme.

Réalisation pratique selon la méthode de Pin et al :

Avant l'examen, une mesure du VEMS est réalisée. En raison d'un risque hypothétique de bronchoconstriction, observé chez les sujets asthmatiques, le patient bénéficie de l'inhalation préventive de 200 µg de salbutamol. Après contrôle du VEMS au bout de 10 minutes, une nébulisation de 5 ml de soluté de NaCl à 3 % pendant 5 minutes (Nébuliseur ultrasonique SYST'AM 2301 à l'embout buccal) est administrée. Après rinçage de bouche et mouchage, le patient est encouragé à expectorer dans un pot stérile. Le VEMS est alors contrôlé : si une chute du VEMS supérieure à 10 % par rapport au VEMS après salbutamol est constatée, la concentration suivante de soluté salé hypertonique n'est pas augmentée. En cas de chute du VEMS > 20 % ou apparition de dyspnée ou sifflements respiratoires, l'épreuve est arrêtée. L'examen n'est poursuivi qu'en cas de chute de moins de 10 % du VEMS. Une nébulisation de 5 ml de soluté salé à 3 % pendant 5 minutes est réalisée à nouveau puis la même procédure est appliquée pour recueillir l'expectoration avant contrôle du VEMS. Si la chute du VEMS est toujours inférieure à 10 %, la même procédure est renouvelée par une nébulisation de soluté salé à 4 % puis de nouveau à 4 % et enfin par les 2 dernières nébulisations à 5 %. L'épreuve est terminée soit après les 6 séances d'inhalation sur une période de 30 minutes, soit avant si un volume satisfaisant d'expectoration est obtenu. Le patient ne quitte l'hôpital qu'après vérification que le VEMS mesuré à la fin des séances de nébulisation est au moins à 90 % de la valeur obtenue dans les conditions basales. Une inhalation de 200 µg de salbutamol est administrée au patient à la fin de l'épreuve de l'expectoration induite.

Analyse de l'expectoration selon une méthode modifiée de Pizzichini et al :

Les produits d'expectoration obtenus pour chaque concentration de soluté salé (3 %, 4 % et 5 %) sont regroupés et étalés sur une boîte de Pétri. Les bouchons muqueux sont ensuite séparés de la salive à l'aide de pinces forceps. Un agent réducteur (dithiotreitol 0,1 %, rompant les liaisons disulfure) est ajouté avant incubation à température ambiante pendant 30 minutes. Le mélange est ensuite filtré (filtre Falcon 70 µm). Le culot cellulaire de la suspension obtenue est recueilli par centrifugation. Le surnageant est prélevé et stocké à - 80 ° C avant d'effectuer les dosages suivants : ECP (dosage radioimmunologique, Pharmacia), albumine, IL-4, IL-5, IL-10, GM-CSF, MCP-1, TNF-α, IFN-γ et eotaxin-1 (kits ELISA, R&D systems). Après vérification de la viabilité (coloration des cellules mortes au bleu trypan) et compte cellulaire, les cellules sont centrifugées sur lame (cytocentrifugeuse Shandon). La composition cellulaire (polynucléaires neutrophiles, éosinophiles, macrophages, lymphocytes, cellules épithéliales bronchiques et oropharyngées) est déterminée après coloration au May-Grünwald-Giemsa des lames de cytocentrifugation. Les cellules métachromatiques (mastocytes et basophiles) sont détectées après coloration au bleu de Toluidine. Seuls les prélèvements présentant une viabilité supérieure à 70 % et une contamination par les cellules oropharyngées inférieure à 20 % seront retenus pour l'analyse. Les lames de cytocentrifugation utilisées pour l'immunocytochimie (Anticorps monoclonal anti-EG2 [forme de stockage de l'ECP], kit APAAP Dako system) sont fixées dans l'acétone puis stockées à - 80 ° C.

ANALYSE DU CONDENSAT DE L'AIR EXHALE

L'analyse du condensat de l'air exhalé est une méthode non invasive de mesure de l'inflammation des voies aériennes à partir du recueil d'un fluide (ou film liquidien) recouvrant leur surface. L'air exhalé comporte une phase gazeuse et une phase saturée en vapeur d'eau qui peut être condensée au contact d'un système de refroidissement. Le fluide du condensat provient d'une part de la vapeur d'eau

dépourvue de soluté et, d'autre part des solutés non volatils provenant du film liquidien recouvrant les voies aériennes et transportés sous forme de gouttelettes. Le condensat respiratoire reflète donc la composition du film recouvrant l'épithélium des voies respiratoires basses.

Différents gaz volatils et des composés non volatils comme des cytokines (IL-4, IL-6), des leucotriènes et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ont été détectés dans le condensat de l'air exhalé. L'analyse du condensat de l'air exhalé est largement utilisée car strictement non invasive (répétable à volonté donc idéale pour le monitoring) et facile d'utilisation. Cependant, cette technique n'est pas rigoureusement standardisée et peu d'études ont permis des comparaisons aux autres méthodes d'évaluation de l'inflammation des voies aériennes.

Réalisation pratique :

Le patient installé en position assise respire calmement pendant 15 minutes à travers un embout buccal connecté à l'appareil de recueil du condensat respiratoire sans pince-nez. Afin de contrôler le rythme respiratoire, il est demandé au patient de respecter une fréquence respiratoire imposée par un métronome électronique sonore bitonal (FR : 15/min, inspiration/expiration = 1/2). Nous utilisons un système de collecte d'échantillons de condensat exhalé de type ECoScreenTM (Jaeger-Toennies, Hoechberg, Germany) avec pneumotachographe intégré (EcoVentTM). Le contrôle des débits aériens, indispensable pour la validité du dosage de l'H₂O₂, permet une meilleure standardisation de la méthode. A la fin de l'examen, le liquide de condensat recueilli est aliquoté et stocké à - 80 ° C.

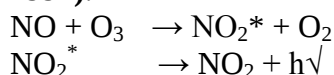
La grande variabilité des concentrations de solutés mesurés dans le condensat de l'air exhalé est liée aux différences de dilution des gouttelettes de film recouvrant les voies aériennes dans la vapeur d'eau. Nous utiliserons des marqueurs de dilution (cations, urée) pour calculer les concentrations des médiateurs dans le liquide recouvrant les voies aériennes à partir de celles mesurées dans le condensat de l'air exhalé. Les cytokines (IL-4) seront dosées par ELISA. Le dosage quantitatif de l'H₂O₂ sera réalisé par chimiluminescence. Quatre-vingt-cinq pour cent seulement de la chimiluminescence étant conservée après 7 jours de congélation (sur des échantillons préliminaires testés en présence de Butyl-OH-Toluène), le dosage de l'H₂O₂ sera réalisé en extemporané en référence à une gamme étalon.

ANALYSE DU NO EXHALE

La concentration de monoxyde d'azote dans l'air exhalé (eNO) a été proposée dès 1991 comme un marqueur de l'inflammation bronchique. En effet, le taux de NO expiré par des patients souffrant d'asthme allergique est élevé (plusieurs dizaines de ppb) comparé aux sujets sains et augmente lors des aggravations de l'asthme et de l'inflammation bronchique.

Cependant, les études réalisées avec cette technique divergent quant au rôle exact du NO dans l'organisme : est-il un simple marqueur de l'inflammation bronchique, joue-t'il un rôle protecteur ou aggravant ou les deux à la fois selon le mécanisme considéré ?

La mesure en ligne du NO exhalé est flux dépendante et fait intervenir des analyseurs spécifiques utilisant la méthode de mesure des oxydes d'azote par chimiluminescence (norme AFNOR NF X 43018) basée sur le principe de la réaction du NO avec O₃ (Khariotnov, 1997).



Les molécules NO₂ * à l'état excité retournent à l'état normal en émettant de la lumière dans la bande comprise entre 560 et 1 250 nm. L'intensité de la lumière émise est proportionnelle à la concentration des molécules de NO présente dans l'air et elle est mesurée par une photodiode équipée d'un filtre optique spécifique.

Le patient, confortablement assis, respire tranquillement par la bouche et évite la respiration nasale. Il inspire alors au maximum de ses capacités et expire longuement par la bouche, au débit constant de 50 mL/s (mesuré et contrôlé), dans une tubulure inerte chimiquement (Téflon ou PTFE) reliée aux analyseurs, de manière à ce qu'un plateau de NO d'une durée supérieure à 2 secondes soit identifié par les analyseurs.

Trois expirations sont répétées à 30 secondes d'intervalle. La teneur moyenne en NO sur ces 3 événements est alors calculée et enregistrée (**American Thoracic Society, 1999**).

Durant les expirations par la bouche, de manière à ne prélever que le NO exhalé par la bouche et non par le nez, un clip nasal peut éventuellement être utilisé, mais les fortes teneurs en NO qui s'accumuleraient alors dans les voies nasales risqueraient de passer dans la bouche via le nasopharynx et de biaiser la mesure. Pour éviter cette contamination nasale et bloquer le palais mou, le patient exhale par la bouche à travers un système en légère surpression (de 5 à 20 cm de colonne d'eau) offrant ainsi une résistance lors de l'expiration qui bloque spontanément le voile du palais.

Le débit d'expiration joue lui aussi un rôle important : trop faible, le débit d'air atteignant les analyseurs est insuffisant pour que la mesure du NO soit significative ; trop élevé, cela devient inconfortable pour le patient. Un flux d'expiration de 0,05 L/s est ainsi recommandé, ménageant un bon compromis entre le confort du patient et le seuil de faisabilité technique (**Baraldi E. and de Jongste JC., 2001**).

Ces deux paramètres sont enregistrés en continu durant la mesure du NO.

Certains paramètres peuvent perturber la mesure du NO exhalé : une infection des voies respiratoires inférieures ou supérieures, la fumée de tabac, une teneur élevée du NO ambiant... Mais ces divers événements extérieurs seront parfaitement maîtrisés, à l'instar du NO ambiant qui sera mesuré en continu durant les essais et qui ne devrait pas dépasser les teneurs classiquement rencontrées dans des ambiances intérieures.

SURVEILLANCE AU DOMICILE

A la fin des visites V3, V6, V9, un carnet de surveillance des symptômes, du VEMS et du débit expiratoire de pointe (DEP) sera remis au patient. Ce carnet de bord sera récupéré après chaque période de 15 jours séparant les examens (cf. annexe 8). Le VEMS et le DEP seront mesurés au moyen d'un spiromètre portatif. Trois mesures successives seront effectuées le matin et le soir et la meilleure des trois valeurs sera rapportée sur le carnet.

SURVEILLANCE DE LA TENEUR EN NO₂ DANS L'ENVIRONNEMENT DES VOLONTAIRES A LA SORTIE DE LA CABINE

A l'intérieur de la cabine d'exposition, les volontaires sont soumis à des ambiances dont le taux de NO₂ est contrôlé (200 ppb, 600 ppb et air purifié). A l'extérieur de cette cabine, ils côtoient des environnements (habitation, lieu de travail, extérieur ...) dont les teneurs en NO₂ diffèrent (elles sont généralement plus faibles). Cependant, certaines pratiques pourraient les exposer à des concentrations en NO₂ proches, voire supérieures aux valeurs expérimentales, ce qui risquerait de biaiser l'interprétation des résultats de l'étude. Pour s'affranchir de ce biais, seront exclus les volontaires dont les activités peuvent les exposer à ces concentrations : tabagisme actif et passif ; utilisation d'appareils de combustion non raccordés (pour la cuisine ou le chauffage) au gaz, bois, fuel, charbon. D'autre part, des conseils leur seront donnés afin de leur éviter la fréquentation d'endroits particulièrement pollués en oxydes d'azote.

De manière générale, en dehors de la cabine, il importe de suivre le plus précisément possible l'exposition au NO₂ des volontaires sélectionnés, afin d'estimer leur exposition totale et d'en tenir compte lors de l'analyse des résultats de l'étude.

Pour cela, nous disposons de plusieurs moyens.

La cabine d'exposition au NO₂, dans laquelle les patients seront installés, est placée au Centre d'Investigation Clinique (CIC) dans une chambre d'hôpital.

Un système d'acquisition de données, couplé à des analyseurs spécifiques des oxydes d'azote par chimiluminescence (méthode normalisée), installés dans cette chambre, permettront l'enregistrement durant la journée au cours de laquelle aura lieu l'exposition de la teneur ambiante en NO₂.

Les teneurs en NO₂ dans cette chambre sont considérées comme représentatives de la teneur ambiante à tout l'étage du CIC.

En effet, entre le moment où il sort de la cabine d'exposition et le moment où il quitte l'Hôpital Bichat, le volontaire est invité à rester dans les locaux du CIC où sa tolérance ainsi que son DEP seront suivis toutes les heures.

La teneur en NO₂ de l'air extérieur aux abords de l'Hôpital Bichat durant les jours d'exposition en chambre de chaque volontaire sera obtenue auprès de l'organisme francilien de surveillance de la

qualité de l'air AIRPARIF, qui dispose de 2 stations de mesure de la pollution de fond urbaine à proximité de l'Hôpital Bichat (station proche de la mairie du 18^{ème}, station d'Aubervilliers).

De même, cet organisme pourra nous fournir les teneurs en NO₂ de l'air extérieur au plus près du lieu d'habitation et du lieu de travail des volontaires.

Par ailleurs, les volontaires seront équipés d'échantillonneurs passifs d'oxydes d'azote de type RADIELLO permettant d'estimer leur exposition au NO₂ sur plusieurs jours (30 maximum) pendant la période d'étude.

Ces mesures de NO₂ seront confrontées au budget espace / temps de chaque sujet, obtenu au moyen d'un questionnaire détaillé (cf. annexe 6) lui demandant de décrire son lieu de vie et ses habitudes de vie. Les informations ainsi recueillies pourront être croisées avec le carnet de suivi des symptômes et du DEP au domicile.

XII. RECUEIL DES DONNEES ET DUREE DE L'ETUDE

Les données concernant l'interrogatoire, l'examen clinique, les tests allergologiques, les épreuves fonctionnelles respiratoires, la surveillance de la bonne tolérance clinique lors de l'exposition au NO₂, ainsi que les symptômes, le VEMS et le DEP notés par le patient pendant les 15 jours séparant chaque période, seront recueillies au CIC de Bichat.

Les données seront recueillies à l'aide d'un stylo noir sur le cahier d'observation. Les corrections qui pourront être apportées seront effectuées de manière à maintenir lisibles les inscriptions originales. Elles seront motivées, datées et paraphées.

L'identification du patient et le formulaire de recueil du consentement éclairé seront traités suivant les normes du secret médical. Sur le cahier d'observation seront notés uniquement les initiales du nom et du prénom du patient, et le numéro d'inclusion puis de randomisation, pour le respect de l'anonymat. Lorsqu'un patient aura terminé l'essai, les cahiers d'observation seront récupérés et conservés au CIC de Bichat.

SUIVI DE L'ETUDE

La coordination de l'essai sera assurée pour le promoteur par le Docteur Véronique Ezratty et pour l'Hôpital Bichat par le Professeur Michel Aubier.

Le Docteur Catherine Neukirch assurera, avec le Professeur Michel Aubier, le recrutement des volontaires et la coordination de toute l'expérimentation clinique ainsi que la prise en charge clinique des sujets pendant toute la durée de l'étude.

DUREE DE PARTICIPATION

La durée de participation pour chaque patient sera, outre la visite d'inclusion, de 6 semaines, avec un intervalle de 15 jours entre chaque période d'exposition au NO₂ ou à l'air filtré.

LIEU DE REALISATION

Tous les examens et les prélèvements seront effectués à l'Hôpital Bichat au CIC et dans le Service d'Explorations Fonctionnelles Respiratoires.

DUREE PREVISIONNELLE DE L'ETUDE

La durée totale prévisionnelle de l'étude est estimée à 2 ans.

XIII. IMPLICATIONS ETHIQUES

L'étude sera conduite en conformité avec la loi relative à la protection des personnes qui se prêtent à des recherches biomédicales ; notamment, elle sera menée selon les directives de la déclaration d'Helsinki et conformément à la loi Huriet (loi du 20 décembre 1988 modifiée).

Declaration of Helsinki

Ethical Implications / Considerations

Huriet Law (re incapacitated subjects)

Le protocole a été soumis au Comité Consultatif de Protection des Personnes se prêtant à la Recherche Biomédicale (CCPPRB) et accepté le 04 janvier 2006 (annexe 1). Toute modification substantielle de ce protocole sera soumise à l'avis de ce Comité (cf. paragraphe « Amendements au protocole »).

Après avoir été informé des buts, du déroulement, des bénéfices et risques de l'étude, chaque patient devra donner son consentement éclairé de participation à l'étude, par écrit.

En application des articles R.2038 et L.595-6 du Code de la Santé Publique, les documents d'étude et les produits seront fournis ou mis gratuitement à disposition pendant le temps de l'essai par le promoteur.

Le promoteur prendra en charge les frais supplémentaires liés à d'éventuelles fournitures ou examens spécifiquement requis par le promoteur de l'essai.

Conformément à l'article L.209-18 du Code de Santé Publique, l'étude se déroulera dans un lieu autorisé à cet effet.

A l'issue de l'essai, les volontaires recrutés pour cette étude sans bénéfice individuel direct ne pourront pas participer à une autre recherche biomédicale pendant une durée d'un mois.

Le montant de l'indemnité versée aux patients volontaires sera de 1 500 Euros.

AMENDEMENTS AU PROTOCOLE

Ni l'investigateur, ni le promoteur ne modifieront le protocole sans l'autorisation de l'autre partie. Toute modification du protocole doit faire l'objet d'un amendement signé par les deux parties et présenté en addendum au protocole.

Dans le cas d'une modification substantielle du projet, le CCPPRB sera saisi pour avis et la modification sera portée à la connaissance du ministre chargé de la Santé.

EVALUATION DE L'OBSERVANCE

L'observance au protocole sera décrite, à chaque période d'exposition, et pendant les 15 jours qui sépareront les expositions au NO₂ à deux concentrations ou à l'air filtré.

EVALUATION DE LA TOLERANCE PENDANT L'ETUDE

La tolérance sera évaluée lors de chaque visite à l'Hôpital Bichat par le recueil des plaintes spontanées et des effets indésirables éventuels signalés par le patient. La tolérance sera également évaluée pendant les intervalles de 15 jours séparant chaque visite, au moyen du carnet de bord, et lors de la visite V10, 15 jours après la dernière exposition au NO₂.

Pour tout événement indésirable, devront être précisés :

- le type d'événement
- la date de survenue
- le délai par rapport aux tests respiratoires et à l'exposition au NO₂
- la durée
- l'intensité
- les éventuelles mesures thérapeutiques appliquées et l'évolution

L'investigateur complétera la feuille destinée à recueillir la description des événements indésirables dans le cahier d'observation. Il donnera son appréciation sur le lien de causalité entre la survenue de l'événement indésirable et le traitement étudié.

Les enveloppes de randomisation (exposition au NO₂ à deux concentrations, air filtré) seront conservées durant l'étude par le Service de Pharmacie de l'Hôpital Bichat.

En cas de nécessité, la levée de l'aveugle se fera par les Pharmaciens de l'Hôpital Bichat, et cette information sera systématiquement transmise au Docteur Véronique Ezratty.

ATTITUDE EN CAS DE SORTIE PREMATUREE D'ESSAI

Toutes les informations recueillies sur un patient ayant abandonné l'étude doivent être consignées dans le cahier d'observation. Dans chaque cas, on devra essayer d'en préciser le motif.

Dans la mesure du possible, pour tout patient sorti prématurément de l'essai, les évaluations finales prévues à la visite de fin d'étude V10 seront réalisées le jour de la sortie d'essai.

Les patients perdus de vue sont ceux qui ne se présentent pas à la dernière visite de fin d'étude. Tous les moyens doivent être mis en œuvre afin d'obtenir, le plus rapidement possible, des informations précises sur la (les) raison(s) de l'arrêt de l'étude.

En cas de levée d'aveugle, le motif devra être justifié et le patient devra sortir de l'étude.

Les patients sortis prématurément de l'étude seront remplacés.

CONDUITE A TENIR EN CAS D'EVENEMENTS INDESIRABLES GRAVES

Doivent être considérés comme graves, les événements indésirables ayant pu :

- contribuer à la survenue d'un décès ou mettre en jeu le pronostic vital immédiat
- provoquer une hospitalisation
- entraîner des séquelles fonctionnelles ou organiques durables

Dans cette éventualité :

- avertir d'urgence par téléphone le Professeur Michel Aubier, investigateur principal, ainsi que le Docteur Catherine Neukirch, coordinateur clinique de l'étude et le médecin pneumologue du CIC
- adresser une confirmation écrite par Fax dans les 3 jours au Docteur Véronique Ezratty, pour le promoteur
- indiquer sur l'enveloppe la date et le nom de la personne ayant levé l'aveugle
- consigner le motif de la sortie de l'étude dans le cahier d'observation

ECARTS AU PROTOCOLE

Pour tout écart au protocole considéré comme notable, en particulier :

- les patients inclus à tort
- ceux chez qui survient, au cours de l'essai, un critère de non inclusion (maladie ou prise d'un traitement interdit)
- ceux qui ne respectent pas les différentes étapes du déroulement de l'étude

La conduite à tenir (prise en compte dans l'analyse ou non) devra être définie et justifiée en accord avec l'investigateur avant la levée de l'insu.

Les cas litigieux seront soumis avant la levée de l'insu et avant toute analyse à l'appréciation du Professeur Michel Aubier et du Docteur Véronique Ezratty.

Tous les écarts au protocole seront décrits dans le rapport d'étude.

CRITERES DE SORTIE D'ESSAI

La participation d'un patient à l'étude sera interrompue :

- en cas d'événement indésirable grave, et / ou nécessitant l'arrêt de l'étude
- en cas d'hospitalisation pour raison médicale ou chirurgicale
- en cas de retrait par un patient de son consentement
- en cas d'interruption de l'exposition au NO₂ / air filtré
- en cas de prise de médicaments interdits pendant la période de l'étude

REGLES DE FIN D'ESSAI

L'étude s'achèvera lorsque les 15 patients auront terminé les 12 visites.

Il est compris et accepté par l'investigateur que le promoteur se réserve le droit à tout moment d'interrompre l'essai en cas de manquement aux bonnes pratiques cliniques ou toute autre forme de non-respect du présent protocole.

RAPPORT ET PUBLICATIONS

Un rapport sera rédigé par le Service des Etudes Médicales de Gaz de France à la fin de l'étude. Le Promoteur est seul propriétaire des résultats. Les résultats obtenus ne pourront faire l'objet d'un commentaire écrit ou oral qu'après l'accord du promoteur.

CONSIDERATIONS PRATIQUES

Information des autorités de tutelle

Avant le début de l'étude et après réception de l'avis du CCPPRB, cette étude sera déclarée par le Service des Etudes Médicales de Gaz de France au ministre chargé de la Santé. Le Service des Etudes Médicales de Gaz de France enverra au ministère une lettre d'intention de réalisation, une copie de l'avis précité ainsi qu'une copie de l'autorisation de lieu de recherches biomédicales sans bénéfice individuel direct accordée au Centre d'Investigation Clinique de l'Hôpital Bichat (cf annexe 11)

INFORMATION DES DIRECTEURS D'ETABLISSEMENT

Avant la mise en œuvre de l'étude, le Professeur Michel Aubier prendra contact avec le Directeur de l'établissement et lui remettra toutes les informations nécessaires concernant l'exposition.

BONNES PRATIQUES CLINIQUES

L'étude sera réalisée en accord avec le respect des bonnes pratiques cliniques (CEE : Note explicative version finale de juillet 1990).

ASSURANCE

Conformément à l'article L.209-7 du Code de la Santé Publique, une assurance visant à garantir les conséquences pécuniaires de la responsabilité civile de Gaz de France et des intervenants dans l'étude a été souscrite auprès de la Société BIOMEDIC INSURE.

ARCHIVAGE

Seront archivés pendant au moins 15 ans :

- par l'investigateur principal : les codes permettant l'identification des patients, les dossiers médicaux, et toutes les données sources
- par le promoteur : toute documentation pertinente pour l'étude ainsi que le rapport final

CONFIDENTIALITE

Confidentiality

Informations fournies par Gaz de France

L'investigateur et toute personne appelée à collaborer à l'étude s'engagent à maintenir confidentielles les informations qui lui seront fournies par Gaz de France.

Conformément à l'article R.5120 du Code de la Santé Publique, ils ne peuvent sans l'accord du promoteur, donner d'informations relatives à l'étude qu'au ministre chargé de la Santé et aux médecins inspecteurs de la Santé.

Information concernant les patients

L'investigateur accepte que des personnes dûment mandatées par Gaz de France puissent éventuellement consulter ou copier les documents originaux (dossiers hospitaliers, radiographies, examens de laboratoire, etc.) dans le but de vérifier l'exactitude des données des cahiers d'observation.

SIGNATURES

Acceptation du protocole scientifique de l'étude des « Effets bronchiques de l'exposition répétée à faibles doses de dioxyde d'azote chez des sujets asthmatiques intermittents ».

Tous les signataires s'engagent à travailler selon les bonnes pratiques cliniques.

Investigateur principal

Pr Michel AUBIER

Date :

13/01/2006

Signature :



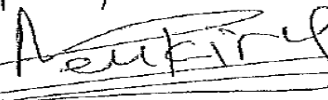
Co-¹ investigateurs

Dr Catherine NEUKIRCH

Date :

13/01/2006

Signature :

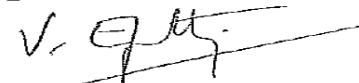


Dr Véronique EZRATTY

Date :

le 19/01/06

Signature :

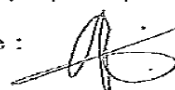


Mme Gaëlle GUILLOSSOU

Date :

13/01/2006

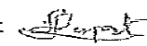
Signature :



Mr Luc ROBERT

Date : 13/01/2006

Signature :



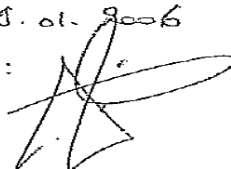
Promoteur

Service des Etudes Médicales de Gaz de France

Dr Jacques LAMBROZO
Directeur

Date : 13.01.2006

Signature :



XIV. BIBLIOGRAPHIE

- Alberts WM. Indoor air pollution: NO, NO₂, CO, and CO₂. *J Allergy Clin Immunol* 1994 ; 94 (2 Pt 2) : 289-95.
- Aldous MB, Holberg CJ, Wright AL et al. Evaporative cooling and other home factors and lower respiratory tract illness during the first year of life. *Am J Epidemiol* 1996; 143: 423-530.
- American Thoracic Society. Recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled nitric oxide and nasal nitric oxide in adults and children, 1999.
- Ayres JG. Health effects of gaseous air pollutants. In : Hester RE, Harrison RM, editors. *Air pollution and health*. Cambridge : The Royal Society of Chemistry, 1998.
- Baraldi E, de Jongste JC et al. Measurement of exhaled nitric oxide in children. *European Respiratory Society Task Force*, 2001.
- Barck C, Lundahl J, Halldén G, Bylin G. Brief exposures to NO₂ augment the allergic inflammation in asthmatics. *Environ Res* 2005 ; 97 (1) : 58-66.
- Basu R and Samet J.M. A review of the Epidemiological Evidence on Health Effects of Nitrogen Dioxide Exposure from Gas Stoves. *J Environ Med* 1999 ; 1 (4) : 173-87.
- Bauer MA, Utell MJ, Morrow PE, Speers DM, Gibb FR. Inhalation of 0.30 ppm nitrogen dioxide potentiates exercise-induced bronchospasm in asthmatics. *Am Rev Respir Dis* 1986 ; 134 (6) : 1203-8.
- COMEAP Guidance on the Effects on Health of Indoor Air Pollutants. December 2004
- de Bilderling G, Chauhan AJ, Jeffs JA et al. Gas cooking and smoking habits and the risk of childhood and adolescent wheeze . *Am J Epidemiol* 2005 ; 162 (6) : 513-22.
- Devalia JL, Sapsford RJ, Cundell DR, Rusznak C, Campbell AM, Davies RJ. Human bronchial epithelial cell dysfunction following in vitro exposure to nitrogen dioxide. *Eur Respir J* 1993 ; 6 (9) : 1308-16.
- Directive 1999/30/CE du Conseil du 22 avril 1999. Annexe II : Valeurs limites pour le dioxyde d'azote (NO₂) et les oxydes d'azote et seuil d'alerte pour le dioxyde d'azote. *Journal officiel des Communautés européennes* 1999 ; L163 : 48.
- Dow L, Phelps L, Fowler L, Waters K, Coggon D, Holgate ST. Respiratory symptoms in older people and use of domestic gas appliances. *Thorax* 1999 ; 54 (12) : 1104-6.
- EHC. 1997. Environmental Health Criteria n°8. WHO-IPCS-INCHEM.
- Frampton MW, Samet JM, Utell MJ. Environmental factors and atmospheric pollutants. *Semin Respir Infect* 1991 ; 6 (4) : 185-93.
- Harlos D, Spengler J. Short-term personal exposure to nitrogen dioxide during various activities. In : Seifert Bea, editor. *Indoor Air 87. Proceedings of the 4th international conference on indoor air quality and climate*. Berlin : Institute for Water, Soil and Air Hygiene, 1987 : p. 278-82.
- Hasselblad V, Eddy D, Kotchmar D. Synthesis of environmental evidence : nitrogen dioxide epidemiology studies. *J Air Waste Manag Assoc* 1992 ; 42 (5) : 662-71.
- Hester R, Harrison R, ed. *Air pollution and health*. Cambridge : The Royal Society of Chemistry, 1998. (Issues in Environmental Science and Technology)
- INERIS - Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques- Oxydes d'azote NO_x. Mise à jour en août 2005.

INRS Fiche toxicologique n°133. Cahiers de notes documentaires n°162, 1996.

Jarvis D, Chinn S, Luczynska C, et al. Association of respiratory symptoms and lung function in young adults with use of domestic gas appliances. *Lancet* 1996 ; 347 (8999) : 426-31

Jarvis D, Chinn S, Sterne J, Luczynska C, Burney P. The association of respiratory symptoms and lung function with the use of gas for cooking. European Community Respiratory Health Survey. *Eur Respir J* 1998 ; 11 (3) : 651-8.

Jarvis DL, Leaderer BP, Chinn S et al. Indoor nitrous acid and respiratory symptoms and lung function in adults. *Thorax* 2005 ; 60 : 474-9.

Kharitonov S, Alving K, Barnes PJ. Exhaled and nasal nitric oxide measurements : recommendations. The European Respiratory Society Task Force. *Eur Respir J* 1997 ; 10 (7) : 1683-93.

Nedellec V. Les facteurs humains d'exposition en population française. Rapport interne. Service des Etudes Médicales, 2001.

Ostro BD, Lipsett MJ, Mann JK, Krupnick A, Harrington W. Air pollution and respiratory morbidity among adults in southern California. *Am J Epidemiol* 1993 ; 137 (7) : 691-700.

Pilotto L, Douglas R, Attewell R, Wilson S. Respiratory effects associated with indoor nitrogen dioxide exposure in children. *Int J Epidemiol* 1997 ; 26 (4) : 788-96.

Samet J, Lambert W, Skipper B, et al. Nitrogen dioxide and respiratory illness in infants. *Am Rev Respir Dis* 1993 ; 148 (5) : 1258-65.

Sandstrom T, Stjernberg N, Eklund A, Ledin MC, Bjerner L, Kolmodin-Hedman B, et al. Inflammatory cell response in bronchoalveolar lavage fluid after nitrogen dioxide exposure of healthy subjects: a dose-response study. *Eur Respir J* 1991 ; 4 (3) : 332-9.

Sandstrom T. Respiratory effects of air pollutants: experimental studies in humans. *Eur Respir J* 1995 ; 8 (6) : 976-95.

Strand V, Svartengren M, Rak S, Barck C, Bylin G. Repeated exposure to an ambient level of NO₂ enhances asthmatic response to a nonsymptomatic allergen dose. *Eur Respir J* 1998 ; 12 (1) : 6-12.

Tunnicliffe WS, Burge PS, Ayres JG. Effect of domestic concentrations of nitrogen dioxide on airway responses to inhaled allergen in asthmatic patients. *Lancet* 1994 ; 344 (8939-8940): 1733-6.

US-EPA. 1995. Review of National Ambient Air Quality Standards for Nitrogen Dioxide, Assessment of Technical and Scientific Information.

Viegi G, Carrozzi L, Paoletti P, et al. Effects of the home environment on respiratory symptoms of a general population sample in middle Italy. *Arch Environ Health* 1992 ; 47 (1) : 64-70.

Volkmer R, Ruffin R, Wigg N, et al. The prevalence of respiratory symptoms in South Australian preschool children. I. Geographic location. II. Factors associated with indoor air quality. *J Paediatr Child Health* 1995 ; 31(2) : 112-20.

World Health Organization (2000). Air Quality Guidelines for Europe. Second Edition. WHO Regional Publications, European Series, N° 91. Copenhagen: World Health

XV. NOTES D'INFORMATION ET DE CONSENTEMENT ECLAIRE

Information for
Volunteers

FICHE D'INFORMATION POUR LE VOLONTAIRE

Modifiée en avril 2008 (augmentation du montant de l'indemnisation)

Titre du projet : Effets bronchiques de l'exposition répétée à de faibles doses de dioxyde d'azote chez des sujets asthmatiques intermittents.

Promoteur : Service des Etudes Médicales de Gaz de France, Paris (Dr J. LAMBROZO)

Lieu d'investigation : Centre d'Investigation Clinique, Hôpital Bichat, Paris **Study Site**
(Pr. M. AUBIER)

Investigateur principal : Pr. M. AUBIER

1. Les bases rationnelles de cette recherche peuvent être résumées ainsi :

La qualité de l'air est un facteur déterminant de notre santé. Un intérêt croissant est porté à la qualité de l'air intérieur, dans la mesure où en milieu urbain nous passons près de 90 % de notre temps dans des locaux intérieurs. De nombreux travaux épidémiologiques et expérimentaux ont évalué les effets sanitaires dus à l'exposition au dioxyde d'azote (NO₂) émis par les sources de combustion intérieures. Mais les résultats ne permettent pas à ce jour d'avancer l'hypothèse d'une relation causale entre le NO₂ et les manifestations respiratoires de type asthmatique.

Les oxydes d'azote (NO, NO₂) sont produits par des processus de combustion. Les sources principales sont le trafic routier, les centrales thermiques et certaines activités industrielles. Les sources intérieures sont la fumée de tabac, certaines bougies d'ambiance et les appareils de combustion utilisés pour la cuisine et/ou le chauffage. Le dioxyde d'azote (NO₂) est un gaz oxydant, polluant de l'air ubiquitaire des environnements intérieur et extérieur, qui après inhalation, se dépose le long des voies aériennes de l'arbre respiratoire, et peut avoir des effets irritants sur l'arbre respiratoire entraînant des symptômes et une diminution de la fonction respiratoire, en particulier chez les patients asthmatiques.

La présente étude, qui nécessite l'utilisation d'une cabine d'exposition et donc une collaboration entre les médecins et des ingénieurs spécialistes de l'étude contrôlée des polluants de l'air, a pour but d'évaluer si une exposition répétée brève au NO₂, à des concentrations faibles telles que l'on peut les retrouver dans certaines habitations, pourrait avoir des effets chez des sujets asthmatiques intermittents sur l'inflammation bronchique.

Les concentrations auxquelles vous serez exposés peuvent être retrouvées dans l'air ambiant lorsqu'il existe une source interne d'émission (consommation de tabac, trafic urbain, cuisinière à gaz et tout autre appareil de chauffage ou cuisson, non raccordé fonctionnant au fuel, gaz, bois, charbon). C'est pourquoi, durant toute la campagne d'essais à laquelle vous allez participer, il vous sera demandé de vous abstenir de fréquenter des lieux enfumés par le tabac, de ne pas être vous-même fumeur actif ou passif (présence dans votre foyer d'une personne fumeuse), et de ne pas utiliser au domicile tout appareil sus-cité.

2. But de l'étude

Ce projet de recherche intitulé « *Effets bronchiques de l'exposition répétée à de faibles doses de dioxyde d'azote chez des sujets asthmatiques intermittents* » dont le responsable est le Professeur Michel Aubier, a pour but d'évaluer les modifications induites par des expositions répétées de 30 minutes au NO₂ à deux concentrations différentes, comparé à l'air filtré, sur l'inflammation et la réactivité des bronches des patients présentant un asthme intermittent. Ce travail expérimental, dont vous ne tirerez aucun bénéfice direct pour votre santé, permettra de mieux comprendre l'impact du NO₂, polluant courant de l'air, sur la réponse inflammatoire bronchique des patients asthmatiques.

3. Ce projet de recherche a reçu un **avis favorable du Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale** de le2005 (n°.....) conformément au décret de loi 90-372 du 27 septembre 1990 relatif à la protection des personnes qui se prêtent à des recherches biomédicales sans bénéfice individuel direct.

Le Service des Etudes Médicales de Gaz de France est promoteur et a souscrit une assurance en responsabilité civile pour cette étude.

4. Si vous décidez de participer à cette étude expérimentale sans bénéfice individuel direct, la durée de votre participation sera de 8 semaines après l'inclusion avec en particulier trois fois deux journées d'expositions brèves au NO₂ ou à l'air filtré, à 15 jours d'intervalle et un suivi des symptômes, du Volume Expiré Maximal en 1 seconde (VEMS) et du Débit Expiratoire de Pointe (DEP) au domicile pendant les 15 jours séparant chaque visite :

4.1- Lors d'une première visite (V0), vous devrez rencontrer le Docteur Catherine NEUKIRCH ou l'un de ses collaborateurs pour qu'elle vous explique en détail le but et le déroulement de l'étude. Elle procédera à un interrogatoire et à un examen clinique vérifiant que votre état de santé permet votre inclusion. Elle vous remettra un carnet de suivi des symptômes et du Débit Expiratoire de Pointe (DEP).

Vous aurez :

- des tests cutanés (s'ils n'ont pas été effectués au cours des 3 dernières années) permettant d'attester que vous êtes allergique aux allergènes de l'environnement comme les acariens, les pollens...
- un test respiratoire permettant de confirmer que votre asthme est léger intermittent
- un prélèvement sanguin pour mesurer certains marqueurs de votre maladie allergique
- un recueil de crachats pour mesurer les marqueurs de l'inflammation bronchique par la technique d'expectoration induite réalisé à 2 reprises à 8 ou 15 jours d'intervalle
- un test d'hyperréactivité bronchique à la métacholine, de base, réalisé à 2 reprises à 8 ou 15 jours d'intervalle

Les résultats de ces examens vous seront communiqués par un médecin.

4.2- Lors des visites 1 et 2 (V1 et V2), vous passerez une journée complète à l'Hôpital Bichat.

Lors de la visite 1 (V1), le matin avant d'entrer dans la chambre d'exposition, vous aurez un test respiratoire (courbe débit volume), un recueil du condensat et du monoxyde d'azote (NO) dans l'air exhalé. Puis vous resterez 30 minutes dans une cabine d'exposition où vous serez exposé dans un ordre aléatoire, soit au NO₂ à une concentration de 200 ppb ou de 600 ppb (384 µg/m³ et 1 152 µg/m³), soit à de l'air filtré.

Votre tolérance à l'exposition au NO₂ comparée à l'exposition à l'air filtré sera évaluée au moyen d'un questionnaire à 15 et 30 minutes et d'une mesure du souffle (débitmètre de pointe permettant la mesure du peak-flow). Juste après l'exposition, et également 6 heures plus tard, vous aurez les mêmes tests respiratoires qu'avant l'exposition ainsi qu'un recueil des crachats et un prélèvement sanguin.

Le recueil de la tolérance et la mesure du peak-flow seront réalisés toutes les heures après l'exposition au NO₂ ou à l'air filtré jusqu'à la 6ème heure après la sortie de la chambre. Vous pourrez quitter l'hôpital après vérification que votre fonction respiratoire est satisfaisante et après inhalation systématique de 200 µg de Ventoline® à la fin de l'expectoration induite.

Lors de la deuxième visite (V2), vous aurez cette fois-ci le matin deux expositions de 30 minutes, à une heure d'intervalle, en chambre selon les mêmes modalités. La première exposition sera précédée d'un test respiratoire (courbe débit volume) et d'un recueil du condensat et du NO dans l'air exhalé. Ces mêmes tests seront à nouveau effectués après la deuxième exposition en cabine, puis à la 6ème heure ainsi qu'un recueil des crachats et un prélèvement sanguin. La tolérance et la mesure du peak-flow se feront de la même façon que lors de la première journée, pendant l'exposition en chambre, puis toutes les heures.

Lors de la visite 3 (V3), vous viendrez uniquement le matin à l'Hôpital Bichat. Vous aurez un test respiratoire (courbe débit volume), un recueil des crachats induits, un recueil du condensat et du NO dans l'air exhalé, et un prélèvement sanguin. Vous aurez également un test d'hyperréactivité bronchique à la métacholine.

Un carnet de suivi quotidien des symptômes et du peak-flow au domicile vous sera remis pour 15 jours, jusqu'au rendez-vous de la visite 4.

Les visites 4 (V4), 5 (V5), 6 (V6) seront identiques à V1, V2, V3, mais avec un autre composé selon l'ordre établi par la randomisation (soit NO₂ à 200 ppb, soit NO₂ à 600 ppb, soit air filtré). A nouveau un carnet de suivi des symptômes et du peak-flow vous sera remis pour 15 jours, jusqu'à la visite 7.

Les visites 7 (V7), 8 (V8), 9 (V9) seront identiques aux visites V1, V2, V3 et aux visites V4, V5, V6, avec le composé restant. Un carnet de suivi selon la même procédure vous sera remis pour la dernière période de 15 jours.

La dernière visite 10 (V10) permettra de récupérer le carnet de suivi des symptômes et du peak-flow, et de vérifier votre état clinique.

5. VOUS POURREZ POSER AUTANT DE QUESTIONS QUE VOUS LE DESIREZ CONCERNANT CE PROJET, TANT AUPRES DU PROFESSEUR AUBIER QUE DE SES COLLABORATEURS.

Vous avez le droit de changer d'avis et de renoncer à tout moment à participer à ce projet de recherche (article L. 209-9 de la loi n° 88-1138). En cas d'interruption après le début de l'étude vous devrez toutefois rester sous surveillance le temps jugé nécessaire par le médecin.

Les événements indésirables qui ont été décrits lors de l'exposition au **dioxyde d'azote** sont les suivants :

- irritation du nez, de la gorge ← **Possible side effects for exposure to NO₂**
- obstruction nasale ou écoulement nasal ← **irritation of nose, throat**
- gêne respiratoire ← **nasal congestion**
- toux ← **difficulty breathing**
- perception d'une odeur inhabituelle ← **cough**
- perception d'une odeur inhabituelle ← **perception of unpleasant/unusual odor**

Le degré d'hyperréactivité bronchique sera mesuré par le **test de provocation bronchique à la métacholine**. Ce test consiste en l'inhalation de doses progressivement croissantes de métacholine avec un contrôle de la fonction respiratoire à chaque étape. Ce test de bronchoprovocation à la métacholine peut également entraîner un léger effet bronchoconstricteur responsable d'une toux avec gêne respiratoire réversible en quelques minutes après inhalation de Ventoline®.

La **technique d'expectoration induite** consiste à inhaler à doses progressivement croissantes du sérum salé hypertonique afin d'obtenir des crachats nécessaires à l'analyse des marqueurs de l'inflammation. Lors de cet examen, une mesure de la fonction respiratoire se fera à chaque étape. Cette technique peut également entraîner une toux avec gêne respiratoire rapidement réversible après inhalation de Ventoline®.

La **technique d'analyse du condensat de l'air exhalé** est une méthode non invasive de mesure de l'inflammation des voies aériennes à partir du recueil de l'air exhalé. Cette méthode consiste à respirer calmement pendant 15 minutes à travers un embout buccal relié à l'appareil de recueil du condensat, sans pince-nez.

La **technique d'analyse du NO de l'air exhalé** est une autre méthode non invasive de mesure de l'inflammation des voies aériennes à partir du recueil de l'air exhalé. Cette méthode consiste à respirer tranquillement par la bouche et à éviter la respiration nasale. Après une grande inspiration, vous expirez longuement par la bouche, au débit constant de 50 mL/s, dans une tubulure reliée à des analyseurs spécifiques des oxydes d'azote, de manière à ce qu'un plateau de monoxyde d'azote, d'une durée supérieure à 2 secondes, soit identifié par les analyseurs.

Results will be kept confidential & anonymous

6. Les résultats ne seront utilisés que par des personnes participant au projet et garderont un caractère confidentiel et anonyme. Conformément à la Loi Informatique et Liberté, vous avez le droit d'accès et de rectification des données enregistrées à l'occasion de cette étude.

7. La réglementation en matière d'essai clinique chez l'homme en bonne santé **vous interdit de participer à deux essais en même temps**. De plus, si vous avez déjà participé à un projet de recherche, il est nécessaire que sa période d'exclusion soit arrivée à terme. De même, il vous sera **interdit de participer à un autre projet de recherche au cours du mois qui suit la fin de la présente étude**. **Cannot be in another study at same time or within a month.**

En dédommagement des contraintes subies, vous serez indemnisé à raison d'une somme de **2000 Euros** si vous vous présentez aux 12 visites, ce qui inclut la réalisation des examens susmentionnés. Cette somme ne peut en aucun cas s'apparenter à un bénéfice et le total de vos indemnités ne peut excéder 3 811,23 Euros par an.

8. La participation à ce projet sera notifiée au ministère de la Santé.

Il sera porté sur le « Fichier des personnes qui se prêtent à des recherches biomédicales sans bénéfice individuel direct », conformément au décret n° 90-372 du 27 septembre 1990, et ce pour une durée de un an :

- vos références personnelles
- la période pendant laquelle vous aurez participé à cette étude
- la période d'exclusion pendant laquelle vous ne pourrez participer à un autre essai de ce type
- le montant total des indemnités perçues pour cette étude

Vous avez la possibilité de vérifier auprès du ministre chargé de la santé, le contenu de ce fichier ainsi que sa destruction au terme du délai de un an fixé par la loi.

L'étude étant contre-indiquée pendant la grossesse, **les femmes en âge de procréer n'observant pas une contraception efficace seront exclues.**

This study is contraindicated during pregnancy. Women of childbearing age not observing effective contraception will be excluded.

FORMULAIRE DE CONSENTEMENT ECLAIRE POUR PARTICIPER A UN PROJET DE RECHERCHE

Titre du projet : Effets bronchiques de l'exposition répétée à de faibles doses de dioxyde d'azote chez des sujets asthmatiques intermittents.

Promoteur : Service des Etudes Médicales de Gaz de France, Paris

(Dr J. LAMBROZO)

Lieu d'investigation : Centre d'Investigation Clinique, Hôpital Bichat, Paris

(Pr. M. AUBIER)

Investigateur principal : Pr. M. AUBIER

Date : _____

1. Je soussigné(e),

Nom.....
(initiales)

Prénom.....
(trois premières lettres)

Né(e) le.....

Domicilié(e) à.....
.....
.....

certifie avoir lu les feuillets d'information et de consentement et me porte volontaire pour participer au projet de recherche intitulé « Effets bronchiques de l'exposition répétée à de faibles doses de dioxyde d'azote chez des sujets asthmatiques intermittents » dont le responsable est le Professeur Michel AUBIER.

Je suis parfaitement conscient(e) que je ne peux tirer aucun bénéfice pour ma santé de cette étude.

I am aware that I will not receive a personal benefit from this study

1. J'ai reçu et bien compris les informations figurant dans la fiche d'information pour le volontaire qui m'a été remise, sur : - *I have received and understood the information sheet*

- le but de l'étude
- la durée de l'étude
- les contraintes liées à l'étude
- la nature et les modalités de l'exposition dans une cabine prévue à cet effet - *the nature of the exposure chamber*
- les troubles actuellement connus et rares aux concentrations utilisées, pouvant survenir à la suite de l'exposition au dioxyde d'azote (NO₂) - *possible side effects*
- les inconvénients liés au test de provocation bronchique non spécifique à la méthacholine - *discomfort of bronchial provocation test*
- les inconvénients liés à la technique d'expectoration induite - *disadvantages of sputum test*
- les inconvénients liés à la technique de recueil du condensat - *condensate collection*
- les inconvénients liés à la technique de recueil du NO exhalé - *exhaled NO collection*

2. J'ai été informé(e) que je serai indemnisé(e) à raison de 2000 Euros maximum en compensation des contraintes subies en accord avec l'article L. 209-15 de la loi n° 88-1138 du 20 décembre 1988 pour ma participation à ce projet.
3. J'ai été informé(e) que j'ai le droit de changer d'avis et de renoncer à tout moment à participer à ce projet de recherche, sans avoir à justifier ma décision (article L. 209-9 de la loi n° 88-1138). *I was informed that I have the right to withdraw at any time for any reason.*
4. J'ai également été informé(e) que l'étude pourrait être interrompue à tout moment sur décision des responsables de l'étude (investigateurs et/ou promoteur).
Si le médecin estime que mon état de santé nécessite des examens complémentaires, j'accepterai de les subir. *I have been informed that the investigators may halt the study or end my participation to protect my health.*
Si je ne respectais pas pendant toute la durée de l'étude les modalités du protocole, dont j'ai été informé(e), ma participation peut être immédiatement suspendue.
5. Je suis d'accord pour respecter fidèlement les consignes du protocole et pour coopérer avec le médecin : je lui dirai immédiatement si je souffre d'un quelconque symptôme prévu, imprévu ou inhabituel. Je peux poser toutes les questions que je désire concernant ce projet, tant auprès du Professeur Michel AUBIER, du Docteur Catherine NEUKIRCH que de leurs collaborateurs.

J'ai parfaitement compris que le fait de passer outre les interdictions ou de cacher la vérité pourrait entraîner des conséquences préjudiciables à ma santé. Je m'engage à répondre, sans dissimuler la vérité, à toutes les questions qui m'ont été posées relatives à ma santé ainsi qu'à mes éventuels traitements médicamenteux actuels ou pris dans les semaines qui précèdent l'étude. Je m'engage à ne participer à aucune autre recherche biomédicale en même temps que celle-ci. Je déclare que je ne participerai pas à un autre projet de recherche au cours du mois qui suivra la fin de la présente étude.
6. J'ai été informé(e) que le secret médical protégera tous les résultats des examens et dosages pratiqués sur moi-même.
7. Je m'engage à être facilement joignable au numéro de téléphone que j'ai communiqué au responsable, pendant toute la durée de l'étude et à appeler, en cas de nécessité, l'un des médecins responsables au numéro qui m'a été communiqué.
8. J'accepte d'être répertorié(e) dans le *Fichier National des personnes qui se prêtent à des recherches biomédicales sans bénéfice individuel direct*. Je pourrai vérifier auprès du Centre d'Investigation Clinique l'exactitude des données inscrites dans ce fichier et leur destruction au terme du délai prévu à l'article R 2045 du code de la Santé Publique.
9. Je ne serai pas cependant répertorié(e) par mon nom dans un quelconque compte-rendu concernant l'étude. En aucune façon, je ne pourrai prétendre avoir le droit de restreindre l'utilisation qui pourra être faite des résultats de ladite étude. En particulier, j'accepte que ces résultats soient communiqués à des autorités régulières médicales de France ou d'ailleurs.
10. Je demande que toute nouvelle information susceptible de modifier mon consentement à participer à l'étude me soit communiquée.
11. Je m'engage à ne pas divulguer à un tiers les renseignements que j'ai pu obtenir moi-même sur l'étude, ni les résultats ou effets constatés sur moi-même ou sur les autres, consécutifs à l'exposition au dioxyde d'azote ou à l'air filtré.
12. J'ai été informé(e) que cette étude est couverte par un contrat d'assurance me garantissant.
13. Je certifie être affilié(e) à un régime de sécurité sociale.

14. Je déclare être majeur(e), ne pas faire l'objet d'un régime de protection légale, ni être privé(e) de liberté par mesure judiciaire ou administrative.

15. Pour les femmes : je déclare ne pas être enceinte ou susceptible de l'être et ne pas être allaitante.

For women: I confirm that I am not pregnant or likely to be pregnant and I am not lactating.

Fait à :

le :

Signature du Volontaire

(précédée de la mention lu et approuvé)

Je soussigné, le médecin investigateur, certifie avoir expliqué le projet de recherche ci-dessus au volontaire à la date mentionnée plus haut

Signature :

ANNEXES

ANNEXE 1 : Avis du CCPPRB de l'Hotel Dieu :

- AVIS FAVORABLE A LA DEMANDE D'AMENDEMENT N°2 RENDU LE 1^{ER} MARS 2007
- AVIS FAVORABLE A LA DEMANDE D'AMENDEMENT N°1 RENDU LE 21 AOUT 2006
- AVIS FAVORABLE RENDU LE 04 JANVIER 2006
- DEMANDE DE MODIFICATIONS MINEURES 12 DECEMBRE 2005

COMITE DE PROTECTION DES PERSONNES Ile de France 1

CPP Ile de France 1
1, Place du Paris Notre-Dame
75181 PARIS cedex 04
Pour tout renseignement, vos papiers arriveront
La responsable administrative :
Hélène de CRECY

Tél : 01 42 34 80 52
Fax : 01 42 34 86 11
Port : 06 63 34 10 52
E-Mail : coppiledefrance1@orange.fr
E-Mail : copp.ph@hnd.aphp.fr

Dr Véronique EZRATTY
Electricité de France - Gaz de France
Direction du personnel et des relations sociales
Délégation Santé Sécurité
Service des études médicales
22-28 rue Joubert
75009 PARIS

Fax : 01 55 31 46 20

Paris le 1^{er} mars 2007

NUMERO DOSSIER : 0611398
Amendement n°2 au 0511241

Le 20 février 2007, le comité a été saisi d'une demande d'avis complémentaire concernant le projet de recherche biomédicale intitulé :
Effets bronchiques de l'exposition répétée à de faibles doses de dioxyde d'azote (NO2) chez des sujets asthmatiques intermittents.

Investigateur coordinateur : Pr. Michel AUBIER
Promoteur : Service des Etudes Médicales de Gaz de France

Cet amendement n°1 porte sur les modifications et documents suivants :

- Augmentation de l'indemnisation des volontaires afin qu'elle passe de 1200 Euros à 1500 Euros pour une expérimentation complète. Le montant de l'indemnité est mentionné en page 22 du protocole dans le chapitre XIII « Implication éthiques » ainsi qu'en page 31 et page 24 dans le chapitre XV « Notes d'information et de consentement éclairé »
- Le retrait de la mention « désensibilisation aux extraits de pollens et d'acariens : 1 ans » des critères d'exclusion dans le chapitre X « Critères de sélection » en page 15.

Le Bureau a adopté, lors de sa séance du mercredi 28 février la délibération suivante :

AVIS FAVORABLE

COMPOSITION du CPP Ile de France 1 :

Présidente : Dr Elisabeth FRIJA-ORVOEN ; Vice-président : M. Antoine FOURMENT ; Secrétaire Scientifique : Christophe BARDIN ; Trésorier : François DAUC
Autres membres :
Marie-Annick CORNU-THENARD ; Dr Gianfranco DALLA BARBA ; Pr. Marc DELPECH ; Pr. Nadine FOREST ; Pierre PRANTZ ; Patrice GAUTHIER ; Dr Cath
GRILLOT-COURVALIN ; Dr Michelle HADCHOUEL ; Céline KORONKIEWICZ ; Catherine LABRUSSE-RIOU ; Catherine MAZIN ; Lydia MORIN ; Dr Jean-L
PERIGNON ; Marie-Odile FERROUSSEAU ; Ariane SACHS ; Magali SEASSAU ; Jeannine TAILLARD ; Paul TELLERMANN ; Elisabeth TRAFFORT ; Dr Jac
TREYON ; Pr. Jean-Michel ZUCKER

Ont participé à la délibération :

PREMIER COLLEGE

- Médecins ou personnes qualifiées en matière de recherche biomédicale : Elisabeth FRIJA-ORVOËN ; Elisabeth TRAIFFORT ;
- Personnes qualifiées en raison de sa compétence en matière de biostatistique ou d'épidémiologie : Jacques TRETON ;
- Médecin généraliste : Catherine GRILLOT-COURVALIN ; Jean-Louis PERIGNON ;
- Infirmières : Jeannine TAILLARD

DEUXIEME COLLEGE

- Personne qualifiée en raison de sa compétence à l'égard des questions éthiques : Jean-Michel ZUCKER ; Paul TELLERMAN ;
- Personnes qualifiées en raison de leurs compétences juridiques : Catherine LABRUSSE-RIOU ; Antoine Fourment ;
- Représentants des associations agréées de malades ou d'usagers du système de santé : Pierre FRANTZ ; Marie-Odile PERROUSSEAU.

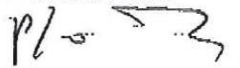
Désormais, pour toute soumission d'un amendement, le Comité souhaite recevoir ces documents:

- 3 exemplaires papier de l'amendement sur lesquels sont reportées nos références ainsi que le titre complet de l'étude.
- Une lettre rédigée en français qui explicite la rationalité de l'amendement, ainsi que son impact sur les risques et les contraintes si l'amendement entraîne une modification du formulaire du consentement et de la notice d'information.
- Si cela est possible, une version électronique de ces documents sur laquelle sont reportées nos références ainsi que le titre complet de l'étude.
- Et enfin, l'attestation de paiement de cet amendement si cette étude entre dans le cadre de la nouvelle réglementation (*cela concerne tous les nouveaux protocoles qui ont été soumis à étude à partir du 25 septembre à notre CPP*)

S'il s'agit d'un amendement important et qui nécessite beaucoup de modifications dans le corps du texte, joindre la partie du document initial afin que le rapporteur puisse s'y référer et comparer les deux textes.

Pour toute modification ou correction relatives au protocole, à la notice d'information, ou au formulaire de consentement, bien les mettre en évidence afin de faciliter aux rapporteurs la relecture des documents (par exemple utiliser une autre couleur, le mode souligné ou italique).

La Présidente
Dr Elisabeth FRIJA



**COMITE CONSULTATIF DE PROTECTION DES PERSONNES
DANS LA RECHERCHE BIOMEDICALE
HOTEL-DIEU - PARIS**

CCPPRB de HOTEL-DIEU
1, Place du Parvis Notre-Dame
75181 PARIS cedex 04
Pour tout renseignement,
Contacter
La responsable administrative :
Hélène de CRÉCY
Tél : 01 42 34 80 52
Fax : 01 42 34 86 11
E-mail : ccpp.prb@hld.ap-hop-paris.fr

Dr Jacques LAMBROZO
Directeur des Etudes médicales
de Gaz de France
22-28, rue Joubert
75009 Paris

Fax : 01 55 31 46 20

Paris le 6 janvier 2006

NUMERO DOSSIER : 0511241

Le 2 décembre 2005, le comité a été saisi d'une demande d'avis concernant le projet de recherche biomédicale intitulé :

Effets bronchiques de l'exposition répétée à de faibles doses de dioxyde d'azote (NO2) chez des sujets asthmatiques intermittents.

Etude sans bénéfice individuel direct

Investigateur coordinateur : Pr. Michel AUBIER

Promoteur : Service des Etudes Médicales de Gaz de France

A la demande du Comité, le Bureau a examiné ce jour, le mercredi 4 janvier 2006, les réponses aux demandes de modifications mineures, et confirmant l'avis favorable sous réserve du Comité, a adopté la délibération suivante :

AVIS FAVORABLE

Ont participé à la délibération :

- Médecins ou personnes qualifiées en matière de recherche biomédicale : Elisabeth FRIJA ; Jacques TRETON ; Christlane GIRARD ; Elisabeth TRAIFFORT.
- Pharmacien : François Dauchy.
- Infirmière : Cécile KORONKIEWICZ, Jeannine TAILLARD.
- Personne qualifiée dans le domaine social : Pierre FRANTZ ; Marie-Annick CORNU-THENARD
- Personne qualifiée en matière d'éthique : Jean-Michel ZUCKER ; Paul TELLERMANN
- Personne qualifiée en matière juridique : Antoine FOURMENT.

Le comité serait heureux de connaître le suivi des essais cliniques et leur bon déroulement. Il exprime son désir que l'investigateur informe le comité de la date de clôture de l'essai et souhaite être tenu au courant des incidents éventuels ayant pu surgir au cours de la recherche.

COMPOSITION du CCPPRB de L'HOTEL-DIEU DE PARIS :

Présidente : Dr Elisabeth FRIJA-ORVOEN ; Vice-président : M. Antoine FOURMENT ; Secrétaire Scientifique : Christophe BARDIN ;
Trésorier : François DAUCHY

Autres membres :

Pr. Jean Michel ZUCKER ; Pr. Marc DELPECH ; Pr. Nadine FOREST ; Pierre FRANTZ ; Dr Christiane GIRARD-LONGHINI ;
Dr Michelle HADCHOUILL ; Cécile KORONKIEWICZ ; Jeannine TAILLARD ; Paul TELLERMANN ; Dr Jacques TRETON ; Dr Gianfranco DALLA
BARBA ; Catherine LABRUSSE-RIQU ; Marie-Annick CORNU-THENARD ; Lydia MORIN ; Elisabeth TRAIFFORT.

Le comité serait heureux de connaître le suivi des essais cliniques et leur bon déroulement. Il exprime son désir que l'investigateur informe le comité de la date de clôture de l'essai et souhaite être tenu au courant des incidents éventuels ayant pu surgir au cours de la recherche.

Nous vous rappelons que toute modification doit faire l'objet d'un amendement et soumission au CCPPRB (joindre en cas d'amendement, trois exemplaires du protocole dûment amendé).

Veillez aussi à bien expliquer en première page et en quelques lignes l'objet de l'amendement présenté et spécifiez si c'est une étude avec ou sans bénéfice individuel direct.

Par ailleurs, si c'est un amendement important et qui nécessite beaucoup de modifications dans le corps du texte, joindre la partie du document initial afin que le rapporteur puisse s'y référer et comparer les deux textes.

Le comité informe l'investigateur que l'amendement doit être soumis en français et accompagné d'une lettre expliquant la rationalité de l'amendement et son impact sur les risques et contraintes et si l'amendement entraîne une éventuelle modification du consentement.

Pour toute modification ou correction relatives au protocole, à la notice d'information, ou au formulaire de consentement, bien les mettre en évidence afin de faciliter aux rapporteurs la relecture des documents (par exemple utiliser une autre couleur, le mode souligné ou italique).

La Présidente
Dr Elisabeth FRIJA



**COMITE CONSULTATIF DE PROTECTION DES PERSONNES
DANS LA RECHERCHE BIOMEDICALE
HOTEL-DIEU - PARIS**

CCPPRS de HOTEL-DIEU
1, Place du Parvis Notre-Dame
75181 PARIS cedex 04
Pour tout renseignement,
Contacter
La responsable administrative :
Hélène de CRECY
Tél. : 01 42 34 80 52
Fax : 01 42 34 86 11
E-mail : ccpprsh@hop-paris.fr

Dr Jacques LAMBROZO
Directeur des Etudes médicales
de Gaz de France
22-28, rue Joubert
75009 Paris

Fax : 01 55 31 46 20

Paris le 6 janvier 2006

NUMERO DOSSIER : 0511241

Le 2 décembre 2005, le comité a été saisi d'une demande d'avis concernant le projet de recherche biomédicale intitulé :

Effets bronchiques de l'exposition répétée à de faibles doses de dioxyde d'azote (NO2) chez des sujets asthmatiques intermittents.

Etude sans bénéfice individuel direct

Investigateur coordinateur : Pr. Michel AUBIER

Promoteur : Service des Etudes Médicales de Gaz de France

A la demande du Comité, le Bureau a examiné ce jour, le mercredi 4 janvier 2006, les réponses aux demandes de modifications mineures, et confirmant l'avis favorable sous réserve du Comité, a adopté la délibération suivante :

AVIS FAVORABLE

Ont participé à la délibération :

- Médecins ou personnes qualifiées en matière de recherche biomédicale : Elisabeth FRIJA ; Jacques TRETON ; Christiane GIRARD ; Elisabeth TRAFFORT.
- Pharmacien : François Dauchy.
- Infirmière : Cécile KORONKIEWICZ, Jeannine TAILLARD.
- Personne qualifiée dans le domaine social : Pierre FRANTZ ; Marie-Annick CORNU-THENARD
- Personne qualifiée en matière d'éthique : Jean-Michel ZUCKER ; Paul TELLERMANN
- Personne qualifiée en matière juridique : Antoine FOURMENT.

Le comité serait heureux de connaître le suivi des essais cliniques et leur bon déroulement. Il exprime son désir que l'investigateur informe le comité de la date de clôture de l'essai et souhaite être tenu au courant des incidents éventuels ayant pu surgir au cours de la recherche.

COMPOSITION du CCPPRS de L'HOTEL-DIEU DE PARIS :

Présidente : Dr Elisabeth FRIJA-ORVOEN ; Vice-président : M. Antoine FOURMENT ; Secrétaire Scientifique : Christophe BARDIN ;
Trésorier : François DAUCHY

Autres membres :

Pr. Jean Michel ZUCKER ; Pr. Marc DELPECH ; Pr. Nadine FOREST ; Pierre FRANTZ ; Dr Christiane GIRARD-LONGHINI ;
Dr Michelle HADCHOUEL ; Cécile KORONKIEWICZ ; Jeannine TAILLARD ; Paul TELLERMANN ; Dr Jacques TRETON ; Dr Gianfranco DALLA
BARBA ; Catherine LABRUSSE-RIOU ; Marie-Annick CORNU-THENARD ; Lydia MORIN ; Elisabeth TRAFFORT.

Nous vous rappelons que toute modification doit faire l'objet d'un amendement et soumission au CCPPRB (joindre en cas d'amendement, trois exemplaires du protocole dûment amendé.

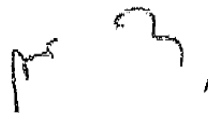
Veillez aussi à bien expliquer en première page et en quelques lignes l'objet de l'amendement présenté et spécifiez si c'est une étude avec ou sans bénéfice individuel direct.

Par ailleurs, si c'est un amendement important et qui nécessite beaucoup de modifications dans le corps du texte, joindre la partie du document initial afin que le rapporteur puisse s'y référer et comparer les deux textes.

Le comité informe l'investigateur que l'amendement doit être soumis en français et accompagné d'une lettre expliquant la rationalité de l'amendement et son impact sur les risques et contraintes et si l'amendement entraîne une éventuelle modification du consentement.

Pour toute modification ou correction relatives au protocole, à la notice d'information, ou au formulaire de consentement, bien les mettre en évidence afin de faciliter aux rapporteurs la relecture des documents (par exemple utiliser une autre couleur, le mode souligné ou italique).

La Présidente
Dr Elisabeth FRIJA



**COMITE CONSULTATIF DE PROTECTION DES PERSONNES
DANS LA RECHERCHE BIOMEDICALE
HOTEL-DIEU - PARIS**

CCEPR de HOTEL-DIEU
1, Place du Parvis Notre-Dame
75181 PARIS cedex 04
Pour tout renseignement,
Contacter
La responsable administrative :
Hélène de CRECY
Tél : 01 42 34 80 52
Fax : 01 42 34 86 11
E-mail : ccp.prh@hdi.ep-hop-paris.fr

Pr. Michel Aubier
Service de Pneumologie
Hôpital Bichat Claude Bernard
46, rue Henri Huchard
75018 PARIS

Paris le 16 décembre 2005

NUMERO DOSSIER : 0511241

Le 2 décembre 2005, le comité a été saisi d'une demande d'avis concernant le projet de recherche biomédicale intitulé :

Effets bronchiques de l'exposition répétée à de faibles doses de dioxyde d'azote (NO2) chez des sujets asthmatiques intermittents.

Etude sans bénéfice individuel direct

Investigateur coordinateur : Pr. Michel AUBIER
Promoteur : Service des Études Médicales de Gaz de France

Le comité a adopté lors de sa séance du lundi 12 décembre 2005 la délibération suivante :
L'avis sera rendu après réception et examen des modifications suivantes :

Concernant le protocole

- Nous fournir le CV du Dr Bonay
- Préciser la quantité de sang prélevé et la reporter aussi dans la Notice d'information et le formulaire du consentement éclairé

Concernant la Notice d'information et le formulaire du consentement éclairé

- Dater le document.
- Préciser si le versement sera versé au prorata ou non en cas de sortie prématurée de l'étude par le patient.
- Remplacer le terme ubiquitaire dans la phrase : « ... *polluant de l'air ubiquitaire des environnements intérieur et extérieur*... » ou bien écrire autrement la phrase.
- Expliciter le terme « peak-flow » : ou mieux encore, nous vous proposons de le remplacer par le terme « débit expiratoire de pointe ».
- La fin de phrase qui fait référence au « total de vos indemnités ne peut excéder 3.811,23 Euros par an » n'est pas bien rédigée. Il faut séparer le montant de la rémunération correspondant au protocole et la phrase sur le montant total annuel que nous vous proposons de la rédiger comme telle : « Nous vous rappelons que le montant maximum de l'indemnité possible est de 3811.23 Euros par an.
- Numéroté les pages des documents.

COMPOSITION du CCEPR de l'HOTEL-DIEU DE PARIS :

Présidente : Dr Elisabeth FRIJA-GRVOEN ; Vice-président : M. Antoine FOURMENT ; Secrétaire Scientifique : Christophe BARDIN ;
Treasorier : François DAUCHY

Autres membres :

Pr. Jean Michel ZUCKER ; Pr. Marc DELPECH ; Pr. Nadine FOREST ; Pierre FRANTZ ; Dr Christiane GIRARD-LONGHINI ;
Dr Michelle HADCHOUEL ; Cécile KORONKIEWICZ ; Jeanine TAILLARD ; Paul TELLERMANN ; Dr Jacques TRETON ; Dr Gianfranco DALLA
BARBA ; Catherine LABRUSSE-RIOU ; Marie-Annick CORNU-THENARD ; Lydia MORIN ; Elisabeth TRAFFORT.

Tout fin

Cette étude, après envoi des modifications demandées, est susceptible de repasser lors de notre prochaine réunion de Bureau début janvier.

Ont participé à la délibération :

- Médecins ou personnes qualifiées en matière de recherche biomédicale : Elisabeth FRIJA ; Jacques TRETON ; Christiane GIRARD ; Elisabeth TRAIFFORT.
- Pharmacien : François Dauchy.
- Infirmière : Cécile KORONKIEWICZ, Jeannine TAILLARD.
- Personne qualifiée dans le domaine social : Pierre FRANTZ ; Marie-Annick CORNU-THENARD
- Personne qualifiée en matière d'éthique : Jean-Michel ZUCKER ; Paul TELLERMANN
- Personne qualifiée en matière juridique : Antoine FOURMENT.

Le comité serait heureux de connaître le suivi des essais cliniques et leur bon déroulement. Il exprime son désir que l'investigateur informe le comité de la date de clôture de l'essai et souhaite être tenu au courant des incidents éventuels ayant pu surgir au cours de la recherche.

Nous vous rappelons que toute modification doit faire l'objet d'un amendement et soumission au CCPPRB (joindre en cas d'amendement, trois exemplaires du protocole dûment amendé.

Veillez aussi à bien expliciter en première page et en quelques lignes l'objet de l'amendement présenté et spécifiez si c'est une étude avec ou sans bénéfice individuel direct.

Par ailleurs, si c'est un amendement important et qui nécessite beaucoup de modifications dans le corps du texte, joindre la partie du document initial afin que le rapporteur puisse s'y référer et comparer les deux textes.

Le comité informe l'investigateur que l'amendement doit être soumis en français et accompagné d'une lettre expliquant la rationalité de l'amendement et son impact sur les risques et contraintes et si l'amendement entraîne une éventuelle modification du consentement.

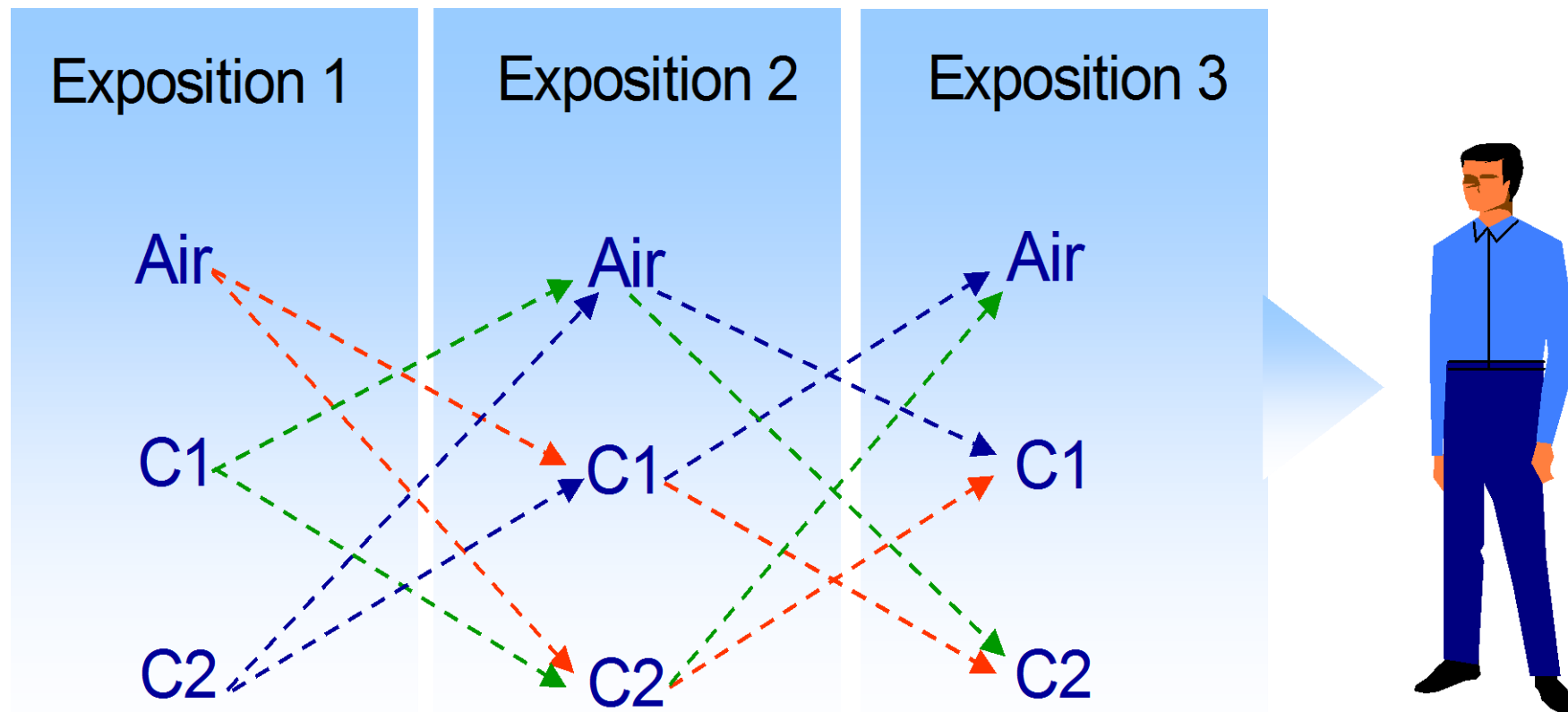
Pour toute modification ou correction relatives au protocole, à la notice d'information, ou au formulaire de consentement, bien les mettre en évidence afin de faciliter aux rapporteurs la relecture des documents (par exemple utiliser une autre couleur, le mode souligné ou italique).

La Présidente
Dr Elisabeth FRIJA

pr

ANNEXE 2 : DESIGN DE L'ETUDE

Etude en cross-over, en double aveugle, randomisée, avec 6 combinaisons d'exposition possibles par sujet :

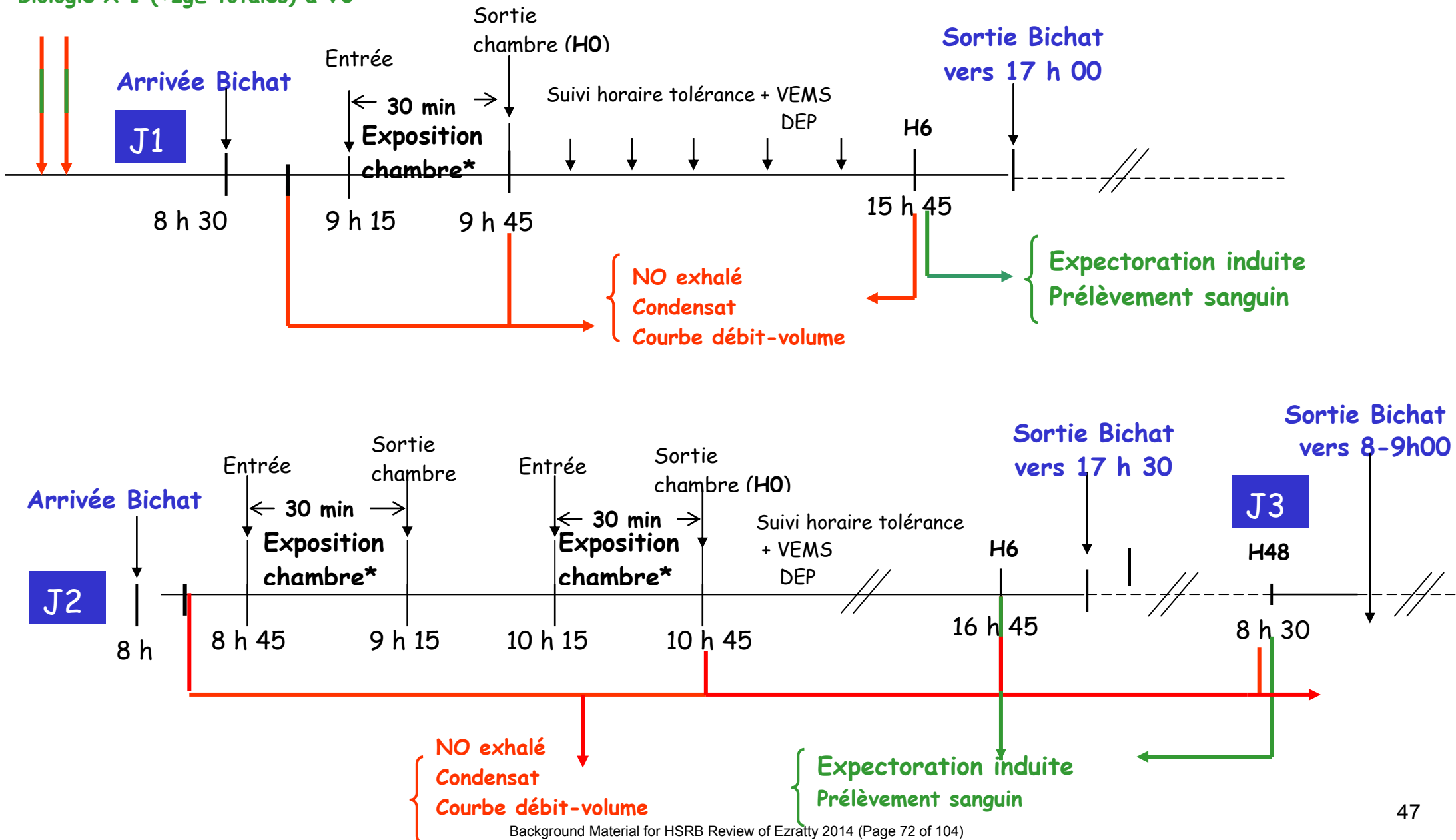


Annexe 3 : Schéma expérimental

Test à la métacholine de base réalisé à
2 reprises pour chaque sujet/Service des EFR
Expectoration induite X 2/CIC
Biologie X 1 (+IgE totales) à V0

*Trois expositions identiques à

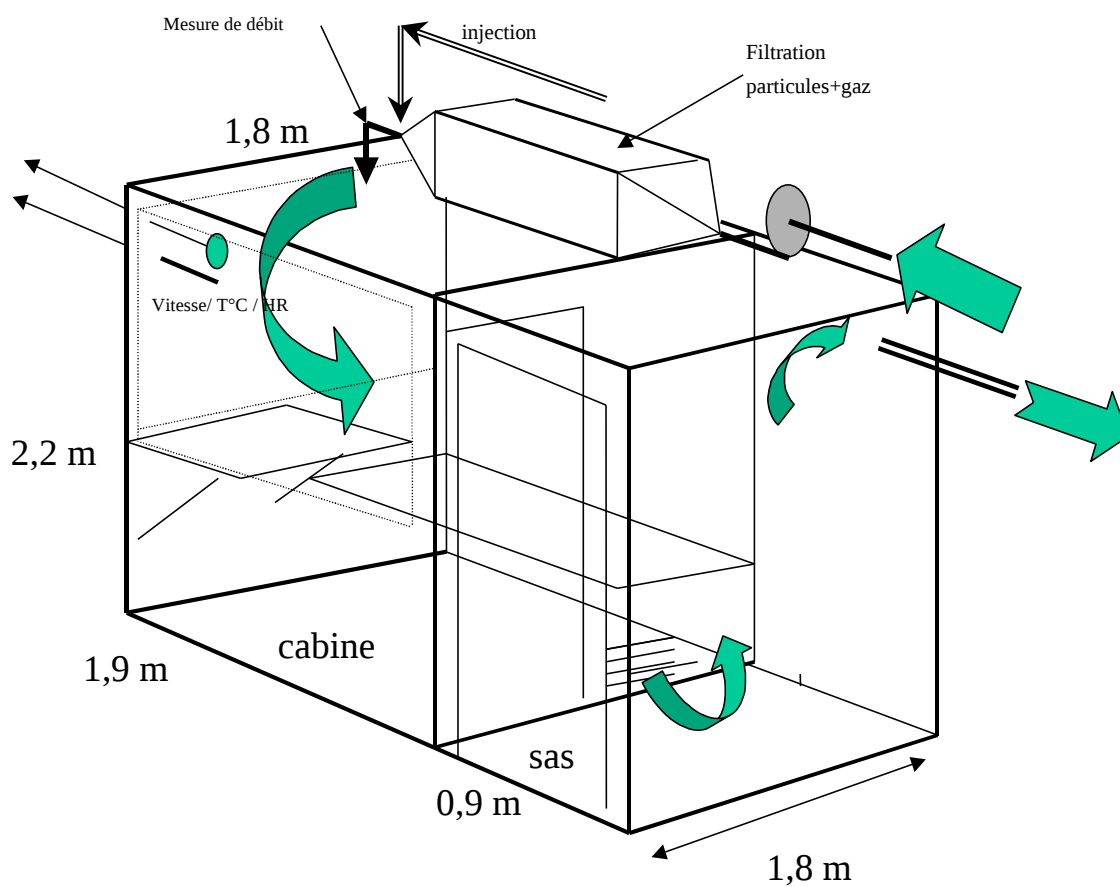
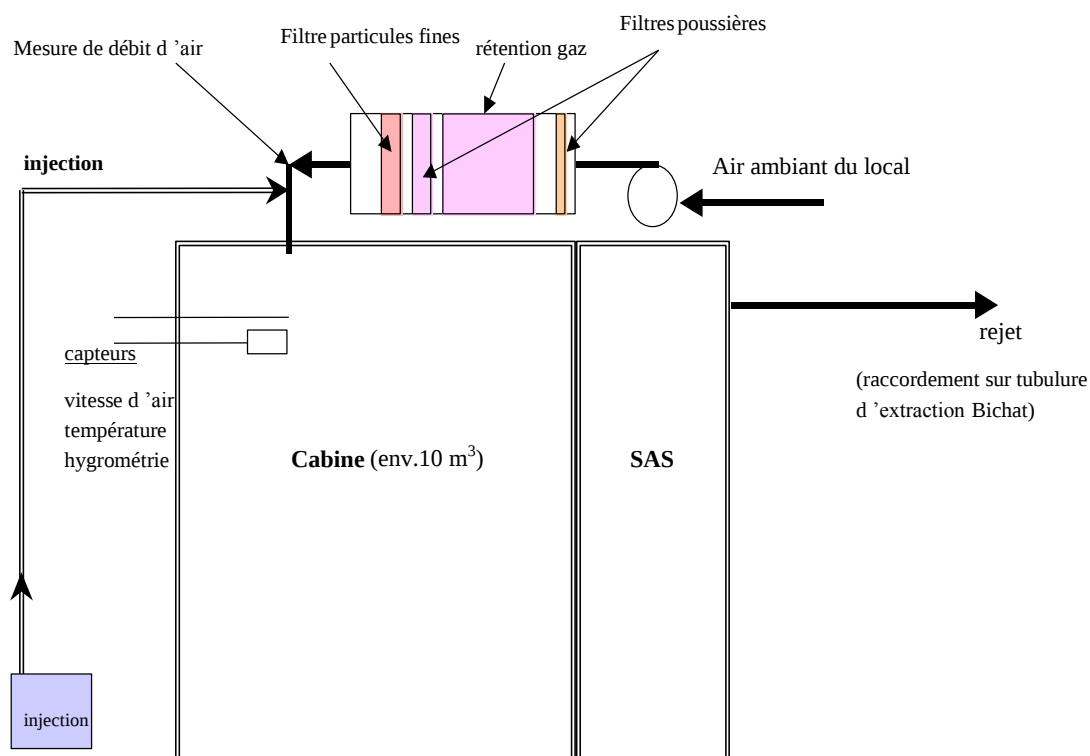
- air filtré
- ou 200 ppb de NO₂
- ou 600 ppb de NO₂



ANNEXE 4 : SCHEMA DE LA CHAMBRE D'EXPOSITION

Caractéristiques techniques de la chambre d'exposition

Source : rapport technique EDF Recherche et Développement Pôle Industrie HP-41/01/011/A



ANNEXE 5 : METROLOGIE DU NO₂

CAHIER DES CHARGES DE L'ETUDE « EFFETS BRONCHIQUES DE L'EXPOSITION REPETEE A DE FAIBLES DOSES DE DIOXYDE D'AZOTE CHEZ DES SUJETS ASTHMATIQUES INTERMITTENTS »

1- Contexte

Dans le cadre d'une collaboration tripartite entre Gaz de France (Délégation au Développement Durable), le Service des Etudes Médicales de Gaz de France et l'Hôpital Bichat, le projet ERMES a demandé au Pôle Moyen d'Essais pour l'Industrie de :

- valider la méthode d'injection contrôlée de dioxyde d'azote (NO₂) en concentrations stables, dans la chambre d'inhalation située à l'Hôpital Bichat,
- réaliser des injections régulées en présence de volontaires suivant un scénario d'exposition, dans un second temps.

Cette action est destinée à évaluer les effets d'une exposition répétée à court terme au dioxyde d'azote (NO₂) sur des sujets sensibles (asthmatiques). Elle sera réalisée en collaboration avec le Service des Etudes Médicales de Gaz de France et l'équipe du Professeur AUBIER du Centre d'Investigation Clinique (CIC) de l'Hôpital Bichat.

2- Objectifs des essais

Ces essais ont pour objectifs :

- de soumettre des volontaires, sélectionnés par le SEM et l'équipe du Professeur AUBIER du Centre d'Investigation Clinique (CIC) de l'Hôpital Bichat, à de faibles expositions au NO₂ (concentration ambiante, 200 et 600 ppb avec une précision de $\pm 10\%$) pendant une durée limitée de 30 minutes le premier jour et 2 fois 30 minutes le second jour, suivant un scénario d'exposition déterminé,
- puis d'évaluer les effets sanitaires de ces expositions à partir de tests cliniques prédéterminés permettant de comparer les réactions de chaque volontaire aux différentes concentrations comme définis dans le protocole médical de l'étude rédigé par l'Hôpital Bichat et le Service des Etudes Médicales (Dr. Véronique EZRATTY).

Pour atteindre ces objectifs, le pôle MEI doit mettre en œuvre les moyens nécessaires afin d'instrumenter la chambre d'exposition du SEM installée à l'Hôpital Bichat.

La première phase de ces essais a consisté à étudier les moyens instrumentaux destinés à équiper la cabine d'exposition afin de répondre au scénario d'exposition, puis à valider expérimentalement la méthode retenue.

La seconde phase des essais consistera à réaliser les injections selon les conditions prévues dans le scénario retenu en présentant pour chaque exposition un document de synthèse des relevés de mesures.

3- Moyens d'essais

3.1- Descriptif de la cabine d'exposition utilisée (cf. annexe 4)

L'exposition des volontaires se déroule dans une cabine d'exposition actuellement située au CIC et dont le SEM est le propriétaire.

3.2- Banc d'essai utilisé

La première phase a consisté à étudier, puis valider la méthode retenue.

Afin de maîtriser la concentration en NO₂ dans la cabine d'exposition un système de mesure des débits de NO₂ injecté a été mis en place, sachant que le débit de renouvellement d'air de la cabine est mesurable en continu.

Le principe d'injection et de contrôle comporte :

- une bouteille de NO₂ de 950 ppm pour les expositions à 600 ppb dans de l'azote de type B 20 sous une pression de 150 bars fournit le gaz nécessaire à l'exposition,
- une bouteille de NO₂ de 520 ppm pour les expositions à 200 ppb dans de l'azote de type B 20 sous une pression de 150 bars fournit le gaz nécessaire à l'exposition,
- un débitmètre massique assure la stabilité du débit injecté demandé,
- un anémomètre (tube de Pitot) permet la mesure du débit de renouvellement d'air de la cabine pour ajuster la valeur du débit de NO₂ injecté à la valeur de la concentration demandée dans la cabine,
- un analyseur de mesure des oxydes d'azote par chimiluminescence (méthode de mesure normative) assure un contrôle continu de la teneur en NO₂ dans la cabine,
- un second analyseur du même type mesure la teneur en NO₂ dans la chambre durant les essais,
- un système d'acquisition de données enregistre toutes ces informations durant les phases de préparation et d'exposition.

La fiabilité de la méthode d'essais proposée dépend de la validité métrologique des moyens d'essais cités ci-dessus, aussi ces derniers ont été vérifiés avec traçabilité du raccordement aux étalons nationaux, comme indiqués dans le tableau ci-dessous.

Moyens d'essais	Appartenance	Types de mesure	Document métrologique	Observations
Cabine et ventilateur	SEM	Moyen d'essais	Constat de maintenance – Euroflux	Changement des filtres et installation d'une vanne papillon
Pitot – mesure de débit d'air	SEM	Critique	Constat de vérification – Euroflux	Un ajustage de la mesure fournie par le Pitot doit être effectué par Euroflux. *
Manomètre à colonne – pression cabine	SEM	Indicative	/	
Manomètre à colonne – pression sas	SEM	Indicative	/	
Thermomètre	SEM	Indicative	/	
Hygromètre	SEM	Indicative	/	
Bouteille de 950 ppm de NO ₂ – gaz injecté	MEI	Critique	Certificat d'étalonnage – Air Liquide	Equipée d'un détendeur inox type HBSI
Bouteille de 520 ppm de NO ₂ – gaz injecté	MEI	Critique	Certificat d'étalonnage – Air Liquide	Equipée d'un détendeur inox type HBSI
Débitmètre massique – débit NO ₂ injecté	MEI	Critique	Certificat d'étalonnage – Bronkhorst	Débit minimal de régulation 0,2 l/min

Bouteille de 800 ppb de NO – ajustage 42 C	MEI	Critique	Certificat d'étalonnage – Air Liquide	
Bouteille azote – ajustage 42 C	MEI	Critique	Certificat d'étalonnage – Air Liquide	
MEGATEC 42 C – analyse cabine	MEI	Critique	Constat de vérification – MEI	
MEGATEC 42 C – analyse chambre	MEI	Critique	Constat de vérification – MEI	
Centrale SA70 – acquisition des données	MEI	Critique	Constat de vérification – MEI	

***CE QUI EST IMPORTANT EST LA STABILITE DU DEBIT POUR QUE LES ESSAIS SOIENT REPRODUCTIBLES, LA VALEUR ETANT PRINCIPALEMENT UN INDICATEUR.**

4- Les essais

4.1- Paramètres à mesurer

Lors des phases d'exposition, il sera nécessaire de mesurer et d'enregistrer les éléments suivants :

- le débit de renouvellement d'air
- le débit de NO₂ injecté
- la concentration en NO₂ dans la cabine
- la teneur en NO₂ dans la chambre
- la température dans la cabine
- le taux d'humidité relative dans la cabine.

Avant chaque exposition, les pressions dans la cabine et dans le sas seront relevées manuellement.

Durant la journée d'essais et après la phase d'exposition, un relevé de la teneur en NO₂ dans l'atmosphère de la chambre sera effectué et enregistré au moyen du système d'acquisition de données.

4.2- Instrumentation spécifique / Montage

Le débit de la bouteille de NO₂ est piloté par le débitmètre massique, puis injecté dans le caisson de détente situé en aval du ventilateur, dont le débit d'air est connu et stable. Le gaz ainsi injecté est mélangé à l'air de renouvellement avant le soufflage dans la cabine. La mesure de la concentration en NO₂ se fera à 1,5 m du sol au centre de la cabine.

4.3- Essais à réaliser

La première phase d'essais préliminaires a permis de valider la méthode définie ci-dessus en déterminant notamment :

- le temps de montée et de stabilisation de la concentration dans la cabine,
- l'homogénéité du mélange gazeux dans la cabine en neuf points situés sur trois plans : à 70 cm du sol un point à 40 cm de chaque angle, à 150 cm du sol au centre de la surface et à 200 cm du sol un point à 40 cm de chaque angle,
- la stabilité dans le temps de la teneur dans la cabine sur une durée de 30 minutes.

La validation de cette méthode implique que les résultats d'essais ne s'écartent pas de plus ou moins 10 % de la valeur de consigne.

La deuxième phase des essais consistera à assurer, durant toute la période expérimentale, les conditions d'exposition conformément au scénario d'exposition.

4.4- Méthode d'essais et de mesures

Les mesures de dioxyde d'azote ont été réalisées par chimiluminescence conformément à la norme NF X 43-018 « Pollution atmosphérique – Dosage des oxydes d'azote par chimiluminescence ».

4.5- Résultats

La phase d'essais préliminaire a donné lieu à l'émission d'un rapport d'essais présentant les résultats obtenus notamment en termes de temps de montée et de stabilisation, d'homogénéisation du mélange gazeux dans la cabine et de stabilité dans le temps de la teneur.

Lors des phases d'exposition, un document récapitulatif sera fourni pour chaque séance, présentant :

- la courbe de la teneur en NO₂ dans cabine durant la phase d'exposition,
- la courbe de la teneur en NO₂ dans la pièce où est installée la cabine durant toute la journée du test,
- un tableau de synthèse avec la teneur en dioxyde d'azote dans la cabine (valeur moyenne, minimum et maximum) ainsi que celle de la pièce où est située la cabine durant toute la journée du test, le débit d'air de renouvellement, les valeurs des pressions dans la cabine et le sas.

5- Synthèse des résultats des essais préliminaire

Les essais réalisés ont montré que la méthodologie adoptée pour mener à bien les essais d'exposition au dioxyde d'azote permet de répondre aux exigences du protocole d'essais :

- le temps d'homogénéisation pour atteindre la valeur de consigne pour 200 ppb et 600 ppb est de 20 minutes. Ce qui permet bien, quoiqu'il arrive de pouvoir réaliser deux expositions successives à 1 h 15 d'intervalle,
- le temps de descente pour retrouver une teneur proche de la valeur de l'ambiance est de 20 minutes, permettant ainsi au personnel autorisé d'intervenir dans la cabine assez rapidement après la fin de l'injection,
- l'homogénéité de la teneur en dioxyde d'azote dans la cabine d'exposition a un écart type relatif par rapport à la moyenne compris entre 1 et 2 %. Elle est donc inférieure aux 10 % de variabilité acceptée dans le cahier des charges,
- la stabilité de la teneur mesurée en un point déterminé a un écart type relatif par rapport à la moyenne inférieur à 1 %. Elle est donc inférieure aux 10 % de variabilité acceptée dans le cahier des charges.

De plus, les essais de caractérisation de la cabine d'exposition ont permis de déterminer :

- le point d'injection optimal situé en sortie du caisson de filtration
- les paramètres des conditions d'injection du dioxyde d'azote
- le débit de renouvellement d'air est de 82 m³.h⁻¹
- les débits d'injection et les bouteilles de gaz :

Consigne (ppb)	Teneur bouteille (ppm)	Débit (L.min ⁻¹)
200	520	0,36
600	950	0,60

- un positionnement du point de prélèvement adapté à la configuration de la cabine situé à 1,50 m du sol dans un angle afin d'augmenter le volume disponible de cette dernière,
- que la teneur en dioxyde d'azote de l'ambiance varie sans influencer sensiblement la teneur dans la cabine,

- que les mouvements de porte dus aux entrées et sorties des participants aux essais ont une incidence sur la teneur de la cabine, qui est toutefois relativement négligeable par rapport à celle liée à la présence humaine,
- que l'incidence de cette présence humaine doit être prise en compte en établissant une correction des valeurs de consigne :

Corpulence	Consigne de 200 ppb	Consigne de 600 ppb
1,6 m / 60 kg	210 ppb	630 ppb
1,8 m / 80 kg	210 ppb	640 ppb

- que l'ajustage de la teneur dans la cabine est réalisable en modifiant le débit d'injection conformément au tableau suivant :

Consigne teneur (ppb)	Concentration bouteille (ppm)	Ecart teneur /débit injection (ppb / 0,01 L.min ⁻¹)
200	520	7
600	950	10

- que le débit du ventilateur doit être surveillé sachant que les pics de débit liés aux mouvements de portes entraînent parfois un écart par rapport à la valeur initiale (l'incidence sur la teneur dans la cabine atteint 3 ppb / m³.h⁻¹),
- que l'odeur du dioxyde d'azote, quelles que soient les teneurs dans la cabine, n'a pas été décelée par les participants.

Etude NO₂ – Hôpital Bichat

Informations générales :

- Sexe :
- Age :
- Profession :
- Adresse du domicile :
- Adresse du lieu de travail :

Entourer les bonnes réponses

Lieu de vie :

Vivez-vous dans :	Une maison	Un appartement	
Situé en milieu :	Urbain / Rural		
Dans le cas d'un appartement : A quel étage est-il situé ? :			
Nombre de pièces principales dans votre habitation ? (salon, cuisine, salle de bain chambre) :			
Superficie de la cuisine			
Aérez-vous régulièrement votre logement :	Chaque jour / Tous les 2-3 jours / 1 fois/semaine / Moins souvent		
Votre cuisine est-elle ouverte sur une autre pièce ? :	Oui / Non		
Votre cuisine est-elle équipée d'une ventilation automatique ?	Oui / Non		
Les fenêtres donnent-elles sur :	Une rue : - A fort trafic automobile ? - A faible trafic auto ?	Une cour / une rue piétonne / un jardin	
Y-a-t'il une chaudière dans le logement :	Oui / Non		
Quel système de chauffage utilisez-vous ?	Collectif : Oui / Non	Individuel : Oui / Non	
Si votre chauffage est individuel : Quelle est sa nature ? (système de chauffage raccordé) :	Electrique	Combustible fossile : Pétrole/Charbon/ Gaz	Autre (Bois, solaire ... A préciser) :
Y-a-t'il des travaux en cours ?	Domicile : Oui / Non Nature (éventuellement) :	Travail : Oui / Non Nature (éventuellement) :	

Mode de vie

Quel(s) mode(s) de transport utilisez-vous ?:	Voiture : Oui / Non Si oui : - Fréquence : - Durée :	Bus : Oui / Non Si oui : - Fréquence : - Durée :	Train : Oui / Non Si oui : - Fréquence : - Durée :	Métro : Oui / Non Si oui : - Fréquence : - Durée :	A pied ou vélo : Oui / Non Si oui : - Fréquence : - Durée :
Quel est l'environnement de votre lieu de travail :	Urbain : Oui / Non Si oui : - à proximité d'un fort trafic auto ? - à proximité d'un faible trafic auto ?		Rural : Oui / Non		
Côtoyez-vous des fumeurs :	Domicile : Oui / Non Si oui, fréquence :		Travail : Oui / Non Si oui, fréquence :	AUTRE (PRECISER) : OUI / NON SI OUI, FREQUENCE :	
Faites vous du sport :	En lieu clos : Oui / Non Si oui : - Nature : - Fréquence : - Durée :		En extérieur : Oui / Non Si oui : A proximité d'une voie de circulation auto : oui / non - Nature : - Fréquence : - Durée :		

MERCI DE REpondre le plus précisément possible aux questions qui suivent nous en avons besoin pour analyser les résultats des expositions !!!

Associez à chaque durée la nature du lieu et n'hésitez pas à découper de la manière la plus précise possible les temps de présence dans les différents lieux les jours d'exposition !

Chaque jour : Combien de temps passez-vous à l'intérieur d'un bâtiment ? Présence de fumeurs : Mettre entre parenthèses une croix à côté du lieu pour oui !	Domicile	Bureau	Supermarché	Restaurant-cantine	Café	Salle de sport	Hôpital	Autre : (à préciser).
Semaine :								
Week-end :								
Jour 1 exposition 1 :								
Jour 2 exposition 1 :								
Jour 3 exposition 1 :								
Jour 1 exposition 2 :								
Jour 2 exposition 2 :								
Jour 3 exposition 2 :								
Jour 1 exposition 3 :								
Jour 2 exposition 3 :								
Jour 3 exposition 3 :								

Chaque jour : Combien de temps passez-vous à l' <u>extérieur</u> d'un bâtiment ? Présence de fumeurs : Mettre une croix dans la case correspondante	Domicile	Bureau	Supermarché	Restaurant-cantine	Café	Salle de sport	Hôpital	Autre : (à préciser).
Semaine :								
Week-end :								
Jour 1 exposition 1 :								
Jour 2 exposition 1 :								
Jour 3 exposition 1								
Jour 1 exposition 2 :								
Jour 2 exposition 2 :								
Jour 3 exposition 2 :								
Jour 1 exposition 3 :								
Jour 2 exposition 3 :								
Jour 3 exposition 3 :								

Chaque jour : Combien de temps passez-vous dans <u>les transports</u> ?	Voiture	Bus	Train	Métro	A pied	Vélo	Cyclomoteur	Autre : (à préciser).
Présence de fumeurs : Mettre une croix dans la case correspondante								
Semaine :								
Week-end :								
Jour 1 exposition 1 :								
Jour 2 exposition 1 :								
Jour 3 exposition 1 :								
Jour 1 exposition 2 :								
Jour 2 exposition 2 :								
Jour 3 exposition 2 :								
Jour 1 exposition 3 :								
Jour 2 exposition 3 :								
Jour 3 exposition 3 :								

ANNEXE 7 : QUESTIONNAIRE DE TOLERANCE

Irritation du nez ou de l'oropharynx : Oui • Non •

Obstruction nasale ou écoulement nasal : Oui • Non •

Oppression thoracique : Oui • Non •

Gêne respiratoire : Oui • Non •

Toux : Oui • Non •

Sifflement : Oui • Non •

Odeur inhabituelle : Oui • Non •

Autre(s) symptôme(s) ou sensation d'inconfort : Oui • Non •

Si oui, à préciser en clair :

.....

ANNEXE 8 : CARNET DE SURVEILLANCE A DOMICILE DES SYMPTOMES ET DU DEP

Numéro :		Semaine duau					
Initiales :							
	<i>Lundi</i>	<i>Mardi</i>	<i>Mercredi</i>	<i>Jeudi</i>	<i>Vendredi</i>	<i>Samedi</i>	<i>Dimanche</i>
1. Rhume des foins							
2. Irritation des yeux							
3. Irritation de la gorge							
4. Toux sèche pendant la nuit							
5. Toux pendant la journée							
6. Sifflements (jour ou nuit)							
7. Gêne respiratoire (jour ou nuit)							
8. Crise d'asthme							
9. Nombre de bouffées de bronchodilatateurs							
10. Nombre de bouffées de corticoïdes							
11. Autres corticoïdes : nombre de prises							
12. Appel à un médecin pour aggravation de l'asthme : - médecin de ville - hôpital : consultation ou urgences - SOS médecin							
13. Infection respiratoire avec ☐ ☐ > 38 °C							
DEBIT DE POINTE							
Matin au réveil (avant bronchodilatateurs)							
Soir (avant le dîner)							

ANNEXE 9 :
ATTESTATION D'ASSURANCE



Société de courtage d'Assurances
SAS au capital de 48.000 €
RCS VANNES B 347 531 089 - APE 672Z
PARC D'INNOVATION BRETAGNE SUD
C.P. 142 - 56038 VANNES CEDEX
Tel 33 2 97 69 19 19 - Fax 33 2 97 69 11 11
E-mail : biomedi@biomedi-insure.com



GERLING FRANCE

ATTESTATION D'ASSURANCE
RESPONSABILITE CIVILE
PROMOTEUR DE RECHERCHE BIOMEDICALE

ADHESION n° 200500295

Nous, soussignés GERLING FRANCE - 111, rue de Longchamp 75116 PARIS, agissant en qualité d'assureur, attestons par la présente que :

SERV. DES ETUDES MEDICALES DE GAZ DE
FRANCE
22-28 rue Joubert
75009 PARIS

(1680) 90712

a souscrit un contrat de Responsabilité Civile sous le n°

conforme aux dispositions légales et réglementaires Françaises sur les recherches biomédicales et notamment aux dispositions de la loi n° 88.1138 du 20.12.88 modifiée par la loi 90.86 du 23.01.90 et par la loi n° 94.690 du 25 juillet 1994 et les décrets N° 97.888 du 1^{er} octobre 1997, ainsi que les décrets n° 91.440 du 14 mai 1991 et N° 2002-722 du 3 mai 2002.

Description précise de la recherche assurée :

Effets bronchiques de l'exposition répétée à de faibles doses de dioxyde d'azote chez des sujets asthmatiques intermittents.

La garantie est conforme à l'obligation d'assurance instituée par les textes de la loi précitée, article L 1121-7 du Code de la Santé Publique, à la charge du promoteur, tant pour sa responsabilité que pour celle des intervenants.

La garantie prévue au contrat restera acquise à l'Assuré en cas de modification affectant la durée du protocole et/ou la prise d'effet du protocole.

La présente attestation est valable pour la durée de la recherche concernée et sa présentation vaut présomption de garantie à la charge de l'assureur.

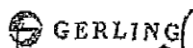
MFH/AT
Fait, le 30 novembre 2005



Société de courtage d'Assurances
56038 VANNES CEDEX
RCS VANNES B 347 531 089 - APE 672Z
PARC D'INNOVATION BRETAGNE SUD
C.P. 142 - 56038 VANNES CEDEX
Tel 33 2 97 69 19 19 - Fax 33 2 97 69 11 11
E-mail : biomedi@biomedi-insure.com

111, rue de Longchamp
75116 PARIS
Téléphone : +33 (0) 1 44 05 56 00
Téléfax : +33 (0) 1 44 05 56 56
e-mail : info@gerling.fr
Web : www.gerling.fr

2005/389



Allgemeine Versicherungs-AG
Allgemeine Versicherungs-AG
Direction pour la France
111, rue de Longchamp 75116 PARIS

Entreprise privée régie
par le Code des Assurances
Capital 224 789 463 €
R.C.S. Paris B 775 746 480

Siège social : Gerling-Konzern
Allgemeine Versicherungs-AG,
Von-Weber-Strasse, 4-14, D - 50670 Köln
Téléphone : 00 49 221 144-1
Téléfax : 00 49 221 144-33 19

ANNEXE 10 :
ATTESTATION DE VERSEMENT A LA DRASS



Ministère de la Santé et des Solidarités

Direction générale de la santé
Sous-direction Politiques de santé et stratégies
Bureau de l'évaluation des programmes, de la recherche
et de la prospective
DGS / SD1C / RBM 06.034

Paris, le 01

Personne chargée du dossier :
Mme le Dr. Sabine KENOUGH
Tél. : 01 40 56 57 33
Fax : 01 40 56 56 55
E-mail : sabine.kenouch@sante.gouv.fr

Service des Etudes Médical
de Gaz de France
Dr Jacques LOMBROZO
Directeur
22-28 rue Joubert
75009 PARIS

A l'attention de Dr Véronique EZ

Monsieur,

Par votre courrier du 10/01/2006, reçu le 13/01/2006, vous m'avez adressé, en qualité de représentant du promoteur, une lettre d'intention concernant la recherche biomédicale sur

Effets bronchiques de l'exposition répétée à de faibles doses de dioxyde d'azote chez des asthmatiques intermittents.

Investigateur coordonnateur : Pr Michel AUBIER - CIC Hôpital Bichat - 75 PARIS.

Votre lettre d'intention a été enregistrée par la Direction Générale de la Santé sous le numéro

DGS 2006/0016

Au cas où vous auriez à m'informer d'une modification substantielle apportée à votre projet ou d'un effet grave survenu au cours de cette recherche³ ou de son arrêt prématuré⁴, vous devez mentionner ce numéro dans la correspondance que vous m'adresserez par envoi recommandé avec demande d'avis de réception au :

MINISTÈRE CHARGÉ DE LA SANTÉ
Direction générale de la santé
Sous-direction des politiques de santé et des stratégies
Bureau de l'évaluation des programmes, de la recherche et de la prospective
14, Avenue Duquesne
75350 PARIS 07 SP

Veuillez agréer, Monsieur, l'expression de ma considération distinguée.

Adjoint au Sous-Directeur
Sous-Direction
des Politiques de Santé et de la Recherche

Handwritten signature: Jean-Luc Grangi

Jean-Luc GRANGI

ANNEXE 11 :
ATTESTATION D'AGREMENT DU LIEU D'ESSAI



2

Paris le, 7 0 NOV. 2003

DIRECTION GÉNÉRALE DE LA SANTÉ

Sous-direction Politiques de santé et stratégies
Bureau de l'évaluation des programmes, de la recherche
et de la prospective
DGS / SDIC / AL 03.2267

Hôpital Bichat
Centre d'Investigation Clinique
Monsieur le Professeur AUBIER
46, rue Henri Huchard
75018 PARIS

Personne chargée du dossier :
Mme le Dr. Sabine KENOUGH
Tel. : 01 40 56 57 33
Fax : 01 40 56 56 55
E-mail : sabine.kenough@santp.gouv.fr

NUMERO DU LIEU : 104978

Monsieur,

Vous avez adressé au Préfet de la D'Ile-de-France une demande de modification d'autorisation de lieu de recherches biomédicales sans bénéfice individuel direct.

Vous voudrez bien trouver ci-joint la décision ministérielle du 4 0 NOV. 2003 vous accordant cette autorisation.

A toutes fins utiles, je vous signale que l'autorisation ci-jointe n'a pas trait aux produits mentionnés à l'article L. 5311-1 du code de la santé publique.

Tout changement du titulaire de l'autorisation, toute modification dans la nature des recherches ou affectant de façon substantielle les conditions d'aménagement, d'équipement ou de fonctionnement doit faire l'objet d'une déclaration au préfet de région dans la forme prévue à l'article R.2023, accompagnée des justifications appropriées (Article R. 2026 du code de la santé publique).

En ce qui concerne le fichier national des personnes qui se prétent à des recherches sans bénéfice individuel direct, vous aurez à utiliser le code d'accès qui vous a été adressée précédemment.

Veuillez agréer, Monsieur, l'expression de ma considération distinguée.

L'Adjoint au Sous-Directeur
Sous-Direction
des Politiques de Santé et Stratégies

Pièce jointe : 1
copie : DRASS ; DDASS ; AFSSAPS.

Jean-Luc GRANGEON

MINISTERE DE SANTE, DE LA FAMILLE
ET DES PERSONNES HANDICAPEES

REPUBLIQUE FRANÇAISE

3

DIRECTION GENERALE DE LA SANTE

NUMERO DU LIEU : 10497S

DECISION
AUTORISANT UN LIEU DE RECHERCHES BIOMEDICALES
SANS BENEFICE INDIVIDUEL DIRECT

LE MINISTRE DE LA SANTE, DE LA FAMILLE ET DES PERSONNES
HANDICAPEES

Vu le code de la santé publique et notamment ses articles L. 1124-6 et R. 1124-9 à R. 1124-16
(ex R. 2021 à R. 2028) ;
Vu la demande adressée au Préfet de la région d'Ile-de-France ;
Vu le rapport d'enquête du pharmacien en date du 20/10/2003.

DECIDE :

ARTICLE 1er : L'autorisation mentionnée à l'article L. 1124-6 du code de la santé publique est
accordée, pour effectuer des recherches biomédicales sans bénéfice individuel direct a :

Hôpital Bichat « Nouveau Bichat »
11^{ème} étage aile Nord
Centre d'Investigation Clinique
46, rue Henri Huchard
75018 PARIS

placé sous la responsabilité de Monsieur Michel AUBIER, dans les conditions prévues à l'article 2.

ARTICLE 2 : Cette autorisation concerne les recherches biomédicales sans bénéfice individuel direct
ayant trait à la physiologie, à la physiopathologie, à l'épidémiologie et à la génétique à
l'exception des produits mentionnés à l'article L. 5311-1 du code de la santé publique.

ARTICLE 3 : La décision du 20/06/2001 autorisant lieu de recherches : Unité d'investigation clinique
« nouveau Bichat » - AP-HP hôpital Bichat Claude-Bernard - 46, rue Huchard 75018
Paris est abrogée.

Fait à Paris, le 7 0 NOV. 2003

L'Adjoint au Sous-Directeur
Sous-Direction
des ~~Pratiques~~ de Santé et Stratégies

Jean-Luc GRANGEON



PRÉFECTURE DE LA RÉGION D'ÎLE-DE-FRANCE

Ministère des Affaires Sociales, du travail
et de la Solidarité
Ministère de la Santé, de la Famille
et des Personnes Handicapées



Paris, le

28 OCT. 2003

DIRECTION RÉGIONALE
DES AFFAIRES SANITAIRES ET SOCIALES

Le directeur régional

Inspection Régionale de la Pharmacie

Affaire suivie par Madame LOEB

Tél : 01.44.84.21.90

mail : dr75-inspec-region-pharma@sante.gouv.fr

Etapel

Nos Réf : IRP/03/

A Mes documents\FLEBUL\BichatCIC.doc

Monsieur le directeur
de l'Hôpital Bichat
46, Rue Huchart
750018 PARIS

A l'attention de Monsieur R-A JEAN
Direction des Affaires Médicales

1716

OBJET : Modification d'une Autorisation de Lieu de recherches biomédicales sans
bénéfice individuel.

Je vous prie de trouver ci-joint le rapport établi par Madame Françoise LOEB, Pharmacienne
Inspectrice de santé publique à la Direction Régionale des Affaires Sanitaires et Sociales
d'Ile-de-France, concernant le lieu de recherches dont :

- Monsieur le Professeur AUBIER

est le responsable. Je vous laisse le soin de lui communiquer ce rapport.

Un avis favorable à la demande de modification est adressé à l'AFSSAPS et à la Direction
générale de la santé (Ministère chargé de la santé) pour suite à donner.

Veuillez agréer, Monsieur, l'expression de ma considération distinguée.

Michel PELTIER

P.J. : 1 rapport



PREFECTURE DE LA REGION ILE-DE-FRANCE



MINISTÈRE DE L'EMPLOI
ET DE LA SOLIDARITÉ
DRASS ILE DE FRANCE

Paris, le 20 octobre 2003

DIRECTION REGIONALE
DES AFFAIRES SANITAIRES ET SOCIALES

Inspection Régionale de la Pharmacie

Dossier suivi par F. LOEB
Tél : 01 44 84 21 50
Email : dr75-inspec-region-pharma@sante.gouv.fr
D:\Mes documents\FLENER\Bichat Crémeux4.doc

**RAPPORT PRESENTE EN VUE D'UNE MODIFICATION
DE L'AUTORISATION D'UN LIEU DE RECHERCHES BIOMEDICALES
SANS BENEFICE INDIVIDUEL DIRECT**

A. RENSEIGNEMENTS GENERAUX

NUMERO DU LIEU

10 497 S MEIC

**MOTIF DE LA DEMANDE DE
MODIFICATION :**

modification de lieu : extension des locaux

**INTITULE DU LIEU DE
RECHERCHE :**

CENTRE D'INVESTIGATION CLINIQUE (CIC)

ETABLISSEMENT :

HOPITAL BICHAT

Adresse :

46, rue Huchard
75018 PARIS

Situation dans l'établissement :

« nouveau Bichat »,
11ème étage aile Nord

RESPONSABLE :

M. le Professeur Michel AUBIER, PU-PH, chef du service de
Pneumologie

Composition de l'équipe :

M. le Pr AUBIER
Mme le Dr Anne Claude CREMBUX, MCU-PH,
Pharmacologue, médecin délégué de l'UIC
M. le Dr Frédérique DELATOUR, Attaché
Mme le Dr Catherine NEUKIRCH, Attachée

CENTRE D'INVESTIGATION CLINIQUE
HOPITAL BICHAT

6

LOCAUX - nouveau lieu

- situé au 11^{ème} étage aile Nord, couloirs Ouest et Nord :
- chambres n° 1 et 2 (pièces n° 114.46 ; 116.46) : les chambres destinées aux volontaires sont sur le plan de la sécurité, identiques à des chambres d'hospitalisation (fluides médicaux)
 - chambre n° 9/10 (pièce 118.46) : chambre équipée d'une cabine d'exposition à des polluants gazeux
 - bureaux de consultation : pièces 112.46 et 120.46
 - bureaux : 112.51 et 112.54
 - salle de soins : 123.51
 - pièces 129.51, 116.51 et 121.51

C. CONCLUSION

Selon les déclarations de la direction de l'établissement, le changement consiste en une extension des locaux : bureau de consultation, bureau, pièces de rangement. En conséquence :

AVIS FAVORABLE à la modification de locaux.

Françoise LOEB



Pharmacienne Inspectrice de Santé Publique



A G E N C I E
FRANÇAISE DE SÉCURITÉ SANITAIRE DES
PRODUITS DE SANTÉ

**DIRECTION DE L'ÉVALUATION DES MÉDICAMENTS
ET DES PRODUITS BIOLOGIQUES**
UNITÉ ESSAIS CLINIQUES - LOI HURIET

Saint-Denis, le **12 NOV. 2003**

Personne chargée du dossier : Laurence Fluckiger

Tél : 01.55.87.36.56

Fax : 01.55.87.36.42

Réf : Lieux ST Décision ALRégion 10- Ile de France\10497MHC.med.ab.75.doc

Monsieur Michel AUBIER
Centre d'Investigation clinique (CIC)
HÔPITAL BICHAT
46, rue Henri Huchard
75018 PARIS

N° du lieu : 10497MHC

Monsieur,

Vous avez adressé au préfet de la région Ile-de-France une demande de modification d'autorisation de lieu de recherches biomédicales sans bénéfice individuel direct. Vous voudrez bien trouver ci-joint, la décision de l'Afssaps en date du **12 NOV. 2003** vous accordant cette modification d'autorisation.

Tout changement du titulaire de l'autorisation, toute modification dans la nature des recherches ou affectant de façon substantielle les conditions d'aménagement, d'équipement ou de fonctionnement doit faire l'objet d'une déclaration au préfet de région dans la forme prévue à l'article R.1124-11 (ancien article R.2023), accompagnée des justifications appropriées (article R.1124-14 - anciennement R.2026 - du code de la santé publique).

En ce qui concerne le fichier national des personnes qui se prêtent à des recherches sans bénéfice individuel direct, vous aurez à utiliser le code d'accès personnel et confidentiel qui vous a été attribué précédemment.

Veuillez agréer, Monsieur, l'expression de ma considération distinguée.

Docteur Philippe VELLA
Chef de l'Unité Essais Cliniques et Loi Huriet

Pièce jointe : copie de la décision.

Copies de la décision :

Assistance Publique - Hôpitaux de Paris

DRASS

DDASS

DGS

APPENDIX 2:
English Translation of
Protocol Section XV and Consent Form

XV. NOTES INFORMATION AND CONSENT**FACT SHEET FOR VOLUNTEERS**

Amended in April 2008 (increase of the amount of compensation)

Project Title: bronchial effects of repeated exposure to low doses of nitrogen dioxide in intermittent asthmatics.

Sponsor: Department of Medical Studies of Gaz de France, Paris (Dr J. Lambrozo)

Location of investigation: Clinical Investigation Centre, Bichat Hospital, Paris

(Pr. M. Aubier)

Principal Investigator: Prof. M. AUBIER.

1. The rational basis of this research can be summarized as:

The air quality is a key determinant of our health. A growing interest is the quality of indoor air, to the extent that urban we spend almost 90% of our time in indoor premises. Numerous epidemiological and experimental studies have evaluated the health effects due to exposure to nitrogen dioxide (NO₂) emitted by internal combustion sources. But the results do not allow that day forward the hypothesis of a causal relationship between NO₂ and asthma-like respiratory symptoms.

Nitrogen oxides (NO, NO₂) are produced by combustion processes. The main sources are traffic, power plants and certain industrial activities. Indoor sources are tobacco smoke, some candles and mood combustion appliances used for cooking and / or heating. Nitrogen dioxide (NO₂) is an oxidizing gas pollutant ubiquitous air of indoor and outdoor environments, which after inhalation, is deposited along the airways of the respiratory tree, and may have irritant effects on respiratory tree causing symptoms and decreased lung function, especially in patients with asthma.

This study, which requires the use of an exhibition booth and therefore a collaboration between physicians and specialists engineers controlled study of air pollutants, is to assess whether repeated brief exposure NO₂, at low concentrations, such as they can be found in some homes, may have effects in intermittent asthmatics on bronchial inflammation.

The levels at which you will be exposed can be found in the air when there is an internal source of emission (tobacco, urban traffic, gas stove and other heating or cooking appliance, not connected with oil-fired, gas, wood, coal). Therefore, throughout the test campaign in which you will participate, you will be asked to refrain from frequenting smoky places by tobacco, not to be yourself active and passive smoking (presence in your home a smoker), and not to use the home while the above-mentioned device.

2. Purpose of the study

This research project entitled "bronchial effects of repeated exposure to low doses of nitrogen dioxide in intermittent asthmatics" whose head is Professor Michel Aubier, aims to assess the changes induced by repeated exposure 30 minutes to NO₂ at two different concentrations, compared to the filtered air, on inflammation and responsiveness of patients with bronchial asthma intermittent. This experimental work, you will not get no direct benefit to your health, will better understand the impact of NO₂ current air pollutant on the inflammatory response of bronchial asthma.

3. This research project has received a favorable opinion of the Advisory Committee for Protection of Persons in Biomedical Research on 2005 (No.) in accordance with Legislative Decree 90-372 of September 27, 1990 on the protection of persons who consent to biomedical research without direct individual benefit.

The Medical Studies Department of Gaz de France's promoter and has purchased liability insurance for this study.

4. If you decide to participate in this experimental study without direct individual benefit, the duration of your participation will be 8 weeks after inclusion in particular with three times two days of brief exposures to NO₂ or filtered air, 15 days apart and monitoring of symptoms, Maximum Volume Expired in 1 second (FEV) and Pointe expiratory Flow (PEF) at home during the 15 days between each visit:

4.1- During a first visit (V0), you will meet Dr. Catherine NEUKIRCH or one of his staff for it explains in detail the purpose and conduct of the study. It will conduct an interview and a clinical examination verifying that your condition allows your inclusion. It will give you a logbook of symptoms and Expiratory Flow Point (DEP).

You will undergo:

- skin tests (if they have not been made over the last 3 years) to attest that you are allergic to environmental allergens such as dust mites, pollen ...
- breath test to confirm that your asthma is mild intermittent
- a blood sample to measure some markers of your allergic disease
- a sputum collection to measure markers of airway inflammation by induced sputum of technical performed 2 times in 8 or 15 days apart
- a bronchial hyperresponsiveness to methacholine test, basic, made 2 times in 8 or 15 days apart

The results of these examinations will be provided by a physician.

4.2- During visits 1 and 2 (V1 and V2), you will spend a full day at the Bichat Hospital.

During the visit 1 (V1) in the morning before entering the exposure chamber, you will have a breathing test (volume flow curve), a collection of condensate and nitric oxide (NO) in the air exhaled. Can you stay for 30 minutes in an exhibition booth where you will be exposed in random order, or NO₂ at a concentration of 200 ppb and 600 ppb (384 g / m³ and 1152 mg / m³) or of filtered air.

Your tolerance for NO₂ exposure compared to exposure to filtered air will be assessed through a questionnaire at 15 and 30 minutes and a measurement of breath (peak flow meter for measuring the peak-flow). Right after the show, and also 6 hours later, you will have the same breath tests prior to the exhibition as well as a collection of sputum and blood samples.

The collection of tolerance and peak-flow measurement will be made every hour after exposure to NO₂ or filtered air to the sixth hour after leaving the room. You can leave the hospital after checking your lung function is satisfactory and systematic after inhalation of 200 mcg Ventoline[®] at the end of induced sputum.

At the second visit (V2), you will this time in the morning two exhibitions of 30 minutes to an hour apart, Room on the same terms. The first exhibition will be preceded by a breathing test (flow volume curve) and a collection of the condensate and NO in exhaled air. These tests will be performed again after the second exhibition booth and at the 6th hour and a collection of sputum and blood samples. Tolerance and measuring peak-flow will be the same as on the first day during the exhibition room, then every hour.

During the visit 3 (V3), you will come only in the morning at the Bichat Hospital. You will have a breathing test (volume flow curve), a collection of induced sputum, a collection of the condensate and NO in exhaled air, and a blood sample. You will also have a bronchial hyperresponsiveness to methacholine test.

A daily logbook of symptoms and peak flow at home will be provided for 15 days, until the appointment of the visit 4.

Visits 4 (V4), 5 (V5), 6 (V6) will be identical to V1, V2, V3 but with another compound in the order established by the randomization (NO₂ is 200 ppb or 600 ppb NO₂ or filtered air). Again a logbook of symptoms and peak-flow will be issued for 15 days to visit 7.

Visits 7 (V7), 8 (V8), 9 (V9) will be identical to visits V1, V2, V3 and V4 visits, V5, V6, with the remaining compound. A follow-up book by the same procedure will be provided for the last 15 days.

Last visit 10 (V10) will recover the logbook of symptoms and peak flow, and check your condition.

5. YOU CAN ASK AS MANY QUESTIONS AS YOU WANT ON THIS PROJECT, AS TO THE TEACHER AUBIER THAT ITS EMPLOYEES.

You have the right to change his mind and give up any time to participate in this research project (Article L. 209-9 of Law No. 88-1138). In case of interruption after the start of the study, however, you will remain under the supervision deemed necessary time by the physician.

Adverse events that were described during exposure to nitrogen dioxide are:

- irritation of nose, throat
- nasal congestion or runny nose
- breathing
- cough
- perception of an unusual odor

The degree of bronchial hyperresponsiveness will be measured by the bronchial provocation test with methacholine. This test consists in the inhalation of increasing doses of methacholine with a control of the respiratory function in each step. This test bronchoprovocation to methacholine may also cause slight bronchoconstrictor effect responsible for a cough with reversible breathing within minutes after inhalation of Ventoline.

The induced sputum technique involves inhaling increasing doses of hypertonic saline to obtain sputum needed for analysis of inflammatory markers. During this examination, a measure of lung function will be at each stage. This technique can also cause coughing rapidly reversible with breathing after inhalation of Ventoline®.

Condensate analysis technique of exhaled air is a non-invasive method of measuring airway inflammation from the collection of exhaled air. This method is to breathe quietly for 15 minutes through a mouthpiece connected to the condensate collection apparatus without nose clip.

NO analytic technique exhaled air is another non-invasive method for measuring the airway inflammation from the collection of exhaled air. This method involves slowly breathe through the mouth and prevent nasal breathing. After a deep breath, you long blast out through the mouth, the constant flow rate of 50 mL / s, in a tube connected to specific analyzers nitrogen oxides, so that nitrogen monoxide plateau d lasting more than 2 seconds, or identified by the analyzers.

6. The results will only be used by people involved in the project and will keep a confidential and anonymous. In accordance with the Data Protection Act you have the right to access and correct the data recorded during this study.

7. The regulations on clinical trial in healthy man forbidden to attend two trials simultaneously. Also, if you have participated in a research project, it is necessary that its exclusion period is terminated. Similarly, it will be forbidden to participate in another research project in the month following the end of the study.

In compensation for the inconvenience suffered, you will be compensated at the rate of a sum of 2,000 Euros if you show up to 12 visits, including the realization of the above reviews. This amount can in no way be compared to a profit and your total compensation may not exceed 3 811.23 Euros per year.

8. Participation in this project will be notified to the Ministry of Health.

It will be on the "File of people who in biomedical research without direct individual benefit," according to Decree No. 90-372 of 27 September 1990, for a period of one year:

- personal references
- the period in which you have participated in this study
- the exclusion period during which you can not participate in another such trial
- the total amount of compensation received for this study

You can check with the Minister for Health, the contents of this file and its destruction within the period of one year set by law.

The study is against-indicated during pregnancy, women of childbearing age not observing effective contraception will be excluded.

February 2007

FORM OF CONSENT TO PARTICIPATE IN A RESEARCH PROJECT

Project Title: bronchial effects of repeated exposure to low doses of nitrogen dioxide in intermittent asthmatics.

Sponsor: Department of Medical Studies of Gaz de France, Paris (Dr J. Lambrozo)

Location of investigation: Clinical Investigation Centre, Bichat Hospital, Paris (Pr. M. Aubier)

Principal Investigator: Prof. M. AUBIER.

Date:

1. I (e)

..... name First Name

(initials) (first three letters)

Born (e)

Resident (e)

.....

.....

have read the information sheets and consent and volunteer to participate in the research project "bronchial effects of repeated exposure to low doses of nitrogen dioxide in intermittent asthmatics" under the responsibility of the Professor Michel Aubier.

I am fully aware (e) I can not draw any benefit to my health in this study.

1. I have received and understood the information in the information sheet for the volunteer handed to me on:

- The purpose of the study
- The duration of the study
- Constraints related to the study
- The nature and terms of exposure in a cabin for this purpose
- Currently known and rare disorders at the concentrations used, which may occur as a result of exposure to nitrogen dioxide (NO₂)
- The inconvenience of nonspecific bronchial provocation test with methacholine
- The disadvantages of induced sputum technique
- The disadvantages of the condensate collection technique

- The disadvantages associated with the collection of technical exhaled NO

2. I have been informed (e) Will I be compensated (e) at 2000 Euros in compensation for the maximum stresses in accordance with Article L. 209-15 of Law No. 88-1138 of 20 December 1988 for participating in this project.

3. I have been informed (e) I have the right to change his mind and give up any time to participate in this research project without having to justify my decision (Article L. 209-9 of the law No. 88-1138).

4. I have also been informed (e) that the study could be interrupted at any time by decision of the reviewers (investigators and / or promoter).

If the doctor thinks that my health condition requires further examination, I will accept to suffer.

If I did not respect throughout the duration of the study the terms of the protocol, I was informed (e), my participation may be suspended.

5. I agree to faithfully comply with the protocol instructions and cooperate with the doctor, I immediately tell him if I have any symptoms planned, unplanned or unusual. I ask all the questions I want for this project, both from Professor Michel Aubier, Dr. Catherine NEUKIRCH that of their employees.

I fully understand that to override bans or hide the truth could lead to harmful consequences to my health. I agree to meet, without concealing the truth, all the questions that were put to me on my health and my potential or current medication taken in the weeks before the study. I am committed to not participate in any other biomedical research along it. I declare that I will not participate in another research project during the month following the end of the study.

6. I have been informed (e) the confidentiality protect all results of examinations and assays performed on myself.

7. I agree to be easily reached at phone number I contacted the manager, for the duration of the study and to call, if necessary, one of the doctors in charge at the number m 'has been communicated.

8. I agree to be listed (e) in the National File of people who in biomedical research without direct individual benefit. I can check with the Center for Clinical Investigation the accuracy of the data included in this file and destruction within the period provided for in Article R 2045 of the Code of Public Health.

9. I will not be listed, however, (e) by name in any report about the study. In any way, I can not claim to have the right to restrict the use that can be made of the results of that study. In particular, I accept that these results are reported to medical authorities regularly France or elsewhere.

10. I request that new information could change my consent to participate in the study is communicated to me.

11. I agree not to disclose to third parties the information I was able to get myself on the study, the results or effects seen on myself or others, following exposure to nitrogen dioxide or filtered air.

12. I was informed (e) that the study is covered by an insurance contract guaranteeing me.

13. I certify that affiliate (s) to a social security scheme.

14. I declare that major (e) shall not be the subject of a legal protection regime, nor deprived (e) of liberty by judicial or administrative action.

15. For women: I say not pregnant or likely to be and not be lactating.

Done at:

on:

Volunteer Signature

(preceded by the read and approved)

I, the investigating physician certify that I have explained above research project volunteer at the date mentioned above

Signature: