

Université de Montréal

**"UNE ÉTUDE DESCRIPTIVE DÉMONTRE  
L'IMPLICATION DES LEUCOTRIÈNES DANS  
LA BRONCHIOLITE SÉVÈRE À VIRUS  
RESPIRATOIRE SYNCYTIAL"**

par

Yves Sznajer

Programme de Sciences Biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de

l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

en Sciences Biomédicales option Épidémiologie clinique

Août 2000

©Yves Sznajer , 2000



2022.11.2

Université de Montréal

"UNE ÉTUDE DESCRIPTIVE DÉMONTRE  
L'IMPLICATION DES LEUCOTRIÈNES DANS  
LA BRONCHOLITE SÈVÈRE À VIRUS  
RESPIRATOIRE SYNCYTIAL"

W  
H  
158  
2001  
N. 049

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de  
l'obtention du grade de Maître en sciences (M.Sc.)  
en Sciences Biomédicales option Immunobiologie et Infectiologie

Année 2000



Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

**" UNE ÉTUDE DESCRIPTIVE DÉMONTRE  
L'IMPLICATION DES LEUCOTRIÈNES DANS  
LA BRONCHIOLITE SÉVÈRE À VIRUS  
RESPIRATOIRE SYNCYTIAL "**

présenté par:

Yves Sznajer

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Sophie Laberge MD	Présidente-rapporteuse
Jean Turgeon MD	Membre du jury
Jacques Lacroix MD	Directeur de recherche
Baruch Toledano MD	Codirecteur

Mémoire accepté le:

## SOMMAIRE

En 1980, les leucotriènes ont été identifiés comme médiateurs de la constriction des bronches chez l'homme. Depuis lors, leur implication a été démontrée dans l'asthme. Il est maintenant accepté que la cascade inflammatoire constitue le déterminant majeur de cette maladie. Ces observations résultent également des analyses des effets des anti-leucotriènes dans le traitement de cette affection.

La bronchiolite à Virus Respiratoire Syncytial (VRS) représente une des affections respiratoires les plus importantes de l'enfant. Cette maladie infectieuse se manifeste par la réplication virale et la cytotoxicité du virus. Le traitement de la bronchiolite à VRS demeure controversé du fait des résultats contradictoires des études réalisées.

L'implication des leucotriènes dans la bronchiolite est supposée du fait du tableau clinique similaire à celui de l'asthme. À ce jour, deux études mesurant les leucotriènes dans la bronchiolite chez l'enfant ont été réalisées. Plusieurs faiblesses dans les

méthodologies de ces études ne permettent pas de tirer de conclusion sur l'implication définitive des leucotriènes dans cette affection.

Nous avons mené une étude clinique qui compare les taux de leucotriènes mesurés à partir des aspirations endotrachéales chez des nourrissons atteints de bronchiolite sévère à VRS (cas) et chez des nourrissons non infectés admis pour une chirurgie correctrice programmée (témoins). L'étude avait pour but:

- de mettre en évidence une élévation du taux de leucotriènes chez les cas;
- si l'hypothèse se vérifiait, d'autoriser des études cliniques évaluant les effets des anti-leucotriènes dans la bronchiolite à VRS.

Tout enfant de moins de deux ans admis au service des soins intensifs pédiatriques de l'Hôpital Sainte-Justine nécessitant une assistance ventilatoire pour un premier épisode de bronchiolite était éligible. Les cas étaient infectés par le VRS, les témoins n'étaient pas malades; par ailleurs, les mêmes critères d'inclusion et d'exclusion ont été adoptés pour les deux populations. Les

analyses ont été réalisées sur des prélèvements issus des aspirations endotrachéales et un échantillon d'urines recueillis durant les 24 premières heures de ventilation mécanique chez les cas et à l'intubation chez les contrôles. La quantification des leucotriènes a été réalisée par les Docteurs J. Westcott et S. Wenzel. Le projet de recherche a été approuvé par le Comité d'Éthique de l'Hôpital Sainte-Justine.

De décembre 1999 à avril 2000, 14 nourrissons ont été enrôlés dans chaque groupe. Les résultats obtenus montrent que les taux de  $\text{LTE}_4$ ,  $\text{LTB}_4$  et  $\text{PGE}_2$  sont significativement augmentés dans les sécrétions endotrachéales des enfants atteints de bronchiolite à VRS comparés aux nourrissons indemnes d'infection:

taux moyens et déviation standard en pg/ml:  $232.9 \pm 277.2$  vs  $43.93 \pm 19.9$ ;  $524.4 \pm 577.1$  vs  $85.93 \pm 72.31$ ;  $7262 \pm 11622$  vs  $4591 \pm 9829$ , respectivement. Les taux de 15-HETE ne sont pas significativement différents entre les deux groupes. Il existe une bonne corrélation entre les taux de  $\text{LTE}_4$  mesurés dans les urines par rapport aux aspirations endotrachéales (Corrélation de Pearson;  $r = 0.46$  ;  $p < 0.01$ )

La quantification des taux de LT à partir d'échantillons prélevés dans le poumon rend compte de façon fiable de la production des LT. Les résultats obtenus nous permettent de conclure que les poumons des enfants atteints de bronchiolite à VRS produisent davantage de leucotriènes que les poumons des enfants non infectés. Les leucotriènes semblent donc impliqués dans la physiopathologie de la bronchiolite à VRS du nourrisson.

Ces résultats autorisent la préparation d'études cliniques pour évaluer les effets des anti-leucotriènes dans la bronchiolite à VRS du nourrisson.

TABLE DES MATIÈRES	Pages
Page de Titre	2
Identification du Jury	3
Sommaire	4-7
Table des Matières	8
Liste de Tableau	9
Liste des Figures	10
Liste des Abréviations	11
Dédicace	12-13
Résumé	14-39
Corps de la Thèse: Article: Eicosanoids Are implicated in Severe RSV Bronchiolitis	40-59
Discussion Générale et Conclusions	60-64
Sources Documentaires	65-77
Annexes I à VII	78-91
Remerciements	82-93

<b>LISTE de TABLEAU</b>	<b>Page</b>
-------------------------	-------------

<b>Tableau 1: Caractéristiques de Population.....</b>	<b>55</b>
---	-----------

<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>Pages</b>
Figure 1. Quantification of LTE <sub>4</sub> in Endotracheal Aspirates and Urine	<b>56</b>
Figure 2. LTB <sub>4</sub> , 15-HETE and PGE <sub>2</sub> in Endotracheal Aspirates	<b>57</b>

**LISTE DES ABRÉVIATIONS**

<b>°C</b>	<b>degré Celsius</b>
<b>ELISA</b>	<b>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</b>
<b>EIA</b>	<b>Enzyme Immuno Assay</b>
<b>g</b>	<b>gravité</b>
<b>15-HETE</b>	<b>15 hydroperoxyeicosatetraenoic acid</b>
<b>Ig E :</b>	<b>immunoglobuline de type E</b>
<b>LT:</b>	<b>leucotriènes</b>
<b>LTE<sub>4</sub></b>	<b>leucotriène E4</b>
<b>LTB<sub>4</sub></b>	<b>leucotriène B4</b>
<b>PGE<sub>2</sub></b>	<b>prostaglandine E2</b>
<b>PICU</b>	<b>pediatric intensive care unit</b>
<b>PRISM</b>	<b>pediatric risk of mortality</b>
<b>RDAI</b>	<b>respiratory distress assessment instrument</b>
<b>SD</b>	<b>Standard Deviation</b>
<b>VRS</b>	<b>Virus Respiratoire Syncytial</b>

## DÉDICACE

Les premiers mots vont par le déroulement naturel et logique des événements à mes parents qui auront fourni depuis ma naissance un environnement et les repères indispensables à l'accomplissement de soi.

Ce modeste témoignage se dirige vers eux, ces compagnons de la première heure qui m'ont tout donné et qui m'ont appris tout ce qu'il fallait posséder pour tenir face aux intempéries et pour savourer les moments de bonheur. Je les remercie d'avoir cru en moi aussi fortement. J'espère ne pas trop les décevoir.

À mes grands-parents qui m'ont appris la tendresse et le partage des émotions vraies. Partis trop prématurément et cependant heureusement encore tellement présents.

À mon frère et ma sœur, rivales et alliés de la prime jeunesse, que j'admire pour leur intelligence, hommage aussi à la faculté qu'ils ont de toujours comprendre où est l'essentiel.

À Benjamin, Sophie et Jérémy, une relève sûre et prometteuse.

Aux amis qui ont cru en moi et m'ont accordé soutien, expérience et encouragements et qui ne m'ont pas oublié durant ces deux années au Canada.

À Sophie Laflamme pour son écoute attentive et ses taquineries tellement salutaires.

À Annie Janvier, sincère, intelligente et entière.

À Mahamadou, incarnation de la sagesse, du tact et des valeurs sûres: un modèle.

À Romain Mandel, qui m'a ouvert les yeux, amitié récente mais ô combien chère.

Au Professeur José Ramet et au Docteur Jean-Marie Bouton pour leur confiance à priori.

## RÉSUMÉ

### **1. La bronchiolite**

#### **1.1 Présentation clinique et Données épidémiologiques**

La bronchiolite est une infection contagieuse de l'arbre respiratoire inférieur qui atteint les nourrissons (enfants de 2 ans et moins). Elle survient durant les mois d'hiver et peut être causée par plusieurs virus (influenza, parainfluenza, adénovirus, rhinovirus), mais le VRS est l'agent causal classique de la maladie. Il existe deux génotypes (A et B) du virus VRS qui circulent simultanément au cours d'une épidémie mais la proportion d'une souche varie d'une année à l'autre et d'un endroit à l'autre. Par ailleurs un ou deux sous-types ont été identifiés pour chaque génotype. Ce phénomène serait responsable du remplacement annuel des souches retrouvées et ainsi de la perpétuation des épidémies enregistrées.<sup>2</sup>

La bronchiolite débute par l'apparition de symptômes respiratoires hauts faits de toux et de rhinorrhée (congestion nasale), suivis deux à trois jours plus tard par une atteinte de l'arbre respiratoire

inférieur. Cette deuxième phase est souvent d'apparition aiguë. Une dyspnée accompagnée de tachypnée, une hyperinflation, une toux irritative, l'agitation liée à l'hypoxie et des difficultés de prise alimentaire et de tolérance digestive sont souvent typiquement retrouvées. L'auscultation pulmonaire révèle la présence de râles crépitants disséminés accompagnés de ronchi. Un sifflement expiratoire, appelé wheezing, complète généralement le tableau clinique.<sup>3</sup>

En Amérique du Nord, l'incidence annuelle des infections de l'arbre respiratoire inférieur est de 240 épisodes/1000 nourrissons.<sup>1,2</sup> La bronchiolite représentait 11 à 17% des causes d'hospitalisation en 1995 aux États-Unis. La mortalité des enfants hospitalisés pour bronchiolite à VRS est de 0.1 % à 1% dans les pays industrialisés.<sup>5, 6</sup> La durée moyenne d'hospitalisation varie de 8,6 à 11,8 jours chez les nourrissons ayant une maladie sous-jacente et de 4,6 à 6,7 jours pour des nourrissons en bonne santé avant le début de la bronchiolite<sup>4</sup>. Le coût estimé du traitement aux États-Unis est de 300 millions de dollars américains par an.<sup>7</sup>

## **1.2 Physiopathologie**

De grandes variations inter-individuelles caractérisent la bronchiolite du nourrisson et l'anatomie de l'arbre respiratoire, l'ampleur de la riposte immunitaire et inflammatoire et/ou la présence d'un déficit sous-jacent révélé par cette infection sont responsables des différentes formes de présentation clinique.

Les mécanismes impliqués dans les signes et la gravité de la bronchiolite reposent sur l'activation de la cascade inflammatoire, la stimulation de presque tous les composants du système immunitaire responsables secondairement de l'obstruction bronchique, de l'hypoxie et finalement de la défaillance respiratoire. L'immunité humorale semble intervenir dans les effets observés lors d'une bronchiolite mais la controverse demeure sur son rôle définitif : des nourrissons avec des titres élevés d'anticorps acquis par voie transplacentaire développeraient une forme moins sévère de la maladie et l'utilisation d'immunoglobulines VRS spécifiques et d'anticorps monoclonaux (anti-VRS spécifiques : Palivizumab) semble améliorer l'évolution de la maladie.<sup>33,34</sup>

L'immunité cellulaire semble impliquée dans la terminaison de la maladie puisque les enfants immuno-déficients portent le virus de façon prolongée et développe davantage de complications. Le taux de lymphocytes CD 8+ est abaissé dans le sang périphérique de nourrissons en convalescence d'un épisode de bronchiolite; cela suggère soit une redistribution des lymphocytes CD8+ au poumon lors d'une infection, soit une immunodépression transitoire modulée par les lymphocytes CD8+.<sup>11,46</sup> Les cellules TH-1, dérivées des lymphocytes T CD 4+, sécrètent l'interleukine-2 et l'interféron- $\gamma$  qui génèrent secondairement les cellules cytotoxiques. Les cellules TH-2 (lymphocytes T Helper 2) stimulées sécrètent l'interleukine-4, l'interleukine-5, l'interleukine-10 et l'interleukine-13; toutes ces cytokines induisent la production, par les cellules B, d'immunoglobulines spécifiques et seraient les médiateurs entraînant le sifflement expiratoire (wheezing) et les phénomènes récurrents qui apparaissent après la bronchiolite: l'activation des éosinophiles<sup>31</sup> et la production d'IgE VRS-spécifique.<sup>11,30</sup> L'interféron- $\gamma$ , cytokine produite principalement par les lymphocytes NK (natural killer) et les lymphocytes T (CD 4+ et CD 8+), a une activité antivirale démontrée: des taux élevés ont été retrouvés au cours de la

phase aiguë lors des infections respiratoires virales produites chez la souris. Un essai clinique réalisé chez des nourrissons atteints de VRS montre que le taux d'interféron- $\gamma$  dans les sécrétions nasopharyngées est augmenté et ce taux est corrélé avec le wheezing.<sup>20</sup>

En outre, les ripostes inflammatoires et immunitaires rencontrées et décrites dans l'asthme ont conduit de nombreuses recherches afin d'apprécier la similitude avec la bronchiolite à VRS car ces deux maladies se ressemblent tant sur le plan des symptômes que de l'évolution clinique. Une controverse existe d'ailleurs dans la littérature sur l'existence d'un continuum et de facteurs de risque exposant les nourrissons ayant fait une bronchiolite à développer de l'asthme plus tard dans l'enfance.

Une série de données et de paramètres ont été étudiés et il ressort que la présence des éléments suivants sont associés à un risque accru de développement de wheezing et d'asthme:

- la présence d'eczéma, la rhinite, le sexe masculin, l'élévation du taux d'immunoglobulines E<sup>36,39</sup> et la présence de tabagisme maternel<sup>37</sup>,

- la sévérité de la bronchiolite elle-même et non le fait qu'un nourrisson ait fait une bronchiolite à VRS <sup>37</sup>,
- la riposte immunitaire joue un rôle majeur : en cas de bronchiolite, on n'observe pas de destruction cellulaire épithéliale par contre la réplication virale induit la production abondante de cytokines, de chémokines et de médiateurs et l'ampleur de leur concentration dans les sécrétions nasales est corrélée avec la gravité clinique <sup>37</sup>.
- les cellules endothéliales sont également activées et libèrent des molécules d'adhésion qui provoquent la transsudation de protéines plasmatiques (responsables l'œdème secondaire), l'activation des médiateurs provoquant la dégranulation des 'goblet cells' et l'encombrement des voies aériennes de matériel muqueux (production de mucus) <sup>37</sup>.
- il existerait une corrélation positive entre l'importance des taux d'anticorps anti-VRS produits au décours d'une bronchiolite et le risque de devenir asthmatique.<sup>38</sup>

Des études réalisant le suivi longitudinal de cohortes de nourrissons ayant présenté une bronchiolite à VRS durant leur première année de vie ont montré qu'une incidence plus élevée de

développement d'asthme était observée durant les trois années suivant l'infection (23 % contre 1% dans le groupe contrôle)<sup>39</sup>; les mêmes auteurs retrouvaient la même observation pour un suivi jusque l'âge de 7 ans.<sup>40</sup> Par contre une étude réalisée chez 888 nourrissons suivie pendant 11 ans après leur épisode de bronchiolite ne retrouvaient plus cette association.<sup>41</sup> Ces auteurs ne retrouvaient pas de différence dans les concentrations d'Ig E entre les groupes atteints et le groupe contrôle contrairement aux résultats de Welliver RC et al.<sup>36</sup> et ceux de Martinez FD et al.<sup>44</sup>

En fin, l'interleukine-11 (IL-11) et l'interleukine-2 pourraient être particulièrement intéressantes dans le déclenchement de la riposte inflammatoire : l'interleukine-11, cytokine cationique capable d'activer les cellules humorales (B) via des mécanismes T-dépendant, jouerait un rôle pivot dans l'activation des cellules TH-2 et dans la production secondaire d'IgE et d'autres interleukines (IL-4, IL-6) lors d'une maladie virale telle l'infection par le VRS; cette cytokine activée lors de la bronchiolite est retrouvée lors de l'inflammation de l'asthme<sup>42</sup>

L'interleukine-2, facteur de croissance des cellules T, est

retrouvée de façon significativement plus élevée chez des nourrissons ayant fait une infection par le VRS, comme si l'infection au VRS favorisait l'apparition d'une hypersensibilité lors d'exposition ultérieure à des antigènes. <sup>43</sup>

### **1.3 Les Traitements de la bronchiolite**

Depuis plus de quarante ans, le traitement de la bronchiolite à VRS est symptomatique: la grande majorité des nourrissons peuvent être traités à domicile en maintenant une hydratation et une alimentation correctes, en s'assurant de la persistance de l'ouverture des voies aériennes supérieures (suction nasale), en suivant le comportement de l'enfant et en étant attentif à la survenue d'une détérioration de l'état respiratoire.<sup>3</sup> Les résultats d'études sur l'efficacité de schéma thérapeutiques demeurent contradictoires.<sup>8,9,10,11</sup>

Les bronchodilatateurs sont souvent utilisés dans la bronchiolite : 78 % des nourrissons hospitalisés au Canada pour cette affection reçoivent des bronchodilatateurs.<sup>48</sup> L'utilisation d'albutérol en nébulisation, (bronchodilatateur agissant comme  $\beta$ -2 adrénergique

sélectif), chez 52 nourrissons de moins de deux ans de manière prospective en double aveugle ne montre pas d'amélioration sur la rapidité de guérison ou sur la diminution de la sévérité de la maladie (comparé à un placebo et en étudiant la durée d'hospitalisation et l'amélioration de l'oxygénation).<sup>47</sup>

Une méta-analyse<sup>10</sup> (basée sur les mots-clés : bronchiolite, albutérol, bromure d'ipratropium ou agents adrénergiques ou agents bronchodilatateurs et effectuée à partir des banques de données: Medline, Excerpta Medica et Reference Update pour des études randomisées placebo vs essais cliniques) posait trois questions: les bronchodilatateurs sont-ils bénéfiques dans le traitement de la bronchiolite en terme d'améliorations clinique, de la saturation en oxygène et du taux d'hospitalisation? Cette étude conclut que les nourrissons atteints de bronchiolite légère à modérée sont transitoirement améliorés grâce au traitement mais il n'est pas possible de conclure à un effet sur l'amélioration de la saturation en oxygène et le traitement ne prévient pas l'hospitalisation.

Plus récemment les résultats d'une étude prospective séquentielle<sup>9</sup>

visant à standardiser le traitement de nourrissons atteints de bronchiolite (avant puis après implantation d'une campagne d'éducation) ont montré qu'un tel programme permettait, au sein d'une communauté, de réduire la prescription d'antibiotiques, de réduire la recherche d'agents infectieux, de réduire le recours aux bronchodilatateurs mais aucun impact n'a été enregistré sur la durée d'hospitalisation lors de la comparaison des deux périodes, ni sur le taux de ré-admission. Il faut noter que les recommandations faites lors de la période de formation visaient à 'tenter d'améliorer l'usage des tests diagnostics, de réduire l'usage des antibiotiques et des bronchodilatateurs et de maintenir la qualité des soins'; tous ces paramètres étant décrits sur base de la revue récente de la littérature...ce qui n'est pas très rigoureux ni exploitable en terme d'efficacité thérapeutique.

Les corticoïdes, du fait de leur propriété anti-inflammatoire, ont aussi été évalués dans l'arsenal thérapeutique de la bronchiolite. Retenons les résultats d'une étude randomisée contrôlée à double insu publiée dans Lancet en 1996<sup>50</sup> chez 53 nourrissons de moins de 1 an traité par dexaméthasone intra-musculaire (1 fois par jour) comparé à 58 nourrissons recevant un placebo (injection de salin).

Cette étude révèle qu'il n'y a pas de différence dans la durée des besoins en oxygène ni dans la rapidité de la disparition des symptômes. Il faut toutefois noter que la saturation en oxygène était plus basse au début de l'étude parmi les nourrissons traités par corticoïdes: étaient-ils plus malades (alors qu'il n'y avait pas de différence pour les autres variables relevées)? À l'heure actuelle, le consensus établi sur base des résultats des différentes études cliniques menées ne recommande pas l'usage des corticoïdes comme traitement standard de la bronchiolite du nourrisson.<sup>2</sup>

La ribavirine est un nucléoside synthétique dérivé de la guanosine. Cet agent virustatique inhibe la traduction de l'ARN messenger viral et secondairement la réplication du virus. Une étude prospective, randomisée contrôlée évaluant le rôle de la ribavirine (par rapport à du salin servant de placebo) chez des nourrissons atteints de bronchiolite à VRS en assistance ventilatoire a été réalisée au sein de notre unité.<sup>51</sup> 21 patients ont constitué le groupe traité par aérosol de ribavirine; 20 patients 'traités' par aérosol de salin ont formé le groupe placebo. La ribavirine (donnée durant 18 heures par jour jusqu'à l'extubation ou pendant

sept jours maximum) ne montre pas une efficacité supérieure ('Intent to Treat' outcome analysis) au placebo sur la durée: de ventilation, de traitement de l'aérosol, de séjour aux soins intensifs, de traitement total à base d'oxygène et de l'hospitalisation. Les recommandations réservent la prescription de ribavirine à une population de nourrissons atteints de bronchiolite ayant une cardiopathie sous-jacente, une hypertension pulmonaire, une mucoviscidose, d'anciens prématurés de moins de 6 semaines de vie et des patients immuno-déprimés.<sup>49</sup>

En fin, l'utilisation d'épinéphrine semble montrer un effet bénéfique chez les nourrissons atteints de bronchiolite.<sup>12</sup> L'épinéphrine provoque une vasoconstriction en stimulant les récepteurs  $\alpha$  du cœur des vaisseaux et des muscles lisses; une baisse de la résistance périphérique totale (effet  $\beta$ -agoniste au niveau musculaire squelettique) et un relâchement des muscles lisses des bronches. Outre ses propriétés  $\beta$ -agonistes, l'épinéphrine possède des propriétés  $\alpha$ -adrénergiques responsable d'un effet vasoconstricteur. C'est ce dernier mode d'action qui expliquerait l'efficacité observée dans la bronchiolite (vasoconstriction et réduction de l'œdème) et qui la rendrait plus

efficace comparativement aux  $\beta$ -mimétiques.

## **2. Les Leucotriènes**

Connus d'abord sous le nom de 'Slow Reactive Substance of Anaphylaxis (SRS-A), les leucotriènes (LT), identifiés en 1980<sup>13</sup>, constituent un groupe de médiateurs formés à partir de l'acide arachidonique<sup>13,14,16,25,59</sup> (Voies Métaboliques Voir ANNEXE I). Cette formation se déroule dans les macrophages et les globules blancs. Les LT produits sont libérés dans le sang lors d'une réaction inflammatoire et rapidement métabolisés par le foie puis éliminés dans les urines. Leur demi-vie dans le sang est très courte; les taux sériques sont donc peu utiles pour évaluer leur activité biologique. Les LT restent stables dans les urines et la quantification sur de tels échantillons est la plus fiable.<sup>24</sup>

Les étapes du métabolisme des leucotriènes (Annexe I) présentent les caractéristiques suivantes. L'événement initial de la production des leucotriènes résulte de l'activation de Phospholipases A2, famille d'enzymes catalysant la libération d'acide arachidonique de la membrane phospholipidique.<sup>14,59</sup>

Grâce à une protéine intégrée dans la membrane nucléaire (FLAP), la formation d'acide arachidonique du cytoplasme est orientée vers la voie de la production des leucotriènes sous l'action de trois lipoxgénases (LO): 5-LO, 12-LO et 15-LO.

La 5-LO est l'enzyme prédominant au niveau des neutrophiles et lors de son activation et couplée à la FLAP, elle forme le complexe actif (5-HETE) qui est chémoattractif pour les neutrophiles et qui donnera naissance aux leucotriènes. 5-HETE se transformera en  $LTA_4$ . Le métabolisme rapide de cet intermédiaire pourrait être responsable des variations des taux rapportés.<sup>24</sup> Le  $LTA_4$  donne naissance aux deux classes de leucotriènes: par l'action de la  $LTA_4$  hydrolase,  $LTA_4$  se transforme en  $LTB_4$  appartenant aux peptido-leucotriènes, et par l'action de  $LTC_4$  synthase,  $LTA_4$  se transforme en  $LTC_4$  qui donnera naissance aux Cystéinyl leucotriènes ( $LTC_4$ ,  $LTD_4$ ,  $LTE_4$ ).<sup>14,25,59</sup>

Le métabolisme des prostaglandines dérive de la transformation du groupement carbon-1-carboxyl du  $LTA_4$ , la quantification des taux de prostaglandines est ainsi un second témoin de l'activation du métabolisme des leucotriènes. Le terme 'Eicosanoïd' définit les dérivés

des voies métaboliques issues de la transformation de l'acide arachidonique. (Le titre de l'article constituant le corps du présent mémoire reprend ce terme car les métabolites de ces différentes voies ont été quantifiés).

La formation de  $\text{LTB}_4$  dépend de l'intégrité des peroxysomes et il existe plusieurs voies de métabolisme du  $\text{LTB}_4$  avant qu'il soit éliminé dans les urines où il est habituellement quantifié. Des taux élevés de  $\text{LTB}_4$  ont été mesurés dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire de nourrissons atteints d'hypertension artérielle pulmonaire.<sup>33</sup>  $\text{LTB}_4$  est un puissant agent chimotactique et activateur des réponses fonctionnelles des neutrophiles: aggrégation et adhésion des leucocytes à l'endothélium vasculaire, génération de radicaux libres d'Oxygène et libération d'enzymes lysosomiales.<sup>59</sup>

$\text{LTE}_4$  est dérivé de la transformation rapide dans le sang circulant de  $\text{LTC}_4$  et  $\text{LTD}_4$  qui sont de puissants bronchoconstricteurs. Des taux élevés de  $\text{LTE}_4$  sont retrouvés dans les expectorations, le liquide de lavage broncho-alvéolaire et les urines des patients atteints de crise d'asthme, de rhinite allergique, d'asthme

déclenché par l'aspirine et de l'asthme à l'effort.<sup>15,16,26,28</sup> Habituellement, quand les fonctions rénales et hépatiques sont normales, les taux de LTE<sub>4</sub> urinaires sont un bon index de la synthèse corporelle totale de leucotriènes. Les taux de LTE<sub>4</sub> mesurés dans les urines ne permettent cependant pas de pouvoir spécifiquement préciser l'origine de leur production.<sup>24</sup>

Les cystéinyl-leucotriènes (LTE<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> et C<sub>4</sub>) sont de puissants bronchoconstricteurs (mille fois plus que l'histamine); ils augmentent la sécrétion de mucus, l'œdème des voies aériennes et induisent la chémoattraction des éosinophiles et leur activation.<sup>14,16,17,20,41,42,59</sup> Une corrélation existe dans l'asthme entre les taux de LTB<sub>4</sub> (et dans une moindre mesure entre les taux de LTE<sub>4</sub>) et le nombre d'éosinophiles.<sup>24</sup> Ils exercent leurs actions biologiques en se liant et en activant des récepteurs spécifiques. Cette liaison s'effectue de manière saturable et réversible pour chaque cystéinyl-leucotriène. Pour LTD<sub>4</sub>, le lien à son récepteur inhibe l'unité catalytique de l'adénylate cyclase. La baisse du taux d'AMPcyclique qui en résulte provoque la contraction de la musculature lisse (bronchoconstriction) de même que la libération

accrue d'acide arachidonique pour la synthèse des prostaglandines.<sup>45,59</sup>

Il est maintenant bien connu que les leucotriènes sont produits par les cellules impliquées dans la pathogénèse de l'asthme. Cependant, les arguments les plus convaincants de leur rôle causal sont issus des études cliniques sur l'efficacité des drogues qui inhibent l'action et/ou la formation des leucotriènes (anti-leucotriènes).<sup>16,26,29,52,53,54,55,56</sup> L'utilisation de MK-571, antagoniste des récepteurs LTD<sub>4</sub> - administré en intra-veineux durant 20 minutes avant un effort chez 12 sujets asthmatiques (asthme à l'effort)- a permis de noter non seulement une réduction du degré de bronchoconstriction chez tous les sujets traités (par rapport à un groupe contrôle) mais aussi une diminution de la durée de cet épisode.<sup>52,53</sup> L'utilisation de ICI-204-219, autre antagoniste spécifique des récepteurs LTD<sub>4</sub> administré par voie entérale, confirme ces résultats dans une population de patients souffrant d'asthme allergique.<sup>54</sup> La prise continue durant 6 semaines de ICI 204-219 (étude multicentrique randomisée contrôlée en double aveugle) améliorent la capacité fonctionnelle pulmonaire, diminuent les symptômes diurnes et les réveils

nocturnes et diminuent les scores de gravité utilisés pour évaluer l'asthme sans engendrer d'effets secondaires.<sup>55</sup> En fin, l'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse de la 5- lipoxygénase réduisent de 70 à 90% la synthèse des leucotriènes chez des patients souffrant d'asthme induit par le froid.<sup>56</sup> Ces effets ont également été étudiés et mis en évidence chez l'enfant asthmatique.<sup>57,58</sup>

Récemment, une étude pratiquée in vitro sur des cellules épithéliales bronchiques humaines montre que ces cellules expriment les gènes qui codent pour la 5- Lipoxygénase<sup>21</sup>. L'infection par le VRS régulerait positivement la voie des leucotriènes. À l'heure actuelle, deux études ont mesuré les taux de LT dans la bronchiolite du nourrisson.<sup>18,19</sup> Ces études ne permettent d'impliquer de façon définitive les LT pour les raisons suivantes: les problèmes communs reposent sur le fait que dans les deux méthodologies utilisées, les taux obtenus chez les nourrissons infectés ne sont pas comparés à des nourrissons non infectés et que les prélèvements sont faits dans les sécrétions nasopharyngées ne rendant pas compte de la situation au niveau des bronchioles. De plus, dans la première étude,<sup>18</sup> la population diffère par la sévérité de la maladie, le score clinique utilisé n'est

pas validé ('score de symptômes') et le moment de l'évaluation clinique n'est pas précisé. La prise en charge et le traitement ne sont pas standardisés dans cette étude; aucune valeur de référence n'est établie avant de mesurer les taux de LT dans les groupes et en fin, les taux urinaires obtenus ne sont pas normalisés pour la concentration de créatinine. La seconde étude<sup>19</sup> est formée de deux groupes d'enfants d'âge très différents (de 1 mois à 6 ans) dont les symptômes et les données cliniques ne sont pas précisés.

Sur base des arguments scientifiques précédemment décrits montrant que les LT étaient impliqués dans l'asthme, que les mécanismes inflammatoires rencontrés dans la bronchiolite à VRS sont similaires à ceux de l'asthme et comme il n'existe pas d'études démontrant l'implication des LT dans la bronchiolite du nourrisson, nous avons mené une étude clinique comparant les taux de leucotriènes dans les aspirations bronchiques et dans les urines de nourrissons atteints de bronchiolite à VRS à ceux obtenus chez des nourrissons non infectés.

### **3. Approche Méthodologique**

La méthodologie de cet étude clinique repose sur les caractéristiques suivantes: Cette étude a été réalisée dans l'unité des Soins Intensifs à l'Hôpital Sainte-Justine affilié à l'Université de Montréal de décembre 1999 à avril 2000. La quantification des leucotriènes a été réalisée au National Jewish medical and research Center, Denver, Colorado.

Tout enfant de moins de 2 ans, hospitalisé, intubé et en assistance ventilatoire pour un premier épisode de bronchiolite à VRS était considéré comme éligible (cas).

Les critères d'inclusion étaient:

- 1) nourrisson (< 2 ans);
- 2) premier épisode de bronchiolite (marqué par: cliniquement: tachypnée, mise en route des muscles respiratoires accessoires, allongement du temps expiratoire, râles pulmonaires ou wheezing et hyperinflation à la radiographie du thorax de face);
- 3) assistance ventilatoire pour défaillance respiratoire caractérisée

- par a) fatigue ou apnée sévère suivie d'un arrêt respiratoire; b) acidose respiratoire non compensée ( $\text{pH} < 7,30$  et  $\text{PCO}_2 > 60$  Torr ); c) hypoxie ( $\text{PaO}_2 < 60$  Torr ou Saturation par oxymétrie de pouls ( $\text{SpO}_2$ )  $< 93\%$  avec  $\text{FiO}_2 = 0.6.$ );
- 4) diagnostic d'infection à VRS obtenu par ELISA à partir des sécrétions du naso-pharynx durant les 24 premières heures de ventilation mécanique.

Les critères d'exclusion furent la présence de:

- 1) maladie respiratoire chronique: (bronchodysplasie, mucoviscidose, hypoplasie pulmonaire) ou maladie neuromusculaire;
- 2) déficit immunitaire (de tout type) et/ou, maladie peroxysomale,
- 3) insuffisance rénale ou hépatique (chronique ou aiguë);
- 4) ventilation mécanique instaurée depuis plus de 24 heures;
- 5) diagnostic de VRS non confirmé;
- 6) assistance ventilatoire pour apnée sans défaillance respiratoire (défini plus haut);
- 7) infection nosocomiale par le VRS (acquise après 7 jours d'hospitalisation)<sup>22</sup>;

- 8) tout enfant traité par corticostéroïdes (par voie systémique ou topique) et/ou inhibiteurs des prostaglandines;
- 9) enfant traité par ribavirin;
- 10) consentement informé non obtenu d'un parent ou du tuteur légal endéans les premières 24 heures de ventilation mécanique. (La présence d'un critère d'exclusion suffisait pour ne pas enrôler un enfant dans l'étude).

Une fois le patient enrôlé dans l'étude, les données cliniques suivantes ont été collectées pour les cas: la plus haute fréquence respiratoire (/min) et le rythme cardiaque le plus élevé avant intubation; le score de P.R.I.S.M<sup>23</sup> (Annexe I); le score R.D.A.I.(Annexe II)<sup>12</sup> ; les gaz capillaires; l'examen de la radiographie standard de face; les histoires personnelle et familiale d'atopie. Chez les cas, les échantillons ont été prélevés durant les premières 24 heures de ventilation mécanique. Les aspirations endotrachéales constitue une procédure de routine dans une unité de soins intensifs pour les enfants en ventilation mécanique. Pas d'autre manœuvre n'a été effectuée pour cette étude. Un échantillon d'urine a été recueilli par la mise place d'un sac à urine. Ce n'est que lorsque les urines ont été recueillies que

les aspirations ont été effectuées synchronisant les prélèvements et permettant une interprétation des résultats des dosages (corrélation).

Le groupe contrôle (témoins) était composé d'enfants non infectés, n'ayant pas contracté le VRS et qui était admis au quartier opératoire pour une intervention chirurgicale programmée nécessitant intubation et recours à la ventilation mécanique (ex. cystoscopie, strabisme, hernie inguinale). Les mêmes critères d'exclusion que ceux mentionnés plus hauts ont été utilisés pour cette population. Les sécrétions des aspirations endotrachéales de même que les urines ont été prélevées à l'intubation pour éviter l'interférence éventuelle avec les médicaments anesthésiants.

Il n'y a pas eu d'interférence dans la prise en charge des enfants durant l'étude car les résultats ont été obtenus après que les enfants avaient quitté l'hôpital. L'étude a été approuvée par le Comité d'éthique de l'Hôpital Sainte-Justine.

Les échantillons une fois obtenus étaient placés au congélateur (-70 ° Celsius). Toutes les données furent recueillies par le moniteur

de recherche (Y.S) qui ne soignait pas les enfants. La quantification des leucotriènes a été réalisée par les Docteurs S.Wenzel et J.Y Westcott (National Jewish medical and research Center Denver- Colorado) . Ils ignoraient le groupe auquel appartenaient les échantillons analysés. La technique de quantification a été décrite par J. Westcott en détail et adaptée pour cette étude<sup>24</sup> : brièvement, 2 ml d'aspiration ont été ajoutés à 2 ml de méthanol pour permettre la précipitation des protéines. Les échantillons furent ensuite centrifugés à 600 g et 4°C durant dix minutes. 6 ml de Tampon Phosphate ont été ajoutés au surnageant qui était mis en contact avec une cartouche Sep-Pak. Les LT qui formaient alors le surnageant étaient recueillis et purifiés par du méthanol 80% et évaporés par pression négative par un Speed -Vac. [<sup>3</sup>H] LTC<sub>4</sub>, [<sup>3</sup>H] LTE<sub>4</sub>, [<sup>3</sup>H] LTB<sub>4</sub> étaient enfin ajoutés à chaque échantillon et centrifugé à 1,000 g durant 10 min. Le taux de leucotriènes était alors déterminé par Enzyme Immune-Assay (EIA). Les taux de leucotriènes des urines ont été normalisés pour la concentration de créatinine.

Les analyses statistiques ont été réalisées de la façon suivante: les données démographiques et cliniques ont été comparées entre les

deux groupes (variables continues - moyenne  $\pm$  déviation standard). L' évaluation de la signification statistique des différences entre les groupes à états évalués par le teste de chi square. La moyenne du taux de LT a été calculée pour chaque groupe d'enfants : le test de Mann-Whitney (test de comparaison entre les groupes pour une répartition non paramétrique) a été utilisé pour les analyses des taux de leucotriènes dans les aspirations. Cette méthode a aussi été utilisée pour les échantillons issus des urines. La corrélation de Pearson a permis d'analyser la relation entre la quantification des LTE<sub>4</sub> dans les aspirations et dans les urines pour estimer la fiabilité des taux obtenus dans le site pulmonaire (par rapport aux urines site standard de mesure). (Graphpad Software San Diego, CA).

Les résultats des dosages des leucotriènes dans cette étude sont représentés dans les figures des pages qui constituent le corps du présent mémoire (article). Les quantifications de ces médiateurs ont été répertoriées successivement et sous forme de comparaison entre la population des enfants infectés par le VRS et la population d'enfants non infectés.

Les commentaires de ces résultats sont détaillés dans la discussion et les conclusions générales situées à la suite de la présentation du corps du mémoire.

**Eicosanoid Mediators are Implicated in Severe Respiratory Syncytial  
Virus Bronchiolitis.**

Yves Sznajer<sup>1</sup> M.D, Jay Westcott<sup>2</sup> PhD, Sally Wenzel<sup>2</sup> M.D, Bruce Mazer<sup>3</sup>  
M.D Marisa Tucci<sup>1</sup> M.D. and Baruch Joseph Toledano<sup>1</sup> M.D.

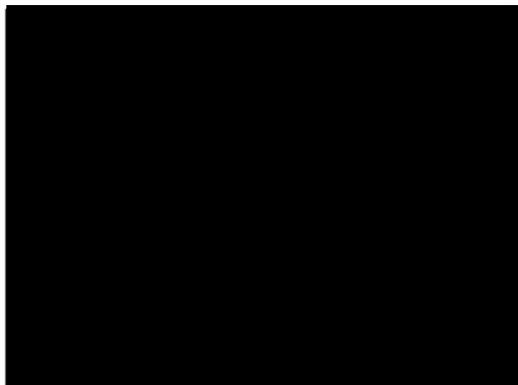
<sup>1</sup> Pediatric Intensive Care Unit, Sainte Justine Hospital, Université de  
Montréal, Montreal, Canada.

<sup>2</sup> National Jewish Medical and Research Center, Department of Medicine,  
Denver, Colorado

<sup>3</sup> Meakins Christie Laboratory, Mc Gill University, Montreal, Canada

Yves Sznajer is supported by a Grant from the Scientific Foundation A. Loicq  
Bruce Mazer, Marisa Tucci and Baruch Toledano are supported by the Fonds  
de Recherche de Santé du Québec

**Corresponding Address:** Dr. Baruch Toledano



## **ABSTRACT**

**Background:** The incidence of respiratory syncytial virus bronchiolitis is 240 per 1000 infants. Its pathophysiology and manifestations have several similarities with asthma. Leukotrienes contribute to the eosinophilia and wheezing seen in asthma, and may also contribute to the clinical symptoms in respiratory syncytial virus bronchiolitis. We conducted a prospective study to quantify the levels of several eicosanoids in intubated patients with severe bronchiolitis and compared them to those of electively intubated non-infected infants.

**Methods:** Patients included in the study were < 2-years-old and were matched for weight and sex. Infants in the study group were admitted to the pediatric intensive care unit for a first episode of severe bronchiolitis. Quantification of LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub> and 15-HETE was performed from endotracheal aspirates, and LTE<sub>4</sub> quantification was performed from both endotracheal aspirates and urine.

**Results:** Fourteen infants were enrolled in each group. LTE<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub> and PGE<sub>2</sub> levels were significantly increased from endotracheal aspirates of infants with bronchiolitis compared to controls: mean  $\pm$  standard error in pg/ml: LTE<sub>4</sub>: 232.9 $\pm$ 277.2 vs 43.9 $\pm$ 19.9; LTB<sub>4</sub>: 524.4 $\pm$ 577.1 vs 85.9 $\pm$ 72.3; PGE<sub>2</sub>: 7262  $\pm$ 11622 vs 4591 $\pm$ 9829, (p<0.01). 15-HETE levels were not significantly different in the two groups. Urinary LTE<sub>4</sub> levels were significantly increased in infants with bronchiolitis compared to the control population: 1242.7 $\pm$ 779.4 vs 242.1 $\pm$ 22.6 pg/ml creatinine (p<0.001).

**Conclusions:** Eicosanoids are increased in the tracheal aspirates and urine of children with bronchiolitis which suggests their implication in the pathogenesis of bronchiolitis.

## INTRODUCTION

In North America, the annual incidence of lower respiratory tract infections is 240 episodes per 1000 infants (1, 2). Respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis constitutes the most prevalent clinical infection in this age group displaying an array of symptoms ranging from a mild flu-like event to acute respiratory failure requiring admission to an intensive care unit and mechanical ventilation (3). In the United States, 6 children per 1000 aged less than 6 months are hospitalized each year for bronchiolitis. The mean length of hospital stay varies from 4.6 to 6.7 days in previously healthy patients and from 8.6 to 11.8 days in compromised children (4). While mortality of hospitalized children with RSV bronchiolitis is 0.1 % to 1% in industrialized countries (5, 6), the cost of hospital care of these infants is significant, attaining \$ 300 million dollars per year in the United States (7).

Each year, the RSV bronchiolitis epidemic represents a clinical therapeutic challenge. The standard of care for patients with bronchiolitis remains controversial. The use of bronchodilators and steroids is not substantiated (8-11).  $\beta$ - agonists have been disappointing in terms of their therapeutic effect. Inhaled epinephrine has a beneficial effect in children with bronchiolitis who are less than two years-old, suggesting that airway edema greatly contributes to the symptoms of bronchiolitis (12).

In 1979, leukotrienes (LT) were identified as mediators derived from arachidonic acid metabolism (13, 14). They are now well established as mediators responsible for some of the clinical symptoms encountered in asthmatic patients. Cysteinyl -LT ( $LTC_4$ ,  $LTD_4$ ,  $LTE_4$ ) are potent bronchoconstrictors that increase mucus secretion and airway edema and can also recruit inflammatory cells such as eosinophils (13, 15-17).  $LTB_4$  is a potent chemotactic agent and activator of neutrophil responses and may be involved in the pathophysiology of certain subgroups of asthmatic patients (15, 16).

We hypothesized that LT are major mediators in the pathophysiology of bronchiolitis caused by RSV. To test our hypothesis we conducted a prospective study in infants admitted to the PICU for RSV bronchiolitis to quantify cysteinyl-LT and  $LTB_4$  levels in the endotracheal (ET) aspirates from a RSV bronchiolitic population (cases) and compared these to the levels noted in a group of patients intubated for elective surgery (controls). Eicosanoids ( $PGE_2$  and 15-HETE) involved in other pathways of arachidonic acid metabolism were also quantified for comparison purposes. Because cysteinyl LT might be important in the evaluation of less severely ill, non-intubated patient with RSV bronchiolitis, we also assessed whether there existed differences in urinary  $LTE_4$  levels in our populations.

## **MATERIALS AND METHODS**

**Population characteristics:** This prospective study was conducted between December 1<sup>st</sup> 1999 and April 30<sup>th</sup> 2000 in the pediatric intensive care unit at Sainte-Justine Hospital. All infants under two years of age who required intubation for a first episode of RSV bronchiolitis were considered eligible for this study. The control group was composed of healthy infants with no respiratory symptoms who were admitted to the operating room and who required intubation for elective surgery. This study was approved by the Scientific Committee and the Ethics Committee at Sainte-Justine Hospital.

**Inclusion criteria for case population included:** 1) first episode of bronchiolitis; 2) mechanical ventilation initiated for respiratory compromise 3) RSV etiology obtained by ELISA or viral cultures from the nasopharynx.

**Exclusion criteria for case and controls included:** 1) chronic respiratory disease; 2) immune deficiency or peroxisomal disorder, 3) liver or renal failure; 4) mechanical ventilation for more than 24 hours before inclusion; 5) mechanical ventilation for apnea but not respiratory failure; 6) nosocomial RSV infection (18); 7) children treated with corticosteroids, cyclooxygenase inhibitors or ribavirin; 8) inability to obtain informed consent.

**Clinical measures:** The following data were collected: highest respiratory rate and heart rate before intubation; RDAI score (12); PRISM II score (19);

capillary gas; continuous oxygen saturation monitoring; personal history; family history of atopy.

**Eicosanoid Measurements:** In the case population, each sample was obtained during the first 24 hours of mechanical ventilation. ET aspiration is performed via aspiration of secretions into a Luki® tube Davis and Geck (Wayne, NJ) following the instillation of 2.5 ml of saline. Urine samples were collected through a urine bag. In the control population, the secretions from the ET aspiration as well as the urine samples were taken immediately after intubation.. The urine samples were not diluted. All specimens were immediately transferred to a freezer and maintained at -70°C.

**Eicosanoid Assay :** The quantification of the eicosanoids was performed at the National Jewish Medical and Research Center, Denver, Colorado. The investigators were blinded to the identification of the samples.

**ET Eicosanoid Assay:** The technique used for eicosanoid quantification was derived from the previously described method for bronchoalveolar lavage fluid and adapted for tracheal aspirates (20). Cysteinyl-leukotrienes and PGE<sub>2</sub> were quantified using a standard kit from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). LTE<sub>4</sub> levels reflect LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> and LTE<sub>4</sub>. 15-HETE was measured by EIA using an antibody from Assay Design (Ann Arbor, MI, USA).

**Urine LT assay:** The protocol for urine LTE<sub>4</sub> purification utilizing an immunoaffinity resin was previously described (20). Urinary LTE<sub>4</sub> was

normalized to creatinine levels in the urine, which were measured spectrophotometrically utilizing a commercially available kit (Sigma Chemical, St Louis, MO, USA).

**Statistical analysis:** Demographic data were analyzed using Chi squared test. The Mann Whitney test was used for comparison analysis of eicosanoid levels in the ET aspirates and urine. The Pearson Correlation test was used to analyze the relationship between the LTE<sub>4</sub> levels in ET aspirates and urine (Graphpad Software San Diego, CA).

## **RESULTS**

Fourteen children with severe RSV bronchiolitis and fourteen healthy children constituted the two groups of this study. In the case group, the RSV test was obtained within the first 24-hours after admission to PICU. There was no statistical difference between the two groups for sex, weight, history of atopy and prematurity (Table 1). The mean age was slightly higher for the control population. To confirm the severity of the disease, pediatric clinical scores (PRISM score (19) and RDAI score (12)) were calculated only for the patients in the case population; these scores were not applicable to the control group of healthy infants electively intubated for surgery.

LTE<sub>4</sub> levels in our assay represent levels of all cysteinyl LT including LTE<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub> and LTD<sub>4</sub>. Figure 1A represents the results of the quantification of LTE<sub>4</sub> in the aspirates of both groups. LTE<sub>4</sub> levels (mean  $\pm$  SEM) were 202.9  $\pm$  277.2 pg/ml in the case population versus 43.9  $\pm$  19.9 pg/ml in the control group (p<0.01). Figure 2A illustrates LTB<sub>4</sub> levels and indicates that patients with RSV have a markedly elevated mean concentration of 524.4  $\pm$  577.1 pg/ml in their ET aspirates while control patients had a mean level of 85.9  $\pm$  72.3 pg/ml (p<0.001). 15-HETE is the result of arachidonic metabolism via the 15-lipoxygenase enzyme. Figure 2B represents the mean levels of 15-HETE in the ET aspirates in both groups and shows that there was no

statistically significant difference in the concentration of this metabolite in the bronchiolitis population and the control group ( $7262 \pm 11622$  pg/ml versus  $4591 \pm 9829$  pg/ml, respectively).

Prostaglandin metabolism involves the activation of the cyclooxygenase pathway. Figure 2C represents the quantification of  $\text{PGE}_2$  in the ET aspirates of both study groups and indicates detection of  $910.6 \pm 879$  pg/ml in the case population compared to  $64.2 \pm 46.9$  pg/ml in the control group ( $p < 0.001$ ).

When renal and hepatic functions are normal, urinary  $\text{LTE}_4$  can be utilized as an index of total body  $\text{LTC}_4$  synthesis, as it is a good indicator of LT production (20). Figure 1B demonstrates that  $\text{LTE}_4$  levels in the urine were significantly increased in patients with severe RSV bronchiolitis compared to control ( $1242.7 \pm 779.4$  pg/mg creatinine vs  $242.1 \pm 22.6$  pg/mg creatinine, respectively;  $p < 0.001$ ). We evaluated the correlation of the quantification  $\text{LTE}_4$  levels measured in ET aspirates and urine for all our patient population and shows that although there is a statistically significant correlation in the levels obtained ( $p < 0.01$ ); the correlation coefficient is moderate with an r value of 0.46.

## DISCUSSION

Twenty years ago, LTC<sub>4</sub> and LTD<sub>4</sub> were identified for their potent constricting effects in human bronchi (17). The ability of cysteinyl-LT (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>) to induce bronchoconstriction in asthma is now well established; their other effects include pulmonary vasodilatation, increased vascular permeability and mucous production (21). Inflammation has long been considered the major factor responsible for the development of asthma (22). More particularly, eosinophil activation and chemoattraction is induced by cysteinyl-LT and a correlation exists between the levels of LTB<sub>4</sub> and LTE<sub>4</sub> and eosinophils (23, 24). These findings have led to the development of anti-LT drugs as second line therapy for asthma (25).

There have been many attempts to find effective treatments for patients with RSV bronchiolitis (26-28). Because a consistently effective therapy has yet to be found, significant morbidity still occurs in intubated patients with RSV bronchiolitis. Since some of the symptoms of bronchiolitis are similar to those of asthma, it is conceivable that LT are involved in the pathophysiology of bronchiolitis as well. To date, two clinical trials on LT have been performed in children with bronchiolitis in which there was no assessment of LT levels in intubated patients with proven RSV bronchiolitis and no link established between LT levels and the severity of RSV bronchiolitis (29, 30). In both these studies, no comparison to a control group was realized and quantification

of LT was performed from nasopharyngeal aspirates. In the first study by Cook et al (29), the population of patients used had marked variation with regard to the severity of bronchiolitis. In the second study by Volovitz (30), the two study groups consisted of infected children with RSV bronchiolitis patients compared to patients with other upper respiratory tract infections. In addition, the age of included patients, which ranged from less than 1 year to 6 years of age in both non paired groups, was not compatible with the usual age at which severe RSV bronchiolitis occurs. Others have suggested the importance of LT in airway pathologies. A clinical trial studying virus-induced wheezing in children implied that interferon- $\gamma$  and cysteinyl-LT may play a role in this pathology (31) while an in vitro study on human bronchial epithelial cells showed that these cells express the genes encoding for 5-lipoxygenase, an important enzyme in the LT pathway (14), and that RSV infection in these cells can upregulate the enzyme (32).

We measured LT levels in infants intubated for severe RSV bronchiolitis and compared them to those in healthy children electively intubated for other indications. There are several strengths in the design and methodology of our study. Because there are no existing reference values for LT levels in the pediatric population, we performed the quantification of various LT metabolites in urine and ET secretions. This allowed us to standardize the levels for the pediatric population and permitted a reliable interpretation of the levels obtained in children with severe RSV bronchiolitis. Moreover, as

recommended (20), the quantification of LT in urine was calculated by taking into account the concentration of creatinine. All patients in the case population had a confirmed RSV bronchiolitis and were so severely affected that they required intubation and mechanical ventilation which allowed us to avoid contamination of ET secretions with upper airway secretions. Because ET secretion aspiration is routine care in intubated children, this provided a convenient venue to obtain these samples.

LTE<sub>4</sub> is derived from the rapid transformation of LTC<sub>4</sub> and LTD<sub>4</sub> in the circulation and is a potent bronchoconstrictor. This cysteinyl-LT has been found to be elevated in sputum, bronchoalveolar lavage and urine of patients with acute asthma, allergic rhinitis as well as in aspirin-sensitive and exercise-induced asthma (14). Our findings corroborate the notion that cysteinyl LT, like it has been shown in asthma, is markedly elevated in children with severe RSV bronchiolitis and may play a role in its pathogenesis. Elevated levels of LTB<sub>4</sub> have been found in lavage fluid of infants with persistent pulmonary hypertension (33). Our findings demonstrate a significant increase in LTB<sub>4</sub> levels in our patients with bronchiolitis as compared to controls. The results of the quantification of PGE<sub>2</sub> show that, in patients with severe RSV bronchiolitis, the cyclooxygenase pathway is activated as well. 15-HETE levels were not statistically significant between our bronchiolitis group and controls. 15-HETE is derived from arachidonic acid via lipoxygenase activity. The increase in LTA<sub>4</sub>, which occurred without a significant increase in 15-

HETE, could be due to upregulation of 5-lipoxygenase without a marked increase of the activity of 15-lipoxygenase that converts arachidonic acid to 15-HETE.

When renal and hepatic functions are normal, urinary LTE<sub>4</sub> is utilized as an index of total body LTC<sub>4</sub> synthesis. This metabolite is a good indicator of LT production (20). Basal levels of urinary LTE<sub>4</sub> in healthy children are known to be similar to those of adults, although some variability has been described (20). Because RSV bronchiolitis does not lead to intubation and mechanical ventilation in the majority of afflicted infants, we evaluated whether there occurred differences in urinary levels of LTE<sub>4</sub> in our bronchiolitis population compared to our control group. We demonstrated that there were significant differences in the urinary LTE<sub>4</sub> levels in patients with severe RSV bronchiolitis compared to controls suggesting that urinary LTE<sub>4</sub> levels might also be elevated in non-intubated RSV bronchiolitis patients and further suggesting that it may be pertinent to measure LTE<sub>4</sub> levels in less severely affected non-intubated infants with bronchiolitis to monitor the disease process. In order to determine if elevated LTE<sub>4</sub> levels in urine reflected respiratory inflammation, we evaluated if there was a correlation between these values. There was a statistically significant albeit moderate degree of correlation between LTE<sub>4</sub> levels in ET aspirates and in urine.

Our findings indicate that variations of LT levels are part of an ongoing inflammatory process in infants with severe RSV bronchiolitis. In this study, we demonstrate for the first time that the levels of LT are increased in ET aspiration and in urine of infants with severe RSV bronchiolitis. Our findings open new avenues in the understanding of RSV bronchiolitis in children and allow the elaboration of clinical trials to evaluate the use of therapeutic agents such as LT modifiers for infants with RSV bronchiolitis.

**Acknowledgements:** Dr. Francois Proulx and Dr. Barbara Mazer for their help with the statistical analysis.

**TABLE 1 Population Characteristics**

<b>Clinical Data</b>			
<b>(Mean ± Standard Deviation)</b>	<b>Control Group</b>	<b>Bronchiolitis Population</b>	
	<b>n=14</b>	<b>n=14</b>	
<b>Age (month)</b>	4.75	2.15	
<b>Sex (M/F)</b>	10/4	09/5	N.S
Weight (kg)	5.8 ± 2	4.4 ± 1	N.S
RDAI score	N. A	8.2/17 (±0.5)	N. A
PRISM score	N. A	13.40 (±8)	N. A
Respiratory Rate (/min)	32 (± 5)	59 (± 15)	P<0.01
History of atopy	1/14	2/14	N.S
History of prematurity	4/14	5/14	N.S

**Table 1 Population Characteristics**

N.A = Not Applicable,

N.S= The difference does not reach statistical significance,

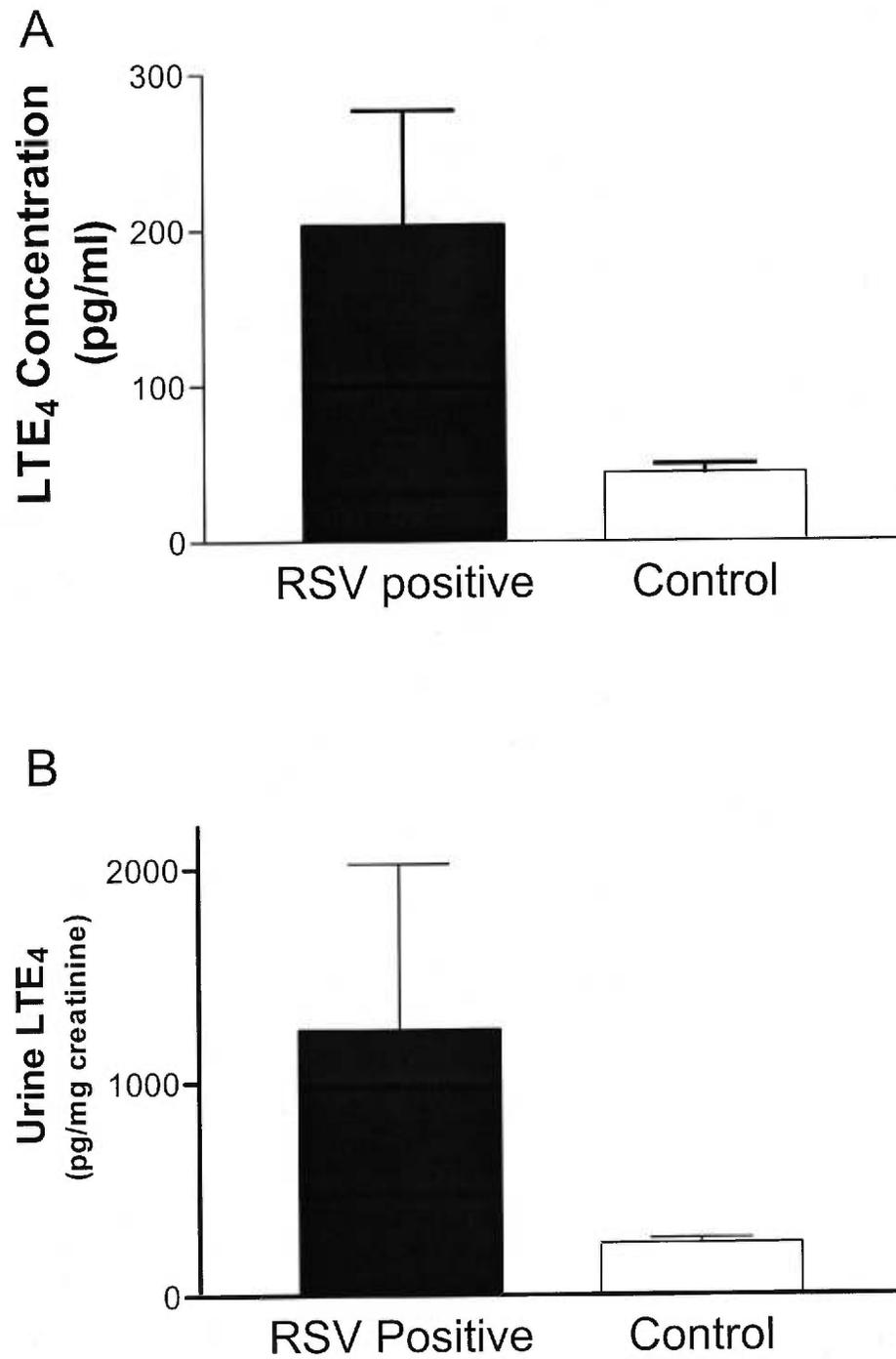
p<0.01 for statistical significance.

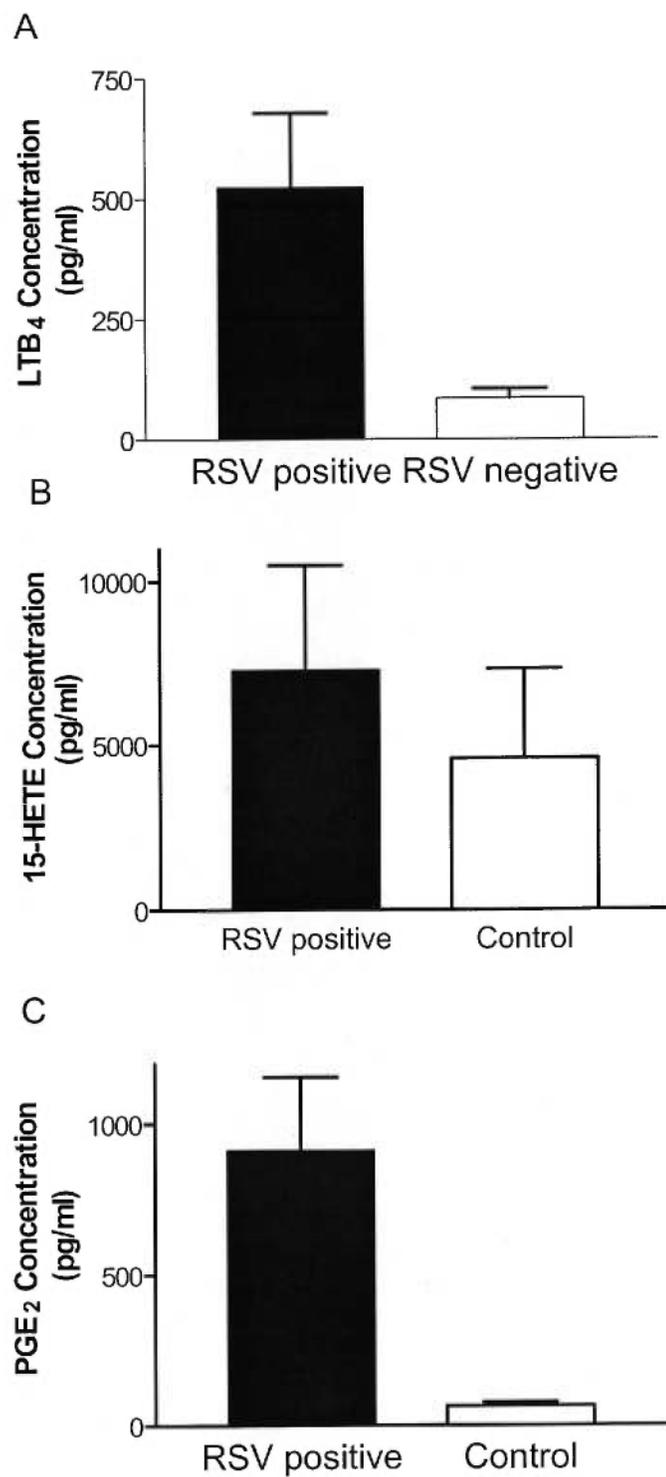
RDAI = Respiratory Distress Assessment Instrument<sup>12</sup>

PRISM score = Pediatric Risk of Mortality Score II<sup>26</sup>

RDAI Score and PRISM score were not applicable to healthy infants of the control group.

Figure 1 Quantification of LTE<sub>4</sub> in Endotracheal Aspirates and Urine



**Figure 2 LTB<sub>4</sub>, 15-HETE and PGE<sub>2</sub> in Endotracheal Aspirates**

## LEGENDS FOR FIGURES

**Figure 1. A. LTE<sub>4</sub> Quantification in Endotracheal Aspirates:** Histograms comparing the quantification of LTE<sub>4</sub> in the ET aspirates from the RSV bronchiolitis group compared to the control group ( $202.9 \pm 277.2$  pg/ml versus  $43.9 \pm 19.9$  pg/ml, respectively;  $n=14$ , mean  $\pm$  SEM,  $p<0.01$ ). **B. LTE<sub>4</sub> Quantification in Urine.** Histograms comparing the quantification of LTE<sub>4</sub> in the urine from the RSV bronchiolitis group compared to the control group ( $1242.7 \pm 779.4$  pg/mg creatinine versus  $242.1 \pm 22.6$  pg/mg creatinine, respectively;  $n=14$ , mean  $\pm$  SEM,  $p<0.001$ ).

**Figure 2. A. LTB<sub>4</sub> Quantification in Endotracheal Aspirates.** Histograms comparing the quantification of LTB<sub>4</sub> in ET aspirates from the RSV bronchiolitis group compared to the control group ( $524.40 \pm 577.1$  pg/ml versus  $85.93 \pm 72.31$  pg/ml, respectively; mean  $\pm$  SEM,  $n=14$ ,  $p<0.001$ ). **B. 15-HETE Concentration in Endotracheal Aspirates.** Histograms comparing the quantification of 15-HETE in the ET aspirates from the RSV bronchiolitis group compared to the control group ( $7262 \pm 11622$  pg/ml versus  $4591 \pm 9829$  pg/ml, respectively;  $n=14$ , mean  $\pm$  SEM). The difference was not statistically significant ( $p=0.1$ ). **C. PGE<sub>2</sub> Quantification in Endotracheal Aspirates.** Histograms comparing the quantification of PGE<sub>2</sub> in the ET aspirates from the RSV bronchiolitis group compared to the control group

(910.6  $\pm$  879.0 pg/ml versus 64.2  $\pm$  46.9 pg/ml, respectively; n=14, mean  $\pm$  SEM, p<0.001).

## DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS

Avant de commenter les résultats, il convient de faire quelques remarques sur la méthodologie utilisée.

À ce jour, il n'existait pas de données sur les concentrations de leucotriènes (LT) dans les poumons des enfants, infectés ou non.

Les connaissances du métabolisme des leucotriènes, des taux mesurés chez l'adulte et des taux mesurés dans les urines de même que la méthode de quantification utilisée, ont servi de base et d'outils pour réaliser une étude descriptive. Les deux études pédiatriques<sup>18,19</sup> qui ont quantifié les taux de LT à partir de prélèvements du naso-pharynx nous ont permis également de préciser le devis de notre méthodologie: nous avons établi qu'une différence de 50% entre les taux attendus dans la population d'enfants malades (par rapport aux enfants non infectés) serait significativement significative. Sur base des valeurs mentionnées dans ces articles la taille de l'échantillon a pu être précisée: un minimum de dix enfants par groupe étaient requis pour

entreprendre l'analyse des données et montrer une éventuelle différence.

14 nourrissons ont été inclus dans chaque groupe.

Le groupe des témoins a été enrôlé après que la population des cas a été enrôlée et que les échantillons ont été prélevés. Cela a permis d'apparier les populations et éviter les biais de sélection.

Le tableau 1 reprend ces données: le groupe infecté (cas) est un peu plus âgé que les témoins mais il n'y pas de différence entre les groupes pour le poids et le sexe. Il est peu probable que la différence d'âge entre nos groupe contribué aux différences des dosages des eicosanoids puisque dans notre groupe contrôle il n' avait pas de relation entre le dosage des eicosanoids et l' âge des patients.

Les nourrissons infectés par le VRS (cas) étaient en détresse respiratoire sévère et ont dû être intubés et placés sous assistance respiratoire. Même si tous les nourrissons qui développent une bronchiolite à VRS ne doivent pas recevoir ce traitement, par ce choix de population, nous avons voulu éviter la contamination des

échantillons prélevés directement à partir des sécrétions endotrachéales.

Par ailleurs, les aspirations endotrachéales font partie des soins de routine dans la prise en charge des enfants en assistance ventilatoire en unité de soins intensifs. Notre étude n'a apporté aucune contrainte ni morbidité aux soins normalement prodigués à ces enfants. Cette méthode pourrait se révéler utile à l'avenir pour réaliser un suivi de l'inflammation du poumon chez de tels patients.

Nous avons démontré dans la présente étude que les taux de  $\text{LTE}_4$ ,  $\text{LTB}_4$  et  $\text{PGE}_2$  sont significativement augmentés chez les patients atteints de bronchiolite à VRS (comparés à des nourrissons non infectés). Les taux de 15-HETE sont élevés dans les aspirations endotrachéales des cas par rapport aux témoins sans que la différence soit statistiquement significative. Du fait que l'on ne dispose d'aucune autre donnée pour interpréter ce résultat, l'hypothèse que l'on peut émettre est que l'activation de cette voie métabolique serait telle que 15-HETE disparaîtrait rapidement au niveau du poumon pour permettre la formation des dérivés actifs.

La corrélation de Pearson révèle que la quantification des LTE<sub>4</sub> pratiquée dans les aspirations ne diffère pas de celles obtenus dans les urines ( $r=0.46$  courbe de régression linéaire). Une attention particulière a été portée pour que les échantillons des aspirations des poumons ne soient prélevés que lorsque les urines étaient obtenues (autorisant cette étude de corrélation). Le poumon apparaît donc un site reflétant de façon fiable la production de LT.

**Conclusions:**

Nous avons ainsi démontré pour la première fois à notre connaissance que les LT sont augmentés dans les aspirations endotrachéales des nourrissons atteints de bronchiolite sévère à VRS.

Depuis plus de trente ans, le traitement de la bronchiolite à VRS demeure symptomatique. Nos résultats devraient ouvrir la voie à une compréhension nouvelle de cette maladie. Ils autorisent l'élaboration d'essais cliniques sur l'évaluation des anti-leucotriènes dans le traitement de la bronchiolite à VRS.

**SOURCES DOCUMENTAIRES**

<sup>1</sup>[Hall CB. Respiratory syncytial virus in Feigin RD, Cherry JD, editors. Textbook of Pediatric Infectious diseases. 4<sup>th</sup> Edition. Philadelphia:WB Saunders;1997:2084-2111].

<sup>2</sup>[Hall CB. Respiratory syncytial virus:A continuing culprit and conundrum. J Pediatr 1999;135:S2-S7].

<sup>3</sup>[Everard ML. Bronchiolitis: Origins and Optimal Management. Drugs 1995; 49(6):885-896].

<sup>4</sup>[Wang EEL et al. PICNIC study of admission and management variation in patients hospitalized with respiratory syncytial viral lower respiratory tract infection. J Pediatr 1996;129:390-395].

<sup>5</sup>[Glezen WP and Denny FW. Epidemiology of acute lower respiratory disease in children N Engl J Med 1973;288:498-505].

<sup>6</sup>[Ruuskanen O and Ogra PL. Respiratory syncytial virus. Cur Prob Pediatr 1993;23:50-79].

<sup>7</sup>[Meissner HC. Economic Impact of viral respiratory disease in children. *J Pediatr* 1994;124:S17-S21].

<sup>8</sup>[Everard ML. Acute bronchiolitis: a perennial problem. *Lancet* 1996;348:279-280].

<sup>9</sup>[Adcock PM, Sanders CL and Marshall GS. Standardizing the care of bronchiolitis. *Arch Pediatr Adol Med* 1998;152:739-744].

<sup>10</sup>[Kellner JD, Ohlsson A, Gadomski A and Wang EEL. Effect of bronchodilator therapy in bronchiolitis: a meta-analysis *Arch Pediatr Adol Med* 1996;150:1166-1172].

<sup>11</sup>[van Schaik SM, Welliver RC and Kimpen JLL. Novel pathways in the Pathogenesis of Respiratory Syncytial Virus Disease. *Pediatr Pulmonology* 2000;30(2):131-138].

<sup>12</sup>[Lowell DI, Lister G, Von Koss H. and Mc Carthy P. Wheezing in infants:the response to Epinephrine. *Pediatr*

1987;79(6):939-945].

<sup>13</sup>[Samuelsson B, Hammarstrom S, Murphy RC and Borgeat P. Leukotrienes and Slow Reacting Substance of Anaphylaxis (SRS-A) Allergy 1980;35:375-381].

<sup>14</sup>[Mayatepek E. and Hoffmann GF. Leukotrienes: Biosynthesis, Metabolism and Pathophysiologic significance. *Pediatr Res* 1995;37(1):1-9].

<sup>15</sup>[Busse W. The role and contribution of Leukotrienes in asthma. *Annals Allergy, Asthma, & Immunology* 1998;81:17-26;quiz 26-9].

<sup>16</sup>[Drazen JM., Israel E. and O'Byrne P. Treatment of Asthma with Drugs Modifying the Leukotriene Pathway. *N Engl J Med* 1999;340(3):197-206].

<sup>17</sup>[Dahlen S-E., Hedqvist P., Hammarström S. and Samuelsson B. Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi. *Nature* 1980;288:484-486].

<sup>18</sup>[Volovitz B. Welliver RC., De Castro G., Krystofik DA., and Ogra PL. The release of Leukotrienes in the respiratory tract during infection with respiratory syncytial virus: role in obstructive airway disease. *Pediatr Res* 1988;24:504-507].

<sup>19</sup>[Cook A., Sampson A., Green C., Spencer D., Piper P., and Price J. Leukotrienes in Infants with Acute Viral Bronchiolitis. *Brit J Clin Pharm* 1992;34:155p].

<sup>20</sup>[van Schaik SM, et al. Increased production of Interferon- $\gamma$  and cysteinyl Leukotrienes in Virus-induced wheezing. *J All Clin Immun* 1999;103:630-636].

<sup>21</sup>[Behera AK et al. Respiratory Syncytial Virus Induces the Expression of 5-Lipoxygenase and Endothelin-1 in Bronchial Epithelial Cells. *Bioch Biophys Res Comm* 1998;251:704-709].

<sup>22</sup>[Langley JM., LeBlanc JC., Wang EEL., Law BJ., MacDonald NE., Mitchell I. Stephens D., McDonald J., Boucher FD., and

Dobson S. Nosocomial respiratory syncytial virus infection in Canadian pediatric hospitals: a Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada Study. *Pediatr* 1997;100:943-6].

<sup>23</sup>[Pollack MM, Ruttimann UE and Getson PR. Pediatric Risk of Mortality (PRISM) score. *Crit Care Med* 1988;16:1110-116].

<sup>24</sup>[Westcott JY. The Measurement of Leukotrienes in Human Fluids. *Clin Rev Allergy Immun* 1999;17:153-177].

<sup>25</sup>[Lewis RA., Austen F. and Soberman RJ. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. *N Engl J Med* 1990;323:645-655].

<sup>26</sup>[Wenzel SE. New approaches to anti-inflammatory therapy for asthma. *Am J Med* 1998;104:287-300].

<sup>27</sup>[Wang JH, Trigg CJ, Devalia JL, Jordan S, and Davies RJ. Effect of inhaled beclomethasone dipropionate on expression of proinflammatory cytokines and activated eosinophils in the

bronchial epithelium of patients with mild asthma. *J All Clin Immunol* 1994;94(6 Pt1):1025-1034.

<sup>28</sup>[Laitinen LA., Laitinen A., Haahtela T., Vilkkka V., Spur BW. and Lee Th. Leukotriene E<sub>4</sub> and granulocytic infiltration into asthmatic airways. *Lancet* 1993;341:989-990].

<sup>29</sup>[Wenzel SE., Trudeau J., Kaminsky D., Cohn J., Martin R. and Westcott JY. Effect of 5-Lipoxygenase inhibition on bronchoconstriction and airway inflammation in nocturnal asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:897-905].

<sup>30</sup>[Welliver RC., Wong DT., Sun M., Middleton E Jr., Vaughan RS. and Ogra PL. The development of respiratory syncytial virus-specific IgE and the release of histamine in nasopharyngeal secretions after infection. *N Engl J Med* 1981;305:841-846].

<sup>31</sup>[Garafalo R., Kimpen JLL., Welliver RC. and Ogra PL. Eosinophil degranulation in the respiratory tract during naturally acquired respiratory syncytial virus infection. *J Pediatr* 1992;120:28-32].

<sup>32</sup>[Welliver RC. Therapy for bronchiolitis: help wanted [editorial; comment]. *J Pediatr* 1997;130:170-172].

<sup>33</sup>[Welliver RC. Respiratory syncytial virus immunoglobulin and monoclonal antibodies in the prevention and treatment of respiratory syncytial virus infection. *Sem in Perinat* 1998;22:87-95].

<sup>34</sup>[DeVincenzo J. Prevention and treatment of respiratory syncytial virus infections (for advances in pediatric infectious diseases). *Adv Pediatr Inf Dis* 1997;13,1-47].

<sup>35</sup>[Dobyns EL., Westcott JY., Kennaugh JM. Ross MN. and Stenmark KR. Eicosanoids decrease with successful extracorporeal membrane oxygenation therapy in neonatal pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:873-880].

<sup>36</sup>[Welliver RC, Kaul TN, and Ogra PL. The appearance of cell-bound IgE in respiratory-tract epithelium after respiratory-syncytial-virus infection. *N Engl J Med*;1980;303(21):202-206.

<sup>37</sup>[Gern JE and Busse WW. The role of viral infections in the natural history of asthma. *J All Clin Immun* 2000;106(2):201-212].

<sup>38</sup>[Strannegard O, Cello J, Bjarnason R, Sigurbergsson F and Sigurs N. Association between pronounced IgA response in RSV bronchiolitis and development of allergic sensitization. *Pediatr All Immun* 1997;8:1-6].

<sup>39</sup>[Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B, and Bjorksten B. Asthma and immunoglobulin E antibodies after respiratory syncytial virus bronchiolitis: a prospective cohort study with matched controls. *Pediatrics* 1995;95(4): 500-505].

<sup>40</sup>[Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, and Kjellman B. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important

risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(5):1501-1507].

<sup>41</sup>[Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, Holberg CJ, Halonen M, Taussig LM, Wright AL, and Martinez FD. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years [see comments] *Lancet* 1999;354(9178):541-545].

<sup>42</sup>[Einarsson O, Geba GP, Zhu Z, Landry M, and Elias JA. Interleukin-11: stimulation in vivo and in vitro by respiratory viruses and induction of airways hyperresponsiveness. *J Clin Invest* 1996;97(4):915-924].

<sup>43</sup>[Noma T, Mori A, and Yoshizawa I. Induction of Allergen-specific IL-2 responsiveness of lymphocytes after respiratory syncytial virus infection and prediction of onset of recurrent wheezing and bronchial asthma. *J All Clin Immun* 1996;98(4):816-826].

<sup>44</sup>[Martinez FD, Stern DA, Wright AL, Taussig LM and Halonen M. Differential immune responses to acute lower respiratory tract

illness in early life and subsequent development of persistent wheezing and asthma. *J All Clin Immun* 1998;102(6 Pt 1):915-920].

<sup>45</sup>[Kuehl FA, De Haven RN, Pong SS. Lung Tissue receptors for sulfopeptides leukotrienes. *J All Clin Imm* 1984;74:378-381].

<sup>46</sup>[Welliver RC, Kaul Tn, Sun M, Ogra PL. Defective regulation of immune response in respiratory syncytial virus infection. *J Imm* 1984;133 :1925-1930].

<sup>47</sup>[Dobson J.V et al. The Use of Albuterol in Hospitalized Infants with bronchiolitis. *Pediatrics* 1998;101(3):361-368].

<sup>48</sup>[Law B.J, De Carvalho V, PicNic 1993 Respiratory Syncytial Virus infections in hospitalized Canadian children :regional differences in patient populations and management practices. *Pediatr Inf Dis J* 1993;12 :659-663].

<sup>49</sup>[Rodriguez WJ. Management strategies for respiratory syncytial virus infections in infants. *J Pediatr* 1999;135 :S45-S50].

<sup>50</sup>[Roosevelt G, Sheehan K, Grupp-Phelan J, Tanz RR and Listernick R. Dexamethasone in bronchiolitis : a randomised controlled trial. *Lancet* 1996;348:292-295].

<sup>51</sup>[Guerguerian A-M, Gauthier M, Lebel M.H, Farrell C.A and Lacroix J. Ribavirin in Ventilated Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis. *Am J Resp Crit Care Med* 1999;160:829-834].

<sup>52</sup>[Manning PJ., Watson RM, Margolskee DJ, et al. Inhibition of exercise-induced bronchoconstriction by MK-571, a potent leukotriene D<sub>4</sub> – receptor antagonist. *N Engl J Med* 1990; 323: 1736].

<sup>53</sup>[Gaddy JN, Margoleskee DJ, Bush RK, et al.: Bronchodilatation with a potent and selective leukotriene D<sub>4</sub> receptor antagonist (MK-571) in patients with asthma. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 358-363].

<sup>54</sup>[Spector SL, Smith LJ, Glass M, et al. Effects of 6 weeks of therapy with oral doses of ICI 204-219, a leukotriene D<sub>4</sub> receptor antagonist, in subjects with bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150 :618-623].

<sup>55</sup>[Taylor IK, O'Saughnessy KM, Fuller RW, et al. : Effect of cysteinyl-leukotriene receptor antagonist ICI 204-219 on allergen induced bronchoconstriction and airway hyperreactivity in atopic subjects. *Lancet*; 1991; 337:690- 694].

<sup>56</sup>[Israel E, Dermakarian R, Rosemberg M, et al. The effects of a 5-Lipoxygenase inhibitor on asthma induced by cold, dry air. *N Engl J Med* 1990;323:1740-1744].

<sup>57</sup>[Kemp JP, Dockhorn RJ, Shapiro GG, et al. Montelukast once daily inhibits exercise induced bronchoconstriction in 6-to 14-year-old children with asthma. *J Pediatr* 1998;133:424-428].

<sup>58</sup>[Knorr B, Matz J, Bernstein JA, et al. Montelukast for chronic asthma in 6-to 14-year-old children with asthma. *JAMA* 1998;279:1181-1186].

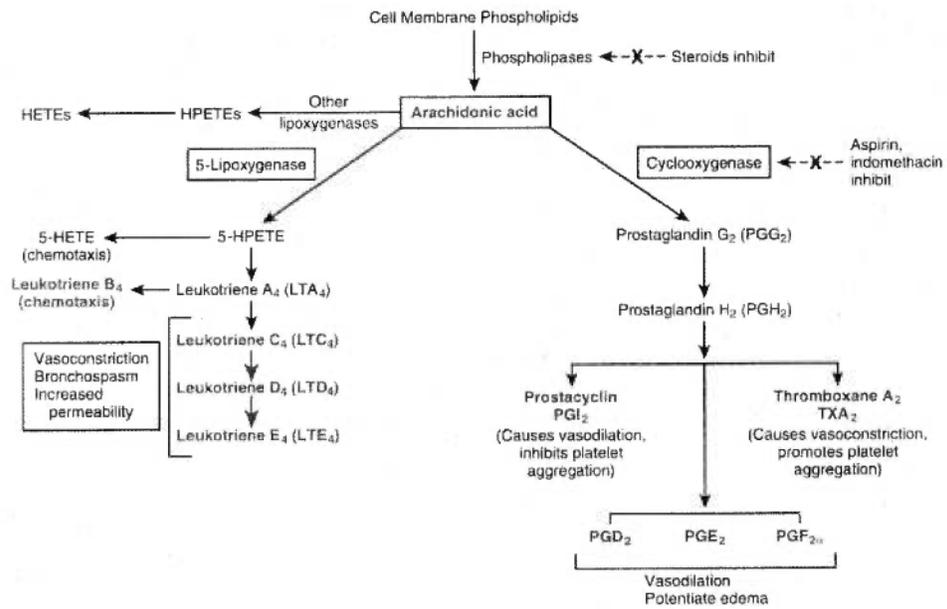
<sup>59</sup>[Cotran R. in Pathologic Basis of Disease, Sixth Edition  
1998:70-71].

## ANNEXES

<b>Annexe</b>	<b>Page</b>
<b>ANNEXE I</b> <b>Voie Métabolique des leucotriènes formés au départ de l'acide Arachidonique</b>	79
<b>ANNEXE II</b> <b>Score de PRISM II</b>	80- 81
<b>ANNEXE III</b> <b>Score RDAI</b>	82-83
<b>ANNEXE IV</b> <b>Livret d'observation des patients</b>	84-86
<b>ANNEXE V</b> <b>Comité d'Éthique</b>	87
<b>ANNEXE VI</b> <b>Lettre de participation</b>	88-90
<b>ANNEXE VII</b> <b>Congrès SRLF</b>	91

## ANNEXE I

## Voie Métabolique des Leukotrienes.



## ANNEXE II

Le score de PRISM<sup>23</sup> est basé sur le relevé de 14 paramètres cliniques et biologiques mesurés de façon standard dans une unité de soins intensifs. Allant de 0 à 49 pour les plus malades, ce score couvre les différents systèmes de l'organisme qui peuvent défaillir et rend ainsi compte de la sévérité ainsi que du risque de mortalité de l'enfant après 24 heures d'admission aux soins intensifs (courbe ROC=93%).

L'échelle clinimétrique du score de PRISM est reprise sur la page suivante avec les points attribués pour chaque paramètre.

Le score de PRISM est formé par la somme des points décernés. La note maximale qui puisse être relevée est de 49 et correspond à un état de sévérité extrême. Si un paramètre n'a pas été noté ou mesuré, il est conventionnellement convenu que ce paramètre ne devait pas être utile ou altéré pour le patient considéré et donc 0 point est attribué pour ce paramètre.

**PRISM score (from Pollack et al. [Pollack, 1988  
#72])**

<i>Variable 1</i>	< 1 yr	> 1 yr	Points	Day	D1	D2	D3	D4	D5	D6
Respiratory rate/min	0 (apnea)	0 (apnea)	5							
	61-90	51-70	1							
	> 90	> 70	5							
Cardiac rate /min	> 160	> 150	4							
	< 90	< 80	4							
Systolic BP (mm Hg)	> 160	> 200	6							
	130-160	150-200	2							
	55-65	65-75	2							
	40-54	50-64	6							
	< 40	< 50	7							
Diastolic BP (mm Hg)		> 110	6							
Glasgow coma score*		< 8	6							
Pupillary reaction		Unequal or dilated	4							
		fixed and dilated	10							
PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> ratio **		200-300	2							
		< 200	3							
PaCO <sub>2</sub> (torr)***		51-65	1							
		> 65	5							
Bicarbonates: mmol/L		< 16	3							
		> 32	3							
PT/PTT		1.5 x contrôle	2							
Potassium: mmol/L = mEq/l		< 3.0	5							
		3.0-3.5	1							
		6.5-7.5	1							
		> 7.5	5							
Total calcium: mmol/L (mg/dL)		< 1.75 (7.0)	6							
		1.75-2 (7.0-8.0)	2							
		3-3.75 (12.0-15.0)	2							
		> 3.75 (15.0)	6							
Glucose: mmol/L (mg/dL)		< 2.22 (40)	8							
		2.22-3.33 (40-60)	4							
		13.88-22.22 (250-400)	4							
		> 22.22 (400)	8							
Bilirubine totale: mmol/L (mg/dL)		> 50 (3.5)	6							
<b>PRISM score</b>			<b>TOTA</b>							

<sup>1</sup> \* Do not consider Glasgow coma score if patient is under sedation, anesthesia or paralyzing agent.

\*\* Do not consider PaO<sub>2</sub> if there is an intracardiac shunt or if there was a chronic respiratory insufficiency. Consider only arterial PO<sub>2</sub>.

\*\*\* PaCO<sub>2</sub> can be measured on a capillary blood sample.

### ANNEXE III

Le score RDAI ( Respiratory Distress Assessment Instrument) a été établi par Lowell et al.<sup>12</sup> pour évaluer la sévérité clinique de l'état respiratoire des enfants. Fait de deux paramètres (rétractions liées à la détresse respiratoire et wheezing), noté sur 9 points et 8 points respectivement, il est facilement utilisable au chevet du malade. Le score est une note sur 17, résultat de la somme des 2 paramètres notés. Il présente une bonne concordance inter-observateur (kappa de 0.9 à 0.64) et est reproductible (au cours de sa validation il n'y a pas eu de différence de plus de un point entre les scores attribués pour un même patient).

La page suivante reprend la description du score RDAI et sa notation par paramètre (Annexe III page 2).

TABLE 1. Wheezing and Retraction Scales of the Respiratory Distress Assessment Instrument\*

	Points					Maximum Points
	0	1	2	3	4	
Wheezing						
Expiration	None	End	½	¾	All	4
Inspiration	None	Part	All			2
Location	None	Segmental: ≤2 of 4 lung fields	Diffuse: ≥3 of 4 lung fields			2
Retractions						
Supraclavicular	None	Mild	Moderate	Marked		3
Intercostal	None	Mild	Moderate	Marked		3
Subcostal	None	Mild	Moderate	Marked		3

\* Within each variable the subscores are summed to give a total score. The maximum total points for wheezing is 8 and for retractions is 9.

## ANNEXE IV

## LIVRET D'OBSERVATION DES PATIENTS

Protocole clinique: Leucotriènes dans la bronchiolitesévère.

a) Identité: - Nom et prénom:

b) Dossier numéro:

c) Date de Naissance:

d) Date d'admission (Soins intensifs):

e) Diagnostic à l'admission:

-Traitement avant l'admission

- 

	<b>Oui</b>	<b>Non</b>
--	------------	------------

f) Antécédents personnels:

-prématurité

-ventilation artificielle néonatale

-oxygénodépendance/BPD

-séquelles (anoxie, RGO, autres)

-traitement chronique (nature, dose, durée)

Si oui préciser

g) Pathologie anténatale

h) Malformation congénitale

i) Histoire familiale:

-atopie (si oui préciser)

-asthme

- tabagisme

- animaux domestiques (lesquels)

- prise de médicaments (si oui lesquels)

- allaitement maternel

Examen à l'admission:

- Date et heure

- rythme respiratoire (/min.):

- rythme cardiaque (/min.):

- température (°c):

- tension artérielle (mmHg):

- Astrup: pH ... pO2 ... pCO2... B.E. ...

- Saturation:

- Wheezing ...

- Radiographie du thorax: (commentaires: foyer, comblement,...)

- Traitement initial:

S'ASSURER DE L'

- j) absence de stéroïdes
- k) absence d'aspirine
- l) absence de  $\beta$ -mimétique (s)
- m) absence d' $\alpha$ -adrénergiques

Score de PRISM - Annexe II

Score RDAI - Annexe III

## Annexe V

Le 22 novembre 1999

Comité d'Éthique

Dr Baruch Toledano  
Pédiatrie  
7e bloc 9

OBJET: Titre du projet: LEUKOTRIENES IN SEVERE BRONCHIOLITIS: A DESCRIPTIVE PROSPECTIVE STUDY.

Responsables du projet: Baruch Toledano M.D., et Yves Szajer, MD, fellow en recherche. Collaborateurs internes: Claude Mercier, MD et Salam Yazbeck, MD; collaborateurs externes: Bruce Mzaer et Sally Wenzel.

Cher Docteur,

Suite à la réception de la dernière version de votre formulaire de consentement, votre projet cité en rubrique a été approuvé par le Comité d'éthique à la recherche.

Veuillez trouver ci-joint, avec la lettre d'approbation officielle du Comité, votre formulaire de consentement portant le tampon d'approbation du Comité. Nous vous prions de vous servir d'une copie de cette version pour distribution.

Notez qu'il est de votre responsabilité d'aviser le Comité d'éthique de toute modification au protocole ou de tout effet secondaire.

Votre projet a été envoyé au directeur du Centre pour approbation finale.

Nous vous souhaitons bonne chance dans la réalisation de votre projet et vous prions de recevoir nos meilleures salutations.

Le Président du Comité d'éthique à la recherche,

  
Philippe Chessex, M.D.



## Formulaire de consentement

**Titre du projet : Étude pour évaluer et mesurer la concentration des leucotriènes dans le liquide d'aspiration bronchique de nourrissons atteints de bronchiolite.**

**Noms des chercheurs :** Dr B. Tolédano, Dr Y. Sznajer

### Description de la recherche

JUSTINE  
italier  
sière-enfant

La bronchiolite est une infection hautement contagieuse de l'arbre respiratoire inférieur qui atteint les nourrissons (enfants de 2 ans et moins). La bronchiolite survient durant les mois d'hiver.

Montréal

En Amérique du Nord, l'incidence annuelle des infections du tractus respiratoire inférieur est de 240 épisodes/1000 nourrissons. La bronchiolite peut-être causée par plusieurs virus mais le Virus Respiratoire Syncytial est l'agent causal classique de la maladie. De 11 à 17% des nourrissons atteints de bronchiolite ont été hospitalisés en 1995 aux États-Unis.

Les leucotriènes sont des éléments produits par certaines cellules de défense de l'organisme lors d'une inflammation et provoquent des manifestations connues comme notamment l'obstruction respiratoire par l'augmentation des sécrétions des bronches et un gonflement des tissus à l'endroit de l'inflammation. Chez l'homme adulte, il est clairement démontré que les leucotriènes jouent un rôle déterminant dans le tableau clinique de l'asthme.

Le mécanisme de la bronchiolite du nourrisson présente des similitudes avec celui de l'asthme.

À l'heure actuelle la relation entre les leucotriènes et la bronchiolite n'a pas été démontrée de façon satisfaisante. Notre projet de recherche a pour but d'évaluer et de mesurer la concentration des leucotriènes dans le liquide d'aspiration bronchique de nourrissons atteints de bronchiolite.

### Procédures du projet

Les soins habituels qui seront prodigués à votre enfant comprennent déjà le prélèvement d'échantillons du liquide d'aspiration bronchique et d'urine. Ces mêmes échantillons serviront pour les analyses du projet de recherche.

Pour les fins de la recherche, votre enfant ne subira aucune intervention additionnelle.

### Inconvénients et risques.

Puisque le projet ne nécessite aucune intervention additionnelle, votre enfant ne sera soumis à aucun inconvénient ou risque supplémentaire.



### **Avantages et bénéfices**

Il n' y aura aucun bénéfice direct pour votre enfant dans la mesure où les résultats seront obtenus tardivement et que le personnel soignant ne sera pas impliqué dans la démarche du présent projet de recherche.

Les résultats de la recherche nous permettront peut-être de déterminer un meilleur traitement qui pourra dans le futur profiter aux enfants atteints de bronchiolite.

### **Confidentialité**

Tous les renseignements obtenus sur votre enfant dans le cadre de ce projet de recherche seront traités de façon confidentielle.

Les résultats de cette recherche pourront servir à des fins de publication scientifique sans toutefois que l' identité de votre enfant ne soit révélée.

### **Responsabilité**

En signant le présent formulaire, vous conservez le droit de faire valoir, le cas échéant, tous vos recours légaux advenant une complication liée au projet de recherche qui vous causerait préjudice.

### **Participation**

La Participation de votre enfant à ce projet de recherche est tout à fait volontaire. Vous êtes libre d' accepter ou de refuser que votre enfant y participe ou d' interrompre à tout moment sa participation sans que cela nuise aux relations avec le médecin de votre enfant et les autres intervenants ou au déroulement des soins normalement fournis à votre enfant.

### **Personnes- Ressources**

Vous pouvez en tout temps contacter le Docteur Baruch TOLEDANO au numéro (514) 345-4931 poste 3260 ou le Docteur Yves SZNAJER au numéro (514) 345-4931 ext. 6354 .

Pour des commentaires ou des plaintes à formuler au sujet du projet de recherche, vous pouvez contacter l' ombudsman de l'hôpital au numéro (514) 345-4931.



**Signatures**

Un des membres de l' équipe de recherche m' a expliqué la nature, le déroulement du projet de recherche ainsi que la façon dont mon enfant y participera. J' ai pris connaissance du formulaire de consentement et on m'en a remis un exemplaire. J' ai eu l' occasion de poser des questions auxquelles on a pris soin de répondre. Après réflexion, j' accepte que mon enfant participe à ce projet de recherche.

Nom et prénom de l' enfant en lettres capitales : -----

Nom du titulaire de l'autorité parentale \_\_\_\_\_

Signature \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_

Nom du Témoin \_\_\_\_\_ Signature \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_

**Engagement du chercheur**

Le projet de recherche a été expliqué au signataire. Un membre de l' équipe de recherche a répondu à ses questions et lui a rappelé qu' il était libre de retirer l' enfant du projet de recherche sans qu' il soit porté atteinte à la qualité des services de santé qu' il reçoit.

Nom du chercheur \_\_\_\_\_ Signature \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_

## Annexe VII

XXIX<sup>e</sup> Congrès de la SRLF, 16–19 janvier 2001

SP242

IMPLICATION DES LEUCOTRIÈNES (LT) DANS LA BRONCHIOLITE SÉVÈRE DU NOURRISSON: UNE ÉTUDE CAS-TÉMOIN. Y. Sznajder, J.Y Westcott, S.E Wenzel, B. Mazer et B.J Tolédano Service des Soins Intensifs Pédiatriques, Hôpital Sainte-Justine, Montréal, Canada.

**Introduction:** L'incidence annuelle du virus respiratoire syncytial (VRS) est de 240/1000 nourrissons. Les LT, médiateurs dérivés de l'acide arachidonique, sont impliqués dans les symptômes de l'asthme. Le tableau clinique de la bronchiolite est similaire à celui de l'asthme. Il n'existe pas d'étude contrôlée quantifiant le taux de LT dans la bronchiolite à VRS.

**Hypothèse:** Nous postulons que les LT sont impliqués dans la physiopathologie de la bronchiolite. **Objectifs:** Quantification et comparaison des taux de LT chez des nourrissons ventilés pour bronchiolite sévère à VRS (cas) et chez des nourrissons non infectés intubés pour intervention programmée (témoin).

**Méthodes:** Les patients des deux groupes, appariés pour le poids et le sexe, étaient âgés de moins de deux ans. A été exclus tout nourrisson atteint de maladie pulmonaire chronique, rénale et/ou hépatique; de déficit immunitaire; traité avec des corticoïdes et/ou des inhibiteurs des prostaglandines. La quantification des LTE<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>, 15-HETE a été effectuée sur des aspirations endotrachéales à l'intubation chez les témoins et prélevées < 24 heures de ventilation mécanique chez les cas<sup>1</sup>. Le Comité d'Éthique de l'Hôpital Sainte-Justine a approuvé le projet de recherche.

**Résultats:** 14 nourrissons ont été enrôlés dans chaque groupe. Le taux de LT E<sub>4</sub>, B<sub>4</sub> et PGE<sub>2</sub> sont significativement augmentés dans les aspirations endotrachéales des cas par rapport aux témoins (Moyenne ± Déviation Standard en pg/ml: 232.9±277.2 vs 43.93±19.9; 524.4±577.1 vs 85.93±72.31; 7262 ±11622 vs 4591±9829, respectivement). Les niveaux de 15-HETE ne sont pas significativement différents.

**Conclusion:** Une augmentation des LT produits par les poumons des patients avec VRS comparés aux témoins suggère que les LT sont impliqués dans la physiopathologie de la bronchiolite sévère à VRS. Un essai clinique avec les anti-LT devrait être entrepris.

<sup>1</sup>Westcott J.Y The Measurement of Leukotrienes in Human Fluids. Clin Rev All Immun 1999;17:153-177.

## REMERCIEMENTS

Ce projet n'aurait pu aboutir sans le travail de toute une équipe :

Le protocole de recherche s'est déroulé au sein de l'unité des soins intensifs de l'Hôpital Sainte-Justine dont l'équipe a établi, réalisé, débattu les différents aspects méthodologiques du projet. Projet qui avant de pouvoir être appliqué avait été soumis et a obtenu l'approbation du Comité Scientifique et du Comité d'Éthique de l'Hôpital Sainte-Justine.

Le docteur S.E Wenzel a financé la réalisation des quantifications.

Le docteur J.Y Westcott et ses assistants ont réalisé les quantifications au laboratoire. Sans leur expertise, sans doute que ce travail n'aurait été aussi rigoureusement accompli.

Tout ceci n'aurait été possible en fin sans l'aide des Docteurs Jacques Lacroix et Baruch Toledano.

Le Docteur Jacques Lacroix, dont la réputation dépasse largement et justement les frontières du continent nord-américain, a la faculté d'éveiller la curiosité scientifique, de stimuler la recherche chez

les jeunes médecins qu'il accueille et de les encadrer de son expérience, de ses compétences et de sa patience. Qu'il trouve ici un modeste témoignage d'une gratitude infinie.

Le docteur Baruch Toledano a été le co-directeur indispensable et idéal. Discret mais attentif, stimulant et soucieux, assurant autonomie et liberté à bon escient, possédant les connaissances fondamentales de façon très sûre, il aura été un guide tout au long de ces deux années de travaux non forcés.

La fondation scientifique belge A. Loicq aura contribué de façon substantielle au soutien de ce projet. Définie pour promouvoir la recherche en médecine d'urgence et en soins intensifs, elle a élu le présent projet comme lauréat pour l'année 1999.

Un dernier remerciement va directement aux parents qui ont accepté que leur enfant participe à cette étude.