



HAL
open science

Nouvelles stratégies de prise en charge de l'hypertension pulmonaire périnatale

Estelle Aubry

► **To cite this version:**

Estelle Aubry. Nouvelles stratégies de prise en charge de l'hypertension pulmonaire périnatale. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2012. Français. NNT : 2012LIL2S011 . tel-00762661

HAL Id: tel-00762661

<https://theses.hal.science/tel-00762661>

Submitted on 7 Dec 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE D'UNIVERSITE
UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE DE LILLE II

NOUVELLES STRATEGIES
DE PRISE EN CHARGE
DANS
L'HYPERTENSION PULMONAIRE
PERINATALE

Estelle AUBRY
Praticien Hospitalier
Faculté de médecine de Lille 2
CHRU de Lille

Soutenue le 03 juillet 2012

M. Le Professeur Yves Aigrain (Paris 5)

M. Le Professeur François Becmeur (Strasbourg)

M. Le Professeur Emmanuel Sapin (Dijon)

M. Le Professeur Pierre Tourneux (Amiens)

M. Le Professeur Laurent Storme (Lille II)

M. Le Professeur Rémi Besson (Lille II)

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur

REMERCIEMENTS

A notre jury de thèse,

Monsieur le Professeur Yves AIGRAIN, vous avez accepté immédiatement de juger ce travail, et montré une grande disponibilité, vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

Monsieur le Professeur François Becmeur, je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse avec autant d'enthousiasme, et de juger ce travail avec toute votre expérience sur la pathologie thoracique et son traitement. Veuillez trouver ici l'expression de ma très grande gratitude.

Monsieur le Professeur Emmanuel Sapin, je vous suis très reconnaissante d'avoir dit oui malgré le délai court et vos blessures personnelles, pour être rapporteur de ce travail. Votre spontanéité à nous aider malgré la lourdeur du travail impose notre respect. Soyez assuré de ma très grande gratitude.

Monsieur le Professeur Pierre TOURNEUX, tu m'as par ta gentillesse indéfectible, tes paroles bienveillantes montré que ce système n'altérerait pas les belles personnes. Je te suis très reconnaissante d'avoir accepté malgré les rebondissements de ces derniers mois, de juger ce travail avec l'expérience que tu as du modèle et de l'hypertension artérielle pulmonaire.

Monsieur le Professeur Laurent Storme, vous m'avez ouvert les portes de votre équipe depuis mon master 2, j'y ai découvert beaucoup plus que la recherche. Le temps que j'y passe est pour moi source d'enrichissement mais aussi de plaisir. Votre démarche tant clinique que de recherche explique l'admiration que je vous porte. Vos conseils, votre soutien mais aussi la confiance que vous m'avez accordée durant cette thèse m'ont beaucoup touchés. Soyez assuré de ma gratitude et de mon respectueux attachement.

Monsieur le Professeur Rémi Besson, vous m'avez incité à découvrir la recherche et à m'investir auprès de la faculté de médecine, grâce à vous j'ai découvert une équipe exceptionnelle. Vous êtes régulièrement source d'un rappel à la l'humilité et vous vous assurez régulièrement qu'il ne me vienne pas des prétentions ridicules. Pour tout cela mais aussi pour avoir accepté de diriger ce travail soyez assuré de ma très sincère reconnaissance.

A L'EA 4489, tous ses masters, tous ses chercheurs avec qui j'ai appris et apprends à chacune de nos rencontres la rigueur scientifique dans l'enthousiasme et la bonne humeur.

Au Dr Thomas Hubert pour ses compétences en médecine vétérinaire et son aide organisationnelle régulière.

A Michel (l'homme qui murmure à l'oreille des brebis), Arnold et Martin pour leur disponibilité et leur compétence, ces travaux ne seraient pas possibles sans votre précieux concours.

A Damien, parce que rien sans toi n'aurait la même saveur, parce que tu sais comprendre et accepter malgré toutes les contraintes, je te dois tant.

A Julie et Capucine qui mettez tant de goût dans nos vies, sans oublié **celui ou celle qui arrive** et qui ne manquera pas de vous ressembler.

A ma famille toujours présente ou trop tôt partie, pour votre soutien et votre amour sans faille.

Table des matières

INTRODUCTION.....	7
Chapitre 1 :Régulation du tonus vasculaire pulmonaire au cours de la vie fœtale et à la naissance	
1. CIRCULATION FŒTALE.....	10
1.1. HEMODYNAMIQUE FŒTALE.....	10
1.2. PHYSIOLOGIE DE LA CIRCULATION PULMONAIRE FŒTALE	11
2. ADAPTATION CIRCULATOIRE A LA NAISSANCE.....	13
2.1. CIRCULATION TRANSITIONNELLE OU MODIFICATIONS HEMODYNAMIQUES A LA NAISSANCE	14
2.2. L'HYPERTENSION ARTERIELLE PULMONAIRE HTAP	15
Chapitre 2 : buts de l'étude et questions étudiées	
1. BUTS DE CE TRAVAIL.....	18
2. QUESTIONS ETUDIEES	18
Chapitre 3 : modèle expérimental	
1. PREPARATION DU MODELE.....	19
1.1. ANIMAUX	19
1.2. ANESTHESIE.....	19
1.2.1. PROTOCOLE SEDATION + RACHI ANESTHESIE :	19
1.2.2. PROTOCOLE ANESTHESIE GENERALE	20
1.3. MODELE CHRONIQUE D'ETUDE DE LA CIRCULATION PULMONAIRE PERINATALE CHEZ LE FŒTUS DE BREBIS [86]	20
2. MESURES DES PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES.....	21
Chapitre 4 : effets du tabagisme passif maternel sur la circulation pulmonaire chez le fœtus de brebis :	
1. INTRODUCTION	23
2. MATERIEL ET METHODE	24
2.1. MODELE EXPERIMENTAL	24
2.2. PROTOCOLES	24
2.3. ANALYSE STATISTIQUE	25

3. RESULTATS.....	26
4. DISCUSSION.....	27

CHAPITRE 5 : EFFETS DE L'APELINE SUR LA CIRCULATION PULMONAIRE FŒTALE

1. INTRODUCTION.....	32
2. MATERIEL ET METHODE.....	33
2.1. MODELE EXPERIMENTAL.....	33
2.2. PROTOCOLES.....	33
2.2.1. PROTOCOLE « VASO-REACTIVITE DE L'APELINE » :.....	33
2.2.2. PROTOCOLE « VOIE D'ACTION DE L'APELINE » :.....	35
2.3. PREPARATION DES PRODUITS :.....	36
2.4. ANALYSE STATISTIQUE.....	36
3. RESULTATS.....	36
3.1. PROTOCOLE « VASO-REACTIVITE DE L'APELINE » :.....	37
3.2. PROTOCOLE « VOIE D'ACTION DE L'APELINE » (N= 1):.....	39
4. DISCUSSION.....	40

CHAPITRE 6 : EFFETS DE LA DHEA SUR LA CIRCULATION PULMONAIRE FŒTALE, ETUDE EXPERIMENTALE CHEZ LE FŒTUS DE BREBIS

1. INTRODUCTION.....	45
2. MATERIEL ET METHODE.....	46
2.1. MODELE EXPERIMENTAL.....	46
2.2. PROTOCOLES.....	46
2.2.1. INJECTION INTRA VEINEUSE DIRECTE A DOSE CROISSANTE.....	46
2.2.2. ETUDE DES MECANISMES D'ACTION DE LA DHEA.....	48
2.3. PREPARATION DES PRODUITS.....	48
2.4. ANALYSES STATISTIQUES.....	49
3. RESULTATS.....	49
3.1. INJECTION DE DHEA EN IVD A DOSE CROISSANTE.....	49
3.1.1. PROTOCOLE INJECTION DE DHEA EN IVD, DOSE 6 MG (N=7).....	50
3.1.2. PROTOCOLE INJECTION DE DHEA EN IVD, DOSE 12 MG (N=7).....	52
3.1.3. PROTOCOLE INJECTION DE DHEA EN IVD, DOSE 24 MG (N=5).....	55
3.1.4. RESUME DES INJECTIONS IVD :.....	58
3.2. RESULTATS DES PROTOCOLES LNA-DHEA.....	59
3.2.1. PROTOCOLE 3A : LNA-DHEA 12 MG (N=6).....	59
3.2.2. PROTOCOLE LNA-DHEA 24 MG (N=5).....	62
4. DISCUSSION.....	63

Chapitre 7 : L'effet des acides gras polyinsaturés oméga 3 (AGPI ω 3) sur la circulation pulmonaire : étude expérimentale chez le fœtus d'agneau

1. INTRODUCTION.....	66
2. CONCLUSION.....	70

Chapitre 8 : Effets de l'EPA et du DHA sur la circulation pulmonaire fœtale

1. INTRODUCTION.....	73
2. MATERIEL ET METHODE	75
2.1. MODELE EXPERIMENTAL	75
2.2. PROTOCOLES	75
PREPARATION DES PRODUITS	76
2.3. ANALYSES STATISTIQUES	76
3. RESULTATS.....	77
3.1. EFFETS DE L'INJECTION D'UNE SOLUTION D'EPA SUR LA CIRCULATION PULMONAIRE FŒTALE	77
3.2. EFFETS DE L'INJECTION D'UNE SOLUTION DE DHA SUR LA CIRCULATION PULMONAIRE FŒTALE	78
3.3. PROTOCOLE TEMOIN « ETHANOL ».....	79
4. DISCUSSION.....	80

Chapitre 9 : l'impact de l'obstruction trachéale anténatale sur la circulation pulmonaire fœtale.

1. INTRODUCTION.....	82
4. DISCUSSION.....	84

Chapitre 10 : conclusion générale et perspectives

LES PRINCIPALES DONNEES NOUVELLES DECRITES DANS CE TRAVAIL DE THESE SONT LES SUIVANTES :.....	86
---	----

Références et bibliographies.....	91
-----------------------------------	----

Index des figures.....	109
------------------------	-----

Index des tableaux.....	111
-------------------------	-----

INTRODUCTION

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) correspond à une augmentation des résistances artérielles pulmonaires, avec dans les formes les plus graves, une défaillance cardiaque droite. L'HTAP persistante du nouveau-né (HTAPP) est estimée à 2/100 naissances en France [1].

Pendant la vie fœtale, le débit sanguin pulmonaire(Qp) représente moins de 10 % du débit cardiaque droit et gauche combiné [2]. L'hypoperfusion pulmonaire est directement liée à une constriction intense du lit vasculaire. En effet, la circulation pulmonaire fœtale est caractérisée par des résistances vasculaires pulmonaires élevées (RVP), et un faible débit sanguin pulmonaire. Des modifications brutales des RVP sont nécessaires à l'adaptation à la vie extra-utérine. L'HTAPP s'explique par l'échec à l'adaptation à la vie extra-utérine. Ce syndrome est caractérisé par une élévation des RVP, responsable de shunts sanguins droit-gauche au travers du canal artériel et/ou du foramen ovale et d'une hypoxémie [3]. Les pathologies respiratoires de la période néonatale sont responsables d'une morbidité et d'une mortalité importante. De nombreuses pathologies sont en cause : maladie des membranes hyalines [4], HTAPP, retard de résorption du liquide pulmonaire...

L'adaptation cardio-respiratoire à la naissance implique le déclenchement simultané de 2 phénomènes : 1) la genèse de la capacité résiduelle fonctionnelle par résorption du liquide pulmonaire et par sécrétion de surfactant à la surface alvéolaire; et 2) l'augmentation du débit sanguin pulmonaire par vasodilatation des vaisseaux pulmonaires. L'intégrité de la fonction endothéliale et la libération de médiateurs vasodilatateurs en réponses à divers stimulus (O₂, shear-stress, ventilation alvéolaire) sont nécessaires à la relaxation des cellules musculaires lisses des vaisseaux pulmonaires [5-11]. C'est pourquoi les mécanismes de régulation de la circulation pulmonaire périnatale sont essentiels à connaître pour mieux comprendre et traiter les détresses respiratoires néonatales.

Plusieurs voies sont impliquées dans la régulation des RVP périnatales dont les plus importantes sont :

1. La voie du monoxyde d'azote (voie du NO)
2. la voie des prostaglandines (PG)
3. La sensibilité des myofibrilles au calcium
4. l'endothéline 1 (ET1)
5. les canaux potassiques qui sont eux même régulés par :
 - le NO et la PGI₂ [12]
 - l'acide époxy-eicosatriénoïque (EET)
 - l'acide 17,18-époxyeicosatétraénoïque (17,18 EPETE)

D'autres mécanismes pourraient intervenir dans le contrôle de la circulation pulmonaire périnatale. L'apeline, protéine découverte en 1998 [13] est présente dans le parenchyme pulmonaire mais aussi dans les vaisseaux [14] avec un rôle vasodilatateur, médié par la voie du NO [15, 16], ou vasoconstricteur passant par les cellules musculaires lisses [17]. Par ailleurs des facteurs environnementaux viennent en plus perturber la régulation de la vascularisation pulmonaire, qu'ils soient liés à l'atmosphère dans laquelle évolue le fœtus comme le tabac ou dus à l'action médicale comme l'occlusion trachéale (OT) en thérapeutique pré natale des Hernies Diaphragmatiques Congénitales (HDC).

Le but de ce travail est double :

- 1) approfondir nos connaissances sur la régulation de la circulation pulmonaire périnatale ;
- 2) d'envisager de nouvelles possibilités thérapeutiques dans les cas de mal adaptation à la vie extra utérine.

Le premier chapitre résume succinctement l'état des connaissances actuelles sur la physiologie de la circulation pulmonaire pendant la vie fœtale et à la période « transitionnelle ».

Le chapitre II expose le but du travail et les questions étudiées. Elles sont au nombre de 6 :

- l'Apeline joue-t-elle un rôle dans la régulation du tonus vasculaire pulmonaire fœtal ?
- Quels effets la déhydroépiandostérone (DHEA) a-t-elle sur la régulation de la vascularisation pulmonaire fœtale ?
- Quel est le rôle des acides gras poly insaturés oméga 3 (AGPI ω 3) sur les RVP ?
- Quels sont les AGPI ω 3 responsables de cette réponse ?
- Quel impact a le tabagisme passif sur le tonus vasculaire pulmonaire fœtal ?
- Quelles sont les conséquences vasculaires de l'OT anté natale ?

Le chapitre III décrit les matériels et méthodes utilisés pour répondre aux différentes questions posées.

Les chapitres IV à IX résument et commentent les résultats correspondant aux questions posées.

Le dernier chapitre de conclusion fait une synthèse des résultats et expose les spéculations.

Chapitre 1 :Régulation du tonus vasculaire pulmonaire au cours de la vie fœtale et à la naissance

1. Circulation fœtale

1.1. Hémodynamique fœtale

Le niveau élevé des RVP joue un rôle majeur dans le maintien de la circulation fœtale. Le sang riche en oxygène est amené du placenta au fœtus par la veine ombilicale. Il rejoint la veine cave inférieure par le *ductus venosus* ou canal d'Arantius, où il se mélange au sang veineux. Grâce à l'orientation particulière du *foramen ovale*, situé en regard de l'abouchement de la veine cave inférieure dans l'oreillette droite, le sang oxygéné est préférentiellement dirigé vers l'oreillette gauche alors que le sang veineux issu de la veine cave supérieure et du sinus coronaire passe dans le ventricule droit. Puisque les RVP sont plus élevées que les résistances vasculaires systémiques, la majeure partie du débit ventriculaire droit traverse le canal artériel pour s'ajouter au débit sanguin de l'aorte descendante. Le débit aortique élevé qui en est le corollaire favorise la perfusion placentaire et les échanges gazeux [18]. Le sang issu du ventricule gauche dans l'aorte ascendante est donc plus riche en oxygène que le sang de l'aorte descendante. Cette organisation de la circulation fœtale permet ainsi d'améliorer l'oxygénation du myocarde et des structures cérébrales au dépend des viscères abdominaux et de la partie inférieure du corps et de ramener le sang veineux au placenta par les artères ombilicales (Fig. 1).

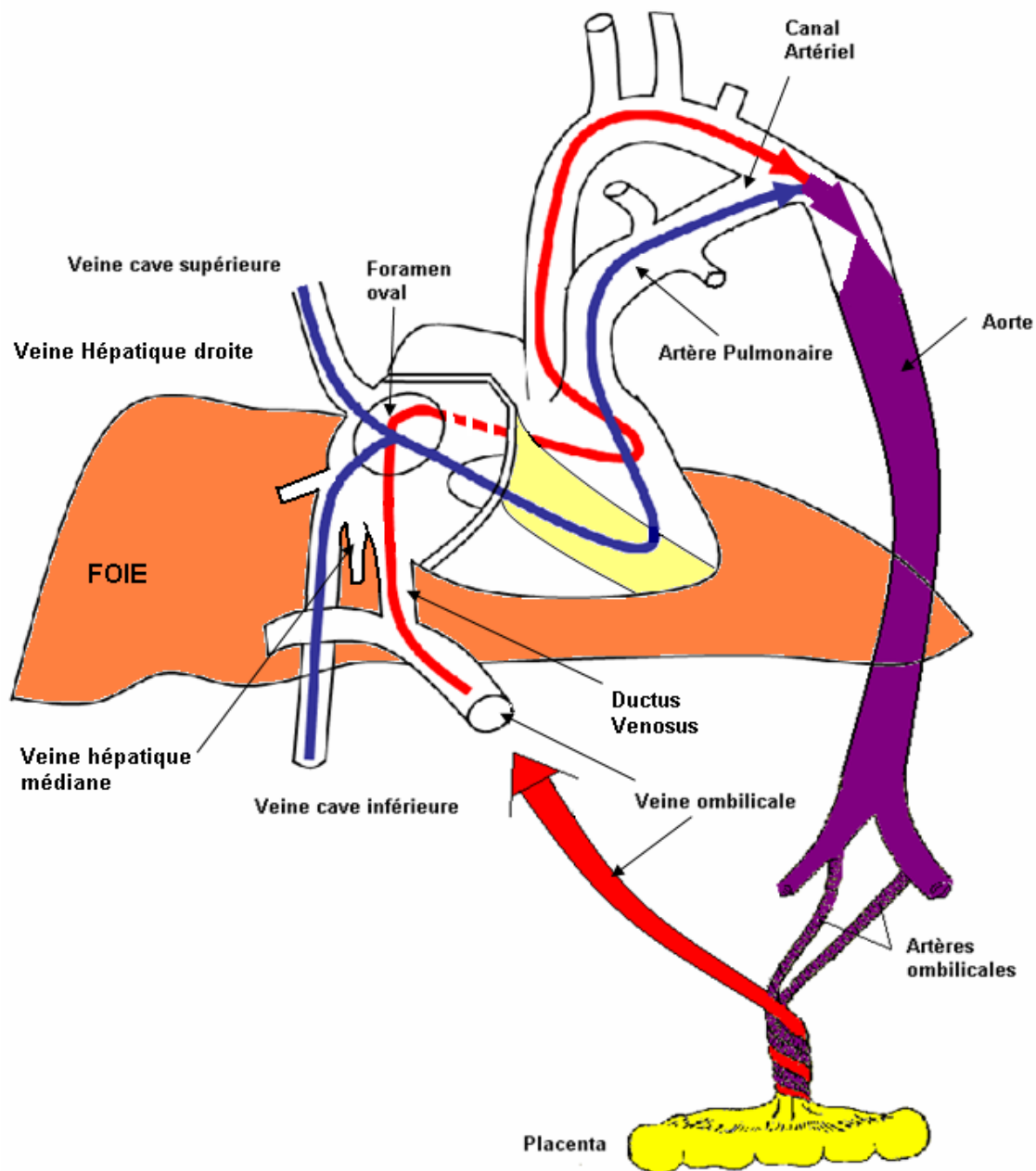


Figure 1. Schéma de la circulation foeto-placentaire.

1.2. Physiologie de la circulation pulmonaire foetale

Le Q_p foetal bien que faible est essentiel à la croissance et au développement pulmonaire. Ainsi, la ligature de l'artère pulmonaire en fin de gestation chez le fœtus est responsable d'une hypoplasie pulmonaire sévère [19]. Le Q_p augmente avec l'âge gestationnel : ceci est en partie lié à une augmentation du nombre de vaisseaux artériels.

Cependant, les RVP augmentent lorsqu'elles sont rapportées au poids du poumon suggérant que le tonus vasculaire pulmonaire s'accroît en fin de gestation [20].

Les mécanismes qui maintiennent les RVP élevées durant la vie intra-utérine incluent une pression partielle en O₂ alvéolaire et artérielle pulmonaire basse, une absence d'interface gaz-liquide, et la production préférentielle de médiateurs vasoconstricteurs. La contribution des facteurs mécaniques est suggérée par la diminution ou l'élévation des RVP respectivement en cas d'infusion dans le poumon d'une solution de sérum physiologique ou en cas de drainage du liquide pulmonaire [21]. La pression partielle artérielle en oxygène (PaO₂) fœtale est proche de 20 mmHg et cette relative hypoxie « physiologique » est un des facteurs qui permet de maintenir des RVP élevées pendant la vie fœtale. La circulation pulmonaire fœtale est très sensible aux variations de la PaO₂. Une augmentation de la PaO₂ induit une chute des RVP. A l'inverse, une réduction de la PaO₂ élève les RVP du fœtus [20, 22]. Elle augmente les pressions pulmonaires et systémiques et réduit le Qp. Cette réponse à l'hypoxie augmente avec l'âge gestationnel [23]. La relation entre PaO₂ et RVP est curvilinéaire. L'oxygène a une action directe sur les fibres musculaires lisses vasculaires, via une dépolarisation par les canaux calciques membranaires[24], mais son effet est modulé par divers médiateurs vasoactifs.

Les mécanismes de la vasoconstriction hypoxique incluent la modulation du potentiel redox déterminé par les rapports Glutathion réduit/Glutathion oxydé et NADPH/NADP [25], l'activation de protéines héminiques (O₂ sensors : cytochrome P-450, hèmes oxygénases)[26], ou la fermeture directe ou indirecte de certains canaux potassiques [27, 28]. Les canaux potassiques jouent un rôle important dans la modulation de la réactivité vasculaire pulmonaire. L'activation des canaux potassiques voltages-dépendant induit une hyperpolarisation cellulaire qui aboutit à la fermeture des canaux calciques voltages dépendants et la vasodilatation. Inversement, la fermeture des canaux potassiques, lors d'une baisse de PaO₂, dépolarise les membranes des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) ce qui ouvrent les canaux calciques voltage-dépendants. L'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium qui en découle induit une contraction des CMLV [12, 29-31]. De plus les canaux potassiques sont régulés par le NO et la PG-I₂ [12], l'EET un dérivé de l'action de la momo-oxygénase cytochrome P450 sur l'acide arachidonique qui est connu comme vasodilatateur par le

biais d'une protéine G [12, 31], mais aussi par le 17, 18 EPETE un dérivé de l'action de l'action des cytochrome P450 sur les AGPI ω 3 [31].

Une augmentation de production de médiateurs vasoconstricteurs contribue aussi à augmenter les RVP in utero. Si le rôle des leucotriènes est controversé [6, 32], l'ET1, peptide d'origine endothéliale contribue au moins en partie à l'élévation des RVP. Elle est vasoconstrictrice par stimulation de la phospholipase C, ce qui augmente l'inositol tri phosphate et la libération de calcium par le réticulum sarcoplasmique [30]. Les taux d'ET1 sont plus élevés pendant la vie fœtale que chez l'adulte [33]. L'infusion intrapulmonaire d'un antagoniste sélectif du récepteur ET-A à l'ET 1 (BQ 123), augmente le Qp[34,35]. De plus, l'hypoxie prolongée stimule la production d'ET1 chez le fœtus de brebis proche du terme et chez le nouveau-né humain en cas d'asphyxie ou d'HTAPP[36].

Enfin, la circulation pulmonaire fœtale est caractérisée par une autorégulation temps-dépendante. Divers stimuli, comme l'oxygène, l'acétylcholine, la bradykinine, l'histamine, la tolazoline sont capables de réduire les RVP mais la vasodilatation semble toujours transitoire: les RVP rejoignent leurs valeurs de base après une à deux heures malgré la poursuite de l'infusion de drogues vasodilatatrices ou l'oxygénothérapie [37, 40]. A l'inverse, les drogues qui favorisent la relaxation des CMLV par augmentation de cGMP, incluant le NO, le facteur atrial natriurétique, le 8-bromo-GMP, produisent une vasodilatation pulmonaire prolongée dans les artères pulmonaires post natales [41, 42]. Il est possible que la régulation temps-dépendante de la circulation pulmonaire fœtale s'explique par l'incapacité des cellules endothéliales fœtales à prolonger leur production de NO ou par une augmentation de l'activité de la phosphodiesterase du CGMP [43, 44] mais possiblement aussi par d'autres voies.

2. Adaptation circulatoire à la naissance

La naissance est un événement unique pour la circulation artérielle pulmonaire puisqu'elle va passer d'une circulation fœtale à faible débit et haute résistance à une circulation à débit élevé et faible résistance. Ce changement qui se produit dès les

premiers instants de la vie extra utérine met en jeu différents mécanismes. L'HTAPP du nouveau-né correspond à un dysfonctionnement de l'un ou plusieurs de ces mécanismes.

2.1. Circulation transitionnelle ou modifications hémodynamiques à la naissance

A la naissance, les RVP chutent brutalement avec pour conséquence immédiate une augmentation par 8 ou 10 du Qp. La réduction des pressions pulmonaires est plus lente : à la 24^{ème} heure, la pression artérielle pulmonaire moyenne est d'environ la moitié de la pression systémique moyenne. Après la chute rapide et précoce des RVP, la décroissance devient plus lente et régulière jusqu'à atteindre les chiffres adultes, en 2 à 6 semaines [5, 7, 45-48]. La chute rapide des RVP après la naissance est la conséquence directe d'une vasodilatation, d'un recrutement et d'une distension vasculaire pulmonaire [49]. Sous l'effet combiné de la chute des RVP et de l'arrêt de la vascularisation ombilicale, les résistances systémiques s'élèvent et la pression aortique (PAo) devient supérieure à la pression pulmonaire. Le shunt droite-gauche à travers le canal artériel s'inverse avec la chute des RVP, ce qui augmente le Qp durant les premières heures de vie. La PaO₂ augmente de 20 à 50 mmHg en quelques minutes.

L'élévation du Qp augmente le retour veineux dans l'oreillette gauche. La pression auriculaire gauche s'élève et devient supérieure à la pression auriculaire droite, ce qui entraîne la fermeture du *foramen ovale* [50]. L'inversion du shunt droite-gauche et l'élévation de la PaO₂ vont contribuer à la fermeture progressive du canal artériel [50].

De multiples mécanismes contribuent à cette adaptation à la vie extra-utérine : 1) genèse d'une interface air-liquide et distension rythmique du poumon ; 2) augmentation de la PaO₂ pulmonaire et de la pression partielle alvéolaire en oxygène ; 3) production de médiateurs vasodilatateurs [5, 6, 11,45, 51,52].

L'irruption d'air dans les saccules terminales réduit les pressions interstitielles périvasculaires, conduisant à une dilatation ou une distension des vaisseaux. Cette effet existe sans nécessiter une augmentation de la PaO₂ [45,50]. L'addition d'oxygène au mélange gazeux accentue la chute des RVP [45]. Par ailleurs, l'augmentation isolée de la PaO₂ sans ventilation pulmonaire réduit les RVP [20].

Les stimuli mécaniques réduisent les RVP, au moins en partie, par augmentation de la production de médiateurs vasodilatateurs, tels que le NO, la prostacycline, et le facteur hyperpolarisant dérivant de l'endothélium (EDHF). En effet, l'inhibition de la

cyclooxygénase limite la chute des RVP liée à la ventilation pulmonaire mais pas à l'oxygène [53]. De même, les inhibiteurs de la NO synthase limitent la chute des RVP liée à l'oxygène [5].

2.2. L'hypertension artérielle pulmonaire HTAP

L' HTAP est une maladie qui touche les petites artères pulmonaires. Elle se caractérise par une augmentation des RVP. Dans l'ensemble des étiologies d'HTAP (en dehors des situations de poussées aiguës) on retrouve une vasoconstriction artérielle pulmonaire associée à un remodelage de la paroi des vaisseaux [54].

Le *défait de développement* du lit vasculaire pulmonaire est observé dans HDC, les agénésies rénales, et les dystrophies thoraciques asphyxiantes [55, 56]]. La dysplasie ou l'hypoplasie du poumon est associée à une réduction du nombre des voies aériennes, des alvéoles, et des artères associées. Dans les hypoplasies pulmonaires sévères il existe une diminution du lit vasculaire pulmonaire dans un champ déterminé entraînant une augmentation des RVP. Les HDC sont également associées à une augmentation des muscles lisses dans les artères périphériques et à une hypertrophie de la média dans ces vaisseaux [57]. Ceci majore l'HTAP et le shunt droit-gauche à travers le foramen ovale et le canal artériel. La présence de telles anomalies anatomiques explique en partie la réponse partielle aux différents traitements pharmacologiques. Une oxygénation efficace est difficile à obtenir, car elle nécessiterait des pressions de ventilation et des volumes de ventilation élevés. Ces paramètres ventilatoires entraîneraient un barotraumatisme et des fuites aériques, et augmenteraient paradoxalement les pressions vasculaires pulmonaires par l'intermédiaire d'une sur-distension des alvéoles et une « tamponnade » des vaisseaux.

Le *développement inadapté* du lit vasculaire pulmonaire *in utero* se caractérise par la muscularisation des artères pré-acinaires ou des artères intra-acinaires normalement non muscularisées. Cette muscularisation hypertrophique des vaisseaux réduit la lumière vasculaire et diminue le débit pulmonaire. Chez le fœtus humain une fermeture ou une vasoconstriction du canal artériel peut survenir après une tocolyse employant de l'indométacine [58, 59]. Cette HTAPP secondaire à une hypertrophie vasculaire pulmonaire est reproduite dans les modèles de fœtus de brebis avec ligature du canal artériel [60, 61]. L'exposition de fœtus de brebis à une hypoxie intra-utérine

prolongée entraîne également une augmentation de la muscularisation des vaisseaux artériels pulmonaires et une augmentation des pressions artérielles pulmonaires [62].

La *mauvaise adaptation fonctionnelle* du lit vasculaire pulmonaire se rapporte à l'absence de diminution des résistances vasculaires pulmonaires, après la naissance, et ceci malgré une anatomie normale. Ce défaut d'adaptation peut résulter d'un échec de dilatation des vaisseaux artériels pulmonaires à musculature normale à cause d'un stress périnatal. Les facteurs mis en cause sont l'acidose, l'hypothermie, l'hypoglycémie, l'hypercapnie, l'hypoxie, l'inhalation et l'hémorragie. Le traitement de l'HTAPP chez ces enfants repose sur la correction des anomalies métaboliques qui contribuent à la pathologie. Ces enfants sont susceptibles d'avoir une vasoconstriction anormale réversible, et par conséquent sont d'excellents répondeurs au traitement vasodilatateur dès que les anomalies métaboliques sous-jacentes ont été corrigées.

L'absence d'augmentation du Qp en réponse aux stimuli liés à la naissance conduit à une hypoxémie sévère et à un défaut d'oxygénation du fœtus. L'HTAPP néonatale représente ainsi l'incapacité de la circulation pulmonaire d'atteindre ou de maintenir la diminution normale des RVP pendant la période périnatale précoce. Les mécanismes responsables de l'HTAPP sont actuellement mal précisés :

- échec des mécanismes qui contribuent à la chute des RVP à la naissance (comme une chute du NO endogène ou de l'activité PGI₂)
- production excessive de vasoconstricteurs (tel que l'endothéline, la thromboxane, les leucotriènes ou les facteurs d'activation plaquettaire)
- une altération de la réceptivité des cellules musculaires lisses aux stimulus vaso-actifs.

Dans de nombreux cas, le remodelage vasculaire contribue à une augmentation prolongée des RVP in utero et à une HTAPP après la naissance. De nombreuses études animales suggèrent que les modifications structurelles liées à l'hypertension peuvent apparaître après seulement cinq jours d'élévation soutenue des pressions artérielles pulmonaires [63-66].

Dans l'HTAPP dès que les pressions artérielles pulmonaires dépassent les pressions artérielles systémiques, il existe un shunt droit-gauche : le débit sanguin pulmonaire passe à travers le canal artériel ou le foramen ovale entraînant une hypoxémie critique. L'hypoxémie aiguë apparaît souvent secondairement, après une éventuelle période d'apparente stabilité liée à une augmentation brutale des pressions artérielles

pulmonaires, entraînant un shunt important droit-gauche. Au plan physiologique cela peut traduire une « réponse myogénique » ou la tendance de la circulation pulmonaire à s'opposer à l'étirement ou la vasodilatation (« stretch stress »)[67]. Depuis longtemps il avait été démontré que les modifications de la pression intra-vasculaire pouvaient stimuler la contraction des cellules musculaires lisses [68].

Malgré les traitements agressifs comprenant l'oxygène, l'alcalose métabolique ou respiratoire, les traitements tonicardiaques, la morbidité et la mortalité de l'HTAPP restent très élevées chez ces enfants. Le but du traitement de ces nouveau-nés atteints d'HTAPP est d'augmenter le Qp, de diminuer les RVP sans compromettre l'éjection cardiaque. Les protocoles thérapeutiques visent à baisser les RVP grâce à des traitements vasodilatateurs tels que la tolazoline, le nitroprussate de sodium et la prostaglandine E₁. Les traitements pharmacologiques sont souvent inefficaces, soit à cause de l'hypotension systémique associée (liée à l'absence de sélectivité des traitements pour la circulation pulmonaire), soit à cause de l'impossibilité de diminuer immédiatement les RVP, soit à cause de l'impossibilité de maintenir une vasodilatation prolongée (tachyphylaxis)[69], ou en raison d'autres effets secondaires. Les patients qui échappent aux traitements conventionnels ont souvent besoin d'un traitement par l'ECMO (extra corporeal membrane oxygenation)[70]. Rapidement des études ont démontré l'effet vasodilatateur à la fois sélectif et puissant du NO inhalé chez le fœtus, et le jeune agneau[71-75]. L'amélioration clinique pendant le traitement par NO inhalé apparaissait pour de nombreuses affections classiquement associées à une HTAPP : hernie diaphragmatique congénitale, syndrome d'inhalation méconiale, sepsis sévère, idiopathique et autres[76-82]. L'amélioration clinique était essentiellement obtenue par un traitement associant le NO inhalé et la ventilation par oscillations à haute fréquence plutôt que par le traitement par NO seul. Tous les nouveau-nés en hypoxémie réfractaire ne répondent pas favorablement, par une amélioration de la PO₂, au traitement par NO inhalé, et des études complémentaires cherchent à établir les mécanismes qui peuvent potentialiser la bonne réponse clinique. On sait que certaines affections comme les HDC sont moins sensibles au NO par un manque d'activité de la Guanyl Cyclase soluble [83].

Chapitre 2 : buts de l'étude et questions étudiées

1. Buts de ce travail

Le but de ce travail est d'évaluer l'impact de l'environnement fœtal sur l'adaptation à la vie extra-utérine et a deux objectifs :

- 1) de mieux connaître les mécanismes de régulation de la circulation pulmonaire périnatale ;
- 2) d'évaluer de nouvelles thérapeutiques potentiellement utilisables dans les situations de mal adaptation de la vie extra utérine.

2. Questions étudiées

Nous avons étudié l'action de nouveaux médiateurs ou facteurs potentiels de la circulation pulmonaire fœtale et néonatale qui n'avait pas encore été étudiées dans cette localisation :

- 1) le tabagisme passif
- 2) l'Apeline
- 3) La DHEA
- 4) Les AGPI ω 3

Par ailleurs nous avons étudié l'impact de l'obstruction trachéale anténatale sur la circulation pulmonaire fœtale.

Chapitre 3 : modèle expérimental

1. Préparation du modèle

1.1. Animaux

Le modèle utilisé est un modèle chirurgical chez la brebis gravide de race « Columbia-Rambouillet », réputée pour avoir des grossesses simples avec des fœtus dont le poids de naissance moyen est d'environ 3 kilogrammes. Les brebis provenaient toutes d'un même élevage de la Creuse ayant reçu l'agrément de la Direction Département des Services Vétérinaires. Pour pouvoir dater exactement le terme des fœtus, les grossesses ont été induites après préparation hormonale par des éponges intra-vaginales imprégnées de progestatifs. La saillie était ainsi programmée à date fixe et la gestation était confirmée par une échographie. Les brebis gestantes étaient livrées par l'éleveur 24 heures au moins avant le bloc.

1.2. Anesthésie

Les brebis gestantes ont été opérées à 130 ± 2 jours. Un jeûne préalable de 48 heures était imposé initialement, puis de 6 heures pour éviter les complications hydro-électrolytiques du ruminant (déshydratation, alcalose métabolique). Sur la durée de ce travail de thèse, 2 protocoles anesthésiques se sont suivis. Le premier était une sédation associée à une rachianesthésie, le second une anesthésie générale.

1.2.1. Protocole sédation + rachianesthésie :

Les brebis étaient séditées par une injection intraveineuse sur cathéter jugulaire de Pentothal® (thiopental), titré de 1 à 4 grammes selon l'animal, puis anesthésiées par rachianesthésie avec 4 ml de bupivacaïne à 0,25%[84]. Les brebis étaient maintenues

sédâtées, mais en ventilation spontanée pendant la chirurgie. Une antibioprophylaxie était assurée par l'injection intraveineuse, d'un gramme d'amoxicilline - acide clavulanique et l'injection intramusculaire de 80 mg de gentamicine, puis en fin de bloc de 500mg d'amoxicilline -acide clavulanique. Les brebis récupéraient rapidement de la chirurgie, se redressant sur leurs pattes dans les 6 heures après l'intervention. Elles reprenaient leur alimentation dès qu'elles se mettaient sur leurs pattes.

1.2.2. Protocole anesthésie générale

Les brebis étaient sédâtées par une injection intramusculaire de 0,3mL de Xylazine (Sédaxylan® : 20mg/mL)[85]. Une voie centrale était posée en jugulaire externe par ponction percutanée. La brebis recevait en intraveineux 2 grammes de Ceftriaxone (Rocéphine®), 2 ampoules de 20mg de Nalbuphine (Nubain®). Une perfusion de sérum salé isotonique (SSI) était maintenue durant toute l'intervention. La déterision était assurée par 2 lavages à la Chlorhexidine (Hibiscrub®) et au savon de Marseille, l'aseptie du champ opératoire par 2 badigeons à la Chlorhexidine (Biseptine®). L'anesthésie générale était réalisée au gaz Isoflurane (AErane®, 1 à 5%) et maintenue jusqu'à la fin de l'intervention. La brebis était surveillée en continue par la mesure de la fréquence cardiaque et de la saturation afin de s'assurer de la bonne tolérance maternelle de l'anesthésie.

1.3. Modèle chronique d'étude de la circulation pulmonaire périnatale chez le fœtus de brebis [86]

En condition d'asepsie stricte, une laparotomie médiane sous ombilicale était pratiquée suivie d'une hystérotomie permettant l'extériorisation de la patte avant gauche du fœtus. L'analgésie fœtale était assurée par l'injection intramusculaire d'une ampoule de 2mL de Nalbuphine et d'une injection sous cutanée de 1mL de Chlorhydrate de lidocaïne (Xylocaïne®) sur le trajet de l'incision cutanée. Il était mis en place un cathéter (Vygon, Ecoven, France) de taille 4 French en position intra-aortique et un second au niveau de la veine cave supérieure fœtale. Par une thoracotomie gauche en regard du 3ème espace un cathéter 2,5 French était mis en place dans l'artère pulmonaire gauche (APG) et un cathéter 4 French dans l'artère pulmonaire (AP). Une sonde de débitmètrie ultrasonique (T402, Transonic System®, Ithaca,NY,USA) était mise en place autour de l'APG. Un

cathéter 5 French était laissé en intra-amniotique. Une amnio-infusion de 500mL de sérum salé isotonique associé à 500mg d'amoxicilline + acide clavulanique (Augmentin®) étaient réalisées en remplacement du liquide amniotique. L'ensemble des cathéters et la sonde de débitmétrie étaient extériorisés sur le flanc droit de la brebis après tunnélisation sous cutanée. Une fois l'intervention terminée, la brebis regagnait son box et après récupération complète de l'analgésie, la boisson et la l'alimentation étaient reprises. Durant les 72 heures suivant l'intervention, la brebis recevait en injection intraveineuse quotidienne, 2mg de Ceftriaxone, 2 ampoules de Naluphine et 2 ampoules de Spasfon®. L'accès en nourriture et en eau était ad libitum. Les premiers protocoles expérimentaux étaient réalisés 48 heures après l'intervention et après obtention d'une stabilité hémodynamique fœtale.

2. Mesures des paramètres physiologiques

Le capteur de débit était connecté à un débitmètre autocalibré (T201, Transonic Systems, Ithaca, NY, USA) pour la mesure continue du débit sanguin dans APG.

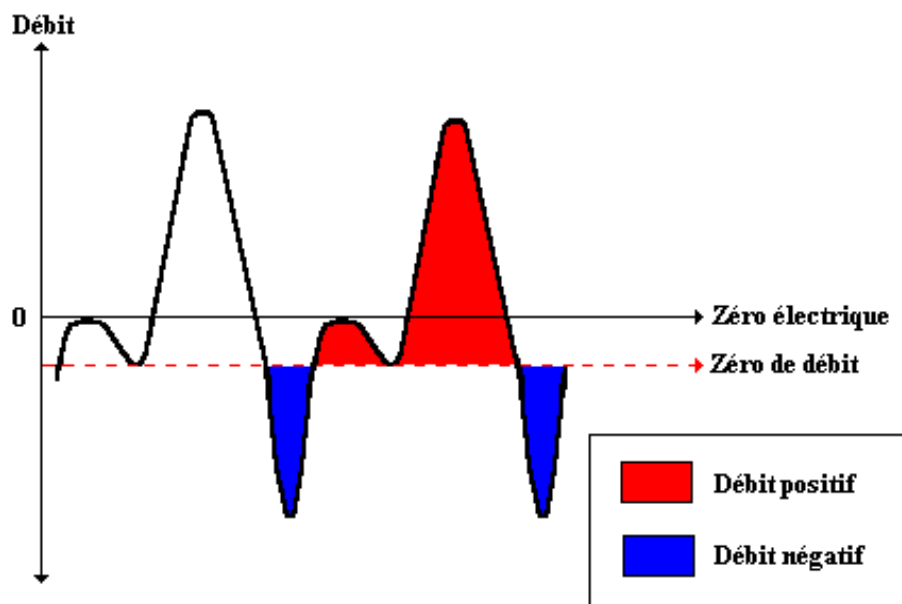


Figure 2. Représentation du zéro de débit.

Les valeurs de débit étaient déterminées à partir du signal de débit sanguin phasique (au moins 30 cycles cardiaques) : le zéro de débit était défini comme la valeur de débit précédant le début de la systole[87] (Fig. 2). Les cathéters artériels pulmonaire, aortique

et de la cavité amniotique étaient connectés à des capteurs de pression (Merlin monitor, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA). Les pressions étaient référencées à la pression amniotique. La fréquence cardiaque était calculée à partir du signal phasique de la pression artérielle pulmonaire (PAP). Les résistances vasculaires pulmonaires étaient calculées selon l'équation suivante :

$$RVP = (PAP - POG) / Qp$$

Où PAP représente la pression moyenne dans l'artère pulmonaire, POG la pression moyenne dans l'oreillette gauche et Qp le débit moyen de l'artère pulmonaire gauche. Des travaux antérieurs de l'équipe de recherche ont montré que la valeur de POG était de 2mmHg de façon constante [88]. Les gaz du sang (GDS), le pH, la mesure de la saturation artérielle en oxygène, les taux d'hémoglobine et de méthémoglobine étaient réalisés sur des échantillons de sang artériel pulmonaire (modèle OSM-3, Radiometer, Copenhagen, Denmark, et I-STAT®, Abbott, USA par micro-méthode en corrigeant les valeurs à la température de l'animal à 39°5).

Chapitre 4 : effets du tabagisme passif maternel sur la circulation pulmonaire chez le fœtus de brebis :

1. Introduction

Le tabagisme pendant la grossesse est associé à plusieurs problèmes de santé, y compris l'avortement, prématurité, retard de croissance, et syndrome de mort subite du nourrisson (SMSN)[89,90]. Il altère le développement du système respiratoire qui augmente le risque de développer une respiration sifflante et de l'asthme dans l'enfance [91,92]. L'examen morphométrique des poumons exposés in utero à la fumée de cigarette a montré des changements structurels et fonctionnels tels que la diminution des parois alvéolaires et l'augmentation de la réactivité des voies respiratoires[93,94]. De plus en plus de preuves émergent rapportant que l'exposition maternelle à la fumée peut aussi nuire à la circulation pulmonaire périnatale du fœtus exposé par l'intermédiaire de sa mère. Le tabagisme pendant la grossesse augmente le risque HATPP[95,96]. L'HTAPP résulte de l'échec de la circulation pulmonaire à se dilater à la naissance, et peut causer une hypoxémie sévère[97]. On connaît peu les mécanismes potentiels expliquant le lien entre le tabagisme pendant la grossesse et l'HTAPP.

Chez l'adulte, l'HTAP peut aggraver l'évolution de la maladie pulmonaire obstructive chronique induite par le tabagisme. Une dysfonction endothéliale des artères intrapulmonaires a été retrouvée lors d'une exposition à la fumée du tabac. Elle contribue au moins en partie à la vasoconstriction et la prolifération des cellules musculaires lisses[99,98]. L'hypoxie chronique a également été impliquée dans le mécanisme de la vasoconstriction pulmonaire et du remodelage vasculaire chez les gros fumeurs[100]. Des études in vitro suggèrent que, les conséquences fœtales à l'exposition maternelle à la fumée de tabac peut modifier la vasorelaxation pulmonaire du nouveau-né. En effet, l'exposition prénatale à la fumée de cigarette altère la relaxation

endothélium-dépendante des artères pulmonaires des embryons de poulet[101]. Actuellement, l'impact de la fumée de cigarette maternelle sur la circulation pulmonaire fœtale est mal connu.

2. Matériel et Méthode

2.1. Modèle expérimental

Cf. Chapitre 3

2.2. Protocoles

Le but de cette étude était d'évaluer la réponse vasculaire fœtale au tabagisme passif maternel mais aussi d'appréhender la réactivité vasculaire fœtale à l'oxygène avant et après tabagisme maternel (photographie 1).

Les protocoles expérimentaux sont décrits dans l'article publié dans la revue Américain Journal of Obstetrics and Gynecology :

Houfflin-Debarge V, Sabbah-Briffaut E, Aubry E, Deruelle P, Alexandre C, Storme L. Effects of environmental tobacco smoke on the pulmonary circulation in the ovine fetus. Am J Obstet Gynecol 2011 May;204(5):450



Photographie 1 : brebis avec tête dans un sac en plastique contenant de la fumée de cigarettes, générée par débit d'air de 100ml/minute provenant d'un compresseur d'air. Le tauc de CO était contrôlé par dans le sac et maintenu à 60 particules par million. La FiO2 était maintenue à 21% dans le sac.

2.3. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes affectées de leur erreur standard (ESM). Les données ont été analysées en utilisant une analyse de variance (ANOVA) pour mesures répétées. Les différences intergroupes ont été analysées à l'aide des tests de Fisher, de Scheffe et de Bonferroni-Dunn en raison des comparaisons multiples. La comparaison des paramètres des GDS a fait appel au test non paramétrique de

comparaison de moyenne pour petits effectifs de Mann-Whitney. L'ensemble des analyses statistiques a été effectué en utilisant le logiciel Stat View 4.5 pour PC (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). Le seuil de signification retenu était $p < 0.05$.

3. Résultats

Ce travail a fait l'objet d'un article publié dans la revue Américain Journal of Obstetrics and Gynecology :

Houfflin-Debarge V, Sabbah-Briffaut E, Aubry E, Deruelle P, Alexandre C, Storme L. Effects of environmental tobacco smoke on the pulmonary circulation in the ovine fetus. Am J Obstet Gynecol 2011 May;204(5):450

4. Discussion

Notre objectif était de déterminer si le tabagisme maternel notamment passif pouvait retentir sur la circulation pulmonaire du fœtus.

Lors de l'exposition à la fumée de cigarette, nous avons mis en évidence une vasoconstriction artérielle pulmonaire associée à une altération de la réactivité vasculaire pulmonaire à l'oxygène. Nous avons aussi retrouvé une diminution significative de la PO₂ fœtale, non associée à une hypoxie maternelle. Enfin, il existait une augmentation significative de la fraction de carboxyhémoglobine (FCOHb) fœtale durant l'exposition tabagique.

Chez l'enfant en cas de tabagisme actif et passif, on retrouve une augmentation de la fréquence des pathologies respiratoires à type de pneumonie et de bronchite, des allergies, des anomalies du comportement à type de troubles de l'attention, de la concentration, d'agressivité et d'agitation, une diminution du quotient intellectuel [102]. Nos recherches ont pu mettre ainsi en évidence pour la première fois in vivo une vasoconstriction pulmonaire chez le fœtus lors de l'exposition maternelle tabagique.

Nous avons aussi pu montrer que l'exposition maternelle passive et prolongée à la fumée de cigarette (mimant la situation d'une femme enceinte exposée dans un endroit confiné) entraînait une augmentation de la FCOHb fœtale et une hypoxie fœtale. Socol et al ont aussi observé ce phénomène en exposant des femelles Macaques rhésus gestantes à la fumée de cigarette pendant 30 minutes[103]. Ils ont montré chez le fœtus une diminution de la PO₂ fœtale dès la 15^{ème} minute avec un nadir 30 minutes après l'arrêt de l'exposition et une baisse de la PCO₂ fœtale.

Dans une pièce confinée, les fumeurs passifs sont exposés à des taux de CO entre 25 à 100 ppm[104]. Les effets sur la santé humaine varient selon le taux de carboxyhémoglobine (FHbCO) dans le sang. La mesure de la FCOHb foetale sur sang du cordon est multipliée par 1/3 chez le nouveau-né par rapport à sa mère à la naissance [105]. De même, le taux de HbCO fœtale chez les femmes fumeuses mesuré lors de cordocentèse dans le cadre du diagnostic prénatal est multiplié par deux par rapport à celui des femmes non fumeuses (6.2% versus 2.9%)[106]. Au niveau expérimental,

Longo et al. ont étudié l'évolution du taux de carboxyhémoglobine fœtale et maternelle chez des brebis gestantes pendant l'inhalation de différentes concentrations de CO[107]. A 30 ppm de CO, la FCOHb maternelle passait de 1,1 % à 4,6 % en 8 à 10 heures. La FCOHb fœtale passait de 1,8 % à 7,4 % plus progressivement en 36 à 48 h. La PO₂ fœtale était significativement diminuée chez le fœtus. À 50 ppm, la FCOHb maternelle atteignait 7,2 % et la FCOHb fœtale 11,3%. Dans notre étude, les brebis gestantes étaient exposées de façon plus prolongée, ce qui peut expliquer le fait que la FCOHb fœtale augmente de façon plus importante.

Les mécanismes possibles de la vasoconstriction artérielle pulmonaire peuvent être variés car il existe de nombreux composants dans la fumée de cigarette, plus de 400. Ces composants sont les mêmes entre la fumée inhalée par les fumeurs actifs et celle inhalée par les fumeurs passifs [108]. Ils peuvent être divisés en 2 catégories : la phase gazeuse et la phase particulaire[109]. La phase gazeuse comprend le CO. L'hémoglobine a une affinité plus élevée pour le CO que pour l'oxygène et l'affinité pour le CO est plus grande chez le fœtus que chez l'adulte. Le CO déplace la courbe de dissociation de l'O₂ vers la gauche, entraînant une diminution de la dissociation de l'oxyhémoglobine (O₂Hb). La phase particulaire contient la nicotine. Le contenu des cigarettes en nicotine varie entre 0,04 et 3,5 mg par cigarette. La nicotine est métabolisée par le foie en cotinine qui est pharmacologiquement inactif. La demi-vie plasmatique de la nicotine est de 40 minutes alors que celle de la cotinine est de 15 à 30 heures. Ainsi, le dosage de la cotinine permet de connaître l'index d'exposition à la nicotine. La nicotine passe dans la circulation fœtale[110].

Un des mécanismes pouvant être responsable de la vasoconstriction pulmonaire est l'hypoxie. L'effet hypoxique de la nicotine est controversé dans la littérature. Monheit et al. ont injecté des doses croissantes de nicotine en intraveineux chez la brebis gestante[111]. La PO₂ et le pH du fœtus ne se sont pas altérés, seule la PCO₂ fœtale a baissé de façon significative à la posologie élevée de 1,5 mg/mn. Suzuki et al. ont injecté de la nicotine à des singes gestantes mais à des posologies plus importantes (100 µgr/min/kg) et ont obtenu une diminution significative du flux utérin avec hypoxie et acidose fœtales[112]. Suzuki avait montré auparavant que l'injection de nicotine provoquait ces effets seulement si elle était injectée à la brebis gestante et non au fœtus [113]. L'étude de la littérature suggère que l'injection maternelle, et non fœtale, de

nicotine induit une diminution du flux sanguin utérin par un agent sympathomimétique (norépinéphrine et épinéphrine), entraînant une hypoxie ou hypoxémie [111-116].

On a en effet constaté chez les femmes enceintes fumeuses chroniques que la consommation de 2 cigarettes entraînait une augmentation rapide et significative de la norépinéphrine et de l'épinéphrine [117].

La nicotine pourrait donc être responsable de l'hypoxie de façon indirecte par effet sur la circulation placentaire. Mais un effet propre sur le poumon peut-être associé puisque des récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine de type $\alpha 7$ n Ach r ont été retrouvés dans le poumon fœtal [118].

Les récepteurs sont aussi retrouvés au niveau des vaisseaux pulmonaires et l'exposition à la nicotine de singes gestantes entraîne une augmentation de l'épaisseur de la paroi des vaisseaux, ainsi qu'une augmentation de l'expression des ARNm du collagène de type I et III et de leurs protéines correspondante[119]. Ces altérations structurales vasculaires pourraient être à l'origine de l'HTAP. Au niveau épidémiologique on a mis en évidence une plus grande fréquence de l'hypertension artérielle pulmonaire chez les nouveaux-nés de mères fumeuses [95,96].

De nombreuses études réalisées in vitro montrent un lien possible entre le tabagisme et la modification de cette réactivité pulmonaire. Carlo et al. montrent une diminution de la vasodilatation endothéliale-dépendante des artères pulmonaires d'embryons de poulets exposés chroniquement à des extraits de fumée de cigarette [120]. Hutchison et al. ont exposé des lapins à la fumée de cigarette et on retrouvé une altération de la vasodilatation des artères pulmonaires à l'acétylcholine[121].

On peut donc émettre plusieurs hypothèses quant aux mécanismes de la vasoconstriction pulmonaire foetale:

- l'hypoxémie foetale par diminution de la PO₂ foetale (par baisse du flux sanguin utérin, et/ou par augmentation du taux de carboxyhémoglobine foetale),
- la diminution de la réactivité vasculaire pulmonaire à l'oxygène.

La circulation pulmonaire foetale est très sensible aux variations de la PaO₂. Une augmentation de la PaO₂ induit une chute des RVP. À l'inverse, une hypoxie induit une augmentation des RVP, notamment en postnatal, où l'hypoxie est reconnue comme étant un facteur majeure de l'HTAP du nouveau-né. Le mécanisme d'action de l'O₂ fait intervenir plusieurs voies métaboliques. L'O₂ est susceptible de moduler le statut

« redox » de la cellule musculaire ce qui influe sur l'état d'ouverture de certains canaux potassiques, sur la polarisation de la cellule musculaire lisse et donc sur l'état d'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants[122]. Le NO est aussi impliqué dans la vasodilatation pulmonaire médiée par l'O₂. In vivo, chez le fœtus d'agneau sain, deux études ont montré que le LNA réduisait la vasodilatation pulmonaire qui survient normalement à la naissance lors de la ventilation alvéolaire en oxygène pur [7-123].

Hutchinson et al. retrouvent une diminution de l'activité de la NOs et une diminution du contenu endothélial en L-arginine chez des lapins exposés à la fumée de cigarette[124].

On peut donc émettre comme hypothèse que les composants de la fumée de cigarette, en inhibant la voie du NO (vasodilatation endothéliale-dépendante Fig 3), bloquent un des mécanismes d'action de l'oxygène, entraînant une vasoconstriction des vaisseaux pulmonaires.

Quelque soit le mécanisme, il y a finalement une atteinte de la vasodilatation endothéliale-dépendante.

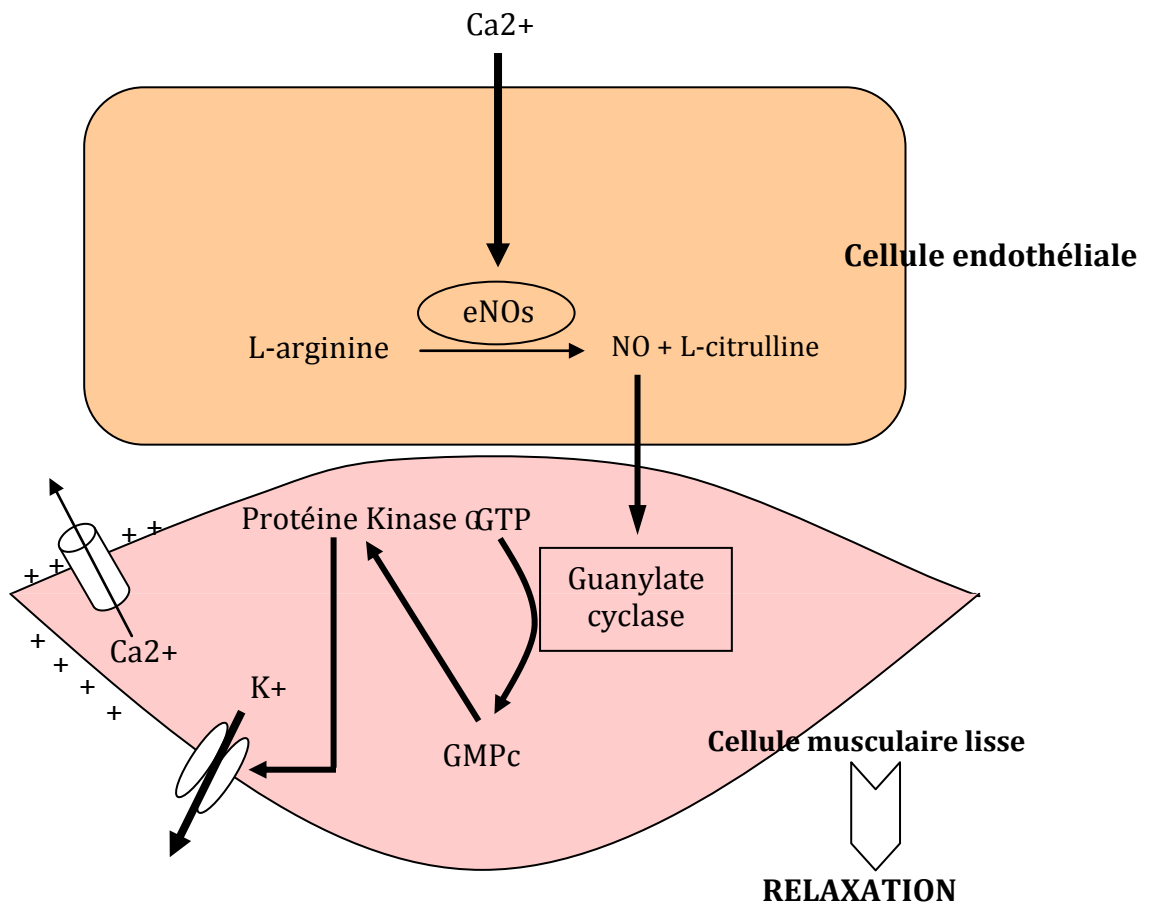


Figure 3 : Schématisation de la voie du NO.

Chapitre 5 : effets de l'apeline sur la circulation pulmonaire fœtale

1. Introduction

Durant la grossesse, le système pulmonaire fœtal est caractérisé par la présence de liquide pulmonaire au sein des alvéoles pulmonaires et par une circulation pulmonaire fœtale spécifique. Les RVP des artères pulmonaires restent élevées durant toute la grossesse. L'adaptation du système respiratoire à la naissance doit être rapide et passe la résorption du liquide pulmonaire grâce aux pompes Na^+/K^+ ATPase et des canaux sodés spécifiques, la sécrétion de surfactant, et l'augmentation brutale du débit vasculaire pulmonaire avec chute des RVP par [11,45]. La vasodilatation des vaisseaux pulmonaires est indispensable pour permettre l'augmentation du débit pulmonaire. Les mécanismes responsables de cette vasodilatation ne sont pas encore tous connus. Les catécholamines jouent un rôle dans l'adaptation cardio-respiratoire à la naissance, elles sont responsables d'une augmentation de la pression intra-aortique et de la contractilité du ventricule gauche. Elles participent également à la résorption du liquide pulmonaire. Un précédent travail avait retrouvé que la Noradrénaline entraînait un puissant effet vasodilatateur sur les artères pulmonaires [125]. En 1993, un nouveau gène codant pour un récepteur couplé à une protéine G était identifié pour ses similitudes avec le récepteur à l'angiotensine[126]. En 1998 le ligand nommé Apeline (APJ Endogenous Ligand) de ce récepteur appelé APJ était découvert par Tatemoto [13]. Les techniques de biologie moléculaire et d'immuno-histochimie ont permis de définir une représentation importante de l'Apeline et de son récepteur APJ chez le rat, la souris et l'homme au sein du parenchyme pulmonaire[14]. Sur le plan cardiaque, des études *in vitro* ont montré chez l'homme et chez le rat un très puissant effet inotrope positif [128,129]. Dans les vaisseaux, l'apeline présente un effet vasodilatateur en agissant de façon autocrine sur les cellules endothéliales, médié par la voie du NO[15,16]. Mais elle possède également un effet vasoconstricteur par action paracrine directement sur les cellules musculaires lisses des veines saphènes humaines dénudées[17].

Aucune étude n'a étudié, à ce jour, l'effet de l'apeline sur la circulation pulmonaire fœtale. L'objectif principal de notre étude était d'évaluer *in vivo* les effets vasculaires pulmonaires de l'apeline à des concentrations croissantes sur un modèle expérimental de fœtus de brebis instrumenté de façon chronique in utéro.

2. Matériel et méthode

2.1. Modèle expérimental

Cf. chapitre 3

2.2. Protocoles

2.2.1. Protocole « vaso-réactivité de l'apeline » :

Nous avons testé 4 doses différentes d'apeline selon le même protocole : 0,25mg, 0,5mg, 1mg, 2mg. Perfusion sur l'APG de SSI à 12mL/h avec mesure toutes les 10min de la PAo, PAP, FC, du Qp et calcul des RVP jusqu'à obtention d'une stabilité hémodynamique de 30min. Une perfusion d'apeline sur l'APG au débit de 12mL/h pendant 2 heures était effectuée. Puis on perfusait du SSI sur l'APG au débit de 12mL/h pendant 2 heures. Toutes les 10min de la Pao, PAP, FC, du Qp étaient relevés et on calculait les RVP. Des GDS et une lactatémie étaient pratiqués à T0, T30, T150, T210. (figure4)

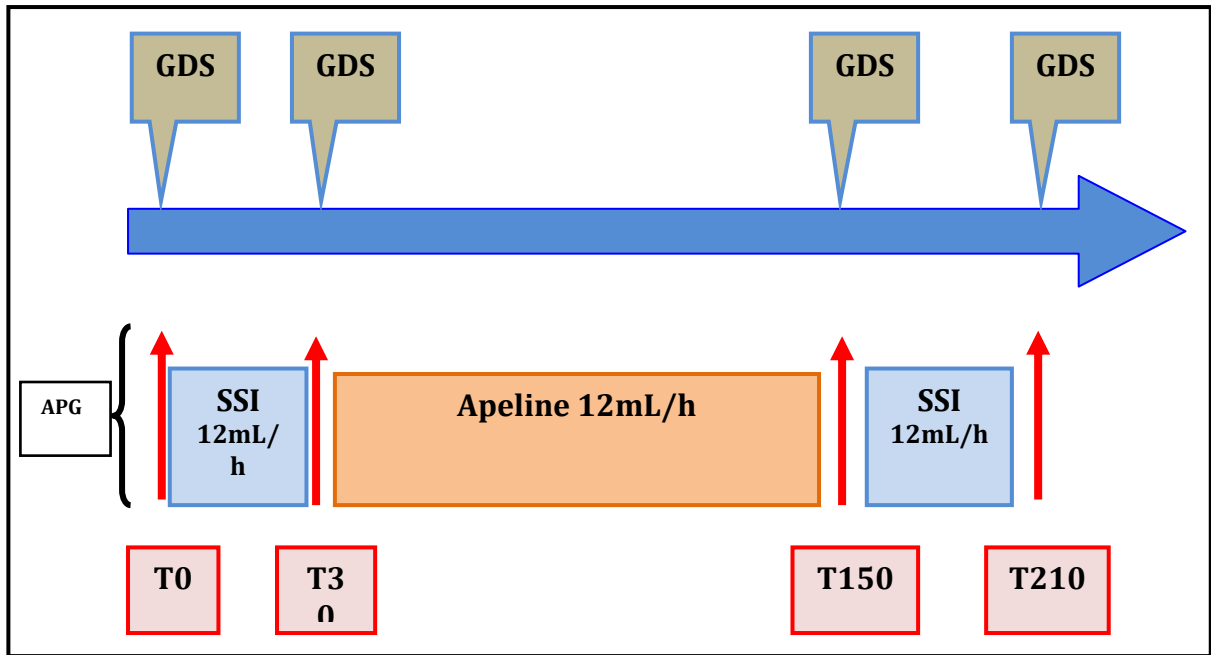


Figure 4 : Protocole expérimental d'étude de la vaso-réactivité de l'apeline.

Une expérimentation témoin était réalisée en perfusant en place de l'apeline un soluté d'éthanol (solvant de l'apeline, dose totale d'éthanol pur : 0,25mL) au débit de 12mL/h. (figure 5)

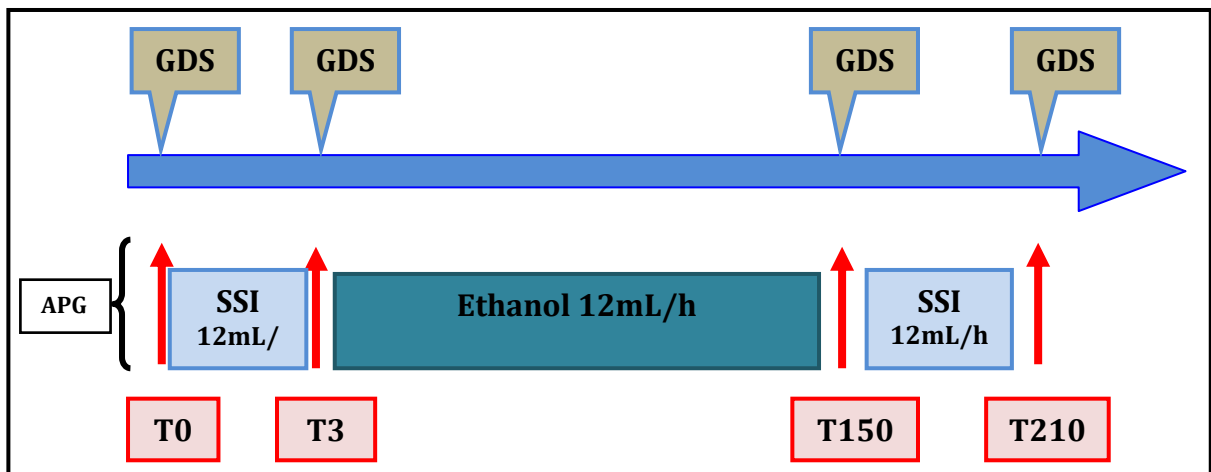


Figure 5 : Protocole expérimental d'étude de la vaso-réactivité de l'éthanol (protocole témoin).

2.2.2. Protocole « voie d'action de l'apeline » :

Pour étudier la voie d'action de l'apeline pouvant aboutir à une vaso-activité, nous avons testé l'effet de l'apeline après avoir inhibé la libération de calcium intracellulaire. Pour cela nous réalisons une perfusion sur l'APG de SSI au débit de 12mL/h jusqu'à obtention d'une stabilité hémodynamique de 30min, puis une perfusion sur l'AP d'un inhibiteur calcique, la Nicardipine (Loxen®) pendant 2 heures au débit de 3,7mL/h de T0 à T120. La perfusion sur l'APG de 2mg d'Apeline était faite au débit de 12mL/h pendant 2 heures de T30 à T150. Enfin une perfusion sur l'APG de SSI au débit de 12mL/h pendant 1 heure était réalisée à la suite immédiate de l'apeline, soit de T150 à T 270. Durant toute la procédure, les PAP, Pao, FC, Qp étaient relevés et les RVP calculées toutes les 10 minutes, les GDS avec lactatémies étaient réalisés à T0, T30, T150, T210. (figure 6)

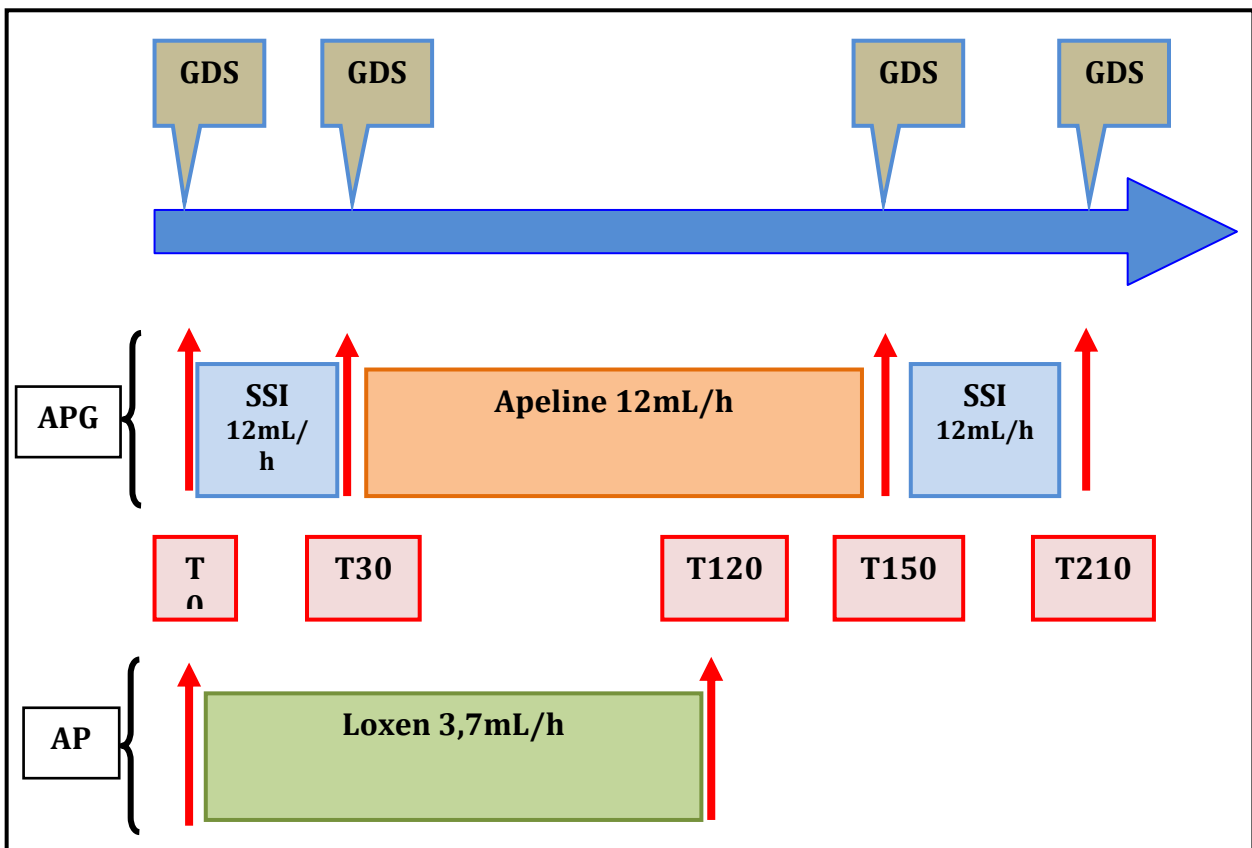


Figure 6 : Protocole expérimental d'étude de la voie d'action de l'apeline.

2.3. Préparation des produits :

L'apeline 13 utilisée (Spibio, Laboratoire Bertin, Montigny-le-Bretonneux, France) était soluble dans l'éthanol (20mg/mL). Cinq milligrammes de cette forme cristalloïde d'apeline était dilué dans 0,25mL d'éthanol puis 50µL de la solution mère étaient réparties dans 5 aliquotes contenant donc chacun 1mg d'apeline. Des seringues de 24mL étaient ensuite préparées pour une injection de 2 heures à 12mL/h avec du SSI et de l'apeline pour obtenir les testées 0,25mg, 0,5mg, 1mg, 2mg.

La Nicardipine (Loxen® 10mg/10ml) était diluée dans du sérum glucosé 5% (SG5%) à raison de 1mL pour 5mL de SG5%. Notre objectif était de tester 1,5mg.

La préparation de la solution d'éthanol (solution témoin) était préparée en ajoutant 0,25mL d'éthanol pur à 23,75mL de solution mère de SSI perfusée sur 2 heures sur l'APG.

2.4. Analyse statistique

Les analyses statistiques étaient réalisées grâce au logiciel Stat View 5.0 (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). L'ensemble des résultats était présenté selon la moyenne \pm ESM. Certaines courbes représentent le pourcentage de variation par rapport à la base. La valeur « n » représentait le nombre de fœtus dans chaque protocole. Le seuil de significativité était $p < 0,05$.

Les tests utilisés pour étudier la significativité des variations au cours du temps des résistances, des débits et des pressions étaient une analyse de variance pour mesures répétées (test ANOVA pour mesures répétées) et le test de Bonferroni-Dunn pour comparer plusieurs valeurs entre elles dans le temps en cas de significativité sur le test ANOVA pour mesures répétées. Le test de Mann-Whitney était utilisé pour comparer les valeurs de GDS en début et après 2 heures de perfusion d'apeline.

3. Résultats

Quatorze brebis ont été opérées à 128 jours de gestations. Les valeurs de base (PAP, Q, PVR, FC, PAo, gaz du sang) étaient similaires dans les protocoles.

3.1. Protocole « vaso-réactivité de l'apeline » :

Sur les 4 doses testées d'apeline, seules 1 et 2 mg entraînaient une modification du Q et des RVP. L'injection de 0,25 mg (n=3) et de 0,5 mg (n=6) d'apeline n'entraînait aucune modification ni de la gazométrie, ni des pressions systémiques, ni du Q, ni des RVP. Après l'injection de 1 mg (n=8) d'apeline la PAP n'était pas modifiée mais le Q diminuait de 20,6% (de $90,63 \pm 9,14$ à $79,33 \pm 18,18$ mL / min ; $p < 0,0001$) et les RVP augmentaient de 30,8% (de $0,51 \pm 0,017$ à $0,63 \pm 0,12$ mmHg / mL / min ; $p < 0,0002$) (figure.7). L'injection de 1 mg d'apeline ne modifiait pas les gaz du sang, ni les pressions systémiques ou la FC (tableau 1).

Tableau 1 : Valeurs des Gaz du Sang artériels avant et après perfusion d'Apeline 1mg.
SaO₂= saturation artérielle en oxygène, Moyenne \pm SD, Seuil de significativité $p < 0,05$, NP=Non Significatif

	Protocole Apeline 1mg		Protocole Apeline 2 mg		P
	Avant	Après	Avant	Après	
pH	$7,37 \pm 0,01$	$7,35 \pm 0,01$	$7,38 \pm 0,01$	$7,38 \pm 0,02$	NP
pCO₂	$37,9 \pm 3,2$	$39,53 \pm 2,6$	$36,23 \pm 2,8$	$39,90 \pm 0,4$	NP
pO₂	$15,55 \pm 0,8$	$16 \pm 1,03$	$17,33 \pm 1,2$	$16,66 \pm 1,45$	NP
HCO₃⁻	$22,93 \pm 1,8$	$22,4 \pm 1,7$	$21,93 \pm 1,7$	$23,93 \pm 1,1$	NP
SaO₂%	$20,66 \pm 1,9$	$20,33 \pm 2,2$	$24,66 \pm 3,9$	$22,33 \pm 4,3$	NP
Lactate	$1,67 \pm 0,6$	$1,44 \pm 0,5$	$1,19 \pm 0,2$	$1,03 \pm 0,1$	NP

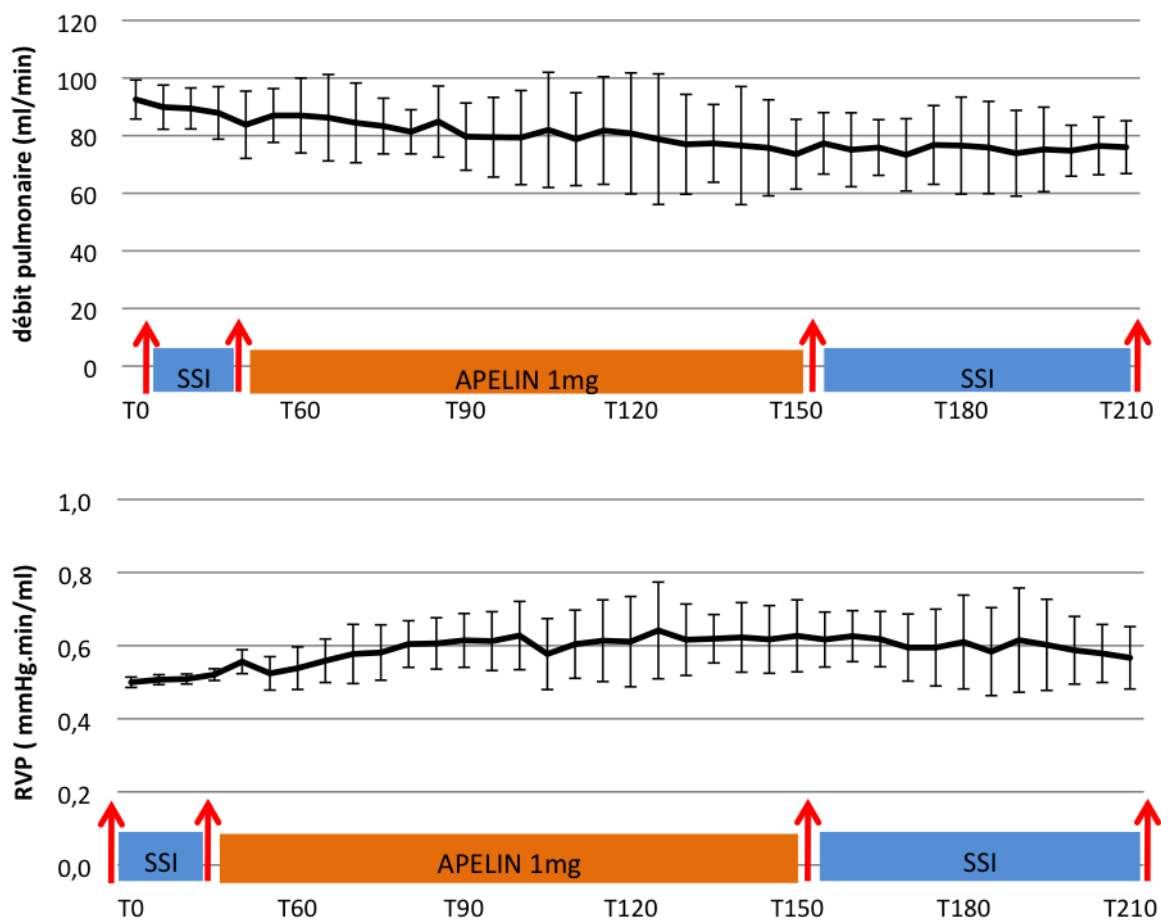


Figure 7 : Effets hémodynamiques de la perfusion de 1mg d'Apeline (12 mL/h pendant 2h) (n=8) : RVP = résistances vasculaires pulmonaires, exprimées en valeurs moyennes et écarts à la moyenne.

Après l'injection de 2 mg d'apeline (n=5) la PAP n'était pas modifiée mais on voyait une diminution de 33,7% du Q (de $90,53 \pm 6,15$ à $60 \pm 24,58$ mL / min ; $p < 0,05$) et une augmentations des RVP de 90% (de $0,51 \pm 0,02$ à $0,97 \pm 0,66$ mmHg / mL / min ; $p < 0,05$) (figure 8). Cette injection n'altérait pas les gaz du sang et ne modifiait ni les pressions systémiques ni la FC (tableau 1). La perfusion de SSI associée à de l'éthanol (n=8) ne modifiait les pressions systémiques, ni le Q, ni les RVP, ni les GDS.

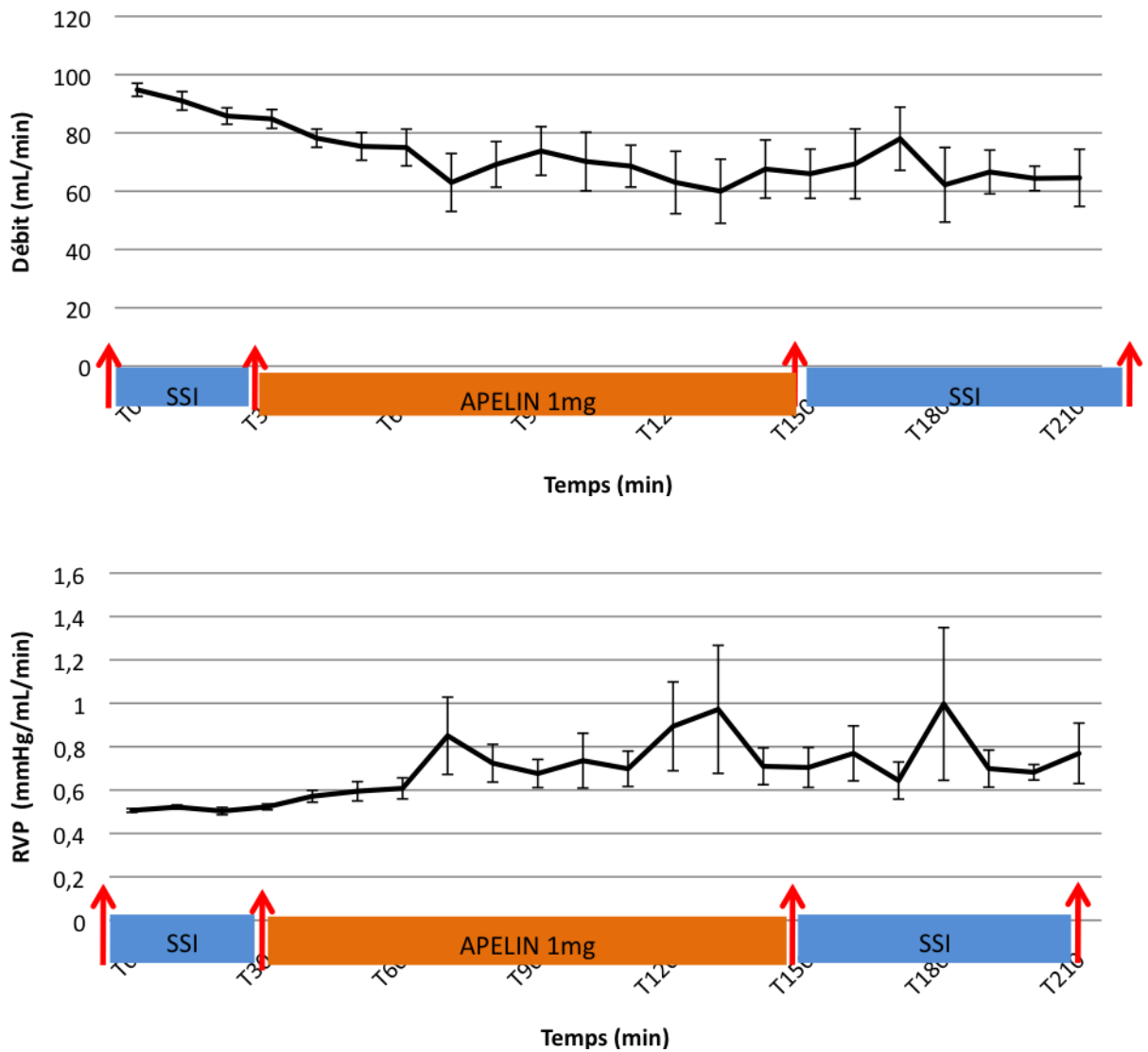


Figure 8 : Effets hémodynamiques de la perfusion de 2mg d'Apeline (12 mL/h pendant 2h) (n=5) : RVP – résistances vasculaires pulmonaires, exprimées en valeurs moyennes et écarts à la moyenne.

3.2. Protocole « voie d'action de l'apeline » (n= 1):

La perfusion de 1,5mg de Nicardipine (soit 0,5 mg/Kg) entraînait une augmentation du Qp de 87,2% et une diminution des RVP de 55,7%. L'injection secondairement d'apeline n'entraînait aucune modification du Q ou des RVP (figure 9). L'injection de Nicardipine suivi d'apeline n'altérait ni les gaz du sang, ni la Pao, ni la FC.

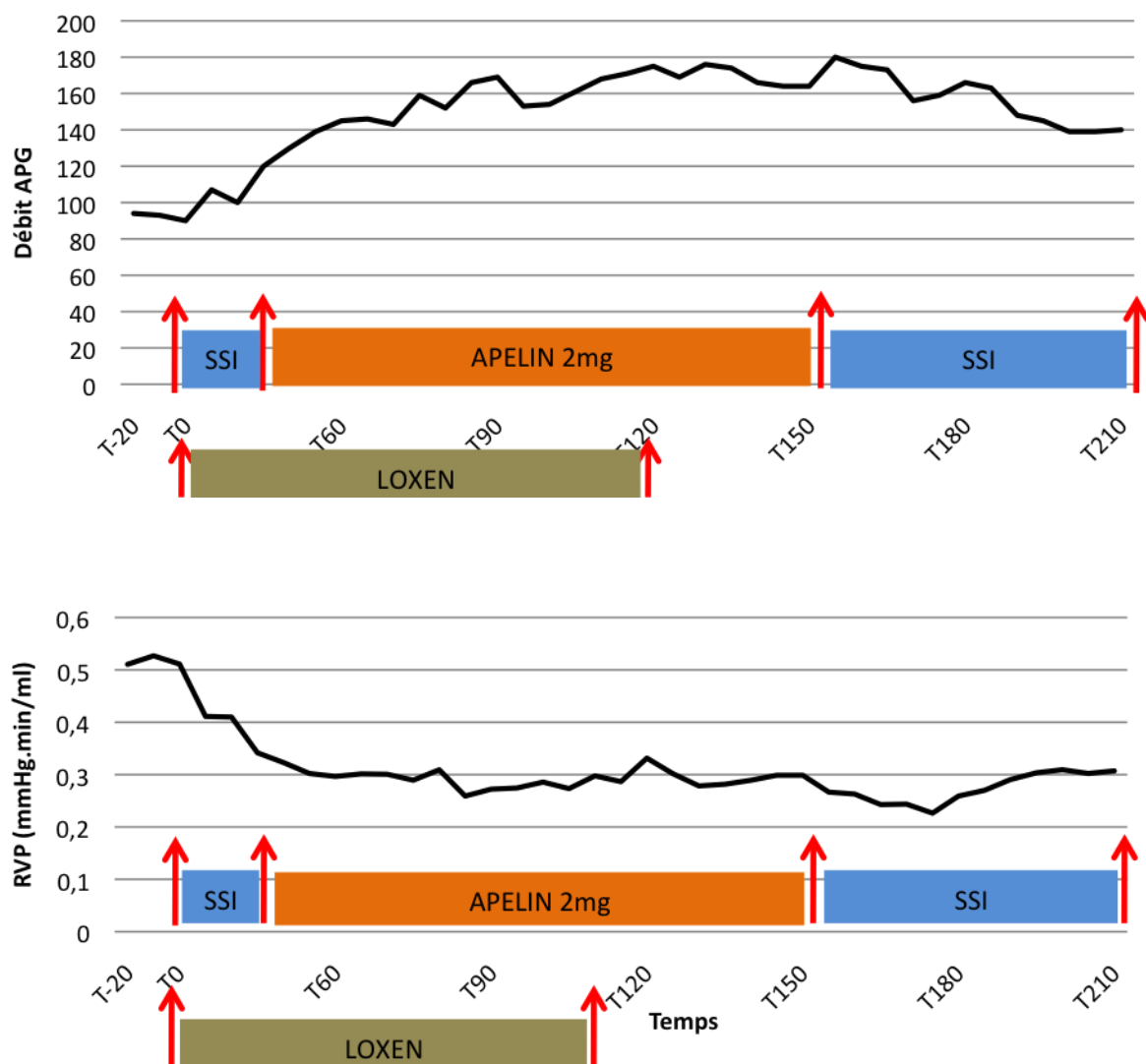


Figure 9: Effets hémodynamiques sur le débit pulmonaire fœtal et les résistances vasculaires pulmonaires (RVP) de la perfusion de Nicardipine (Loxen®) et d'Apeline 2mg (n=1).

4. Discussion

L'apeline et son récepteur APJ sont présents en concentration importante au niveau de la paroi vasculaire. Son rôle dans la régulation du tonus vasculaire et ses mécanismes d'actions sous-jacents ne sont pas encore tous connus. Notre hypothèse de recherche était que l'apeline au niveau de la circulation pulmonaire du fœtus de brebis possédait également une activité vasomodulatrice.

Les travaux que nous avons réalisés jusqu'à présent nous permettent de présenter plusieurs résultats. Au cours de l'ensemble des expérimentations pratiquées, l'injection d'apeline sur l'APG ne modifiait ni la fréquence cardiaque, ni la PAo et la PAP ce qui

témoigne de l'absence d'effet systémique de l'apeline. De plus, les résultats gazométriques notamment la PaO₂ et la lactatémie n'étaient pas modifiées. L'apeline n'était donc pas responsable d'une toxicité fœtale. Nous avons testé 4 concentrations d'apeline différentes de 0,25mg à 2mg en perfusion sur 2 heures ce qui correspond à des concentrations de 0,7 à 5,5µg/Kg/min. Pour des concentrations de 0,25mg et 0,5mg les débits de l'APG n'étaient pas modifiés de même que les RVP de l'APG. Pour une concentration de 1mg, la FC, la PAP et la PAo n'étaient pas modifiées mais les débits diminuaient de façon significative de 20,6% et les RVP augmentaient significativement avec un pourcentage de variation maximale par rapport à la base de 30,8%. Une perfusion de 2mg d'apeline était responsable d'une diminution des débits et d'une augmentation importante des RVP (respectivement 33,7% de diminution maximale des débits et 90% de pourcentage maximal de variation par rapport à la base). Nous avons donc montré que l'apeline présente sur les artères pulmonaires du fœtus de brebis une puissante action vasoconstrictrice dose-dépendante pour des concentrations supérieures ou égales à 1mg sans modifier la circulation systémique ni être responsable d'une toxicité fœtale.

L'apeline et son récepteur APJ sont connus pour être fortement exprimés au niveau pulmonaire ainsi que précocement dans le développement embryonnaire au niveau de la paroi des vaisseaux [15,17,129-131]. A ce jour, il existe peu d'études ayant étudié l'effet hémodynamique de l'apeline sur gros animaux [132,133] et aucune chez le fœtus. Ces précédents travaux ont par ailleurs étudié l'effet hémodynamique systémique de bolus d'apeline injecté par voie intra veineuse, nous avons préféré observer l'action de l'apeline sur le plan systémique et local lors de l'injection prolongée sur 2 heures au niveau de l'artère pulmonaire gauche.

Sur le plan hémodynamique, de nombreux travaux ont été réalisés mais des résultats différents sont retrouvés. Les travaux de Tatemoto retrouvaient une baisse significative de la pression artérielle (PA) chez le rat abolie par le L-Name, inhibiteur de la voie du NO [16]. De même, Cheng en 2003 retrouvait chez le rat conscient un effet vasodilatateur de l'apeline 12 à la fois artériel et veineux [134]. Cette vasodilatation est médiée via la voie du NO et inhibée par les inhibiteurs de la NO synthase [14, 16, 127, 130, 135,136].

Mais une activité vasoconstrictrice de l'apeline était retrouvée dans les travaux in vitro de Katugampola sur des veines saphènes humaines dénudées avec un effet vasoconstricteur comparable à celui retrouvé pour l'endothéline 1 et l'urotensin II [17].

La [Pyr] apeline 13 (20 et 50nM) chez des rats conscients était également vasoconstrictrice lors de son injection en intra-ventriculaire cérébrale et en intra-veineux [137].

Les travaux de Charles et al en 2006 menés chez la brebis mettaient en évidence une activité biphasique dose et temps-dépendante lors de l'injection de 1mg d'apeline avec une courte phase vasodilatatrice suivie d'une phase vasoconstrictrice [132,138]. De même, sur un modèle expérimental d'embolie pulmonaire aigue chez le chien, il était constaté une baisse suivie d'une augmentation de la PA [133]

Comme nous venons de le voir, les effets hémodynamiques de l'apeline sont complexes et ses mécanismes d'action ne sont pas tous connus à ce jour. Elle possède un effet vasodilatateur endothélium-dépendant via la voie du NO [15,127,130,135,136] et un effet vasoconstricteur passant par les cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire [14].

En 2002, Szokodi mettait en évidence une activité inotrope positive dose-dépendante de l'apeline plus importante que l'endothéline 1 [128]. Cet effet mettait en jeu la voie de la Phospholipase C (PLC), de la Proteine kinase C (PKC) ainsi que les échangeurs Na^+/H^+ du sarcoleme et les échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ aboutissant à l'augmentation du Ca^{++} intra cellulaire et à la contraction du cardiomyocyte. Selon Masri le récepteur de l'apeline couplé à une protéine G_i inhibe l'adénylcyclase et active la voie de la PLC et de PKC [129]. Nous avons voulu tester in vivo un inhibiteur non toxique pour le fœtus de la libération de Ca^{++} intra cellulaire dépendant des canaux calcique voltage-dépendant et de la voie du Diacylglycerol (DAG) et de la PLC. L'injection de Nicardipine (Loxen®) était responsable d'une vasodilatation qui n'était pas modifiée par l'apeline à la concentration la plus vasoconstrictrice que nous ayons testée. Ceci tend à prouver que l'activité vasoconstrictrice de l'apeline passe par les canaux calciques voltage dépendant.

Notre travail constitue la première étude à évaluer l'action de l'apeline en perfusion lente sur gros animal. Les concentrations utilisées par Lee, Tatemoto et Cheng étaient comprises entre 3 et 15 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ tandis que celles utilisées par Charles et Kagiyaama étaient entre 20 et 250 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ [13,15,132,134,137]. Nos concentrations de 0,25mg à 2mg sur 2heures étaient comprises entre 0,7 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{min}$ et 5,5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$. Les résultats obtenus étaient en faveur d'un effet dose et temps-dépendant.

Dans notre étude, nous avons retrouvé une absence de modification de la FC, de la PAo et de la PAP. Néanmoins, n'étant pas certains que l'apeline ne soit pas dégradé

directement au niveau pulmonaire, nous ne pouvons affirmer son absence d'effet systémique.

Nous avons montré un effet vasoconstricteur de l'apeline sur les artères pulmonaires fœtales de brebis. Les principaux agents vasoactifs comme l'angiotensine II, l'endothéline 1 ou la noradrénaline exercent leur effet également via un récepteur couplé à une protéine G spécifique à 7 domaines transmembranaires. Pour l'endothéline de type 1, King mettait en évidence une activité biphasique d'abord hypotensive de façon transitoire courte et précoce puis hypertensive dose dépendante plus tardive et plus prolongée [139]. Les études hémodynamiques réalisées sur l'urotensine II humaine ont retrouvé également un effet vasodilatateur endothélium-dépendant via la voie du NO suivie d'un puissant effet vasoconstricteur [140,141]. Les mécanismes d'action de l'urotensine II décrit par Maguire semblent très proches de ceux de l'apeline [141].

Douglas et al ont comparé les effets de l'urotensine II en fonction du type d'artères et en fonction de l'espèce animale étudiée et d'importantes différences ont été retrouvées [142].

De même, de précédents travaux réalisés par notre équipe de recherche avaient retrouvé une action vasodilatatrice de la Norépinéphrine (Noradrénaline®) lors de son injection au niveau de l'artère pulmonaire gauche du fœtus de brebis alors que sa puissante activité vasoconstrictrice chez l'Homme adulte était largement démontrée [143].

Il est fortement probable que l'apeline qui semble très proche d'un point de vue configurationnel, mode d'action et voies de signalisation intra cellulaire avec ces agents vasoactifs possède une activité différente selon le type d'artères et l'espèce animale étudiée.

L'apeline et son récepteur sont en concentration importante au niveau plasmatique dans la période fœtale et diminue rapidement après la naissance [144]. Cette différence de concentration pré et post natale et l'effet vasoconstricteur sur les artères pulmonaires fœtales que nous avons démontré nous laisse à penser que l'apeline joue un rôle majeur dans le tonus pulmonaire fœtal prénatal.

Un stress aigu ou chronique est responsable d'une augmentation du taux d'ARNm de l'APJ [129,145]. Le système apelinergique pourrait donc être impliqué dans les situations d'hypertension artérielle pulmonaire néonatale, dans les situations d'accouchement difficile et de stress à la naissance contribuant à une maladaptation à la

vie extra-utérine accompagnant les situations de stress périnatal. Il pourrait être dans ce sens une cible thérapeutique de premier ordre dans les pathologies respiratoires d'hypertension artérielle pulmonaire néonatale.

Chapitre 6 : effets de la DHEA sur la circulation pulmonaire fœtale, étude expérimentale chez le fœtus de brebis

1. Introduction

La Déhydroépiandrostérone (DHEA) est une hormone stéroïdienne sécrétée par la corticosurrénale, c'est l'hormone stéroïdienne la plus abondante circulant chez l'homme[146]. Son taux est progressivement décroissant avec l'âge. Elle n'a pas de rôle clairement déterminé chez l'homme mais de nombreuses études suggèrent un rôle protecteur cardiovasculaire et de multiples autres effets bénéfiques (hormones anti vieillissement)[147].

Des études récentes ont mis en évidence une activité de la DHEA sur la circulation pulmonaire. Elle améliore l'hypertension artérielle pulmonaire chronique chez le rat (induite par exposition à l'hypoxie chronique ou par injection de Monocrotaline)[148-151]. In vitro, la DHEA entraîne une vasodilatation sur des cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires humaines[152]. Cependant l'effet de la DHEA sur la circulation pulmonaire fœtale n'est pas connu.

Notre hypothèse est que la DHEA a un effet vasodilatateur pulmonaire fœtal, qui pourrait permettre son utilisation thérapeutique dans l'HTAPP des nouveau-nés. Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié les effets vasculaires pulmonaires de la DHEA sur le modèle de fœtus de brebis instrumenté de façon chronique in utero. Nous avons par ailleurs cherché à en comprendre les mécanismes d'action.

2. Matériel et méthode

2.1. Modèle expérimental

Cf chapitre 3

2.2. Protocoles

Les mesures étaient réalisées lorsque la vitalité fœtale était correcte ($\text{pH} > 7,32$ et lactacidémie $< 3 \text{ mmol/l}$) et s'il n'existait pas d'instabilité hémodynamique fœtale. Chaque injection d'agent pharmacologique était effectuée à 24h d'intervalle de la précédente afin d'éviter toute interférence d'action.

En se basant sur une étude chez le furet, nous avons décidé de tester 3 doses croissantes de DHEA : 6 mg, 12 mg et 24 mg[153].

2.2.1. Injection intra veineuse directe à dose croissante

Le protocole a consisté à tester 3 doses croissantes de DHEA en intraveineux directe (IVD). Après obtention d'une stabilité hémodynamique de 30 minutes sous perfusion de sérum physiologique à 6 ml/h sur le cathéter veineux, la solution de DHEA était injectée en IVD, puis rincée par 5 ml de sérum physiologique hépariné (Figure 10)

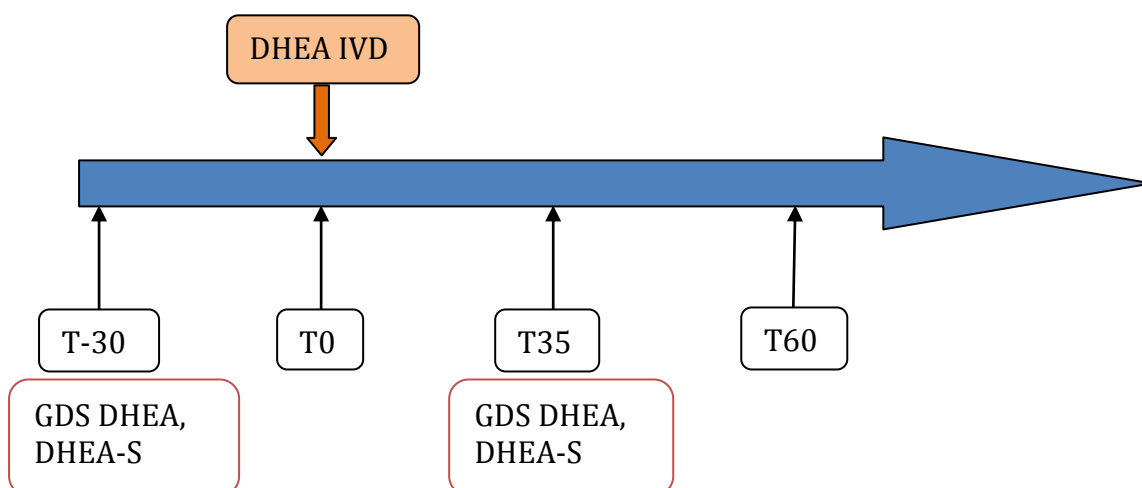


Figure 10 : Protocole d'injection de DHEA IVD

Les mesures hémodynamiques étaient relevées toutes les 10 minutes pendant la période de stabilité, puis toutes les 5 minutes après l'injection de DHEA pendant 35 minutes, puis toutes les 10 minutes jusqu'à 65 minutes de l'injection.

Des prélèvements sanguins (2 ml de sang) étaient effectués à l'agneau (cathéter aortique) et à la brebis (cathéter jugulaire) avant l'injection et 35 minutes après l'injection. Ces prélèvements permettaient les dosages de DHEA et DHEA-sulfate (DHEA-S) et la réalisation de GDS.

Les prélèvements étaient effectués sur tubes secs puis centrifugés à 3000 tours/min pendant 15 minutes à 4°C. Le sérum était alors prélevé et réparti en 2 aliquotes de 300 à 500 µl chacun, puis congelés à -20°C en attendant les dosages. Les dosages étaient effectués au laboratoire de biochimie section endocrinologie sous la direction du Professeur Pigny (Centre de biologie et pharmacologie, CHRU de Lille). Les résultats étaient exprimés en ng/ml pour les taux de DHEA et en µmol/l pour les taux de DHEA-S.

Afin de s'assurer que les adjuvants (DMSO et Crémophor®) n'avaient pas d'effet vasculaire propre, nous avons effectué des manipulations témoins. Deux types de témoin ont été nécessaires : une solution témoin à 2% (0,1 ml de DMSO, 0,1 ml de Crémophor® et 4,8 ml de sérum physiologique) et une solution témoin à 4% (0,2 ml de DMSO, 0,2 ml de Crémophor® et 4,6 ml de sérum physiologique). L'injection se faisait en IVD dans les mêmes conditions que l'injection IVD de DHEA (Figure 11)

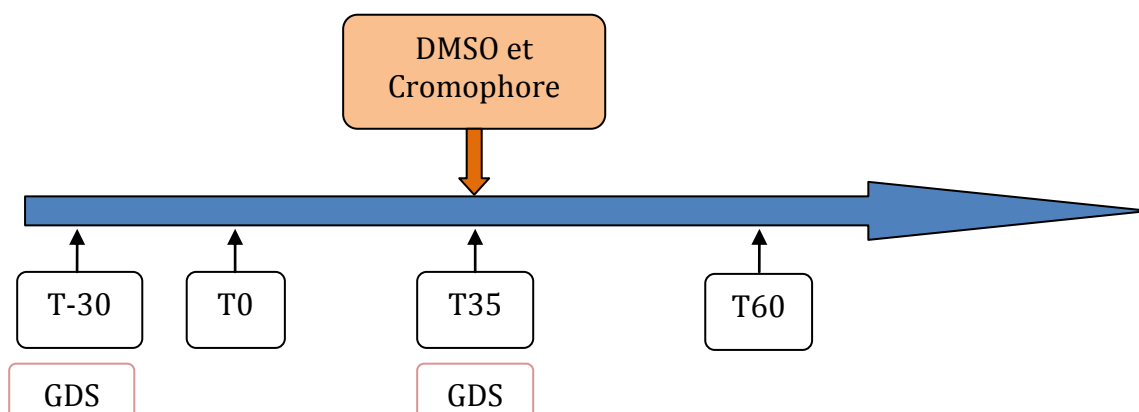


Figure 11 : Protocole d'injection témoin IVD dans le protocole d'étude de la DHEA

2.2.2. Etude des mécanismes d'action de la DHEA

Afin d'étudier les mécanismes d'action de la DHEA sur la vascularisation pulmonaire fœtale, nous avons testé un inhibiteur potentiel de la DHEA : la L-nitro-arginine (LNA, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), inhibiteur de la NO synthase. Le test au LNA a été fait avec 2 doses différentes de DHEA (12 mg et 24 mg).

Après une période de stabilité hémodynamique de 30 minutes, on effectuait une injection IVD de 30 mg de LNA, puis après 30 minutes, une injection IVD de DHEA. Les mesures hémodynamiques étaient relevées toutes les 10 minutes jusqu'à l'injection de DHEA puis toutes les 5 minutes pendant 35 minutes, puis toutes les 10 minutes jusqu'à 195 minutes. Les prélèvements étaient faits comme pour l'injection de DHEA seule avec un dernier prélèvement à 185 minutes pour un gaz du sang fœtal. (Figure 12)

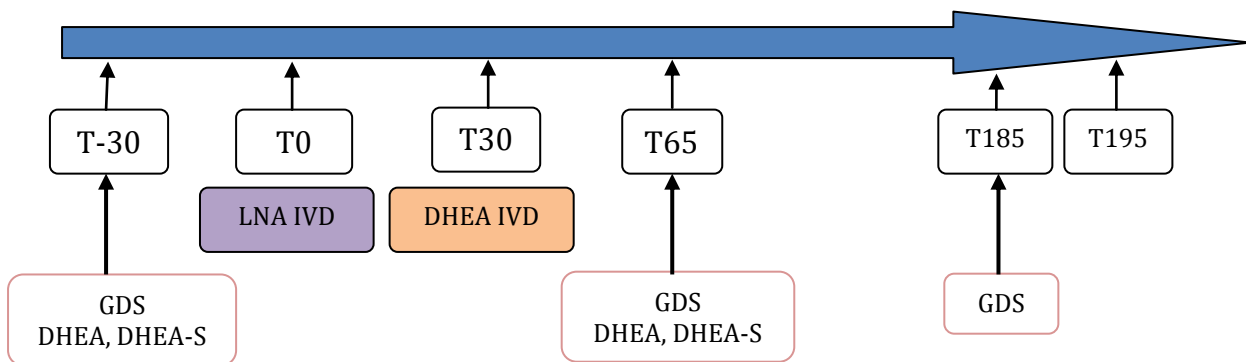


Figure 12 : Protocole d'injection LNA-DHEA IVD

2.3. Préparation des produits

La DHEA (Cooper) se présentait sous forme de poudre. Cette hormone liposoluble nécessitait une solubilisation à l'aide de Diméthyl sulfoxyde (DMSO, laboratoire Sigma-Aldrich) et l'adjonction de Crémophor® (laboratoire Sigma-Aldrich) afin de maintenir la solubilité une fois dilué dans du sérum physiologique. La solution obtenue était spontanément acide. En fin de préparation, la solution était tamponnée par de la soude et de l'acide chlorhydrique afin d'obtenir un pH physiologique.

Pour les doses de 6 et 12 mg, la dilution de la DHEA se faisait avec 2% de DMSO et 2% de Crémophor® (0,1 ml de DMSO, 0,1 ml de Crémophor® et 4,8 ml de sérum physiologique). Pour la dose de 24 mg, la dilution se faisait avec 4% de DMSO et 4% de

Crémophor® (0,2 ml de DMSO, 0,2 ml de Crémophor® et 4,6 ml de sérum physiologique).

La préparation du LNA se faisait de la façon suivante : dilution de 30 mg de LNA avec 0,2 ml d'acide chlorhydrique, adjonction de 2 ml de sérum physiologique puis tamponnement par adjonction de 0,2 ml de NaOH (titration pour obtenir un pH=7,4). La solution était ensuite injectée à travers un filtre anti bactérien.

2.4. Analyses statistiques

Les résultats étaient exprimés sous forme de moyennes affectées de leur écart type.

Les données hémodynamiques étaient analysées en utilisant une analyse de variance (ANOVA) pour mesures répétées. Les différences intergroupes étaient analysées à l'aide du test de Bonferroni-Dunn en raison des comparaisons multiples, lorsque les valeurs de base des populations étaient identiques.

Les comparaisons des paramètres gazométriques et des dosages sanguins faisaient appel au test non paramétrique de comparaison de moyennes pour petits effectifs de Mann-Whitney.

Le seuil de signification retenu était $p < 0,05$. L'ensemble des analyses statistiques était effectué en utilisant de logiciel Stat View 4.5 pour PC (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA).

Dans chaque protocole, n représente le nombre de fœtus de brebis étudiés.

3. Résultats

3.1. Injection de DHEA en IVD à dose croissante

Nous avons testé 3 doses de DHEA et vérifié l'absence d'effet de l'injection d'une solution témoin.

3.1.1. Protocole injection de DHEA en IVD, dose 6 mg (n=7)

L'injection IVD chez le fœtus de 6 mg de DHEA ne modifiait pas les pressions artérielles pulmonaires et aortiques, les débits pulmonaires (de 94 ± 5 à 103 ± 7 ml/min ; $p=0,6$), ni les résistances vasculaires pulmonaires (de $0,5 \pm 0,01$ à $0,45 \pm 0,02$ mmHg/ml/min ; $p=0,2$). La comparaison par rapport au témoin dilué à 2% de DMSO et Crémophor (n=7) ne montrait pas de différence significative pour le débit ($p=0,92$), pour les RVP ($p=0,6$), ni pour la PAP ($p=0,26$) (Figure 13).

Les GDS ne variaient pas de façon significative. Il n'y avait pas non plus de différence significative pour les gaz du sang et les valeurs de PAP, PAO et FC entre les témoins 2% et les injections à 6mg de DHEA (Tableau 2).

Tableau 2 : Evolution des paramètres gazométriques, de fréquence cardiaque (FC) et pression aortique (PAO) chez le fœtus avant (n=7) et après injection témoins de 2% (N=7), après injection IVD de 6mg de DHEA (n=7).

	Avant injection DHEA 6mg	Après injection témoins de 2%	Après injection DHEA 6mg
pH	$7,36 \pm 0,01$	$7,35 \pm 0,01$	$7,36 \pm 0,01$
PaCO2 (mmHg)	$52 \pm 1,6$	$50 \pm 1,6$	$51 \pm 1,4$
PaO2 (mmHg)	$15 \pm 1,4$	$13 \pm 1,6$	$15 \pm 1,5$
Lactates (mmol/l)	$1,63 \pm 0,13$	$1,8 \pm 0,2$	$1,34 \pm 0,05$
Saturation (%)	49 ± 6	$49 \pm 4,6$	48 ± 6
Hémoglobine (g/dl)	$11 \pm 0,3$	$11 \pm 0,2$	$11 \pm 0,3$
FC (bat/min)	159 ± 5	$156 \pm 5,8$	$156 \pm 4,5$
PAO (mmHg)	$47 \pm 2,6$	44 ± 1	$46 \pm 2,3$

Les valeurs sont exprimées en moyennes suivies de l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les moyennes avant injection sont calculées sur les temps de T-30 à T0. Les moyennes après injection sont calculées sur les temps de T5 à T25.

Les dosages sanguins de DHEA et DHEA sulfate réalisés chez le fœtus et chez la brebis avant et à 35 minutes après l'injection montraient des différences. Les taux de DHEA augmentaient significativement entre T0 et T35 chez la brebis ($p=0,05$) et chez l'agneau ($p=0,02$). Les taux de DHEA-S n'augmentaient de façon significative que chez l'agneau ($p=0,02$). (Tableau 3)

Tableau 3: Taux de DHEA et DHEA-S avant et 35 minutes après injection IVD de 6mg de DHEA chez la brebis et chez le fœtus d'agneau.

	DHEA (ng/ml)			DHEA-S (μmol/l)		
	T0	T35	p	T0	T35	p
Brebis	0,67 ± 0,06	2,76 ± 1,03	0,05	<0,41	<0,41	NS
Agneau	0,6 ± 0,06	13,2 ± 2,7	0,02	<0,41	1,13 ± 0,17	0,02

Les valeurs sont exprimées en moyennes suivies de l'erreur standard de la moyenne (SEM) sur n=4. NS signifie p>0,05

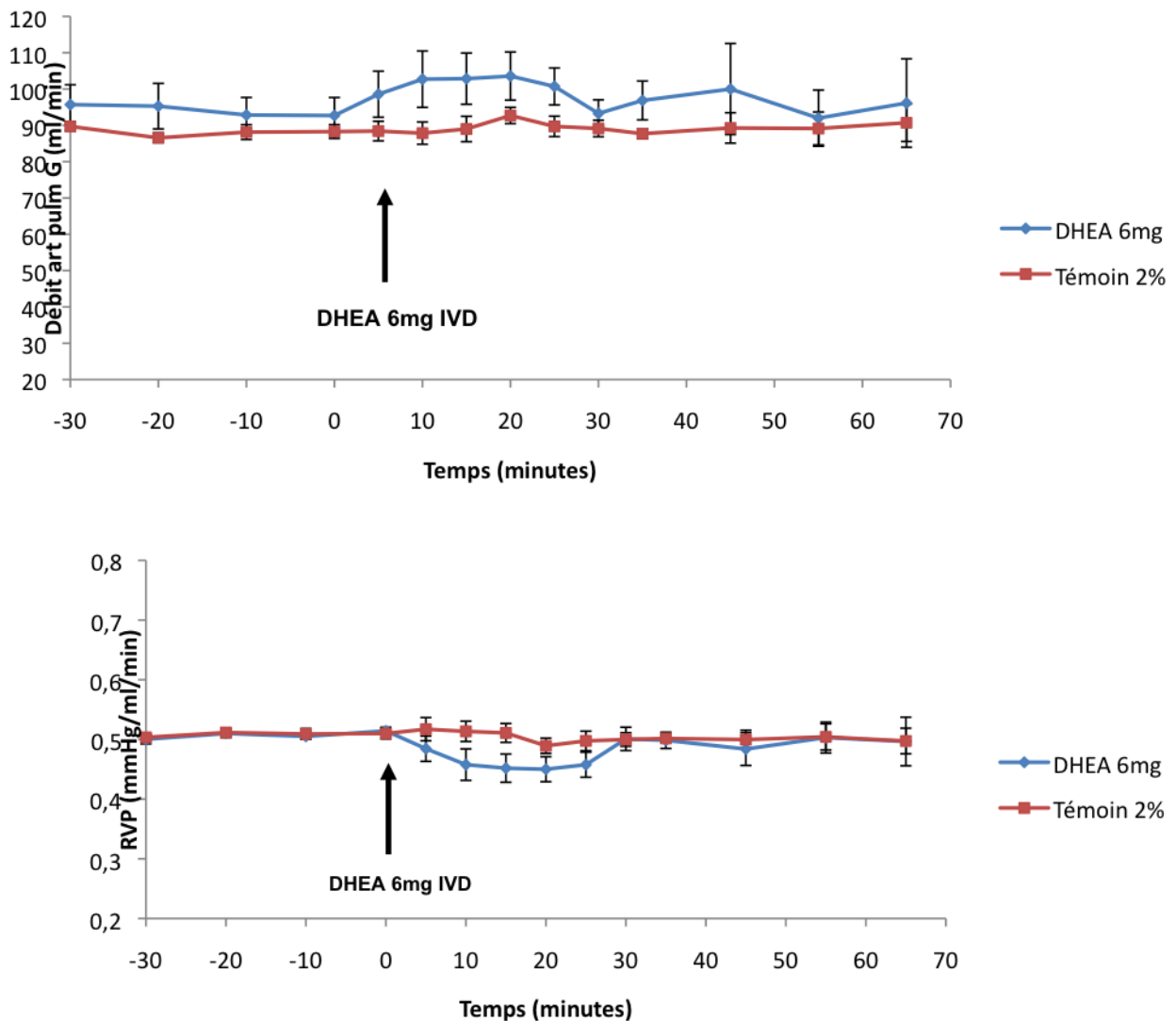


Figure 13: Réponse vasculaire pulmonaire fœtale à une injection IVD de 6 mg de DHEA (n=7, courbe bleue) et comparaison avec les injections de témoin 2% (n=7, courbe rouge). Les valeurs sont exprimées en moyennes affectées de leur erreur standard de la moyenne.

3.1.2. Protocole injection de DHEA en IVD, dose 12 mg (n=7)

L'injection IVD de 12 mg de DHEA entraînait une vasodilatation pulmonaire gauche significative, avec une augmentation de Qp de 20% à T15 (de 86 ± 2 à 104 ± 5 ml/min ; $p < 0,0001$) et une diminution des RVP de 15% à T15 (de $0,5 \pm 0,01$ à $0,43 \pm 0,02$ mmHg/ml/min ; $p < 0,001$).

La comparaison par rapport au témoin dilué à 2% (n=7) ne montrait pas de différence significative pour la PAP ($p=0,4$). Il existait par contre une différence significative entre le témoin et l'injection de 12mg pour le débit ($p < 0,001$) et pour les RVP ($p < 0,05$) (Figure 14).

La FC présentait une variation dans le temps significative ($p < 0,05$). Les PAP, PAO et les gaz du sang ne variaient pas de façon significative. Il n'y avait pas non plus de différence significative pour les GDS et les valeurs de PAO et FC entre les témoins 2% et les injections à 12mg de DHEA. (Tableau 4)

Tableau 4: Evolution des paramètres gazométriques, de fréquence cardiaque (FC) et de pression aortique (PAO) chez le fœtus avant et après injection IVD de 12mg de DHEA.

	Avant injection DHEA 12mg	Après injection DHEA 12mg
pH	$7,36 \pm 0,01$	$7,37 \pm 0,01$
pCO2 (mmHg)	$51 \pm 1,4$	$50 \pm 1,2$
pO2 (mmHg)	$15 \pm 0,9$	15 ± 1
Lactates (mmol/l)	$1,8 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,2$
Saturation (%)	$46 \pm 3,6$	46 ± 3
Hémoglobine (g/dl)	$11 \pm 0,5$	$11 \pm 0,6$
FC (Bat/min)	153 ± 5	$158 \pm 6^*$
PAO (mmHg)	44 ± 1	$44 \pm 1,3$

Les valeurs sont exprimées en moyenne suivies de l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les moyennes avant injection sont calculées sur les temps de T-30 à T0. Les moyennes après injection sont calculées sur les temps de T5 à T25. *= $p < 0,05$

Les dosages sanguins de DHEA et DHEA sulfate réalisés chez le fœtus et chez la brebis avant et à 35 minutes après l'injection montraient des différences significatives. Les taux de DHEA augmentaient significativement entre T0 et T35 chez la brebis ($p=0,02$) et chez l'agneau ($p < 0,01$). Les taux de DHEA-S n'augmentaient de façon significative que chez

l'agneau. Les taux de base de DHEA étaient différents chez la brebis et chez l'agneau ($p=0,05$), mais identique pour les taux de DHEA-S ($p>0,99$). (Tableau 5)

Tableau 5 : Taux de DHEA et DHEA-S avant et 35 minutes après injection IVD de 12mg de DHEA chez le fœtus d'agneau.

	DHEA (ng/ml)			DHEA-S ($\mu\text{mol/l}$)		
	T0	T35	p	T0	T35	p
Brebis	$0,82 \pm 0,16$	$2,85 \pm 0,6$	0,02	<0,41	<0,41	NS
Agneau	$1,5 \pm 0,22$	$22,76 \pm 3,3$	0,009	<0,41	$1,34 \pm 0,26$	0,036

Les valeurs sont exprimées en moyennes suivies de l'erreur standard de la moyenne (SEM) sur n=5 animaux. NS signifie $p>0,05$

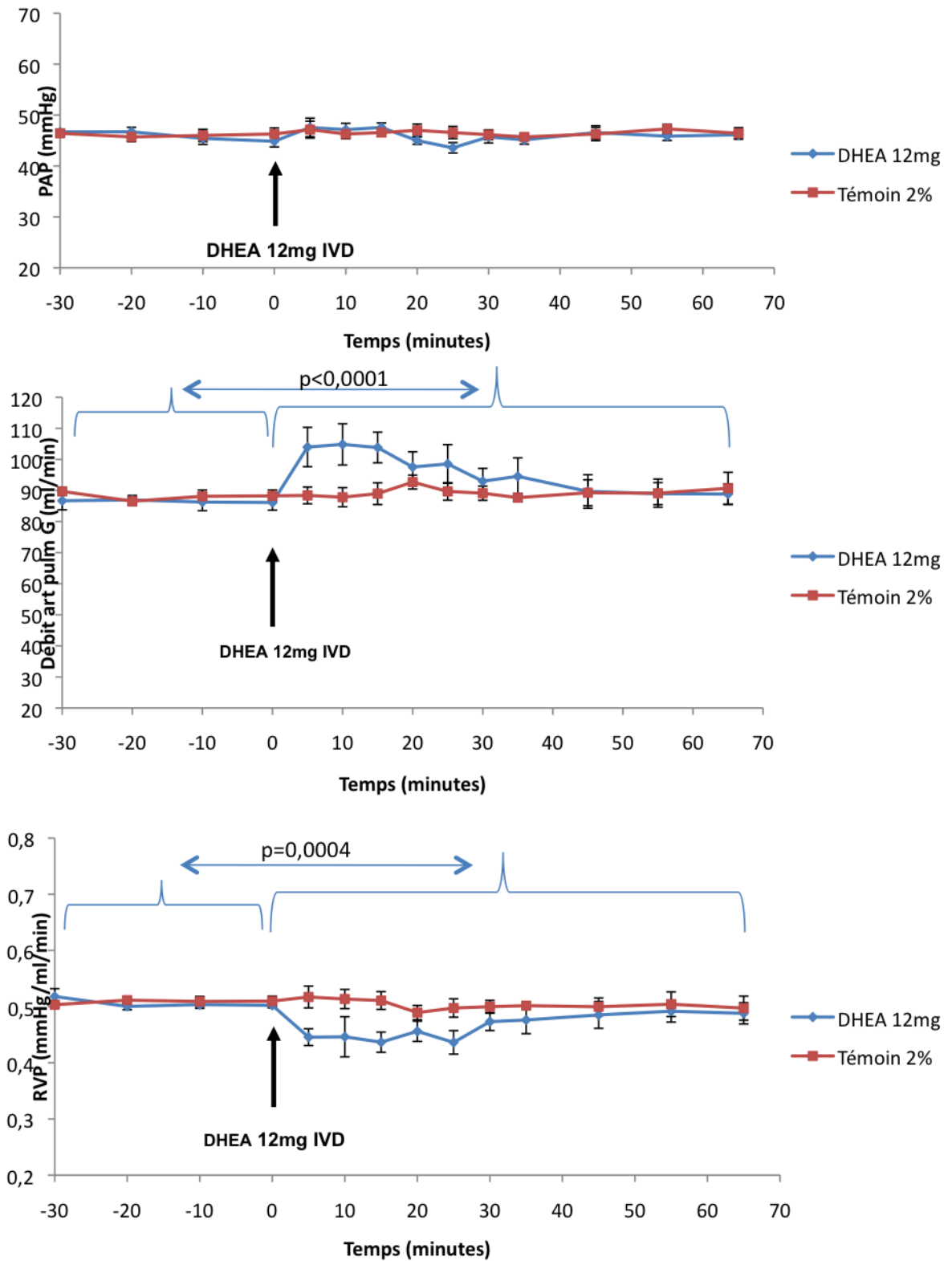


Figure 14 : Réponse vasculaire pulmonaire fœtale à une injection IVD de 12mg de DHEA (n=7, courbe bleue) et comparaison avec les injections de témoin 2% (n=7, courbe rouge). Les valeurs sont exprimées en moyennes affectées de leur erreur standard de la moyenne.

3.1.3. Protocole injection de DHEA en IVD, dose 24 mg (n=5)

L'injection IVD de 24 mg de DHEA chez le fœtus entraînait une vasodilatation pulmonaire significative, avec une augmentation de Qp de 60% à T15 (de 88 ± 2 à $141 \pm 9,8$ ml/min ; $p < 0,0001$) et une diminution des RVP de 40% à T15 (de $0,5 \pm 0,01$ à $0,32 \pm 0,02$ mmHg/ml/min ; $p < 0,0001$).

La comparaison par rapport au témoin dilué à 4% (n=5) ne montrait pas de différence significative pour la PAP ($p=0,14$). Il existait par contre une différence significative entre le témoin et l'injection de DHEA 24mg pour le débit ($p < 0,0001$) et pour les RVP ($p < 0,0001$) (Figure 15).

La FC présentait une variation dans le temps significative ($p < 0,0001$). Les PAP, PAO et les GDS ne variaient pas de façon significative durant le protocole de mesure. Il n'y avait pas non plus de différence significative pour les GDS et les valeurs de PAO entre les témoins 4% et les injections de DHEA 24mg, mais il existait une différence significative pour les valeurs de FC (Tableau 6).

Les dosages sanguins de DHEA et DHEA sulfate réalisés chez le fœtus et chez la brebis avant et à 35 minutes après l'injection montraient des différences. Les taux de DHEA augmentaient entre T0 et T35 de façon significative chez l'agneau ($p=0,009$), mais pas chez la brebis ($p=0,22$). Les taux de DHEA-S n'augmentaient de façon significative que chez l'agneau ($p=0,04$). (Tableau 7)

Tableau 6 : Evolution des paramètres gazométriques, de fréquence cardiaque (FC) et de pression aortique (PAO) chez le fœtus avant et après injection IVD de 24mg de DHEA.

	Avant injection DHEA 24mg	Après injection DHEA 24mg
pH	7,36 ± 0,01	7,35 ± 0,01
pCO2 (mmHg)	49 ± 0,9	51 ± 0,9
pO2 (mmHg)	15 ± 1,4	16 ± 1,9
Lactates (mmol/l)	1,8 ± 0,2	1,7 ± 0,2
Saturation (%)	43 ± 6	48 ± 5,7
Hémoglobine (g/dl)	11,6 ± 0,6	11,7 ± 0,5
FC (Bat/min)	149 ± 7	162 ± 8*
PAO (mmHg)	45 ± 1,6	46 ± 2

Les valeurs dans le tableau sont exprimées en moyenne suivies de l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les moyennes avant injection sont calculées sur les temps de T-30 à T0. Les moyennes après injection sont calculées sur les temps de T5 à T25. *= p<0.05

Tableau 7 : Taux de% DHEA et DHEA-S avant et 35 minutes après injection IVD de 24mg de DHEA chez la brebis et chez le fœtus d'agneau.

	DHEA (ng/ml)			DHEA-S (µmol/l)		
	T0	T35	p	T0	T35	p
Brebis	0,9	2,95 ± 0,5	NS	<0,41	0,53 ± 0,1	NS
Agneau	1,4 ± 0,13	50,85 ± 2,4	0,009	<0,41	2,31 ± 0,17	0,04

Les valeurs dans le tableau sont exprimées en moyenne suivies de l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les moyennes avant injection sont calculées sur les temps de T-30 à T0. Les moyennes après injection sont calculées sur les temps de T5 à T25. NS signifie p>0,05.

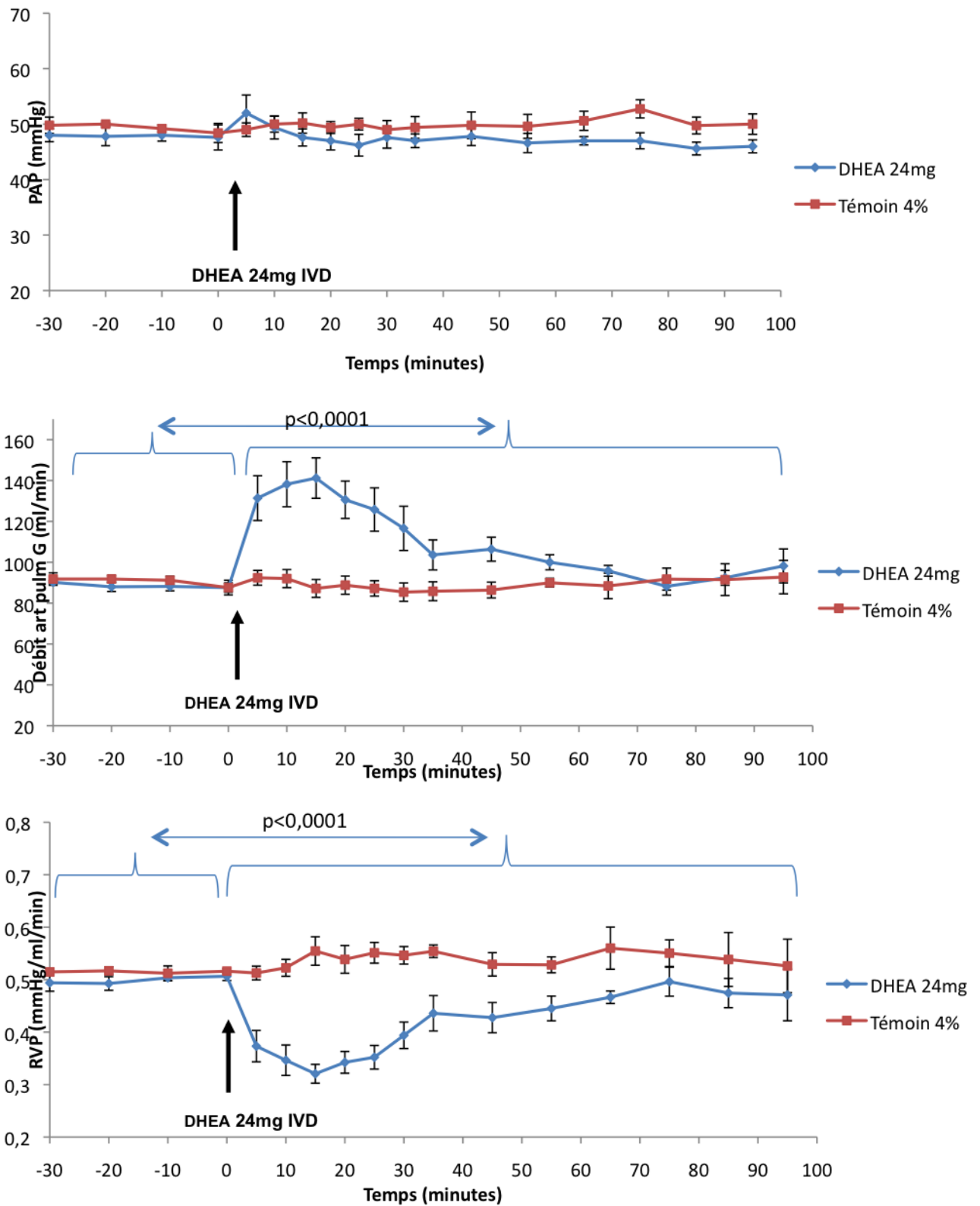


Figure 15 : Réponse vasculaire pulmonaire fœtale à une injection IVD de 24mg de DHEA (n=5, courbe bleue) et comparaison avec les injections de témoin 4% (n=5, courbe rouge). Les valeurs sont exprimées en moyennes affectées de leur erreur standard de la moyenne.

3.1.4. Résumé des injections IVD :

Les injections IVD de DHEA aux doses de 6, 12 et 24 mg avaient des effets vasculaires pulmonaires se traduisant par une augmentation du débit artériel pulmonaire, une stabilité de la pression artérielle et une diminution des RVP. Cet effet débutait 5 minutes après l'injection, était maximal 15 minutes après l'injection et cessait environ 35 minutes après l'injection.

Les témoins dilués à 2% et 4% n'avaient pas d'effet vasculaire propre.

L'effet vasodilatateur pulmonaire était progressif avec l'augmentation de dose de DHEA. Le pourcentage de variation des RVP était statistiquement différent entre les doses de 24mg et 12mg ($p < 0,005$) et entre les doses de 24mg et 6mg ($p < 0,001$). Le pourcentage de variation du débit APG était statistiquement différent entre les doses de 24mg et 12mg ($p = 0,0015$) et entre les doses de 24mg et 6mg ($p = 0,0002$). (Figure 16-17)

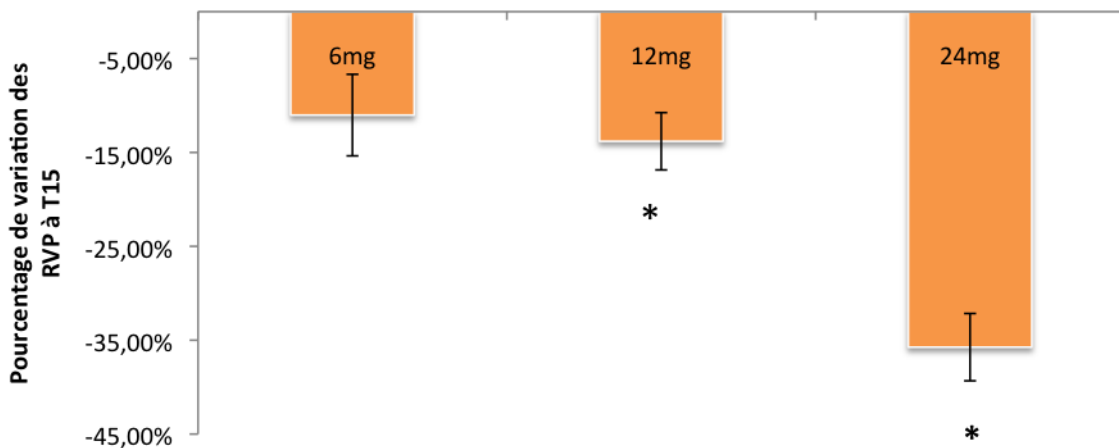


Figure 16 : Effet dose de la DHEA sur les résistances vasculaires pulmonaires (RVP). Représentation du pourcentage de variation de RVP entre la base (T-30 à T0) et le temps T15. * signifie $p < 0,01$

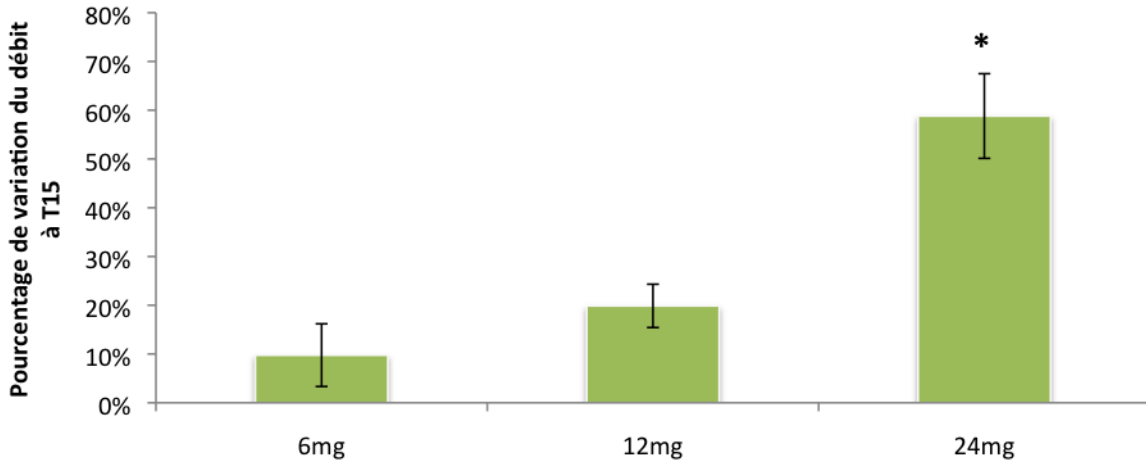


Figure 17 : Effet dose de la DHEA sur le débit artériel pulmonaire gauche (QAPG). Représentation du pourcentage de variation de débit dans l'artère pulmonaire gauche entre la base (T-30 à T0) et le temps T15. * signifie $p < 0,01$.

Il existait une augmentation des taux de DHEA et DHEA-S proportionnelle à l'augmentation de dose de DHEA injectée, chez le fœtus et chez la brebis pour les taux de DHEA, uniquement chez le fœtus pour les taux de DHEA-S.

3.2. Résultats des protocoles LNA-DHEA

3.2.1. Protocole 3a : LNA-DHEA 12 mg (n=6)

L'injection IVD chez le fœtus de 12 mg de DHEA après une injection IVD de LNA inhibait l'effet vasodilatateur de la DHEA seule (Figure 18)

Il n'y avait pas de différence significative entre les GDS avant et après les injections de LNA et DHEA 12 mg, ni de différence pour les PAO, PAP et FC. (Tableau 8)

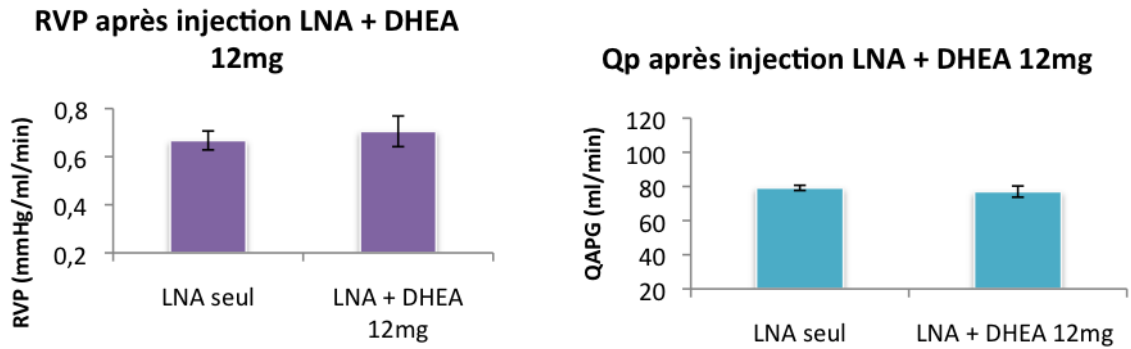


Figure 18 : Evolution des Résistances vasculaires pulmonaires (RVP) et du débit de l'artère pulmonaire gauche (Qp) avant et 15 minutes après injection de 12mg de DHEA, 30 minutes après injection de LNA.

Tableau 8 : Evolution des paramètres gazométriques, de FC, PAP et PAO chez le fœtus avant et après injection IVD de 12mg de DHEA et de LNA (n=6).

	LNA + DHEA 12mg	
	Avant injection	Après injection
pH	7,36 ± 0,01	7,35 ± 0,01
pCO2 (mmHg)	50 ± 1,4	52 ± 1,2
pO2 (mmHg)	15 ± 0,8	15 ± 1
Lactates (mmol/l)	1,7 ± 0,1	1,8 ± 0,2
Saturation (%)	44 ± 1,9	46 ± 3
Hémoglobine (g/dl)	11,8 ± 0,5	12,2 ± 0,6
FC (Bat/min)	141 ± 5	143 ± 6
PAO (mmHg)	52 ± 2	53 ± 2
PAP (mmHg)	54 ± 2	55 ± 2

Les valeurs dans le tableau sont exprimées en moyenne suivies de l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les moyennes avant injection sont calculées sur les temps de T-30 à T0. Les moyennes après injection sont calculées sur les temps de T5 à T25.

Le pourcentage de variation des débits pulmonaires et des résistances vasculaires pulmonaires étaient significativement différents avec ou sans administration préalable de LNA (Figure 19). Les gaz du sang après DHEA et avec ou sans administration préalable de LNA n'étaient pas différents (Tableau 9)

Tableau 9 : Comparaison des paramètres gazométriques chez le fœtus avant injection IVD de LNA + DHEA 12mg (n=6) et de DHEA 12mg (n=7).

	LNA + DHEA 12mg	DHEA 12mg
pH	7,36 ± 0,01	7,36 ± 0,01
pCO2 (mmHg)	50 ± 1,4	51 ± 1,4
pO2 (mmHg)	15 ± 0,8	15 ± 0,9
Lactates (mmol/l)	1,7 ± 0,1	1,8 ± 0,2
Saturation (%)	44 ± 1,9	46 ± 3,6
Hémoglobine (g/dl)	11,8 ± 0,5	11 ± 0,5

Les valeurs sont exprimées en moyennes suivies de l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les moyennes avant injection sont calculées sur les temps de T-30 à T0.

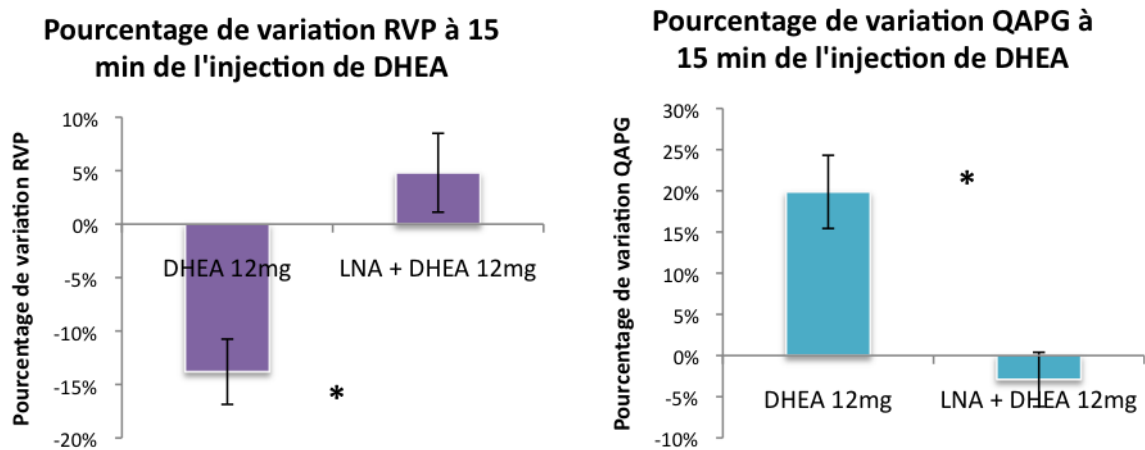


Figure 19 : Pourcentages de variation des Résistances vasculaires pulmonaires (RVP) et du débit de l'artère pulmonaire gauche (QAPG) entre la base et 15 minutes après l'injection de DHEA. Comparaison des variations entre l'injection de DHEA seule et après LNA. * signifie p<0,005.

3.2.2. Protocole LNA-DHEA 24 mg (n=5)

L'injection IVD de 24 mg de DHEA après une injection IVD de LNA inhibait l'effet vasodilatateur de la DHEA seule (Figure 20).

Tableau 10 : Evolution des paramètres gazométriques, de FC, PAP et PAO chez le fœtus avant et après injection IVD de 24mg de DHEA et de LNA (n=5).

LNA + DHEA 24mg		
	Avant injection	Après injection
pH	7,35 ± 0,01	7,3 ± 0,03
pCO2 (mmHg)	47 ± 3	52 ± 4
pO2 (mmHg)	15 ± 1,6	13 ± 2
Lactates (mmol/l)	2,3 ± 0,8	3,26 ± 0,9
Saturation (%)	41 ± 5	35 ± 7
Hémoglobine (g/dl)	11,5 ± 0,3	13 ± 0,4
FC (Bat/min)	134 ± 4	140 ± 8
PAO (mmHg)	52 ± 1,5	57 ± 3,4
PAP (mmHg)	54 ± 1,5	59 ± 3,4

Les valeurs dans le tableau sont exprimées en moyenne suivies de l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les moyennes avant injection sont calculées sur les temps de T-30 à T0. Les moyennes après injection sont calculées sur les temps de T5 à T25.

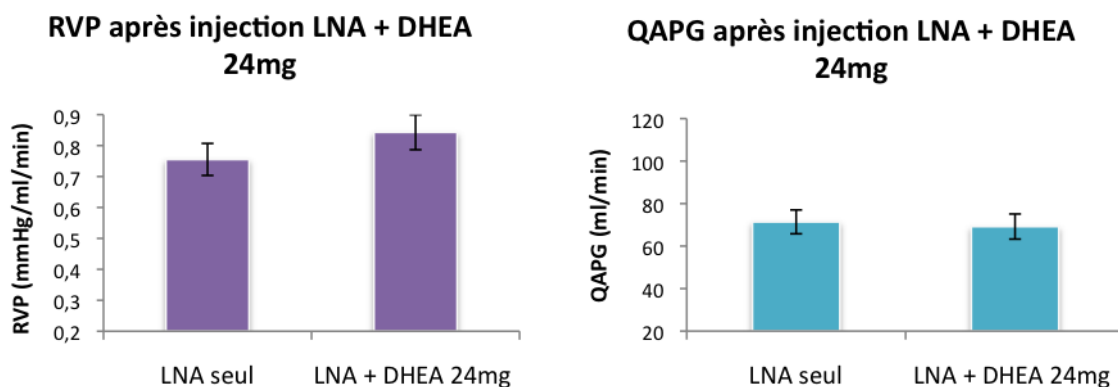


Figure 20 : Evolution des Résistances vasculaires pulmonaires (RVP) et du débit de l'artère pulmonaire gauche (QAPG) avant et 15 minutes après injection de 24mg de DHEA, 30 minutes après injection de LNA.

Le pourcentage de variation des débits pulmonaires et des résistances vasculaires pulmonaires étaient significativement différents avec ou sans administration préalable de LNA (Figure 21). Les gaz du sang après DHEA et avec ou sans administration préalable de LNA n'étaient pas différents (Tableau 11)

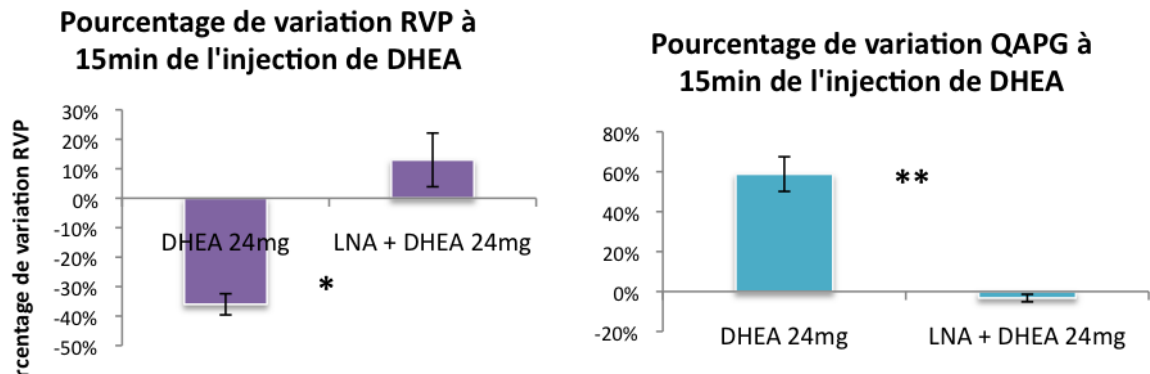


Figure 21 : Pourcentages de variation des résistances vasculaires pulmonaires (RVP) et du débit l'artère pulmonaire gauche (APG) entre la base et 15 minutes après l'injection de DHEA. Comparaison des variations entre l'injection de DHEA seule et après LNA. * signifie $p < 0,005$, ** signifie $p = 0,0002$.

Tableau 11 : Comparaison des paramètres gazométriques chez le fœtus avant injection IVD de LNA + DHEA 24mg (n=5) et de DHEA 24mg (n=5).

	LNA + DHEA 24mg	DHEA 24mg
pH	7,35 ± 0,01	7,36 ± 0,01
pCO2 (mmHg)	47 ± 3	49 ± 0,9
pO2 (mmHg)	15 ± 1,6	15 ± 1,4
Lactates (mmol/l)	2,3 ± 0,8	1,8 ± 0,2
Saturation (%)	41 ± 5	43 ± 6
Hémoglobine (g/dl)	11,5 ± 0,3	11,6 ± 0,6

Les valeurs sont exprimées en moyennes suivies de l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les moyennes avant injection sont calculées sur les temps de T-30 à T0.

4. Discussion

Notre objectif était de savoir si la DHEA avait un effet sur la circulation pulmonaire fœtale. Pour cela, nous avons étudié chez le fœtus de brebis chroniquement instrumenté

in utero, les effets vasculaires pulmonaires des injections intraveineuses de DHEA. Nous avons montré un effet vasodilatateur pulmonaire dose-dépendant du DHEA.

Nous avons ensuite cherché à comprendre le mécanisme d'action de la DHEA en testant l'effet de la DHEA en présence d'un inhibiteur de la NO synthase. L'action de la DHEA était inhibée en présence de LNA, indiquant que la vasodilatation induite par le DHEA est médiée par le NO. La DHEA a un effet vasodilatateur pulmonaire prouvé in vivo chez le rat, la souris et le furet [148-151,153,154]. In vitro, il existe un effet vasodilatateur sur les cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires humaines[152]. De nombreuses études ont démontré l'innocuité de la DHEA donnée au long cours chez l'homme[155]. Suite aux travaux de Bonnet et al, des essais cliniques sont actuellement en cours afin de tester l'efficacité de la DHEA dans le traitement de l'HTAP chronique de l'adulte[149].

A notre connaissance, aucune étude n'avait porté sur la circulation pulmonaire périnatale.

Nos résultats confirment l'existence d'un effet vasodilatateur pulmonaire spécifique en période périnatale. L'effet de la DHEA injectée en IVD était rapide (dans les 5 minutes suivant l'injection) et bref (35 minutes maximum). Les autres publications étudiant l'effet de la DHEA sur la vascularisation pulmonaire utilisaient la voie orale (DHEA mélangée à l'alimentation des rats)[148-151]. Molinari et al ont testé la DHEA sous forme intra veineuse sur les circulations d'une part coronaire et d'autre part systémique (artère rénale, artère mésentérique, artère iliaque)[156,157]. L'injection se faisait chez des porcs anesthésiés, en IVD suivie d'une IVL. Ils retrouvaient également un effet très rapide (3 minutes après l'injection) et une durée d'action brève de 5 minutes. Dans notre étude, la brève durée d'action peut également s'expliquer par une possible élimination placentaire de la DHEA. En effet, les taux sanguins de DHEA maternels augmentaient de façon significative après l'injection alors que la DHEA n'était injectée qu'au fœtus. Notre étude montre un passage de la DHEA à travers le placenta du fœtus vers la mère.

Le mécanisme d'action de la DHEA est mal connu. Nous avons montré que l'utilisation du LNA, un bloqueur de la NO synthase, a pour conséquence d'inhiber l'action vasodilatatrice de la DHEA. Nos résultats indiquent donc que le mécanisme d'action vasodilatateur de la DHEA est médié par le NO.

Il a été montré in vitro que la DHEA active un récepteur membranaire couplé à une protéine G qui entraîne une activation de la NO synthase (NOS) [154,158,159]. Cette activation de la NO synthase est responsable de la production de NO et d'une vasorelaxation. Cornfield a résumé les 2 possibilités d'action de la DHEA sur la voie du NO (figure 22)[160].

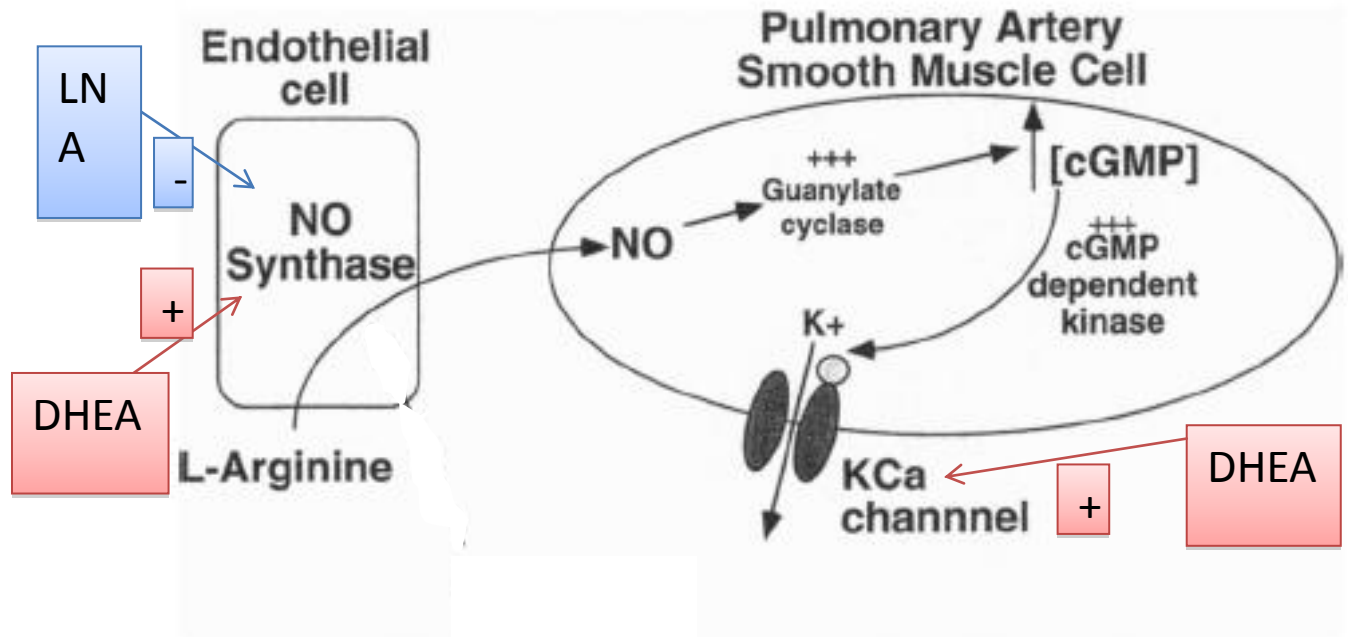


Figure 22 : Schéma expliquant la vasodilatation pulmonaire fœtale passant par la voie du NO d'après Cornfield. Représentation du mode d'action du LNA et des deux modes d'action hypothétiques de la DHEA.

Enfin, pour certains, les effets vasculaires et le possible effet protecteur cardiovasculaire en pratique humaine seraient liés à la transformation de la DHEA en œstradiol [161].

Chapitre 7 : L'effet des acides gras polyinsaturés oméga 3 (AGPI ω 3) sur la circulation pulmonaire : étude expérimentale chez le fœtus d'agneau

1. Introduction

De très nombreux travaux expérimentaux, cliniques et épidémiologiques ont clairement démontrés le rôle bénéfique des acides gras poly insaturés de type OMEGA 3 (AGPI ω 3) sur la fonction cardio-respiratoire et la fonction pulmonaire. Ils réduisent la survenue de pathologies cardiovasculaires (athérome, infarctus, hypertension artérielle) et améliorent la mortalité du SDRA de l'adulte. Les bénéfices des AGPI ω 3 sont liés à 3 de leurs effets biologiques essentiels :

- Amélioration de la fonction endothéliale, par accentuation notamment de la vasodilatation endothélium-dépendante [162].
- Augmentation de la clearance des liquides alvéolaires par activation des pompes à sodium, et augmentation de l'activité du canal ENaC.
- Effets anti-inflammatoires par modulation de la synthèse des médiateurs lipidiques, de la libération des cytokines, et de l'activation des leucocytes [162].

Les acides gras poly-insaturés (AGPI) se répartissent en plusieurs familles définies par la position de la première double liaison à l'extrémité méthyl-terminale de leur précurseur: acides palmitoléique (16:1), Oléique (18 :1), linoléique (18 :2) et linoléique (18 :3). L'acide Linoléique (LA) et l'acide Linoléique (ALA) sont des acides gras essentiels chez les mammifères. Les AGPI ω 3 et AGPI ω 6 sont impliqués dans de nombreuses voies métaboliques : par une succession de désaturations et d'élongations, l'ALA et le LA produisent plusieurs métabolites dont l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et

l'acide docosahexaénoïque (DHA), et l'acide arachidonique (AA). Ces métabolites intègrent plusieurs voies métaboliques :

La voie des cyclo-oxygénases : cette voie conduit à la production des PG, et des thromboxanes.

- l'AA produit les PG et thromboxanes. Le thromboxane A₂ est un puissant agrégant plaquettaire et vasoconstricteur. L'AA produit également des PG de la série 2 (I₂, E₂, F₂, D₂). La PGI₂ a un effet antiagrégant et vasodilatateur. La PGE₂ est pro inflammatoire et vasodilatatrice, tandis que la prostaglandine F₂ est vasoconstrictrice [162,163] ;

- L'EPA produit les PG et thromboxanes de la série 3. Ils possèdent des effets de moindre intensité que la série 2. Ainsi, le TxA₃ est un faible agrégant plaquettaire et un faible vasoconstricteur. La PGI₃ un vasodilatateur faible, mais c'est un inducteur de la production de PGI₂ [162,163] ;

La voie des lipo-oxygénases produit les leucotriènes :

- l'AA produit les leucotriènes série 4 (LTB₄, LTC₄, LBD₄, LTE₄) ;
- L'EPA produit les leucotriènes série 5 (LTB₅, LTC₅, LTD₅, LTE₅).

Globalement, les dérivés eicosanoïdes de l'AA (prostaglandines, thromboxanes et leucotriènes) sont des médiateurs pro-agrégants plaquettaires et pro inflammatoires puissants. A l'opposé, les eicosanoïdes issus de l'EPA ont un effet pro inflammatoire faible et réduisent par ailleurs la production des dérivés pro-inflammatoires issus de l'AA [164,165].

La voie de la Mono-oxygénase Cytochrome P450

- L'AA produit l'acide époxy-eicosatriénoïque (EET), qui est un vasodilatateur puissant, et l'acide hydroxy-eicosatetraénoïque (HETE). L'effet de l'HETE sur la circulation pulmonaire est controversé: plusieurs études décrivent un effet vasoconstricteur pulmonaire[166], tandis que d'autres décrivent un effet vasodilatateur pulmonaire[167].

- L'EPA produit 4 métabolites dont l'acide 17,18-époxyeicosatetraénoïque (17,18-EPETE) est le plus important et constitue 2/3 de ces métabolites. Une partie des effets du VEGF passent par la production de ces acides époxy-eicosatetraénoïques. Ces acides époxy-eicosatetraénoïques possèdent des propriétés vasodilatatrices plus marquées que les acides époxyeicosatriénoïques

(EETs) dérivés « époxy » des AGPI ω 6. Ils ont la capacité d'activer les canaux KCa et de réduire la sensibilité des myofibrilles au calcium[168].

Les AGPI ω 3 et ω 6 sont métabolisés par les mêmes enzymes. Il existe de ce fait une compétition entre AGPI ω 3 et ω 6. L'augmentation des apports en AGPI ω 3 par rapport aux ω 6 aboutit à la baisse des métabolites des AGPI ω 6. La supplémentation en AGPI ω 3 modifie la composition des membranes cellulaires (plaquettes, globules rouges, cellules endothéliales) qui s'enrichissent en AGPI ω 3. Un effet compétitif existe entre les AGPI ω 3 (surtout l'EPA) et les AGPI ω 6 (acide arachidonique) sur plusieurs voies métaboliques (cyclo-oxygénase, lipo-oxygénase, Cyt P450).

Pour résumer, une supplémentation en AGPI ω 3 induit :

- Une baisse de la production des PGE2, PGF2, TXA2, LTB4, EET, 20 HETE, majoritairement pro-inflammatoires, et vasoconstrictrices ;
- Une augmentation de la production des prostacyclines, notamment PGI3 mais sans réduire la production de PGI2 (issue de l'acide arachidonique), la PGI3 étant un inducteur de la production de PGI2 ;
- La production des époxydes, surtout le 17,18-EPETE, puissant vasodilatateur[169-170].

Au total, les mécanismes d'actions des AGPI ω 3 sont complexes, multiples et impliqués dans de nombreuses voies biologiques. Les métabolites de l'EPA et du DHA ont des effets anti-inflammatoires puissants, des effets vasculaires vasodilatateurs et anti-agrégants, et favorisent la prolifération des cellules endothéliales. Ces effets vasculaires impliquent l'activation des canaux potassiques calcium dépendant soit directement, soit via l'activation de la protéine kinase A. Chacun de ces dérivés décrits ci-dessus ont des effets cellulaires spécifiques et tissus-dépendants.

Alors que des effets bénéfiques des AGPI ω 3 pendant la période périnatale ont été montrés sur le devenir psychomoteur à moyen et long terme, les effets cardiorespiratoires d'une supplémentation en AGPI ω 3 chez le fœtus ou le nouveau-né ne sont pas connus. Les mécanismes d'action, et les études expérimentales et cliniques chez l'adulte suggèrent que les AGPI ω 3 ont la potentialité d'améliorer l'adaptation cardio-respiratoire à la naissance par leurs effets de potentialisation de la vasodilatation endothélium-dépendante (vasodilatation pulmonaire). Plus spécifiquement, un effet vasodilatateur a été montré in vitro sur des artères pulmonaires humaines[168].

Nous posons donc ici l'hypothèse que les AGPI ω 3 réduisent les résistances pulmonaires périnatales. Pour tester cette hypothèse, les effets des AGPI ω 3 sur la circulation pulmonaire seront étudiés sur un modèle expérimental de fœtus d'agneau chroniquement instrumenté. Par ailleurs, nous chercherons à savoir si les effets vasculaires des AGPI ω 3 sont liés à :

- La production de NO ;
- L'ouverture de canaux potassiques calcium- ou voltage-dépendant ;
- La production des métabolites « époxydes » produits par la mono-oxygénase cytochrome P450

Pour tester cette hypothèse, les expérimentations seront effectués en présence ou non d'inhibiteur de la NO synthase, en présence ou non d'inhibiteur de canaux potassiques, et enfin avec et sans inhibiteur du cytochrome P450 spécifique du métabolisme des AGPI ω 3.

Ce travail a fait l'objet d'un article publié dans la revue Critical Care of Medicine :

- Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in the fetal pulmonary circulation. Houeijeh A*, Aubry E*, Coridon H, Montaigne K, Sfeir R, Deruelle P, Storme L. Crit Care Med. 2011;39:1431-8

*** A.H. and E.A. contributed equally**

2. Conclusion

Des effets bénéfiques cardiovasculaires des AGPI ω 3 ont été décrits chez l'adulte. Nous avons voulu savoir si les AGPI ω 3 pouvait améliorer l'adaptation cardio-respiratoire à la naissance. Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié les effets des AGPI ω 3 sur la circulation pulmonaire de fœtus d'agneau. Nous avons montré qu'à la différence des AGPI sans ω 3, les AGPI ω 3 induisent une réponse pulmonaire vasodilatatrice. Cette réponse vasculaire pulmonaire n'est pas modifiée par l'inhibition de la NO synthase mais est réduite par l'inhibition de la mono-oxygénase P450, et abolie par les inhibiteurs des canaux potassiques. Cette réponse est médiée par l'ouverture de canaux potassiques induite en partie par des métabolites des AGPI ω 3 produits par la mono-oxygénase P450. De nombreux travaux ont montré que les AGPI ω 3 ont un effet protecteur cardiaque et vasculaire. Plus spécifiquement au niveau de la fonction pulmonaire, il a été montré chez des adultes présentant un syndrome de détresse respiratoire aiguë et chez des patients porteurs de mucoviscidose hospitalisés en réanimation que la supplémentation AGPI ω 3 par voie parentérale ou entérale induisait une réduction significative de la durée de ventilation mécanique, du risque de survenue d'une défaillance multi viscérale, et de la durée de séjour en réanimation[171,172]. Ces effets sur la fonction pulmonaire sont liés à une modulation de la réaction inflammatoire et à une amélioration de la fonction endothéliale lors d'un choc septique ou d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë[173,174]. Les effets vasculaires pulmonaires sont moins bien documentés. Un effet vasodilatateur des métabolites des AGPI ω 3 a été montré in vitro sur des artères pulmonaires humaines[168]. De nombreux autres métabolites produits indirectement par des AGPI ω 3 comme la PGI2 sont utilisées en clinique humaine pour traiter l'hypertension artérielle pulmonaire [175]. Dans notre étude, nous montrons pour la première fois à notre connaissance, que les AGPI ω 3 induisent une augmentation des Qp et une réduction des RVP en période périnatale. Il s'agit bien d'une réponse spécifique de la série ω 3 des AGPI puisque l'injection d'Intralipide® ne modifie pas le tonus vasculaire pulmonaire.

La réponse vasodilatatrice pulmonaire persiste pendant toute la durée de la perfusion d'AGPI ω 3 et se poursuit à l'arrêt de la perfusion pendant une durée d'au moins une

heure. Cette réponse vasodilatatrice pulmonaire est particulièrement originale parce qu'à ce jour, tous les vasodilatateurs pulmonaires connus n'entraînent qu'une réponse transitoire et brève d'environ 1 heure malgré la poursuite du traitement chez le fœtus. C'est le cas par exemple pour l'effet de l'oxygène, de l'acétylcholine, du sildénafil, de la bradykinine, ou de l'effet des contraintes de cisaillement[67,69]. Nous montrons par ailleurs, que l'administration d'AGPI ω 3 n'a pas altéré les paramètres hémodynamiques systémiques, ni la pré-charge et la fonction du ventricule gauche. Il peut paraître surprenant que les PAP n'aient pas diminué malgré la vasodilatation pulmonaire. Cette absence de modification des pressions artérielles pulmonaires est attendue en période fœtale, puisque l'artère pulmonaire et l'aorte communique par le canal artériel : les pressions pulmonaires et systémiques sont donc toujours similaires tant que le canal artériel est largement perméable[67,69]. Enfin, les AGPI ω 3 n'ont pas modifiés les gaz du sang. Cette donnée indique qu'ils n'ont pas altéré la perfusion placentaire. De même, la stabilité de la concentration plasmatique des lactates indique que les AGPI ω 3 n'ont pas modifiés l'oxygénation tissulaire. Au total, les AGPI ω 3 induisent une réponse vasodilatatrice prolongée chez le fœtus d'agneau sans effet délétère ni sur la circulation systémique ni sur l'oxygénation tissulaire.

Cette réponse vasculaire pulmonaire n'est pas inhibée par de la L-nitro-arginine, ce qui indique qu'elle n'est pas liée à une augmentation de la production de NO. Par contre, la réponse vasodilatatrice pulmonaire est abolie par le tétra-éthyl-amonium -antagoniste non spécifique des canaux potassiques-. Ces premiers résultats suggèrent que les AGPI ω 3 ont des effets vasodilatateurs pulmonaires médiés par l'ouverture de canaux potassiques, et indépendant de la libération de NO. A notre connaissance, il s'agit de la première étude suggérant un effet bénéfique des AGPI ω 3 sur la circulation pulmonaire périnatale.

L'hypertension artérielle pulmonaire persistante du nouveau-né (HTAPP) est un syndrome clinique qui est associé avec différentes affections cardio-pulmonaires : l'asphyxie néonatale, le sepsis, l'inhalation méconiale, la détresse respiratoire néonatale, ou l'HTAPP peut être idiopathique. L'HTAPP résulte d'un échec des mécanismes de la vasodilatation pulmonaire à la naissance. Ce syndrome clinique est caractérisé par une augmentation des RVP, entraînant un shunt vasculaire droit-gauche extra-pulmonaire à travers le canal artériel et le foramen ovale et une hypoxie sévère. L'HTAPP est une pathologie à la fois fréquente et sévère puisque environ 5 pour mille naissances se

compliqueront de ce syndrome associé à une hypoxémie réfractaire. La morbidité et la mortalité des HTAPP du nouveau-né restent élevées, justifiant la poursuite d'études de sa pathogénie.

Une altération de la voie du NO est impliquée dans l'HTAPP. Elle joue un rôle essentiel dans la vasodilatation pulmonaire à la naissance. Le NO induit une relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires en activant la guanylate cyclase ce qui accroît la concentration intra-cellulaire du GMP cyclique. L'HTAPP peut résulter d'une diminution de la production de NO ou d'une diminution de la réponse au NO. Dans le premier cas, l'inhalation de NO améliore la fonction pulmonaire. Dans le 2ème cas, le traitement est actuellement limité à une prise en charge symptomatique de la détresse respiratoire. Le recours à une circulation extra-corporelle peut être nécessaire. Un traitement par AGPI ω 3 pourrait être efficace puisqu'il dilate le lit vasculaire pulmonaire indépendamment de la voie du NO.

Dans le cadre de ce travail de recherche, nous cherchons à décrypter le mécanisme de cette réponse vasodilatatrice pulmonaire. Nos résultats préliminaires indiquent qu'elle est médiée par une activation des canaux potassiques. Les dérivés « epoxy » de l'EPA ou du DHA ont la capacité d'activer directement et/ou indirectement les canaux potassiques calcium- et ATP-dépendant. Dans la 2ème partie de ce travail, nous chercherons à savoir quel est le médiateur de cette réponse vasodilatatrice

Le passage du DHA trans-placentaire et dans le lait a été montré. L'intérêt de cette stratégie préventive sur le développement psycho-moteur de l'enfant a déjà aussi été démontré [176]. Si nos résultats apportent des arguments en faveur d'un effet cardiorespiratoires bénéfiques d'une supplémentation en AGPI ω 3, cette étude pourra contribuer à promouvoir la consommation d'aliments contenant des AGPI ω 3 pendant la grossesse et la période d'allaitement, comme les poissons gras ou certaines huiles riches en acide linoléique.

Chapitre 8 : Effets de l'EPA et du DHA sur la circulation pulmonaire fœtale

1. Introduction

Les mécanismes d'actions des AGPI ω 3 sont complexes, multiples et impliqués dans de nombreuses voies biologiques. Les principaux AGPI ω 3 à effets biologiques sont l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA), tous les 2 dérivant de la conversion de l'acide α linoléinique. Ils agissent soit directement, soit par l'intermédiaire de leurs métabolites.

L'EPA et le DHA sont métabolisés par 3 classes enzymatiques :

- la voie des cyclo-oxygénases qui produisent les prostaglandines (classe 3) et les thromboxanes (classe 3) ;
- la voie des lipo-oxygénases qui conduit aux leucotriènes (classes 5) et aux lipoxines.
- la voie des cytochrome P450 mono-oxygénases qui produisent des dérivés époxydes des AGPI ω 3 tels que les acides hydroxy-eicosatétraénoïques (HETEs) (comme le 20-HETE) [177] et les acides époxy-eicosatétraénoïques (EETs) (notamment les 17-18 époxy) [165]. Ils ont la capacité d'activer les canaux potassiques calcium dépendant et de réduire la sensibilité des myofibrilles au calcium [31].

Ces dérivés époxydes sont métabolisés en dérivés inactifs par les époxydes hydrolases[178]. L'inactivation des époxydes hydrolases augmente donc les concentrations de dérivés «époxydes » [178]. Chacun de ces dérivés ont des effets cellulaires spécifiques et tissus-dépendants.

Les métabolites de l'EPA et du DHA ont des effets vasculaires vasodilatateurs et antiagrégants, et favorisent la prolifération des cellules endothéliales [179]. Ces effets vasculaires impliquent l'activation des canaux potassiques calcium- et ATP-dépendants soit directement, soit via l'activation de la protéine kinase A [168]. Ces effets vasculaires

expliquent l'atténuation de l'hypertension pulmonaire induite par la monocrotaline chez le rat, par les inhibiteurs de l'époxyde hydroxylase [180].

Alors que des effets bénéfiques des AGPI ω 3 pendant la période périnatale ont été montrés sur le devenir psychomoteur à moyen et long terme [176], les effets cardiorespiratoires d'une supplémentation en AGPI ω 3 chez le fœtus ou le nouveau-né sont peu connus.

Les mécanismes d'action, et les études expérimentales et cliniques chez l'adulte suggèrent que l'EPA et le DHA ont la potentialité de prévenir les détresses respiratoires néonatales et leurs conséquences :

- En améliorant l'adaptation cardio-respiratoire à la naissance par leurs effets sur la réabsorption de liquide pulmonaire (création de la CRF) et par leurs effets de potentialisation de la vasodilatation endothélium-dépendante (vasodilatation pulmonaire);
- En réduisant les processus inflammatoire du poumon, facteur de dysplasie broncho-pulmonaire.

Une première série d'expérimentation a été réalisée sur des fœtus d'agneau [181], rapportée dans le chapitre 7. Nos résultats montraient qu'une perfusion d'OMEGAVEN® (émulsion lipidique contenant plusieurs AGPI ω 3 dont l'EPA et le DHA) réduisait les résistances vasculaires pulmonaires d'environ 25%.

Cette réponse vasculaire pulmonaire n'était pas liée à une augmentation de la production de NO mais était médiée par l'ouverture de canaux potassiques.

Notre hypothèse est que l'EPA est responsable de l'effet vasodilatateur pulmonaire fœtal observé dans nos travaux préliminaires. Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié les effets vasculaires pulmonaires de l'EPA et du DHA sur un modèle expérimental de fœtus de brebis instrumenté de façon chronique in utero.

Par ailleurs, les mécanismes d'action de l'EPA ont été explorés à l'aide d'expérimentation in vitro sur anneaux vasculaires pulmonaires fœtaux prélevés chez l'agneau. L'hypothèse principale de ce travail est que l'EPA induit une vasorelaxation endothélium-dépendante.

2. Matériel et méthode

2.1. Modèle expérimental

Cf chapitre 3

2.2. Protocoles

Etude de l'effet vasculaire pulmonaire de l'EPA et du DHA

Ce protocole, représenté par la figure 21, comprenait une perfusion de SSI : 12mL/h jusqu'à obtenir 30 minutes de stabilité hémodynamique : mesures toutes les 10 minutes des Pao, PAP, et intra amniotique (PIA), de la FC et du débit de l'APG. Des prélèvements sanguins (1 tube EDTA et 1 tube hépariné) pour dosages des acides gras, GDS et lactates étaient réalisés à la fin de la période de stabilité. Puis nous débutons la perfusion de l'EPA ou de DHA associée à du SSI à débit de 12 mL/h pendant une durée de 2 heures, (dose totale d'EPA de 25 mg dilué dans 0,25 mL d'éthanol, dose totale de DHA de 50 mg dilué dans 0,25 mL d'éthanol). Durant cette période, nous réalisons les mesures toutes les 10 minutes des PAo, PAP, PIA, FC, du débit de l'APG et calcul des RVP. En fin de perfusion, réalisation de nouveaux GDS, lactates et prélèvements sanguins pour dosages des acides gras (1 tube EDTA et 1 tube hépariné). Puis le relais était pris par une perfusion de SSI à débit de 12 mL/h sur une heure avec poursuites des mesures des pressions PAo, PAP, PIA, FC, Qm et calcul des RVP.

Les tubes des prélèvements sanguins étaient centrifugés à 4 °C, à 5000 tours pendant 10 minutes, récupération du sérum conservés dans des tubes eppendorf® congelés à -80°C Le même protocole était réalisé avec de l'éthanol (0.25 ml) pour s'assurer de l'absence d'effet de l'excipient.

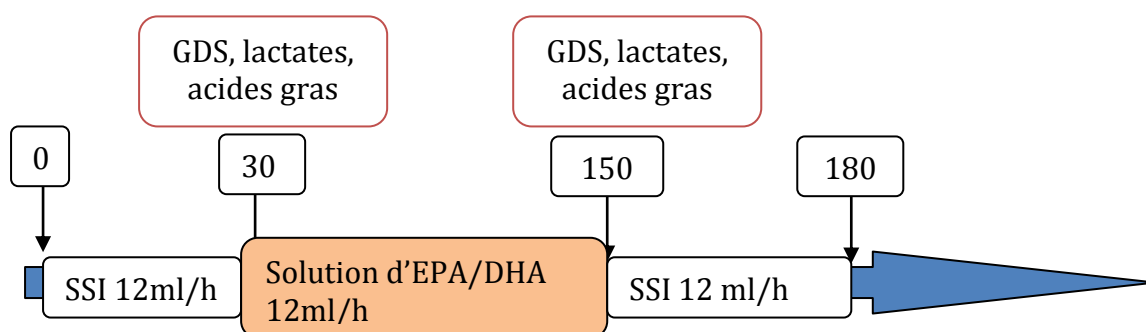


Figure 23 : Représentation schématique du protocole EPA ou DHA

Le groupe témoin a été constitué de fœtus de brebis chroniquement instrumentés selon la même chirurgie. Le protocole d'étude remplaçait l'injection d'EPA ou de DHA par une solution d'éthanol, solvant des AGPI ω 3.

Préparation des produits

L'EPA et le DHA étaient produits par le laboratoire Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, USA). La solution d'EPA était obtenue en solubilisant 25mg d'EPA dans 0,25ml d'éthanol puis l'ensemble était ramené par ajout de SSI à un volume de 26 ml. La solution de DHA était obtenue en solubilisant 50 mg dans 0,25 ml d'éthanol. Puis l'ensemble était ramené à 26ml par ajout de SSI.

La solution témoin d'éthanol était obtenue en mélangeant 0,25 ml d'éthanol à 25,75 ml de SSI.

2.3. Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques était effectué en utilisant de logiciel StatView 4.5 pour PC (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). Dans chaque protocole, n représente le nombre de fœtus étudiés.

Les résultats étaient exprimés sous forme de moyennes affectées de leur écart à la moyenne (SEM) ou sous forme de pourcentage de variation maximale par rapport à la base.

Les données hémodynamiques étaient analysées en utilisant une analyse de variance (ANOVA) pour mesures répétées. Les différences intergroupes étaient analysées à l'aide du test de Bonferroni-Dunn en raison des comparaisons multiples, lorsque les valeurs de base des populations étaient identiques.

Les comparaisons des paramètres gazométriques faisaient appel au test non paramétrique de comparaison de moyennes pour petits effectifs de Mann-Whitney.

Le seuil de significativité retenu était $p < 0,05$.

3. Résultats

3.1. Effets de l'injection d'une solution d'EPA sur la circulation pulmonaire foétale

Durant l'injection de l'EPA, il n'était pas observé de modifications dans le temps de la FC, de la PAP, ni de la PAo. On notait une élévation significative du Qp à partir de la 60^{ème} minute suivant l'injection variant de $84 \pm 1,2$ à $100 (\pm 1,7)$ mL/min ($p < 0,001$). Cette élévation du Qp était associée à une réduction significative des RVP variant de $0,51 \pm 0,01$ à $0,43 \pm 0,01$ mmHg/mL/min ($p < 0,001$) (figure 24).

Les gaz du sang artériel et la lactatémie (tableau 12), n'étaient pas modifiés lors de l'injection de l'EPA.

Tableau 12 : évolution du gaz du sang artériel avant et après l'injection d'EPA pour un nombre de brebis (n=8), NS = non significatif

	Avant injection d'EPA	Après 120 min d'injection d'EPA	p
pH	$7,40 \pm 0,04$	$7,38 \pm 0,04$	NS
pCO ₂ (mmHg)	$47,30 \pm 7,49$	$48,12 \pm 8,15$	NS
pO ₂ (mmHg)	$12,7 \pm 4,03$	$13 \pm 4,45$	NS
Lactates (mmol/L)	$4,10 \pm 3,55$	$3,69 \pm 3,86$	NS
HbO ₂ saturation (%)	$49,9 \pm 20,24$	$52,33 \pm 17,86$	NS

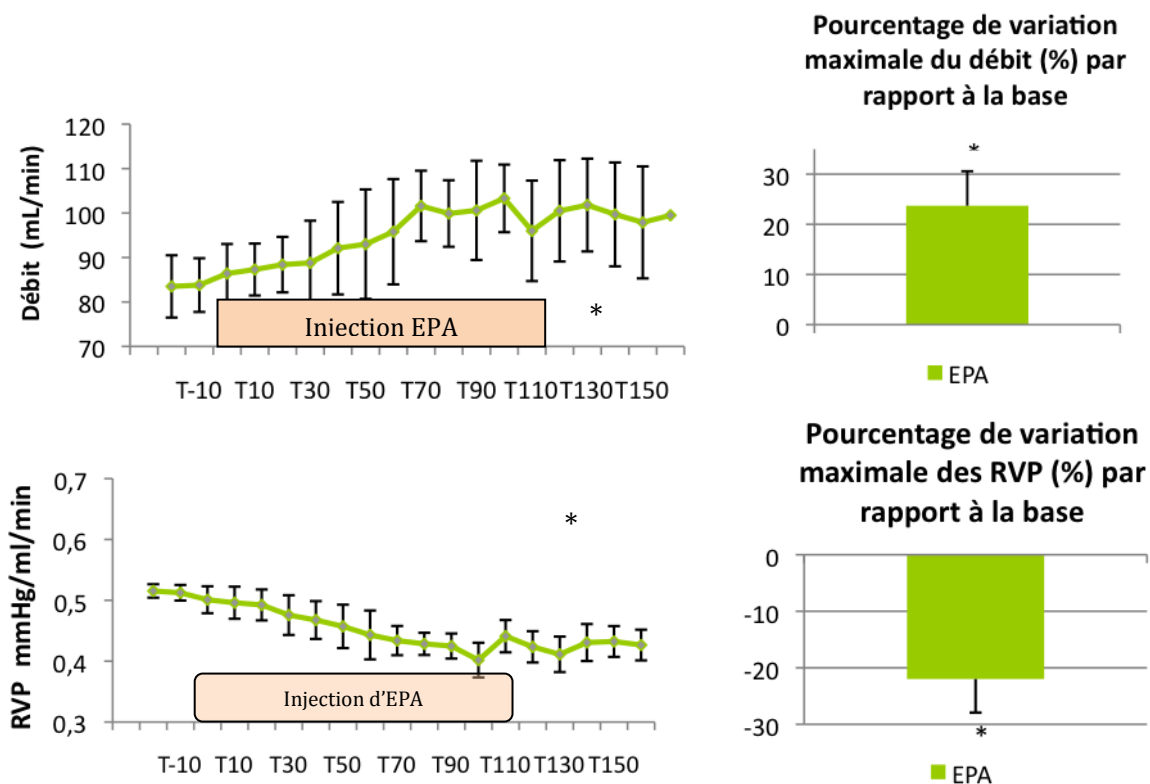


Figure 24 : Effets vasculaires lors d'une injection d'EPA 25 mg pendant 120 minutes (n=8). Augmentation significative ($p < 0,001$) du débit maximal de l'APG de 25 % et une réduction significative des RVP maximale de 22 % avec un effet persistant après la fin de l'injection d'EPA. * = $p < 0,001$

3.2. Effets de l'injection d'une solution de DHA sur la circulation pulmonaire foetale

Durant l'injection de DHA, il n'était pas retrouvé de modification statistiquement significative des FC, PAP, ni de la PAo.

Le Qp ne variait pas de façon significative (de $84 \pm 0,17$ mL/min à $89 \pm 1,85$ mL/min). De même, les variations des RVP constatées n'étaient pas significatives ($0,53 \pm 0,01$ mmHg/mL/min à $0,50 \pm 0,01$ mmHg/mL/min après 60 minutes d'injection de DHA). Les gaz du sang artériel et lactatémie restaient inchangés pendant l'injection de DHA (cf. tableau 13). Les résultats du protocole DHA sont représentés, dans la figure 25.

Tableau 13 : Absence de modification des gaz du sang artériel et du taux de lactate avant et après l'injection de DHA pour un nombre de brebis n=7, NS = non significatif

	Avant injection de DHA	Après 120 min d'injection de DHA	p
pH	7,39 ± 0,07	7,38 ± 0,08	NS
pCO2 (mmHg)	46,96 ± 4,86	46,08 ± 8,01	NS
pO2 (mmHg)	13,44 ± 4,48	15,33 ± 4,64	NS
Lactates (mmol/L)	3,05 ± 3,25	3,27 ± 4,20	NS
HbO2 saturation (%)	51,78 ± 19,12	54,54 ± 21,15	NS

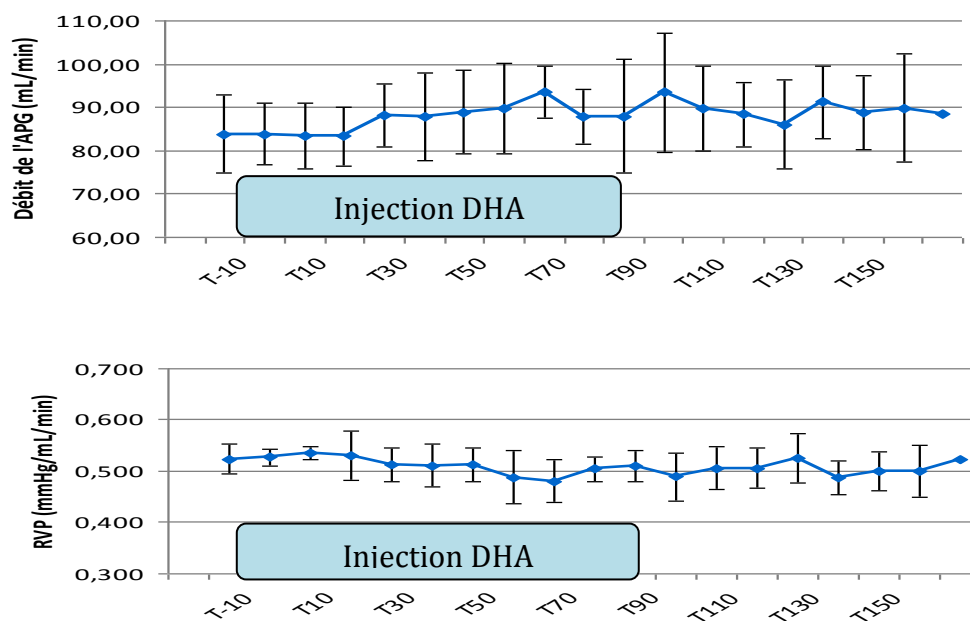


Figure 25 : Effets vasculaires du DHA (n=7). Pas de variation significative du débit de l'APG lors de l'injection de 50mg de DHA (p=0,157) ni des RVP (p=0,355).

3.3. Protocole Témoin « éthanol »

Les débits et des RVP ne variaient pas de façon significative après l'injection d'éthanol.

Les gaz du sang artériels et les lactates, dont les résultats figurent dans le tableau 14, n'étaient pas perturbés durant l'injection d'éthanol.

Tableau 14 : Absence de modifications des gaz du sang artériel et du taux de lactates avant et après l'injection d'éthanol (n=6). NS=: non significatif

	Avant injection d'éthanol	Après 120 min d'injection d'éthanol	p
pH	7,38 ± 0,05	7,36 ± 0,06	NS
pCO2 (mmHg)	39,81 ± 5,85	39,68 ± 4,04	NS
pO2 (mmHg)	15,13 ± 4,88	15,13 ± 4,42	NS
Lactates (mmol/L)	3,23 ± 4,77	3,6 ± 5,15	NS
HbO2 saturation (%)	60,03 ± 18,49	64,01 ± 24,57	NS

4. Discussion

le chapitre 7 nous avons montré que les AGPI ω 3 réduisaient les RVP fœtales chez l'agneau. Dans cette étude, nous avons cherché à savoir parmi les AGPI ω 3, lequel était le principe actif.

Nous avons étudié les effets vasculaires de l'EPA et du DHA (principaux AGPI ω 3 retrouvés dans l'Omegaven®) sur la circulation pulmonaire de fœtus de brebis. Nous avons montré que l'EPA induisait une réponse vasodilatatrice pulmonaire prolongée. A l'inverse, le DHA ne modifie pas les RVP. Les résultats du groupe témoin « éthanol » confirmait que l'éthanol, dans lequel l'EPA et le DHA sont solubles, n'était pas responsable des effets vasculaires observés lors de l'injection d'EPA ou de DHA.

D'autres travaux ont étudié les effets AGPI ω 3 sur la circulation pulmonaire, notamment en situation pathologique. Une étude expérimentale sur un modèle de rats atteints d'hypertension pulmonaire chronique, menée par S.L. Archer et al., retrouvaient une baisse du taux de mortalité chez les rats hypoxiques nourris à l'huile de poisson (riche en AGPI ω 3) par rapport aux autres rats hypoxiques. Ils notaient également une diminution des séquelles hémodynamiques et morphologiques liées à l'hypoxie chronique[182].

Dans le même sens, les travaux de Revermann et al. sur un modèle expérimental de rats hypertendus pulmonaires à la monocrotaline, démontrait que l'inhibition de la dégradation (par l'époxyde hydrolase soluble) des métabolites « epoxy » des AGPI ω 3 permettait de retarder le développement des lésions de remodelage vasculaires liée à l'HTAP[[180].

L'EPA possède un effet vasodilatateur pulmonaire foetal prolongé, contrairement à d'autres vasodilatateurs pulmonaires utilisés en thérapeutique (oxygène, acétylcholine, sildénafil, bradykinine) [67]. En effet, on observe une persistance de la réponse vasculaire jusqu'à une heure après la fin de l'injection d'EPA.

D'autre part, l'injection d'EPA n'a pas modifié les paramètres hémodynamiques systémiques. Les FC, PAP, PAo sont restées constantes durant l'administration d'EPA.

L'effet vasculaire observé est un effet direct de l'EPA. Notamment, il n'est pas lié indirectement à des modifications d'oxygénation puisqu'il n'a pas été observé durant l'injection d'EPA de modifications significatives de la PaCO₂ et de la PaO₂. De plus, l'absence de modifications significatives des gaz du sang ainsi que du taux de lactates indique que la perfusion placentaire et que l'oxygénation tissulaire n'ont pas été altérées.

Au total, l'EPA induit une réponse vasodilatatrice prolongée chez le fœtus de brebis sans effet délétère ni sur la circulation systémique ni l'oxygénation tissulaire.

Pour mieux appréhender le mécanisme d'action de l'EPA sur la circulation pulmonaire, nous avons débuté une étude in vitro sur des anneaux vasculaires avec ou sans lésion de l'endothelium.

Chapitre 9 : l'impact de l'obstruction trachéale anténatale sur la circulation pulmonaire fœtale.

1. Introduction

Le développement et la croissance du poumon fœtal sont liés en partie aux contraintes mécaniques exercées par la pression intra pulmonaire due à la production continue de liquide sécrété par l'épithélium alvéolaire et extériorisé par les voies aériennes supérieures[183-187]. L'occlusion de la trachée (OT) fœtale augmente cette pression intra pulmonaire en empêchant la sortie du liquide pulmonaire. Il en résulte une accélération de la croissance du poumon[188,189]. Cet effet a bien été démontré sur plusieurs modèles expérimentaux. L'OT est utilisée actuellement en clinique humaine dans les cas de hernies diaphragmatiques congénitales jugées sévères pendant la vie fœtale et qui s'accompagnent d'hypoplasie pulmonaire[190]. Les mécanismes expliquant, que l'OT anténatale corrige les conséquences d'une hypoplasie pulmonaire ne sont qu'imparfaitement compris.

Il a été montré que l'OT anténatale accélère la prolifération des cellules pulmonaires, stimule la formation alvéolaire, accentue l'amincissement de la paroi alvéolaire, et induit la trans-différentiation des cellules épithéliales de type II en type I[188].

L'hypoplasie pulmonaire associe hypoplasie parenchymateuse et vasculaire à des anomalies importantes de la paroi des vaisseaux pulmonaires. La musculature est épaissie, et la réactivité vasculaire pulmonaire est altérée indiquant l'existence d'une dysfonction endothéliale [191]. L'OT anténatale prévient partiellement l'apparition de ces anomalies histologiques vasculaires [192]. Cependant, les effets de l'OT anténatale sur la circulation pulmonaire ne sont pas connus. En effet il a été décrit une baisse de

l'index de pulsatilité (IP) à la fois chez le lapin et chez la brebis pour les fœtus avec une OT, mais il n'a pas été retrouvé de changement pour le débit pulmonaire après une Occlusion trachéale par foetoscopie (FETO) chez le fœtus d'agneau [193,196]. Actuellement, peu d'éléments sont connus sur la réactivité vasculaire pulmonaire après FETO dans les HDC. Une seule étude rapporte que la survenue d'une HTAP est moins fréquente chez les fœtus ayant eu une TO [196].

Notre hypothèse est que l'occlusion trachéale anténatale a un impact sur la circulation pulmonaire. Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié, chez le fœtus d'agneau chroniquement instrumenté, les effets d'une occlusion trachéale brève puis chronique sur le tonus vasculaire pulmonaire de base et sur la réactivité vasculaire pulmonaire endothéliale et non-endothéliale dépendante.

Les résultats de ce travail sont à l'origine de l'article soumis à la revue « Journal of Pediatric Surgery » :

Aubry E, Fayoux P, Jani J, Deprest J, Deruelle P, Debarge V, Storme L. Effects of tracheal occlusion on the pulmonary circulation in the fetal lamb with normally developing lungs. J Pediatr Surg, soumis, revision en cours.

4. Discussion

Nous avons recherché les effets vasculaires pulmonaires de l'occlusion anténatale. Pour cela nous avons étudié la réponse tant à une occlusion aigue qu'à une occlusion prolongée chez le fœtus de brebis. Une OT brève diminue le tonus vasculaire pulmonaire de base tandis que la levée de cette occlusion entraîne une baisse supplémentaire des RVP. Nous avons aussi montré qu'une occlusion trachéale prolongée émousse la réponse vasculaire pulmonaire à l'acétylcholine et diminue celle induite par l'augmentation de la PaO₂. En regroupant nos résultats, ces données indiquent que l'OT anténatale favorise une vasodilatation pulmonaire, qui est en partie atténuée par les effets mécaniques de l'élévation de la pression intraluminale.

L'OT anténatale modifie la musculation anormale des artérioles pulmonaires dans la HDC [197]. Il a déjà été démontré qu'une OT de courte durée corrigeait les anomalies vasculaires pulmonaires chez le fœtus de brebis porteur d'une HDC [197,198]. L'index de pulsatilité dans les artères pulmonaires, un marqueur indépendant d'HTAP, est élevé dans les HDC, alors que l'OT reverse cette augmentation. Malgré toutes ces données, avant notre étude peu d'éléments sont connus sur l'effet de l'OT sur le poumon normal. Bien qu'une augmentation du volume pulmonaire suit l'OT, il n'est pas retrouvé de modification des profils de débits sanguins chez le fœtus de brebis [194]. Polglase et al. ne retrouve pas de modification ni du Q_p ni des RVP durant 7 jours d'OT chez la brebis gestante [195]. Nos résultats vont dans le même sens que ces 2 études avec une absence de modification du tonus vasculaire pulmonaire de base en cas d'OT prolongée. Par contre, nous avons mis en évidence qu'une brève OT élève le Q_p et diminue les RVP. La vasodilatation pulmonaire induite par l'OT n'est pas le résultat d'une modification des échanges gazeux ou de l'équilibre vasculaire systémique, puisque les GDS fœtaux et la Pao ne sont pas modifiés pendant la même période. Le mécanisme de la vasodilatation pulmonaire induite par l'OT n'est pas clair, mais peut inclure la libération de facteurs de croissance et de médiateurs vasodilatateurs [199]. L'étirement du poumon régulerait à la hausse de l'ARNm du VEGF, de l'expression des protéines [200] et de la production de NO [201]. Muratore et al. retrouve une augmentation du VEGF dès la trentième minute de stretching pulmonaire expliquant nos résultats de diminution RVP dès 30 minutes

d'OT. En outre, nous avons également constaté que la déflation du ballon 2 heures plus tard, amplifiait la réponse vasodilatatrice pulmonaire. La levée de l'OT provoque certainement une baisse de la pression trachéale. Une étude précédente met en évidence que la pression intraluminale a un impact majeur sur le débit sanguin pulmonaire [195]. A la lumière des données de la littérature et de nos récents résultats, nous pouvons penser que l'OT active spontanément 2 réponses vasculaires opposées : 1) une vasodilatation induite par la libération de médiateurs vasodilatateurs due à l'étirement pulmonaire ; 2) l'augmentation de pression intraluminale qui s'oppose à la réponse vasodilatatrice. Ainsi, la libération de l'OT favorise la réponse vasodilatatrice pulmonaire aiguë. Pris dans leur ensemble, nos résultats suggèrent que l'OT aiguë induit une réponse puissante vasodilatatrice pulmonaire qui est en partie atténuée par l'augmentation de la pression intraluminale.

Notre étude fournit des informations supplémentaires sur l'impact de l'OT sur la circulation fœtale pulmonaire. Les réponses vasculaires pulmonaires à l'acétylcholine et à l'augmentation de la PaO₂ fœtale ont été nettement diminuées après l'OT prolongée. Cette réponse particulière à des stimuli vasodilatateurs notamment après FETO n'est probablement pas liée à une diminution de la réactivité vasculaire pulmonaire. Une étude précédente, dans un modèle similaire, a montré une augmentation soutenue du débit sanguin pulmonaire après l'arrêt de la FETO, ce qui suggère que la réactivité vasculaire pulmonaire n'est pas affectée par l'OT prolongée [195]. Ainsi, une réponse diminuée à des stimuli vasodilatateurs au cours d'une OT prolongée prouverait l'impact majeur de la pression intraluminale sur le débit sanguin pulmonaire. Différentes études retrouvent des atteintes de la structure des vaisseaux pulmonaires lors de l'OT [192,202]. Des anomalies vasculaires pulmonaires similaires ont été décrites dans l'HTAP [191] d'où l'intérêt de notre étude à mieux expliciter l'impact de l'OT sur l'hémodynamique pulmonaire.

En conclusion, nos résultats indiquent que l'OT anténatale n'altère pas le Qp en dépit de l'augmentation de la pression intra luminale. Une brève occlusion trachéale prénatale aiguë induit une réponse puissante vasodilatatrice pulmonaire, qui est renforcée après l'arrêt de l'OT. Nous suggérons que l'occlusion trachéale prénatale favorise activement une vasodilatation pulmonaire. L'impact de l'OT prolongée sur le Qp est masqué en partie par les effets mécaniques de l'élévation de la pression intraluminale.

Chapitre 10 : conclusion générale et perspectives

Les principales données nouvelles décrites dans ce travail de thèse sont les suivantes :

Dans la première partie de ce travail, nous avons vu que les mécanismes de transition de la circulation pulmonaire à la naissance dépendent de facteurs environnementaux comme le tabagisme passif. Ainsi, nous avons démontré que l'exposition à la fumée de cigarette élevait le tonus vasculaire pulmonaire et surtout altérait de façon prolongée la réactivité vasculaire pulmonaire. Cet effet explique le risque accru de maladaptation à la vie extra-utérine en cas de tabagisme pendant la grossesse.

Nous avons montré que l'apeline présente dans les artères pulmonaires fœtales une puissante action vasoconstrictrice dose-dépendante. Selon nos résultats, cette action est médiée par l'ouverture de canaux calciques voltage dépendant. Le système apelinergique est activé dans toutes les situations de stress, de la même façon qu'est activé l'axe corticotrope. Le système apelinergique pourrait donc expliquer les HTAP néonatales par maladaptation à la vie extra utérine accompagnant les situations de stress périnatal.

Aux vues de nos résultats, il semble important de poursuivre la compréhension du système apelinergique. Nous souhaiterions pouvoir tester sur des anneaux vasculaires pulmonaires montés sur tensiomètre, afin d'évaluer un probable effet-dose. Nous souhaiterions inhiber la voie de la phospholipase C afin de décrypter les mécanismes d'action aboutissant à la vasoconstriction pulmonaire par l'apeline. Par ailleurs, nous envisageons d'évaluer l'état d'activation du système apelinergique au cours de la HDC, puisque cette malformation se complique presque systématiquement d'une HTAP.

Nos résultats confirment l'existence d'un effet vasodilatateur pulmonaire spécifique en période périnatale de la DHEA. Nous avons mis en évidence un effet dose avec une vasodilatation plus importante et plus prolongée lors de l'augmentation de la dose. Le mécanisme d'action de la DHEA est mal connu. Nous avons montré que l'utilisation d'un bloqueur de la voie du NO, a pour conséquence d'inhiber l'action de la DHEA. Nos résultats indiquent donc que le mécanisme d'action vasodilatateur de la DHEA est médié par le NO. Nous avons aussi pu montrer que la DHEA passait du fœtus dans le sang maternel. Le DHEA s'administre essentiellement par voie orale. Nous envisageons de tester ces effets en cliniques humaines chez des enfants porteurs d'une HTAP lors de pathologie respiratoire chronique comme la hernie diaphragmatique ou les formes sévères de dysplasie broncho-pulmonaire.

Enfin, nous avons montré qu'à la différence des AGPI sans $\omega 3$, les AGPI $\omega 3$ induisent une réponse pulmonaire vasodilatatrice. Cette réponse vasculaire pulmonaire n'est pas modifiée par l'inhibition de la NO synthase mais est réduite par l'inhibition de la mono-oxygénase P450, et abolie par les inhibiteurs des canaux potassiques. Cette réponse est médiée par l'ouverture de canaux potassiques induite en partie par des métabolites des AGPI $\omega 3$ produits par la mono-oxygénase P450. Ce résultat est important car 30% des HTAPP sont résistantes au NO. Il est possible qu'une supplémentation en AGPI $\omega 3$ pendant la vie fœtale pourrait prévenir la survenue d'une HTAPP. D'autre part, nous savons que parmi les AGPI $\omega 3$, c'est l'EPA qui possède un effet vasodilatateur pulmonaire fœtal. Cette action est prolongée, contrairement à d'autres vasodilatateurs pulmonaires déjà utilisés en thérapeutique. En effet, on observe une persistance de la réponse vasculaire jusqu'à une heure après la fin de l'injection, d'EPA.

Nous envisageons de poursuivre des travaux de recherche expérimentaux et cliniques pour mieux préciser les mécanismes d'actions des Oméga-3 sur la fonction pulmonaire, ainsi que les indications potentielles en clinique humaines.

En effet, ses séquelles respiratoires surviennent chez presque la moitié des enfants de poids de naissance inférieur à 1000 g[203]. Elles s'expriment sous la forme d'une insuffisance respiratoire chronique appelée dysplasie broncho-pulmonaire associée de façon non exceptionnelle à une hypertension artérielle pulmonaire. Par leur incidence élevée, leur chronicité, et la lourdeur du handicap qu'elles induisent, les séquelles

pulmonaires de la prématurité représentent un réel problème de santé publique. Les mécanismes responsables de la dysplasie bronchopulmonaire sont multiples, et incluent des anomalies du développement alvéolaire et vasculaire pulmonaire et des réactions inflammatoires. Des séquelles respiratoires sont fréquentes aussi chez les enfants porteurs d'une hernie diaphragmatiques.

Des travaux indiquent que les acides gras poly insaturés de type OMEGA-3 (AGPI ω 3) réduisent la mortalité chez les patients adultes porteur d'un SDRA [171,172]. **Les bénéfices des AGPI ω 3** dans la pathologie pulmonaire sont potentiellement liés à 3 de leurs effets biologiques essentiels :

- **Amélioration de la fonction endothéliale**, par accentuation notamment de la vasodilatation endothélium-dépendante [204,205] ;
- **Augmentation de la clearance des liquides alvéolaires** par activation des pompes à sodium [206,207] et augmentation de l'activité du canal ENaC [208] ;
- **Effets anti-inflammatoires** par modulation de la synthèse des médiateurs lipidiques, de la libération des cytokines, et de l'activation des leucocytes [17].

Les AGPI ω 3 ont à la fois le potentiel d'améliorer l'adaptation cardio-respiratoire à la naissance (donc d'améliorer la fonction pulmonaire) et de réduire la réaction inflammatoire. En effet, l'adaptation cardio-circulatoire à la naissance implique le déclenchement simultané de 2 phénomènes : 1) la genèse de la capacité résiduelle fonctionnelle par résorption du liquide pulmonaire et par sécrétion de surfactant à la surface alvéolaire. Des canaux sodés spécifiques (canal ENaC) ainsi que l'activation d'une pompe Na/K ATPase sont nécessaires à la clearance du liquide alvéolaire. Or ceux-ci peuvent être activés par les AGPI ω 3; et 2) l'augmentation du débit sanguin pulmonaire par vasodilatation des vaisseaux pulmonaires. L'intégrité de la fonction endothéliale et la libération de médiateurs vasodilatateurs en réponses à divers stimulus (O₂, shear-stress, ventilation alvéolaire) sont nécessaires à la relaxation des cellules musculaires lisses des vaisseaux pulmonaires. Nous avons montré que les AGPI ω 3 ont des propriétés vasodilatatrices pulmonaires non médiés par la libération de NO chez le fœtus d'agneau [181]. Par ailleurs, les AGPI ω 3 peuvent réduire les réactions

inflammatoires du poumon. Ainsi, les effets potentiels des AGPI ω 3 sur l'adaptation cardiorespiratoire à la naissance et sur la réaction inflammatoire les rendent susceptibles de réduire le risque de dysplasie broncho-pulmonaire chez l'enfant prématuré ou porteur d'une hernie diaphragmatique.

Nous posons **l'hypothèse** que les **AGPI ω 3 administrés avant la naissance réduisent les risques de survenue de dysplasie broncho-pulmonaire** par :

- 1) Amélioration de l'adaptation cardio-vasculaire à la naissance et donc de la fonction pulmonaire ;
- 2) Et diminution de la réaction inflammatoire du poumon. Pour tester cette hypothèse, les effets des AGPI ω 3 sur la circulation pulmonaire, sur la clearance du liquide pulmonaire à la naissance, sur le stress oxydant et sur les réactions inflammatoires du poumon seront étudiés sur un modèle expérimental d'agneaux prématurés nouveau-nés.

Par ailleurs, nous testerons l'hypothèse que les effets respiratoires des AGPI ω 3 sont liés à la production des métabolites « époxydes ». Pour tester cette hypothèse, les expérimentations seront effectués avec et sans inhibiteur du cytochrome P450 spécifique de la formation de ces dérivés, et avec et sans inhibiteur des époxydes hydrolases.

Cette étude sera réalisée sur un modèle d'agneau prématuré qui présente à la naissance une mal-adaptation cardio-respiratoire liée à une maladie des membranes hyalines et une HTAPP. La ventilation mécanique induit en quelques heures une intense réaction inflammatoire du poumon. Nous attendons que les AGPI ω 3 accélèrent la résorption du liquide pulmonaire (effet sur les pompes à sodium et le canal ENaC), réduisent l'HTAPP (effets sur l'endothélium vasculaire), et améliorent la réactivité vasculaire pulmonaire aux stimulants vasodilatateurs liés à la naissance (ventilation alvéolaire, shear-stress et O₂) sur ce modèle. Donc, une amélioration de la fonction circulatoire et de la fonction pulmonaire est attendue. Par ailleurs, les effets anti-inflammatoires des AGPI ω 3 et de leurs dérivés, ainsi qu'une diminution probable des paramètres ventilatoires des animaux traités devraient permettre de réduire le développement de la réaction inflammatoire du poumon.

Dans le cadre de ce travail de recherche, nous chercherons aussi à savoir si les effets bénéfiques des AGPI ω 3 sont liés à la production de dérivés « epoxy ». Dans ce cas, l'inhibition du cytochrome P450 impliquée dans la production de ces dérivés devrait abolir les effets pulmonaires des AGPI ω 3. Nous confirmerons aussi cette hypothèse par 2 autres méthodes : 1) l'inhibition de l'hydrolase spécifique des dérivés « époxy » qui devraient accentuer la réponse pulmonaire aux AGPI ω 3 ; et 2) dosages spécifiques de ces dérivés (plasmatiques et poumons).

Au total, nous attendons donc que les AGPI ω 3 administrés avant la naissance préviennent les détresses respiratoires néonatales et l'évolution vers la dysplasie broncho-pulmonaire des enfants prématurés ou porteurs d'une hernie diaphragmatique. Cette recherche devrait être le préalable à **l'utilisation d'une supplémentation par AGPI ω 3 pendant la grossesse dans le but de prévenir les détresses respiratoires néonatales et leurs complications.** Le passage du DHA trans-placentaire et dans le lait a été montré. L'intérêt de cette stratégie préventive sur le développement psycho-moteur de l'enfant a déjà aussi été démontré. Si nos résultats apportent des arguments en faveur d'un effet cardio-respiratoires bénéfiques d'une supplémentation en AGPI ω 3, cette étude pourra contribuer à promouvoir la consommation d'aliments contenant des AGPI ω 3 pendant la grossesse et la période d'allaitement, comme les poissons gras ou certaines huiles riches en acide linoléique.

Références et bibliographies

1. Pearson DL, Dawling S, Walsh WF, Haines JL, Christman BW, Bazyk A, Scott N, Summar ML. Neonatal pulmonary hypertension--urea-cycle intermediates, nitric oxide production, and carbamoyl-phosphate synthetase function. *N Engl J Med.* 2001 Jun 14;344(24):1832-8.
2. Rudolph AM, Heymann MA. Circulatory changes during growth in the fetal lamb. *Circ Res* 1970;26(3):289-99.
3. Levin DL, Heymann MA, Kitterman JA, Gregory GA, Phibbs RH, Rudolph AM. Persistent pulmonary hypertension of the newborn. *J Pediatr* 1976;89:626-633.
4. Walther FJ, MJ Benders, JO Leighton. Persistent pulmonary hypertension in premature neonates with severe respiratory distress syndrome. *Pediatrics* 1992;90:899-904.
5. Abman SH, Chatfield BA, Hall SL, McMurtry IF. Role of endothelium-derived relaxing factor during transition of pulmonary circulation at birth. *Am J Physiol.* 1990 Dec;259:H1921-7.
6. Cassin S. Role of prostaglandins, thromboxanes, and leukotrienes in the control of the pulmonary circulation in the fetus and newborn. *Semin Perinatol.* 1987 Jan;11(1):53-63.
7. Cornfield DN, Chatfield BA, McQueston JA, McMurtry IF, Abman SH. Effects of birth-related stimuli on L-arginine-dependent pulmonary vasodilation in ovine fetus. *Am J Physiol.* 1992 May;262(5 Pt 2):H1474-81.
8. Assali NS, Kirschbaum TH Dilts PV J. Effects of hyperbaric oxygen on uteroplacental and fetal circulation. *Circ Res.* 1968 May;22(5):573-88.
9. Davidson D. Circulating vasoactive substances and hemodynamic adjustments at birth in lambs. *J Appl Physiol.* 1987 Aug;63(2):676-84.
10. Davidson D, Eldemerdash A. *Pediatr Res.* Endothelium-derived relaxing factor: evidence that it regulates pulmonary vascular resistance in the isolated neonatal guinea pig lung. 1991 Jun;29(6):538-42.
11. Velvis H, Moore P, Heymann MA. Prostaglandin inhibition prevents the fall in pulmonary vascular resistance as a result of rhythmic distension of the lungs in fetal lambs. *Pediatr Res.* 1991 Jul;30(1):62-8.
12. Ghatta S, Nimmagadda D, Xu X, O'Rourke ST. Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. *Pharmacol Ther.* 2006 Apr;110(1):103-16.

13. Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, Kawamata Y, Fukusumi S, Hinuma S, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Fujino M. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Oct 20;251(2):471-6.
14. Kleinz, M. J., and Davenport, A. P. Emerging roles of apelin in biology and medicine. *Pharmacol. Ther.* 2005;107:198-211.
15. Lee, D. K., Cheng, R., Nguyen, T., Fan, T., Kariyawasam, A. P., Liu, Y., Osmond, D. H., George, S. R., and O'Dowd, B. F. Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *J Neurochem.* 2000;74:34-41.
16. Tatemoto, K., Takayama, K., Zou, M. X., Kumaki, I., Zhang, W., Kumano, K., and Fujimiya, M. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul. Pept.* 2001;99:87-92.
17. Katugampola, S. D., Maguire, J. J., Matthewson, S. R., and Davenport, A. P. [[125]I]-(Pyr(1))Apelin-13 is a novel radioligand for localizing the APJ orphan receptor in human and rat tissues with evidence for a vasoconstrictor role in man. *Br J Pharmacol.* 2001; 132:1255-1260.
18. Rudolph AM. The changes in the circulation after birth. Their importance in congenital heart disease. *Circulation.* 1970 Feb;41(2):343-59.
19. Wallen LD, Perry SF, Alston JT, Maloney JE. Morphometric study of the role of pulmonary arterial flow in fetal lung growth in sheep. *Pediatr Res.* 1990 Feb;27(2):122-7
20. Morin FC 3rd, Egan EA, Ferguson W, Lundgren CE. Development of pulmonary vascular response to oxygen. *Am J Physiol.* 1988 Mar;254(3 Pt 2):H542-6.
21. Walker AM, Ritchie BC, Adamson TM, Maloney JE. Effect of changing lung liquid volume on the pulmonary circulation of fetal lambs. *J Appl Physiol.* 1988 Jan;64(1):61-7.
22. Abman SH, Accurso FJ, Wilkening RB, Meschia G. Persistent fetal pulmonary hypoperfusion after acute hypoxia. *Am J Physiol.* 1987 Oct;253(4 Pt 2):H941-8.
23. Lewis AB, Heymann MA, Rudolph AM. Gestational changes in pulmonary vascular responses in fetal lambs in utero. *Circ Res.* 1976 Oct;39(4):536-41.
24. Cornfield DN, Stevens T, McMurtry IF, Abman SH, Rodman DM. Acute hypoxia causes membrane depolarization and calcium influx in fetal pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1994 Apr;266(4 Pt 1):L469-75.

25. Weir EK, Eaton JW, Chesler E. Redox status and pulmonary vascular reactivity. *Chest*. 1985 Oct;88(4 Suppl):249S-252S.
26. Fandrey J, Seydel FP, Siegers CP, Jelkmann W. Role of cytochrome P450 in the control of the production of erythropoietin. *Life Sci*. 1990;47(2):127-34.
27. Post JM, Hume JR, Archer SL, Weir EK. Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol*. 1992 Apr;262(4 Pt 1):C882-90.
28. Yuan XJ, Goldman WF, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP. Hypoxia reduces potassium currents in cultured rat pulmonary but not mesenteric arterial myocytes. *Am J Physiol*. 1993 Feb;264(2 Pt 1):L116-23
29. Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol*. 1990 Jul;259(1 Pt 1):C3-18.
30. Weir, E. K. The fetal and neonatal pulmonary circulation. monograph series New York, Futura publishing Company Ed. 2000.
31. Hercule HC, Salanova B, Essin K, Honeck H, Falck JR, Sausbier M, Ruth P, Schunck WH, Luft FC, Gollasch M. The vasodilator 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid targets the pore-forming BK alpha channel subunit in rodents. *Exp Physiol*. 2007 Nov;92(6):1067-76.
32. Soifer SJ, Loitz RD, Roman C, Heymann MA. Leukotriene end organ antagonists increase pulmonary blood flow in fetal lambs. *Am J Physiol*. 1985 Sep;249(3 Pt 2):H570-6.
33. Nakamura T, Kasai K, Konuma S, Emoto T, Banba N, Ishikawa M, Shimoda S. Immunoreactive endothelin concentrations in maternal and fetal blood. *Life Sci*. 1990;46(15):1045-50.
34. Ivy DD, Kinsella JP, Abman SH. Physiologic characterization of endothelin A and B receptor activity in the ovine fetal pulmonary circulation. *J Clin Invest*. 1994 May;93(5):2141-8.
35. Ivy DD, Kinsella JP, Abman SH. Endothelin blockade augments pulmonary vasodilation in the ovine fetus. *J Appl Physiol*. 1996 Dec;81(6):2481-7.
36. Rosenberg AA, Kennaugh J, Koppenhafer SL, Loomis M, Chatfield BA, Abman SH. Elevated immunoreactive endothelin-1 levels in newborn infants with persistent pulmonary hypertension. *J Pediatr*. 1993 Jul;123(1):109-14.
37. Abman SH, Wilkening RB, Ward RM, Accurso FJ. Adaptation of fetal pulmonary blood flow to local infusion of tolazoline. *Pediatr Res*. 1986 Nov;20(11):1131-5.

38. Abman SH, Accurso FJ. Sustained fetal pulmonary vasodilation with prolonged atrial natriuretic factor and GMP infusions. *Am J Physiol.* 1991 Jan;260(1 Pt 2):H183-92.
39. Accurso FJ, Alpert B, Wilkening RB, Petersen RG, Meschia G. Time-dependent response of fetal pulmonary blood flow to an increase in fetal oxygen tension. *Respir Physiol.* 1986 Jan;63(1):43-52.
40. Accurso FJ, Wilkening RB. Temporal response of the fetal pulmonary circulation to pharmacologic vasodilators. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1988 Jan;187(1):89-98.
41. Abman SH, Chatfield BA, Rodman DM, Hall SL, McMurtry IF. Maturation changes in endothelium-derived relaxing factor activity of ovine pulmonary arteries in vitro. *Am J Physiol.* 1991 Apr;260(4 Pt 1):L280-5.
42. Kinsella JP, McQueston JA, Rosenberg AA, Abman SH. Hemodynamic effects of exogenous nitric oxide in ovine transitional pulmonary circulation. *Am J Physiol.* 1992 Sep;263(3 Pt 2):H875-80.
43. Abman SH, Accurso FJ, Wilkening RB, Meschia G. Persistent fetal pulmonary hypoperfusion after acute hypoxia. *Am J Physiol.* 1987 Oct;253(4 Pt 2):H941-8.
44. Ziegler JW, Ivy DD, Fox JJ, Kinsella JP, Clarke WR, Abman SH. Dipyridamole, a cGMP phosphodiesterase inhibitor, causes pulmonary vasodilation in the ovine fetus. *Am J Physiol.* 1995 Aug;269(2 Pt 2):H473-9.
45. Cassin S, Dawes GS, Mott JC, Ross BB, Strang LB. The Vascular Resistance of the Foetal and Newly Ventilated Lung of the Lamb. *J Physiol* 1964;171:61-79.
46. Teitel DF, Iwamoto HS, Rudolph AM. Effects of birth-related events on central blood flow patterns. *Pediatr Res* 1987;22(5):557-66.
47. Kinsella JP, Ivy DD, Abman SH. Ontogeny of NO activity and response to inhaled NO in the developing ovine pulmonary circulation. *Am J Physiol* 1994;267(5 Pt 2):H1955-61.
48. Kuipers J, Sidi D, Heymann M, and Rudolph. Comparison of methods of measuring cardiac output in newborn lambs. *Pediatr Res.* 1982; 16:594-598
49. Haworth SG. Pulmonary vascular remodeling in neonatal pulmonary hypertension : state of the art. *Chest.* 1988; 93:133-138
50. Iwamoto HS, Teitel D, Rudolph AM. Effects of birth-related events on blood flow distribution. *Pediatr Res* 1987;22(6):634-40.
51. Assali NS, Kirschbaum TH Dilts PV J. Effects of hyperbaric oxygen on uteroplacental and fetal circulation. *Circ Res.* 1968 May;22(5):573-88.

52. Davidson D, Eldemerdash A. Endothelium-derived relaxing factor: evidence that it regulates pulmonary vascular resistance in the isolated neonatal guinea pig lung. *Pediatr Res*. 1991 Jun;29(6):538-42.
53. Bevan JA, Laher I. Pressure and flow-dependent vascular tone. *FASEB J*. 1991 Jun;5(9):2267-73.
54. Howell K, Preston RJ, McLoughlin P. Chronic hypoxia causes angiogenesis in addition to remodelling in the adult rat pulmonary circulation. *J Physiol*. 2003 Feb 15;547(Pt 1):133-45.
55. Hislop A, Hey E, Reid L. The lungs in congenital bilateral renal agenesis and dysplasia. *Arch Dis Child* 1979;54:32-38.
56. Hislop A, Reid L. Persistent hypoplasia of the lung after repair of congenital diaphragmatic hernia. *Thorax* 1976;31:450-455.
57. Tenbrinck R, Gaillard JL, Tbboel D, Kluth D, Lachmann B, Molenaar JC. Pulmonary vascular abnormalities in experimentally induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *J Pediatr Surg*. 1992 Jul;27(7):862-5.
58. Katz Z, Lancet M, Yemini M, Mogilner BM, Feigl A, Ben Hur H. Treatment of premature labor contractions with combined ritodrine and indomethacin. *Int J Gynaecol Obstet* 1983 Aug;21(4):337-42.
59. Vermillon ST, Scardo JA, Lashus AG, Wiles HB. The effect of indomethacin tocolysis on fetal ductus arteriosus constriction with advancing gestational age. *Am J Obstet Gynecol* 1997 Aug;177(2):256-9.
60. Wild LM, Nickerson PA, Morin III FC. Ligating the ductus arteriosus before birth remodels the pulmonary vasculature of the lamb. *Pediatr Res* 1989;25:251-257.
61. Belik J, Keeley FW, Baldwin F, Rabinovitch M. Pulmonary hypertension and vascular remodeling in fetal sheep. *Am J Physiol* 1994;266:H2303-H2309.
62. Gersony WM, Morishima HO, Daniel SS, Kohl S, Cohen H, Brown W, James LS. The hemodynamic effects of intrauterine hypoxia: an experimental model in newborn lambs. *J Pediatr* 1976;89:631-635.
63. Abman SH, Shanley PF, Accurso FJ. Failure of postnatal adaptation of the pulmonary hypertension after chronic intrauterine pulmonary hypertension in the fetal lambs. *J Clin Invest* 1989;83:1849-1858.
64. Meyrick B, Reid L. Hypoxia-induced structural changes in the media and adventitia of the rat hilar pulmonary artery and their regression. *Am J Pathol* 1980;100:151-178.
65. Jeffery TK, Wanstall JC. Pulmonary vascular remodeling : a target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension. *Pharmacol Ther* 2001;92:1-20.

66. Wild LM, Nickerson PA, Morin FC. Ligating the ductus arteriosus before birth remodels the pulmonary vasculature of the lamb. *Pediatr Res* 1989;25:251-257.
67. Storme L, Rairigh RL, Parker TA, Kinsella JP, Abman SH. In vivo evidence for a myogenic response in the fetal pulmonary circulation. *Pediatr Res* 1999 Mar;45(3):425-31.
68. Selkurt EE. Effect of acute pulmonary hypertension on pressure/flow in the canine pulmonary vascular bed. *Respir Physiol*. 1985;60(2):169-80.
69. Storme L, Rairigh RL, Parker TA, Kinsella JP, Abman SH. Acute intrauterine pulmonary hypertension impairs endothelium-dependent vasodilatation in the ovine fetus. *Pediatr Res*. 1999 Apr;45(4 Pt 1):575-81.
70. Bartlett RH, Gazzaniga AB, Toomasian J, Coran AG, Roloff D, Rucker R. Extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) in neonatal respiratory failure: 100 cases. *Ann Surg* 1986;204:236-245
71. Pepke-Zaba J, Higenbottam TW, Din Xuan AT, Stone D, Wallwork J. Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilation in pulmonary hypertension. *Lancet* 1991;338:1173-1174
72. Fratacci MD, Frostell CG, Chen TY, Zapol WM. Inhaled NO: a selective pulmonary dilator of heparine-protamine vasoconstriction in sheep. *Anesthesiology* 1991;75:990-999
73. Kinsella JP, Neish S, Shaffer E, Abman SH. Low dose inhalational nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Lancet* 1992;340:819-820
74. Roberts JD, Polaner DM, Lang P, Zapol WM. Inhaled nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Lancet* 1992; 340:818-819
75. Kinsella JP, Neish SR, Ivy DD, Shaffer E, Abman SH. Clinical response to prolonged treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *J Pediatr* 1993;123:103-108
76. Roberts JD Jr, Chen TY, Kawai N, Wain J, Dupuy P, Shimouchi A, Bloch K, Polaner D, Zapol WM. Inhaled nitric oxide reverses pulmonary vasoconstriction in the hypoxic and acidotic newborn lamb. *Circ Res* 1993;72:246-254
77. The neonatal inhaled nitric oxide study group. Inhaled nitric oxide in full-term and nearly full-term infants with hypoxic respiratory failure. *N Engl J Med* 1997;336:597-604
78. Chu J, Clements JA, Cotton E, Klaus MH, Sweet AY, Thomas MA, Tooley WH. The pulmonary hyperperfusion syndrome. *Pediatrics* 1965;35:733-742

79. Walther FJ, Benders MJ, Leighton JO. Persistent pulmonary hypertension in premature neonates with severe respiratory distress syndrome. *Pediatrics* 1992;90:899-904
80. Kinsella JP, Neish SR, Ivy DD, Shaffer E, Abman SH. Clinical responses to prolonged treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn with low doses of inhaled nitric oxide. *J Pediatr* 1993 Jul;123(1):103-8.
81. Kinsella JP, Ivy DD, Abman SH. Inhaled nitric oxide improves gas exchange and lower pulmonary vascular resistance in severe experimental hyaline membrane disease. *Pediatr Res* 1994;36:402-408.
82. Rossaint R, Falke KJ, Lopez F, Slama K, Pison U, Zapol WM. Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1993;328:399-405.
83. Thebaud B, Petit T, De Lagausie P, Dall'Ava-Santucci J, Mercier JC, Dinh-Xuan AT. Altered guanylyl-cyclase activity in vitro of pulmonary arteries from fetal lambs with congenital diaphragmatic hernia. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002 Jul;27(1):42-7.
84. Romanetti F, *L'essentiel Vétérinaire* 29:24-25, 2006.
85. Kästner SB. A2-agonist in sheep : a review. *Vet Anaesth Analg.* 2006 Mar;33(2):79-96.
86. Jaillard S, Houfflin-Debarge V, Riou Y, Storme L, Puech F, Wurtz A. Modèle d'étude de la chirurgie pulmonaire périnatale chez l'agneau. *Annales de Chirurgie.* 2001;126(7):659-665.
87. Lewis AB, Heymann MA, Rudolph AM. Gestational changes in pulmonary vascular responses in fetal lambs in utero. *Circ Res.* 1976 Oct;39(4):536-41.
88. Deruelle P, Houfflin-Debarge V, Magnenant E, Jaillard S, Riou Y, Puech F, Storme L. Effects fetal tracheal ligation and congenital diaphragmatic hernia : a pulmonary vascular morphometric analysis. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:208-15.
89. Rogers JM. Tobacco and pregnancy. *Reproductive Toxicology* 2009 ;28 :152–160.
90. Schoendorf KC, Kiely JL. Relationship of sudden infant death syndrome to maternal smoking during and after pregnancy. *Pediatrics* 1992;90: 905–908.
91. American Academy of Pediatrics Committee on Environmental Health. Environmental tobacco smoke: a hazard to children. *Pediatrics* 1997; 99:639-42.
92. Gilliland FD, Li YF, Peters JM. Effects of maternal smoking during pregnancy and environmental tobacco smoke on asthma and wheezing in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:429-436.

93. Elliot JG, Carroll NG, James AL, Robinson PJ. Airway alveolar attachment points and exposure to cigarette smoke in utero. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:45-49.
94. Stick SM, Burton PR, Gurrin L, Sly PD, LeSouëf PN. Effects of maternal smoking during pregnancy and a family history of asthma on respiratory function in newborn infants. *Lancet* 1996;348:1060-64.
95. Bearer C., Emerson R. K., O'Riordan M. A., Roitman E., and Shackleton C., Maternal tobacco smoke exposure and persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Environ Health Perspect*, 1997;105:202-6.
96. Muraskas J. K., Juretschke L. J., Weiss M. G., Bhola M., and Besinger R. E. Neonatal-perinatal risk factors for the development of persistent pulmonary hypertension of the newborn in preterm newborns. *Am J Perinatol* 2001;18:87-91.
97. Kinsella JP, Abman SH. Recent developments in the pathophysiology and treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *J Pediatr* 1995;126:853-64.
98. Wright JL, Churg A. Short-term exposure to cigarette smoke induces endothelial dysfunction in small intrapulmonary arteries: analysis using guinea pig precision cut lung slices. *J Appl Physiol* 2008;104: 1462–1469.
99. Peluffo G, Calcerrada P, Piacenza L, Pizzano N, Radi R. Superoxide-mediated inactivation of nitric oxide and peroxynitrite formation by tobacco smoke in vascular endothelium: studies in cultured cells and smokers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;296: H1781–H1792.
100. Wright JL, Levy RD, Churg A. Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease: current theories of pathogenesis and their implications for treatment. *Thorax* 2005;60:605–609.
101. Carlo WF, Villamor E, Ambalavanan N, DeMey JG, Blanco CE. Chronic exposure to cigarette smoke extract impairs endothelium-dependent relaxation of chicken embryo pulmonary arteries. *Biol Neonate*, 2001;80:247-250.
102. Williams, G.M., et al., Maternal cigarette smoking and child psychiatric morbidity: a longitudinal study. *Pediatrics*, 1998. 102(1): p. e11
103. Socol, M.L., et al., Maternal smoking causes fetal hypoxia: experimental evidence. *Am J Obstet Gynecol*, 1982. 142(2): p. 214-8.
104. Longo, L.D. and E.P. Hill, Carbon monoxide uptake and elimination in fetal and maternal sheep. *Am J Physiol*, 1977. 232(3): p. H324-30.
105. Visnjevac, V. and M. Mikov, Smoking and carboxyhaemoglobin concentrations in mothers and their newborn infants. *Hum Toxicol*, 1986. 5(3): p. 175-7.

106. Soothill, P.W., et al., Maternal smoking and fetal carboxyhaemoglobin and blood gas levels. *Br J Obstet Gynaecol*, 1996. 103(1): p. 78-82.
107. Longo, L.D. and E.P. Hill, Carbon monoxide uptake and elimination in fetal and maternal sheep. *Am J Physiol*, 1977. 232(3): p. H324-30.
108. Hanke, W., W. Sobala, and J. Kalinka, Environmental tobacco smoke exposure among pregnant women: impact on fetal biometry at 20-24 weeks of gestation and newborn child's birth weight. *Int Arch Occup Environ Health*, 2004. 77(1): p. 47-52.
109. Lee, M.J., Marijuana and tobacco use in pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 1998. 25(1): p. 65-83.
110. Suzuki, K., et al., Placental transfer and distribution of nicotine in the pregnant rhesus monkey. *Am J Obstet Gynecol*, 1974. 119(2): p. 253-62.
111. Monheit, A.G., et al., Maternal and fetal cardiovascular effects of nicotine infusion in pregnant sheep. *Am J Obstet Gynecol*, 1983. 145(3): p. 290-6.
112. Suzuki, K., L.J. Minei, and E.E. Johnson, Effect of nicotine upon uterine blood flow in the pregnant rhesus monkey. *Am J Obstet Gynecol*, 1980. 136(8): p. 1009-13.
113. Suzuki, K., et al., Pharmacologic effects of nicotine upon the fetus and mother in the rhesus monkey. *Am J Obstet Gynecol*, 1971. 111(8): p. 1092-101.
114. Manning, F., D. Walker, and C. Feyerabend, The effect of nicotine on fetal breathing movements in conscious pregnant ewes. *Obstet Gynecol*, 1978. 52(5): p. 563-8.
115. Resnik, R., G.W. Brink, and M. Wilkes, Catecholamine-mediated reduction in uterine blood flow after nicotine infusion in the pregnant ewe. *J Clin Invest*, 1979. 63(6): p. 1133-6.
116. Adamsons, K., E. Mueller-Heubach, and R.E. Myers, Production of fetal asphyxia in the rhesus monkey by administration of catecholamines to the mother. *Am J Obstet Gynecol*, 1971. 109(2): p. 248-62.
117. Quigley, M.E., et al., Effects of maternal smoking on circulating catecholamine levels and fetal heart rates. *Am J Obstet Gynecol*, 1979. 133(6): p. 685-90.
118. Sekhon, H.S., et al., Prenatal nicotine increases pulmonary alpha7 nicotinic receptor expression and alters fetal lung development in monkeys. *J Clin Invest*, 1999. 103(5): p. 637-47.
119. Sekhon, H.S., et al., Prenatal nicotine exposure increases connective tissue expression in foetal monkey pulmonary vessels. *Eur Respir J*, 2004. 23(6): p. 906-15.

120. Carlo, W.F., et al., Chronic exposure to cigarette smoke extract impairs endothelium-dependent relaxation of chicken embryo pulmonary arteries. *Biol Neonate*, 2001. 80(3): p. 247-50.
121. Hutchison, S.J., et al., Secondhand tobacco smoke impairs rabbit pulmonary artery endothelium-dependent relaxation. *Chest*, 2001. 120(6): p. 2004-12.
122. Weir, E.K., J.W. Eaton, and E. Chesler, Redox status and pulmonary vascular reactivity. *Chest*, 1985. 88(4 Suppl): p. 249S-252S.
123. Moore, P., et al., EDRF inhibition attenuates the increase in pulmonary blood flow due to oxygen ventilation in fetal lambs. *J Appl Physiol*, 1992. 73(5): p. 2151-7.
124. Hutchison, S.J., et al., Secondhand tobacco smoke impairs rabbit pulmonary artery endothelium-dependent relaxation. *Chest*, 2001. 120(6): p. 2004-12.
125. Jaillard, S., Houfflin-Debarge, V., Riou, Y., Rakza, T., Klosowski, S., Lequien, P., and Storme, L. Effects of catecholamines on the pulmonary circulation in the ovine fetus. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 2001.281:R607-R614.
126. O'Dowd, B. F., Heiber, M., Chan, A., Heng, H. H., Tsui, L. C., Kennedy, J. L., Shi, X., Petronis, A., George, S. R., and Nguyen, T. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* 1993. 136:355-360.
127. Maguire, J. J., Kleinz, M. J., Pitkin, S. L., and Davenport, A. P. [Pyr1]apelin-13 identified as the predominant apelin isoform in the human heart: vasoactive mechanisms and inotropic action in disease. *Hypertension* 2009 54:598-604.
128. Szokodi, I., Tavi, P., Foldes, G., Voutilainen-Myllyla, S., Ilves, M., Tokola, H., Pikkarainen, S., Piuholta, J., Rysa, J., Toth, M., and Ruskoaho, H. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ. Res.* 2002.91:434-440.
129. Masri, B., Knibiehler, B., and Audigier, Y. Apelin signalling: a promising pathway from cloning to pharmacology. *Cell Signal.* 2005.17:415-426.
130. Ashley, E., Chun, H. J., and Quertermous, T. Opposing cardiovascular roles for the angiotensin and apelin signaling pathways. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2006.41:778-781.
131. Andersen, C. U., Markvardsen, L. H., Hilberg, O., and Simonsen, U. Pulmonary apelin levels and effects in rats with hypoxic pulmonary hypertension. *Respir. Med.* 2009. 103:1663-1671.

132. Charles, C. J., Rademaker, M. T., and Richards, A. M. Apelin-13 induces a biphasic haemodynamic response and hormonal activation in normal conscious sheep. *J. Endocrinol.* 2006. 189:701-710.
133. Feng, J. H., Li, W. M., Wu, X. P., Tan, X. Y., Gao, Y. H., Han, C. L., Li, S. Q., and Xie, H. N. Hemodynamic effect of apelin in a canine model of acute pulmonary thromboembolism. *Peptides* 2010.31:1772-1778.
134. Cheng, X., Cheng, X. S., and Pang, C. C. Venous dilator effect of apelin, an endogenous peptide ligand for the orphan APJ receptor, in conscious rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2003.470:171-175.
135. Salcedo, A., Garijo, J., Monge, L., Fernandez, N., Luis Garcia-Villalon, A., Sanchez, T., V, Cuervas-Mons, V., and Dieguez, G. Apelin effects in human splanchnic arteries. Role of nitric oxide and prostanoids. *Regul. Pept.* 2007.144:50-55.
136. Pitkin SL, Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP. Modulation of the apelin/APJ system in heart failure and atherosclerosis in man. *Br J Pharmacol.* 2010 Aug;160(7):1785-95.
137. Kagiya, S., Fukuhara, M., Matsumura, K., Lin, Y., Fujii, K., and Iida, M. Central and peripheral cardiovascular actions of apelin in conscious rats. *Regul. Pept.* 125:55-59, 2005.
138. Charles, C. J. Putative role for apelin in pressure/volume homeostasis and cardiovascular disease. *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* 2007.5:1-10.
139. King, A. J., Pfeffer, J. M., Pfeffer, M. A., and Brenner, B. M. Systemic hemodynamic effects of endothelin in rats. *Am. J. Physiol* 258:H787-H792, 1990.
140. Gardiner, S. M., March, J. E., Kemp, P. A., and Bennett, T. Bolus injection of human UII in conscious rats evokes a biphasic haemodynamic response. *Br. J. Pharmacol.* 143:422-430, 2004.
141. Maguire J. J., and Davenport A. P. Is urotensin-II the new endothelin? *Br. J. Pharmacol.* 2002.137:579-588.
142. Douglas, S. A., Sulpizio, A. C., Piercy, V., Sarau, H. M., Ames, R. S., Aiyar, N. V., Ohlstein, E. H., and Willette, R. N. Differential vasoconstrictor activity of human urotensin-II in vascular tissue isolated from the rat, mouse, dog, pig, marmoset and cynomolgus monkey. *Br. J. Pharmacol.* 2000.131:1262-1274.
143. Jaillard, S., Elbaz, F., Bresson-Just, S., Riou, Y., Houfflin-Debarge, V., Rakza, T., Larrue, B., and Storme, L. Pulmonary vasodilator effects of norepinephrine during the development of chronic pulmonary hypertension in neonatal lambs. *Br. J. Anaesth.* 2004.93:818-824.

144. Malamitsi-Puchner, A., Gourgiotis, D., Boutsikou, M., Baka, S., Hassiakos, D., and Briana, D. D. Circulating apelin concentrations in mother/infant pairs at term. *Acta Paediatr.* 2007.96:1751-1754.
145. O'Carroll, A. M., Don, A. L., and Lolait, S. J. APJ receptor mRNA expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus: regulation by stress and glucocorticoids. *J. Neuroendocrinol.* 2003.15:1095-1101.
146. Baulieu EE et al. An adrenam-secreted "androgen": Dehydroisoandrosterone sulfate, its metabolism and a tentative generalization on the metabolism of other steroid conjugates in man. *Recent Prog Horm Res.* 1965; 21:411-500.
147. Porsova-Dutoit I, Sulcova J, Starka L. Do DHEA/DHEAS play a protective role in coronary heart disease? *Physiol Res.* 2009;49 suppl 1:S43-56.
148. Hampl V, Bibova J, Povysilova V, Herget J. Dehydroepiandrosterone sulphate reduces chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Eur Respir J.* 2003 May; 21(5):862-5.
149. Bonnet S, Dumas de la Roque E, Begueret H, Marthan R, Fayon M, Dos Santos P, Savineau JP, Baulieu EE. Dehydroepiandrosterone (DHEA) prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA,* 2003 Aug 5;100(16):9488-93.
150. Debonneuil EH, Quillard J, Baulieu EE. Hypoxia and dehydroepiandrosterone in old age : a mouse survival study. *Respir Res.* 2006 Dec 18;7:144.
151. Homma N, Nagaoka T, Karoor V, Imamura M, Taraseviciene-Stewart L, Walker LA, Fagan KA, McMurtry IF, Oka M. Involvement of RhoA/Rho kinase signaling in protection against monocrotaline-induced pulmonary hypertension in pneumectomized rats by dehydroepiandrosterone. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008 Jul; 295(1):L71-8.
152. Peng W, Hoidal JR, Farruk IS. Role of a novel KCa opener in regulating K⁺ channels of hypoxic human pulmonary vascular cells. *Am J Respi Cell Mol Biol.* 1999 Apr;20(4):737-45.
153. Farrukh IS, Peng W, Orlinska U, Hoidal JR. Effect of dehydroepiandrosterone on hypoxic pulmonary vasoconstriction: a Ca²⁺-activated K⁺-channel opener. *Am J Physiol.* 1998 Feb;274(2Pt1):L186-95.
154. Oka M, Karoor V, Homma N, Nagaoka T, Sakao E, Golembeski SM, Limbird J, Imamura M, Gebb SA, Fagan KA, McMurtry IF. DHEA upregulates soluble guanylate cyclase and inhibits hypoxic pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res,* 2007 June 1; 74(3): 377-387.

155. Baulieu EE et al. DHEA, DHEA sulfate, and aging: Contribution of the DHEAge study to a sociobiomedical issue. *Proc Natl Acad Sci*, 2000 April 11; 97(8): 4279-4284.
156. Molinari C, Battaglia A, Grossini E, Mary DAS, Vassanelli C, Vacca G. The effect of dehydroepiandrosterone on coronary blood flow in prepubertal anaesthetized pigs. *J Physiol*. 2003 Jun 15;549(Pt3): 937-44.
157. Molinari C, Battaglia A, Grossini E, Mary DAS, Vassanelli C, Vacca G. The effect of dehydroepiandrosterone on regional blood flow in prepubertal anaesthetized pigs. *J Physiol*. 2004 May 15;557(Pt1):307-319.
158. Liu D, Dillon JS. Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to G α (i2,3). *J Biol Chem*. 2002 Jun 14;277(24): 21379-88
159. Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Varone G, Caruso A, Genazzani AR. Dehydroepiandrosterone modulates endothelial nitric oxide synthesis via direct genomic and nongenomic mechanisms. *Endocrinology*. 2003 Aug;144(8):3449-55.
160. Cornfield DN, Reeve HL, Tolarova S, Weir EK, Archer S. Oxygen causes fetal pulmonary vasodilatation through activation of a calcium-dependant potassium channel. *Proc Natl acad Sci USA*. 1996 Jul 23: 93(15):8089-94.
161. Hayashi T, Esaki T, Muto E, Kano H, Asai Y, Thakur NK, sumi D, Jayachandran M, Iguchi A. Dehydroepiandrosterone retards atherosclerosis formation through its conversion to estrogen: the possible role of nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Mar; 20(3): 782-92.
162. Abeywardena, M. Y. and R. J. Head. Longchain n-3 polyunsaturated fatty acids and blood vessel function. *Cardiovasc Res* 2001;52(3): 361-71.
163. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte PE, Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998;12(12):1063-1073.
164. Calder P C. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Biochem Soc Trans* 2005 Apr; 33(Pt 2): 423-7.
165. Russo G L. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochem Pharmacol* 2009;77(6): 937-46.
166. Fer M, Dreano Y, Lucas D, Corcos L, SaLaun JP, Berthou F, Amet Y. Metabolism of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids by recombinant human cytochromes P450. *Arch Biochem Biophys* 2008;471(2): 116-25.
167. Morin C, Guibert C, Sirois M, Echave V, GomesMM, Rousseau E. Effects of omega-hydroxylase product on distal human pulmonary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294(3): H1435-43.

168. Morin C, Sirois M, Echave V, Albadine R, Rousseau E. Relaxing effects of 17(18)-EpETE on arterial and airway smooth muscles in human lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;296(1): L130-9.
169. Burr ML, Fehily AM, Gibert JF, Rogers S, HollidayRM, Sweetnam PM, Elwood PC, Deadman NM. Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet* 1989Sep30;2(8666): 757-61.
170. Simopoulos AP. Omega-3 Fatty Acids in Inflammation and Autoimmune Diseases. *J Am Coll Nutr.* 2002 Dec;21(6):495-505.
171. Katz DP, Manner T, Furst P, Askanazi J. The use of an intravenous fish oil emulsion enriched with omega-3 fatty acids in patients with cystic fibrosis. *Nutrition* 1996;12(5):334-339.
172. Ranieri VM, Suter PM, Tortorella C, De Tullio R, Dayer JM, Brienza A, Bruno F, Sultsky AS. Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA* 1999;282(1):54-61.
173. Mayer K, Grimm H, Mayser P, Eigenbrodt E. Parenteral nutrition with n-3 lipids in sepsis. *Br J Nutr.* 2002 ;87 Suppl 1: S69-75.
174. Mayer K, Gokorsch S, Fegbeutel C, Hattar K, Rosseau S, Walmrath D, Seeger W, Griminger F. Parenteral nutrition with fish oil modulates cytokine response in patients with sepsis." *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167(10): 1321-8.
175. McLaughlin VV, Archer SL, Badesch DB, et al. ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association developed in collaboration with the American College of Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc.; and the Pulmonary Hypertension Association. *J Am Coll Cardiol* 2009;53(17):1573-1619.
176. Szajewska H, Horvath A, Koletzko B. Effect of n-3 long-chain PUFA supplementation of women with low-risk pregnancy outcomes and growth measures at birth : a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2006 ; 83 :1337-1344.
177. Morin C, Sirois M, EchaveV, Gomes MM, Rousseau E. Functional effects of 20-HETE on human bronchi: hyperpolarization and relaxation due to BK Ca channel activation. *Am J Physiol Lung Mol Physiol* 2007;293 : L1037-L1044.
178. Kim IH, Nishi K, Tsai HJ, Bradford T, Koda Y, Watanabe T, Morisseau C, Blanchfield J, Toth I, Hammock BD. Design of bioavailable derivatives of 12-(3-adamantan-1-yl-ureido)dodecanoic acid, a potent inhibitor of the soluble epoxide hydrolase. *BioorgMed Chem* 2007Jan1;15(1):312-323.

179. Singer P, Shapiro H, Theilla M, Anbar R, Singer J, Cohen J. Anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acids in critical illness: novel mechanisms and an integrative perspective. *Intensive Care Med.* 2008 Sep; 34(9):1580-92
180. Revermann M, Barbosa-Sicard E, Dony E, Schermuly R. T, Morisseau C, Geisslinger G, Fleming I, Hammock B. D, Brandes R. P. Inhibition of the soluble epoxide hydroxylase attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Hypertens* 2009;27:322-31.
181. *Houeijeh A, *Aubry E, Coridon H, Montaigne K, Sfeir R, Deruelle P, Storme. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA- ω 3) in the perinatal pulmonary circulation. *Crit Care Med.* 2011 Jun;39(6):1431-8.
182. Archer SL, Johnson GJ, Gebhard RL, Castleman WL, Levine AS, Westcott JY, Voelkel NF, Nelson DP, Weir EK. Effect of dietary fish oil on lung lipid profile and hypoxic pulmonary hypertension. *J Appl Physiol.* 1989 Apr;(4):1662-73.
183. Moessinger AC, Harding R, Adamson TM, Singh M, Kiu GT. Role of lung fluid volume in growth and maturation of the fetal sheep lung. *J Clin Invest.* 1990;86:1270-7.
184. Nardo L, Hooper SB, Harding R. Stimulation of lung growth by tracheal obstruction in fetal sheep: relation to luminal pressure and lung liquid volume. *Pediatr Res.* 1998;43:184-90.
185. Alcorn D, Adamson TM, Lambert TF, Maloney JE, Ritchie BC and Robinson PM. Morphological effects of chronic tracheal ligation and drainage in the fetal lamb lung. *J.Anat* 1977;123: 649-660.
186. Flecknoe SJ, Wallace MJ, Harding R and Hooper SB. Determination of alveolar epithelial cell phenotypes in fetal sheep: evidence for the involvement of basal lung expansion. *J Physiol* 2002;542: 245-253.
187. Hooper SB, Han VKM and Harding R. Changes in lung expansion alter pulmonary DNA synthesis and IGF-II gene expression in fetal sheep. *Am J Physiol* 1993;265: L403-L409.
188. Nardo L, Maritz G, Harding R and Hooper SB. Changes in lung structure and Cellular division induced by tracheal obstruction in fetal sheep. *Exp Lung Res* 2000;26: 105-119.
189. O'Toole, SJ, Hratch AS, Karamanoukian HL, Holm B, Azizkhan RG, Glick PL. Tracheal ligation does not correct the surfactant deficiency associated with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatric Surg* 1997; 32(2):1328-31.
190. Deprest J, Gratacos E, Nicolaidis KH, FETO Task Group. Fetoscopic tracheal occlusion (FETO) for severe congenital diaphragmatic hernia: evolution of a technique and preliminary results. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2004;24(2):121-6.

191. Storme L, Parker TA, Kinsella JP, Rairigh RL, Abman SH. Chronic hypertension impairs flow-induced vasodilatation and augments the myogenic response in fetal lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282 (1): L56-66.
192. Roubliova XI, Verbelen EK, Wu J, Vaast P, Jani J, Deprest JA. Effect of tracheal occlusion on peripheral pulmonary vessel muscularization in a fetal rabbit model for congenital diaphragmatic hernia. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191(3): 830-6.
193. Sylvester KG, Rasanen J, Kitano Y, Flake AW, Crombleholme TM, Adzick NS. Tracheal occlusion reverses the high impedance to flow in the fetal pulmonary circulation and normalizes its physiological response to oxygen at full term. *J Pediatr Surg*. 1998;33:1071-4.
194. Tchirikov M, Hecher K, Deprest J, Verbeken E, Roubliova X, Schröder HJ. Pulmonary circulation of fetal sheep with lung hyperplasia following tracheal occlusion. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2005;25:277-81.
195. Polglase GR, Wallace MJ, Morgan DL, Hooper SB. Increases in lung expansion alter pulmonary hemodynamics in fetal sheep. *J Appl Physiol*. 2006;101:273-82.
196. Cruz-Martinez R, Moreno-Alvarez O, Prat J, Krauel L, Tarrado X, Castañón M, Hernandez-Andrade E, Albert A, Gratacos E. Lung tissue blood perfusion changes induced by in utero tracheal occlusion in a rabbit model of congenital diaphragmatic hernia. *Fetal Diagn Ther*. 2009;26:137-42.
197. Luks FI, Wild YK, Piasecki GJ, De Paepe ME. Short-term tracheal occlusion corrects pulmonary vascular anomalies in the fetal lamb with diaphragmatic hernia. *Surgery*. 2000 Aug;182(2):266-72.
198. Bratu I, Flageole H, Laberge JM, Chen MF, Piedboeuf B. Pulmonary structural maturation and pulmonary artery remodeling after reversible fetal ovine tracheal occlusion in diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*. 2001;36:739-44.
199. Jesudason EC, Connell MG, Fernig DG, Lloyd DA, Losty PD. In vitro effects of growth factors on lung hypoplasia in a model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*. 2000;35:914-22.
200. Muratore CS, Nguyen HT, Ziegler MM, Wilson JM. Stretch-induced upregulation of VEGF gene expression in murine pulmonary culture: a role for angiogenesis in lung development. *J Pediatr Surg*. 2000;35:906-12.
201. Kuebler WM, Uhlig U, Goldmann T, Schael G, Kerem A, Exner K, Martin C, Vollmer E, Uhlig S. Stretch activates nitric oxide production in pulmonary vascular endothelial cells in situ. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168:1391-8.

202. DiFiore JW, Fauza DO, Slavin R, Wilson JM. Experimental Fetal tracheal ligation and congenital diaphragmatic hernia: a pulmonary vascular morphometric analysis. *J Pediatr Surg* 1995;30: 917-924.
203. Larroque B, Breart G, Kaminski M, Dehan M, Andre M, Burguet A, Grandjean H, Ledesert B, Leveque C, Maillard F, Matis J, Roze JC, Truffert P; Epipage study group. Survival of very preterm infants: Epipage, a population based cohort study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2004;8:F139-44
204. Morgan DR, Dixon LJ, Hanratty CG, El-Sherbeeney N, Hamilton PB, McGrath LT, Leahey WJ, Johnston GD, McVeigh GE. Effects of dietary omega-3 fatty acid supplementation on endothelium-dependent vasodilation in patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol.* 2006;97:547-51.
205. Goirand F, Ovide-Bordeaux S, Renaud JF, Grynberg A, Lacour B. Effect of dietary docosahexaenoic acid on the endothelium-dependent vasorelaxation in diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2005;32:184-90.
206. Pierre M, Husson MO, Leberre R, Desseyn JL, Galabert C, Beghin L, Beermann C, Dagenais A, Berthiaume Y, Cardinaud B, Barbry P, Gottrand F, Guery BP. Omega 3 polyunsaturated fatty acids improve host response in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007;292:L1422-31.
207. Wu BJ, Else PL, Storlien LH, Hulbert AJ. Molecular activity of Na(+)/K(+)-ATPase from different sources is related to the packing of membrane lipids. *J Exp Biol.* 2001;204:4271-80.
208. Mies F, Shlyonsky V, Goolaerts A, Sariban-Sohraby S. Modulation of epithelial Na⁺ channel activity by long chain n-3 fatty acids. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;287:850-855.

Index des figures

Figure 2. Schéma de la circulation foeto-placentaire.

Figure 2. Représentation du zéro de débit.

Figure 3 : Schématisation de la voie du NO.

Figure 4 : Protocole expérimental d'étude de la vaso-réactivité de l'apeline.

Figure 5 : Protocole expérimental d'étude de la vaso-réactivité de l'éthanol (protocole témoin).

Figure 6 : Protocole expérimental d'étude de la voie d'action de l'apeline.

Figure 7 : Effets hémodynamiques de la perfusion de 1mg d'Apeline (12 mL/h pendant 2h) (n=8) : RVP = résistances vasculaires pulmonaires, exprimées en valeurs moyennes et écarts à la moyenne.

Figure 8 : Effets hémodynamiques de la perfusion de 2mg d'Apeline (12 mL/h pendant 2h) (n=5) : RVP – résistances vasculaires pulmonaires, exprimées en valeurs moyennes et écarts à la moyenne.

Figure 9 : Effets hémodynamiques sur le débit pulmonaire fœtal et les résistances vasculaires pulmonaires (RVP) de la perfusion de Nicardipine (Loxen®) et d'Apeline 2mg (n=1). Données exprimées en valeurs moyennes et écarts à la moyenne

Figure 10 : Protocole d'injection de DHEA IVD

Figure 11 : Protocole d'injection témoin IVD dans le protocole d'étude de la DHEA

Figure 12 : Protocole d'injection LNA-DHEA IVD

Figure 13 : Réponse vasculaire pulmonaire fœtale à une injection IVD de 6 mg de DHEA (n=7, courbe bleue) et comparaison avec les injections de témoin 2% (n=7, courbe rouge). Les valeurs sont exprimées en moyennes affectées de leur erreur standard de la moyenne.

Figure 14 : Réponse vasculaire pulmonaire fœtale à une injection IVD de 12mg de DHEA (n=7, courbe bleue) et comparaison avec les injections de témoin 2% (n=7, courbe rouge). Les valeurs sont exprimées en moyennes affectées de leur erreur standard de la moyenne.

Figure 15 : Réponse vasculaire pulmonaire fœtale à une injection IVD de 24mg de DHEA (n=5, courbe bleue) et comparaison avec les injections de témoin 4% (n=5, courbe

rouge). Les valeurs sont exprimées en moyennes affectées de leur erreur standard de la moyenne.

Figure 16 : Effet dose de la DHEA sur les résistances vasculaires pulmonaires (RVP). Représentation du pourcentage de variation de RVP entre la base (T-30 à T0) et le temps T15. * signifie $p < 0,01$

Figure 17 : Effet dose de la DHEA sur le débit artériel pulmonaire gauche (QAPG). Représentation du pourcentage de variation de débit dans l'artère pulmonaire gauche entre la base (T-30 à T0) et le temps T15. * signifie $p < 0,01$.

Figure 18 : Evolution des Résistances vasculaires pulmonaires (RVP) et du débit de l'artère pulmonaire gauche (Qp) avant et 15 minutes après injection de 12mg de DHEA, 30 minutes après injection de LNA.

Figure 19 : Pourcentages de variation des Résistances vasculaires pulmonaires (RVP) et du débit de l'artère pulmonaire gauche (QAPG) entre la base et 15 minutes après l'injection de DHEA. Comparaison des variations entre l'injection de DHEA seule et après LNA. * signifie $p < 0,005$.

Figure 20 : Evolution des Résistances vasculaires pulmonaires (RVP) et du débit de l'artère pulmonaire gauche (QAPG) avant et 15 minutes après injection de 24mg de DHEA, 30minutes après injection de LNA.

Figure 21 : Pourcentages de variation des résistances vasculaires pulmonaires (RVP) et du débit l'artère pulmonaire gauche (APG) entre la base et 15 minutes après l'injection de DHEA. Comparaison des variations entre l'injection de DHEA seule et après LNA. * signifie $p < 0,005$, ** signifie $p = 0,0002$.

Figure 22 : Schéma expliquant la vasodilatation pulmonaire foetale passant par la voie du NO d'après Cornfield. Représentation du mode d'action du LNA et des deux modes d'action hypothétiques de la DHEA.

Figure 23 : Représentation schématique du protocole EPA ou DHA

Figure 24 : Effets vasculaires lors d'une injection d'EPA 25 mg pendant 120 minutes (n=8). Augmentation significative ($p < 0,001$) du débit maximal de l'APG de 25 % et une réduction significative des RVP maximale de 22 % avec un effet persistant après la fin de l'injection d'EPA. * = $p < 0,001$

Figure 25 : Effets vasculaires du DHA (n=7). Pas de variation significative du débit de l'APG lors de l'injection de 50mg de DHA ($p = 0,157$) ni des RVP ($p = 0,355$).

Index des tableaux

Tableau 1 : Valeurs des Gaz du Sang artériels avant et après perfusion d'Apeline 1mg.

Tableau 2 : Evolution des paramètres gazométriques, de fréquence cardiaque (FC) et de pression aortique (PAO) chez le fœtus avant (n=7) et après injection témoins de 2% (N=7), après injection IVD de 6mg de DHEA (n=7).

Tableau 3 : Taux de DHEA et DHEA-S avant et 35 minutes après injection IVD de 6mg de DHEA chez la brebis et chez le fœtus d'agneau.

Tableau 4 : Evolution des paramètres gazométriques, de fréquence cardiaque (FC) et de pression aortique (PAO) chez le fœtus avant et après injection IVD de 12mg de DHEA.

Tableau 5 : Taux de DHEA et DHEA-S avant et 35 minutes après injection IVD de 12mg de DHEA chez le fœtus d'agneau.

Tableau 6 : Evolution des paramètres gazométriques, de fréquence cardiaque (FC) et de pression aortique (PAO) chez le fœtus avant et après injection IVD de 24mg de DHEA.

Tableau 7 : Taux de DHEA et DHEA-S avant et 35 minutes après injection IVD de 24mg de DHEA chez la brebis et chez le fœtus d'agneau.

Tableau 8 : Evolution des paramètres gazométriques, de FC, PAP et PAO chez le fœtus avant et après injection IVD de 12mg de DHEA et de LNA (n=6).

Tableau 9 : Comparaison des paramètres gazométriques chez le fœtus avant injection IVD de LNA + DHEA 12mg (n=6) et de DHEA 12mg (n=7).

Tableau 10 : Evolution des paramètres gazométriques, de FC, PAP et PAO chez le fœtus avant et après injection IVD de 24mg de DHEA et de LNA (n=5).

Tableau 11 : Comparaison des paramètres gazométriques chez le fœtus avant injection IVD de LNA + DHEA 24mg (n=5) et de DHEA 24mg (n=5).

Tableau 12 : évolution du gaz du sang artériel avant et après l'injection d'EPA pour un nombre de brebis (n=8) .

Tableau 13 : Absence de modification des gaz du sang artériel et du taux de lactate avant et après l'injection de DHA pour un nombre de brebis n=7.

Tableau 14 : Absence de modifications des gaz du sang artériel et du taux de lactates avant et après l'injection d'éthanol (n=6).

NOUVELLES PERSPECTIVES DE PRISE EN CHARGE DANS L'HYPERTENSION ARTERIELLE PULMONAIRE PERINATALE

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) correspond à une augmentation des résistances artérielles pulmonaires, avec dans les formes les plus graves, une défaillance cardiaque droite. L'HTAP persistante du nouveau-né (HTAPP) est estimée à 2/100 naissances en France. L'adaptation cardio-respiratoire à la naissance implique le déclenchement simultané de plusieurs phénomènes non complètement compris. Notre travail avait pour but d'approfondir les connaissances sur la régulation pulmonaire périnatale et d'envisager de nouvelles possibilités thérapeutiques. Ainsi, nous avons mis en évidence *in vivo* une vasoconstriction pulmonaires chez le fœtus lors du tabagisme passif maternel, par blocage de la voie du NO. De même, nous avons pu montrer l'effet vasoconstricteur de l'apeline sur les artères pulmonaires de fœtus de brebis. Cet effet semble dose dépendant, inhibé par l'action des inhibiteurs calciques. Au contraire nous avons mis en évidence un effet vasodilatateur de la Déhydroépiandrostérone (DHEA). Cette action est médiée par la voie du NO. Parallèlement, nous avons montré que les acides gras poly insaturés ω 3 (AGPI ω 3) entraînaient une vasodilatation pulmonaire, se prolongeant au delà d'une heure après l'arrêt de la perfusion. Cet effet est médié par l'ouverture des canaux potassiques et indépendant de la voie du NO. Parmi les AGPI ω 3, nous avons établi que l'acide eicosapentaénoïque (EPA) qui induit cette réponse sans effet délétère sur la circulation systémique, ni l'oxygénation tissulaire. Enfin, nous avons établi que l'occlusion trachéale (OT) anténatale, traitement proposé pour certaine hypoplasie pulmonaire malformative, n'altère pas le débit pulmonaire, en favorisant la dilatation pulmonaire. Mais en cas d'OT prolongée, ces effets sont en partie masqués par les effets mécaniques de la pression intraluminaire. Ainsi grâce à ces travaux, nous avons avancé dans la compréhension de l'adaptation de la circulation pulmonaire de la vie intra à la vie extra utérine. Ils permettent aussi de proposer de nouvelles thérapeutiques comme la supplémentation en AGPI ω 3 des femmes attendant un enfant à risque d'HTAP, et d'envisager de nouvelles voies de recherche thérapeutique comme la voie de l'apeline.



Tracheal occlusion alters pulmonary circulation in the fetal lamb with normally developing lungs

Estelle Aubry^{a,b}, Pierre Fayoux^{a,b}, Jacques Jani^c, Jan Deprest^d, Philippe Deruelle^{a,e},
Véronique Debarge Houfflin^{a,e}, Laurent Storme^{a,e,*}

^aEA4489, Faculté de Médecine, IFR 114, Université Lille 2, France

^bPôle Enfant, Clinique de Chirurgie et Orthopédie de l'Enfant, CHRU Lille, France

^cDepartment of Obstetrics and Gynaecology, UH Brugmann, Brussels, Belgium

^dDepartment of Obstetrics and Gynaecology, University Hospitals Leuven, Leuven, Belgium

^ePôle Femme Mère Nouveau-né, Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU de Lille, France

Received 1 February 2012; revised 17 July 2012; accepted 14 August 2012

Key words:

Fetal tracheal occlusion;
Pulmonary circulation;
Congenital diaphragmatic
hernia

Abstract

Background: Tracheal occlusion (TO) promotes fetal lung growth through an increase in intraluminal pressure. Although evidence suggests that fetal TO (FETO) decreases the occurrence of pulmonary hypertension in severe congenital diaphragmatic hernia, controversies on its effect on the pulmonary circulation remain. Therefore, we investigated the effects of FETO on the lung hemodynamics in a chronically catheterized fetal lamb model.

Methods: Fifteen pregnant ewes were operated on between 125 and 128 days of gestation (term: 145 days). Catheters and ultrasonic flow transducer were placed through a left thoracotomy in the lamb fetus to determine aortic, pulmonary and left atrial pressures, and left pulmonary artery blood flow. A balloon was positioned between the carina and vocal cords under fetoscopic control. The animals were assigned to either control ($n=6$) or FETO ($n=9$) groups. TO was performed by inflating the balloon. We studied the acute effects of temporary (2-h) and prolonged (4-day) TO on basal pulmonary vascular tone and on the pulmonary vascular reactivity to acetylcholine and to increased fetal oxygen tension.

Results: We found that left pulmonary blood flow (LPA) increased and pulmonary vascular resistance (PVR) decreased by 20% during brief TO ($p<0.05$). After balloon deflation, LPA blood flow further increased by 40%, and PVR decreased by 50% compared to baseline values ($p<0.05$). In contrast, no change in LPA blood flow or PVR was observed during prolonged TO. Moreover, the vasodilator responses to acetylcholine and to increased fetal PaO₂ were blunted during TO.

Conclusions: These data indicate that antenatal tracheal occlusion promotes active pulmonary vasodilation, which is partly blunted by the mechanical effects of elevation of the intraluminal pressure. © 2012 Published by Elsevier Inc.

* Corresponding author. Pôle Femme Mère Nouveau-né, Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU de Lille, Avenue Eugène Avinée, Lille Cedex 59035, France. Tel: +33 320 44 6199; fax: +33 320 44 6236.

E-mail address: lstorme@chru-lille.fr (L. Storme).

Normal fetal lung growth and maturation require the secretion of lung liquid and a cyclical transpulmonary pressure. Lung liquid is secreted across the epithelium and exits the trachea at the time of opening of the

glottis due to fetal breathing movements [1–4]. Tracheal occlusion (TO) accelerates fetal lung growth through an increase in intraluminal pressure [5–7]. Fetal TO is clinically used in isolated congenital diaphragmatic hernia (CDH) with severe pulmonary hypoplasia as a means to promote lung growth, hence improving survival [8]. CDH lungs present fewer and smaller airspaces, reduced radial alveolar count, thicker alveolar septa, increased interstitial tissue, and markedly diminished gas-exchange surface area [9,10]. TO-induced lung expansion markedly accelerates lung cell proliferation, stimulates formation of alveoli, and increases luminal surface area [6].

In CDH, the abdominal contents in the thoracic cavity interfere with the dichotomous branching of conducting airways, leading to a reduction of bronchiolar generations. As the development of the pulmonary arterial system parallels that of the bronchial tree, fewer arterial branches are also observed in CDH, together with striking vascular architectural abnormalities. Intrapulmonary arteries are excessively muscularized with thickened media that in turn alter the pulmonary vascular reactivity [10]. In a rabbit model of CDH, antenatal TO during the saccular phase lessens, at least in part, those vascular histological abnormalities [11,12]. However, controversies on the effects of fetal TO (FETO) on the pulmonary circulation remain. Although TO has been associated with a decrease in Pulsatility Index (PI) both in rabbits and sheep, no change in pulmonary blood flow was found after FETO in fetal lambs [13–16]. FETO did not impair left ventricular growth or function in human fetuses with CDH [17]. Moreover, little is known regarding the pulmonary vascular reactivity after clinical FETO for severe CDH. There is a single report demonstrating that survival and occurrence of pulmonary hypertension are less frequent in fetuses with a larger drop in PI following TO [18]. In order to study the effects of TO on the fetal pulmonary circulation, we embarked on an experimental study using a chronically catheterized fetal lamb model, with normally developing lungs.

1. Methods

1.1. Experimental model

All animal procedures and protocols used in this study received prior approval from the French Ministry of Agriculture (Ministère de l'Agriculture, de la Pêche et de l'Alimentation). Fifteen mixed-breed pregnant ewes between 125 and 128 days of gestation (term 145 days) were fasted 24 h prior to the surgery. The dates have been chosen because basal pulmonary vascular tone and reactivity have been largely characterized at this gestational age in the fetal lamb [19,20]. Under sterile conditions and general anesthesia as previously reported [19,20], the fetal lamb's left forelimb was delivered through a uterine incision. A skin incision was

made after subcutaneous injection of lidocaine (XYLO- 98
CAINE® 1%, 4 ml) and intramuscular injection of nalbu- 99
phine to access the axillary vessels. Polyvinyl catheters 100
(20G) were inserted into the axillary artery and vein and 101
advanced into the ascending aorta (Ao) and superior vena 102
cava, respectively. A left axillary to sternal thoracotomy at 103
the fifth to sixth intercostal spaces exposed the heart and 104
great arteries (Fig. 1). Using a 16-gauge intravenous 105
placement unit (Angiocath; Travenol, Deerfield, IL), a 22- 106
gauge catheter was placed through purse string sutures in the 107
left pulmonary artery (LPA) to allow for selective acetyl- 108
choline infusion (Fig. 1). Using a 14-gauge intravenous 109
placement unit (Angiocath; Travenol), 20-gauge catheters 110
were placed in the main pulmonary artery (MPA) and left 111
atrium. After gentle, blunt dissection of the bifurcation of 112
MPA, a flow transducer (size 6, Transonic Systems, Ithaca, 113
New York) was placed around the LPA to measure blood 114
flow to the left lung (Fig. 1). Another catheter (20G) was 115
placed in the amniotic cavity to measure the reference 116
pressure. A balloon (GVB 16, Cathnet Science, Paris, 117
France) was mounted on a delivery microcatheter 118
(CIFN130, Balt) and positioned between the carina and the 119
vocal cords under fetoscopic control (1.3-mm fetoscope 120
11540 AA within a curved sheath 11530KB, Karl Storz, 121
Tuttlingen Germany). The catheter connected to the balloon 122
was fixed to the mandible with nonabsorbable suture. The 123

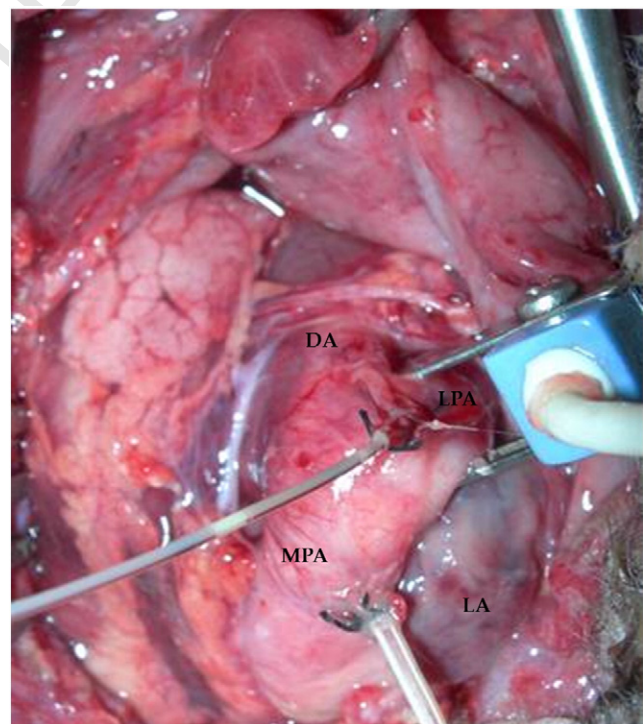


Fig. 1 View of the operative field after left thoracotomy in a fetal lamb. The heart and great vessels are exposed. Catheters are advanced into the left pulmonary artery (LPA) and the main pulmonary artery (MPA) through purse string sutures. A flow transducer is placed around the left pulmonary artery. DA, ductus arteriosus; LA, left atrium.

uterus was sutured closed, and a dose of ampicillin (500 mg) was given in the amniotic cavity. The flow transducer and catheters were exteriorized through a subcutaneous tunnel to an external flank pouch. Estimated weight of the fetal lambs was 3000 g. Studies were performed after a recovery time of 48 h. Catheter positions were checked at autopsy.

1.2. Hemodynamic measurements

The flow transducer was connected to an internally calibrated flowmeter (T201, Transonic Systems) for continuous measurements of LPA blood flow. The zero blood flow value was defined as the flow measured immediately before the beginning of systole. Main pulmonary artery, aortic, and amniotic catheters were connected to a blood pressure transducer (IntelliVue MP90, Philips, the Netherlands). Pressures were referenced to the amniotic cavity pressure. Pulmonary vascular resistance (PVR) in the left lung was calculated as the difference between mean pulmonary artery pressure (PAP) and left atrial pressures divided by mean LPA flow.

Biologic measurements: blood samples from the main pulmonary artery catheter were used for blood gas analysis (OSM 3 hemoximeter Radiometer, Copenhagen, Denmark and I-STAT, ABBOTT, USA) 30 min before the experiment, during the experiment and 30 min after the experiment.

1.3. Experimental design

The animals were assigned to either control ($n=6$) or FETO ($n=9$) groups.

1.3.1. Acute effects of temporary FETO on basal pulmonary vascular tone

To investigate the pulmonary vascular response to acute TO, the balloon was inflated with saline for 2 h and then rapidly deflated. Mean PAP, mean aortic pressure (AoP), amniotic pressure, and LPA blood flow were recorded at 30-min intervals starting 30 min before FETO (baseline) and for 30 min continuous after the FETO period. The observation period was 3 h.

1.3.2. Effects of prolonged FETO on basal pulmonary vascular tone and on the pulmonary vascular reactivity

For this, the balloon was inflated for 4 consecutive days in the FETO group whereas it was not in the control group. Hemodynamic parameters were recorded at 30-min intervals for 3 h after starting FETO and then each day for 1 h (three measurements) from days 2 to 4. We also investigated the pulmonary vascular responses to acetylcholine and to increased fetal PaO₂ after 3 days of FETO. Both acetylcholine and O₂ are known vasodilator of the fetal lung, at least in part through endothelial release of nitric oxide [21,22]. For that, after saline (6 ml/h) was infused into the LPA catheter for 30 min, acetylcholine (Sigma, Saint Quentin Fallavier,

France: 20 µg/ml in saline) was infused (6 ml/h) for 20 min. Then the catheter was flushed again with saline (6 ml/h). Hemodynamic measurements (mean PAP, AoP, LPA pulmonary blood flow) were recorded at 5-min intervals. After 4 days of FETO, fetal PaO₂ was increased by providing 12 L/min O₂ to the ewe for 30 min through nasal cannulae. Hemodynamic measurements (mean PAP, AoP, LPA pulmonary blood flow) were recorded at 10-min intervals starting 30 min before O₂ inhalation, during O₂ inhalation, and for 30 min after O₂ discontinuation. Fetal blood gas tensions and pH were measured at baseline and 25 min after the beginning of O₂ inhalation.

1.4. Data analysis

Results are presented as means±SD. Data were analyzed by using repeated-measures and factorial ANOVA (Stat View 4.1 for PC; Abacus Concepts, Berkeley, CA). Intergroup differences (same basal values) were analyzed with the Bonferroni/Dunn's least significant test. Mann-Whitney tests (independent values) were used to compare quantitative data. A p value <0.05 was considered statistically significant.

2. Results

2.1. Acute effects of temporary TO on basal pulmonary vascular tone

Table 1 and Fig. 2 display results of this acute experiment. Baseline values of PAP, LPA blood flow and PVR were similar in control and TO fetuses. In the control group, the hemodynamic parameters did not change during the study period. Balloon inflation did not alter the blood gases, but increased LPA blood flow and decreased PVR by 20% during the occlusion period ($p<0.05$). After balloon deflation LPA blood flow increased and PVR dropped, compared to values during the occlusion period ($p<0.05$). Compared to baseline values, post-occlusion LPA blood flow increased by 40% and PVR decreased by 50%

Table 1 Blood gases and hemodynamic variables before and during tracheal occlusion in the TO group ($n=9$).

	Before balloon inflation	During balloon inflation	p	
pH	7.35±0.06	7.34±0.04	0.4	t1.4
PaO ₂ (mm Hg)	18±3	19±7	0.25	t1.5
PaCO ₂ (mm Hg)	45±9	42±9	0.9	t1.6
HR (beats/min)	160±2	167±4	0.56	t1.7
AoP (mm Hg)	40±2	39±1	0.47	t1.8

Values are means±SD. PaO₂, arterial partial pressure of O₂; PaCO₂, arterial partial pressure of CO₂; HR, heart rate; AoP, mean aortic pressure.

t1.9

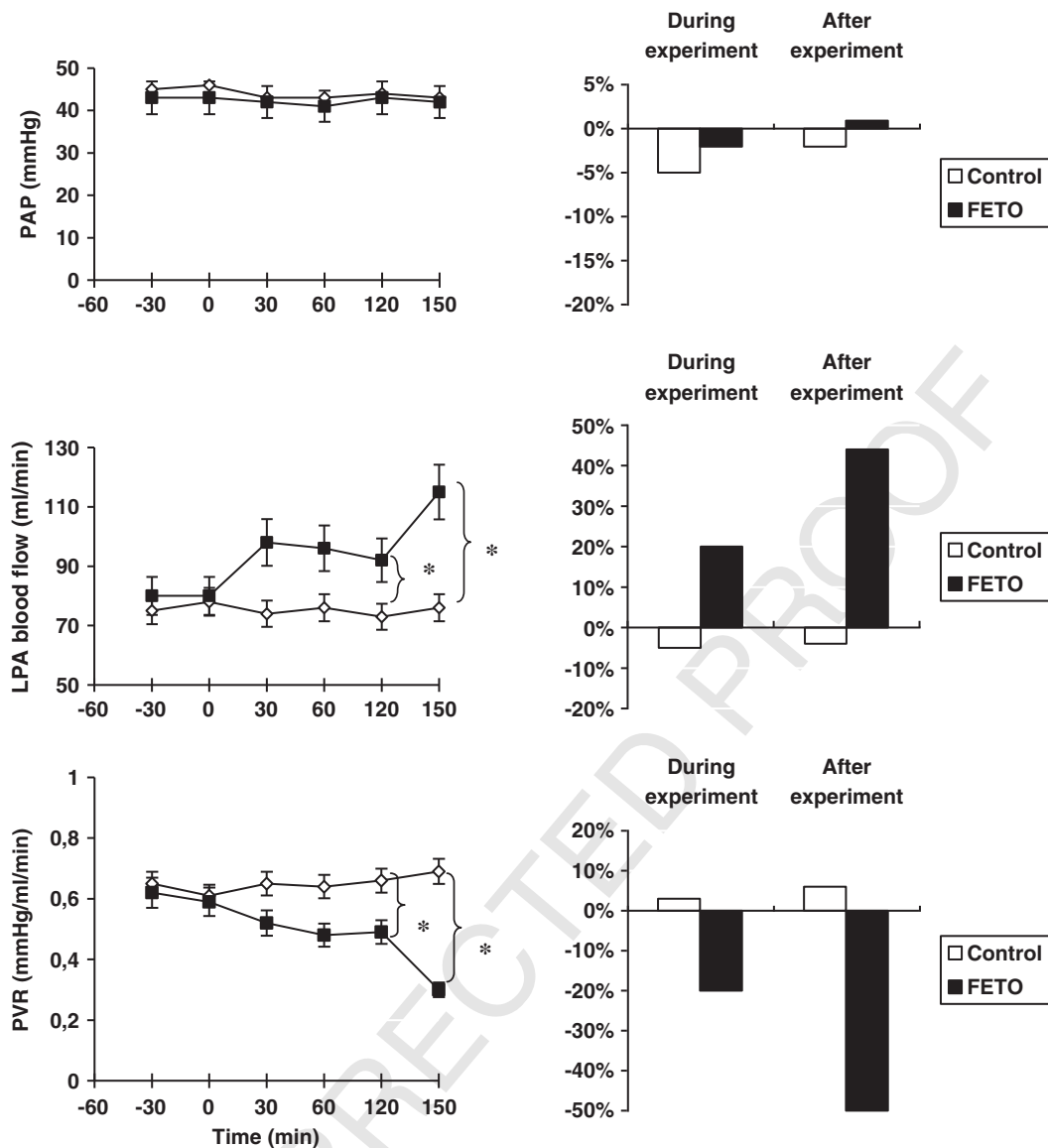


Fig. 2 Pulmonary vascular response to acute fetal tracheal occlusion (FETO). Pulmonary hemodynamic parameters were compared between fetal lambs with no FETO (control group, $n=6$) and fetal lambs with FETO (FETO group, $n=9$) for 120 min. Mean pulmonary artery pressure (PAP), left pulmonary artery blood flow (LPA blood flow) and pulmonary vascular resistance (PVR) did not change in the control group. LPA blood flow increased by 20%, and PVR decreased by 20% during acute FETO. Further increase in LPA blood flow and decrease in PVR were observed after releasing tracheal occlusion. * $p<0.05$ vs. control group.

208 ($p<0.05$). Thirty minutes after releasing FETO, the left
 209 pulmonary artery (LPA) blood flow was higher and PVR was
 210 lower than during sustained FETO ($n=5$) (respectively, LPA
 211 blood flow: 115 ± 8 vs. 85 ± 8 ml/min, $p<0.05$; PVR: $0.27\pm$
 212 0.02 vs. 0.52 ± 0.05 mm Hg/ml/min, $p<0.05$).

213 **2.2. Effects of prolonged TO on pulmonary vascular** 214 **tone and on pulmonary vascular reactivity**

215 Again, mean AoP, HR and arterial blood gas parameters
 216 in the TO group did not change during the study period
 217 (Table 2). During the 4 days of occlusion, mean PAP, LPA
 218 blood flow and PVR did not change significantly (Fig. 3).

219 Blood gas and hemodynamic parameters were similar in
 220 controls and FETO lambs (Fig. 3 and Table 2).

221 In the control group, administration of acetylcholine
 222 increased LPA blood flow by 60% (from 75 ± 8 to $122\pm$
 223 25 ml/min; $p<0.05$) and decreased PVR by 40% (from
 224 0.61 ± 0.04 to 0.40 ± 0.1 mm Hg/ml/min; $p<0.05$). In con-
 225 trast, in the TO group, acetylcholine did not significantly
 226 change LPA blood flow and PVR (respectively, 72 ± 5 vs.
 227 78 ± 6 ml/min; 0.66 ± 0.04 vs. 0.61 ± 0.08 mm Hg/ml/min).

228 Inhaled O_2 increased fetal Pa O_2 from 18 ± 5 to 24 ± 2 mm
 229 Hg in the control group and from 19 ± 2 to 24 ± 4 mm Hg in
 230 the FETO group ($p<0.05$). PAP, AoP and heart rate did not
 231 change in both groups during O_2 inhalation (Table 3). LPA

t2.1 **Table 2** Blood gas and hemodynamic variables during the
t2.2 4 days of tracheal occlusion in the TO group ($n=9$).
t2.3

	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4
t2.4 pH	7.34±0.02	7.32±0.02	7.34±0.01	7.31±0.13
t2.5 PaCO ₂ (mm Hg)	35±3	34±12	37±5	43±7
t2.6 PaO ₂ (mm Hg)	18±6	18±3	19±2	19±2
t2.7 Lactates (mmol/L)	1.5±0.3	1.9±1.8	1.4±0.6	2±0.5
t2.8 HR (beats/min)	154±20	154±12	162±18	154±30
t2.9 AoP (mm Hg)	39±3	39±3	37±4	40±5

t2.10 Values are means±SD. PaO₂, arterial partial pressure of O₂; PaCO₂,
arterial partial pressure of CO₂; HR, heart rate; AoP, mean aortic
pressure.

232 blood flow increased by 100% and PVR decreased by 55%
233 in the control group ($p<0.05$) (Fig. 4). LPA blood flow
234 increased by 40% and PVR decreased by 20% in the TO
235 group ($p<0.05$) (Fig. 4). Despite comparable baseline

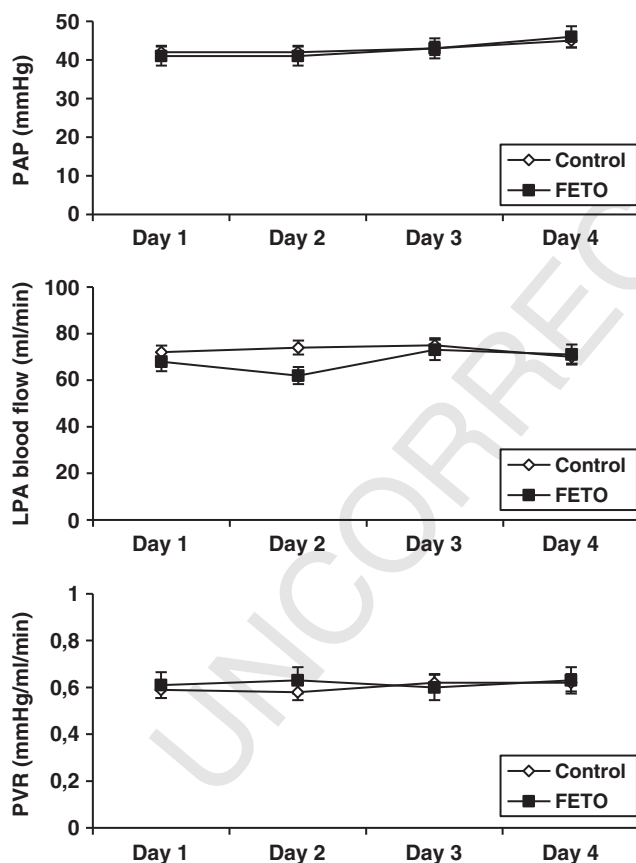


Fig. 3 Serial change in the pulmonary vascular tone in control fetal lambs ($n=6$) and in fetal lambs with fetal tracheal occlusion ($n=6$). Mean pulmonary artery pressure (PAP), left pulmonary artery blood flow (LPA blood flow) and pulmonary vascular resistance (PVR) did not change significantly the study period in both groups.

t3.1 **Table 3** Blood gas and hemodynamic variables during O₂
t3.2 inhalation in the control group ($n=6$) and in the TO group ($n=9$).
t3.3

	Control group		FETO group	
	Baseline	O ₂	Baseline	O ₂
t3.4 pH	7.38±0.03	7.36±0.03	7.34±0.03	7.30±0.04
t3.5 PaCO ₂ (mm Hg)	43±3	46±5	39±8	44±7
t3.6 PaO ₂ (mm Hg)	18±5	24±2 *	19±2	24±4 *
t3.7 HR (beats/min)	161±14	152±11	158±19	149±24
t3.8 AoP (mm Hg)	42±5	43±5	41±6	41±6

t3.9 Values are means±SD. PaCO₂, arterial partial pressure of CO₂; PaO₂,
arterial partial pressure of O₂; HR, heart rate; AoP, mean aortic pressure.

t3.10 * $p<0.05$.
t3.11

values, the percentage of change in LPA blood flow and in
PVR was lower in the FETO group than in the control group
($p<0.05$) (Fig. 4).

3. Discussion

We investigated the pulmonary vascular effects of
antenatal tracheal occlusion. We studied the pulmonary
vascular response to both acute and prolonged tracheal
occlusions in fetal lambs. A brief tracheal occlusion period
decreased pulmonary vascular tone whereas its release
induces a further drop in pulmonary vascular resistance.
We also found that prolonged tracheal occlusion blunted the
pulmonary vasodilator response to acetylcholine and to
increase in fetal PaO₂. These data indicate that antenatal
tracheal occlusion promotes active pulmonary vasodilation,
which is partly blunted by the mechanical effects of elevation
of the intraluminal pressure.

Antenatal tracheal occlusion modifies the abnormal mus-
cularization of pulmonary arterioles seen in CDH [12]. Short-
term tracheal occlusion corrects pulmonary vascular anomalies
in the fetal lamb with diaphragmatic hernia [12,23]. The
Pulsatility Index (PI) in the pulmonary arteries, a marker of
impedance, is elevated in CDH, whereas tracheal occlusion
reverses the high pulmonary artery PI in both sheep and rabbit
models with CDH [13,16]. However, little is known regarding
the vascular effects of FETO in normal lungs. Despite an
increase in fetal lung volume after TO, no significant changes
of blood flow velocity profiles in the pulmonary arteries were
found in fetal lambs [14]. Neither was there a change in
pulmonary blood flow and pulmonary vascular resistance
during 7 days of FETO in lambs [15]. Our results are in
agreement with these two studies as no change in basal
pulmonary hemodynamics was observed with prolonged TO.
In contrast, we found that brief TO acutely elevates pulmonary
blood flow and decreases pulmonary vascular resistance. TO-
induced pulmonary vasodilation was not caused by a change in

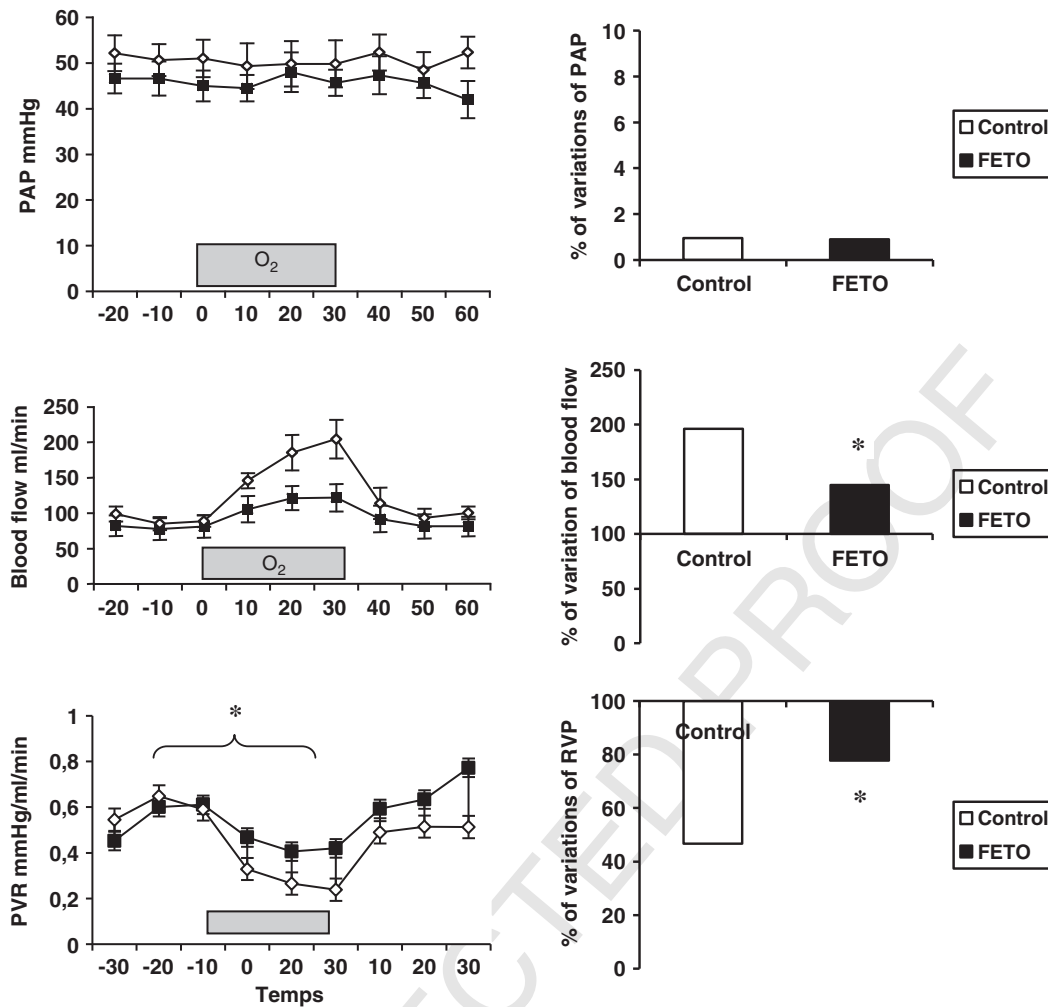


Fig. 4 Pulmonary hemodynamic response to increased fetal PaO₂, in the control (n=6) and fetal tracheal occlusion (FETO, n=6) groups. Although baseline values for mean pulmonary artery pressure (PAP), left pulmonary artery blood flow (LPA blood flow) and pulmonary vascular resistance (PVR) were similar, the increase in LPA blood flow was higher and the decrease of PVR was lower in the FETO group than in the control group, after 30 min of O₂ inhalation. **p*<0.05 vs. control group.

271 gas exchange or systemic hemodynamics, as the fetal blood
 272 gases and aortic pressure were not altered by TO. The
 273 mechanism of TO-induced pulmonary vasodilation is unclear,
 274 but may include the release of growth factors and vasodilator
 275 mediators [24]. Lung stretch was found to up-regulate VEGF
 276 mRNA and protein expression [25] and NO production [26].
 277 Expression of VEGF is increased as early as 30 min after
 278 starting stretch stimuli and peaks at 2 h [25]. This time frame
 279 is compatible with our results showing a progressive decrease in
 280 PVR from 30 min of TO. Furthermore, we also found that
 281 deflation of the balloon 2 h later further promoted the
 282 pulmonary vasodilator response, as PVR was lower after
 283 releasing TO than during sustained TO. Releasing of TO
 284 almost certainly causes a drop in the tracheal pressure. A
 285 previous study highlights that the intraluminal pressure has a
 286 major impact on the pulmonary blood flow. Elevation of the
 287 airways pressure results in a compression of the perialvolar
 288 capillaries, in turn reducing the pulmonary blood flow [15]. We
 289 speculate that TO may simultaneously activates two opposing

290 responses: (1) pulmonary vasodilation through parenchymal
 291 stretch-induced vasodilator release and (2) intraluminal
 292 pressure that opposes the vasodilator response. Thus, release
 293 of TO promotes the pulmonary vasodilator response to acute
 294 FETO. Taken together, our results suggest that acute FETO
 295 induces a potent pulmonary vasodilator response which is
 296 partly blunted by the increase intraluminal pressure.

297 Our study provides additional information on the impact
 298 of TO on the fetal pulmonary circulation. Although both
 299 acetylcholine and O₂ reduce pulmonary vascular tone after
 300 prolonged FETO, the vasodilator response to these vasodi-
 301 lator stimuli was lower than that in control animals. The
 302 decrease in the lung vascular response to acetylcholine and to
 303 O₂ may result from FETO-impaired pulmonary vasoreactiv-
 304 ity. Alternatively, a blunted response to vasodilator stimuli
 305 during prolonged TO may further highlight the major impact
 306 of intraluminal pressure on the pulmonary blood flow. In
 307 accordance with this hypothesis, a previous study in a similar
 308 model showed a sustained increase in pulmonary blood flow

309 after releasing FETO, suggesting that the pulmonary
310 vascular reactivity is not impaired by prolonged TO [15].


311 Our study has some limitations. More clinically relevant
312 information would have been provided in an experimental
313 model with CDH. However, we believe that investigation in
314 normal fetal lung is the first step to assess the effects of
315 FETO on the pulmonary circulation and to explore the
316 mechanisms by which FETO may alter the pulmonary
317 vasoreactivity. Furthermore, novel indications of FETO
318 emerge beyond CDH, including antenatal conditions with
319 premature rupture of the membranes [27,28]. Although other
320 investigators highlighted changes in pulmonary vessel
321 remodeling after FETO [11,12], we did not perform a
322 histological analysis of lungs in this study. We studied the
323 effects on lung circulation of 4-day antenatal tracheal
324 occlusion. When used in human fetus with CDH, tracheal
325 occlusion is prolonged for several weeks. The impact of
326 prolonged tracheal occlusion on the pulmonary circulation is
327 presently unknown.

328 Our results indicate that antenatal tracheal occlusion does
329 not impair pulmonary blood flow, despite an increase in the
330 intraluminal pressure. Brief antenatal tracheal occlusion
331 acutely induces a potent pulmonary vasodilator response,
332 which is enhanced after its release. We suggest that
333 antenatal tracheal occlusion promotes active pulmonary
334 vasodilation. The impact of TO on pulmonary blood flow is
335 masked in part by the mechanical effects of elevation of the
336 intraluminal pressure.

337 References

- 338 [1] Moessinger AC, Harding R, Adamson TM, et al. Role of lung fluid
339 volume in growth and maturation of the fetal sheep lung. *J Clin Invest*
340 1990;86:1270-7. 403
- 341 [2] Kalache KD, Chaoui R, Marks B, et al. Does fetal tracheal fluid flow
342 during fetal breathing movements change before the onset of labour?
343 *BJOG* 2002;109:514-9. 404
- 344 [3] Polglase GR, Wallace MJ, Grant DA, et al. Influence of fetal breathing
345 movements on pulmonary hemodynamics in fetal sheep. *Pediatr Res*
346 2004;56:932-8. 405
- 347 [4] Miller AA, Hooper SB, Harding R. Role of fetal breathing movements
348 in control of fetal lung distension. *J Appl Physiol* 1993;75:2711-7. 406
- 349 [5] Nardo L, Hooper SB, Harding R. Stimulation of lung growth by
350 tracheal obstruction in fetal sheep: relation to luminal pressure and
351 lung liquid volume. *Pediatr Res* 1998;43:184-90. 407
- 352 [6] Nardo L, Maritz G, Harding R, et al. Changes in lung structure and
353 cellular division induced by tracheal obstruction in fetal sheep. *Exp*
354 *Lung Res* 2000;26:105-19. 408
- 355 [7] O'Toole SJ, Sharma A, Karamanoukian HL, et al. Tracheal ligation
356 does not correct the surfactant deficiency associated with congenital
357 diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1996;31:546-50. 409
- 358 [8] Dekoninck P, Gratacos E, Van Mieghem T, et al. Results of fetal
359 endoscopic tracheal occlusion for congenital diaphragmatic hernia and
360 the set up of the randomized controlled TOTAL trial. *Early Hum Dev*
361 2011;87:619-24. 410
- 362 [9] Ting A, Glick PL, Wilcox DT, et al. Alveolar vascularization of the
363 lung in a lamb model of congenital diaphragmatic hernia. *Am J Respir*
364 *Crit Care Med* 1998;157:31-4. 411
- 365 [10] Roubliova X, Verbeken E, Wu J, et al. Pulmonary vascular
366 morphology in a fetal rabbit model for congenital diaphragmatic
367 hernia. *J Pediatr Surg* 2004;39:1066-72. 412
- 368 [11] Roubliova XI, Verbeken EK, Wu J, et al. Effect of tracheal occlusion
369 on peripheral pulmonary vessel muscularization in a fetal rabbit model
370 for congenital diaphragmatic hernia. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:
371 830-6. 413
- 372 [12] Luks FI, Wild YK, Piasecki GJ, et al. Short-term tracheal occlusion
373 corrects pulmonary vascular anomalies in the fetal lamb with
374 diaphragmatic hernia. *Surgery* 2000;128:266-72. 414
- 375 [13] Sylvester KG, Rasanen J, Kitano Y, et al. Tracheal occlusion reverses
376 the high impedance to flow in the fetal pulmonary circulation and
377 normalizes its physiological response to oxygen at full term. *J Pediatr*
378 *Surg* 1998;33:1071-4. 415
- 379 [14] Tchirikov M, Hecher K, Deprest J, et al. Pulmonary circulation of fetal
380 sheep with lung hyperplasia following tracheal occlusion. *Ultrasound*
381 *Obstet Gynecol* 2005;25:277-81. 416
- 382 [15] Polglase GR, Wallace MJ, Morgan DL, et al. Increases in lung
383 expansion alter pulmonary hemodynamics in fetal sheep. *J Appl*
384 *Physiol* 2006;101:273-82. 417
- 385 [16] Cruz-Martinez R, Moreno-Alvarez O, Prat J, et al. Lung tissue blood
386 perfusion changes induced by in utero tracheal occlusion in a rabbit
387 model of congenital diaphragmatic hernia. *Fetal Diagn Ther* 2009;26:
388 137-42. 418
- 389 [17] Van Mieghem T, Gucciardo L, Doné E, et al. Left ventricular cardiac
390 function in fetuses with congenital diaphragmatic hernia and the effect
391 of fetal endoscopic tracheal occlusion. *Ultrasound Obstet Gynecol*
392 2009;34:424-9. 419
- 393 [18] Cruz-Martinez R, Moreno-Alvarez O, Hernandez-Andrade E, et al.
394 Contribution of intrapulmonary artery Doppler to improve prediction
395 of survival in fetuses with congenital diaphragmatic hernia treated with
396 fetal endoscopic tracheal occlusion. *Ultrasound Obstet Gynecol*
397 2010;35:572-7. 420
- 398 [19] Houeijeh A, Aubry E, Coridon H, et al. Effects of n-3 polyunsaturated
399 fatty acids on the pulmonary circulation in fetal lamb. *Crit Care Med*
400 2011;39:1431-8. 421
- 401 [20] Houfflin-Debarge V, Sabbah E, Aubry E, et al. Effects of
402 environmental tobacco smoke on the pulmonary circulation in the
403 ovine fetus. *Am J Obstet Gynecol* 2011;204:450.e8-450.e14. 422
- 404 [21] Jaillard S, Larrue B, Deruelle P, et al. Effects of phosphodiesterase 5
405 inhibitor on pulmonary vascular reactivity in the fetal lamb. *Ann*
406 *Thorac Surg* 2006;81:935-42. 423
- 407 [22] Deruelle P, Houfflin-Debarge V, Magnenant E, et al. Effects of
408 antenatal glucocorticoids on pulmonary vascular reactivity in the ovine
409 fetus. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:208-15. 424
- 410 [23] Bratu I, Flageole H, Laberge JM, et al. Pulmonary structural
411 maturation and pulmonary artery remodeling after reversible fetal
412 ovine tracheal occlusion in diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*
413 2001;36:739-44. 425
- 414 [24] Jesudason EC, Connell MG, Fernig DG, et al. In vitro effects of growth
415 factors on lung hypoplasia in a model of congenital diaphragmatic
416 hernia. *J Pediatr Surg* 2000;35:914-22. 426
- 417 [25] Muratore CS, Nguyen HT, Ziegler MM, et al. Stretch-induced
418 upregulation of VEGF gene expression in murine pulmonary culture:
419 a role for angiogenesis in lung development. *J Pediatr Surg* 2000;35:
420 906-12. 427
- 421 [26] Kuebler WM, Uhlig U, Goldmann T, et al. Stretch activates nitric
422 oxide production in pulmonary vascular endothelial cells in situ. *Am J*
423 *Respir Crit Care Med* 2003;168:1391-8. 428
- 424 [27] Kohl T, Geipel A, Tchatcheva K, et al. Life-saving effects of fetal
425 tracheal occlusion on pulmonary hypoplasia from preterm premature
426 rupture of membranes. *Obstet Gynecol* 2009;113:480-3. 429
- 427 [28] Kohl T, Müller A, Franz A, et al. Temporary fetoscopic tracheal
428 balloon occlusion enhanced by hyperoncotic lung distension: is there a
429 role in the treatment of fetal pulmonary hypoplasia from early preterm
430 premature rupture of membranes? *Fetal Diagn Ther* 2007;22:462-5. 430

AUTHOR QUERY FORM

 ELSEVIER	Journal: YJPSU Article Number: 55899	Please e-mail or fax your responses and any corrections to: Elsevier E-mail: corrections.esi@elsevier.spitech.com Fax: +1 619 699 6721
--	---	---

Dear Author,

Please check your proof carefully and mark all corrections at the appropriate place in the proof (e.g., by using on-screen annotation in the PDF file) or compile them in a separate list. Note: if you opt to annotate the file with software other than Adobe Reader then please also highlight the appropriate place in the PDF file. To ensure fast publication of your paper please return your corrections within 48 hours.

For correction or revision of any artwork, please consult <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Any queries or remarks that have arisen during the processing of your manuscript are listed below and highlighted by flags in the proof. Click on the 'Q' link to go to the location in the proof.

Location in article	Query / Remark: click on the Q link to go Please insert your reply or correction at the corresponding line in the proof
Q1	Please confirm that given names and surnames have been identified correctly.
Q2	Please provide journal-specific highlights for this article.
Q3	Please check if the country name added to affiliations a and e and correspondence address is correct. <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px auto; width: fit-content;"> Please check this box if you have no corrections to make to the PDF file. <input type="checkbox"/> </div>
	Fig. 1 - (BW in print, Colour in web) Fig. 2 - (BW in print and web) Fig. 3 - (BW in print and web) Fig. 4 - (BW in print and web) If you wish to pay for the figure(s) to be printed in color, please indicate so on your proofs and an estimate will be emailed to you.

Thank you for your assistance.

Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in the fetal pulmonary circulation

Ali Houeijeh, MD; Estelle Aubry, MD; H el ene Coridon, MD; Karine Montaigne, MD; Rony Sfeir, MD; Philippe Deruelle, MD; Laurent Storme, MD

Objective: Although evidence exists that n-3 polyunsaturated fatty acids may improve the outcome in patients with severe respiratory failure, little is known regarding their pulmonary circulatory effects. This question is clinically relevant in respiratory failure associated with pulmonary hypertension, in particular in newborn infants with persistent pulmonary hypertension. The objective of this study was to investigate the effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on the fetal pulmonary circulation.

Design: Randomized, placebo-controlled comparative laboratory investigation.

Setting: University research facility.

Subjects: Fifty-two chronically prepared lamb fetuses.

Interventions: Catheters and ultrasonic flow transducer were placed through a left thoracotomy in the lamb fetus to determine aortic, pulmonary, and left atrial pressures and left pulmonary artery blood flow.

Measurements and Main Results: We compared the pulmonary vascular responses to 120 mins of Omegaven (lipid emulsions enriched in n-3 polyunsaturated fatty acids) or Intralipide (lipid emulsions enriched in n-6 polyunsaturated fatty acids) infusion. Then we investigated the effects of Omegaven on the pulmonary circulation after nitric oxide synthase inhibition by L-nitro-argin-

ine, potassium channel blockade by tetraethylammonium, and cytochrome P450 epoxygenase inhibition by (methylsulfonyl)-2-(2-propynyloxy)-benzenehexanamide. Pulmonary artery and aortic pressures as well as blood gases and plasma lactate concentrations did not change during either fat emulsion infusion. Left pulmonary blood flow increased by 30% and pulmonary vascular resistance decreased by 28% during Omegaven infusion, whereas left pulmonary blood flow and pulmonary vascular resistance did not change during Intralipide infusion. This pulmonary vascular response to Omegaven was not altered by L-nitro-arginine. At the opposite, Omegaven induced pulmonary vasodilatation was abolished by tetraethylammonium and markedly attenuated by (methylsulfonyl)-2-(2-propynyloxy)-benzenehexanamide.

Conclusions: Lipid emulsion containing n-3 polyunsaturated fatty acids may induce a potent and sustained vasodilatation in the fetal lung. This pulmonary vasodilator response is mediated through production of vasoactive mediators by cytochrome P450 epoxygenase and through activation of potassium channels. (Crit Care Med 2011; 39:000-000)

KEY WORDS: n3 polyunsaturated fatty acids; cytochrome P450 epoxygenase; DHA; EPA; pulmonary circulation

Adequate nutritional support in the critically ill patients is required to prevent malnutrition and is associated with decreased mortality and morbidity (1). Guidelines suggest that lipid emulsions should be used early in the course of the disease for adequate energy intake and for supplying the requirements of essential

fatty acids (2). There is a lack of consensus about the optimum source and composition of lipid (soybean or fish oil) in parenteral formulations for the patient with respiratory failure. Fatty acids from fish oil were found to attenuate the initial injurious hyperinflammatory state in severe sepsis and in patients with acute lung injury (3, 4). Controversies exist on the effects of fat emulsion on the pulmonary circulation. This question is particularly important in term newborn infants because respiratory failure is usually associated with pulmonary hypertension. Previous studies suggested that intravenous lipid emulsions (mainly soybean oil) may increase the pulmonary artery pressure in newborns with respiratory failure (5).

Evidence exists that differential vascular effects can be expected according to lipid formulation. Indeed, dietary fish oils have beneficial effects on cardiac and vascular function, including effects on platelet/vessel wall interactions, endothelial

function, and inhibition of smooth muscle cells proliferation (6). n-3 polyunsaturated fatty acids (n3 PUFAs) are metabolized by several enzymes: 1) the cyclo-oxygenase to produce prostaglandins (PGE₃, PGI₃), known as potential vasodilator mediator (7); 2) the lipo-oxygenase to produce 5-series leukotrienes, which have weak biological activities; and 3) the CYP450 epoxygenase, which leads to the production of epoxides, mainly 17(18)-epoxyeicosatetraenoic acid (17[18]-EpETE) (8, 9). These epoxides were found to induce concentration-dependent relaxation of human pulmonary arteries through activation of calcium-dependent potassium channels (BK_{ca}) (10). In addition, n3 PUFA competes with the arachidonic acid (n6 PUFA) for enzymatic conversion. This competition decreases formation of vasoactive AA metabolites such as thromboxane A₂, a potent pulmonary vasoconstrictor, and 20-epoxyeicosatrienoic acid (6, 11). Thus, some evi-

From the P ole de Médecine Périnatale (AH, KM, PD, LS), Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU de Lille, Lille, France; UPRES-EA4489 (AH, EA, HC, KM, RS, PD, LS), Faculté de Médecine, IFR 114, Universit  de Lille-Nord de France, Lille, France; and Pôle de Chirurgie P diatrique (EA, HC, RS), Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU de Lille, Lille, France.

A.H. and E.A. contributed equally.

The authors have not disclosed any potential conflicts of interest.

For information regarding this article, E-mail: lstorme@chru-lille.fr

Copyright   2011 by the Society of Critical Care Medicine and Lippincott Williams & Wilkins

DOI: 10.1097/CCM.0b013e31821204fb

dence suggests that n3 PUFA may be beneficial in conditions associated with pulmonary hypertension. However, whether n3 PUFA and their metabolites may alter the perinatal pulmonary circulation is presently uncertain.

Therefore, the aim of the present study was to assess the physiological effects of n3 PUFA on the pulmonary vascular resistance in the fetus. We report that n3 PUFAs induce a potent pulmonary vasodilatation blocked by CYP450 epoxygenase or potassium channels inhibitors but not by nitric oxide synthase inhibitors.

METHODS

Animal Preparation

All animal procedures and protocols used in this study were reviewed and approved by the French "Ministère de l'Agriculture, de la Pêche et de l'Alimentation" before the studies were conducted. Fifty-two mixed-breed pregnant ewes between 127 and 130 days' gestation (term = 147 days) were fasted for 24 hrs before surgery. Ewes were sedated with intramuscular xylazine (Sedaxylan 20 mg/mL, 40 mg), intravenous propofol (Diprivan 2%, 4 mL), and nalbuphine (Nubain, 20 mg) before general anesthesia by inhaled Isoflurane (Aerane, from 1% to 5%). The lamb's fetus left forelimb was delivered through a uterine incision. Skin incision was made after subcutaneous injection of lidocaine (Xylocaine 1%, 4 mL) and nalbuphine (Nubain, 5 mg). Polyvinyl catheters (20 G) were advanced into the aorta and the vena cava through the axillary vessels. After left thoracotomy, catheters were inserted into the left pulmonary artery (LPA) (22 G), main pulmonary artery (20 G), and left atrium (20 G). An ultrasonic flow transducer, size 6 (Transonic Systems, Ithaca, NY), was placed around the LPA. Another catheter was placed in the amniotic cavity. The uteroplacental circulation was kept intact, and the fetus was gently replaced in the uterus. The flow transducer and catheters were exteriorized through a subcutaneous tunnel to an external flank pouch. Estimated weight of the lamb's fetus was 3000 g. The ewes received 1 g amoxicillin and 20 mg nalbuphine daily until day 3 after surgery. Catheters were maintained by daily infusions of 2 mL heparinized normal saline (10 U/mL). Catheter positions were checked at autopsy. Studies were performed after a recovery time of 72 hrs.

Physiological Measurements

The flow transducer cable was connected to an internally calibrated flowmeter (T201; Transonic Systems) for continuous measure-

ments of LPA blood flow. The absolute value of flow was determined from the mean of phasic blood flow signals with zero blood flow defined as the measured flow value immediately before the beginning of systole. Main pulmonary artery, aortic, left atrial, and amniotic catheters were connected to blood pressure transducers (Merlin Multi-Parameter Monitor; Philips France). Pressures were referenced to the amniotic cavity pressure. Pulmonary vascular resistance in the left lung was calculated as the difference between mean pulmonary artery and left atrial pressures divided by LPA flow. Blood samples from the main pulmonary artery were used for blood gas analysis and oxygen saturation measurements (OSM 3 Hemoximeter and ABL 520 Radiometer, Copenhagen, Denmark).

Experimental Design

Four different experimental protocols were included in this study: 1) pulmonary hemodynamic response to fat emulsion containing either mainly n3 PUFA or mainly n6 PUFA; 2) effect of nitric oxide synthase inhibition on the pulmonary vascular response to n3 PUFA; 3) effect of potassium channels blockade on this response; and 4) effect of CYP450 epoxygenase inhibition on this response. The infusion protocols were randomized. A minimum recovery period of 24 hrs was required between each protocol. To ensure that complete recovery was achieved before starting a protocol, we checked that the measured parameters and arterial blood gases returned to baseline values. Mean pulmonary artery pressure, left atrial pressure, mean aortic pressure, amniotic pressure, LPA flow, and heart rate were recorded at 10-min intervals. Blood gas analysis and oxygen saturation measurements were performed before and at the end of each protocol.

Protocol 1—Pulmonary Hemodynamic Response to Fat Emulsion Containing Either Mainly n3 PUFA or Mainly n6 PUFA. The animals were randomly assigned to receive either refined fish oil Omegaven (Fresenius Kabi, France) 10% or refined soybean oil Intralipide (Fresenius Kabi) 10% (qualitative and quantitative composition in Table 1). Thirty mins after stable baseline with saline infusion in LPA, Omegaven or Intralipide was infused into LPA at a rate of 1.2 mL/hr for 120 mins followed by saline infusion at 1.2 mL/hr for 60 mins.

Protocol 2—Effect of Nitric Oxide Synthase Inhibition on the Pulmonary Vascular Response to n3 PUFA. Thirty mins after stable baseline with saline infusion in LPA (1.2 mL/hr), L-nitro-arginine (LNA) (30 mg over 10 mins) was infused into LPA. This dose was selected from past studies that have demonstrated effective blockade of nitric oxide synthase activity during acetylcholine and flow-induced vasodilatation for at least 3 hrs (12,

Table 1. Qualitative and quantitative composition of Omegaven and Intralipide 10%

	Intralipide 10%	Omegaven 10%
Saturated fatty acids, %	10–20	15–30
Monosaturated fatty acids, %	20–30	10–20
Polyunsaturated fatty acids, %	50–70	40–70
n6 PUFA (%)	40–60	2–10
AA (%)	—	1–4
n3 PUFA (%)	5–10	30–60
DHA (%)	—	15–30
EPA (%)	—	15–30

PUFA, polyunsaturated fatty acids; AA, arachidonic acid; DHA, docosahexaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid.

13). Then the LPA catheter was infused with normal saline 1.2 mL/hr during 20 mins before starting the Omegaven protocol as previously. As control experiments, L-nitro-arginine infusion was followed by saline (1.2 mL/hr) for 210 mins.

Protocol 3—Effect of Potassium Channel Blockade on the Pulmonary Vascular Response to n3 PUFA. Protocol 1 was repeated during tetraethylammonium (TEA) infusion. TEA (1 mL = 10 mg at 6 mL/hr) was infused into the axillary venous catheter 10 mins before and throughout the Omegaven infusion. This dose was selected from past studies that showed effective blockade of flow-induced pulmonary vasodilatation in the fetal lamb (14). As control experiments, TEA (1 mL = 10 mg at 6 mL/hr) was infused into the venous catheter for 130 mins followed by saline infusion (6 mL/hr) over 60 mins with saline infusion in the LPA catheter (1.2 mL/hr).

Protocol 4—Effect of Cytochrome P450 Epoxygenase Inhibition on the Pulmonary Vascular Response to n3 PUFA. Protocol 1 was repeated after (methylsulfonyl)-2-(2-propynyl)-benzenehexanamide (MS-PPOH) administration. MS-PPOH (15 mg over 10 mins) was infused into the LPA 60 mins before starting Omegaven infusion. This dose was selected from past studies that showed the selective inhibition of CYP450 epoxygenase by MS-PPOH *in vivo* (15, 16). As control experiments, serial changes of basal hemodynamic variables were measured from 60 mins to 240 mins after MS-PPOH infusion (15 mg over 10 mins) with saline infusion in a LPA catheter (1.2 mL/hr).

Drug Preparation

Omegaven and Intralipide are fat emulsions ready for intravenous infusion. L-Nitro-arginine (Sigma-Aldrich, France) solution was freshly prepared just before infusion. L-Nitro-arginine (30 mg) was dissolved in a few drops of 1 M HCl. Then, 1 mL of normal saline was

added. A total of 1 M NaOH was added to titrate the pH to 7.40. Tetraethylammonium (Sigma-Aldrich) is dissolved in normal saline to obtain a concentration of 1 mL = 10 mg. MS-PPOH (SPI-BIO, Paris, France) is dissolved in dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich) and Cremophor (Sigma-Aldrich) and diluted in 5 mL of normal saline (1 mL = 3 mg).

Data Analysis

The data are presented as means ± SEM. The data were analyzed with a repeated-measures analysis of variance with time as a within-subjects factor to assess the changes over time within groups (Stat View for PC; Abacus Concepts, Berkeley, CA). Intergroup comparisons of the longitudinal changes were analyzed with an analysis of covariance using the baseline period as the covariate and the treatment period as the repeated observations and with the Fisher's, Scheffe, and Bonferroni/Dunn least significant tests. Mann-Whitney test was used for blood gas values comparisons. A *p* value <.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Protocol 1—Pulmonary Hemodynamic Response to Fat Emulsion Containing Either Mainly n3 PUFA (n = 8) or Mainly n6 PUFA (n = 5). Omegaven did not alter heart rate (157 ± 2 vs. 155 ± 6 beats/min; *p* = .74), aortic pressure (45 ± 1 vs. 45 ± 2 mm Hg; *p* = .80), pulmonary artery pressure (47 ± 1 vs. 46 ± 2 mm Hg; *p* = .45), or left atrial pressure (2 ± 0.8 vs. 3 ± 0.8 mm Hg; *p* = .08). Omegaven increased LPA flow by 30% (from 83 ± 3 to 110 ± 8 mL/min; *p* < .0001). Pulmonary vascular resistance decreased by 28% (from 44 ± 2 to 32 ± 3 dyne·sec/cm⁵; *p* < .0001) (Fig. 1). One hr after the end of Omegaven, pulmonary vascular resistance was still lower than baseline values (*p* < .0001) (Fig. 1).

Intralipide did not alter heart rate (161 ± 5 vs. 158 ± 8 beats/min; *p* = .89), aortic pressure (48 ± 3 vs. 48 ± 4 mm Hg; *p* = .99), pulmonary artery pressure (50 ± 3 vs. 51 ± 4 mm Hg; *p* = .56), left atrial pressure (2 ± 1 vs. 3 ± 1 mm Hg; *p* = .08), LPA flow (85 ± 7 vs. 90 ± 9 mL/min; *p* = .15), or pulmonary vascular resistance (45 ± 2 vs. 43 ± 3 dyne·sec/cm⁵; *p* = .43) (Fig. 1). Blood gases, arterial O₂ saturation of hemoglobin, and plasma lactate concentrations did not change during the experiment in both groups (Table 2). The drop in pulmonary vascular resistance was significantly

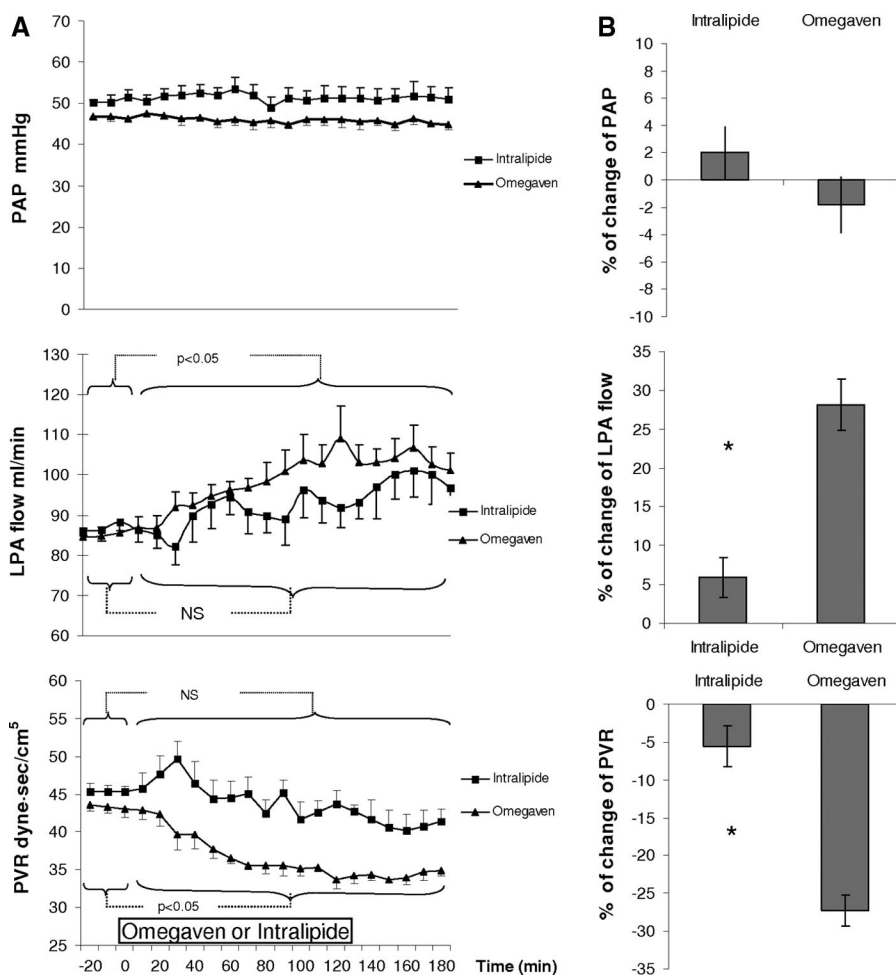


Figure 1. Pulmonary vascular responses to Omegaven (n = 8) and Intralipide (n = 5). *A*, Omegaven but not Intralipide infusion decreased the pulmonary vascular resistance (PVR) and increased left pulmonary artery (LPA) blood flow. Results are expressed as means ± SEM. *B*, The percent of decrease in PVR was significantly greater at the end of Omegaven compared with Intralipide infusion (percentage of change between baseline and the end of lipid emulsion infusion ± SEM). **p* < .0001 comparing Omegaven and Intralipide groups for the changes of PVR and LPA flow. NS, not significant.

Table 2. Blood gases, arterial O₂ saturation, and plasma lactate concentration at baseline and 2 hrs after starting Omegaven or Intralipide infusion^a

	Omegaven			Intralipide		
	Before Omegaven	2 hrs After Starting Omegaven	<i>p</i>	Before Intralipide	2 hrs After Starting Intralipide	<i>p</i>
pH	7.38 ± 0.01	7.37 ± 0.01	.43	7.3 ± 0.01	7.35 ± 0.01	.67
PCO ₂ , torr	49 ± 2	50 ± 2	.56	49 ± 1	51 ± 1	.60
PO ₂ , torr	15 ± 2	15 ± 2	.86	14 ± 1	15 ± 2	.91
HCO ₃ , mmol/L	28 ± 1	29 ± 1	.40	28 ± 1	27 ± 1	.75
SaO ₂ , %	51 ± 4	49 ± 4	.99	47 ± 4	48 ± 6	.83
Hb, g/dL	12 ± 1	12 ± 1	.52	11 ± 1	11 ± 2	.91
Lactate, mmol/L	2 ± 0.55	2 ± 0.5	.35	2 ± 0.55	3 ± 0.52	.67

SaO₂, arterial O₂ saturation; Hb, hemoglobin concentration. Mean ± SD.

^aNo significant changes have been observed in any parameters.

greater at the end of Omegaven than Intralipide infusion (*p* < .0001) (Fig. 1).

Protocol 2—Effect of Nitric Oxide Synthase Inhibition on the Pulmonary Vascular Response to n3 PUFA. Pulmo-

nary vascular resistance increased by 25% after L-nitro-arginine infusion (*p* < .0001) (Fig. 2). Omegaven decreased pulmonary vascular resistance by 30% from the beginning to the end of its infusion

(from 63 ± 2 to 44 ± 3 dyne·sec/cm⁵; $p < .0001$) (Fig. 2). The blood gas, arterial O₂ saturation, and the plasma lactate concentrations did not change during the experiments (Table 3).

Protocol 3—Effect of Potassium Channel Blockade on the Pulmonary Vascular Response to n3 PUFA. Heart rate decreased during TEA infusion (from 146 ± 4 to 127 ± 4 beats/min; $p = .02$). Aortic pressure, pulmonary artery pressure, LPA flow, and pulmonary vascular resistance did not change during TEA infusion (Fig. 3). Omegaven did not modify left pulmonary blood flow or pulmonary vascular resistance (Fig. 3). Blood gases, arterial O₂ saturation of hemoglobin, and plasma lactate concentrations did not change during the study period (Table 4).

Protocol 4—Effect of Cytochrome P450 Epoxygenase Inhibition on the Pulmonary Vascular Response to n3 PUFA. Aortic pressure, pulmonary artery pressure, LPA blood flow, and pulmonary vascular resistance did not change after MS-PPOH (Fig. 4). Omegaven did not alter left pulmonary blood flow or pulmonary vascular resistance (Fig. 4). Blood gases, arterial O₂ saturation of hemoglobin, and plasma lactate concentrations were similar in both groups (Table 5).

DISCUSSION

In this *in vivo* experimental study, we examined the effect of n3 PUFA on the fetal pulmonary circulation. We studied the response to fat emulsion containing, either mainly n3 PUFA or mainly n6 PUFA, on the basal pulmonary vascular tone in chronically prepared late gestation fetal lambs. We found that fat emulsion enriched in n3 PUFA mediated a potent and sustained pulmonary vasodilatation, whereas n6 PUFA did not change basal pulmonary vascular tone. Nitric oxide synthase inhibition did not alter the pulmonary vascular response to n3 PUFA. At the opposite, this response was abolished by CYP450 epoxygenase inhibition and potassium channel blockade. Taken together, our data suggest that n3 PUFA causes a potent and sustained vasodilatation in the fetal lung through production of vasoactive mediators by CYP450 epoxygenase and through activation of potassium channels.

Several studies have shown that n3 PUFAs have a protective cardiovascular effect. Increased consumption of n3 PUFA decreases the mortality and morbidity related to cardiovascular pathology

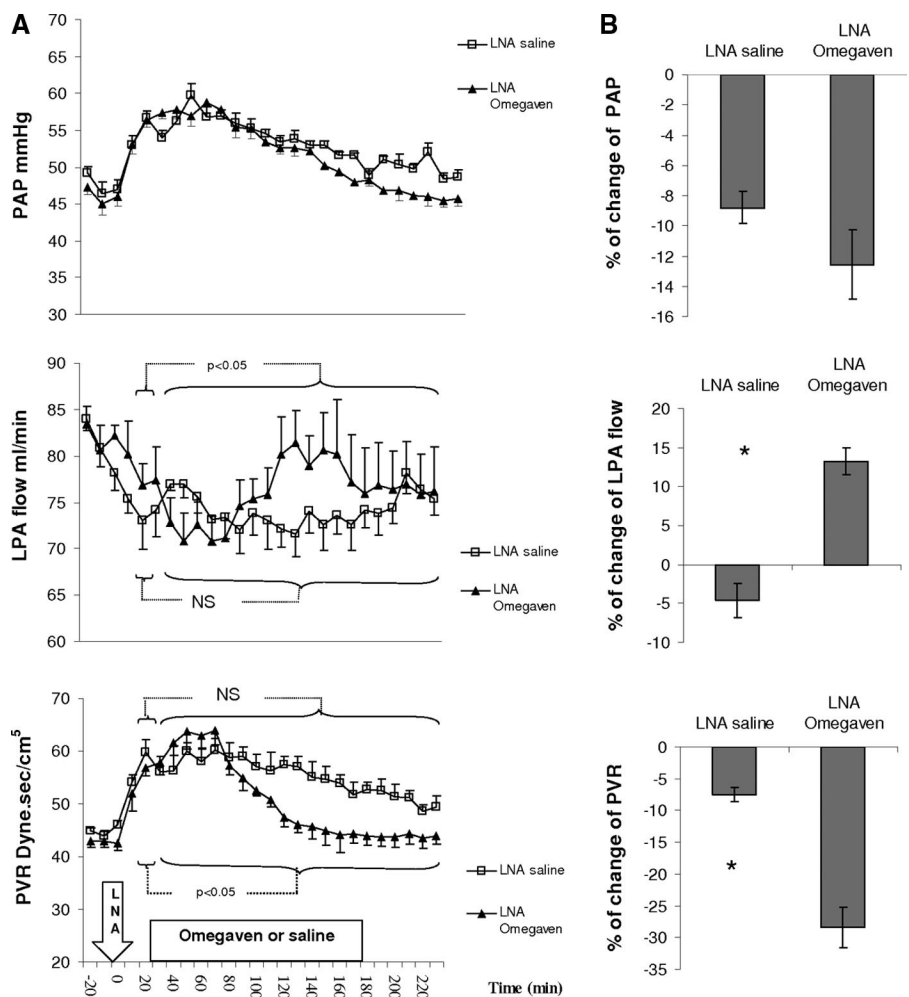


Figure 2. Pulmonary vascular responses to L-nitro-arginine (LNA) + saline (n = 5) or LNA + Omegaven (n = 5). *A*, Omegaven infusion significantly increased LPA blood flow and decreased PVR ($p < .0001$). Results are expressed as means \pm SEM. *B*, The percent of change in PVR and LPA flow was significantly greater at the end of Omegaven compared with saline infusion. Results are expressed as percent of change between baseline (just before starting Omegaven) and the end of Omegaven or saline infusion \pm SEM. * $p < .0001$ comparing LNA + Omegaven and LNA + saline groups for the changes of PVR and LPA flow. LPA, left pulmonary artery; PVR, pulmonary vascular resistance; NS, not significant.

Table 3. Values of blood gas, arterial O₂ saturation, plasma lactate concentration at baseline and after L-nitro-arginine (LNA), and 2 hrs normal saline (control) or Omegaven infusion^a

	LNA + Omegaven			LNA + Saline		
	Before LNA	After LNA and 2 hrs of Omegaven	<i>p</i>	Before LNA	After LNA and 2 hrs of Normal Saline	<i>p</i>
pH	7.37 \pm 0.01	7.34 \pm 0.01	.08	7.37 \pm 0.01	7.36 \pm 0.01	.53
Pco ₂ , torr	49 \pm 2	52 \pm 2	.34	45 \pm 2	45 \pm 2	.75
PO ₂ , torr	16 \pm 1	17 \pm 2	.29	17 \pm 1	18 \pm 1	.29
HCO ₃ , mmol/L	28 \pm 1	29 \pm 0.5	.41	26 \pm 1	25 \pm 1	.75
SaO ₂ , %	54 \pm 3	51 \pm 3	.53	55 \pm 2	53 \pm 6	.46
Hb, g/dL	12 \pm 1	12 \pm 0.3	.73	11 \pm 0.8	12 \pm 0.7	.29
Lactate, mmol/L	1.8 \pm 0.3	2.3 \pm 0.4	.32	1.5 \pm 0.1	2.1 \pm 0.4	.22

SaO₂, arterial O₂ saturation; Hb, hemoglobin concentration. Mean \pm SD.

^aNo significant changes have been observed in any parameters.

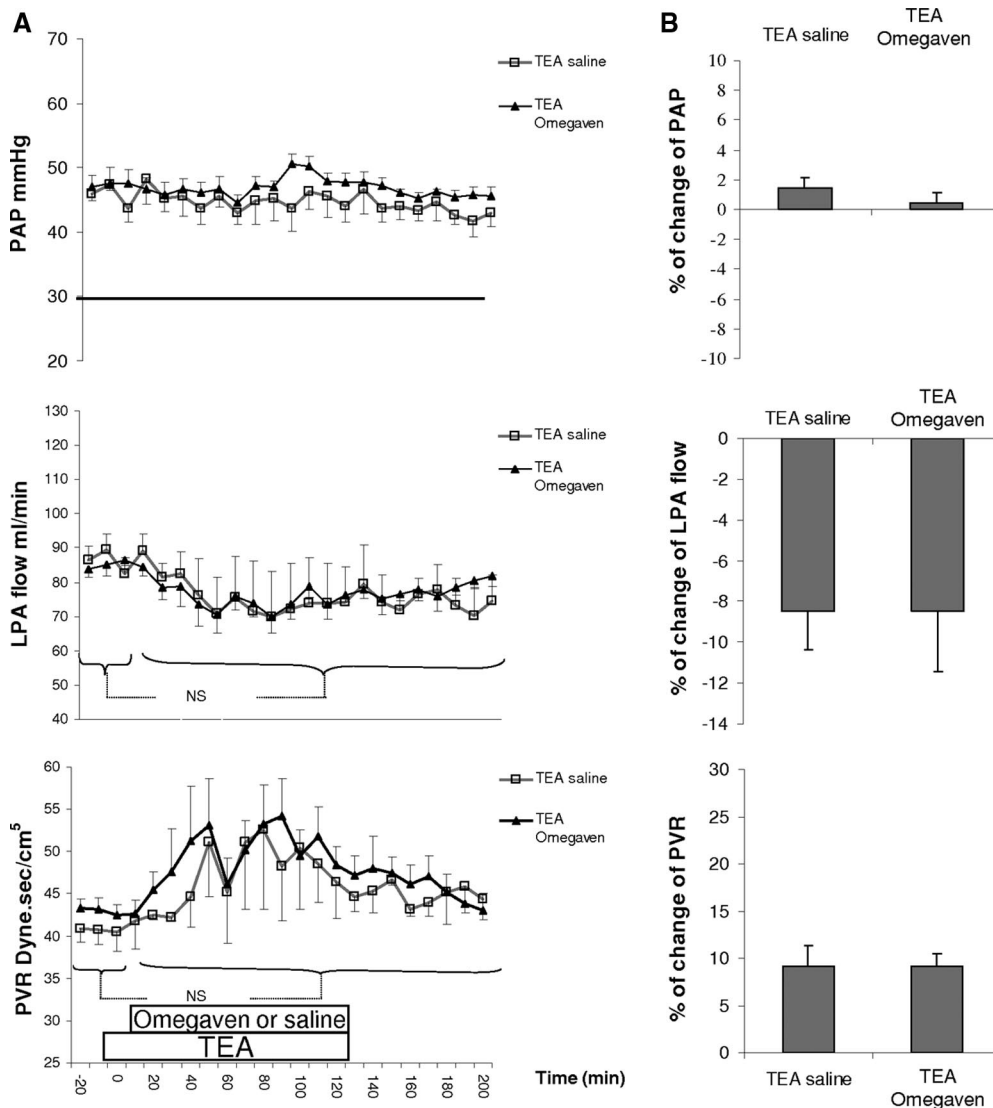


Figure 3. Pulmonary vascular responses to the infusion of tetraethylammonium (TEA) + normal saline (control, n = 4) or TEA + Omegaven (n = 5). A, Pulmonary artery pressure (PAP), left pulmonary artery (LPA) blood flow, and pulmonary vascular resistance (PVR) did not change during the study period. Results are expressed as means ± SEM. B, The percentage of change in PAP, LPA blood flow, and PVR were similar in both groups. Results are expressed as percent of change between baseline and the end of Omegaven or saline infusion ± SEM. NS, not significant.

Table 4. Values of blood gas, arterial O₂ saturation, and plasma lactate concentration at baseline and 2 hrs after starting infusion of tetraethylammonium (TEA) + normal saline (control) or TEA + Omegaven^a

	TEA + Omegaven			TEA + Saline		
	Before TEA	After TEA and 2 hrs of Omegaven	<i>p</i>	Before TEA	After TEA and 2 hrs of Normal Saline	<i>p</i>
pH	7.37 ± 0.01	7.36 ± 0.01	.53	7.38 ± 0.02	7.38 ± 0.01	.66
PCO ₂ , torr	49 ± 2	49 ± 3	.91	49 ± 3	49 ± 4	.82
PO ₂ , torr	15 ± 1	16 ± 2	.83	15 ± 3	15 ± 3	.82
HCO ₃ , mmol/L	27 ± 1	26 ± 1	.29	29 ± 2	29 ± 2	.52
SaO ₂ , %	48 ± 4	49 ± 5	.46	47 ± 8	44 ± 8	.51
Hb, g/dL	11.5 ± 0.1	12 ± 0.5	.34	11.6 ± 0.79	11.3 ± 0.1	.49
Lactate, mmol/L	1.63 ± 0.3	1.74 ± 0.2	.75	1.65 ± 0.1	1.3 ± 0.1	.31

SaO₂, arterial O₂ saturation; Hb, hemoglobin concentration. Mean ± SD.

^aNo significant changes have been observed in any parameters.

(17–19). Furthermore, n3 PUFA supplementation decreases the duration of mechanical ventilation and the risk of multiorgan failure in adults with acute respiratory distress syndrome (20, 21). Little is known regarding the pulmonary vascular effects of n3 PUFA. Dietary fish oil enriched in n3 PUFA decreases lung vascular remodeling in rats with chronic hypoxia (22). Analogs of other n3 PUFA metabolites such as prostacyclins are used in humans to treat pulmonary artery hypertension (23). n3 PUFA metabolites of CYP450 epoxygenase such as 17(18)-epoxyeicosatetraenoic acid cause vasorelaxation on human pulmonary arteries (10). In this study, our data provide further evidence that n3 PUFA may cause

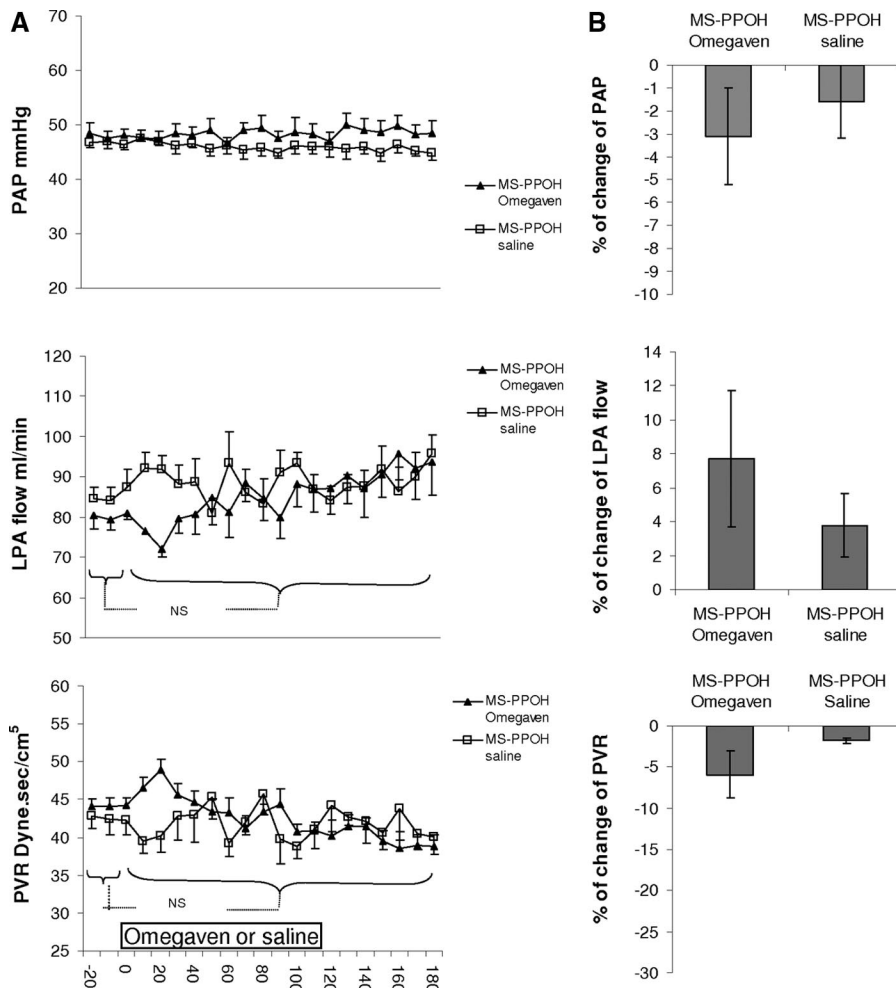


Figure 4. Pulmonary vascular responses to MS-PPOH + normal saline (n = 5) or MS-PPOH + Omegaven (n = 5). A, Pulmonary artery pressure (PAP), left pulmonary artery (LPA) blood flow, and pulmonary vascular resistance (PVR) did not change during the study period in both groups. Results are expressed as means ± SEM. B, The percent of change in PAP, LPA blood flow, and PVR are similar in both groups. Results are expressed as percent of change between baseline before starting Omegaven and the end of Omegaven or saline infusion ± SEM. MS-PPOH, (methylsulfonyl)-2-(2-propynyloxy)-benzenehexanamide; NS, not significant.

Table 5. Values of blood gas, arterial O₂ saturation, and plasma lactate concentration at baseline and after the injection of (methylsulfonyl)-2-(2-propynyloxy)-benzenehexanamide (MS-PPOH) and 2 hrs of normal saline or Omegaven infusion^a

	MS-PPOH + Omegaven			MS-PPOH + Saline		
	Before MS-PPOH	After MS-PPOH and 2 hrs of Omegaven	p	Before MS-PPOH	After MS-PPOH and 2 hrs of Normal Saline	p
pH	7.38 ± 0.01	7.37 ± 0.01	.53	7.39 ± 0.03	7.37 ± 0.02	.83
PCO ₂ , torr	46 ± 1	47 ± 1	.25	47 ± 3	51 ± 2	.83
PO ₂ , torr	19 ± 0.96	19 ± 1.49	.99	17 ± 2	18 ± 3	.60
HCO ₃ , mmol/L	27 ± 0.4	28 ± 0.7	.75	28 ± 2	29 ± 2	.83
SaO ₂ , %	55 ± 3	55 ± 5	.75	48 ± 8	47 ± 7	.91
Hb, g/dL	11 ± 0.2	12 ± 0.2	.75	11.8 ± 1.1	12.2 ± 1.3	.60
Lactate, mmol/L	1.8 ± 0.23	1.9 ± 0.09	.60	2.2 ± 0.1	2.3 ± 0.2	.32

SaO₂, arterial O₂ saturation; Hb, hemoglobin concentration. Mean ± SD.

^aNo significant changes have been observed in any parameters.

potent vasodilatation of the fetal lung. We found that Omegaven, but not Intralipide, decreases pulmonary vascular resistance. Except for the content of n3 PUFA and n6 PUFA, fat compositions of Omegaven and Intralipide are similar (Table 1). n6 PUFA/n3 PUFA ratio in Omegaven and Intralipide are approximately 0.1 and 10, respectively. Therefore, it is likely that the pulmonary vasodilator response to Omegaven is related to n3 PUFA. The decrease in pulmonary vascular resistance was prolonged for at least 3 hrs after starting Omegaven. This particular vascular response is original because most of the vasodilator agents such as oxygen, acetylcholine, sildenafil, bradykinin, or shear stress induce a transient vascular response in the fetal lung (13, 14, 24). Omegaven did not alter heart rate, left atrial, or systemic arterial blood pressure indicating that n3 PUFAs do not impair systemic vascular resistance and left ventricular function. Lack of change in the gradient between the pulmonary artery and the aortic pressures indicates that n3 PUFAs do not alter the basal tone of the ductus arteriosus. Furthermore, n3 PUFAs do not alter blood gases or lactate concentrations. Taken together, these data provide evidence that n3 PUFAs may induce a prolonged vasodilator response in the fetal lung without a deleterious effect on systemic circulation or on tissue oxygenation.

The mechanism of action of n3 PUFA on fetal pulmonary circulation is yet uncertain. Our results show that the pulmonary vasodilator response to n3 PUFA is not impaired by nitric oxide synthase inhibition. At the opposite, the pulmonary vasodilator response to n3 PUFA is abolished by TEA. At the dose used in this study, TEA results in both calcium- and voltage-dependent K⁺ channels blockade (14). Potassium channels are involved in the pulmonary vasodilatation at birth (14, 25, 26). Therefore, our results indicate that the pulmonary vasodilator response to n3 PUFA is mediated by activation of K⁺ channels. We also found that MS-PPOH, a selective inhibitor of cytochrome P450 epoxygenase, abolishes n3 PUFA-induced pulmonary vasodilatation. Collectively, the present study highlights that n3 PUFA may reduce the basal vascular tone through the production of CYP450 epoxygenase metabolites and activation of K⁺ channels. CYP450 epoxygenases are largely expressed in the lung vessels (27–29). Emerging evidences indicate that CYP450 epoxygenase metabolites may alter the course of pulmonary

hypertension. The soluble epoxide hydrolase metabolizes epoxides to their less active derivatives. Epoxide hydrolase inhibition was found to reduce pulmonary vascular remodeling and the development of pulmonary hypertension in rats (30). n3 PUFA, in particular eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid, are metabolized into epoxide derivatives by CYP450 epoxygenase (8). These metabolites include the epoxyeicosatetraenoic acids and the epoxydocosapentaenoates (31, 32). Eicosapentaenoic acid epoxides are potent activators of BK_{ca} in vascular smooth cells (32) and mediate concentration-dependent relaxing effects in human pulmonary artery and human bronchi (10, 31, 32). We speculate that n3 PUFA could have been metabolized by CYP450 epoxygenase in the lung vessels to produce epoxyeicosatetraenoic acid metabolites that in turn activate potassium channels causing vasodilatation.

There are some limitations in our study. Omegaven contains several n3 PUFA, including linolenic acid, docosahexaenoic acid, and eicosapentaenoic acid. It is unclear presently which of these n3 PUFA components mediates the pulmonary vasodilator response to Omegaven infusion. Additionally, this study highlights the vasodilator effects of n3 PUFA in the fetal lung. Although basal pulmonary vascular tone is elevated in the fetus, the conditions of occurrence of persistent pulmonary hypertension of the newborn are different and the use of n3 PUFA in its treatment needs further investigation.

Perspective and Conclusion

Persistent pulmonary hypertension of the newborn is a clinical syndrome characterized by sustained elevation of pulmonary vascular resistance, structural changes in the pulmonary vascular bed, and abnormal pulmonary vasoreactivity. Specific management includes mechanical ventilation, correction of acidosis, and inhaled nitric oxide. Parenteral nutrition is also usually required, including fat emulsion supplementation. In the newborn infant, the usual intravenous fat emulsion contains mainly n6 PUFA. Our data provide evidence for potential beneficial effects of n3 PUFA on the pulmonary circulation through production of epoxides. We speculate that n3 PUFA supplementation may contribute to improve pulmonary blood flow and function in persistent pulmonary hypertension of the newborn, in particular in conditions with

prolonged pulmonary hypertension such as congenital diaphragmatic hernia or pulmonary hypoplasia.

REFERENCES

- Ziegler TR: Parenteral nutrition in the critically ill patient. *N Engl J Med* 2009; 361: 1088–1097
- Phillips SK: Pediatric parenteral nutrition: Differences in practice from adult care. *J Intensive Nurs* 2004; 27:166–170
- Pontes-Arruda A, Aragao AM, Albuquerque JD: Effects of enteral feeding with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid, and antioxidants in mechanically ventilated patients with severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 2006; 34:2325–2333
- Singer P, Theilla M, Fisher H, et al: Benefit of an enteral diet enriched with eicosapentaenoic acid and gamma-linolenic acid in ventilated patients with acute lung injury. *Crit Care Med* 2006; 34:1033–1038
- Prasertsom W, Phillipos EZ, Van Aerde JE, et al: Pulmonary vascular resistance during lipid infusion in neonates. *Arch Dis Childhood* 1996; 74:F95–98
- Simopoulos AP: Essential fatty acids in health and chronic diseases. *Forum Nutr* 2003; 56:67–70
- Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, et al: Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998; 12:1063–1073
- Fer M, Dreano Y, Lucas D, et al: Metabolism of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids by recombinant human cytochromes P450. *Arch Biochem Biophys* 2008; 471: 116–125
- Kulas J, Schmidt C, Rothe M, et al: Cytochrome P450-dependent metabolism of eicosapentaenoic acid in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Arch Biochem Biophys* 2008; 472:65–75
- Morin C, Sirois M, Echave V, et al: Relaxing effects of 17(18)-EpETE on arterial and airway smooth muscles in human lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009; 296: L130–139
- Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF, et al: Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet* 1989; 2:757–761
- Storme L, Parker TA, Kinsella JP, et al: Chronic hypertension impairs flow-induced vasodilation and augments the myogenic response in fetal lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282:L56–66
- Storme L, Rairigh RL, Parker TA, et al: In vivo evidence for a myogenic response in the fetal pulmonary circulation. *Pediatr Res* 1999; 45:425–431
- Storme L, Rairigh RL, Parker TA, et al: K⁺-channel blockade inhibits shear stress-induced pulmonary vasodilation in the ovine fetus. *Am J Physiol* 1999; 276:L220–228
- Brand-Schieber E, Falck JF, Schwartzman M: Selective inhibition of arachidonic acid epoxidation in vivo. *J Physiol Pharmacol* 2000; 51:655–672
- Rajapakse NW, Roman RJ, Falck JR, et al: Modulation of V1-receptor-mediated renal vasoconstriction by epoxyeicosatrienoic acids. *Am J Physiol* 2004; 287:R181–R187
- Abdukeyum GG, Owen AJ, McLennan PL: Dietary (n-3) long-chain polyunsaturated fatty acids inhibit ischemia and reperfusion arrhythmias and infarction in rat heart not enhanced by ischemic preconditioning. *J Nutr* 2008; 138:1902–1909
- Calder PC: n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: Evidence explained and mechanisms explored. *Clin Sci (Lond)* 2004; 107:1–11
- Massaro M, Scoditti E, Carluccio MA, et al: Basic mechanisms behind the effects of n-3 fatty acids on cardiovascular disease. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2008; 79:109–115
- Katz DP, Manner T, Furst P, et al: The use of an intravenous fish oil emulsion enriched with omega-3 fatty acids in patients with cystic fibrosis. *Nutrition* 1996; 12:334–339
- Ranieri VM, Suter PM, Tortorella C, et al: Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: A randomized controlled trial. *JAMA* 1999; 282:54–61
- Archer SL, Johnson GJ, Gebhard RL, et al: Effect of dietary fish oil on lung lipid profile and hypoxic pulmonary hypertension. *J Appl Physiol* 1989; 66:1662–1673
- McLaughlin VV, Archer SL, Badesch DB, et al: ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association developed in collaboration with the American College of Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc; and the Pulmonary Hypertension Association. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53:1573–1619
- Storme L, Rairigh RL, Parker TA, et al: Acute intrauterine pulmonary hypertension impairs endothelium-dependent vasodilation in the ovine fetus. *Pediatr Res* 1999; 45: 575–581
- Archer SL, Huang JM, Hampl V, et al: Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:7583–7587
- Cornfield DN, Reeve HL, Tolarova S, et al: Oxygen causes fetal pulmonary vasodilation through activation of a calcium-dependent potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:8089–8094
- Kiss L, Schutte H, Mayer K, et al: Synthesis of arachidonic acid-derived lipoxygenase and cytochrome P450 products in the intact human lung vasculature. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1917–1923
- Pokreisz P, Fleming I, Kiss L, et al: Cytochrome P450 epoxygenase gene function in hypoxic pulmonary vasoconstriction and pul-

- monary vascular remodeling. *Hypertension* 2006; 47:762–770
29. Zhu D, Effros RM, Harder DR, et al: Tissue sources of cytochrome P450 4A and 20-HETE synthesis in rabbit lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19:121–128
 30. Revermann M, Barbosa-Sicard E, Dony E, et al: Inhibition of the soluble epoxide hydrolase attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Hypertens* 2009; 27:322–331
 31. Ye D, Zhang D, Oltman C, et al: Cytochrome p-450 epoxygenase metabolites of docosahexaenoate potently dilate coronary arterioles by activating large-conductance calcium-activated potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 303:768–776
 32. Lauterbach B, Barbosa-Sicard E, Wang MH, et al: Cytochrome P450-dependent eicosapentaenoic acid metabolites are novel BK channel activators. *Hypertension* 2002; 39:609–613
 33. Tristani-Firouzi M, Martin EB, Tolarova S, et al: Ventilation-induced pulmonary vasodilation at birth is modulated by potassium channel activity. *Am J Physiol* 1996; 271: H2353–H2359
 34. Capdevila JH, Karara A, Waxman DJ, et al: Cytochrome P-450 enzyme-specific control of the regio- and enantiofacial selectivity of the microsomal arachidonic acid epoxygenase. *J Biol Chem* 1990; 265: 10865–10871

AUTHOR QUERIES

AUTHOR PLEASE ANSWER ALL QUERIES

1

1—Provide names and locations of manufacturers of all brand name products mentioned:
Sedaxylan, Diprivan, Nubain, Aerrane, Xylocaine.

2—Location of Philips France?

3—Location (city) of Fresenius Kabi?

4—City where Sigma-Aldrich is located?

5—So that all references are cited in order in the text, references 12 through 34 have been renumbered/reordered. Verify changes. Also, your original references 15 and 28 were not cited in the text and were therefore moved to the end of the reference list as reference 33 and 34, respectively. Cite these 2 references in the text or delete from reference list.

BASIC RESEARCH: OBSTETRICS

Effects of environmental tobacco smoke on the pulmonary circulation in the ovine fetus

Veronique Houfflin-Debarge, MD; Ethel Sabbah-Briffaut, MD; Estel Aubry, MD; Philippe Deruelle, MD; Ceneric Alexandre, MD; Laurent Storme, MD

OBJECTIVE: Epidemiologic studies have highlighted an association between maternal smoking and persistent pulmonary hypertension of the newborn infant. However, the impact of exposure to tobacco smoke on the perinatal pulmonary circulation is currently unknown. The purpose of this study was to assess the pulmonary vascular effects of environmental tobacco smoke in the fetus.

STUDY DESIGN: We performed surgery on 16 fetal lambs and placed catheters in the main pulmonary artery, aorta, and left atrium to measure pressures. An ultrasonic blood flow transducer was placed around the left pulmonary artery to measure blood flow. The ewes were exposed to tobacco smoke for 2 hours. In another set of experiments, the

pulmonary vascular response to increased fetal O₂ tension has been assessed after 2 hours of tobacco smoke inhalation or not (control group).

RESULTS: Exposure to tobacco smoke decreased pulmonary blood flow by 30% and elevated pulmonary vascular resistance by 40%. The vasodilator response to increased O₂ tension was blunted after smoke inhalation compared with control animals. Smoke inhalation was associated with a decrease in fetal PaO₂ and SaO₂.

CONCLUSION: Exposure to environmental tobacco smoke in pregnant ewes impairs both basal tone and vascular reactivity of the fetal lung.

Key words: fetal lamb, pulmonary circulation, tobacco smoke

Cite this article as: Houfflin-Debarge V, Sabbah-Briffaut E, Aubry E, et al. Effects of environmental tobacco smoke on the pulmonary circulation in the ovine fetus. *Am J Obstet Gynecol* 2011;204:450.e8-14.

Cigarette smoking during pregnancy is associated with multiple health problems that include spontaneous abortion, prematurity, growth restriction, and sudden infant death syndrome.^{1,2} It alters the development of the respiratory system and increases the risk of a wheeze and asthma in childhood.^{3,4} Studies of lungs that were exposed in

utero to cigarette smoke showed marked structural and functional changes, such as decreased alveolar attachments to the airway wall and increased airways responsiveness.^{5,6} Moreover, growing evidence has emerged that in utero smoke exposure may also impair the perinatal pulmonary circulation. Cigarette smoking during pregnancy increases the risk of persistent pulmonary hypertension of the newborn infant (PPHN).^{7,8} PPHN results from the failure of the pulmonary circulation to dilate at birth and may cause severe hypoxemia.⁹ Little is known regarding the potential mechanisms to explain the link between cigarette smoking during pregnancy and PPHN.

In adults, pulmonary hypertension may worsen the course of tobacco smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. Endothelial dysfunction in intrapulmonary arteries was found during exposure to tobacco smoke that contributed, at least in part, to vasoconstriction and smooth muscle cells proliferation.^{10,11} Chronic hypoxia has also been involved in the mechanism of pulmonary vasoconstriction and vascular remodeling in heavy smokers.¹² In vitro studies suggest that in utero tobacco smoke may alter pulmonary vasorelax-

ation. Indeed, prenatal exposure to cigarette smoke extract impairs endothelium-dependent relaxation of isolated pulmonary arteries of chicken embryo.¹³ However, the impact of maternal cigarette smoking on the perinatal pulmonary circulation currently is unknown.

Therefore, the aim of this study was to assess the effects of in utero cigarette smoke on the pulmonary vascular resistance (PVR) in the fetus. We performed serial studies on the acute hemodynamic effects of passive cigarette smoke in late-gestation fetal lambs.

MATERIALS AND METHODS

All animal procedures and protocols were reviewed and approved by the French "Ministère de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Pêche." Surgery was performed on 16 mixed-breed pregnant ewes at 130-132 days' gestation (term = 145 days). Ewes were sedated with intramuscular xylazine (Sedaxylan; 20 mg/mL, 40 mg), intravenous propofol (Diprivan; 2%, 4 mL), and nalbuphine (Nubain; 20 mg) before intubation and mechanical ventilation. The ewes were kept anesthetized by inhaled isoflurane (Aerrane; 1-5%). The left forelimb of the fetus was delivered through a uterine in-

From the Faculté de Médecine, Université Lille-Nord de France (Drs Houfflin-Debarge, Sabbah-Briffaut, Aubry, Deruelle, Alexandre, and Storme); Pôle Femme Mère Nouveau-né, Hôpital Jeanne de Flandre (Drs Houfflin-Debarge, Sabbah-Briffaut, Deruelle, Alexandre, and Storme), and Pôle Enfant, Clinique de Chirurgie et Orthopédie de l'Enfant (Dr Aubry), Lille, France.

Received Aug. 30, 2010; revised Dec. 21, 2010; accepted Dec. 30, 2010.

Reprints: Laurent Storme, MD, Pôle Femme Mère Nouveau-né, Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU de Lille, Avenue Eugène Avinée, Lille Cedex 59035, France. lstorme@chru-lille.fr.

Supported by the following grants: Fondation de France, University Lille-Nord de France, Fondation de l'Avenir, and Société Française de Médecine Périnatale.

0002-9378/\$36.00

© 2011 Mosby, Inc. All rights reserved.

doi: 10.1016/j.ajog.2010.12.049

cision. A skin incision was made after subcutaneous injection of lidocaine (Xylocaine; 1%, 4 mL) and nalbuphine (Nubain; 5 mg). Polyvinyl catheters (20 gauge) were advanced into the fetal aorta and vena cava through the axillary vessels. A left thoracotomy exposed the heart and great vessels. A catheter (20 gauge) was inserted into the main pulmonary artery by direct puncture through purse string suture, as previously described.^{14,15} An ultrasonic flow transducer, size 6 (Transonic Systems; Transonic Systems Inc, Ithaca, NY), was placed around the left pulmonary artery (LPA). Another catheter was placed in the amniotic cavity. The flow transducer and catheters were exteriorized through a subcutaneous tunnel to an external flank pouch. The ewes received amoxicillin (Clamoxyl; 1 g) and nalbuphine (20 mg) daily until day 3 after surgery. Studies were performed after a recovery time of 72 hours (ie, at 133–135 days' gestation). Previous lung morphometric studies suggest that this gestational age in the fetal lamb corresponds to full-term for lung maturation in human fetus.¹⁶

Physiologic measurements

The blood flow transducer cable was connected to an internally calibrated flow meter (T201; Transonic Systems Inc) for continuous measurements of LPA blood flow. The *zero blood flow* was defined as the measured blood flow value immediately before the beginning of systole. The catheters were connected to a pressure transducer (Philips HP Merlin; Soma Technology Inc, Bloomfield, CT). Pressures were referenced to the amniotic cavity pressure. PVR in the left lung was calculated as the difference between mean pulmonary artery pressure (PAP) and left atrial pressures divided by mean LPA blood flow. Based on our past studies in which left atrial pressure was found to be consistently close to 2-cm H₂O, a value of 2-cm H₂O was used as an estimate of left atrial pressure.^{14,15} Blood samples from the main pulmonary artery catheter were used for blood gas analysis, carboxyhemoglobin, lactate, and oxygen saturation (SaO₂) measurements (OSM3 Hemoximeter and ABL

800 FLEX; Radiometer, Copenhagen, Denmark; i-Stat, Abbott Laboratories, Chicago, IL).

Experimental design

The animals were assigned randomly either in an experimental group (tobacco smoke exposure) or in a control group. Two different experimental protocols were included in this study: (1) the effects of maternal exposure to environmental cigarette smoke on the basal pulmonary vascular tone (protocol 1) and (2) the effects of maternal exposure to environmental cigarette smoke on the pulmonary vascular response to an increase in O₂ tension (protocol 2). Experimental protocols were performed successively (protocol 1 then protocol 2). A minimum recovery period of 48 hours was required between each protocol. To ensure that complete recovery was achieved before another protocol began, we checked that the measured parameters, arterial blood gases, and carboxyhemoglobin levels had returned to the baseline values. Mean PAP, aortic pressure (AoP), amniotic pressure, LPA blood flow, and heart rate were recorded at 10-minute intervals. Blood gas analysis, carboxyhemoglobin, and SaO₂ measurements in both the ewe and fetus were performed before and at the end of each protocol.

Protocol 1: effects of maternal exposure to environmental cigarette smoke on the basal pulmonary vascular tone. After 30 minutes of baseline hemodynamic measurements, a large helmet (self-made light and transparent plastic, volume approximately 125 L) was placed around the ewe's head and held around the neck. The helmet was ventilated by an air/O₂ blender and flow meter (Sechrist Industries Inc, Anaheim, CA) that was set at a rate of 18 L/min and fraction of inspired oxygen (FiO₂) of 21%. FiO₂ and carbon monoxide (CO) concentration inside the helmet was monitored continuously (Puritan-Bennett 7820 oxygen monitor; Puritan-Bennett Inc, Overland Park, KS; TIF8500A carbon monoxide analyzer; TIF Instruments, Owatonna, MN). After 30 minutes of quiet breathing in the helmet, tobacco smoke was delivered into it. The tobacco smoke generator system

consisted of a device which lit and presented a cigarette (Gauloise disque bleu, no filter: tar, 10.7mg/cigarette; nicotine, 0.59 mg/cigarette; CO, 16.5 mg/cigarette) to a tube that was connected to a precision air flow meter (0–100 mL/min; Sechrist Industries Inc). The entire air flow passed over the cigarette. Smoke was delivered into a mixing chamber where it was diluted with the fresh gas that was driven by the air/O₂ blender and flow meter (rate, 18 L/min). The blender was then adjusted to maintain the FiO₂ at 21% in the helmet. The rate of airflow that generated the cigarette smoke was adjusted to obtain a target CO concentration inside the helmet of 40 parts per million (ppm; 80 mL/min [range, 75–85 mL/min]). This CO concentration and the 2-hour exposure duration were chosen to mimic actual environmental cigarette smoke in which pregnant women potentially can be exposed in various private or public facilities.^{16–20} Each cigarette was puffed for 10 minutes before replacement. Duration of the smoking period was 120 minutes. The helmet was then removed, and the smoke generator was stopped. The ewe breathed room air for an additional 30 minutes. Special care was taken to ventilate the room for the duration of the experiment (CO, <2 ppm).

Protocol 2: effects of maternal exposure to environmental cigarette smoke on the pulmonary vascular response to increased O₂ tension. The purpose of this protocol was to determine whether in utero cigarette smoke would alter the pulmonary vasodilator response to increase in fetal PaO₂. The ewes were exposed to 120 minutes of tobacco smoke, as described earlier. Then, the smoke generator was discontinued, and the air/O₂ blender and flow meter was set at FiO₂ of 100% (18 L/min) for 30 minutes. Hemodynamic measurements (mean PAP, AoP, pulmonary blood flow, PVR) were recorded at 10-minute intervals that started 30 minutes before O₂ inhalation, during O₂ inhalation, and for 30 minutes after O₂ discontinuation. Control animals were subjected to a similar protocol, excluding tobacco smoke inhalation.

TABLE 1
Blood gas parameters

Variable	Baseline		Helmet		Tobacco smoke		Recovery	
	Ewe	Fetus	Ewe	Fetus	Ewe	Fetus	Ewe	Fetus
pH	7.46 ± 0.02	7.38 ± 0.02	7.44 ± 0.02	7.36 ± 0.02	7.45 ± 0.02	7.34 ± 0.02	7.46 ± 0.02	7.36 ± 0.02
PaO ₂ , mm Hg	92 ± 8	18 ± 1	94 ± 7	19 ± 2	90 ± 8	12 ± 3 ^a	92 ± 7	14 ± 3 ^a
SaO ₂ , %	95 ± 3	54 ± 5	97 ± 3	57 ± 6	91 ± 6 ^a	39 ± 8 ^a	93 ± 4	44 ± 5 ^a
PaCO ₂ , mm Hg	37 ± 3	45 ± 3	40 ± 3	47 ± 3	38 ± 4	47 ± 6	37 ± 5	49 ± 4
Lactate, plasma lactate concentration, mg/L	1.2 ± 0.9	1.7 ± 0.6	1.1 ± 0.5	1.1 ± 0.6	1.3 ± 0.5	2.2 ± 0.8	1.3 ± 0.4	2 ± 0.8
Carboxyhemoglobin, %	1.5 ± 0.7	1.8 ± 0.8	1.3 ± 0.5	1.6 ± 0.5	6.2 ± 1.5 ^a	5.7 ± 2.1 ^a	5.5 ± 2 ^a	5.6 ± 2 ^a

Data are given as mean ± SD (n = 8).

^a P < .05, compared with baseline.

Houfflin-Debarge. Tobacco smoke and pulmonary circulation. *Am J Obstet Gynecol* 2011.

Statistical analysis

The results are presented as means ± SEM. The data were analyzed with repeated-measures and factorial analysis of variance. Intergroup differences were analyzed with the Fisher's, Scheffe's, and Bonferroni/Dunn's least significant tests (Stat View for PC; Abacus Concepts, Berkeley, CA). The Mann-Whitney test (independent values) and paired Wilcoxon rank test (paired values) were also performed on the quantitative data to test for statistical differences between the groups. A probability value of < .05 was considered to be statistically significant.

RESULTS

Protocol 1

Effects of maternal exposure to environmental cigarette smoke on the basal pulmonary vascular tone. Eight ewes were exposed to tobacco smoke at an average of 4 days after the surgery. PaCO₂ and pH did not change in both the ewe and fetus during the study period (Table 1). Compared with baseline, none of the parameters (pH, blood gases, SaO₂, PAP, AoP, LPA blood flow) changed during the period of spontaneous air breathing in the helmet in both ewe and fetus (Table 1; Figure 1). Although the PaO₂ of the ewe did not change, fetal PaO₂ decreased during maternal exposure to tobacco smoke (P < .05; Table 1). The SaO₂ of both the ewes and fetuses were lower at the end of the smoke exposure period

than during baseline (P < .05; Table 1). Carboxyhemoglobin levels increased in the ewes and fetuses during smoke exposure (P < .05; Table 1). Exposure to cigarette smoke did not alter heart rate (before, 157 ± 5 beats/min; after, 162 ± 6 beats/min), AoP (before, 50 ± 3 mm Hg; after, 52 ± 2 mm Hg), and PAP (before, 52 ± 3 mm Hg; after, 54 ± 3 mm Hg; Figure 1). Exposure to cigarette smoke decreased LPA blood flow by 30% (from 87 ± 7 mL/min to 62 ± 4 mL/min; P < .05; Figure 1). PVR increased by 40% (from 0.59 ± 0.06 mm Hg/mL/min to 0.82 ± 0.08 mm Hg/mL/min; P < .05; Figure 1). Thirty minutes after cessation of smoke exposure, the PVR was still higher than baseline values (P < .05; Figure 1).

Protocol 2

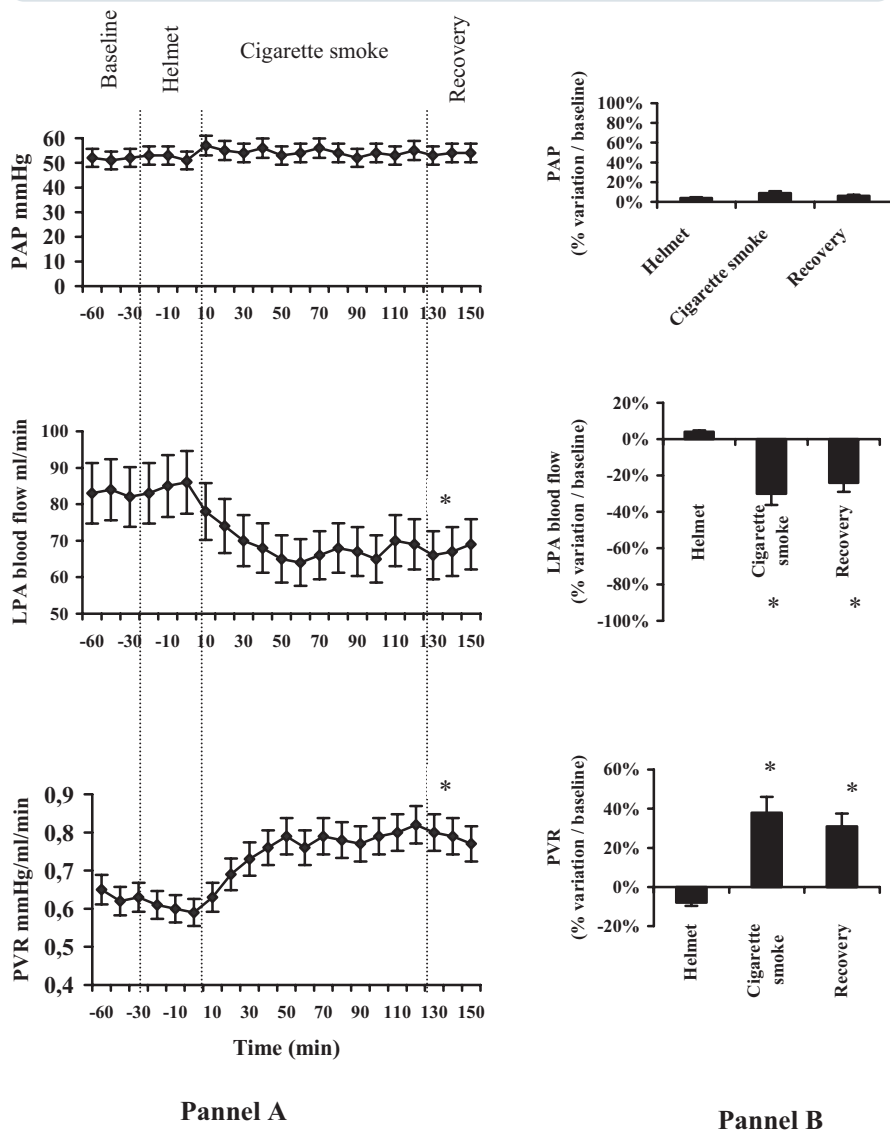
Effects of maternal exposure to environmental cigarette smoke on the pulmonary vascular response to increased O₂ tension. Compared with the control group, the fetuses that were exposed to 2 hours of maternal smoking had lower PaO₂ and SaO₂ and higher carboxyhemoglobin levels (P < .05; Table 2). Inhaled O₂ for 30 minutes increased PaO₂ and SaO₂ levels significantly in both groups (P < .05; Table 2). In the control group, the increase in fetal PaO₂ level elevated LPA blood flow by 120% (from 84 ± 12 to 180 ± 19 mL/min; P < .05) and decreased PVR by 55% (P < .05; Figure 2).

In the "cigarette smoke" group, LPA blood flow increased by 40% (from 72 ± 14 to 99 ± 22 mL/min; P < .05), and PVR decreased by 30% during the O₂ challenge (P < .05; Figure 2). Despite PaO₂ and SaO₂ levels being similar in both groups after 30 minutes of O₂ inhalation, the percentage of change in LPA blood flow and PVR were larger in the control group than in the "cigarette smoke" group during the O₂ challenge (P < .05; Table 2; Figure 2).

COMMENT

Association between maternal smoking and persistent pulmonary hypertension of the newborn infant has been found in epidemiologic studies. However, the impact of in utero cigarette smoke on the perinatal pulmonary circulation is uncertain. We performed serial studies on the acute hemodynamic effects of passive cigarette smoke inhalation in late-gestation fetal lambs. We found that exposure to environmental tobacco smoke for 2 hours markedly decreased pulmonary blood flow and elevated PVR. Tobacco smoke-induced elevation in pulmonary vascular tone was sustained for at least 30 minutes after cessation of smoke exposure. The effect of cigarette smoke exposure on the fetal pulmonary circulation is associated with a decrease in fetal PaO₂ and SaO₂ levels. We also found that the fetal pulmonary vasodilator response to an increase in O₂ tension is blunted after

FIGURE 1
Effects of maternal exposure to environmental cigarette smoke on the basal pulmonary vascular tone (n = 8)



A, Change in mean pulmonary artery pressure (PAP), left pulmonary artery (LPA) blood flow, and pulmonary vascular resistance (PVR) at baseline, during spontaneous air breathing in helmet (*Helmet*), during exposure to tobacco smoke (*Cigarette smoke*), and after discontinuation of smoke inhalation (*Recovery*). PAP did not change during the study period. LPA blood flow decreased, and PVR increased during the study period. The *asterisk* denotes a probability value of < .05; analysis of variance was used for repeated measures). **B**, Changes in PAP, LPA blood flow, and PVR are expressed as percentage of change, compared with baseline. Whereas spontaneous air breathing in helmet (*Helmet*) did not change the hemodynamic parameters, LPA blood flow was lower, and PVR was higher during the smoke inhalation period (*Cigarette smoke*), and 30 minutes after discontinuation of smoke inhalation (*Recovery*). The *asterisk* denotes a probability value of < .05.

Houfflin-Debarge. Tobacco smoke and pulmonary circulation. *Am J Obstet Gynecol* 2011.

exposure to cigarette smoke. Taken together, the results of this observational study indicate that exposure to environmental tobacco smoke in pregnant ewes

impairs both basal tone and vascular reactivity of the fetal lung.

Although evidence exists that indicates a link between in utero exposure to

tobacco smoke and the occurrence of PPHN at birth, this is the first in vivo study to demonstrate a major impact of prenatal exposure to environmental tobacco smoke on the perinatal pulmonary circulation.^{7,8} Cotinine concentrations in the cord blood, which is a biologic marker for nicotine exposure, were found to be higher in infants with PPHN than in healthy control newborn infants.⁷ Prenatal cigarette smoke was found to increase the risk of PPHN in the premature infants at <30 weeks' gestational age, which suggests a toxic effect on the pulmonary vascular development and maturation.⁸

Our study provides new information on the potential impact of prenatal exposure to environmental tobacco smoke on the perinatal pulmonary circulation. The pregnant ewes were exposed to cigarette smoke that was delivered into a large helmet placed around the head. The concentration of cigarette smoke inside the helmet was titrated with the continuous measurement of CO concentration. Similar methods of titration have been used previously to explore the impact of passive smoking on the systemic vascular reactivity.²¹ A target CO concentration of 40 ppm was chosen because similar CO concentrations (10-60 ppm) were found in various private or public facilities (such as pubs, bars, internet cafes, cars, or closed rooms in which people are smoking).¹⁷⁻²² Carboxyhemoglobin levels that were measured in the ewes, after the 2-hour exposure to cigarette smoke are similar to those measured in pregnant women who smoke.²³ Inhalation of cigarette smoke in pregnant ewes induced a marked drop in the fetal pulmonary blood flow. This effect was not related to acute change in breathing pattern or gas exchange in the ewe, because neither blood gas nor FiO₂ in the ewes changed during the experimental period. The decrease in pulmonary blood flow was sustained for at least 30 minutes after discontinuation of smoke exposure. These data indicate that prenatal smoke exposure causes a potent pulmonary vasoconstriction in the fetus that persists after cessation of smoke inhalation.

TABLE 2
Fetal blood gas parameters

Variable	Baseline		O ₂ challenge		Recovery	
	Control	Cigarette smoke	Control	Cigarette smoke	Control	Cigarette smoke
pH	7.37 ± 0.03	7.34 ± 0.03	7.38 ± 0.02	7.33 ± 0.03	7.38 ± 0.02	7.34 ± 0.02
PaO ₂ , mm Hg	18 ± 2	11 ± 3 ^a	24 ± 3	25 ± 3	17 ± 4	14 ± 3
SaO ₂ , %	56 ± 5	37 ± 9 ^a	71 ± 8	65 ± 8	53 ± 6	46 ± 7
PaCO ₂ , mm Hg	44 ± 4	47 ± 6	42 ± 3	46 ± 4	41 ± 4	44 ± 6
Lactate, plasma lactate concentration, mg/L	1.4 ± 0.7	2.1 ± 1	1.7 ± 0.8	2.4 ± 1.2	1.3 ± 0.5	2.2 ± 0.8
Carboxyhemoglobin	1.4 ± 0.8	6.1 ± 1.5 ^a	1.5 ± 0.5	5.8 ± 1.8 ^a	1.2 ± 0.5	4.4 ± 1.4 ^a

Data are given as mean ± SD. Cigarette smoke group, n = 4; Control group, n = 5.

^a P < .05, cigarette smoke group compared with control group.

Houfflin-Debarge. Tobacco smoke and pulmonary circulation. *Am J Obstet Gynecol* 2011.

Furthermore, smoke inhalation impairs the physiologic vasodilator response to increased O₂ tension in the perinatal lung. In a normal fetal lamb, inhaled O₂ increases the fetal PaO₂ level, which in turn causes a potent pulmonary vasodilation.²⁴ After a brief (2-hour) exposure to tobacco smoke, the pulmonary vasodilator response to increased O₂ tension was lower than in a normal fetal lamb, despite similar values of PaO₂ and SaO₂. These data indicate that prenatal exposure to cigarette smoke markedly alters the normal pulmonary vascular reactivity to O₂.

PVR decreases dramatically during the normal transition from the fetal-to-neonatal circulation at birth. Three main factors contribute to the increase of pulmonary blood flow during this transition: ventilation of the lung, increased O₂ tension, and hemodynamic forces (such as increased shear stress).²⁴ PPHN results from the failure of the pulmonary circulation to dilate at birth. This syndrome is characterized by sustained elevation of PVR, structural changes in the pulmonary vascular bed, and abnormal pulmonary vasoreactivity, which causes extrapulmonary right-to-left shunting across the ductus arteriosus and foramen ovale and severe hypoxemia.^{9,25} We speculate that prenatal exposure to cigarette smoke may increase the risk of PPHN through an increase in pulmonary vascular tone and impaired pulmonary vascular reactivity to vasodilatory stimuli.

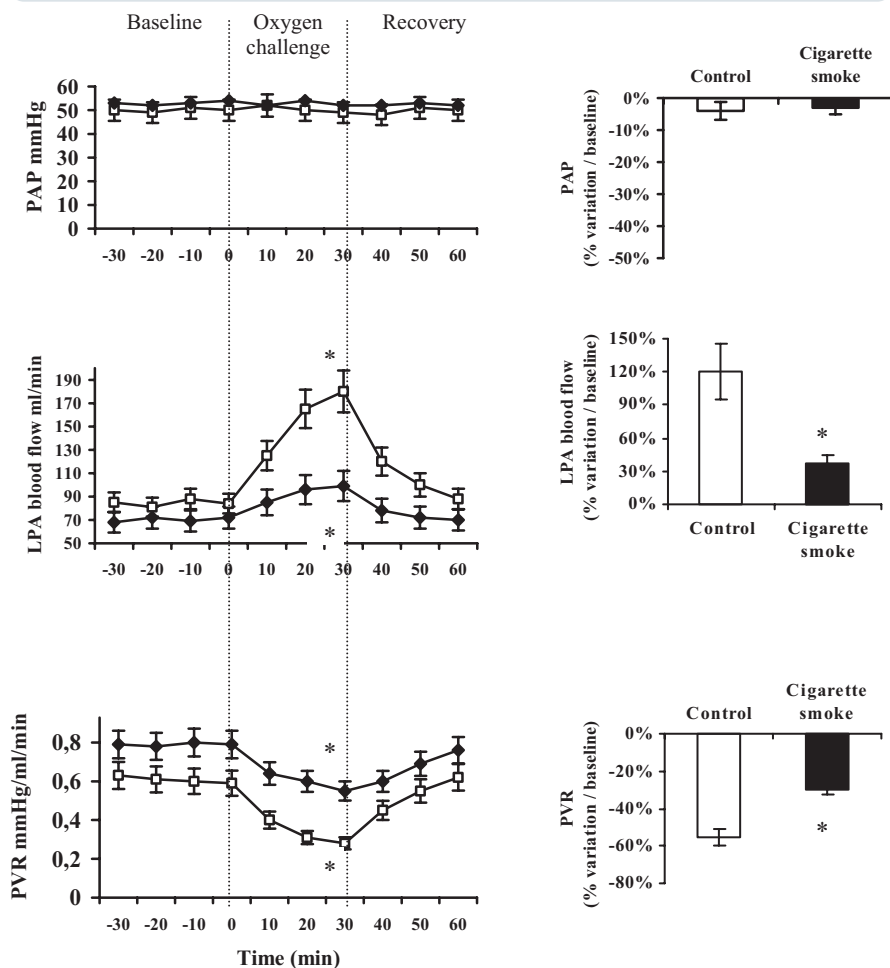
The mechanisms by which prenatal exposure to cigarette smoke alters the pulmonary circulation of the fetus are, for the moment, uncertain. In our study, smoke inhalation caused a dramatic decrease in fetal PaO₂ and SaO₂ levels. This observation is in accordance with previous studies that demonstrated a decrease in fetal O₂ tension that lasted for 30 minutes in rhesus monkeys during exposure to maternal smoking.²⁶ As in our study, fetal hypoxemia persisted at least 30 minutes after discontinuation of exposure to smoke. Fetal hypoxemia is not caused by maternal hypoxemia, because maternal PaO₂ levels did not change during smoke inhalation. Cigarette smoke contains >1000 chemical compounds that include nicotine, cadmium, oxidative agents, acrolein, and phenolic hydrocarbons.²⁷ Many of these compounds have the potential to alter uteroplacental perfusion or fetoplacental exchange. However, it is likely that smoke-associated CO inhalation contributes, at least in part, to fetal hypoxemia. Despite unchanged maternal PaO₂ levels, the ewes' SaO₂, which was measured by cooxymetry, decreased during cigarette smoke inhalation. A decrease in SaO₂ was associated with an elevation in carboxyhemoglobin level. Furthermore, CO augments the affinity of hemoglobin for O₂ by decreasing its ability to release O₂.²⁸

Both the decrease in arterial O₂ content and the altered oxyhemoglobin saturation curves have been involved in the

decrease in fetal PaO₂ and SaO₂ levels during CO inhalation.²⁸ In a previous study in pregnant ewes, levels of CO inhalation-induced carboxyhemoglobin of approximately 6% have been associated with a decrease in fetal PaO₂ of approximately 7 mm Hg, which is in agreement with our results.²⁸ Inhaled CO has no direct effect on the pulmonary circulation in the fetus.²⁹ Basal pulmonary vascular tone in the perinatal lung is largely dependent on O₂ tension. Decrease in PaO₂ level lowers pulmonary blood flow and elevates PVR.^{24,30} Furthermore, chronic in utero hypoxia has been associated with vascular remodeling and altered vasoreactivity in the fetal lung.^{31,32} Taken together, these data support the hypothesis that maternal smoking-induced vasoconstriction in the fetal lung may result, at least in part, from a CO inhalation-mediated drop in fetal O₂ tension.

Alternatively, other mechanisms may explain our results: (1) Tobacco smoke was found to cause endothelial dysfunction that contributed to pulmonary vasoconstriction and smooth muscle cells proliferation.^{10,11} Cigarette smoke extracts alter endothelium-dependent relaxation of isolated pulmonary arteries of chicken embryo and of vascular smooth muscle cells of the neonatal porcine lung.^{13,33} Endothelial dysfunction is caused in part by impaired vascular endothelial growth factor that signals through oxidative/nitrosative stress.³⁴ Endothelial function plays a major role in the regula-

FIGURE 2
Effects of maternal exposure to environmental cigarette smoke on the pulmonary vascular response to increased O₂ tension



Panel A

Panel B

A, Change in mean pulmonary artery pressure (PAP), left pulmonary artery (LPA) blood flow, and pulmonary vascular resistance (PVR) during O₂ challenge in control fetal lambs (open bar; control) and in fetal lambs that were exposed first to in utero tobacco smoke for 2 hours (closed bar; cigarette smoke). Smoke inhalation was discontinued just before O₂ challenge. PAP did not change during the study period. LPA blood flow increased, and PVR decreased during the study period in both groups. The asterisk denotes a probability value of < .05; analysis of variance was used for repeated measures. **B**, Changes in PAP, LPA blood flow, and PVR are expressed as percentage of change, compared with baseline. The percentages of changes in LPA and in PVR were higher in the control group than in the cigarette smoke group. The asterisk denotes a probability value of < .05.

Houfflin-Debarge. Tobacco smoke and pulmonary circulation. *Am J Obstet Gynecol* 2011.

tion of the vascular tone and reactivity in the perinatal lung.^{24,25,35} Thus, maternal exposure to tobacco smoke may elevate PVR and impair vasoreactivity in the fetal lung through smoke compound-induced endothelial dysfunction. Further experiments, which would include the pulmo-

nary vascular responses to acetylcholine or to sildenafil (respectively, endothelium-dependent vasodilator or not), would be required to test this hypothesis. (2) In utero tobacco smoke exposure may have induced a fetal stress that in turn could have elevated pulmonary vas-

cular tone as previously reported.³⁶ However, lack of change in fetal heart rate and AoP during smoke inhalation does not support this hypothesis.

In conclusion, prenatal exposure to cigarette smoke may cause a potent and sustained pulmonary vasoconstriction in the fetus and may impair the vasodilator response to increase in O₂ tension. These effects are associated with a marked decrease in fetal oxygenation. The concentration of cigarette smoke that was used in this study mimics environmental tobacco smoke to which pregnant women potentially may be exposed. The postnatal circulatory adaptation is highly dependent on the decrease in PVR and on the vasodilator response to birth-related stimuli, such as O₂. We speculate that prenatal exposure to tobacco smoke may increase the risk of PPHN through failure of the pulmonary circulation to dilate at birth. ■

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Michel Pottier and Arnold Dive (Hospitalo-Academic Department of Experimental Research, School of Medicine, University Lille-Nord de France) for their technical assistance and Michel Delcroix for the advice in preparing the protocol.

REFERENCES

1. Rogers JM. Tobacco and pregnancy. *Reprod Toxicol* 2009;28:152-60.
2. Schoendorf KC, Kiely JL. Relationship of sudden infant death syndrome to maternal smoking during and after pregnancy. *Pediatrics* 1992;90:905-8.
3. American Academy of Pediatrics Committee on Environmental Health. Environmental tobacco smoke: a hazard to children. *Pediatrics* 1997;99:639-42.
4. Gilliland FD, Li YF, Peters JM. Effects of maternal smoking during pregnancy and environmental tobacco smoke on asthma and wheezing in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:429-36.
5. Elliot JG, Carroll NG, James AL, Robinson PJ. Airway alveolar attachment points and exposure to cigarette smoke in utero. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:45-9.
6. Stick SM, Burton PR, Gurrin L, Sly PD, LeSouëf PN. Effects of maternal smoking during pregnancy and a family history of asthma on respiratory function in newborn infants. *Lancet* 1996;348:1060-4.
7. Bearer C, Emerson RK, O'Riordan M, Roitman E, Shackleton C. Maternal tobacco smoke exposure and persistent pulmonary hyperten-

- sion of the newborn. *Environ Health Perspect* 1997;105:202-6.
- 8.** Muraskas JK, Juretschke LJ, Weiss MG, Bholra M, Besinger RE. Neonatal-perinatal risk factors for the development of persistent pulmonary hypertension of the newborn in preterm newborns. *Am J Perinatol* 2001;18:87-91.
- 9.** Kinsella JP, Abman SH. Recent developments in the pathophysiology and treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *J Pediatr* 1995;126:853-64.
- 10.** Wright JL, Churg A. Short-term exposure to cigarette smoke induces endothelial dysfunction in small intrapulmonary arteries: analysis using guinea pig precision cut lung slices. *J Appl Physiol* 2008;104:1462-9.
- 11.** Peluffo G, Calcerrada P, Piacenza L, Pizzano N, Radi R. Superoxide-mediated inactivation of nitric oxide and peroxynitrite formation by tobacco smoke in vascular endothelium: studies in cultured cells and smokers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;296:H1781-92.
- 12.** Wright JL, Levy RD, Churg A. Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease: current theories of pathogenesis and their implications for treatment. *Thorax* 2005;60:605-9.
- 13.** Carlo WF, Villamor E, Ambalavanan N, DeMey JG, Blanco CE. Chronic exposure to cigarette smoke extract impairs endothelium-dependent relaxation of chicken embryo pulmonary arteries. *Biol Neonate* 2001;80:247-50.
- 14.** Deruelle P, Houfflin-Debarge V, Magnenant E, et al. Effects of antenatal glucocorticoids on pulmonary vascular reactivity in the ovine fetus. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:208-15.
- 15.** Jaillard S, Houfflin-Debarge V, Riou Y, et al. Effects of catecholamines on the pulmonary circulation in the ovine fetus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;281:R607-14.
- 16.** Alcorn D, Adamson T, Maloney J, Robinson P. A morphologic and morphometric analysis of fetal lung development in the sheep. *Anat Rec* 1981;201:655-67.
- 17.** Wan-Kuen J, Jung-Wook O, Jong-In D. Evaluation of exposure to carbon monoxide associated with passive smoking. *Environ Res* 2004;94:309-18.
- 18.** Sebben J, Pimm P, Shephard RJ. Cigarette smoke in enclosed public facilities. *Arch Environ Health* 1977;32:53-8.
- 19.** Goniewicz MŁ, Czogala J, Kośmider L, Koszowski B, Zielińska-Danch W, Sobczak A. Exposure to carbon monoxide from second-hand tobacco smoke in Polish pubs. *Cent Eur J Public Health* 2009;17:220-2.
- 20.** Seppänen A. Smoking in closed space and its effect on carboxyhaemoglobin saturation of smoking and nonsmoking subjects. *Ann Clin Res* 1977;9:281-3.
- 21.** Fromme H, Dietrich S, Heitmann D, et al. Indoor air contamination during a waterpipe (narghile) smoking session. *Food Chem Toxicol* 2009;47:1636-41.
- 22.** Giannini D, Leone A, Di Bisceglie D, et al. The effects of acute passive smoke exposure on endothelium-dependent brachial artery dilation in healthy individuals. *Angiology* 2007;58:211-7.
- 23.** Hayde M, Bernaschek G, Stevenson DK, Knight GJ, Haddow JE, Widness JA. Antepartum fetal and maternal carboxyhemoglobin and cotinine levels among cigarette smokers. *Acta Paediatr* 1999;88:327-31.
- 24.** Cornfield DN, Chatfield BA, McQueston JA, McMurtry IF, Abman S. Effects of birth-related stimuli on L-arginine-dependent pulmonary vasodilation in ovine fetus. *Am J Physiol* 1992;262:H1474-81.
- 25.** Storme L, Rairigh RL, Parker TA, Kinsella JP, Abman SH. Acute pulmonary hypertension in utero impairs endothelium-dependent vasodilation. *Pediatr Res* 1999;45:575-81.
- 26.** Socol ML, Manning FA, Murata Y, Druzin ML. Maternal smoking causes fetal hypoxia: experimental evidence. *Am J Obstet Gynecol* 1982;142:214-8.
- 27.** Huber GL, First ME, Grubner O. Marijuana and tobacco smoke gas-phase cytotoxins. *Pharmacol Biochem Behav* 1991;40:629-36.
- 28.** Longo LD. The biological effects of CO on the pregnant woman, fetus, and newborn infant. *Am J Obstet Gynecol* 1977;129:69-103.
- 29.** Grover TR, Rairigh RL, Zenge JP, Abman SH, Kinsella JP. Inhaled carbon monoxide does not cause pulmonary vasodilation in the late-gestation fetal lamb. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;278:L779-84.
- 30.** Herrera EA, Pulgar VM, Riquelme RA, et al. High-altitude chronic hypoxia during gestation and after birth modifies cardiovascular responses in newborn sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;292:R2234-40.
- 31.** Xue Q, Ducsay CA, Longo LD, Zhang L. Effect of long-term high-altitude hypoxia on fetal pulmonary vascular contractility. *J Appl Physiol* 2008;104:1786-92.
- 32.** Bixby CE, Ibe BO, Abdallah MF, et al. Role of platelet-activating factor in pulmonary vascular remodeling associated with chronic high altitude hypoxia in ovine fetal lambs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;293:L1475-82.
- 33.** Ambalavanan N, Carlo WF, Bulger A, Shi J, Philips JB. Effect of cigarette smoke extract on neonatal porcine vascular smooth muscle cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001;170:130-6.
- 34.** Edirisinghe I, Arunachalam G, Wong C, et al. Cigarette-smoke-induced oxidative/nitrosative stress impairs VEGF- and fluid-shear-stress-mediated signaling in endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* 2010;12:1355-69.
- 35.** Storme L, Rairigh RL, Parker TA, Kinsella JP, Abman SH. In vivo evidence for a myogenic response in the fetal pulmonary circulation. *Pediatr Res* 1999;45:1-7.
- 36.** Houfflin-Debarge V, Delelis A, Jaillard S, et al. Effects of nociceptive stimuli on the pulmonary circulation in the ovine fetus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R547-53.