



HAL
open science

Nouvelles approches thérapeutiques de la pathologie pulmonaire par les suppléments alimentaires en période périnatale

Dyuti Sharma

► **To cite this version:**

Dyuti Sharma. Nouvelles approches thérapeutiques de la pathologie pulmonaire par les suppléments alimentaires en période périnatale. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2015. Français. NNT : 2015LIL2S066 . tel-01490802

HAL Id: tel-01490802

<https://theses.hal.science/tel-01490802>

Submitted on 16 Mar 2017

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 LILLE II

**NOUVELLES APPROCHES THERAPEUTIQUES DE LA PATHOLOGIE
PULMONAIRE PAR LES SUPPLEMENTS ALIMENTAIRES EN PERIODE
PERINATALE**

Dyuti SHARMA

Chef de Clinique Assistant Hospitalo-Universitaire

Faculté de médecine Lille 2

CHRU Lille

Soutenue le 21 Décembre 2015

Mme. Le Professeur Véronique Houfflin-Debargé (Lille II)

M. Le Professeur Pascal De Lagausie (Marseille)

M. Le Professeur Pierre Tourneux (Amiens)

M. Le Professeur Arnaud Bonnard (Paris VII)

M. Le Professeur Rémi Besson (Lille II)

REMERCIEMENTS

RESUME

La dysplasie broncho-pulmonaire (DBP), complication fréquente de la prématurité, atteint 30% des nouveau-nés de faible poids de naissance. L'hypertension artérielle pulmonaire persistante du nouveau-né (HTAPP), associée ou non à la DBP, résulte d'une mauvaise adaptation à la vie extra-utérine et survient dans diverses situations pathologiques (prématurité, sepsis, inhalation de méconium, hernie diaphragmatique congénitale...). Ces 2 pathologies sont grevées d'une morbidité et d'une mortalité importante en période périnatale. En effet, certaines situations d'HTAPP ou de DBP sévères restent réfractaires aux thérapeutiques actuelles.

Les acides gras polyinsaturés oméga 3 (AGPI ω -3) sont des nutriments aux propriétés bénéfiques sur le système circulatoire et pulmonaire, mais également sur le développement fœtal, démontrés par de nombreuses études expérimentales et cliniques. La déhydroépiandrostérone (DHEA) est une hormone stéroïdienne dont le taux de sécrétion chez l'homme diminue avec l'âge. Des études récentes ont démontré un effet cardio-protecteur mais également un effet vasodilatateur pulmonaire et préventif de lésions de DBP dans des modèles expérimentaux.

Les buts de notre travail étaient 1) d'étudier l'effet d'une supplémentation maternelle en AGPI ω -3 dans un modèle expérimental de DBP induite par hyperoxie chez le raton, 2) d'étudier l'effet circulatoire d'une injection d'AGPI ω -3 (in vivo) dans un modèle d'étude de la circulation pulmonaire chez le fœtus de brebis chroniquement instrumenté, et d'étudier les mécanismes d'action AGPI ω -3 (anneaux vasculaires isolés), enfin 3) d'étudier l'effet circulatoire de la DHEA (in vivo) dans le modèle de fœtus de brebis et d'étudier les mécanismes d'actions de la DHEA sur la circulation pulmonaire fœtale (in vivo).

Nous avons démontré que la supplémentation par voie orale en AGPI ω -3 de rates gestantes à la fin de la gestation et après la naissance permettait de prévenir, chez les ratons nouveau-nés, les lésions de DBP induites par une exposition chronique à l'hyperoxie. Ces lésions étaient retrouvées dans les groupes contrôles (eau et AGPI ω -

6). Cette étude n'avait pas retrouvée d'effet bénéfique des AGPI ω -3 sur le remodelage vasculaire induit.

L'injection d'acide eicosapentaénoïque (EPA) chez le fœtus de brebis a révélé un effet vasodilatateur pulmonaire puissant avec une baisse significative et prolongée des résistances vasculaires pulmonaires (RVP), en comparaison à l'injection d'acide docosahexaénoïque (DHA) ou de l'excipient (faible dose d'éthanol). L'effet vasorelaxant de l'EPA sur des anneaux isolés pré-contractés était plus important que celui du DHA à dose équivalente, et il était dose- et endothélium-dépendent. Enfin, cet effet impliquait la voie de production du NO puisqu'il était diminué lors du traitement des anneaux par le L-Nitro-Arginine (LNA), inhibant la NO synthase.

L'étude de perfusion en bolus de DHEA dans le lit pulmonaire vasculaire chez le fœtus de brebis instrumenté mettait en évidence un effet vasodilatateur bref. Cet effet était dose-dépendant avec une baisse plus prononcée des RVP et une durée plus importante pour des doses de DHEA plus importantes. Enfin l'étude des mécanismes d'action retrouvait une inhibition de l'effet de la DHEA par le LNA, démontrant une action vasodilatatrice par activation de production du NO.

L'ensemble de ces travaux permet de suggérer que les AGPI ω -3 représentent des nutriments intéressants en période périnatale (grossesse, allaitement et per os), notamment en traitement préventif dans les situations à risque de DBP, ou curatif en cas d'HTAPP. La production endogène de DHEA est augmentée par l'activité physique et diminuée en cas d'apport nutritionnel excessif. Un excès de prise de poids pendant la grossesse est associé à une augmentation de risque d'HTAP. La promotion de l'activité physique pendant la grossesse associée à un contrôle des apports caloriques pourraient permettre d'augmenter la production de DHEA et de réduire les risques de maladaptation cardiorespiratoire à la naissance.

ABSTRACT

Bronchopulmonary dysplasia (BPD), a common complication of prematurity, reached in 30% of newborns with very low birth weight. The persistent pulmonary hypertension of the newborn (PPHN), with or without BPD, result of poor adaptation to extrauterine life and occurs in various pathological situations (prematurity, sepsis, inhaled meconium, congenital diaphragmatic hernia ...). These two diseases are burdened with high morbidity and high mortality in the perinatal period. Indeed, some of severe PPH or BPD situations remain refractory to current treatment.

Polyunsaturated fatty acids omega-3 (ω -3 PUFA) are nutrients with beneficial properties on the circulatory and pulmonary system, but also on fetal development, demonstrated by many experimental and clinical studies. Dehydroepiandrosterone (DHEA) is a steroid hormone whose secretion levels in humans decreases with age. Recent studies have demonstrated a cardio-protective effect but also a pulmonary vasodilator and preventive effect of DBP injury in experimental models.

The aims of our study were 1) to study the effect of maternal PUFA ω -3 supplementation in an experimental model of hyperoxia-induced DBP in pups, 2) to study effect on pulmonary circulation of infusion of ω -3 PUFAs (in vivo) in model of chronically instrumented fetal sheep, and to analyze the mechanisms of action of ω -3 PUFA (isolated vascular rings), and finally 3) to study the effect of DHEA (in vivo) in fetal pulmonary circulation in the same model of sheep fetus and to understand the mechanisms of action of DHEA (in vivo).

We have demonstrated that diet supplementation with PUFA ω -3 on pregnant rats at the end of gestation and after birth prevents the DBP injuries induced by chronic exposure to hyperoxia. These lesions were found in the control groups (water and ω -6 PUFA). This study had not found a beneficial effect of ω -3 PUFA supplementation on the induced vascular remodeling.

Infusion of eicosapentaenoic acid (EPA) in the sheep fetus revealed a potent pulmonary vasodilator with a significant and prolonged decrease of pulmonary

vascular resistance (PVR), as compared to docosahexaenoic acid (DHA) or excipient (low dose of ethanol) infusion. Vasorelaxant effect of EPA on pre-contracted isolated rings was higher than DHA at equivalent dose, and was dose- and endothelium-dependent.

Bolus IV DHEA in the pulmonary vascular bed highlighted an acute vasodilator response in instrumented fetal sheep. This effect is dose-dependent. Mechanisms of action involve NO production as LNA abolished the effect of DHEA.

Taken together, these results suggest that ω -3 PUFAs are valuable nutrients in the perinatal period (pregnancy, breastfeeding and oral), particularly for preventive treatment of situations at risk for BPD, or PPHN. DHEA production is increased by physical activity. Promotion of physical activity during pregnancy could elevate DHEA synthesis and reduce the risk for PPHN.

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

❖ Articles Originaux

- Dyuti Sharma, Armande Subayi Nkempi, Estelle Aubry, Ali Houeijeh, Laura Butruille, Véronique Houfflin-Debargé, Rémi Besson, Philippe Deruelle and Laurent Storme. *Maternal PUFA ω -3 Supplementation Prevents Neonatal Lung Injuries Induced by Hyperoxia in Newborn Rats*. Int. J. Mol. Sci. **2015**, 16, 22081-22093

- Dyuti Sharma, Estelle Aubry, Thavarak Ouk, Ali Houeijeh, Véronique Houfflin-Debargé, Rémi Besson, Philippe Deruelle, Laurent Storme. *Effects of Eicosapentanoic Acid (EPA) and Docosahexanoic Acid (DHA) on fetal pulmonary circulation: an experimental study in fetal lambs*. Soumis à American Journal of Obstetrics and Gynecology

- Dyuti Sharma, Hélène Coridon, Estelle Aubry, Ali Houeijeh, Véronique Houfflin-Debargé, Rémi Besson, Philippe Deruelle, Laurent Storme. *Effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on fetal pulmonary circulation: an experimental study in fetal lambs*. Soumis prochainement

❖ Communications Orales et Affichées

- Dyuti Sharma, Estelle Aubry, Thavarak Ouk, Ali Houeijeh, Véronique Houfflin-Debargé, Rémi Besson, Philippe Deruelle, Laurent Storme. *Effects of eicosapentanoic acid (EPA) and docosahexanoic acid (DHA) on fetal lamb pulmonary circulation*, (communications orales) au 12^{ème} Congrès de l'EUPSA (European Union of Pediatric Surgery Association) à Barcelone (15 au 18 juin 2011), au 47^{ème} Congrès de l'ESSR (European Society of Surgical Research) à Lille (06 au 09 juin 2012), aux 40^{èmes} Journées Nationales de la SFMP (Société Française de Médecine Périnatale) à Deauville (20-22 Octobre 2010), aux JFRN (Journées

Francophones de Recherche en Néonatalogie) à Paris (16-17 Décembre 2010), au 68^{ème} Congrès de la SFCP (Société Française de Chirurgie Pédiatrique) à Nancy (8 -10 juin 2011) et au 113^{ème} Congrès de l'AFC (Association Française de Chirurgie) à Paris (05-07 Octobre 2011) ; (communication affichée) à la 14^{ème} Journée André Verbert, Ecole Doctorale de Lille (11/09/2014)

- Armande Subayi Nkempi, Estelle Aubry, Laura Butruille, Ali Houeijeh, Dyuti Sharma, Philippe Deruelle, Véronique Houfflin-Debarge, Rémi Besson, Laurent Storme. *Omega 3 fatty acids supplementation during pregnancy can improve lung development in newborns rats exposed to hyperoxia*, (communications orales) au 15^{ème} congrès de l'EUPSA à Dublin (15-18 juin 2014), aux 43^{èmes} Journées Nationales de la SFMP à Monaco (14-15 Novembre 2013) et aux JFRN (16-17 Décembre 2013 à Paris)

ABBREVIATIONS

ACh : acetylcholine

AGPI ω -3 / ω -6 : acides gras polyinsaturés ω -3/ ω -6

ALA : acide α -linoléique

AP : artère pulmonaire commune

APG : artère pulmonaire gauche

BKCa : canal potassique calcium-sensible à forte conductance (B pour *big*)

CF : *correcting factor*

CML : cellule musculaire lisse

CRF : capacité résiduelle fonctionnelle

DBP : dysplasie broncho-pulmonaire

DDSV : Direction Départementale des Services Vétérinaires

DHA : acide docosahexaénoïque

DHEA : déhydroépiandrostérone

DHEA-S : déhydroépiandrostérone-sulfate

ECMO : oxygénation par membrane extra-corporelle

EETs : acides époxy-eicosatétraénoïques

eNOS : NO synthase endothéliale

EPA : acide eicosapentaénoïque

ESM : erreur standard à la moyenne

FC : fréquence cardiaque

FiO₂ : fraction d'oxygène inspirée

GDS : gaz du sang

GMPc : guanosine monophosphate cyclique

HTAPP : hypertension artérielle pulmonaire persistante

HETEs : acides hydroxy-eicosatétraénoïques

5HT : sérotonine

IKCa : canal potassique calcium-sensible à conductance intermédiaire (I)

IL -6/-8/-11 : *interleukine-6/-8/-11*

JNK: c-Jun NH₂-terminal kinases

KCa : canal potassique calcium sensible

LNA: l-nitro-arginine

MAG-DPA: acide mono-acylglycérade docosapentaénoïque

MAPK: *mitogen-activated protein kinase*

NF-kB: *nuclear factor kappa B*

NO: monoxyde d'azote (*nitric oxide*)

PAF : paraformaldéhyde

PAo : pression aortique

PAP : pression artérielle pulmonaire

pCO₂ : pression partielle en dioxyde de carbone

PIA : pression intra-amniotique

p38 : protéine 38 MAPK

pO₂ : pression partielle en oxygène

POG : pression de l'oreillette gauche

Q_m : débit mesuré de l'artère pulmonaire gauche

Q_c : débit corrigé de l'artère pulmonaire gauche

ROCK : Rho Kinase

ROS : espèces réactives oxygénées (*reactive oxygen species*)

RVP : résistances vasculaires pulmonaires

SA : semaines d'aménorrhée

SDRA : syndrome de détresse respiratoire aigu

SKCa : canal potassique calcium-sensible à conductance faible (S pour *small*)

SNP : Nitroprussiate de sodium (*sodium nitroprusside*)

TGF-β: *transforming growth factor-β*

TNF-α: *tumor necrosis factor-α*

VEGF: *vascular endothelial growth factor*

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.....	14
CHAPITRE 1 : PATHOLOGIE PULMONAIRE EN PERIODE NEONATALE.....	16
I. Mécanismes physiopathologiques impliqués dans la dysplasie broncho-pulmonaire et l’hypertension artérielle pulmonaire persistante	16
A. Définition et approche physiopathologique de la Dysplasie Broncho-Pulmonaire (DBP).....	16
B. Hypertension artérielle pulmonaire (HTAPP) et régulation du tonus vasculaire	17
II. Principaux mécanismes d’actions des Acides Gras Poly Insaturés de type ω -3 (AGPI ω -3) et de la DéHydroEpiAndrosterone (DHEA) sur le tonus vasculaire et l’inflammation.....	19
A. Mécanismes d’action des AGPI ω -3	19
B. Mécanismes d’action de la déhydroépiandrostérone (DHEA).....	22
CHAPITRE 2 : BUTS DE L’ETUDE ET MODELES EXPERIMENTAUX.....	24
I. Objectifs de la thèse	24
A. Buts de ce Travail.....	24
B. Questions étudiées.....	24
II. Modèle expérimental de dysplasie bronchopulmonaire (BDP) induite par l’hyperoxie chez le raton.....	24
A. Effets de l’hyperoxie et modèle de DBP.....	24
B. Mise en place du modèle de DBP induite par l’hyperoxie chez le raton.....	25
III. Modèle expérimental d’étude de la circulation pulmonaire chez le fœtus de brebis.....	27
A. Protocole d’étude <i>In Vivo</i>	27
1/ Protocole chirurgical.....	27
2/ Protocole d’expérimentation <i>in vivo</i>	30
B. Protocole d’étude <i>In Vitro</i>	32
1/ Prélèvement des anneaux vasculaires pulmonaires.....	32
2/ Expérimentations sur le tensiomètre.....	32

CHAPITRE 3 : RESULTATS	34
I. Etude de la supplémentation maternelle en Acides Gras Poly-Insaturés ω -3 (AGPI ω -3) sur les lésions de DBP chez le raton.....	34
A. Introduction	34
B. Matériels et méthodes	35
1/ Modèle expérimental.....	35
2/ Protocoles.....	36
3/ Statistiques.....	36
C. Résultats	37
<i>Article n°1: “Maternal PUFA ω-3 Supplementation Prevents Neonatal Lung Injuries Induced by Hyperoxia in Newborn Rats”</i>	
D. Discussion	38
II. Etude de l’effet de l’Acide Eicosapentaénoïque (EPA) et de l’Acide Docosahexaénoïque (DHA) sur la circulation pulmonaire fœtale	40
A. Introduction	40
B. Matériels et méthodes	41
1/ Modèle expérimental.....	41
2/ Protocoles.....	41
3/ Statistiques.....	41
C. Résultats	42
<i>Article n°2: “Effects of Eicosapentaenoic Acid (EPA) and Docosahexaenoic Acid (DHA) on fetal pulmonary circulation: an experimental study in fetal lambs”</i>	
D. Discussion	67
III. Etude de l’effet de la déhydroépiandrosterone (DHEA) sur la circulation pulmonaire fœtale chez le fœtus de brebis.....	70
A. Introduction	70
B. Matériels et méthodes	71
1/ Modèle expérimental.....	71
2/ Protocoles.....	71
3/ Statistiques.....	72
C. Résultats	72
<i>Article n°3: “Effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on fetal pulmonary circulation: an experimental study in fetal lambs”</i>	
D. Discussion	93
CHAPITRE 4 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES	96
ANNEXE	101
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	112
LISTE DES FIGURES	120

INTRODUCTION

Les pathologies pulmonaires de la période néonatale sont responsables d'une morbidité et d'une mortalité importantes. De nombreuses pathologies en cause (maladie des membranes hyalines, hypertension artérielle pulmonaire persistante, retard de résorption du liquide pulmonaire...) ont en commun d'être associées à un échec de l'adaptation cardio-respiratoire à la naissance.

L'adaptation cardio-respiratoire à la naissance nécessite la mise en œuvre simultanée de 2 phénomènes :

- la genèse d'une capacité résiduelle fonctionnelle par résorption du liquide pulmonaire (mettant en jeu des canaux sodés spécifiques (canal ENaC) ainsi que l'activation d'une pompe Na/K ATPase) et par sécrétion de surfactant à la surface alvéolaire ;
- l'augmentation du débit sanguin pulmonaire par vasodilatation des vaisseaux pulmonaires, nécessitant une intégrité de la fonction endothéliale ainsi que la libération de médiateurs vasodilatateurs en réponses à divers stimulus (O_2 , shear-stress, ventilation alvéolaire) pour obtenir la relaxation des cellules musculaires lisses des vaisseaux pulmonaires.

Les séquelles pulmonaires sont l'une des complications les plus fréquentes de ces pathologies périnatales, s'exprimant sous la forme d'une insuffisance respiratoire chronique appelée dysplasie broncho-pulmonaire (DBP) et pouvant être associée à une hypertension artérielle pulmonaire persistante (HTAPP). Cette DBP est présente chez 30 % des enfants nés avec un faible poids de naissances [1] et des séquelles respiratoires sont retrouvées chez presque la moitié des enfants de poids de naissance inférieur à 1000g [2]. Par leur retentissement sur l'état général chez l'enfant prématuré et par leur incidence élevée et leur chronicité, les séquelles pulmonaires liées à une pathologie périnatale représentent un réel problème de santé publique.

La prise en charge de l'HTAPP et de la DBP nécessite une bonne connaissance des mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'adaptation à la vie extra-utérine,

la régulation des résistances vasculaires pulmonaires (RVP) et ceux plus récemment incriminés dans le développement de lésions de DBP.

Les acides gras polyinsaturés ω -3 (AGPI ω -3) et la déhydroépiandrostérone sont des suppléments alimentaires dont les effets bénéfiques sur les systèmes cardio-circulatoires et pulmonaires ont été étudiés par de nombreux travaux.

Les buts de ce travail étaient :

1/ de poursuivre les travaux sur les effets des AGPI ω -3 sur la circulation pulmonaire fœtale et dans un modèle pathologique expérimental de DBP ; d'étudier l'effet de la DHEA sur la circulation pulmonaire fœtale

2/ de s'approprier de nouvelles techniques ou modèles expérimentaux dans le laboratoire pour la poursuite des travaux dans le domaine de la recherche périnatale

Le 1^{er} chapitre expose les mécanismes physiopathologiques responsables du développement de la DBP et de l'HTAPP en ciblant certaines voies d'action impliqués dans les effets des AGPI ω -3 ou de la DHEA sur le tonus vasculaire et l'inflammation.

Le chapitre II décrit le but de l'étude, les questions posées et expose les modèles expérimentaux utilisés.

Le chapitre III présente les résultats des 3 questions posées sous la forme de 3 articles rédigés en anglais, avec introduction et discussion rédigées en français.

Le dernier chapitre conclut le travail par une synthèse des résultats et énonce les perspectives.

CHAPITRE 1: PATHOLOGIE PULMONAIRE EN PERIODE NEONATALE

I. MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES IMPLIQUES DANS LA DYSPLASIE BRONCHO-PULMONAIRE (DBP) ET L'HYPERTENSION ARTERIELLE PULMONAIRE PERSISTANTE (HTAPP)

A. Définition et approche physiopathologique de la Dysplasie Broncho-Pulmonaire

La dysplasie broncho-pulmonaire (DBP) est caractérisée par une altération ou un arrêt du développement pulmonaire et est définie par une oxygène-dépendance du nouveau-né prématuré pendant au moins 28 jours. Son degré de sévérité est évalué à l'âge de 36 semaines d'aménorrhée (SA) pour les nouveau-nés prématurés avant 32 SA et à 8 semaines de vie pour les nouveau-nés après 32 SA et est fonction de l'importance de la F_{iO_2} ($<30\%$ ou $\geq 30\%$ avec ou sans ventilation en pression positive) [3]. En 20 ans, la prise en charge en néonatalogie s'est améliorée avec l'administration anténatale des corticoïdes, le traitement par surfactant et le développement d'une ventilation moins agressive. Le taux de lésions pulmonaires sévères a diminué, laissant la place à une « nouvelle forme de DBP » se développant chez le nouveau-né prématuré à faible poids de naissance, associant hypoplasie alvéolaire et altération du développement vasculaire pulmonaire. Elle survient chez 30 % des enfants prématurés de poids de naissance inférieur à 1000g et est devenue exceptionnel chez les enfants nés après 30 SA ou avec un poids de naissance de plus de 1200g [3]. Les lésions histologiques diffèrent également avec moins de fibrose parenchymateuse et un meilleur respect des voies aériennes mais aux dépens d'un arrêt de développement pulmonaire avec la présence d'alvéoles plus larges et moins nombreuses, avec une diminution de la septation et une augmentation de l'élasticité du parenchyme pulmonaire [4]. On note également un défaut de développement de la microcirculation pulmonaire.

Plusieurs facteurs contribuent au développement de la DBP et agissent en s'additionnant ou par synergie pour aboutir à la survenue des lésions pulmonaires.

La ventilation mécanique et l'oxygénothérapie à concentrations élevées ou de durée prolongée sont classiquement impliqués dans la survenue de lésions de DBP et les progrès de prise en charge des enfants prématurés ont modifié ces 2 paramètres afin de diminuer les lésions pulmonaires iatrogènes. En effet, le stress oxydatif par la production d'espèces réactives oxygénées (ROS) activent des voies de signalisation telles que JNK (c-Jun NH₂-terminal kinases) ou p38 (membre de la famille des MAPK (mitogen activated protein kinases), protéines activées par les stimuli de stress, aboutissant à la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 8 (IL-8) ou le TGF- β (transforming growth factor) [5].

Plus récemment, il a été démontré que la présence de nombreux polynucléaires neutrophiles dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire chez le nouveau-né prématuré ventilé est corrélée à l'œdème pulmonaire et à une baisse des polynucléaires dans la circulation [6]. D'autres travaux ont révélé l'implication de nombreux facteurs pro-inflammatoires, comme l'IL-8, le TNF- α , le TGF- β , l'IL-6 ou l'IL-11 dans la survenue de troubles de l'alvéolisation [7,8]. Par ailleurs, le VEGF (vascular endothelial growth factor) et son récepteur semblent également jouer un rôle dans la physiopathologie de la DBP puisque leur expression est diminuée dans les poumons dysplasiques dans un modèle de babouins avec extrême prématurité [9], que le taux élevé de VEGF dans le sang de cordon des enfants prématurés était corrélé à un risque diminué de DBP [10] et enfin, que l'administration intra-trachéal du gène du VEGF (médiée par un adénovirus) améliorait la survie, la formation des capillaires pulmonaires avec un développement des alvéoles pulmonaires dans un modèle de DBP induite par hyperoxie chez le rat [11].

B. Hypertension artérielle pulmonaire (HTAPP) et régulation du tonus vasculaire

L'hypertension artérielle pulmonaire persistante du nouveau-né (HTAPP) est un syndrome clinique qui s'associe à différentes affections cardio-pulmonaires : l'asphyxie néonatale, le sepsis, l'inhalation méconiale, la détresse respiratoire néonatale, mais peut également 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 résistances vasculaires pulmonaires (RVP), entraînant un shunt vasculaire droit-gauche extra-pulmonaire à travers le canal artériel et le foramen ovale et une hypoxie sévère.

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 de production du monoxyde d'azote (NO), jouant un rôle essentielle dans la vasodilatation pulmonaire à la naissance, est impliquée dans l'HTAPP. Le NO est produit par la cellule endothéliale en réponse à la stimulation par des substances vasodilatatrices (l'acétylcholine, bradykinine, substance P) ou à une stimulation mécanique. Il en résulte une augmentation du calcium intra-cellulaire et l'activation de l'eNOS (NO synthase endothéliale) produisant le NO.

Le NO représente, avec les prostacyclines, l'un des meilleurs facteurs vasorelaxants dérivés de l'endothélium. Il induit une relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires par activation de la guanylate cyclase, provoquant une augmentation de la concentration de GMPc qui par action de la protéine kinase G va inhiber la pompe Ca-ATPase et provoquer la chute du Ca^{++} dans la CML induisant la relaxation (FIGURE 1) [12].

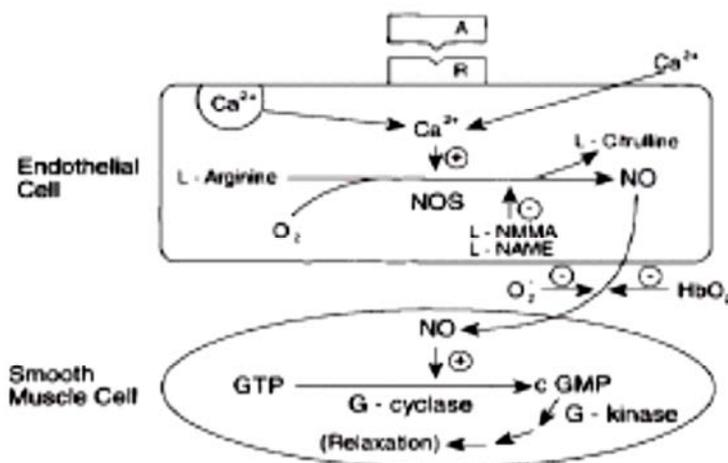


FIGURE 1 : Voie de relaxation de la CML par la production du NO, d'après l'article de Saiag B et al. (2004) *Endothelium, paroi vasculaire et approches thérapeutiques appliquées à la vasomotricité. Angéologie.*,56,3, 31-41, non référencé PubMed

D'autres voies de signalisation comme les canaux potassiques calcium-sensible (KCa) sont impliquées dans la régulation du tonus vasculaire, et contribuent à l'hyperpolarisation et donc à la relaxation de la cellule musculaire lisse (CML) (FIGURE 2 [13]). Cette hyperpolarisation est médiée par les facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium (EDHF) [14] qui provoquent l'ouverture des canaux potassiques calcium-sensible à forte conductance (BKCa) de la CML et la sortie du potassium dans l'espace intercellulaire. L'ouverture des canaux potassiques calcium-sensible à conductance faible (SKCa) et intermédiaire (IKCa) situés sur la cellule endothéliale participe à l'augmentation du Ca^{++} dans la cellule endothéliale et à la production de NO.

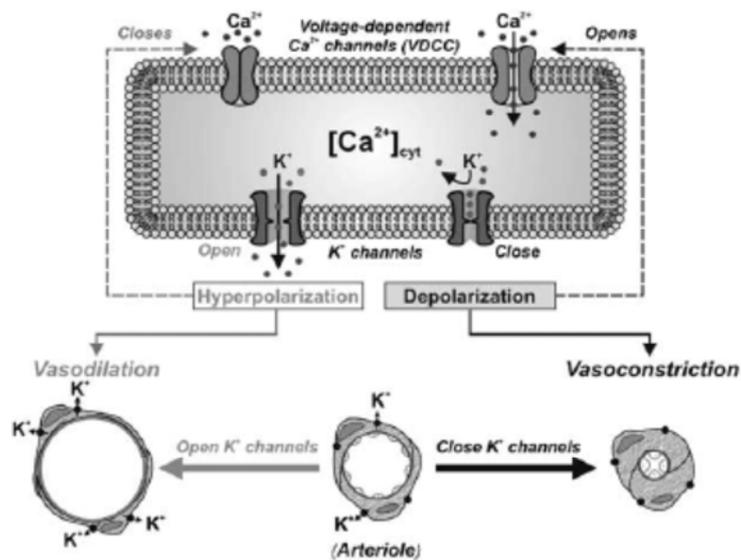


FIGURE 2 [13]: Relaxation de la CML par hyperpolarisation avec ouverture des canaux potassiques calcium-sensible (KCa) et fermeture des canaux calciques voltage dépendants (VOC)

II. PRINCIPAUX MECANISMES D' ACTIONS DES ACIDES GRAS POLY INSATURES DE TYPE ω -3 (AGPI ω -3) ET DE LA DEHYDROEPIANDROSTERONE (DHEA) SUR LE TONUS VASCULAIRE ET L'INFLAMMATION

A. Mécanismes d'action des AGPI ω -3

Le rôle bénéfique des Acides Gras Poly Insaturés de type ω -3 (AGPI ω -3) sur la fonction cardio-respiratoire et la fonction pulmonaire a fait l'objet de nombreux travaux expérimentaux et cliniques. Ils préviennent la survenue de pathologies cardiovasculaires et diminuent la mortalité du SDRA (syndrome de détresse

respiratoire aigu) de l'adulte [15,16]. Les effets bénéfiques des AGPI ω -3 sont liés à 3 de leurs principales propriétés :

- Améliorer la fonction endothéliale, notamment la vasodilatation endothélium-dépendante [17,18]
- Augmenter la clairance des liquides alvéolaires par activation des pompes à sodium [19, 20] et augmentation de l'activité du canal ENaC [21]
- Moduler la synthèse des médiateurs lipidiques, réguler la production des cytokines et l'activation des leucocytes, avec des propriétés anti-inflammatoires [22].

Les mécanismes d'actions des AGPI ω -3 sont complexes, multiples et impliqués dans de nombreuses voies biologiques. Les principaux AGPI ω -3 sont l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA), dérivant de la conversion de l'acide α -linoléniq (ALA) (FIGURE 3 [23]). Leurs effets sont obtenus par action directe ou par l'intermédiaire de leurs métabolites.

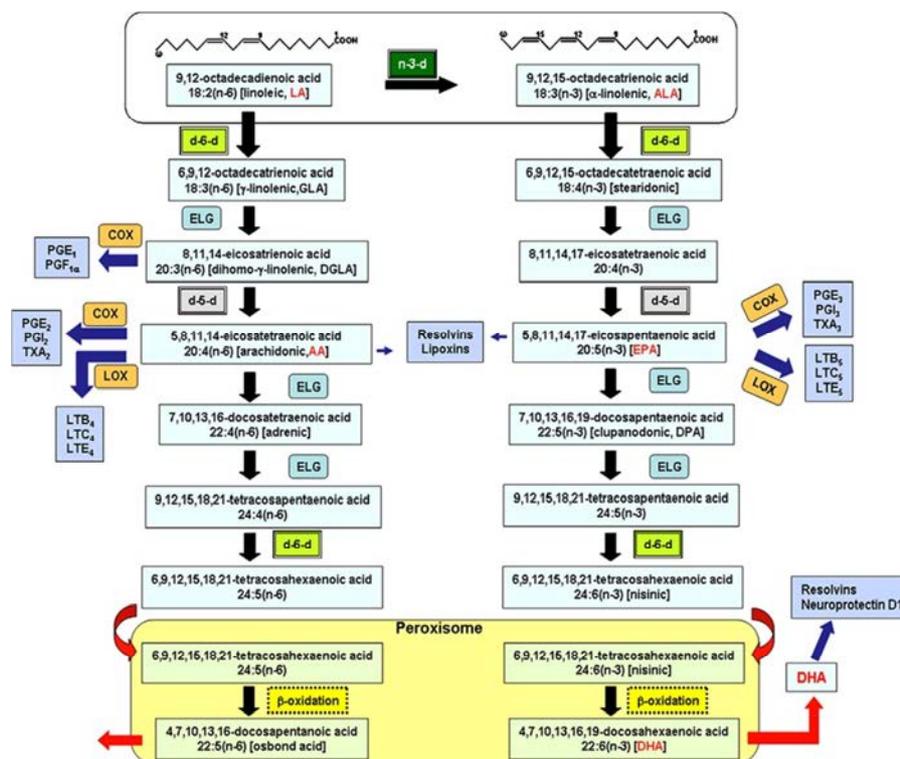


FIGURE 3 [23] : Synthèse et métabolisme des AGPI ω -3

L'EPA et le DHA sont métabolisés par 3 classes enzymatiques (FIGURE 3 [23]) : la voie des cyclo-oxygénases produisant les prostaglandines et les thromboxanes de classe 3 ; la voie des lipo-oxygénases avec transformation en leucotriènes de classes 5, et enfin, la voie des cytochrome P450 mono-oxygénases [24] aboutissant à la production des dérivés époxydes des AGPI ω -3 tels que les acides hydroxy-eicosatétraénoïques (HETEs) [25] et les acides époxy-eicosatétraénoïques (EETs) [26]. Ces dérivés activent les canaux potassiques calcium dépendant et réduisent la sensibilité des myofibrilles au calcium [27].

Les métabolites de l'EPA et du DHA ont des effets vasculaires vasodilatateurs impliquant l'activation des canaux potassiques calcium- et ATP- dépendants soit directement, soit via l'activation de la protéine kinase A [28]. L'époxyde hydrolase humaine transforme ces métabolites (HETE et EET) en dérivés inactifs [29]. Ces données expliquent l'atténuation de l'hypertension pulmonaire induite par la monocrotaline chez le rat, par les inhibiteurs de l'époxyde hydroxylase [30].

Le schéma (FIGURE 4) propose une synthèse des mécanismes d'action de l'EPA et du DHA sur le tonus vasculaire par l'intermédiaire des dérivés époxydes sur les différentes voies de signalisation (canaux potassiques calcium-sensible à conductance faible (SKCa), intermédiaire (IKCa) ou forte (BKCa), la voie de production de NO par l'eNOS).

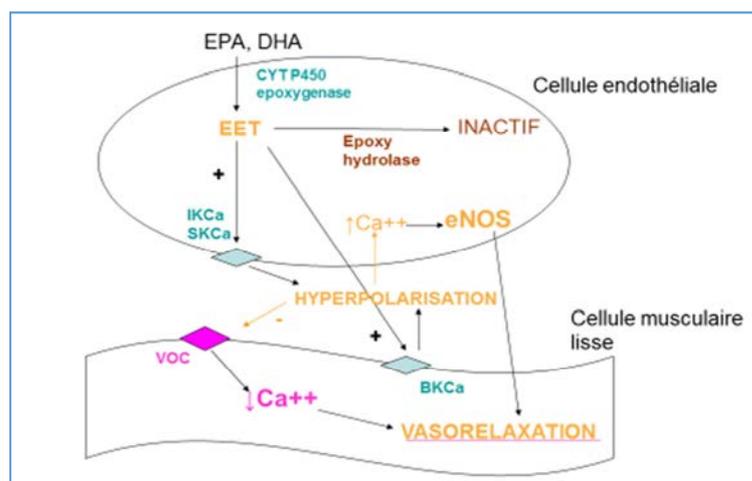


FIGURE 4 : Hypothèses sur les mécanismes d'action de l'EPA et du DHA sur le tonus vasculaire (*eNOS* : NO synthase endothéliale ; *(S,I,B)KCa* : canaux potassiques calcium-sensible à conductance faible (*S*), intermédiaire (*I*) ou forte (*B*) ; *VOC* : canaux calciques voltage-dépendant)

Les études expérimentales sur ces mécanismes d'action et les études 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 capacité résiduelle fonctionnelle (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.

B. Mécanismes d'action de la déhydroépiandrostérone (DHEA)

La déhydroépiandrostérone (DHEA) est une hormone stéroïdienne dont le taux de sécrétion chez l'homme diminue avec l'âge. Des études récentes ont démontré un effet cardio-protecteur mais également un effet vasodilatateur pulmonaire et préventif de lésions de DBP dans des modèles expérimentaux [31-34].

Les données actuelles de la littérature sur les mécanismes d'action de la DHEA sur le tonus vasculaire au niveau de la circulation pulmonaire, schématisés FIGURE 5, permettent d'émettre l'hypothèse que la DHEA agit sur les 2 cellules endothéliale et musculaire lisse via des récepteurs non encore décrits. Il semble que la DHEA augmenterait la production de NO, via l'action sur une protéine G activant l'eNOS, et donc provoquerait une relaxation de la CML par l'augmentation du GMPc. La DHEA favoriserait la diminution du Ca^{++} dans la CML par activation des canaux BKCa et blocage des canaux VOC situés sur la CML [35]. Enfin, la DHEA inhiberait la voie de la ROCK (Rho Kinase) dans la CML, impliquée dans la vasoconstriction et le remodelage vasculaire retrouvé dans l'HTAPP.

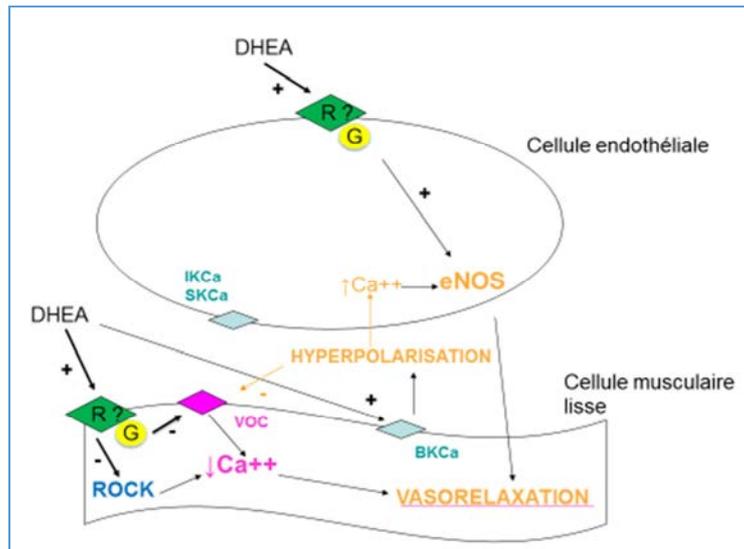


FIGURE 5: Hypothèses sur les mécanismes d'action de la DHEA sur le tonus vasculaire (*R?*: récepteurs à la DHEA endothéliaux ou sur la CML non encore décrits; *G*: protéine *G*; *eNOS*: NO synthase endothéliale; (*S,I,B*)KCa: canaux potassiques calcium-sensible à conductance faible (*S*), intermédiaire (*I*) ou forte (*B*); *VOC*: canaux calciques voltage-dépendant; *ROCK*: Rho Kinase)

CHAPITRE 2: BUTS DE L'ETUDE ET MODELES EXPERIMENTAUX

I. OBJECTIFS DE LA THESE

A. Buts de ce travail

Le but de ce travail est d'étudier les effets de suppléments alimentaires ciblés (AGPI ω -3 et DHEA) sur la prévention ou le traitement de la pathologie pulmonaire en période néonatale avec pour objectifs :

1. de s'approprier de nouveaux modèles ou techniques dans le laboratoire (modèle de DBP et étude sur anneaux vasculaires pulmonaires isolés)
2. d'utiliser ces modèles et celui développé par l'équipe (étude de la circulation pulmonaire fœtale) pour tester les effets des suppléments alimentaires dans le cadre d'une recherche pré-clinique sur la pathologie pulmonaire en période néonatale

B. Questions étudiées

Cette recherche s'est organisée selon 3 questions :

1. La supplémentation maternelle en AGPI ω -3 peut-elle prévenir les lésions de DBP induite chez le raton ?
2. Quels sont les effets de l'EPA et du DHA sur la circulation pulmonaire fœtale ?
3. La DHEA peut-elle baisser les résistances vasculaires pulmonaires fœtales ?

II. MODELE EXPERIMENTAL DE DYSPLASIE BRONCHO-PULMONAIRE (DBP) INDUITE PAR L'HYPEROXIE CHEZ LE RATON

A. Effet de l'hyperoxie et modèle de DBP

Une ventilation artificielle avec concentration supra-physiologique d'oxygène est souvent nécessaire dans le traitement de la détresse respiratoire chez les nouveau-nés, enfants ou adultes, qu'elle soit liée à une hypoxémie, à un SDRA ou à une

pathologie pulmonaire obstructive chronique. Cependant, l'hyperoxie (fortes concentrations d'oxygène ou exposition prolongée dans le temps) induit dans la cellule pulmonaire la surproduction de ROS : anion superoxide, radical hydroxyle, acide hypochlorique, peroxide d'hydrogène [36] qui vont dépasser les mécanismes de défense antioxydants et être toxiques pour la cellule. Les conséquences de ce stress oxydatif vont conduire à l'arrêt de croissance de la cellule et à la mort cellulaire [37]. Le poumon est un organe particulièrement sensible au stress oxydatif de par sa localisation anatomique et sa large surface épithéliale. L'hyperoxie va provoquer une destruction de la barrière alvéolo-capillaire, une réponse inflammatoire importante et un œdème pulmonaire. La période néonatale est une période critique pour le développement pulmonaire et l'hyperoxie provoque alors un arrêt de la croissance pulmonaire, un retard de la maturation alvéolaire et un développement vasculaire dysplasique. Après la naissance, l'exposition à de fortes concentrations d'oxygène pendant 1 [38] à 4 [39] semaines va amener à un arrêt de développement pulmonaire et de l'alvéolisation chez les mammifères [40]. Ces lésions sont histologiquement proches des lésions pulmonaires décrites dans la dysplasie broncho-pulmonaire du grand prématuré chez l'homme [41]. Le développement de ce modèle a été particulièrement intéressant chez le rongeur. En effet, chez rat, le développement pulmonaire est plus rapide avec un stade de formation alvéolaire plus court, moins de 10 jours entre J2 et J10 de vie [42], ce qui fait du raton un animal privilégié pour l'étude des pathologies pulmonaires néonatales.

B. Mise en place du modèle de DBP induite par hyperoxie chez le raton

Les rates gestantes de race Wistar provenaient du Laboratoire Janvier (Janvier SAS, St Berthevin, France) et étaient hébergées dans notre laboratoire à partir du 7^{ème} jour de gestation. Les rates étaient nourries ad libitum par une alimentation standard SAFE A 04 (59.9% d'hydrates de carbone, 16.1% de protéines, 11.9% d'eau, 3.1% de lipides dont 54 % d'AGPI ω -6, 21% d'acides gras saturés et 17 % d'acides gras mono-saturés). Elles étaient exposées à des cycles jour/nuit alternativement toutes les 12h.

Après la mise bas survenait spontanément au 21^{ème} jour de gestation. Après 36 heures de vie (adaptation à la vie extra-utérine [43] et après rééquilibration des portées à 10 ratons par rate allaitante, les animaux étaient exposés soit en hyperoxie avec une fraction d'oxygène inspirée (FiO_2) comprise entre 80 et 85 %, soit laissés en air ambiant pour les groupes contrôles (FiO_2 21 %). La durée de l'exposition était de 10 jours. Les rates allaitantes et leurs ratons exposés à l'hyperoxie étaient placés dans une enceinte plastifiée (Tente à Oxygène, Vygon®, Ecouen, France). Le débit de gaz était de 5 L. min⁻¹, permettant d'obtenir une FiO_2 entre 80 et 85 % et de maintenir une pression partielle en CO_2 (pCO_2) <1mmHg [44]. La concentration en O_2 dans l'enceinte était mesurée en continu par un moniteur d'oxygène (Airox, BioMS®, Pau, France) et la pCO_2 était surveillée par un analyseur aspiratif à mesure spectrophotométrique (Novamatrix/Respironics/Philips®, Solna, Suède). La température à l'intérieur de l'enceinte était enregistrée en continu. Les enceintes étaient ouvertes 30 min par jour pour l'alimentation, les gavages et pesée des animaux.

Tous les animaux étaient sacrifiés au 11^{ème} jour après la mise bas. Les poumons étaient préparés juste après une sternotomie par instillation de paraformaldéhyde (PAF 4%) à pression continue (30 cm H_2O) pendant 30 minutes à l'aide d'une canulation trachéale avec un cathéter 24G [45]. La trachée était liée sous pression puis le bloc cœur-poumon était prélevé et placé en solution de PAF 4% pendant 12 heures. Enfin, les poumons fixés étaient inclus en paraffine. Des coupes transverses de 5 mm d'épaisseur étaient réalisées à partir des 3 lobes pulmonaires droits. Les lames étaient colorées à l'hématoxyline et à l'éosine pour l'étude des structures alvéolaires et du remodelage vasculaire et analysées sous microscope (Axiophot 2-Zeiss, Jena, Allemagne) couplé à une caméra numérique (AxioCam IC-Zeiss, Jena, Allemagne) et relié à un logiciel de traitement d'images (Axiovision -Zeiss, Jena, Allemagne FIGURE 6). Le grossissement était x50. La sauvegarde des images se faisait sous format TIFF en haute résolution. L'analyse des images était réalisée par le logiciel ImageJ (créé par Mr Wayne Rasband (National Institut of mental Health, Bethesda, MD, USA, accessible sur le site <http://rsb.info.nih.gov/ij>).

L'étude histologique comprenait l'évaluation de l'alvéolisation pulmonaire avec la mesure de la distance moyenne inter-alvéolaire, le compte du nombre de septa alvéolaires secondaires/champ et la mesure de l'épaisseur de l'interstitium [45]. L'étude du remodelage vasculaire se faisait par la mesure du diamètre externe et celle de l'épaisseur de la paroi des petites artères pulmonaires (calibre entre 10 et 50 μm) pour le calcul de l'hypertrophie de la média ($= (2 \times \text{épaisseur de la paroi} \times 100) / \text{diamètre externe}$) [45].

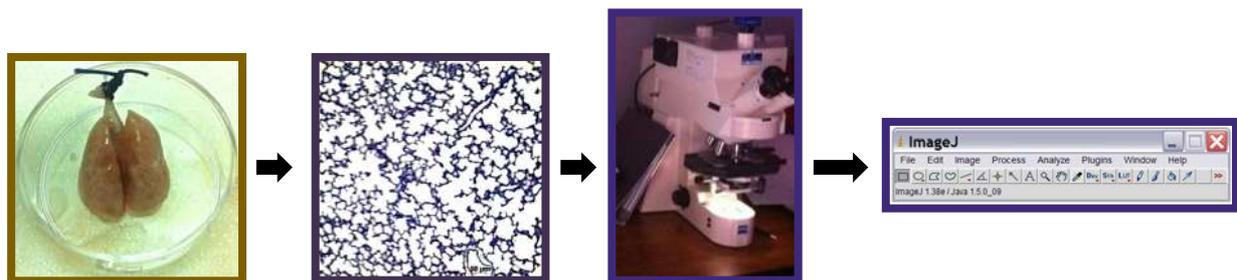


FIGURE 6 : Protocole d'analyse histo-morphométrique des poumons du prélèvement à l'analyse numérique

III. MODELE EXPERIMENTAL D'ETUDE DE LA CIRCULATION PULMONAIRE CHEZ LE FCETUS DE BREBIS

A. Protocole d'étude *In Vivo*

Les brebis de race Colombia-Rambouillet provenaient d'un élevage de la Creuse ayant reçu l'agrément de la DDSV (Direction Départementale des Services Vétérinaires) et étaient livrées gestantes avec datation échographique.

Le modèle expérimental d'étude de la circulation pulmonaire périnatale chez l'agneau a été mis au point par l'équipe et décrit dans la littérature [46]. Le protocole utilisé dans ce travail comporte des modifications du modèle concernant notamment l'anesthésie de la brebis gestante, l'absence de mise en place de cathéter dans l'oreillette gauche et du ballonnet gonflable autour du canal artériel.

1/Protocole chirurgical

Les foetus de brebis étaient opérés in utero à un terme allant de J127 à J129, (terme théorique : 145 jours), après un jeûne de 24h. Une voie veineuse était posée chez la brebis en site jugulaire par abord percutané.

Les brebis étaient séditées (par 0,3 mL de xylazine (SEDAXYLAN® : 20 mg/mL) en intraveineux, après remplissage vasculaire par 500 mL de RINGER® contenant 2 grammes de ceftriaxone (ROCEPHINE®), pour réalisation d'une détersion du champ opératoire abdominal.

L'anesthésie générale était induite par du propofol (DIPRIVAN®, 5 mL à 2%) associée et entretenue au gaz isoflurane (AErrane®, 1 à 5%). Le remplissage vasculaire était poursuivi par du RINGER®. L'analgésie était assurée par une injection lors de l'anesthésie d'une ampoule de 20 mg de nalbuphine (NUBAIN®).

La chirurgie était réalisée en condition d'asepsie stricte, après badigeon à l'Hibitane®. Après laparotomie médiane sous ombilicale, on procédait à une hystérotomie en regard de la patte avant-gauche du foetus.

On réalisait une anesthésie locale par injection sous cutanée par 5 mL de chlorhydrate de lidocaïne (10 mg/mL) et une analgésie foetale par injection intramusculaire de 10 mg de nalbuphine (NUBAIN®).

Des cathéters (Vygon®, Ecoven, France) étaient mis en position intra aortique (4 French) et intra cave supérieure (4 Fr) par abord des vaisseaux axillaires foetaux (FIGURE 7 Photographie de gauche).

On procédait ensuite à une thoracotomie gauche en regard du 3^{ème} espace intercostal pour la mise en place, après ouverture du péricarde et dissection, de cathéters (respectivement 4 Fr et 2,5 Fr) dans l'artère pulmonaire commune (AP) et dans l'artère pulmonaire gauche (APG) ainsi qu'une sonde de débitmétrie ultrasonique (TRANSONIC SYSTEMS®, taille 6S, Ithaca, NY, USA) autour de l'APG (FIGURE 7 Photographie de droite).

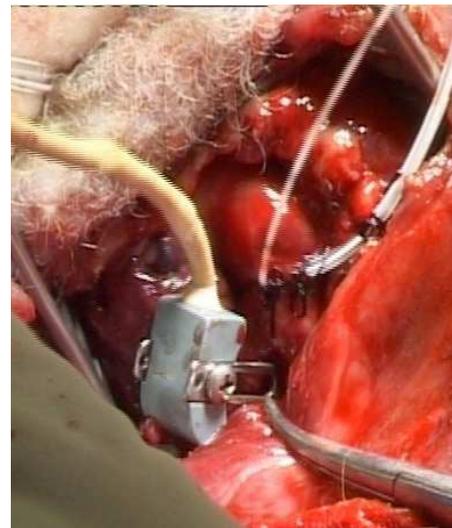
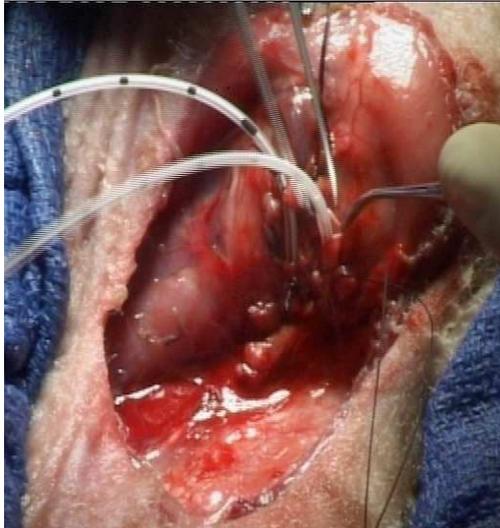


FIGURE 7 : Positionnement des cathéters intra aortique et intraveineux cave par abord axillaire (photographie de gauche) et de cathéters en AP et APG avec sonde doppler autour de l'APG (photographie de droite)

Lors de la fermeture de l'hystérotomie, un cathéter de calibre 5 Fr était laissé en intra-amniotique pour mesure d'une pression de référence.

Par ce cathéter, une amnio-infusion de 250 mL de sérum salé isotonique contenant 500 mg d'amoxicilline+acide clavulanique (AUGMENTIN®) était réalisée en fin d'intervention.

L'analgésie post opératoire était assurée par une injection de NUBAIN® 20 mg en intraveineux renouvelée 6 heures après la première injection le jour du bloc puis de façon quotidienne jusque J3 post-opératoire.

De la même façon, une antibioprophylaxie était réalisée par injection quotidienne intra-amniotique de 500 mg d'AUGMENTIN® jusque J3 post-opératoire et l'analgésie fœtale assurée par l'injection intraveineuse de 10 mg de NUBAIN® jusque J3 post-opératoire.

Les cathéters étaient entretenues par une injection quotidienne de sérum salé isotonique hépariné à 10 UI/mL.

2/ Protocoles d'expérimentation in vivo

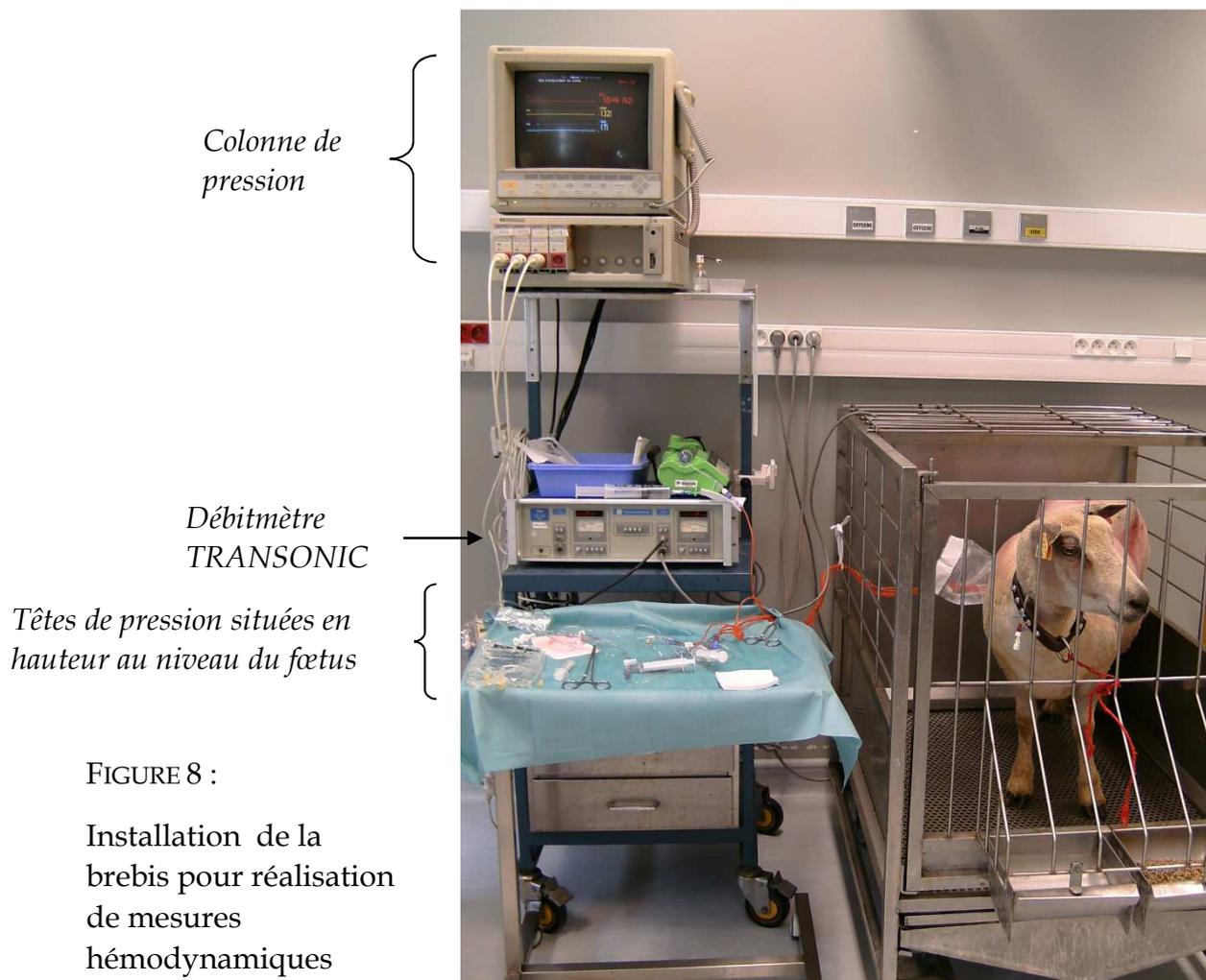
L'expérimentation débutait à partir de J2 post-opératoire.

Les cathéters aortique, de l'AP et intra-amniotique étaient reliés à une colonne de mesure des pressions (Merlin monitor, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA).

La pression artérielle aortique (PAo) et la pression artérielle pulmonaire commune (PAP) étaient référencées à la pression intra-amniotique (PIA).

La fréquence cardiaque (FC) était calculée à partir du signal phasique de la pression pulmonaire.

L'installation des différents cathéters et de la sonde de débitmétrie était représentée sur la FIGURE 8.



La sonde de débitmétrie était reliée au débitmètre (T206, Transonic system, Ithaca, NY, USA) permettant une mesure continue du débit de l'APG. La valeur du débit mesuré était déterminée à partir du signal de débit sanguin phasique. Le zéro de débit était défini par la valeur de débit précédant la systole. La valeur du débit réel représentait la somme du débit mesuré et d'un « Correcting Factor » (CF) déterminé à l'aide du logiciel d'acquisition PHYSIOTRACE® (Estaris -Monitoring), cf. FIGURE 9.

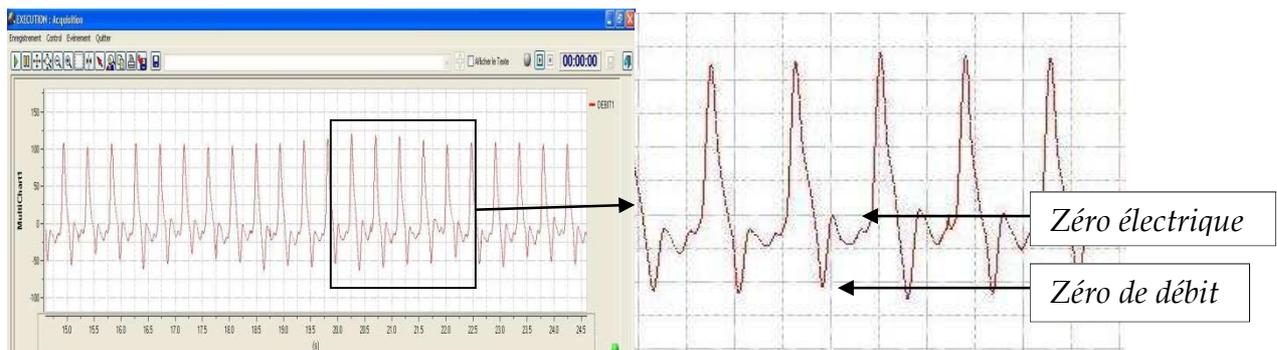


FIGURE 9 : Représentation du zéro de débit

La résistance vasculaire pulmonaire (RVP) était calculée selon la formule :

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

où la POG est la Pression dans l'Oreillette Gauche, la PAP la Pression dans l'Artère Pulmonaire commune et le Q_c est le débit corrigé de l'APG correspondant à la somme du débit mesuré (Q_m) et du Correcting Factor (CF) déterminé à l'aide du logiciel PHYSIOTRACE®.

La pression dans l'oreillette gauche était estimée à partir des mesures effectuées lors d'expérimentations antérieures. Nous avons montré que la POG était constamment proche de 2 cmH₂O [46].

Par conséquent, les résistances vasculaires pulmonaires étaient estimées par la formule :

$$RVP = (PAP - 2) / (Q_m + CF)$$

Les gaz du sang (GDS), la mesure de saturation en oxygène et les dosages de la concentration sanguine en lactates étaient réalisés sur des échantillons de sang artériel aortique ou pulmonaire selon 2 modalités : analyseurs OSM 3 (hemoximeter, Radiometer, Copenhague, Suède) et i-STAT (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA).

B. Protocole d'étude *In vitro*

1/ Prélèvement des anneaux vasculaires pulmonaires

Les fœtus d'agneaux étaient sacrifiés entre J127 et J135 de gestation.

Sous anesthésie générale (même protocole d'anesthésie que pour le protocole chirurgical *in vivo*), on procédait à une reprise de la laparotomie. Après hystérotomie, injection de 5 mL de lidocaïne 1% sur le trajet de l'incision et de 2 mL de NUBAIN® en intramusculaire, on réalisait un abord par thoracotomie transverse, selon la technique décrite par l'équipe londonienne de Voiglio et al. [47], chez le fœtus. Il était prélevé les 2 poumons en respectant le hile pulmonaire et surtout toute la longueur des artères pulmonaires. En fin de prélèvements, il était réalisé le sacrifice de l'agneau, et de la brebis par euthanasie au T61® à la posologie de 0,3 mL/Kg.

Les poumons prélevés étaient immédiatement plongés dans une solution de Krebs (composée en mmol de : NaCl 118, KCl 4.6, NaHCO₃ 27.2, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, CaCl₂ 1.75, Glucose 11.1 ; pH 7.35-7.45) maintenue à 4°C et oxygénée. Des artères pulmonaires de quatrième génération (à partir de l'artère pulmonaire commune) étaient prélevées avec précaution. Des anneaux pulmonaires d'environ 8 mm de long étaient préparés à partir des artères pulmonaires.

2/ Expérimentations sur le tensiomètre

Chaque anneau pulmonaire était monté entre 2 étriers passés dans la lumière vasculaire et plongé dans une chambre d'organe (Radnoti® Glass, Morovia, CA, USA) contenant 40 ml de solution de Krebs maintenue à 37°C, et oxygénée par un mélange O₂/CO₂ (95%/5%). L'étrier inférieur était fixe tandis que l'étrier supérieur était suspendu par un fil à un transducteur de force (Radnoti®) couplé à une carte informatique (Flash 12®, Strawberry Tree Incorporated) mesurant la tension qui est secondairement convertie en force contractile par un logiciel (Workbench PC®, Strawberry Tree Incorporated). L'anneau pulmonaire était très progressivement mis en tension jusqu'à 0,8 g (tension optimale de repos). L'anneau était laissé à la tension optimale de repos pendant 1 heure. Puis la viabilité de cet anneau était testée par

l'adjonction de KCl à 3M pour obtenir une concentration de 80 mM. Après 3 rinçages de la chambre d'organe par la solution de Krebs, une vasoconstriction est réalisée par l'adjonction de sérotonine (5HT, 10^{-4} M) (FIGURE 10).



*Solution de
Krebs*

*Systeme de cuves
contenant les anneaux
reliés par un système
d'étriers au
tensiomètre, lui-même
relié au système
informatique.*



FIGURE 10 : Tensiomètre pour étude de la vasomotricité sur anneaux isolés (photographie du dessus) ; Cuves de 40 mL de solution de Krebs réchauffée à 37°C pour incubation des anneaux (photographie du dessous)

L'étude de la réactivité du vaisseau était testée par relaxation endothélium-dépendante à l'Acétyl Choline (10^{-4} M) et la relaxation médiée par les cellules musculaires lisses par action du nitroprussiate de sodium (SNP 10^{-4} M).

CHAPITRE 3: RESULTATS

I. ETUDE DE LA SUPPLEMENTATION MATERNELLE EN ACIDES GRAS POLYINSATURES ω -3 (AGPI ω -3) SUR LES LESIONS DE DBP INDUITES CHEZ LE RATON

A. Introduction

La dysplasie broncho-pulmonaire (DBP) est une des plus fréquentes complications de la prématurité, retrouvée chez 30 % des nouveau-nés de très faible poids de naissance [1]. Cette pathologie pulmonaire chronique résulte de la haute susceptibilité du poumon prématuro aux lésions acquises lors de la réanimation, de la ventilation mécanique mais également liée à la production de médiateurs pro-inflammatoires modifiant les voies de signalisation requises pour le développement normal du poumon. En 20 ans, la prise en charge en néonatalogie s'est améliorée avec l'administration anténatale des corticoïdes, le traitement par surfactant et le développement d'une ventilation moins agressive. Le taux de lésions pulmonaires sévères a diminué, laissant la place à une « nouvelle forme de DBP » se développant chez le nouveau-né prématuré à faible poids de naissance, associant hypoplasie alvéolaire et altération du développement vasculaire pulmonaire. La recherche actuelle étudie le déséquilibre entre médiateurs pro- et anti-inflammatoires, comme l'un des mécanismes de développement de cette « nouvelle DBP » chez le prématuré de très faible poids de naissance [7,48,49]. De plus, l'obstruction pulmonaire chronique et les symptômes respiratoires persistants sont retrouvés de façon significative à distance par les enfants nés prématurés avec antécédents de DBP, en comparaison aux enfants nés prématurés sans DBP [50].

Les effets bénéfiques de la prise alimentaire d'AGPI ω -3 durant la grossesse et la période périnatale ont été largement reportés [51,52], en particulier, l'effet de l'acide docosahexaénoïque (DHA) sur les développements pré- et post-nataux du cerveau et de la rétine. Les AGPI ω -3 à longues chaînes ont des propriétés physiologiques importantes lors de la grossesse, pour la femme mais également pour le fœtus [53].

Les études ont démontrés que le placenta jouait un rôle primordial dans le transfert des acides gras adapté à la demande foétale et qu'il était capable de cibler le transport des AGPI ω -3 à longues chaînes vers le fœtus [54]. D'autres études ont montré le possible bénéfice d'une nutrition enrichies avec des AGPI ω -3 chez le prématuré, avec des avantages significatifs sur le développement moteur et la croissance [55]. Plus récemment, une tendance à la diminution de l'incidence de la DBP et une réduction du risque d'entérocolite ulcéro-nécrosante ont été observées chez des enfants prématurés nés avant 32 SA supplémentés par AGPI ω -3 à longues chaînes [56]. Certaines études suggèrent que les propriétés anti-inflammatoires des AGPI ω -3 peuvent expliquer l'intérêt potentiel dans leur utilisation en nutrition parentérale ou orale pour prévenir les processus pathologiques inflammatoires en période néonatale [57,58].

Le modèle animal de DBP a surtout été développé chez le rongeur, car la naissance survient pendant le stade sacculaire de développement pulmonaire. L'exposition à l'hyperoxie des rats nouveau-nés crée une déstructuration pulmonaire affectant l'alvéolisation et la vascularisation, avec des lésions proches de celles décrites dans la « nouvelle DBP » des enfants prématurés [1,59]. En effet, les poumons de « nouvelle DBP » présentent des alvéoles élargies, simplifiées et kystiques avec des vaisseaux pulmonaires irréguliers [60].

Nous posons l'hypothèse que la supplémentation maternelle en AGPI ω -3 pendant la fin de la gestation et à la période précoce post-natale pourrait prévenir les lésions de DBP induites par l'hyperoxie chez le nouveau-né raton.

B. Matériels et Méthodes

1/ Modèle expérimental

Cf. CHAPITRE 2

2/ Protocoles

Le but de l'étude était d'évaluer les effets d'une supplémentation maternelle en AGPI ω -3, en AGPI ω -6, contrôlée par un groupe témoin, sur les lésions pulmonaires induites par l'hyperoxie chez le nouveau-né raton en comparaison à une exposition à l'air ambiant (FIGURE 11)

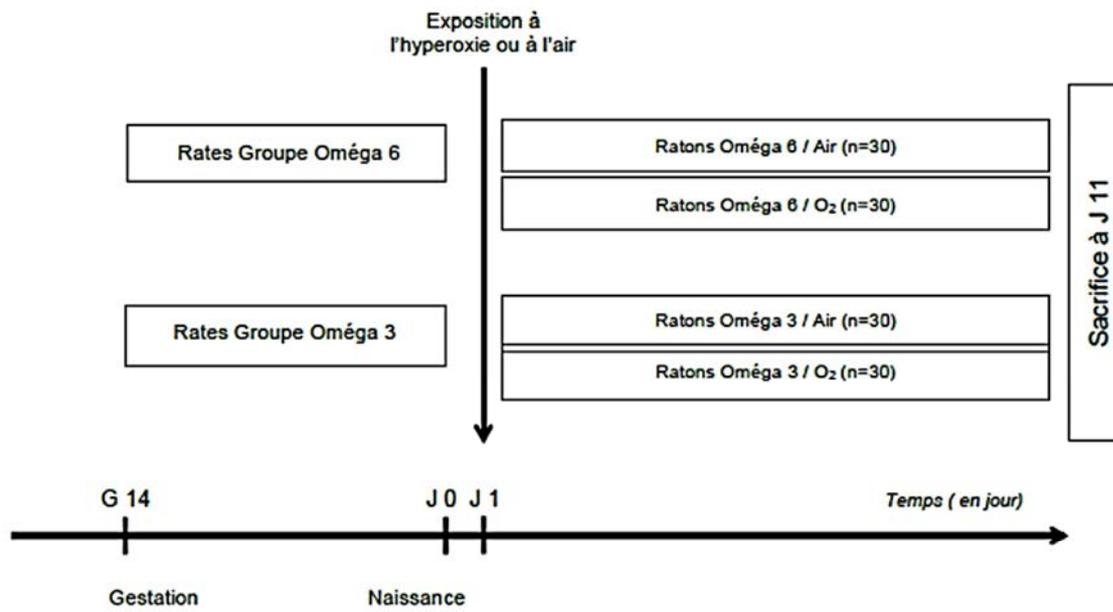


FIGURE 11: Schéma du protocole expérimental de DBP chez le raton

Les protocoles expérimentaux sont décrits dans l'article publié dans la revue International Journal of Molecular Sciences :

Dyuti Sharma, Armande Subayi Nkempi, Estelle Aubry, Ali Houeijeh, Laura Butruille, Véronique Houfflin-Debarge, Rémi Besson, Philippe Deruelle and Laurent Storme. *Maternal PUFA ω -3 Supplementation Prevents Neonatal Lung Injuries Induced by Hyperoxia in Newborn Rats*. Int. J. Mol. Sci. 2015, 16, 22081-22093

3/ Analyses statistiques

Les résultats étaient exprimés en moyenne affectées de leurs erreurs standards (ESM). La comparaison entre les groupes utilisait un test d'analyse de variance

simple ou à mesures répétées (ANOVA one-way ou repeated ANOVA) et, un test a posteriori de Bonferroni, pour les comparaisons multiples. Les analyses statistiques étaient réalisées à l'aide du logiciel Graphpad Prism Version 5® (Graphpad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Les analyses statistiques des données de la croissance des rats et des mesures morphométriques (histologie pulmonaire) ont comparé chacun des groupes de supplémentation maternelle (AGPI ω -3, AGPI ω -6 et groupe contrôle) entre eux et les groupes exposés à l'hyperoxie versus les groupes exposés à l'air ambiant. Une différence avec une valeur du $p < 0.05$ était considérée comme statistiquement significative.

C. Résultats

Ce travail a fait l'objet d'un article publié dans la revue International Journal of Molecular Sciences :

Dyuti Sharma, Armande Subayi Nkembi, Estelle Aubry, Ali Houeijeh, Laura Butruille, Véronique Houfflin-Debarge, Rémi Besson, Philippe Deruelle and Laurent Storme. *Maternal PUFA ω -3 Supplementation Prevents Neonatal Lung Injuries Induced by Hyperoxia in Newborn Rats.* Int. J. Mol. Sci. 2015, 16, 22081-22093

D. Discussion

Nous avons montré que la supplémentation en AGPI ω -3 chez les rates Wistar gestantes prévenait la survenue de lésions de DBP induites chez les ratons par exposition prolongée à l'hyperoxie, dans un modèle expérimental in vivo. Nos données ne montraient de différence significative entre les 2 groupes de supplémentation en AGPI ω -3 exposés à l'hyperoxie ou laissés en air ambiant concernant le nombre de septa alvéolaires secondaires/champs, la distance moyenne inter-alvéolaire et l'épaisseur de l'interstitium. Cette étude utilisait un modèle de lésions de DBP induites décrit dans la littérature [59,60] et reproduisait les lésions pulmonaires induites dans tous les groupes de ratons exposés à l'hyperoxie. De la même façon, on retrouvait, comme décrit dans ce modèle [61,62], une baisse significative de poids chez les ratons soumis à une hyperoxie comparés au groupe de ratons contrôle. Contrairement à la supplémentation maternelle en AGPI ω -6, l'enrichissement en AGPI ω -3 des rates gestantes exposées à l'hyperoxie avait un effet bénéfique sur le développement pulmonaire en prévenant les lésions de DBP induites par l'hyperoxie. Cette étude confirme les propriétés intéressantes des AGPI ω -3 en comparaison aux AGPI ω -6 sur le système pulmonaire en période périnatale, comme nous l'avons rapporté dans une étude sur les effets des AGPI ω -3 sur la circulation pulmonaire fœtale [63]. Cependant, nous n'avons pas retrouvé de prévention des lésions de remodelage vasculaire dans notre étude. En effet, tous les ratons exposés à l'hyperoxie, quelle que soit la supplémentation maternelle (AGPI ω -3 ou ω -6) présentaient des lésions vasculaires significatives en comparaison aux ratons laissés en air ambiant. De plus, nous ne constatons uniquement que des lésions concernant l'épaisseur de la média et nous ne retrouvons pas d'hypertrophie ventriculaire droite. Les lésions de remodelage cardiovasculaire induites par l'hyperoxie habituellement décrites dans ce modèle [61-64] regroupent les lésions de la paroi artérielle pulmonaire avec augmentation de l'épaisseur de la média et leur retentissement cardiaque avec une hypertension artérielle pulmonaire associée à hypertrophie ventriculaire droite. La survenue et l'importance de ces lésions semblent corrélées au degré d'hyperoxie (% de FiO₂) mais également à la durée de l'exposition à l'hyperoxie et la présence ou non dans les protocoles d'un temps de

« récupération ». Dans notre étude, l'analyse histologique des poumons était réalisée au 11^{ème} jour de vie après 10 jours d'exposition et peut expliquer la présence seule des lésions de remodelage vasculaire. Notre durée d'exposition était similaire à d'autres études, mais dans celles-ci une période de « récupération en air ambiant » post-exposition pendant laquelle les lésions pulmonaires et vasculaires étaient fixées. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que dans notre étude, la supplémentation maternelle en AGPI ω -3 était suffisante pour prévenir le développement des lésions pulmonaires mais d'une durée trop courte pour démontrer un effet sur le remodelage vasculaire. Enfin, notre étude ne permet également pas de définir la durée (minimale ou totale) nécessaire de la supplémentation maternelle en AGPI ω -3 pour prévenir les lésions de DBP. Nous avons décidé de débiter cette supplémentation en fin de gestation et de la poursuivre lors de l'allaitement car il a été démontré que les AGPI ω -3 sont bénéfiques pendant la période périnatale, particulièrement dans la prévention de la prématurité mais également de la DBP.

Cette étude pilote pré-clinique a démontré que la supplémentation maternelle en AGPI ω -3 prévenait la survenue de lésions de DBP en période périnatale. Les mécanismes d'actions des AGPI ω -3 n'ont pas été étudiés dans ce modèle mais des études récentes ont exploré l'action des AGPI ω -3 sur la diminution des cytokines pro-inflammatoires [57] telles que le TNF- α , IL-1 β , IL-6 et IL-8 qui semblent fortement impliquées dans le développement des lésions de DBP chez le prématuré. En effet, des taux élevés de ces cytokines (IL-1, IL-8 et TNF- α) ont été retrouvés chez les nouveau-nés prématurés avec DBP [7]. Une autre étude sur un modèle d'HTAPP induit par la monocrotaline chez le rat, a mis en évidence une diminution de NF-kB et de p38 MAKP avec moins d'inflammation et de remodelage vasculaire dans le groupe de rats traités par l'acide monoacylglycérade docosapentaénoïque (le MAG-DPA, métabolite de l'EPA et du DHA, qui sont des AGPI ω -3) en comparaison au groupe contrôle. Or p38 est un membre de la famille des MAKP, impliqué dans la production de protéines kinases activées en situation de stress, responsable d'apoptose des cellules et des macrophages pulmonaires. Ces données suggèrent que les AGPI ω -3 ont des propriétés de régulation et de diminution des cytokines pro-inflammatoires impliquées dans le développement de la DBP en période néonatale.

II. ETUDE DE L'EFFET DE L'ACIDE EICOSAPENTAENOIQUE (EPA) ET DE L'ACIDE DOCOSAHEXAENOIQUE (DHA) SUR LA CIRCULATION PULMONAIRE FŒTALE

A. Introduction

L'hypertension artérielle pulmonaire persistante du nouveau-né (HTAPP) résulte d'une maladaptation cardiovasculaire à la vie extra-utérine et est favorisée par certaines situations périnatales comme la prématurité, le sepsis, l'inhalation méconiale ou encore des malformations congénitales. Elle est la conséquence d'une persistance de résistances vasculaires pulmonaires élevées associée à une hypoxémie sévère. La pathologie pulmonaire chronique peut s'associer mais aussi aggraver une HTAPP. Les complications respiratoires surviennent chez presque la moitié des enfants prématurés de poids de naissance inférieur à 1000 grammes [65]. Actuellement, l'HTAPP nécessite de nombreux traitements associant l'inhalation de monoxyde d'azote en ventilation artificielle, des agents inotropes, et dans certains cas d'hypoxémies réfractaires, l'oxygénation par membrane extracorporelle (ECMO). Le but des recherches actuelles est de diminuer la survenue de l'HTAPP et d'en limiter la morbidité.

Il est évident que l'environnement nutritionnel fœtal joue un rôle essentiel dans la mauvaise adaptation pulmonaire à la naissance. Différents effets vasculaires sont liés à la prise de lipides, et beaucoup d'études et essais cliniques ont démontré le rôle bénéfique de la prise d'huile de poissons sur la fonction cardiorespiratoire chez l'adulte. Ces huiles réduisent la survenue d'évènements cardiovasculaires (athérosclérose, infarctus du myocarde, hypertension artérielle) et améliorent la survie en réanimation des patients avec syndrome de détresse respiratoire aigu [66,67]. Les huiles de poisson, enrichies en AGPI ω -3, diminuent le remodelage vasculaire pulmonaire chez les rats soumis à une hypoxie chronique [68]. Nous avons démontré dans une précédente étude [63] que l'huile de poisson (riche en AGPI ω -3), comparé à l'huile de soja (riche en AGPI ω -6), avait des propriétés vasodilatatrices pulmonaires sur un modèle expérimental de fœtus de brebis. Le but de ce travail était d'identifier, parmi les principaux AGPI ω -3 représentés par l'acide

eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA), lequel était responsable des effets circulatoires décrits sur le modèle de fœtus de brebis et d'étudier les mécanismes d'action de cet AGPI ω -3 sur des anneaux artériels pulmonaires fœtaux.

B. Matériels et Méthodes

1/ **Modèle expérimental**

Cf. CHAPITRE 2.

2/ **Protocoles**

Le but de l'étude était d'évaluer les effets d'une injection intraveineuse lente de 25 mg d'EPA et de 50 mg de DHA sur la circulation pulmonaire fœtale in vivo dans le modèle de fœtus de brebis. Les effet-doses de l'EPA et du DHA ainsi que le mécanisme d'action de l'EPA (lésion de l'endothélium et blocage de la NO synthase par L-Nitro-Arginine (LNA) étaient étudiés dans un second protocole in vitro, sur anneaux vasculaires isolés à partir des poumons de fœtus de brebis.

Les protocoles expérimentaux sont détaillés dans l'article soumis à la revue American Journal of Obstetrics and Gynecology :

Dyuti Sharma, Estelle Aubry, Thavarak Ouk, Ali Houejeh, Véronique Houfflin-Debarge, Rémi Besson, Philippe Deruelle, Laurent Storme. *Effects of Eicosapentanoic Acid (EPA) and Docosahexaenoic Acid (DHA) on fetal pulmonary circulation: an experimental study in fetal lambs.*

3/ **Analyses statistiques**

Les analyses statistiques étaient réalisées à l'aide du logiciel StatView 4.5 software pour PC (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). Pour chaque protocole, n indiquait le nombre de fœtus étudiés (observations indépendantes). Les résultats étaient exprimés en moyenne affectées de leurs erreurs standards (ESM) ou en pourcentage de variation maximale à partir de la moyenne de période de stabilité. La comparaison entre les groupes utilisait un test d'analyse de variance simple ou à mesures répétées (ANOVA one-way ou repeated ANOVA) et, un test a posteriori de

Bonferroni, pour les comparaisons multiples, en utilisant la période de stabilité (temps T-20 min au temps T0) comme covariable et la période de traitement (jusqu'à 40 min après la fin de l'injection, temps T0 au temps T160 min) comme mesures répétées. Les gaz du sang étaient comparés à l'aide d'un test non paramétrique de Wilcoxon. Une différence avec une valeur du $p < 0.05$ était considérée comme statistiquement significative.

Pour le protocole in vitro, le nombre d'anneaux étudiés par fœtus variait de 1 à 6. Les valeurs étaient moyennées pour un même fœtus afin d'obtenir une seule valeur par animal. Un test d'analyse de variances pour mesures répétées (ANOVA) était utilisé pour l'analyse statistique des données des protocoles in vitro. Les effets de l'EPA et du DHA à la dose de 100 μM étaient comparés à l'aide d'un test de Mann et Whitney.

C. Résultats

Ce travail a fait l'objet d'un article soumis à la revue American Journal of Obstetrics and Gynecology :

Dyuti Sharma, Estelle Aubry, Thavarak Ouk, Ali Houejeh, Véronique Houfflin-Debarge, Rémi Besson, Philippe Deruelle, Laurent Storme. *Effects of Eicosapentanoic Acid (EPA) and Docosahexaenoic Acid (DHA) on fetal pulmonary circulation: an experimental study in fetal lambs.*

Elsevier Editorial System(tm) for American Journal of Obstetrics and Gynecology

Manuscript Draft

Manuscript Number: W15-0966

Title: Effects of Eicosapentaenoic Acid (EPA) and Docosahexaenoic Acid (DHA) on fetal pulmonary circulation: an experimental study in fetal lambs

Article Type: Original Research

Section/Category: Translational Obstetrics

Corresponding Author: Dr. Dyuti SHARMA, M.D.

Corresponding Author's Institution: Univ. Lille, EA 4489 – Perinatal Environment and Health, F-59000 Lille, France

First Author: Dyuti SHARMA, M.D.

Order of Authors: Dyuti SHARMA, M.D.; Estelle AUBRY, M.D., Ph.D.;

Thavarak OUK, M.D., Ph.D.; Ali HOUEIJEH, M.D.; Véronique HOUFFLINDEBARGE,

M.D., Ph.D.; Rémi BESSON, M.D., Pr; Philippe DERUELLE, M.D.,

Ph.D.; Laurent STORME, M.D., Ph.D.

Manuscript Region of Origin: FRANCE

Effects of Eicosapentaenoic Acid (EPA) and Docosahexaenoic Acid (DHA) on fetal pulmonary circulation: an experimental study in fetal lambs

Dyuti Sharma^{1,2}, Estelle Aubry^{1,2}, Thavarak Ouk^{3,4}, Ali Houeijeh^{1,5}, Véronique Houfflin-Debarge^{1,6}, Rémi Besson^{1,2}, Philippe Deruelle^{1,6}, Laurent Storme^{1,5*}

¹Univ. Lille, EA 4489 - Environnement Périnatal et Santé, F-59000 Lille, France

²CHU Lille, Clinique de Chirurgie Pédiatrique, Hôpital Jeanne de Flandre, F-59000 Lille, France

³Univ.Lille, U1171 - Degenerative & vascular cognitive disorders, F-59000 Lille, France

⁴Inserm, U1171, F-59000 Lille, France

⁵CHU Lille, Clinique de Néonatalogie, Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU Lille, F-59000, Lille, France

⁶CHU Lille, Clinique de Gynécologie-Obstétrique, Hôpital Jeanne de Flandre, F-59000, Lille, France

* To whom correspondence should be addressed. *Mail to:* laurent.storme@chru-lille.fr

Author's disclosure: The author has not disclosed any potential conflicts of interest

This study was supported by a grant from "Académie Nationale de Médecine"

Abstract: 361 words

Manuscript: 2932 words

Condensation and short version title:

- **Condensation:** Eicosapentaenoic acid induces a potent pulmonary vasodilatation without adverse effects in the fetal lambs.
- **Short version title:** n-3PUFAs supplementation and fetal pulmonary circulation

Abbreviations: ACh, Acetylcholine; DA, ductus arteriosus; DHA, docosahexaenoic acid; ECMO, extracorporeal membrane oxygenation; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; EPA, eicosapentaenoic acid; E+, rings with endothelium intact; E-, rings with endothelium stripped; 5-HT, serotonin; HR, heart rate; LNA, L-nitro-arginine; LNA E+, rings pre-treated with LNA and with endothelium intact; LPA, left pulmonary artery; NO, nitric oxide; n-3 PUFAs, n-3 polyunsaturated fatty acids; PAo, aortic pressure; PAP, pulmonary arterial pressure; PPHN, persistent pulmonary hypertension of the newborn; PVR, pulmonary vascular resistance; SNP, sodium nitroprusside.

Abstract

Background: Growing evidence indicates that the foetal nutritional environment plays a critical role in the adaptation at birth. Maladaptation to extrauterine life can cause persistent pulmonary hypertension of the newborn and is associated with significant morbidity and mortality. N-3 poly-unsaturated fatty acids have pulmonary vasodilatory properties that may promote transition at birth. Fish oil contains various n-3PUFAs, mainly eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA).

Objectives: To determine the active agent and clarify the mechanism of action, we studied the circulatory effects of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in fetal sheep and in fetal pulmonary arterial rings.

Study design: Catheters were placed in fetal systemic and pulmonary circulation, and a flow probe around the left pulmonary artery at 128 days gestation. Hemodynamic variables and left pulmonary artery blood flow were measured while infusing EPA or DHA to the fetus. The dose effects of incrementally increasing EPA or DHA concentrations (1-300 μ M) were studied in fetal arterial rings pre-constricted with serotonin. Vascular rings incubated with EPA were separated into 3 groups: intact endothelium, endothelium stripped and intact endothelium rings pretreated with L-nitro-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase.

Results: EPA, but not DHA, induced an increase in pulmonary blood flow and a 25% drop in pulmonary vascular resistance (n=8, p<0.001). EPA and DHA did not alter the fetal hemodynamic variables and blood gases. Incubation of isolated rings with EPA caused a maximum relaxation of 60% in the intact endothelium rings (p<0.001), whereas vessel tone did not change in the rings with endothelium stripped. Vascular effects of EPA were decreased in rings pretreated with L-nitro-arginine (maximum relaxation of 20 %) compared

to rings not incubated with L-nitro-arginine ($p < 0.05$). Incubation with DHA resulted in only a mild relaxation at the highest concentration ($300\mu\text{M}$).

Conclusion: EPA induces a potent pulmonary vasodilatation without adverse effects in fetal lambs. This effect is endothelium- and dose-dependent and involves NO production. As EPA can easily be transfer across the placenta toward the fetus after maternal intake of diet enriched in n-3PUFAs, we speculate that dietary fish oils during the pregnancy may help to prevent maladaptation at birth in high risk conditions for persistent pulmonary hypertension of the newborn.

Key Words: Polyunsaturated fatty acids, diet, persistent pulmonary hypertension of the newborn, prematurity, fetal pulmonary circulation

Introduction

Many perinatal conditions such as prematurity, sepsis, meconium aspiration syndrome and malformations can promote cardiovascular maladaptation to extrauterine life in the newborn, called 'persistent pulmonary hypertension of the newborn' (PPHN). This syndrome is caused by sustained elevation of pulmonary vascular resistance (PVR), causing severe hypoxemia. Chronic lung disease associated with prolonged pulmonary arterial hypertension may complicate the course of PPHN. These respiratory disorders occur in almost half of all infants weighing less than 1000 g at birth.¹ Currently, PPHN requires many intensive treatments such as inhaled nitric oxide (NO) and inotropic agents, or invasive care such as extracorporeal membrane oxygenation. Additional research is required aiming at decreasing occurrence of PPHN and its related lung morbidities.

Growing evidence indicates that the fetal nutritional environment plays a critical role in the cardiorespiratory adaptation at birth. Differential vascular effects can be expected according to lipid intake. Many experimental, clinical and epidemiological studies have clearly demonstrated the beneficial role of dietary fish oils on cardiorespiratory function in adults. They reduce the occurrence of cardiovascular disease and improve survival following acute respiratory distress syndrome in adults.^{2,3} Dietary fish oil enriched in n-3 PUFAs decreases lung vascular remodelling in rats with chronic hypoxia.⁴ We have shown that, compared to soybean oil, fish oil has pulmonary vasodilatory properties in a fetal sheep model.⁵ N-3PUFAs are found in fish oil, not in soybean oil. The aim of our study was to identify among the n-3PUFAs, the active agent responsible for these circulatory effects in the experimental fetal sheep model in vivo and to test this agent in vitro on fetal pulmonary vascular rings to clarify its mechanism of action. Fish oil contains various n-3PUFAs, mainly eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA).

Experimental Procedures

Animals

All animal procedures and protocols were approved by the French “Ministère de l’Agriculture, de la Pêche et de l’Alimentation” before the studies were conducted, and were carried out in the Lille Department of Experimental Research (agreement n°59286).

Surgical procedures

Fetal sheep underwent *in utero* surgery at a gestational age of 126-128 days (gestation=145d). Anaesthesia was induced with propofol (Diprivan®, 5mL, 2%; Astra Zeneca, Caponago, Italy) and maintained with isoflurane gas (Aerrane®, 1-5%; Baxter Healthcare Ltd, Norfolk, UK). Analgesia was provided by nalbuphine (Nubain®, 20mg, Serb Laboratory, Paris, France).

After a midline hysterotomy, local anaesthesia (lidocaine) and fetal analgesia (Nubain®, 20mg) were performed in order to position catheters (18G, Vygon®, Ecoven, France) in the fetal aorta and in the superior vena cava through the axillary vessels. After a left thoracotomy, catheters were placed in the main and the left pulmonary artery (LPA) (18G and 21G respectively) and, an ultrasonic flow probe (Transonic Systems®, size 6S, Ithaca, NY, USA) around the LPA. During the closure of hysterotomy, a 16G catheter were left intra-amniotic to obtain a reference pressure.

For *in vitro* experiments, laparotomy and hysterotomy sites were reopened at term of 140-142 day’s gestation (same protocol as for surgery *in vivo*). The two fetal lungs, including the hila and main pulmonary artery, were removed by transverse thoracotomy using the technique as previously described [6], after local anaesthesia (lidocaine) and fetal analgesia

(nalbuphine, 20mg). At the end of sampling, the lambs were euthanized using T61S (Tanax®, Intervet, France).

Arterial rings preparation

The lungs collected were immersed in Krebs solution, maintained at 4°C and oxygenated. Pulmonary arteries of the fourth generation from the main pulmonary artery were removed with caution to prepare 5-8mm-long arterial rings (from 1 to 6 rings per fetus). Each ring was mounted by inserting a pair of callipers into the vascular lumen, and immersed in one organ chamber (Radnoti® Glass, Monrovia, CA, USA) containing 40mL of Krebs solution maintained at 37°C and oxygenated (95%O₂/5%CO₂). In some rings, the endothelium was mechanically removed while mounting (E-). The lower calliper was fixed and the upper calliper was suspended by a twine from a force transducer (Radnoti®). The contractile force of ring was measured by dedicated software (Workbench, Strawberry Tree Incorporated) using change in voltage between callipers. The tension of the pulmonary rings was gradually adjusted to 0.7g (optimal resting tension).

Physiological measurements

1/In vivo protocol

The catheters were connected to pressure-measuring monitor (Merlin, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA). Aortic pressure (PAo) and pulmonary arterial pressure (PAP) were referenced to the intra-amniotic pressure. LPA flow was continuously measured by the flowmeter. PVR were calculated as the difference between PAP and left atrial pressure divided by LPA flow, where left atrial pressure has been previously determined to be equal to intra-amniotic pressure +2cmH₂O.⁷

Blood samples from the main pulmonary artery were used for blood gas analysis (i-STAT analyzer, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) and SaO₂ measurement (ABL520 Radiometer, Copenhagen, Denmark).

2/ In vitro protocol

Arterial rings were maintained at their optimal resting tension for 1 hour. The viability was tested by the addition of 3M KCl to obtain a final concentration of 80mM. After several washes, pre-contraction was achieved by serotonin (5-HT, 100µM). The reactivity of arterial rings was tested by endothelium-dependent relaxation in response to acetylcholine (ACh, 10µM) with and without L-nitro-arginine (LNA), a specific NO synthase inhibitor. At the end of the protocol and after several washes with Krebs solution, a single dose of sodium nitroprusside (SNP, 10µM) was applied after pre-contraction with 5-HT (100µM) to test endothelium-independent relaxation (mediated by smooth muscle cells).

Experimental design

***In vivo* protocol: fetal pulmonary haemodynamic response to EPA, DHA or ethanol infusion**

Prior to in vivo experimentation, a stable baseline was obtained with saline infusion (12mL/h) for 30min through the LPA catheter. Then, pulmonary haemodynamic response was studied during the infusion of EPA (25mg), of DHA (50mg) or their solvent (ethanol, 0.25mL as a control) in saline solution into the LPA (12mL/h) for 120min followed by saline infusion (12mL/h) for one hour. The dosage of EPA and DHA administered was chosen to match that in Omegaven® (Fresenius Kabi, France) in the study of Houeijeh et al. [5]. Hemodynamic variables were recorded at 10-min intervals. Blood gas and SaO₂ measurements were performed at time 0 (start of drug infusion) and at 120min (end of drug infusion).

***In vitro* protocol: vascular response to EPA and to DHA in fetal pulmonary artery rings**

This series of experiments was performed to determine the vascular response to EPA and to DHA in fetal pulmonary arterial rings, pre-contracted with 5-HT (100 μ M). Dose-response curves for relaxation were obtained by incrementally increasing the concentration of EPA or DHA (1-300 μ M) once a plateau of contraction was reached using 5-HT.

Additional experiments were performed to explore the mechanism of EPA-induced pulmonary vasorelaxation. The vascular response to EPA was studied in fetal pulmonary arterial rings with (E+) or without endothelium (E-), pre-contracted with 5-HT (100 μ M). Similar experiments were performed in fetal lamb pulmonary arterial rings with endothelium after incubation with L-nitro-arginine (100 μ M) for 30min (LNA E+). Dose-response curves for relaxation were obtained by incrementally increasing the concentration of EPA (1-300 μ M) once a plateau of contraction was reached using 5-HT (100 μ M). Responses of isolated artery rings to 100 μ M LNA, and to 10 μ M Ach after pre-treatment with 100 μ M LNA were assessed as controls.

Drugs preparation

EPA (100mg/mL) and DHA (200mg/mL) were purchased from Cayman Chemical Laboratory (Ann Arbor, Michigan, USA). EPA (25mg in 0.25mL ethanol), DHA (50mg in 0.25mL ethanol), and ethanol (excipient of EPA or DHA, 0.25ml) were diluted in 23.75mL of saline. Ach, 5-HT and SNP were made fresh daily as stock solutions (0.1M) and stored at 4°C. LNA solution was prepared just before rings incubation. LNA (1mg) was dissolved in a few drops of 1M chlorhydric acid. Then, 40mL of normal saline was added to obtain a 100 μ M LNA solution. Few drops of 1M sodium hydroxide was added to titrate the pH to 7.40

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using StatView 4.5 software (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). For each protocol (in vivo and in vitro), n indicates the number of fetuses studied (independent measures). Results are expressed as means \pm SEMs or as the percentage of maximum variation from baseline. Intergroup comparisons of the longitudinal changes were analysed with an analysis of covariance (ANOVA) and with the Bonferroni/Dunn test, using the baseline period (time -20 min to time 0) as the covariate and the treatment period (time 0 to time 120min) as the repeated observations. Blood gas parameters were compared using Wilcoxon test. A *p* value <0.05 was considered statistically significant. ANOVA for repeated measures was used to analyze in vitro data.

Results

***In vivo* protocol: Pulmonary haemodynamic response to EPA (n=8), DHA (n=7) or ethanol (n=6) in fetal lambs**

EPA did not alter HR (176 \pm 1 vs. 175 \pm 2 beats/min), PAP (52 \pm 0.2 vs. 52 \pm 0.5 mmHg) or PAo (51 \pm 0.6 vs. 51 \pm 0.7 mmHg) over time. A significant increase in LPA blood flow was noted from start of EPA infusion, from 82 \pm 2 to 100 \pm 2mL/min (*p*<0.001). The elevation of LPA flow was associated with a significant reduction in PVR from 0.52 \pm 0.01 to 0.42 \pm 0.01 mmHg·mL⁻¹·min⁻¹ (*p*<0.001).

During the infusion of DHA, no significant difference was observed in HR (168 \pm 3 vs. 160 \pm 3 beats/min), PAP (53 \pm 0.3 vs. 54 \pm 0.4mmHg) or PAo (52 \pm 0.6 vs. 52 \pm 0.5mmHg). Mean LPA blood flow was not significantly different (84 \pm 3mL/min at baseline and 89 \pm 3mL/min after

DHA). Similarly, changes in PVR were not significant ($0.46 \pm 0.03 \text{ mmHg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ vs. $0.50 \pm 0.03 \text{ mmHg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

EPA induced a significant and prolonged 25% drop in PVR compared to DHA ($p < 0.001$, Fig1) or ethanol ($p < 0.001$, Fig2). Blood gases were not modified during EPA or DHA infusion (Table1)(Wilcoxon test, $p > 0.05$). Infusion of ethanol solution (control) did not change the hemodynamic variables (Fig 2).

***In vitro* protocol: Vascular response to EPA and to DHA in fetal pulmonary artery rings**

Ten lambs were sacrificed to carry out these *in vitro* protocols. Twenty four rings were mounted. The E+ group (with endothelium) consisted of 12 rings and the E- group (stripped of endothelium) of 6 rings. Six rings with intact endothelium were incubated with LNA before pre-contraction with 5-HT, and represented the LNA E+ group.

All rings were contracted with 80mM KCl to test vasoreactivity after mounting. The induction of relaxation with $10 \mu\text{M}$ Ach was higher in the E+ group compared to the E- group (respectively $20 \pm 7\%$ vs. $5 \pm 3\%$, $p < 0.05$), confirming the presence or absence of endothelium. Incubation with $100 \mu\text{M}$ LNA had no direct effect on rings tension. After pre-contraction with $100 \mu\text{M}$ 5HT, $10 \mu\text{M}$ Ach incubation caused a significant vasorelaxation by $-45 \pm 17\%$ ($p < 0.01$). The vasorelaxation induced by $10 \mu\text{M}$ Ach was significantly lower with $100 \mu\text{M}$ LNA than without LNA incubation (respectively $+4 \pm 11\%$ vs. $-45 \pm 17\%$, $p < 0.001$), indicating that ACh-induced vasorelaxation is mediated by NO production. Relaxation during incubation with $10 \mu\text{M}$ SNP was not significantly different between the E+ and E- groups ($50 \pm 8\%$ vs. $40 \pm 5\%$), indicating that the smooth muscle function was similar in the 2 groups at the end of the experiments.

After pre-contraction with 5-HT, incubation with increasing concentrations of EPA ($1-300 \mu\text{M}$) resulted in maximum relaxation in the E+ group (from $-4 \pm 1\%$ to $-60 \pm 11\%$, $p < 0.001$) (Fig3). In

the E- group, increasing concentrations of EPA did not change the tension of the rings (from $2\pm 1\%$ to $-1\pm 2\%$). The vasorelaxant effect of EPA was lower in LNA E+ group than in E+ group ($p < 0.001$), although a significant dose-related vasorelaxant effect of EPA was still recorded ($p < 0.05$).

Only the highest concentration of DHA ($300\mu\text{M}$) caused a mild vasorelaxant response (from $-5\pm 5\%$ to $-25\pm 13\%$). However, the vasorelaxant effect of EPA was greater than DHA ($p < 0.001$).

Discussion

In this study, we investigated the effects of n-3PUFAs on the perinatal lung. We studied the effects of EPA and DHA on basal pulmonary vascular tone in chronically monitored fetal lambs during the end of gestation. We found that EPA induced a prolonged pulmonary vasodilatory response, whereas DHA did not change the pulmonary vascular tone. Using pulmonary arterial rings isolated from fetal lambs, we also showed that EPA induces a striking dose-related vasorelaxation. This vascular response to EPA is abolished by endothelial stripping and reduced by inhibition of endothelial NO synthase. Although DHA causes only a mild vasorelaxant response at the highest concentration, the relaxing effect of DHA is less potent than EPA. Taken together, our data indicate that EPA causes a potent and sustained vasodilatation in the fetal pulmonary circulation through the activation of eNOS and enhanced production of NO.

Several studies have highlighted a protective cardiovascular effect of n-3PUFAs, including EPA, in adults. A diet enriched in n-3PUFAs reduces morbidity and mortality related to cardiovascular disease both due to primary and secondary preventive effects.^{8,9} Compared to diets containing n-6PUFAs, n-3PUFAs promotes endothelial function in healthy adults.¹⁰

Other studies have investigated the effects of n-3PUFAs on pulmonary circulation, especially

in pathological conditions. An experimental work in a rat model of chronic pulmonary hypertension has shown reduced mortality in hypoxic rats fed with fish oil (enriched in n-3PUFAs).⁴ In a rat model of pulmonary hypertension induced by monocrotaline, the inhibition of the degradation of n-3PUFA-derived metabolites delays the vascular remodeling.¹¹ Vasorelaxant effects of n-3PUFA metabolites has been found in isolated human pulmonary arteries.^{12,13} We previously showed that maternal n-3PUFA supplementation during late pregnancy and the early postnatal period prevents lung injuries in neonatal rat pups exposed to prolonged hyperoxia.¹⁴ Furthermore, n-3PUFAs supplementation had beneficial effects in adults with acute respiratory distress syndrome through improvement of the endothelial functions.¹⁵

Our study provides new information on the effects of n-3PUFAs on the perinatal lung. EPA, but not DHA, decreases PVR indicating a potent vasodilatory effect of EPA within the lung, without adverse effect on the systemic haemodynamic as aortic pressure and heart rate were not altered during EPA infusion. The vascular effect observed is a direct effect of EPA and not related to changes in oxygenation, as no significant changes in PaCO₂ and the PaO₂ are observed during EPA infusion. In addition, the absence of significant changes in blood gases and lactate indicate that placental perfusion and tissue oxygenation are not affected. Ethanol -in which EPA and DHA are dissolved- is not responsible for the vascular effects observed during the administration of EPA, as none of the hemodynamic parameters changed during ethanol infusion.

Our *in vitro* experiments clearly highlight a striking dose-related vasorelaxant effect of EPA in isolated fetal pulmonary vascular rings at concentrations ranging from 1 to 300µM. A previous study indicates that dietary fish oil supplementation during pregnancy results in a 5-fold increase in EPA and a 2-fold increase in DHA concentration in the plasma of the

umbilical cord at birth, as well as in the plasma of newborn infants fed with breast milk whose mothers are supplemented with fish oil.¹⁶ In this study, the fetal (cord blood) and neonatal plasma concentrations of EPA (from 40 to 100 μ M) are within the range of maximal pulmonary vasorelaxant effects of EPA found in our *in vitro* study. At the opposite, only the highest concentration of DHA (300 μ M) induced a slight pulmonary vessels relaxation. IV or dietary supplementation with fish oil results in an increase in plasma DHA concentrations from 75 to 125 μ M.^{16,17} In this range of DHA concentrations, no significant vasorelaxant effect was observed *in vitro*. Therefore, evidence exist that dietary supplementation with fish oil in pregnant or lactating women have the potential to elevate EPA and DHA concentrations in the fetus and the infant.¹⁶ However, it is likely that only EPA, but not DHA, may have the potential to alter the hemodynamics of the perinatal lung.

The mechanisms of action of n-3PUFAs are complex and presently uncertain. We addressed the mechanisms of action of EPA on isolated fetal pulmonary arteries. Endothelial damage abolishes the vasorelaxant effect of EPA, indicating that EPA-mediated relaxation is endothelium-dependant. Furthermore, inhibition of eNOS by LNA significantly decreases the vasorelaxant effect of EPA. Previous studies suggested the role of NO release in vascular response to EPA. In two studies on bovine coronary arteries and adult sheep pulmonary arteries, EPA induced an endothelium-dependent vasorelaxant effect mediated by the release of NO.^{18,19} However, our data in pulmonary vessels rings clearly highlights that a vasorelaxant response to EPA exists in spite of NO synthase inhibition, even though the response is reduced. Our previous study in fetal lambs are in accordance with this finding as a vasodilator effects of IV Omegaven[®] -a lipid emulsion enriched with polyunsaturated omega 3 fatty acids- was reported after NO synthase inhibition.⁵ Taken together, these results indicate that the vascular effect of EPA in the perinatal lung is endothelium- and

dose-dependent and is mediated at least in part by endothelium NO synthase activation but also by the release of other endothelium-dependent vasorelaxant mediators.

Perspective and conclusion

PPHN is characterized by sustained elevation of pulmonary vascular resistance after birth. Medical management includes mechanical ventilation and inhaled NO. Our data provide evidence for potential beneficial effects of EPA on the pulmonary circulation. The amounts of EPA require for pharmacological effects are those provided by routine supplementation of fish oil-derived fat emulsion to parenteral nutrition. We speculate that EPA supplementation may contribute to improve pulmonary circulation in PPHN.

Furthermore, several studies showed that the fetal nutritional environment plays a critical role in the maladaptation of the lung circulation at birth. For instance, it has been well established that maternal obesity and diabetes are associated with increased risks of PPHN.²⁰ In the same way, newborns with PPHN are deficient in the amino acid, L-arginine, which is required for NO synthesis.²¹ Evidence exists that differential vascular effects can be expected according to lipid intake. Our study suggests that EPA may be beneficial in conditions associated with pulmonary hypertension through endothelial NO release. EPA can easily be transfer across the placenta toward the fetus after maternal intake of diet enriched in n-3PUFAs.²² We further speculate that dietary fish oils during the pregnancy may help to prevent maladaptation at birth in high risk conditions for PPHN.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge Arnold Dive, Michel Pottier and Dr Thomas Hubert (DHURE, Université Lille 2) for their advices and technical support. The authors gratefully acknowledge Dr Julien De Jonckheere for his important contribution to the statistical analysis and Dr Nicolas Grossin for his technical support for *in vitro* experiment.

S.D., H-D.V., R.B., D.P. and S.L. designed research; S.D., A.E., O.T. and H.A. conducted research; S.D., A.E. O.T and S.L. analysed data; and S.D., A.E. and S.L. wrote the paper. S.L. had primary responsibility for final content. All authors read and approved the final manuscript.

REFERENCES

1. Bhat R, Salas AA, Foster C, Carlo WA, Ambalavanan N. Prospective analysis of pulmonary hypertension in extremely low birth weight infants. *Pediatrics* 2012;129:682-9.
2. 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;34:2325-33.
3. Singer P, Theilla M, Fisher H, Gibstein L, Grozovski E, Cohen J. Benefit of an enteral diet enriched with eicosapentaenoic acid and gamma-linolenic acid in ventilated patients with acute lung injury. *Crit Care Med* 2006;34:1033-8.
4. Archer SL, Johnson GJ, Gebhard RL, et al. Effect of dietary fish oil on lung lipid profile and hypoxic pulmonary hypertension. *J Appl Physiol* (1985) 1989;66:1662-73.
5. Houeijeh A, Aubry E, Coridon H, et al. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in the fetal pulmonary circulation. *Crit Care Med* 2011;39:1431-8.
6. Larrue B, Jaillard S, Lorthioir M, et al. Pulmonary vascular effects of sildenafil on the development of chronic pulmonary hypertension in the ovine fetus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288:1193-1200.
7. 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.
8. Massaro M, Scoditti E, Carluccio MA, De Caterina R. Basic mechanisms behind the effects of n-3 fatty acids on cardiovascular disease. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2008;79:109-15.

9. Harris WS. The omega-3 index: clinical utility for therapeutic intervention. *Curr Cardiol Rep* 2010;12:503-8.
10. Khan F, Elherik K, Bolton-Smith C, et al. The effects of dietary fatty acid supplementation on endothelial function and vascular tone in healthy subjects. *Cardiovasc Res* 2003;59:955-62.
11. 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;27:322-31.
12. Morin C, Guibert C, Sirois M, Echave V, Gomes MM, Rousseau E. Effects of omega-hydroxylase product on distal human pulmonary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:1435-43.
13. Morin C, Sirois M, Echave V, Rizcallah E, 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;296:130-9.
14. Sharma D, Nkembi AS, Aubry E, et al. Maternal PUFA ω -3 Supplmentation Prevents Neonatal Lung Injuries Induced by HYperoxia in Newborn Rats. *Int J Mol Sci* 2015;16:22081-93
15. Nelson JL, DeMichele SJ, Pacht ER, Wennberg AK, Enteral Nutrition in ASG. Effect of enteral feeding with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid, and antioxidants on antioxidant status in patients with acute respiratory distress syndrome. *J Parenter Enteral Nutr* 2003;27:98-104.
16. Helland IB, Smith L, Saarem K, Saugstad OD, Drevon CA. Maternal Supplementation With Very-Long-Chain n-3 Fatty Acids During Pregnancy and Lactation Augments Children's IQ at 4 Years of Age. *Pediatrics* 2003; 111:39-44.

17. Larsen BM, Field CJ, Leong AY, et al. Pretreatment with an intravenous lipid emulsion increases plasma eicosapentanoic acid and downregulates leukotriene B₄, procalcitonin, and lymphocyte concentrations after open heart surgery in infants. *J Parenter Enteral Nutr* 2015;39:171-9.
18. Omura M, Kobayashi S, Mizukami Y, et al. Eicosapentaenoic acid (EPA) induces Ca²⁺-independent activation and translocation of endothelial nitric oxide synthase and endothelium-dependent vasorelaxation. *FEBS Lett* 2001;487:361-6.
19. Singh TU, Kathirvel K, Choudhury S, Garg SK, Mishra SK. Eicosapentaenoic acid-induced endothelium-dependent and -independent relaxation of sheep pulmonary artery. *Eur J Pharmacol* 2010;636:108-13.
20. Nohr EA, Villamor E, Vaeth M, Olsen J, Cnattingius S. Mortality in infants of obese mothers: is risk modified by mode of delivery? *Acta Obstet Gynecol Scand* 2012;91:363-71.
21. Vosatka RJ, Kashyap S, Trifiletti RR. Arginine deficiency accompanies persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Biol Neonate* 1994 66:65-70.
22. Hanebutt FL, Demmelmair H, Schiessl B, Larqué E, Koletzko B. Long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) transfer across the placenta. *Clin Nutr* 2008;27:685-93.

Table 1: Blood gases, HbO₂ saturation and plasma lactates concentration before and after 120 min EPA or DHA infusion (*In vivo* protocol)

	Baseline	After 120 min of EPA	<i>p</i>		Baseline	After 120 min of DHA	<i>p</i>
pH	7.40 ± 0.04	7.38 ± 0.04	0,07	pH	7.39 ± 0.07	7.38 ± 0.08	0,43
PaCO₂	47 ± 7	48 ± 8	0,30	PaCO₂	47 ± 5	46 ± 8	0,67
PaO₂	13 ± 4	13 ± 4	0,53	PaO₂	13 ± 4	15 ± 5	0,06
Lactates	1 ± 0.5	1 ± 0.4	0,23	Lactates	1 ± 0.2	1 ± 0.5	0,94
HCO³⁻	29 ± 4	28 ± 4	0,59	HCO³⁻	28 ± 3	27 ± 5	1
HbO₂ saturation	50 ± 20	52 ± 18	0,55	HbO₂ saturation	52 ± 19	54 ± 21	0,25

Values are means ± SEMs, n=8 (EPA) or n=7 (DHA). PaCO₂, mmHg; PaO₂, mmHg; Lactates, plasma lactate concentration in mmol/L; HCO³⁻, mmol/L; HbO₂ saturation, %. Baseline values compared to values at time after 120 min by Wilcoxon test.

FIGURES & LEGENDS

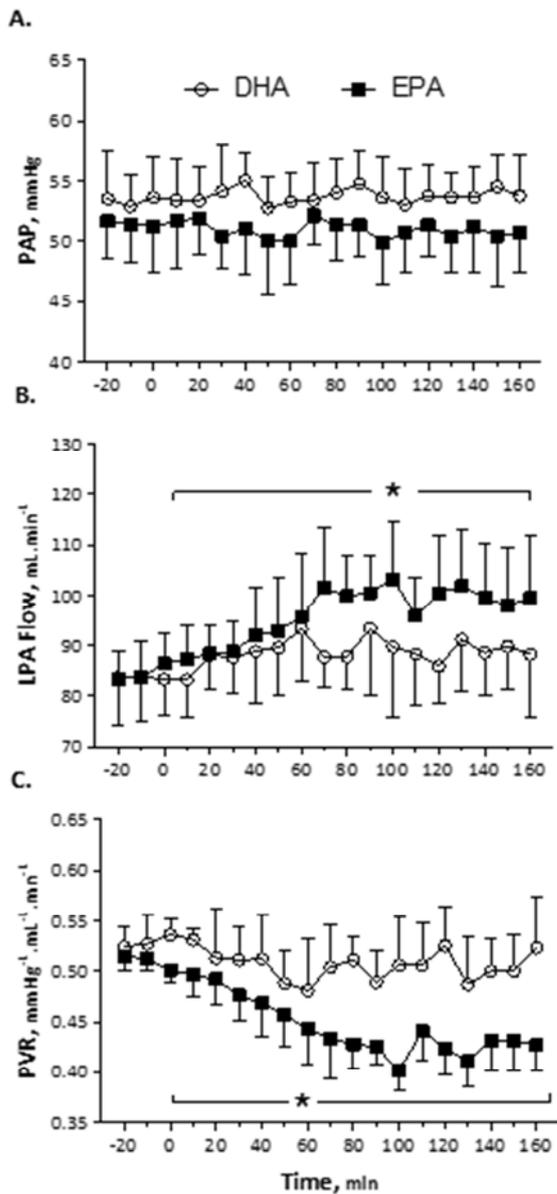


Figure 1: Evolution of pulmonary artery pressure (PAP), left pulmonary artery blood flow (LPA flow) and pulmonary vascular resistance (PVR) in response to infusion of EPA compared to infusion of DHA (*In vivo* experiment). EPA or DHA were infused from T0 to T120. LPA flow was greater and PVR lower during EPA than during DHA infusion. Values are means \pm SEMs, n=8 (EPA) or 7 (DHA). *= $p < 0.001$ comparing EPA vs. DHA groups.

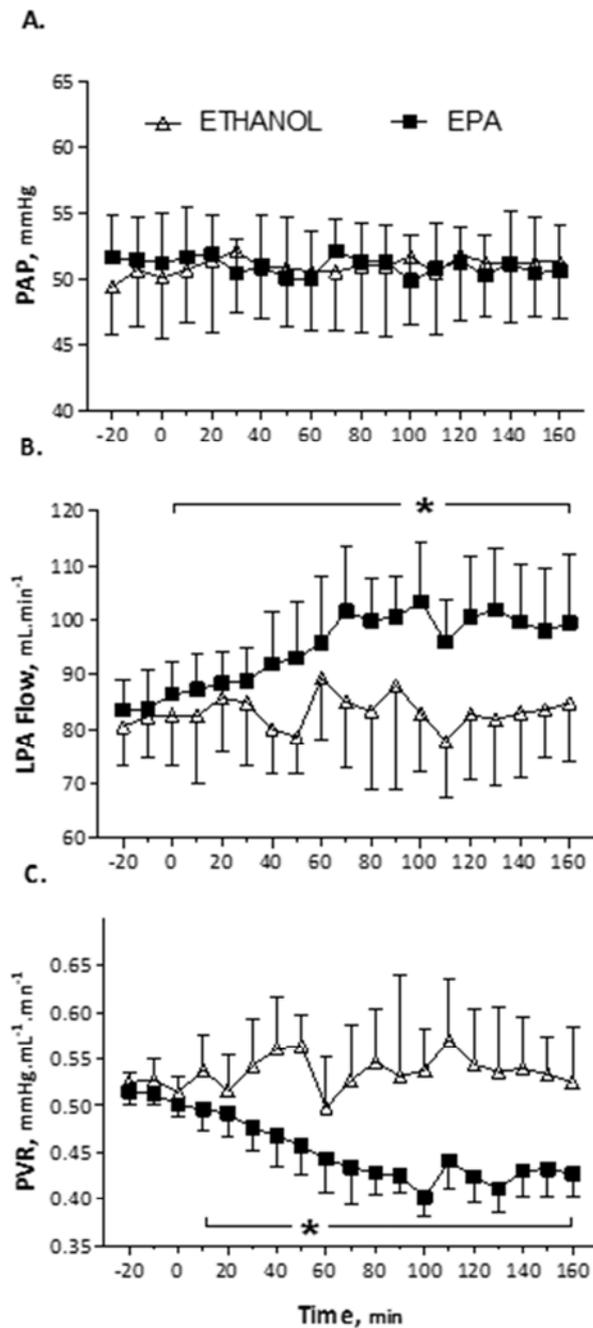


Figure 2: Evolution of pulmonary artery pressure (PAP), left pulmonary artery blood flow (LPA flow) and pulmonary vascular resistance (PVR) in response to infusion of EPA compared to infusion of ethanol (*In vivo* experiment). EPA or ethanol were infused from T0 to T120. LPA flow was greater and PVR lower during EPA than during ethanol infusion. Results are expressed as means \pm SEMs, n=8 (EPA) or 6 (control). *= $p < 0.001$ comparing EPA vs. ethanol groups.

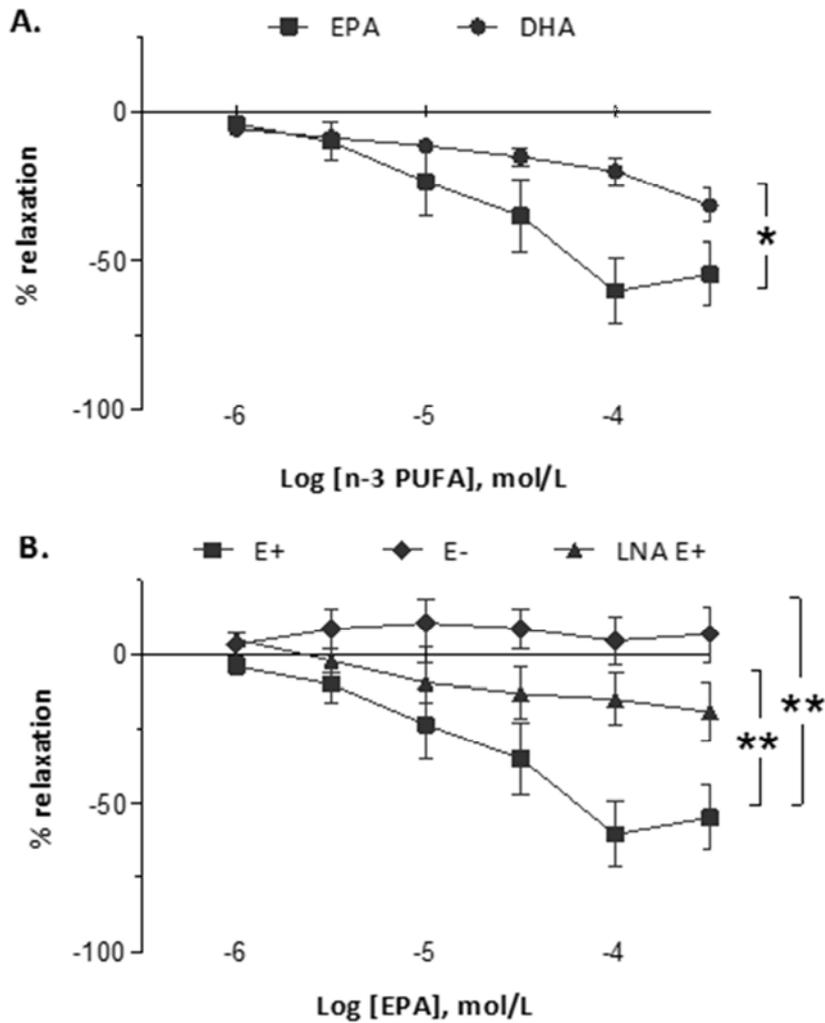


Figure 3: panel A. Vascular response to incremental increase in EPA and DHA in fetal pulmonary artery rings with intact endothelium (E+ rings). After pre-contraction with 5-HT (100 μ M), EPA causes a striking dose-response relaxation, whereas only a mild vasorelaxant response was observed at the highest DHA concentration (300 μ M); **panel B.** Vasoreactivity to EPA in pulmonary arterials rings with intact (E+) or stripped endothelium (E-), and after pre-incubation with L-nitro-arginine (LNA E+) pre-contracted with 100 μ M 5-HT. In the E-group, increasing concentrations of EPA did not change the rings tension. The vasorelaxant effect of EPA was lower in LNA E+ group than in E+ group. Results are expressed as mean \pm SEMs of % of variation of relaxation. **= $p < 0.001$ for E+ vs. E-, E+ vs. LNA E+

D. Discussion

Dans ce travail, nous avons étudié les effets de l'EPA et du DHA sur le tonus vasculaire basal pulmonaire dans un modèle de fœtus de brebis instrumenté in utero de façon chronique. Nous avons trouvé que l'EPA induisait une vasodilatation pulmonaire prolongée alors que le DHA ne changeait pas de façon significative le tonus vasculaire pulmonaire. Dans le protocole d'étude in vitro, nous avons montré que l'EPA avait une action vasodilatatrice puissante dose-dépendante sur les anneaux vasculaires isolés. Cette réponse vasculaire de l'EPA était abolie lorsque l'endothélium était lésé et diminuée par inhibition de la NO synthase endothéliale (eNOS). L'effet vasorelaxant du DHA était moins puissant que celui de l'EPA, avec une vasorelaxation modérée et significativement inférieure (à celle obtenue par une incubation de 100 μ M d'EPA) à la plus forte concentration de DHA (300 μ M). Nos données suggèrent que l'EPA est un puissant vasodilatateur sur la circulation pulmonaire fœtale par l'activation de l'eNOS et par l'augmentation de production du NO.

Plusieurs études ont souligné l'effet protecteur cardiovasculaire des AGPI ω -3, dont l'EPA, chez l'adulte. Une alimentation enrichie en AGPI ω -3 réduit la morbidité et la mortalité liée aux maladies cardiovasculaires dans le cadre d'une prévention primaire mais aussi secondaire [69,70]. Comparée à l'alimentation enrichie en AGPI ω -6, les AGPI ω -3 améliore la fonction endothéliale chez les adultes sains [71]. D'autres études ont démontré les effets des AGPI ω -3 sur la circulation pulmonaire, en particulier en situation pathologique. Une étude expérimentale sur un modèle d'HTAPP chez le rat a démontré la diminution de la mortalité des rats en hypoxie chronique avec un régime alimentaire à base d'huiles de poisson, enrichi en AGPI ω -3 [68]. Dans un modèle d'HTAPP induite par la monocrotaline, l'inhibition de la dégradation des métabolites dérivés des AGPI ω -3 a révélé un délai retardé de l'apparition du remodelage vasculaire [30]. Les effets vasorelaxants des métabolites des AGPI ω -3 ont également été étudiés sur des anneaux isolés d'artères pulmonaires humaines [27,72]. Nous avons précédemment démontré que la supplémentation maternelle en AGPI ω -3 prévenait les lésions pulmonaires de DBP chez les ratons

exposés à l'hyperoxie en période néonatale. De plus, la supplémentation en AGPI ω -3 a des effets bénéfiques chez les adultes en situation de SDRA, par l'amélioration des fonctions endothéliales [73].

Notre étude apporte une nouvelle information sur les effets pulmonaires des AGPI ω -3 en période néonatale. L'EPA, et non le DHA, diminue de façon significative les résistances vasculaires pulmonaires indiquant un puissant effet vasodilatateur sur le poumon, sans effet délétère sur la circulation systémique avec une pression aortique et une fréquence cardiaque stables durant la perfusion d'EPA. L'effet vasculaire observé est directement celui de l'EPA et non liée à des modifications de l'oxygénation tissulaire puisqu'aucune différence significative n'était retrouvée concernant les pressions partielles en oxygène ou en dioxyde de carbone durant la perfusion d'EPA. De plus, l'absence de modifications des gaz du sang artériels et de lactates indiquait l'intégrité de la perfusion placentaire et de l'oxygénation tissulaire. L'éthanol, solvant de l'EPA et du DHA, n'était pas responsable des effets vasculaires observés lors de l'administration de l'EPA et aucun paramètre hémodynamique n'était modifié lors de la perfusion contrôlée d'une faible quantité d'éthanol.

L'étude *in vitro* a mis en évidence un puissant effet vasorelaxant de l'EPA, dose-dépendant, avec incubation à doses croissantes de 1 à 300 μ M d'anneaux vasculaires pulmonaires fœtaux isolés. Dans l'étude de Helland et al. [74], une alimentation enrichie en AGPI ω -3 durant la grossesse augmentait la concentration plasmatique en EPA de 5 fois et en DHA de 2 fois au sang du cordon à la naissance, comme les concentrations plasmatiques des nouveau-nés nourris par allaitement dont les mères avaient une alimentation enrichie en huile de poisson. Dans cette étude, les concentrations plasmatiques fœtale (sang du cordon) et néonatales d'EPA comprises entre 40 et 100 μ M correspondent aux concentrations d'EPA utilisées dans notre étude, responsables de l'effet vasorelaxant maximal sur les anneaux isolés. A l'opposé, seule la plus grande concentration de DHA utilisée (300 μ M) était responsable d'une faible vasorelaxation des vaisseaux pulmonaires. La supplémentation intraveineuse d'AGPI ω -3 ou orale avec les huiles de poisson augmentent les taux plasmatiques de DHA de 75 à 125 μ M [58,74]. Dans cette gamme de concentrations de DHA, aucun effet n'a été observé *in vitro*.

Il est évident qu'une diététique enrichie en huile de poissons chez les femmes enceintes ou allaitant peut élever les concentrations plasmatiques du fœtus et du nouveau-né [74]. Cependant, il semble que seul l'EPA, et non le DHA, ait une action sur la circulation pulmonaire en période périnatale.

Les mécanismes d'action des AGPI ω -3 sont complexes. Nous avons exploré les mécanismes d'actions de l'EPA sur les anneaux artériels pulmonaires fœtaux isolés. L'EPA n'avait pas d'effet vasorelaxant lorsque l'endothélium était lésé, ce qui indiquait que cet effet était endothélium-dépendant. De plus, l'inhibition de la eNOS par le LNA diminuait de façon significative l'effet vasorelaxant de l'EPA. Des études avaient suggéré le rôle de la production de NO dans la réponse vasculaire à l'EPA. Dans 2 d'entre elles, sur des artères coronaires bovines [75] et sur des artères pulmonaires de mouton [76], l'EPA induisait une vasorelaxation endothélium-dépendante médiée par la voie du NO. De plus, nos données de l'étude in vitro retrouve une vasorelaxation à l'EPA malgré l'inhibition de l'eNOS, même si elle est réduite. Notre précédente étude sur le fœtus de brebis [63] avait constaté un effet vasodilatateur d'une perfusion d'Omegaven®, une émulsion lipidique enrichie en AGPI ω -3 après inhibition de la NO synthase. Ces résultats indiquent que l'effet vasculaire de l'EPA sur la circulation pulmonaire périnatale est endothélium et dose-dépendent et qu'il est médié en partie par l'activation de l'eNOS mais également par la production d'autres médiateurs vasorelaxant endothélium-dépendents.

En conclusion, notre étude suggère que l'EPA peut avoir un effet bénéfique sur l'HTAPP par la production endothéliale de NO. Après une prise alimentaire enrichie en AGPI ω -3, l'EPA peut être facilement transporté à travers le placenta vers le fœtus [54]. C'est pourquoi nous posons le postulat que la nutrition enrichie en AGPI ω -3 durant la grossesse peut prévenir la maladaptation à la vie extra-utérine dans les situations à haut risque d'HTAPP du nouveau-né.

III. ETUDE DE L'EFFET DE LA DEHYDROEPIANDROSTERONE (DHEA) SUR LA CIRCULATION PULMONAIRE CHEZ LE FETUS DE BREBIS

A. Introduction

L'hypertension artérielle pulmonaire persistante (HTAPP) est une pathologie sévère d'étiologie multifactorielle, responsable d'un remodelage vasculaire et d'une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires (RVP) aboutissant progressivement à l'insuffisance ventriculaire droite avec une mortalité non négligeable [77]. En période néonatale, l'HTAPP du nouveau-né est la conséquence d'un défaut de diminution des RVP à la naissance. De nombreux mécanismes sont impliqués dans l'adaptation cardio-circulatoire à la vie extra-utérine [78-82]. En situation pathologique, les RVP élevées ne permettent pas l'accroissement du débit sanguin pulmonaire et entraîne la persistance d'un shunt cardiaque droit-gauche (perméabilité du canal artériel et du foramen ovale) ainsi qu'une hypoxémie sévère [83]. Le traitement par monoxyde d'azote inhalé a diminué les indications de l'oxygénation par membrane extra-corporelle (ECMO) et a nettement amélioré le pronostic de ces enfants [84]. Cependant, il persiste encore des cas d'hypoxémie réfractaire pour lesquels la recherche d'autres alternatives thérapeutiques est nécessaire. La déhydroépiandrostérone et son dérivé métabolique la déhydroépiandrostéone-sulfate sont des hormones stéroïdes secrétées par le cortex surrénalien et demeurent les hormones stéroïdiennes les plus abondantes dans la circulation sanguine chez l'homme [85]. L'évolution du taux sanguin de DHEA diminue progressivement avec l'âge [86,87]. De la même façon, la concentration fœtale de DHEA-S est plus basse en fin de grossesse [88]. Le rôle de la DHEA n'a pas clairement été défini chez l'homme, mais il a été démontré que les hormones sexuelles, dont la DHEA, étaient impliquées dans la susceptibilité ou le développement de maladie cardiovasculaire ou d'une hypertension pulmonaire [35,89]. Beaucoup d'études ont démontré les effets cardioprotecteurs de la DHEA, mais également d'autres nombreux effets bénéfiques (« hormone anti-âge ») [90,91].

De plus récents travaux ont souligné une activité de la DHEA sur la circulation pulmonaire. Elle améliore l'HTAPP induite par exposition chronique à l'hypoxie ou par injection de monocrotaline chez les rats adultes [31-34]. In vitro, la DHEA entraîne une relaxation des cellules musculaires lisses des vaisseaux pulmonaires de furets mais aussi de cellules cultivées à partir d'explants d'artères pulmonaires humaines [92,93]. Cependant, l'effet de la DHEA sur la circulation pulmonaire fœtale n'est pas connu.

Nous posons l'hypothèse que la DHEA aurait un effet vasodilatateur pulmonaire chez le fœtus, ce qui permettrait d'envisager son utilisation thérapeutique dans le traitement de l'HTAPP du nouveau-né. Pour tester cette hypothèse et pour en explorer le mécanisme d'action, nous avons étudié l'effet de bolus intraveineux de DHEA à doses croissantes, avec ou sans pré-traitement par la L-Nitro-Arginine (LNA, inhibiteur de la NO synthase) sur la circulation pulmonaire fœtale dans un modèle de brebis gestante instrumenté in utero de façon chronique.

B. Matériels et Méthodes

1/ **Modèle expérimental**

Cf. CHAPITRE 2.

2/ **Protocoles**

Le but de l'étude était d'évaluer les effets de bolus intraveineux de DHEA sur la circulation pulmonaire fœtale in vivo dans le modèle de fœtus de brebis. L'effet-dose de la DHEA (bolus intraveineux direct sur 5 minutes de 6, 12 et 24 mg) ainsi que le mécanisme d'action de la DHEA (doses 12 et 24 mg) par blocage de NO synthase par L-Nitro-Arginine (30 mg de LNA) étaient étudiés selon les 2 protocoles expérimentaux détaillés dans l'article prochainement soumis à Pediatric Research:

Dyuti Sharma, Hélène Coridon, Estelle Aubry, Ali Houeijeh, Véronique Houfflin-Debarge, Rémi Besson, Philippe Deruelle, Laurent Storme. *Effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on fetal pulmonary circulation: an experimental study in fetal lambs.*

3/ Analyses statistiques

Les analyses statistiques étaient réalisées à l'aide du logiciel StatView 4.5 software pour PC (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). Pour chaque protocole, *n* indiquait le nombre de fœtus étudiés (observations indépendantes). Les résultats étaient exprimés en moyenne affectées de leurs erreurs standards (ESM) ou en pourcentage de variation maximale à partir de la moyenne de période de stabilité. La comparaison entre les groupes utilisait un test d'analyse de variance simple ou à mesures répétées (ANOVA one-way ou repeated ANOVA) et, un test a posteriori de Bonferroni, pour les comparaisons multiples, en utilisant la période de stabilité (temps T-30 min au temps T0) comme covariable et la période de traitement (jusqu'à 60 min après la fin de l'injection, temps T0 au temps T65 ou T95 min (protocole LNA)) comme mesures répétées. Les gaz du sang et les dosages de DHEA (exprimé en ng/mL) et DHEA-S (exprimé en $\mu\text{mol/L}$) étaient comparés à l'aide d'un test non paramétrique de Wilcoxon. Une différence avec une valeur du $p < 0.05$ était considérée comme statistiquement significative.

C. Résultats

Ce travail a fait l'objet d'un article prochainement soumis :

Dyuti Sharma, Hélène Coridon, Estelle Aubry, Ali Houeijeh, Véronique Houfflin-Debarge, Rémi Besson, Philippe Deruelle, Laurent Storme. *Effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on fetal pulmonary circulation: an experimental study in fetal lambs.*

Effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on fetal pulmonary circulation: an experimental study in fetal lambs

D. Sharma^{1,2}, H. Coridon^{1,3}, E. Aubry^{1,2}, A. Houeijeh^{1,4}, V. Houfflin-Debargé^{1,5}, R. Besson^{1,2}, P. Deruelle^{1,5}, L. Storme^{1,4}

¹Univ. Lille, EA 4489 - Environnement Périnatal et Santé, F-59000 Lille, France

²CHU Lille, Clinique de Chirurgie Pédiatrique, Hôpital Jeanne de Flandre, F-59000 Lille, France

³Hopital MFME, Service de chirurgie pédiatrique, Fort-de-France, Martinique, France

⁴CHU Lille, Clinique de Néonatalogie, Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU Lille, F-59000, Lille, France

⁵CHU Lille, Clinique de Gynécologie-Obstétrique, Hôpital Jeanne de Flandre, F-59000, Lille, France

* To whom correspondence should be addressed. *Mail to:* laurent.storme@chru-lille.fr

Author's disclosure: The author has not disclosed any potential conflicts of interest

Abstract: 421 words

Manuscript: 3746 words

Abstract

Persistent pulmonary hypertension (PPH) in the newborn remains a severe potential complication of the transition to extra-uterine life with significant morbidity and mortality in the perinatal period. Dehydroepiandrosterone (DHEA) is a steroid hormone with protective effects on the vascular system, which include improvement of PPH in several animal models (rodents, swine and sheep). DHEA also represents a new pharmacological agent that might be used to treat PPH in humans. We hypothesized that DHEA could decrease pulmonary vascular resistance (PVR) in the pulmonary circulation of fetal sheep.

Methods: We studied the vascular effect of a bolus infusion of DHEA in fetal lambs in utero using chronically instrumented sheep at 128 days of gestation. In addition, we used catheters in the systemic and pulmonary circulation with a Doppler probe in the left pulmonary artery (LPA). PVR was computed by monitoring the pulmonary arterial pressure (PAP) and LPA blood flow before, during and after bolus infusion of increasing doses of DHEA

(6, 12 and 24 mg). To determine the mechanism of action, we assessed the infusion of L-nitroarginine (LNA), an inhibitor of NO production, 30 min before a 5-min infusion of 12 mg or 24 mg of DHEA. Blood gases and doses of DHEA and DHEA-sulfate were measured in both the sheep and fetus 30 min before and 30 min after the bolus infusion of DHEA.

Results: Bolus infusion of DHEA had a vasodilator effect on the fetal pulmonary circulation with a significant decrease in PVR (-11 % of maximal variation of PVR after bolus of 6 mg DHEA, -14 % after bolus of 12 mg DHEA and -36 % after bolus of 24 mg DHEA, $p < 0.01$) without damaging effects on the systemic circulation. The vascular effect was short-lived, beginning 5 min after the DHEA bolus and maximal 15 min after the DHEA bolus. No significant difference was observed between blood gases measured before and after DHEA infusion ($p > 0.05$). Dilution of DHEA required excipients (DMSO and Cremophor®), which were contained in the control solution, without a proper effect on fetal pulmonary circulation. Blood levels of DHEA and DHEA-sulfate increased significantly in the fetus after the DHEA bolus, but not in the sheep.

The inhibitory effect of pre-treatment with 30 mg LNA bolus resulted in a significant increase in PVR (+ 4.8 % after LNA/12 mg DHEA infusion versus -14% after 12 mg DHEA 5-min infusion, $p < 0.005$) and + 13.12% after LNA/24 mg DHEA infusion versus -36% with 24 mg DHEA, $p < 0.001$).

Conclusion: We demonstrated a potent vasodilator effect of DHEA on fetal pulmonary circulation without deleterious effects on the systemic circulation or on tissue oxygenation. DHEA might represent a new treatment for PPHN in newborns. Further studies should assess the possibility of oral treatment in perinatal period.

Keywords: sex hormone, dehydroepiandrosterone, persistent pulmonary hypertension of the newborn, neonatal pulmonary circulation

Introduction

Persistent pulmonary hypertension (PPH) is a severe disease of multifactorial etiology that results in many hemodynamic changes, such as severe pulmonary vascular remodeling, increased pulmonary vascular resistance (PVR), right ventricular failure and death [1]. During the perinatal period, PPH of the newborn results from a lack of a physiological decrease in PVR at birth. Multiple mechanisms contribute to normal circulatory adaptation to extra-uterine life [2-6]. In pathological conditions, pulmonary blood flow remains low with a prolonged increase in PVR and PPH, which is associated with a right-left blood shunt (via the patent ductus arteriosus and ovale foramen) with severe hypoxemia [7]. Inhaled nitric oxide has reduced the need for extracorporeal membranous oxygenation (ECMO) and has improved the prognosis of these children [8]. However, refractory hypoxemia may persist, and the search for other therapeutic alternatives is necessary.

Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its 3 β -sulfate ester (DHEA-S), which are steroid hormones secreted by the adrenal cortex, are the most abundant circulating steroid hormone in humans [9]. However, blood levels of DHEA gradually decrease with advancing age [10,11]. A similar pattern was observed for DHEA-S during pregnancy in which the fetal concentration of DHEA-S decreased linearly with gestational age [12].

The role of DHEA in humans is not clearly defined, but it is well known that sex hormones, including DHEA, are involved in the susceptibility to or development of cardiovascular disease or pulmonary hypertension [13,14]. Many studies have suggested that DHEA has cardiovascular protective properties and many other beneficial effects (“anti-aging hormone”) [15,16].

Recent studies have focused on DHEA activity in the pulmonary circulation. DHEA improves chronic pulmonary hypertension in rodents (induced by chronic hypoxia or monocrotaline

injection) [17-21]. In vitro, DHEA causes vasodilation of smooth muscle cells removed from ferret lungs and cultured explants of human pulmonary arteries [22,23]. However, the effect of DHEA on the fetal pulmonary circulation is unknown.

We hypothesized that DHEA could have pulmonary vasodilatory effects in the fetus, which might indicate a therapeutic use for DHEA in PPH newborns. To test this hypothesis, and to understand the potential mechanisms of action of DHEA, we studied the effect of a bolus infusion of DHEA, both with and without pre-treatment by L-nitroarginine (LNA, inhibitor of NO synthase), on fetal pulmonary circulation in utero using chronically instrumented pregnant sheep.

Materials and methods

Animals

All animal procedures and protocols used in this study were approved by the French “Ministère de l’Agriculture, de la Pêche et de l’Alimentation” before the studies were conducted and were carried out in the Department of Experimental Research of our hospital center (animal experimentation agreement n°59286). Pregnant ewes of the Colombia-Rambouillet breed were housed in individual pens starting a week before (at 120 days of gestational; total gestation duration: 145 days) and throughout the procedure.

Surgical procedures

Fetal sheep underwent *in utero* surgery at a gestational age between 126 and 128 days, after fasting for 24 hours. General anesthesia was induced with intravenous propofol (Diprivan, 5 mL, 2%; Astra Zeneca, Caponago, Italy) and maintained with isoflurane gas (Aerrane, 1 to

5%; Baxter Healthcare Ltd., Norfolk, UK). Analgesia was provided by an injection of nalbuphine (Nubain[®], 20 mg, Serb Laboratory, Paris, France).

After a midline laparotomy and hysterotomy, local anesthesia (subcutaneous injection of 5 mL of lidocaine hydrochloride [10 mg/mL]) and fetal analgesia (intramuscular injection of 10 mg of nalbuphine) were performed to position catheters (18 G, Vygon, Ecoven, France) in the fetal aorta and fetal superior vena cava (SVC) through the axillary vessels. After a left thoracotomy, catheters were placed in the main pulmonary artery (MPA) and the left pulmonary artery (LPA) (18 G and 21 G, respectively), and an ultrasonic flowmeter probe (Transonic Systems[®], size 6S, Ithaca, NY, USA) was placed around the LPA. During closure of the hysterotomy, an amniotic infusion of 250 mL of isotonic saline serum containing 500 mg of amoxicillin + clavulanic acid (Augmentin Intravenous, 1 g/200 mg, GlaxoSmithKline UK) was performed using a 16 G catheter, which was left in place intra-amniotically to obtain a reference pressure. Postoperative analgesia of ewes was provided by an intravenous injection of nalbuphine (20 mg) that was repeated 6 hours after the first injection and then on a daily basis until the third day after surgery. Similarly, antibiotic prophylaxis was administered by daily intra-amniotic injections of 500 mg of amoxicillin + clavulanic acid, and fetal analgesia was provided by an intravenous injection of nalbuphine (10 mg) until the third day after surgery.

Catheters were maintained by daily 2 mL injections of heparinized (10 IU / mL) normal saline, and their positions were verified at autopsy. In vivo studies were performed after a recovery time of 48 hours to obtain hemodynamic stability.

Physiological measurements

Aortic, MPA and intra-amniotic catheters were connected to a pressure-monitoring system (Merlin, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA). Aortic pressure (PAo) and pulmonary arterial pressure (PAP) were referenced to the intra-amniotic pressure (IAP). Heart rate (HR) was calculated using the phasic signal from the PAP.

The LPA flow rate was continuously measured by the flowmeter using the mean of the phasic blood flow signal, with zero blood flow defined as the flow value measured immediately before the beginning of systole. PVR was calculated as the difference between PAP and left atrial pressure (LAP), divided by LPA flow, where LAP was previously determined to be equal to IAP+2 [24].

Blood samples from the MPA were used for blood gas analysis (i-STAT analyzer, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) and oxygen saturation measurement (OSM 3 hemoximeter and ABL 520 Radiometer, Copenhagen, Denmark).

Experimental design

Prior to in vivo experimentation, a stable baseline was obtained with saline infusion (6 mL/h) for 30 min through the SVC catheter. Then, the pulmonary hemodynamic response was studied during the 5-min infusion of DHEA (5 mL) or control solution (5 mL) into the SVC followed by saline infusion (5 mL). HR, mean PAP, mean PAo, mean IAP and mean LPA were recorded at 10-min intervals before delivering the bolus of DHEA and at 5-min intervals during a 60-min period thereafter. Blood gas and oxygen saturation measurements, as well as dosages of DHEA and DHEA-S (dehydroepiandrosterone sulfate), were determined for both the ewe and fetus during the baseline period (30 min before DHEA 5-min infusion) and

during the 35 min or 65 min (30 min after of DHEA bolus infusion) in each of the following protocols:

- Expt. 1: The effect on fetal pulmonary circulation with increasing doses of DHEA (bolus infusion of 6 mg, 12 mg and 24 mg of DHEA)

After a stable hemodynamic period of 30 min (baseline period), 6, 12 or 24 mg of DHEA was infused into the fetus as a 5 mL bolus, followed by 5 mL of saline solution.

The vascular response to the DHEA infusion was compared to that for the control solution.

The control solution was a 5-mL infusion of saline solution at either 2 % (6 and 12 mg doses of DHEA) or 4% (24 mg dose of DHEA).

- Expt. 2: The effect on fetal pulmonary circulation with a 5-min infusion of 12 mg and 24 mg of DHEA following an infusion of LNA (inhibition of NO production pathway)

After a stable hemodynamic period of 30 min (baseline period), 2.4 ml of LNA solution (30 mg) was infused as a bolus into the fetus at time 0 (T0) and was followed by a bolus infusion of 12 or 24 mg of DHEA solution at time T30.

Drug preparation

The solutions containing 6 and 12 mg of DHEA (expt. 1) were prepared using the following procedure: powder of DHEA (prasterone 25 g, Cooper®, Melun, France), a liposoluble hormone, was diluted in 2 % dimethyl sulfoxide (0.1 mL of DMSO, Sigma-Aldrich Laboratories, St Quentin-Fallavier, France) with addition of 2 % Cremophor® 0.1 mL (Sigma-Aldrich Laboratories, St Quentin-Fallavier, France) and 4.8 mL of saline solution.

The solution containing 24 mg of DHEA (expt. 1) was prepared using the following procedure: powder of DHEA was diluted in 4 % dimethyl sulfoxide (0.2 mL) with the addition of 4 % Cremophor® 0.2 mL and 4.6 mL of saline solution.

After a solution was prepared, the mixture was buffered with hydrochloric acid and sodium hydroxide to obtain a physiological pH.

The 2% and 4 % control solutions (expt. 1) were prepared, respectively, with 0.1 mL or 0.2 mL DMSO + 0.1 mL or 0.2 mL of Cremophor® in 4.8 mL or 4.6 mL of saline solution.

The LNA solution (expt. 2) was prepared immediately before in vivo experiments. LNA (30 mg) was dissolved in 0.2 mL of 1 M chlorhydric acid with the addition of 2 mL of normal saline; 0.2 mL of 1 M sodium hydroxide was used to titrate the pH to 7.40.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using StatView 4.5 software for PC (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). For both protocols (in vivo and in vitro), n indicates the number of fetuses studied (independent measures).

Results are expressed as the means \pm SEMs or as the percentage of maximum variation from baseline. Intergroup comparisons of the longitudinal changes were performed with an analysis of covariance (ANOVA) and the Bonferroni or Dunn test, using the baseline period (time -30 min to time 0) as the covariate and the treatment period, which included the 60-min period that began after the end of treatment (time 0 to time 65 [Expt. 1] or time 95 [Expt. 2] min), as the repeated observations. Blood gas measurements were compared using the non-parametric Wilcoxon test. A *p* value <0.05 was considered statistically significant. The results were expressed in ng/mL for DHEA and in μ mol/L for DHEA-S.

Results

Expt. 1: Vasodilator effect on fetal pulmonary circulation with increasing doses of DHEA 5-min infusion

A 5-min infusion of DHEA with 6 mg (n=7), 12 mg (n=7) or 24 mg (n=5) resulted in a decrease in PVR, with the largest decrease occurring 15 min after the bolus infusion (0.452 ± 0.024 (bolus 6 mg DHEA) vs. 0.511 ± 0.016 (control solution 2%) $\text{mmHg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$; 0.437 ± 0.018 (bolus 12 mg DHEA) vs. 0.511 ± 0.016 (control solution 2%) $\text{mmHg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$; and 0.321 ± 0.018 (bolus 24 mg DHEA) vs. 0.555 ± 0.027 (control solution 4%) $\text{mmHg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, significant difference for 12 mg and 24 mg DHEA bolus [$p < 0.001$]), with an increase in LPA blood flow. This effect started 5 min after the bolus infusion, persisted into a maximum relaxation 15 min after the bolus infusion, and had a total duration of 35 min (Fig. 1). No effects on the fetal pulmonary or systemic circulation were observed with infusion of the control solution.

The vasodilator effect increased gradually with the DHEA dose (6, 12 and 24 mg), showing a maximum percentage of variation of PVR at T15 min that was 11 %, 13.8 % and 35.7%, respectively. The vascular response that followed 24 mg bolus of DHEA was significantly greater than that following the 6 mg ($p < 0.001$) or 12 mg ($p < 0.005$) bolus of DHEA.

No significant difference was found between the blood gas measurements obtained 30 min before and 30 min after the bolus infusion of DHEA ($p > 0.05$), regardless of the DHEA dose (6, 12 or 24 mg; Table 1).

No systemic effect was observed during the bolus infusion of DHEA, except for a significant increase in fetal HR that occurred without changes in PAo or PAP (Table 1).

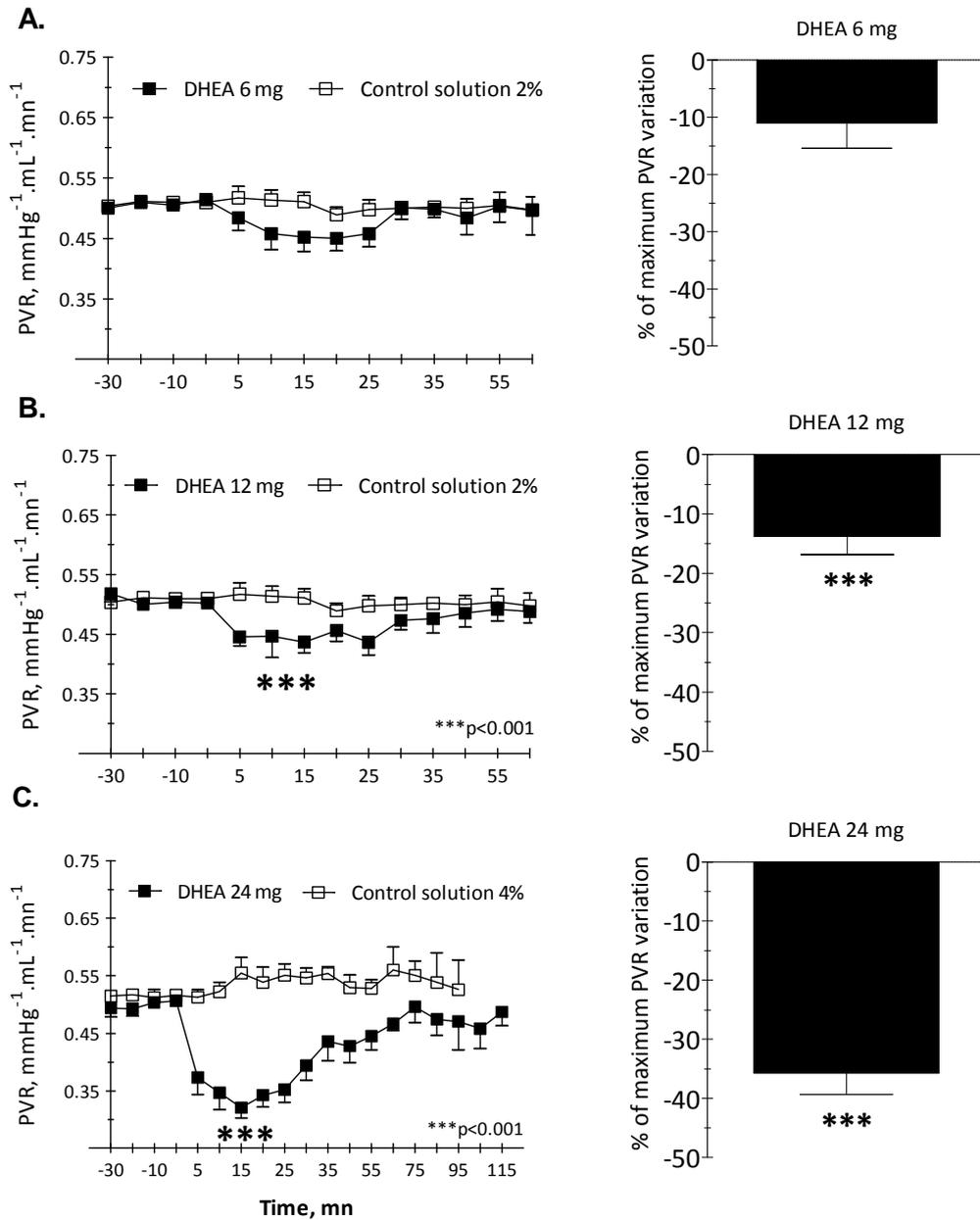


Figure 1: Time-related changes in PVR with increasing doses of DHEA bolus infusion
 (A) PVR after 6 mg DHEA bolus infusion, $n=7$; (B) PVR after 12 mg DHEA bolus infusion, $n=7$, with a significant decrease in PVR compared to the control 2%, $n=7$; (C) PVR after 24 mg DHEA bolus infusion, $n=5$, with a significant decrease in PVR compared to the control 4%, $n=5$

Table 1: Comparisons of blood gases, heart rate, aortic and pulmonary arterial pressures 30 min before and 30 min after bolus infusion of DHEA (6, 12 and 24 mg).

Bolus	6 mg DHEA (n=7)			12 mg DHEA (n=7)			24 mg DHEA (n=5)		
	T-30	T30	<i>P</i>	T-30	T30	<i>p</i>	T-30	T30	<i>p</i>
pH	7.36±0.01	7.36±0.01	NS	7.36±0.01	7.37±0.01	NS	7.36±0.01	7.35±0.01	NS
pCO ₂ (mmHg)	52±1.6	51±1.4	NS	51±1.4	50±1.2	NS	49±0.9	51±0.9	NS
pO ₂ (mmHg)	15±1.4	15±1.5	NS	15±0.9	15±1	NS	15±1.4	16±1.9	NS
Lactates (mM)	1.6±0.1	1.3±0.1	NS	1.8±0.2	1.6±0.2	NS	1.8±0.2	1.7±0.2	NS
SaO ₂ (%)	49±6	48±6	NS	46±4	46±3	NS	43±6	48±6	NS
Hb (g/dL)	11±0.3	11±0.3	NS	11±0.5	11±0.6	NS	12±0.6	12±0.5	NS
HR (batt/min)	159±5	156±5	0.049	153±5	158±5	0.03	149±7	162±8	<0.0001
PAo (mmHg)	47±2.6	46±2.3	NS	44±1	44±1.3	NS	45±1.6	46±2	NS
PAP (mmHg)	50±3	49±2	NS	46±1	46±1	NS	48±1	48±2	NS

¹pCO₂: partial pressure of carbon dioxide; pO₂: partial pressure of oxygen; SaO₂: saturation in oxygen; Hb: hemoglobin; HR: heart rate; PAo: Aortic pressure, PAP: pulmonary arterial pressure

²Results expressed in as mean± SEM; NS: not significant, p>0.05, n= number of independent observations

Blood levels of DHEA were significantly higher at T35 min than at T0 min in both the ewe (except for the 5-min infusion of 24 mg of DHEA) and fetus. However, increases in DHEA-S blood levels were significant only in the fetus. Table 2 presents the blood levels of DHEA and DHEA-S in ewes and fetuses following bolus infusion of DHEA. These blood levels were correlated with the increasing dose of DHEA infused. Higher blood levels of DHEA and DHEA-S were observed in fetuses with 24 mg DHEA than with 6 or 12 mg DHEA.

Table 2: Blood levels of DHEA and DHEA-S before and after bolus infusion of DHEA

Bolus	6 mg DHEA (n=7)			12 mg DHEA (n=7)			24 mg DHEA (n=5)		
	T0	T35	<i>p</i>	T0	T35	<i>p</i>	T0	T35	<i>p</i>
DHEA (ng/mL)									
Ewe	0.67 ±0.06	2.76 ±1.03	0.05	0.82 ±0.16	2.85 ±0.6	0.02	0.9	2.95 ±0.5	NS
Fetus	0.6 ±0.06	13.2 ±2.7	0.02	1.5 ±0.22	22.76 ±3.3	0.009	1.4 ±0.13	50.85 ±2.4	0.009
<i>p</i>	NS	0.03		0.05	0.014		NS	0.05	
DHEA-S (µmol/L)									
Ewe	<0.41	<0.41	NS	<0.41	<0.41	NS	<0.41	0.53 ±0.1	NS
Fetus	<0.41	1.13 ±0.17	0.02	<0.414	1.34 ±0.26	0.036	<0.41	2.31 ±0.17	0.04
<i>p</i>	NS	0.03		NS	0.05		NS	NS	

¹T0: time just before DHEA bolus; T35: time 30 min after DHEA bolus; DHEA-S: dehydroepiandrosterone sulfate

²Results expressed as mean ±SEM; NS: not significant, p>0.05, n=number of independent observations

Expt. 2: Infusion of 30 mg LNA before the bolus infusion of 12 mg (n=6) and 24 mg (n=5) of DHEA inhibited the vasodilator effect on fetal pulmonary circulation

There was a trend of an increase, rather than a decrease, in RVP after a 5-min infusion of 12 or 24 mg DHEA when the fetus was pre-treated with a 30 mg LNA infusion (figures 2A and 2C). The maximum variations in PVR were + 4.81% (12 mg of DHEA, p=0.65) and +13.12 % (24 mg of DHEA, p=0.38), but this difference was not significant. No effects on the systemic circulation (HR, PAo, PAP) or significant differences among blood gases before and after LNA-DHEA infusion were observed.

Pre-treatment with 30 mg of LNA infusion significantly inhibited the vasodilator effect on PVR previously observed with DHEA infusion (p<0.005 for 12 mg of DHEA compared to LNA+DHEA 12 mg, and p<0.001 for 24 mg of DHEA compared to LNA+DHEA 24 mg; figures 2B and 2D).

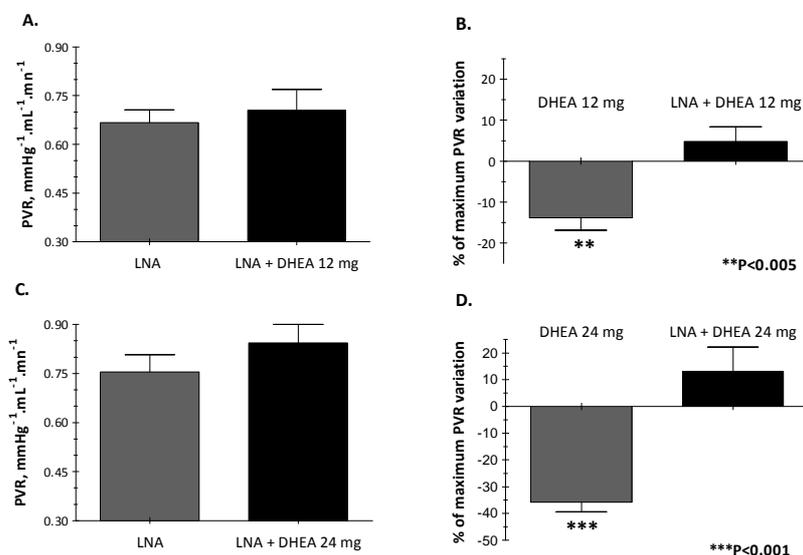


Figure 2: Time-related changes in PVR before and 15 min after DHEA bolus infusion, 30 min after 30 mg LNA infusion (A) comparison of PVR between LNA infusion and LNA+DHEA 12 mg infusion (B) maximum percentage of PVR with DHEA 12 mg bolus infusion with and without LNA pre-treatment (C) comparison of PVR between LNA infusion and LNA+DHEA 24 mg infusion (B) maximum percentage of PVR with DHEA 24 mg bolus infusion with and without LNA pre-treatment

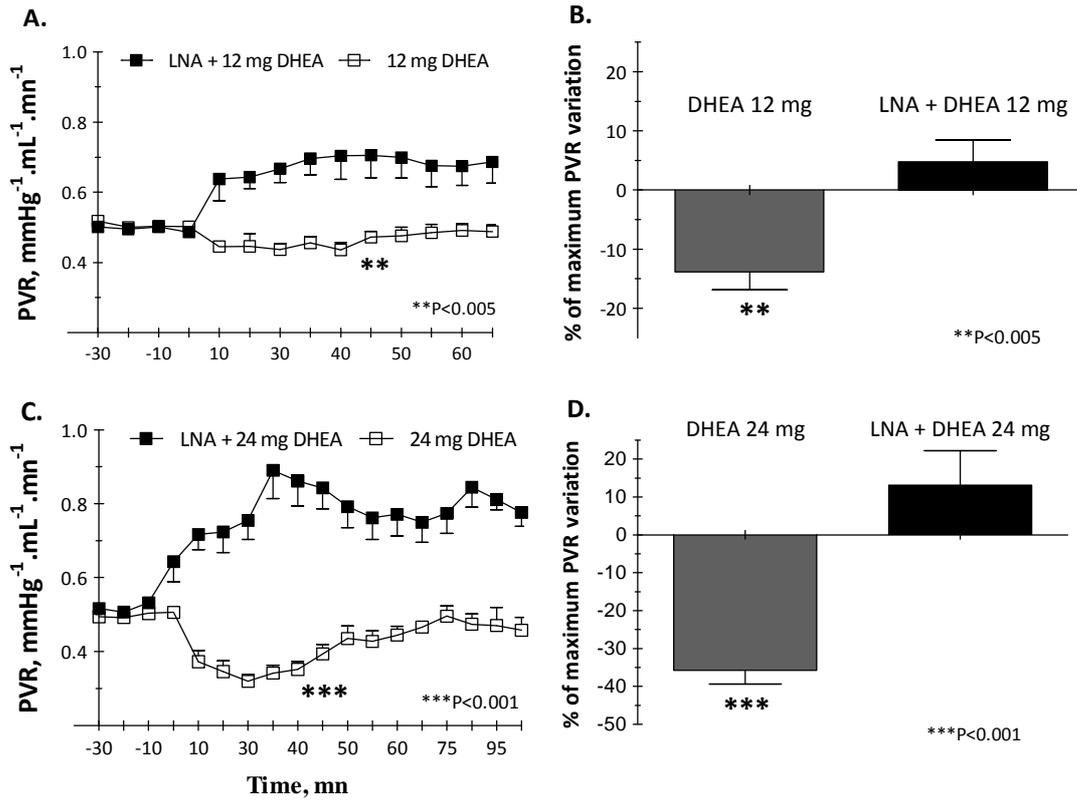


Figure 2: Time-related changes in PVR before and 15 min after DHEA bolus infusion, 30 min after 30 mg LNA infusion (A) comparison of PVR between DHEA 12 mg infusion and LNA+DHEA 12 mg infusion (B) maximum percentage of PVR with DHEA 12 mg bolus infusion with and without LNA pre-treatment (C) comparison of PVR between DHEA 24 mg infusion and LNA+DHEA 24 mg infusion (B) maximum percentage of PVR with DHEA 24 mg bolus infusion with and without LNA pre-treatment

Discussion

The objective of the present study was to determine whether DHEA demonstrated a vasodilator effect on fetal pulmonary circulation. To address this, we studied the effects of an intravenous bolus of DHEA on the fetal lamb in utero using increasing doses of DHEA and chronically instrumented sheep.

For the first time, we demonstrate a vasodilator effect of DHEA on fetal pulmonary circulation, with an increase in LPA blood flow and a significant decrease in PVR (11 to 36 %) that were related to the dose of DHEA (6 to 24 mg) infused.

Other studies have investigated the effects of DHEA on the pulmonary vasculature using oral treatment (DHEA mixed with the diet of rats) [17-20]. Molinari et al. examined the effects of an intravenous bolus of DHEA on the coronary circulation [25] and on the systemic circulation with normally functional endothelium (renal artery, mesenteric artery, iliac artery) [26]. The infusions were performed intravenously in prepubertal anesthetized pigs with a direct bolus followed by a prolonged infusion. Using this model, they found a vasoconstrictor effect of DHEA on the cardiac system, which was a very rapid effect (beginning 3 minutes after the injection) and ended 5 min after the injection. Similar to the findings of Gupte et al. [27], which included myocardial contraction and an increase in coronary perfusion pressure, Molinari et al. found conflicting results that included vasoconstriction of coronary arteries in prepubertal pigs and a significant decrease in coronary blood flow, but with a stable HR and normal aortic blood pressure. These observations could suggest different and opposing actions for DHEA in the cardiac and in pulmonary systems. However, these observations cannot explain our observation of a significant increase in HR in fetal lambs during DHEA perfusion that occurred without changes in aortic or pulmonary arterial pressures. In our study, we confirmed the existence

of a specific and potent pulmonary vasodilator effect. We showed a dose-dependent effect in the fetus that included an increased and prolonged vasodilation with increasing DHEA dose. This dose-dependent effect was also described by Bonnet [18], who administered DHEA in chronic hypoxia in rats.

The short duration of action observed in our work may also be explained by a placental removal of DHEA. Indeed, the maternal blood levels of DHEA significantly increased after DHEA was injected into the fetus. Thus, our results tended to show a passage of DHEA through the placenta, from the fetus to the mother.

In the present study, 6 to 24 mg (1.6 to 6.5 mg·kg⁻¹) of DHEA was administered to fetal lambs, which did not exceed the doses of DHEA given for treatment of PPH in rat models (adult and pups: 9 to 30 mg·kg⁻¹ per os) [17,18, 28] or in adult humans (200 mg per os corresponding to 2.5 to 4 mg·kg⁻¹) with chronic obstructive pulmonary disease [29]. Regarding the blood levels of DHEA-S, the doses (1.13 ±0.17 μM [6 mg DHEA] to 2.31± 0.17 μM [24 mg DHEA]) reported in fetal lambs were similar to the physiological levels of DHEA-S reported for the human fetus during gestation (between 2 and 6 μM, decreasing with gestational age) [12]. Moreover, the DHEA doses in our study (with conversion [ng·mL⁻¹/3.47]: 3.80±0.8 nmol·L⁻¹ [6 mg DHEA] to 14.65 ±0.7 nmol·L⁻¹ [24 mg DHEA]) were lower than the mean serum concentration of free DHEA reported in humans (measured in the morning before taking DHEA) [29] at baseline levels (11.2 [9.6-12.3] nmol·L⁻¹) and after 3 months of DHEA treatment (23.4 [19.7-38.4] nmol·L⁻¹). Thus, the doses of DHEA used for medical treatments and the blood concentrations of DHEA/DHEA-S measured in the fetus in the present study are similar to those reported in experimental or clinical studies and suggest the potential use of DHEA in neonatal care.

To understand the mechanism of action of DHEA, we tested the effect of DHEA after pre-treatment with LNA, an inhibitor of the NO pathway. The vasodilator effect of DHEA was inhibited in the presence of LNA, suggesting a mechanism involving the production of NO via NO synthase (NOS).

At the cellular level, DHEA affects both endothelial and smooth muscle cells by activating or inhibiting many different signaling pathways [13,30].

In vitro, DHEA treatment of pulmonary smooth muscle cells, including those obtained from hypoxic pulmonary vessels in the ferret lung and cultured explants of human pulmonary arteries, showed a complete reversibility of hypoxic pulmonary vasoconstriction [22,23]. The mechanism described includes passage through the opening of calcium-sensitive potassium channels (KCa), and a change in the redox potential of smooth muscle cells in the pulmonary artery [18, 22,23].

Other authors have suggested that DHEA acts directly on endothelial cells via a cell surface receptor coupled to a G-protein that subsequently activates NOS [23,31,32].

In our study, pre-treatment with LNA, a NOS inhibitor, inhibited the vasodilating action of DHEA through a vasoconstrictor effect. Our results therefore suggest a vasodilatory mechanism of action for DHEA that is mediated by NO.

Our preclinical study has demonstrated a potent vasodilator effect of DHEA on fetal pulmonary circulation, without deleterious effects. These results suggest a potential benefit of DHEA on pulmonary circulation for treating PPH during neonatal or childhood periods, as was recently studied by Dumas de la Roque et al. [29]. In that study, the authors demonstrated both preventive and curative effects of DHEA with oral treatment ($30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of DHEA) in a rat pup-model with hypoxic pulmonary hypertension.

In conclusion, the present study is the first to report a potent vasodilator effect on fetal pulmonary resistance, and this result has motivated us to consider whether DHEA is a potential treatment for PPH in neonatal care.

References

1. Tuder RM, Stacher E, Robinson J, Kumar R, Graham BB. Pathology of pulmonary hypertension. *Clin Chest Med.* 2013; 34: 639-650
2. Cassin S, Dawes GS, Mott JC, Ross BB, Strang LB. The vascular resistance of the fetal and newly-ventilated lung of the lamb. *J Physiol.* 1964; 80-89.
3. Velvis H, Moore P, Heymann MA. Prostaglandin inhibition prevents the fall in pulmonary vascular resistance as the result of rhythmic distension of the lungs in fetal lambs. *Pediatr Res.* 1991; 30: 62-67.
4. 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; 269: 473-439.
5. Assali NS, Kirschbaum TH, Dilts PV. Effects of hyperbaric oxygen on uteroplacental and fetal circulation. *Circ Res.* 1968; 22: 573-588.
6. Enhorning G, Adams FH, Norman A. Effects of lung expansion on the fetal lamb circulation. *Acta Pediatr Scand.* 1966; 55: 441-51.
7. Kinsella JP, Abman SH. Recent developments in the pathophysiology and treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *J Pediatr* 1995; 126: 853-64.
8. Jaillard S, Pierrat V, Truffert P, Metois D, Riou Y, Wurtz A, Lequien P, Storme L. Two years' follow-up of newborn infants after extracorporeal membrane oxygenation (ECMO). *Eur J Cardiothorac Surg* 2000 Sep 1; 18: 328-33

9. 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
10. Vermeulen A. Dehydroepiandrosterone sulfate and aging. *Ann NY Acad Sci* 1995; 774: 121-127
11. Baulieu EE, Thomas G, Legrain S, Lahlou N, Roger M, Debuire B, Faucounau V, Girard L, Hervy MP, Latour F, Leaud MC, Mokrane A, Pitti-Ferrandi H, Trivalle C, de Lacharrière O, Nouveau S, Rakoto-Arison B, Souberbielle JC, Raison J, Le Bouc Y, Raynaud A, Girerd X, Forette F. Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, and aging: contribution of the DHEAge Study to a sociobiomedical issue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97 : 4279-4284.
12. Donaldson A, Nicolini U, Symes EK, Rodeck CH, Tannirandorn Y. Changes in concentrations of cortisol, dehydroepiandrosterone sulphate and progesterone in fetal and maternal serum during pregnancy. *Clin Endocrinol.* 1991; 35: 447-451
13. Savineau JP, Marthan R, Dumas de la Roque E. Role of DHEA in cardiovascular diseases. *Biochem Pharmacol.* 2013; 85: 718-726
14. Lahm T, Tudor RM, Petrache I. Progress in solving the sex hormone paradox in pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2014; 307: 7-26
15. Binello E, Gordon CM. Clinical uses and misuses of dehydroepiandrosterone. *Curr Opin Pharmacol.* 2003; 3: 635-641
16. Tummala S, Svec F. Correlation between the administered dose of DHEA and serum levels of DHEA and DHEA-S in human volunteers: analysis of published data. *Clin Biochem.* 1999; 32: 355-361

17. 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
18. 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; 100: 9488-9493
19. Debonneuil EH, Quillard J, Baulieu EE. Hypoxia and dehydroepiandrosterone in old age: a mouse survival study. *Respir Res.* 2006;7:144
20. 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 pneumonectomized rats by dehydroepiandrosterone. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008; 295: 71-8
21. 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; 74: 377-387
22. Farrukh IS, Peng W, Orlinska U, Hoidal JR. Effect of dehydroepiandrosterone on hypoxic pulmonary vasoconstriction: a Ca(2+)- activated K(+)-channel opener. *Am J Physiol.* 1998; 274: 186-195
23. Peng W, Hoidal JR, Farruk IS. Role of a novel KCa opener in regulating K⁺ channels of hypoxic human pulmonary vascular cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999; 20: 737-745
24. Deruelle P, Houfflin Debarge V, Magnenant E, Jaillard S, Riou Y, Puech F, Storme L. Effects of fetal tracheal ligation and congenital diaphragmatic hernia : a pulmonary vascular morphometric analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 189: 208-15

25. 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; 549: 937-944
26. 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; 557: 307-319
27. Gupte SA, Li KX, Okada T, Sato K, Oka M. Inhibitors of pentose phosphate pathway cause vasodilatation: involvement of voltage-gated potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; 301: 299-305
28. Dumas de la Roque E, Quignard JF, Ducret T, Dahan D, Courtois A, Begueret H, Marthan R, Savineau JP. Beneficial effect of dehydroepiandrosterone on pulmonary hypertension in a rodent model of pulmonary hypertension in infants. *Pediatr Res.* 2013; 74: 163-169
29. Dumas de La Roque E, Savineau JP, Metivier AC, Billes MA, Kraemer JP, Doutreleau S, Jougon J, Marthan R, Moore N, Fayon M, Baulieu EÉ, Dromer C. Dehydroepiandrosterone (DHEA) improves pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a pilot study. *Ann Endocrinol* 2012; 73: 20-25
30. Dubuis E. DHEA treatment of pulmonary hypertension: new insights into a complex mechanism. *Cardiovasc Res.* 2007; 74: 337-338
31. Liu D, Dillon JS. Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to $G\alpha(i2,3)$. *J Biol Chem.* 2002; 277: 21379-21388
32. 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; 144: 3449-3455

D. Discussion

L'objectif de cette étude était de déterminer si la DHEA avait un effet vasodilatateur sur la circulation pulmonaire fœtale. Pour cela, nous avons étudié l'effet d'injection intraveineuse directe de DHEA à doses croissantes sur un modèle de fœtus de brebis instrumenté in utero de façon chronique.

Pour la première fois, nous avons démontré un effet vasodilatateur de la DHEA sur la circulation pulmonaire fœtale avec une augmentation du débit sanguin dans l'artère pulmonaire gauche associée à une baisse significative des résistances vasculaires pulmonaires (de 11% à 36%), corrélée à la dose injectée (6 à 24 mg de DHEA).

La DHEA était administrée sur un temps court (5 minutes) et son effet était bref (35 min au maximum). Molinari et al. [94] a testé l'effet de la DHEA en bolus intraveineux direct suivi d'une injection prolongée sur un modèle de cochons pré-pubères anesthésiés dans 2 types de circulation : la circulation coronaire d'une part et la circulation systémique [95] avec endothélium sain (artère rénale, artère mésentérique et artère iliaque). Les résultats retrouvaient un effet vasoconstricteur de la DHEA sur les artères coronaires avec délai d'action court (3 minutes après l'injection) et un effet court (5 min après l'arrêt de l'injection). Dans cette étude comme dans celle de Gupte et al. [96] qui rapportait une contraction myocardique et une augmentation de la pression intra-coronaire, l'effet d'une injection de DHEA était une vasoconstriction avec stabilité de la fréquence cardiaque et de la pression aortique. Ces observations suggèrent des actions différentes et opposées de la DHEA sur les systèmes cardiaque et pulmonaire, mais n'expliquent pas l'augmentation de fréquence cardiaque retrouvée chez le fœtus de brebis après injection de la DHEA sans effet sur les pressions aortique ou pulmonaire dans notre étude. Nous confirmons par nos résultats un puissant effet vasodilatateur pulmonaire avec une réponse plus intense et prolongée dose-dépendante. Cet effet-dose était également décrit par Bonnet et al. [32] lors de l'administration de DHEA dans un modèle de rats exposés à une hypoxie chronique. Dans notre étude, la durée d'action courte peut également être expliquée par le passage placentaire de la DHEA. En effet, les taux

sanguins maternels de DHEA des brebis s'élevaient de façon significative après l'injection de DHEA au fœtus. Les doses de DHEA administrées au fœtus (6 à 24 mg soit 1.6 à 6.5 mg.kg⁻¹) n'excédaient pas celles données en traitement de l'HTAPP dans les modèles de rats (adultes et ratons : 9 à 30 mg. kg⁻¹ par voie orale) [31,32,97] ou les doses de DHEA utilisée chez l'homme adulte (200 mg per os correspondant à 2.5 à 4 mg.kg⁻¹) pour le traitement de l'HTAPP dans un contexte de maladie pulmonaire chronique obstructive [98]. Concernant les taux sanguins de DHEA-S, les dosages (1.13 ±0.17 µM (6 mg DHEA) to 2.31± 0.17 µM (24 mg DHEA) retrouvés chez le fœtus de brebis étaient similaires aux taux physiologiques de DHEA-S étudiés chez le fœtus humain pendant la grossesse (entre 2 et 6 µM, diminuant avec l'âge gestationnel) [88]. De plus, les dosages de DHEA dans notre étude (après conversion (taux en ng.mL⁻¹/3.47): 3.80±0.8 nmol.L⁻¹(6 mg DHEA) to 14.65 ±0.7nmol.L⁻¹ (24 mg DHEA)) étaient plus faibles que les taux sériques de DHEA rapportés chez l'homme (le matin avant prise de DHEA) avant début du traitement (11.2 [9.6-12.3] nmol.L⁻¹) et après 3 mois de traitement (23.4 [19.7-38.4] nmol.L⁻¹ [98]. Les doses de DHEA utilisées pour traitement et les concentrations sanguines de DHEA/DHEA-S observées dans notre étude étaient comparables ou inférieures à celles retrouvées dans les études expérimentales ou cliniques et permettraient d'envisager l'utilisation potentielle de la DHEA en néonatalogie.

Pour comprendre le mécanisme d'action, nous avons testé l'effet de la DHEA après pré-traitement par le L-Nitro-Arginine (LNA, inhibiteur de la NO synthase). L'effet vasodilatateur de la DHEA était inhibé par la présence de LNA, suggérant un mécanisme passant par la production de NO par l'eNOS. Au niveau cellulaire, la DHEA agirait à la fois sur la cellule endothéliale et sur la cellule musculaire lisse par l'activation ou l'inhibition de plusieurs voies de signalisation [35,98]. In vitro, le traitement par la DHEA de cellules musculaires lisses prélevées à partir de vaisseaux pulmonaires hypoxiques isolés de poumons de furets, ou encore obtenues à partir de culture cellulaire d'artères pulmonaires communes humaines, a démontré la réversibilité de la vasoconstriction pulmonaire réponse à l'hypoxie [92,93]. Le mécanisme décrit est celui passant par l'ouverture des canaux potassiques calcium-dépendants (KCa) avec modification du potentiel redox de la cellule musculaire lisse

artérielle pulmonaire [31,92,93]. D'autres auteurs suggèrent une action directe de la DHEA directement sur la cellule endothéliale via un récepteur de surface couplé à une protéine G avec activation de l'eNOS [93,100,101].

Dans notre étude, l'utilisation d'un inhibiteur de l'eNOS (LNA) a aboli l'effet vasodilatateur de la DHEA avec une tendance à la vasoconstriction non significative.

Cette étude préclinique a démontré un puissant effet vasodilatateur de la DHEA sur la circulation pulmonaire fœtale sans effet délétère systémique ou sur l'oxygénation tissulaire et suggère le bénéfice potentiel d'un traitement par la DHEA sur la circulation pulmonaire chez le nouveau-né ou l'enfant dans des situations d'HTAPP, comme étudié récemment dans un modèle expérimental chez le raton [97].

CHAPITRE 4: CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail a permis de démontrer que **la supplémentation maternelle en AGPI ω -3 prévenait la survenue de lésion de DBP induites par hyperoxie chez le raton.**

▪ Etudes expérimentales : Dans cette étude, nous avons reproduit un modèle décrit de DBP chez le nouveau-né raton et répondu aux 2 objectifs principaux:

- observer des lésions de DBP dans les groupes exposés à l'hyperoxie (supplémentation maternelle en AGPI ω -6 et contrôle) avec confirmation du modèle,
- tester l'hypothèse et démontrer l'effet préventif des AGPI ω -3 sur le développement de lésion de DBP.

Les lésions histologiques retrouvées correspondaient aux lésions de « nouvelle » DBP décrite chez le nouveau-né prématuré.

Nous n'avons pas étudié dans ce travail les mécanismes d'action des AGPI ω -3, mais les données actuelles de la littérature sur la physiopathologie de la « nouvelle » DBP semblent impliquer la production de cytokines pro-inflammatoires, la mise en jeu de voie de signalisation de réponse au stress, une diminution de l'expression du VEGF.

Nous pouvons donc envisager de tester l'hypothèse que la supplémentation maternelle en AGPI ω -3 diminue les mécanismes inflammatoires sur le même modèle en associant à l'étude histo-morphométrique, la réalisation de LBA (dosages des protéines et de l'activité GMPc) ainsi qu'une étude immuno-histochimique avec marquage de cellules de l'inflammation (anti-myeloperoxydase (polynucléaires neutrophiles), anti ED-1 (macrophages et monocytes)). Lors de cette étude complémentaire, l'exposition à l'hyperoxie pourrait être suivie d'une période de stabilisation des lésions afin d'obtenir un remodelage vasculaire plus marqué avec HTAPP et hypertrophie ventriculaire droite par des lésions de DBP fixées. Ainsi, en cas d'observation d'un remodelage associé à une hypertrophie ventriculaire droite dans les groupes contrôle, nous pourrions évaluer l'effet des AGPI ω -3 sur ce remodelage vasculaire par l'étude histo-morphométrique mais également en biologie moléculaire (RT-PCR) avec quantification des ARNm du VEGF et son récepteur.

- Etudes cliniques des AGPI ω -3 sur la DBP:

- Les travaux de recherche préclinique sur les AGPI ω -3 ont permis d'envisager la réalisation d'une étude préliminaire au sein de l'unité de Réanimation Néonatale dont les résultats ont fait l'objet d'une publication :

Béghin L, Storme L, Coopman S, Rakza T, Gottrand F. Parenteral nutrition with fish oil supplements is safe and seems to be effective in severe preterm neonates with respiratory distress syndrome. Acta Paediatr. 2015 Nov;104(11):e534-6. [102]

Ce travail a évalué l'innocuité d'une nutrition parentérale enrichie en AGPI ω -3 chez 12 enfants prématurés nés en moyenne à 30 SA présentant une détresse respiratoire et amène à la proposition d'un autre projet d'étude clinique comparant les effets de la nutrition enrichie en AGPI ω -3 (SMOFLIPID®) à ceux d'une nutrition enrichie en AGPI ω -6 (MEDIALIPIDE®) chez le grand prématuré avec pour objectifs d'évaluer les bénéfices potentiels sur la survenue de la DBP mais également sur la survenue d'évènement infectieux (septicémie, ECUN). Ce projet est actuellement en cours d'élaboration.

Le deuxième volet de travail étudiait les effets de l'EPA et du DHA sur la circulation pulmonaire fœtale et a mis en évidence que **l'EPA était un puissant vasodilatateur pulmonaire fœtal avec un effet prolongé, dose- et endothélium-dépendant.**

- Etudes expérimentales: L'effet de l'EPA nécessite la présence de l'endothélium avec absence de vasodilatation lors de lésion de l'endothélium. D'autre part, l'étude du mécanisme d'action a exploré la mise en jeu de production du NO en inhibant l'eNOS par le LNA. Notre étude a montré une diminution de l'effet vasorelaxant de l'EPA après incubation de LNA mais l'effet n'était pas complètement aboli. Ce qui suggère que l'EPA et ses dérivés métabolites agissent par la production de NO par la cellule endothéliale mais pas uniquement. Cette étude a permis d'acquérir une nouvelle technique dans le laboratoire (étude de la vasomotricité sur anneaux isolés), ce qui permet de poursuivre l'exploration des autres voies d'action de l'EPA in vitro (FIGURE 12) :

- voie du CYTP450 par inhibition avec le (methylsulfonyl)-2(2-propynyloxy)-benzenhexanamide (MS-PPOH, IC 50 à 13 μM) : étude de l'action directe de l'EPA sur le tonus vasculaire avec (cellule endothéliale) ou sans endothélium (CML), en inhibant la production de métabolites actifs.
- maintien voire potentialisation de l'effet de l'EPA par incubation avec l'EPA, de l'acide 12-[[[(cyclohexylamino)carbonyl]amino]-dodecanoïque ou CUDA (10 μM), inhibant l'hypoxide hydrolase (voie de dégradation des métabolites EETs)
- Blocage sélectif des canaux potassiques calcium-sensible par l'apamine, venin d'abeille, actif à des concentrations de 1-10 nM sur les canaux SKCa et IKCa présents sur l'endothélium, et par la charybdotoxine, venin de scorpion, inhibant les canaux BKCa présents sur la CML, à des concentrations molaires entre 2-14 nM.

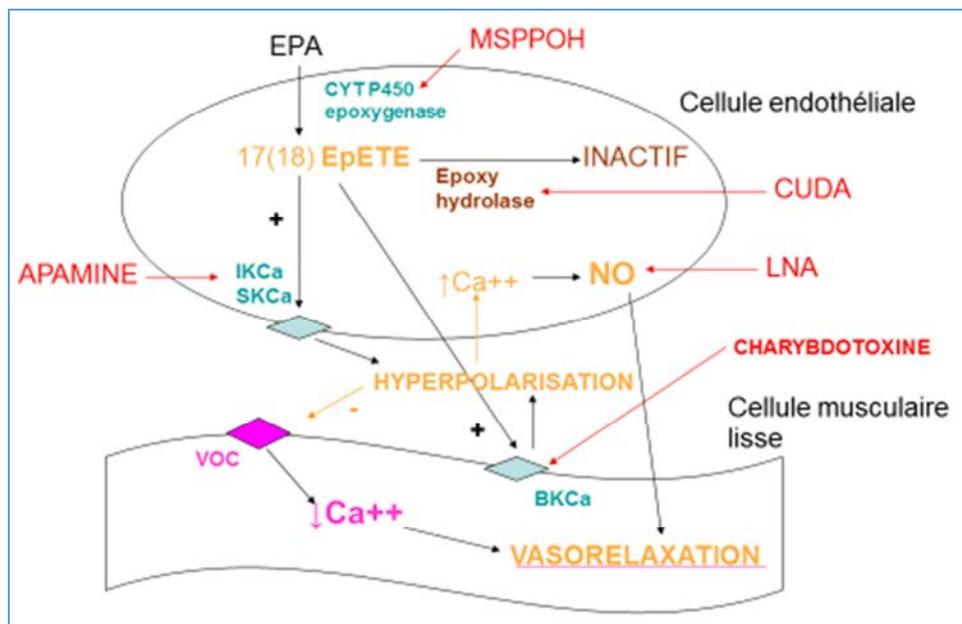


FIGURE 12 : Différentes voies d'action de l'EPA sur le tonus vasculaire avec leurs agents antagonistes (*eNOS* : NO synthase endothéliale ; (S,I,B)KCa : canaux potassiques calcium-sensible à conductance faible (S), intermédiaire (I) ou forte (B) ; VOC : canaux calciques voltage-dépendant)

Par ailleurs, nous proposons également l'étude de l'effet de l'EPA in vivo sur un modèle expérimental d'HTAPP chez le fœtus de brebis. Le protocole chirurgical serait complété par la mise en place d'un occluteur à ballonnet sur le canal artériel [103] afin d'obtenir une augmentation des pressions pulmonaires et une HTAPP.

▪ Etudes cliniques : Les études expérimentales sur AGPI ω -3 suggèrent que la supplémentation maternelle en AGPI ω -3 pourrait prévenir le développement de lésions de DBP mais favoriser la baisse des RVP (et limiter l'HTAPP) dans les situations à haut risque de prématurité. On peut envisager la réalisation d'investigations ultérieures sur l'impact d'une supplémentation maternelle ou du nouveau-né en AGPI ω -3 dans un contexte de malformation congénitale comme la hernie de coupole diaphragmatique qui est souvent associé à un risque important d'hypoplasie pulmonaire et de développement d'une DBP. Nous proposons la réalisation d'une étude clinique avec pour hypothèse que la supplémentation en AGPI ω -3 par voie intraveineuse stabilise ou améliore l'état circulatoire (exprimé en % de variation de la vitesse moyenne de l'artère pulmonaire gauche (critère principal) et diminue les pressions pulmonaires (rapport pressions OD/VD) (critère secondaire)) d'un nouveau-né à terme, avec hernie de diaphragme congénitale en situation d'HTAP. Cette étude serait prospective, randomisée en cross-over. Le protocole détaillé du projet de l'étude clinique qui pourrait être proposé dans le cadre du Centre de Référence des Hernies de Coupole est décrit dans le chapitre annexe.

Enfin le dernier volet de cette thèse avait pour but de tester un autre supplément alimentaire, la DHEA, sur la circulation pulmonaire fœtale. Cette étude a révélé **une action vasodilatatrice de la DHEA sur les RVP du fœtus de brebis** avec un effet bref mais ciblé, sans effet délétère sur la circulation systémique ou l'oxygénation tissulaire. Dans ce travail, l'effet de la DHEA sur la production de NO a été exploré avec une abolition de l'effet vasodilatateur lors du blocage de l'eNOS. Il pourrait également être intéressant de poursuivre l'étude des mécanismes d'action in vitro sur anneaux artériels pulmonaires fœtaux de brebis, qui permettrait :

- de compléter l'effet dose avec des concentrations molaires proches de celles utilisées dans les autres études (40 nM)
- de tester le blocage sélectif des canaux potassiques calcium-sensible par l'apamine, venin d'abeille, actif à des concentrations de 1-10 nM sur les canaux SKCa et IKCa

présents sur l'endothélium, et par la charybdotoxine, venin de scorpion, inhibant les canaux BKCa présents sur la CML, à des concentrations molaires entre 2-14 nM.

Contrairement aux AGPI ω -3, il n'est pas possible de proposer la DHEA comme supplément alimentaire chez la femme enceinte. Cependant, certains facteurs augmentent les taux de concentrations physiologiques de DHEA tels que l'activité physique [104,105]. Nous proposons d'explorer l'effet de l'activité physique durant la gestation sur les taux de DHEA et de DHEA-S maternelle et de la descendance chez la rate gestante, à l'aide d'un modèle expérimental décrit [106]. Nous posons l'hypothèse que l'activité physique augmente les taux de DHEA circulants chez la mère mais également chez le fœtus. Cette étude préclinique pourrait permettre de promouvoir l'activité physique chez les femmes enceintes dans le but de limiter la survenue d'HTAPP chez le nouveau-né.

ANNEXE

EFFETS DES ACIDES GRAS POLYINSATURES ω -3 SUR L'HYPERTENSION ARTERIELLE PULMONAIRE DU NOUVEAU-NE PRESENTANT UNE HERNIE DIAPHRAGMATIQUE CONGENITALE

Investigateur principal : Pr Laurent STORME

Co-investigateurs : Dr SHARMA Dyuti / Dr HOUEIJEH Ali

Promoteur de l'étude : CHRU Lille

1/ Résumé du protocole

La hernie de coupole diaphragmatique congénitale (HDC) est une embryopathie induisant des anomalies de développement pulmonaire et vasculaire associées à un échec de l'adaptation cardio-respiratoire à la naissance qui aboutit à une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) pouvant mettre en jeu le pronostic vital de l'enfant. Les acides gras poly-insaturés ω -3 (AGPI ω -3) ont démontré des effets bénéfiques dans les situations d'HTAP chez l'adulte.

Le but de cette recherche est d'étudier l'effet vasculaire d'une nutrition parentérale enrichie en AGPI ω -3 sur l'HTAP de nouveau-nés avec HDC, en comparaison à la nutrition parentérale usuelle enrichie en AGPI ω -6.

Il s'agit d'une étude prospective, randomisée en cross-over. Les patients seront inclus à J0 de vie, après consentement des parents. Les principaux critères d'inclusion sont la présence d'une HDC gauche et une HTAP. Les nouveau-nés bénéficieront à partir de J1 de vie d'une nutrition parentérale progressivement enrichie en AGPI ω -3 ou ω -6 jusque J4 de vie puis ensuite seront alimentés par l'autre nutrition lipidique de J5 à J8. Les critères cliniques (paramètres ventilatoires, données de la chirurgie), biologiques (gazométrie et lactatémie) et échographiques (variation de la vitesse de l'artère pulmonaire et rapport des pressions OD/VD) seront recueillis à J0-J1, J4-J5 et J8 et analysés statistiquement par des tests de

Wilcoxon pour les variables quantitatives et par des tests de Fisher pour les variables nominales.

L'hypothèse testée est que la supplémentation en AGPI ω -3 par voie intraveineuse stabilise ou améliore l'état circulatoire (exprimé en % de variation de la vitesse moyenne de l'artère pulmonaire gauche (critère principal) et diminue les pressions pulmonaires (rapport pressions OD/VD) (critère secondaire)) d'un nouveau-né avec hernie de diaphragme congénitale en situation d'HTAP.

2/ Justification de l'étude

La hernie de coupole diaphragmatique (HDC) ou hernie de Bochdalek est une affection congénitale fréquente avec une prévalence en Europe allant de 1/2500 à 5000 naissances [1,2]. Cette malformation est grevée d'une mortalité importante en période néonatale (40 à 70 % selon les séries [1-3]) et nécessite une prise en charge multidisciplinaire (obstétricale, réanimatoire, chirurgicale et pédiatrique). En effet, cette malformation du diaphragme induit des anomalies de développement pulmonaire et de sa vascularisation, qui sont à la fois quantitatives et qualitatives. En résultent ainsi une diminution du nombre de bronchioles mais également de la surface d'échange alvéolo-capillaire, et une diminution des branches artérielles pulmonaires avec une réponse vasculaire anormale à l'hypoxie.

Ainsi, l'hypoplasie pulmonaire et les anomalies vasculaires pulmonaires ne permettent pas au nouveau-né à terme porteur d'une HDC, et encore moins en cas de prématurité associée, de s'adapter sur le plan cardiorespiratoire à la vie extra-utérine. Du fait des anomalies vasculaires architecturales et fonctionnelles, on observe à la naissance une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) résultant d'un défaut de vaso-relaxation artérielle pulmonaire avec la persistance de résistances artérielles pulmonaires élevées. Cet échec d'adaptation empêche le passage d'une circulation fœtale à une circulation artérielle post-natale, avec la persistance d'un shunt droit-gauche (par l'intermédiaire du foramen ovale et du canal artériel), responsable d'une hypoxémie. Le défaut de réabsorption du liquide pulmonaire lié à un nombre réduit de canaux ioniques spécifiques (eNaC) participe également à la diminution des échanges gazeux et à l'hypoxémie. Ces éléments contribuent à la persistance d'une HTAP responsable d'une hypoxémie parfois réfractaire et d'une détresse respiratoire

nécessitant la prise en charge spécialisée de ces nouveau-nés dans des unités de réanimation néonatale. De par leurs morbidités importantes respiratoire et circulatoire, la dysplasie broncho-pulmonaire et l'hypertension artérielle pulmonaire persistante représentent des enjeux de santé publique.

Des travaux expérimentaux, cliniques et épidémiologiques ont montré le rôle bénéfique des Acides Gras Poly-Insaturés ω -3 (AGPI ω -3) sur la fonction cardio-respiratoire chez l'adulte [4-7]. Ils agissent soit directement ou par l'intermédiaire de leurs métabolites [8-11] (notamment les acides époxy-eicosatétraénoïques), et sont responsables de plusieurs effets biologiques par leurs propriétés anti-inflammatoires [12-15] ou leurs effets vasodilatateurs [5,16-21].

Nous avons démontré l'effet bénéfique de l'injection intraveineuse d'une émulsion lipidique enrichie en AGPI ω -3, Omegaven®, sur la circulation pulmonaire fœtale dans un modèle expérimental de fœtus de brebis [22].

A l'heure actuelle, les nouveaux prématurés ou nés à terme avec une hernie diaphragmatique congénitale ne sont pas immédiatement autonomes sur le plan alimentaire et bénéficient d'un support nutritionnel parentéral. Cette nutrition parentérale est progressivement enrichie en lipides (avec des AGPI ω -6 de type MEDIALIPIDE 20%®, B Braun Medical) dès les premiers jours de vie. Des travaux étudiant l'intérêt d'une nutrition parentérale enrichie en AGPI ω -3 ont démontré des effets bénéfiques pour les patients adultes hospitalisés en service de réanimation en situation de choc septique ou de syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA) [23,24].

Cette étude-pilote représente la recherche préalable à l'utilisation des AGPI ω -3 en clinique humaine dans la prise en charge de l'HTAP en période néonatale des enfants nés avec hernie de coupole diaphragmatique.

3/ Objectifs et hypothèses testées

Type de l'étude et but de l'étude : étude prospective, interventionnelle, randomisée en cross over, de l'effet circulatoire d'une nutrition parentérale enrichie en AGPI ω -3 chez le nouveau-né avec hernie diaphragmatique congénitale (situation d'HTAP en période néonatale).

Hypothèse testée : la supplémentation en AGPI ω -3 par voie intraveineuse stabilise ou améliore l'état circulatoire (exprimé en % de variation de la vitesse moyenne de l'artère pulmonaire gauche (critère principal) et d'une diminution des pressions pulmonaires (rapport pressions OD/VD) (critère secondaire)) d'un nouveau-né avec une hernie de diaphragme congénitale en situation d'HTAP.

4/ Population étudiée-Echantillonnage

Population étudiée : enfants nés vivants avec une hernie diaphragmatique congénitale, symptomatique en période néonatale, nécessitant sa prise en charge en réanimation néonatale (détresse respiratoire, HTAP)

Critères inclusions (Hernie gauche, critères HTAP) / exclusions (LHR o/a <1 ?, PLUG, cardiopathie sévère associée, hernie de coupole droite, ECMO non consentement des parents)

5/ Schéma général-Plan de l'étude

Il s'agit d'une étude clinique prospective, randomisée, en cross-over (chaque patient reçoit les 2 types de nutrition parentérale : une nutrition parentérale de type MEDIALIPIDE 20% de J1 à J4 puis SMOFLIPID de J5 à J8 ou inversement).

Selon le protocole actuellement établi dans le service de réanimation néonatale, les enfants ne reçoivent pas de lipides dans les poches de nutrition parentérale dans les 24 premières heures de vie. L'introduction des lipides dans la composition de la nutrition parentérale se fait de façon progressive de J1 à J4 selon le schéma suivant :

Tableau 1 : posologies des lipides dans la nutrition parentérale en fonction de l'âge

Jour de vie	Lipides en g/Kg/24h
0	0
1	0,5
2	1
3	1,5
≥ 4	2

Schéma général

L'inclusion des patients sera réalisée de façon prospective, randomisée et consécutive hors critères d'exclusion sur une période déterminée par l'effectif (début de l'étude : année 2014 après accord du CPPB), après consentement des parents et selon critères cliniques (saturation, hémodynamique, gazométrie, paramètres de ventilation) et échographiques (échographie cardiaque trans-thoracique (ETT)).

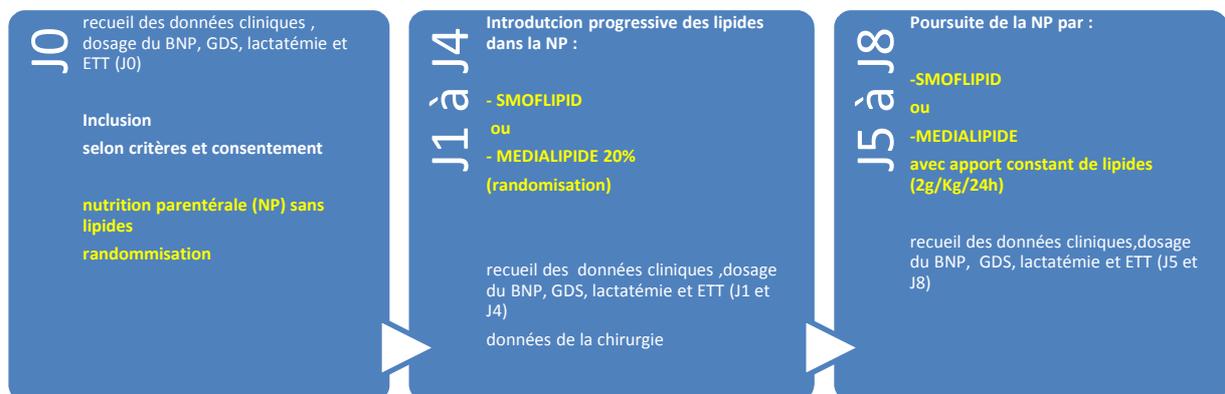


Figure 1 : schéma de l'étude pour chaque patient

Pour chaque patient,

- A l'inclusion, recueil des données générales : âge, poids de naissance, DAN (données sur HDC, LHR, IRM fœtale), adaptation extra-utérine ;
 - recueil de données cliniques : paramètres hémodynamiques (FC, PA, TcPCO₂, saturation en oxygène (SaO₂) pré- et post-ductale, paramètres de ventilation (mode, FiO₂, pression de ventilation)
 - données paracliniques : gazométrie (pH, lactatémie) et données de l'échographie cardiaque (échographie trans-thoracique (ETT) réalisé chez l'enfant calme en dehors des périodes de soins) avec mesures des débits cardiaque, des pressions intra-cavitaires des oreillettes et des ventricules : rapport pressions OD/VD, contractilité ; mesure et calcul des vitesses dans la VCS et vitesse moyenne de l'artère pulmonaire gauche

- De J1 à J4 : introduction progressive (selon protocole du service, cf tableau 1) sur 4 jours des lipides dans la nutrition parentérale, soit MEDIALIPIDE 20 %® (B BRAUN MEDICAL) soit SMOFLIPID® (FRESENIUS KABI, 200 mg/mL émulsion lipidique enrichie en AGPI ω -3), selon la randomisation, en perfusion continue sur 24 h
 - Evaluation clinique pluriquotidienne : Saturation pré- et post- ductale, gazométrie et lactatémie (J0, J1 et J4), paramètres ventilatoires, nécessité traitement NO inhalé, drogues inotropes, HFO
 - ETT (J0, J1 et J4) : débits cardiaque, des pressions intra-cavitaires des oreillettes et des ventricules : rapport pressions OD/VD, contractilité ; mesure et calcul des vitesses dans la VCS et vitesse moyenne de l'artère pulmonaire gauche

- De J5 à J8 : changement de nutrition parentérale MEDIALIPIDE 20 %® (B BRAUN MEDICAL) ou SMOFLIPID® (FRESENIUS KABI, 200 mg/mL émulsion lipidique enrichie en AGPI ω -3) à concentration constante (2g/Kg/24h) pendant 4 jours en perfusion continue sur 24 h
 - Evaluation clinique pluriquotidienne : Saturation pré- et post- ductale, gazométrie et lactatémie (J5 et J8), paramètres ventilatoires, nécessité traitement NO inhalé, drogues inotropes, HFO
 - ETT (J5 et J8) : débits cardiaque, des pressions intra-cavitaires des oreillettes et des ventricules : rapport pressions OD/VD, contractilité ; mesure et calcul des vitesses dans la VCS et vitesse moyenne de l'artère pulmonaire gauche

Critères de sortie de l'étude : nécessité d'une ECMO, décès du patient

6/ Produits-Explorations

Produits :

1/ MEDIALIPIDE 20 %® (B BRAUN MEDICAL) : émulsion lipidique riche en triglycérides et huile de soja, perfusé en continu sur 24h, à un débit de 0.1 à 0.6 mL /Kg/h, sans dépasser 0,25 g lipides/kg/h

2/ SMOFLIPID® (FRESENIUS KABI) 200 mg/mL émulsion lipidique enrichie en AGPI ω -3, perfusé en continu par 24h, à la posologie maximale de 15 mL/Kg poids corporel, avec un débit maximal de 0,125 g de lipides/Kg de poids corporel/heure.

Explorations :

1/ gaz du sang (J0-J1-J4-J5-J8) réalisés par puéricultrices de l'unité

2/ échographies cardiaques réalisés à J0-J1-J4-J5 et J8 par les Dr Ali Houeijeh, Dr Florence Flamein et Dr Sébastien Mur. Les échographies seront effectuées par 2 des 3 praticiens pour diminuer la variabilité de la mesure liée à l'opérateur.

7/ Description des données collectées et méthodes de mesures

Données cliniques et biologiques :

- A l'inclusion (J0), recueil de données cliniques et paracliniques: âge, poids de naissance, DAN (données sur HDC, LHR, IRM fœtale), adaptation extra-utérine, saturation pré- et post-ductale, gazométrie et lactatémie,
- Evaluation clinique pluriquotidienne (J0→J8) : Saturation pré- et post- ductale et paramètres ventilatoires, gazométrie et lactatémie (J0, J1, J4, J5 et J8), nécessité traitement NO inhalé, drogues inotropes, HFO
- Timing de la chirurgie réparatrice, anatomie de la hernie, type de réparation (suture primaire/patch), gastrostomie
- Début de l'alimentation entérale

Données échographiques :

- Echographie cardiaque (J0, J1, J4, J5 et J8), réalisées par 2 des 3 praticiens pour diminuer la variabilité de la mesure liée à l'opérateur ;
- Les paramètres mesurés seront les débits cardiaque, les pressions intra-cavitaires des oreillettes et des ventricules : rapport pressions OD/VD, la contractilité ; la mesure et le calcul des vitesses dans la VCS et la vitesse moyenne de l'artère pulmonaire gauche

8/ Déroulement de l'étude et logistique

Inclusion et étude réalisées au sein de l'unité de réanimation néonatale du CHRU de Lille sous la responsabilité de l'investigateur de l'étude, le Pr Laurent STORME, Hôpital Jeanne de Flandre, après accord du comité d'éthique

Coordination de l'étude et collecte des datas par le Dr SHARMA (co-investigateur de l'étude), CCA chirurgie pédiatrique et doctorante dans l'unité de recherche EA 4489. Les données seront colligées dans une fiche recueil (manuscrit papier pour chaque patient, cf annexe) et saisies dans une base de données (excell). Les échographies cardiaques seront réalisées par les Dr Ali Houeijeh, Dr Florence Flamein et Dr Sébastien Mur.

9/ Statistiques

Calcul de l'effectif

Tests des rangs signés de Wilcoxon pour variables quantitatives et test exact de Fisher pour variables nominales.

10/ Aspects médico-légaux

Avis favorable du CPP

Obtention du consentement libre et éclairé des parents

11/ Budget de l'étude

Les émulsions lipidiques SMOFLIPID® et MEDIALIPIDE 20 %® utilisées pour l'étude sont référencées à la pharmacie du CHRU de Lille et ont l'AMM chez le nouveau-né et prématuré.

12/ Références bibliographiques

1. K-LWaag, S. Loff, K. Zahn, M.Ali, S.Hien, M.Kratz, W. Neff, R. Schaffelder, T Schaible. *Congenital diaphragmatic hernia: a modern approach*. Seminars in Pediatric Surgery (2008) 17,244-254
2. P. D. Robinson & D. A. Fitzgerald. *Congenital diaphragmatic hernia*. Paediatric Respiratory Reviews (2007) 8, 323-335

3. G. Stege, A. Fenton, B.Jaffray. *Nihilism in the 1990s: the true mortality of congenital diaphragmatic hernia*. *Pediatrics* (2003) 112 (3Pt 1): 532-535
4. Massaro, M., Scoditti, E., Carluccio, M. A. & De Caterina, R. Basic mechanisms behind the effects of n-3 fatty acids on cardiovascular disease. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 79, 109–115 (2008)
5. Balakumar, P. & Taneja, G. Fish oil and vascular endothelial protection: bench to bedside. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 271–279 (2012)
6. Adkins, Y. & Kelley, D. S. Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Nutr. Biochem.* 21, 781–792 (2010)
7. Lavie, C. J., Milani, R. V., Mehra, M. R. & Ventura, H. O. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. *J. Am. Coll. Cardiol.* 54, 585–594 (2009)
8. Morin, C., Sirois, M., Echave, V., Rizcallah, E. & Rousseau, E. Relaxing effects of 17(18)-EpETE on arterial and airway smooth muscles in human lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 296, L130–L139 (2009)
9. Revermann, M. *et al.* Inhibition of the soluble epoxide hydrolase attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J. Hypertens.* 27, 322–331 (2009)
10. C. Morin, M. Sirois, V. Echave, M. M. Gomes, E. Rousseau. *Functional effects of 20-HETE on human bronchi: hyperpolarization and relaxation due to BK Ca channel activation*. *Am J Physiol Lung Mol Physiol* 293 : L1037-L1044 (2007)
11. Hantz C. Hercule, Birgit Salanova, Kirill Essin, Horst Honeck, John R. Falck, Matthias Sausbier, Peter Ruth, Wolf-Hagen Schunck, Friedrich C. Luft and Maik Gollasch. *The vasodilator 17, 18-epoxyeicosatetraenoic acid targets the pore-forming BK α channel subunit in rodents*. *Exp Physiol* 92.6 pp 1067–1076 (2007)

12. Pierre M, Husson MO, Le Berre R, Desseyn JL, Galabert C, Béghin 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) Feb 23
13. Mayer K, Grimm H, Grimminger F, Rosseau S. *Parenteral nutrition with n-3 lipids in sepsis*. British Journal of Nutrition (2002), 87, suppl. 1, S69-S75
14. Tull SP, Yates CM, Maskrey BH, O'Donnell VB, Madden J, et al. *Omega-3 Fatty Acids and Inflammation: Novel Interactions Reveal a New Step in Neutrophil Recruitment*. PLoS Biol 7(8): e1000177 (2009)
15. 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
16. Goirand, F., Ovide-Bordeaux, S., Renaud, J.-F., Grynberg, A. & Lacour, B. *Effect of dietary docosahexaenoic acid on the endothelium-dependent vasorelaxation in diabetic rats*. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 32, 184–190 (2005)
17. F. Khan, K. Elherik, C. Bolton-Smith, R. Barr, A. Hill, I. Murrie, Jill J.F. Belch. *The effects of dietary fatty acid supplementation on endothelial function and vascular tone in healthy subjects*. Cardiovascular Research 59 (2003) 955-962
18. M. B. Engler, M.M. Engler, A. Browne, Yi-Ping Sun, R. Sievers. *Mechanisms of vasorelaxation induced by eicosapentaenoic acid (20:5n-3) in WKY rat aorta*. British Journal of Pharmacology (2000) 131, 1793-1799
19. M. Omura, S. Kobayashi, Y. Mizukami, K. Mogami, N. Todoroki-Ikeda, T. Miyake, M. Matsuzaki. *Eicosapentaenoic acid (EPA) induces Ca²⁺-independent activation and*

translocation of endothelial nitric oxide synthase and endothelium-dependent vasorelaxation. FEBS Letters 487 (2001) 361-366

20. T. U. Singh, K. Kathirvel, S. Choudhury, S. K. Garg, S. K. Mishra. *Eicosapentaenoic acid-induced endothelium-dependent and –independent relaxation of sheep pulmonary artery.* European Journal of Pharmacology 636 (2010) 108-113

21. M. M. Engler, M. B. Engler, D. M. Pierson, L. Brizio Molteni, A. Molteni. *Effects of Docosahexaenoic Acid on Vascular Pathology and Reactivity in Hypertension.* Exp Biol Med (Maywood) (2003) Mar; 228 (3): 299-307

22. Houeijeh A, Aubry E, Coridon H, Montaigne K, Sfeir R, Deruelle P, Storme L. *Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in the fetal pulmonary circulation.* Crit Care Med.(2011) Jun;39(6):1431-8

23. S. L. Archer, G.J. Johnson, R.L. Gebhard, W.L. Castleman, A.S. Levin, J.Y. Westcott, N.F. Voelkel, D.P. Nelson, E. K. Weir. *Effect of dietary fish oil on lung lipid profile and hypoxic pulmonary hypertension.* J Appl Physiol, vol 66, Issue 4 : 1662-1673, 1989

24. J. Sabater, J. Ramon Masclans, J. Sacanell, P. Chacon, P. Sabin, M. Planas. *Effects on hemodynamics and gas exchange of omega-3 fatty acid-enriched lipid emulsion in acute respiratory distress syndrome (ARDS) : a prospective, randomized, double-blind, parallel group study.* Lipids in Health and Disease 2008, 7: 39

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Hilgendorff, A., et al., *Chronic lung disease in the preterm infant. Lessons learned from animal models.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2014. **50**(2): p. 233-45.
2. Larroque, B., et al., *Survival of very preterm infants: Epipage, a population based cohort study.* Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2004. **89**(2): p. F139-44.
3. Jobe, A.H. and E. Bancalari, *Bronchopulmonary dysplasia.* Am J Respir Crit Care Med, 2001. **163**(7): p. 1723-9.
4. Thibeault, D.W., et al., *Lung elastic tissue maturation and perturbations during the evolution of chronic lung disease.* Pediatrics, 2000. **106**(6): p. 1452-9.
5. Porzionato, A., et al., *Effects of hyperoxic exposure on signal transduction pathways in the lung.* Respir Physiol Neurobiol, 2015. **209**: p. 106-14.
6. Ferreira, P.J., et al., *Circulating neutrophil concentration and respiratory distress in premature infants.* J Pediatr, 2000. **136**(4): p. 466-72.
7. Jobe, A.J., *The new BPD: an arrest of lung development.* Pediatr Res, 1999. **46**(6): p. 641-3.
8. Bose, C.L., C.E. Dammann, and M.M. Laughon, *Bronchopulmonary dysplasia and inflammatory biomarkers in the premature neonate.* Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2008. **93**(6): p. F455-61.
9. Tambunting, F., et al., *Impaired lung vascular endothelial growth factor in extremely premature baboons developing bronchopulmonary dysplasia/chronic lung disease.* J Investig Med, 2005. **53**(5): p. 253-62.
10. Tsao, P.N., et al., *Vascular endothelial growth factor in preterm infants with respiratory distress syndrome.* Pediatr Pulmonol, 2005. **39**(5): p. 461-5.
11. Wagenaar, G.T., et al., *Gene expression profile and histopathology of experimental bronchopulmonary dysplasia induced by prolonged oxidative stress.* Free Radic Biol Med, 2004. **36**(6): p. 782-801.
12. Feletou, M., R. Kohler, and P.M. Vanhoutte, *Nitric oxide: orchestrator of endothelium-dependent responses.* Ann Med, 2012. **44**(7): p. 694-716.
13. Busse, R., et al., *EDHF: bringing the concepts together.* Trends Pharmacol Sci, 2002. **23**(8): p. 374-80.
14. Burg, E.D., C.V. Remillard, and J.X. Yuan, *Potassium channels in the regulation of pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and apoptosis: pharmacotherapeutic implications.* Br J Pharmacol, 2008. **153** Suppl 1: p. S99-S111.

15. Ranieri, V.M., et al., *Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial.* JAMA, 1999. **282**(1): p. 54-61.
16. Katz, D.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**(5): p. 334-9.
17. Morgan, D.R., et al., *Effects of dietary omega-3 fatty acid supplementation on endothelium-dependent vasodilation in patients with chronic heart failure.* Am J Cardiol, 2006. **97**(4): p. 547-51.
18. Goirand, F., et al., *Effect of dietary docosahexaenoic acid on the endothelium-dependent vasorelaxation in diabetic rats.* Clin Exp Pharmacol Physiol, 2005. **32**(3): p. 184-90.
19. Pierre, M., et al., *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**(6): p. L1422-31.
20. Wu, B.J., et al., *Molecular activity of Na(+)/K(+)-ATPase from different sources is related to the packing of membrane lipids.* J Exp Biol, 2001. **204**(Pt 24): p. 4271-80.
21. Mies, F., et al., *Modulation of epithelial Na⁺ channel activity by long-chain n-3 fatty acids.* Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **287**(4): p. F850-5.
22. Mayer, K., et al., *Parenteral nutrition with n-3 lipids in sepsis.* Br J Nutr, 2002. **87 Suppl 1**: p. S69-75.
23. 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): p. 937-46.
24. Lauterbach, B., et al., *Cytochrome P450-dependent eicosapentaenoic acid metabolites are novel BK channel activators.* Hypertension, 2002. **39**(2 Pt 2): p. 609-13.
25. Morin, C., et al., *Functional effects of 20-HETE on human bronchi: hyperpolarization and relaxation due to BKCa channel activation.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **293**(4): p. L1037-44.
26. Hercule, H.C., et al., *The vasodilator 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid targets the pore-forming BK alpha channel subunit in rodents.* Exp Physiol, 2007. **92**(6): p. 1067-76.
27. Morin, C., 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**(1): p. L130-9.
28. Singer, P., et al., *Anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acids in critical illness: novel mechanisms and an integrative perspective.* Intensive Care Med, 2008. **34**(9): p. 1580-92.

29. Inceoglu, B., et al., *Soluble epoxide hydrolase inhibition reveals novel biological functions of epoxyeicosatrienoic acids (EETs)*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2007. **82**(1-4): p. 42-9.
30. Revermann, M., et al., *Inhibition of the soluble epoxide hydrolase attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats*. J Hypertens, 2009. **27**(2): p. 322-31.
31. Hampl, V., et al., *Dehydroepiandrosterone sulphate reduces chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats*. Eur Respir J, 2003. **21**(5): p. 862-5.
32. Bonnet, S., et al., *Dehydroepiandrosterone (DHEA) prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(16): p. 9488-93.
33. Debonneuil, E.H., J. Quillard, and E.E. Baulieu, *Hypoxia and dehydroepiandrosterone in old age: a mouse survival study*. Respir Res, 2006. **7**: p. 144.
34. Homma, N., et al., *Involvement of RhoA/Rho kinase signaling in protection against monocrotaline-induced pulmonary hypertension in pneumonectomized rats by dehydroepiandrosterone*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. **295**(1): p. L71-8.
35. Savineau, J.P., R. Marthan, and E. Dumas de la Roque, *Role of DHEA in cardiovascular diseases*. Biochem Pharmacol, 2013. **85**(6): p. 718-26.
36. Lee, P.J. and A.M. Choi, *Pathways of cell signaling in hyperoxia*. Free Radic Biol Med, 2003. **35**(4): p. 341-50.
37. Xu, D., et al., *Mitochondrial aldehyde dehydrogenase attenuates hyperoxia-induced cell death through activation of ERK/MAPK and PI3K-Akt pathways in lung epithelial cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **291**(5): p. L966-75.
38. Jankov, R.P., et al., *Fibroblast growth factor receptor-1 and neonatal compensatory lung growth after exposure to 95% oxygen*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **167**(11): p. 1554-61.
39. Warner, B.B., et al., *Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice*. Am J Physiol, 1998. **275**(1 Pt 1): p. L110-7.
40. ter Horst, S.A., et al., *Inhaled nitric oxide attenuates pulmonary inflammation and fibrin deposition and prolongs survival in neonatal hyperoxic lung injury*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **293**(1): p. L35-44.
41. Bonikos, D.S., et al., *Oxygen toxicity in the newborn. The effect of prolonged 100 per cent O₂ exposure on the lungs of newborn mice*. Lab Invest, 1975. **32**(5): p. 619-35.
42. Burri, P.H., *Structural aspects of postnatal lung development - alveolar formation and growth*. Biol Neonate, 2006. **89**(4): p. 313-22.

43. Lin, Y.J., et al., *Inhaled nitric oxide enhances distal lung growth after exposure to hyperoxia in neonatal rats*. *Pediatr Res*, 2005. **58**(1): p. 22-9.
44. Tang, J.R., et al., *Moderate postnatal hyperoxia accelerates lung growth and attenuates pulmonary hypertension in infant rats after exposure to intra-amniotic endotoxin*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010. **299**(6): p. L735-48.
45. Deruelle, P., et al., *BAY 41-2272, a direct activator of soluble guanylate cyclase, reduces right ventricular hypertrophy and prevents pulmonary vascular remodeling during chronic hypoxia in neonatal rats*. *Biol Neonate*, 2006. **90**(2): p. 135-44.
46. Jaillard, S., et al., *[Experimental model of perinatal pulmonary circulation in lambs]*. *Ann Chir*, 2001. **126**(7): p. 659-65.
47. Voiglio, E.J., et al., *[Resuscitative transverse thoracotomy]*. *Ann Chir*, 2003. **128**(10): p. 728-33.
48. Speer, C.P., *Inflammation and bronchopulmonary dysplasia: a continuing story*. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2006. **11**(5): p. 354-62.
49. Schneibel, K.R., et al., *Inflammatory mediator patterns in tracheal aspirate and their association with bronchopulmonary dysplasia in very low birth weight neonates*. *J Perinatol*, 2013. **33**(5): p. 383-7.
50. Vom Hove, M., et al., *Pulmonary outcome in former preterm, very low birth weight children with bronchopulmonary dysplasia: a case-control follow-up at school age*. *J Pediatr*, 2014. **164**(1): p. 40-45 e4.
51. Greenberg, J.A., S.J. Bell, and W.V. Ausdal, *Omega-3 Fatty Acid supplementation during pregnancy*. *Rev Obstet Gynecol*, 2008. **1**(4): p. 162-9.
52. Schwartz, J., et al., *PUFA and LC-PUFA intake during the first year of life: can dietary practice achieve a guideline diet?* *Eur J Clin Nutr*, 2010. **64**(2): p. 124-30.
53. Carlson, S.E., S.H. Werkman, and E.A. Tolley, *Effect of long-chain n-3 fatty acid supplementation on visual acuity and growth of preterm infants with and without bronchopulmonary dysplasia*. *Am J Clin Nutr*, 1996. **63**(5): p. 687-97.
54. Hanebutt, F.L., et al., *Long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) transfer across the placenta*. *Clin Nutr*, 2008. **27**(5): p. 685-93.
55. Nutrition, E.C.o., et al., *Feeding preterm infants after hospital discharge: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2006. **42**(5): p. 596-603.
56. Zhang, P., et al., *Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids for extremely preterm infants: a systematic review*. *Pediatrics*, 2014. **134**(1): p. 120-34.
57. Larsen, B.M., et al., *Pre-treatment with an intravenous lipid emulsion containing fish oil (eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid) decreases inflammatory markers after*

- open-heart surgery in infants: a randomized, controlled trial. Clin Nutr, 2012. 31(3): p. 322-9.*
58. Larsen, B.M., et al., *Pretreatment with an intravenous lipid emulsion increases plasma eicosapentanoic acid and downregulates leukotriene b4, procalcitonin, and lymphocyte concentrations after open heart surgery in infants. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2015. 39(2): p. 171-9.*
 59. Rieger-Fackeldey, E. and R. Hentschel, *Bronchopulmonary dysplasia and early prophylactic inhaled nitric oxide in preterm infants: current concepts and future research strategies in animal models. J Perinat Med, 2008. 36(5): p. 442-7.*
 60. Berger, J. and V. Bhandari, *Animal models of bronchopulmonary dysplasia. The term mouse models. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014. 307(12): p. L936-47.*
 61. Visser, Y.P., et al., *Apelin attenuates hyperoxic lung and heart injury in neonatal rats. Am J Respir Crit Care Med, 2010. 182(10): p. 1239-50.*
 62. de Visser, Y.P., et al., *Phosphodiesterase 4 inhibition attenuates persistent heart and lung injury by neonatal hyperoxia in rats. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012. 302(1): p. L56-67.*
 63. Houeijeh, A., et al., *Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in the fetal pulmonary circulation. Crit Care Med, 2011. 39(6): p. 1431-8.*
 64. Alphonse, R.S., et al., *Activation of Akt protects alveoli from neonatal oxygen-induced lung injury. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011. 44(2): p. 146-54.*
 65. Bhat, R., et al., *Prospective analysis of pulmonary hypertension in extremely low birth weight infants. Pediatrics, 2012. 129(3): p. e682-9.*
 66. Pontes-Arruda, A., A.M. Aragao, and J.D. Albuquerque, *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(9): p. 2325-33.*
 67. Singer, P., 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(4): p. 1033-8.*
 68. Archer, S.L., et al., *Effect of dietary fish oil on lung lipid profile and hypoxic pulmonary hypertension. J Appl Physiol (1985), 1989. 66(4): p. 1662-73.*
 69. Massaro, M., et al., *Basic mechanisms behind the effects of n-3 fatty acids on cardiovascular disease. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2008. 79(3-5): p. 109-15.*
 70. Harris, W.S., *The omega-3 index: clinical utility for therapeutic intervention. Curr Cardiol Rep, 2010. 12(6): p. 503-8.*

71. Khan, F., et al., *The effects of dietary fatty acid supplementation on endothelial function and vascular tone in healthy subjects*. Cardiovasc Res, 2003. **59**(4): p. 955-62.
72. Morin, C., et al., *Effects of omega-hydroxylase product on distal human pulmonary arteries*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(3): p. H1435-43.
73. Nelson, J.L., et al., *Effect of enteral feeding with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid, and antioxidants on antioxidant status in patients with acute respiratory distress syndrome*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2003. **27**(2): p. 98-104.
74. Helland, I.B., et al., *Maternal supplementation with very-long-chain n-3 fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 years of age*. Pediatrics, 2003. **111**(1): p. e39-44.
75. Omura, M., et al., *Eicosapentaenoic acid (EPA) induces Ca(2+)-independent activation and translocation of endothelial nitric oxide synthase and endothelium-dependent vasorelaxation*. FEBS Lett, 2001. **487**(3): p. 361-6.
76. Singh, T.U., et al., *Eicosapentaenoic acid-induced endothelium-dependent and -independent relaxation of sheep pulmonary artery*. Eur J Pharmacol, 2010. **636**(1-3): p. 108-13.
77. Tuder, R.M., et al., *Pathology of pulmonary hypertension*. Clin Chest Med, 2013. **34**(4): p. 639-50.
78. Cassin, S., et al., *The Vascular Resistance of the Foetal and Newly Ventilated Lung of the Lamb*. J Physiol, 1964. **171**: p. 61-79.
79. Velvis, H., P. Moore, and M.A. Heymann, *Prostaglandin inhibition prevents the fall in pulmonary vascular resistance as a result of rhythmic distension of the lungs in fetal lambs*. Pediatr Res, 1991. **30**(1): p. 62-8.
80. Ziegler, J.W., et al., *Dipyridamole, a cGMP phosphodiesterase inhibitor, causes pulmonary vasodilation in the ovine fetus*. Am J Physiol, 1995. **269**(2 Pt 2): p. H473-9.
81. Assali, N.S. and T.H.D.P.V.J. Kirschbaum, *Effects of hyperbaric oxygen on uteroplacental and fetal circulation*. Circ Res, 1968. **22**(5): p. 573-88.
82. Enhorning, G., F.H. Adams, and A. Norman, *Effect of lung expansion on the fetal lamb circulation*. Acta Paediatr Scand, 1966. **55**(5): p. 441-51.
83. Kinsella, J.P. and S.H. Abman, *Recent developments in the pathophysiology and treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn*. J Pediatr, 1995. **126**(6): p. 853-64.
84. Jaillard, S., et al., *Two years' follow-up of newborn infants after extracorporeal membrane oxygenation (ECMO)*. Eur J Cardiothorac Surg, 2000. **18**(3): p. 328-33.

85. Baulieu, E.E., et al., *An Adrenal-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**: p. 411-500.
86. Vermeulen, A., *Dehydroepiandrosterone sulfate and aging.* Ann N Y Acad Sci, 1995. **774**: p. 121-7.
87. Baulieu, E.E., et al., *Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, and aging: contribution of the DHEAge Study to a sociobiomedical issue.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(8): p. 4279-84.
88. Donaldson, A., et al., *Changes in concentrations of cortisol, dehydroepiandrosterone sulphate and progesterone in fetal and maternal serum during pregnancy.* Clin Endocrinol (Oxf), 1991. **35**(5): p. 447-51.
89. Lahm, T., R.M. Tuder, and I. Petrache, *Progress in solving the sex hormone paradox in pulmonary hypertension.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014. **307**(1): p. L7-26.
90. Binello, E. and C.M. Gordon, *Clinical uses and misuses of dehydroepiandrosterone.* Curr Opin Pharmacol, 2003. **3**(6): p. 635-41.
91. Tummala, S. and F. Svec, *Correlation between the administered dose of DHEA and serum levels of DHEA and DHEA-S in human volunteers: analysis of published data.* Clin Biochem, 1999. **32**(5): p. 355-61.
92. Farrukh, I.S., et al., *Effect of dehydroepiandrosterone on hypoxic pulmonary vasoconstriction: a Ca(2+)-activated K(+)-channel opener.* Am J Physiol, 1998. **274**(2 Pt 1): p. L186-95.
93. Peng, W., J.R. Hoidal, and I.S. Farrukh, *Role of a novel KCa opener in regulating K+ channels of hypoxic human pulmonary vascular cells.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. **20**(4): p. 737-45.
94. Molinari, C., et al., *The effect of dehydroepiandrosterone on coronary blood flow in prepubertal anaesthetized pigs.* J Physiol, 2003. **549**(Pt 3): p. 937-44.
95. Molinari, C., et al., *The effect of dehydroepiandrosterone on regional blood flow in prepubertal anaesthetized pigs.* J Physiol, 2004. **557**(Pt 1): p. 307-19.
96. Gupte, S.A., et al., *Inhibitors of pentose phosphate pathway cause vasodilation: involvement of voltage-gated potassium channels.* J Pharmacol Exp Ther, 2002. **301**(1): p. 299-305.
97. Dumas de la Roque, E., et al., *Beneficial effect of dehydroepiandrosterone on pulmonary hypertension in a rodent model of pulmonary hypertension in infants.* Pediatr Res, 2013. **74**(2): p. 163-9.

98. Dumas de La Roque, E., et al., *Dehydroepiandrosterone (DHEA) improves pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a pilot study*. *Ann Endocrinol (Paris)*, 2012. **73**(1): p. 20-5.
99. Dubuis, E., *DHEA treatment of pulmonary hypertension: new insights into a complex mechanism*. *Cardiovasc Res*, 2007. **74**(3): p. 337-8.
100. Liu, D. and J.S. Dillon, *Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to Galpha(i2,3)*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(24): p. 21379-88.
101. Simoncini, T., et al., *Dehydroepiandrosterone modulates endothelial nitric oxide synthesis via direct genomic and nongenomic mechanisms*. *Endocrinology*, 2003. **144**(8): p. 3449-55.
102. Beghin, L., et al., *Parenteral nutrition with fish oil supplements is safe and seems to be effective in severe preterm neonates with respiratory distress syndrome*. *Acta Paediatr*, 2015. **104**(11): p. e534-6.
103. Abman, S.H., P.F. Shanley, and F.J. Accurso, *Failure of postnatal adaptation of the pulmonary circulation after chronic intrauterine pulmonary hypertension in fetal lambs*. *J Clin Invest*, 1989. **83**(6): p. 1849-58.
104. Filaire, E., P. Duche, and G. Lac, *Effects of amount of training on the saliva concentrations of cortisol, dehydroepiandrosterone and on the dehydroepiandrosterone: cortisol concentration ratio in women over 16 weeks of training*. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 1998. **78**(5): p. 466-71.
105. Copeland, J.L., L.A. Consitt, and M.S. Tremblay, *Hormonal responses to endurance and resistance exercise in females aged 19-69 years*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2002. **57**(4): p. B158-65.
106. Damasceno, D.C., et al., *Diabetic rats exercised prior to and during pregnancy: maternal reproductive outcome, biochemical profile, and frequency of fetal anomalies*. *Reprod Sci*, 2013. **20**(7): p. 730-8.

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : Voie de relaxation de la CML par la production du NO

FIGURE 2: Relaxation de la CML par hyperpolarisation avec ouverture des canaux potassiques calcium-sensible (KCa) et fermeture des canaux calciques voltage dépendants (VOC)

FIGURE 3 : Synthèse et métabolisme des AGPI ω -3

FIGURE 4 : Hypothèses sur les mécanismes d'action de l'EPA et du DHA sur le tonus vasculaire

FIGURE 5 : Hypothèses sur les mécanismes d'action de la DHEA sur le tonus vasculaire

FIGURE 6 : Protocole d'analyse histo-morphométrique des poumons du prélèvement à l'analyse numérique

FIGURE 7 : Positionnement des cathéters intra aortique et intraveineux cave par abord axillaire (photographie de gauche) et de cathéters en AP et APG avec sonde doppler autour de l'APG (photographie de droite)

FIGURE 8 : Installation de la brebis pour réalisation de mesures hémodynamiques

FIGURE 9 : Représentation du zéro de débit

FIGURE 10: Tensiomètre pour étude de la vasomotricité sur anneaux isolés (photographie du dessus) ; Cuves de 40 mL de solution de Krebs réchauffée à 37°C pour incubation des anneaux (photographie du dessous)

FIGURE 11: Schéma du protocole expérimental de DBP chez le raton

FIGURE 12 : Différentes voies d'action de l'EPA sur le tonus vasculaire avec leurs agents antagonistes