



**HAL**  
open science

# Rétinoïdes en intra-trachéal et occlusion de trachée dans le traitement anténatal de la hernie diaphragmatique congénitale sur un modèle lapin

Amélie Delabaere

## ► To cite this version:

Amélie Delabaere. Rétinoïdes en intra-trachéal et occlusion de trachée dans le traitement anténatal de la hernie diaphragmatique congénitale sur un modèle lapin. Médecine humaine et pathologie. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2017. Français. NNT : 2017CLFAS024 . tel-03021811

**HAL Id: tel-03021811**

**<https://theses.hal.science/tel-03021811>**

Submitted on 24 Nov 2020

**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.

UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

Année 2017

N° d'ordre

***ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE***

## **Thèse**

Présentée à l'Université de Clermont Auvergne pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITE**

(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité Gynécologie-Obstétrique

Soutenue publiquement le 13 Septembre 2017 par

**Amélie DELABAERE**

---

**Retinoïdes en intra-trachéal et occlusion de trachée dans le traitement anténatal de la hernie diaphragmatique congénitale sur un modèle lapin**

---

Rapporteurs : Pr Alexandra BENACHI, Université Paris-Sud  
Pr Véronique HOUFFLIN-DEBARGE, Université Lille 2  
Président: Pr Denis GALLOT, Université Clermont Auvergne  
Membres : Dr Loïc BLANCHON, Université Clermont Auvergne

Team "Translational approach to epithelial injury and repair"  
Université Clermont Auvergne, UMR/CNRS6293, Inserm 1103  
GReD, F-63000 Clermont-Ferrand, France

A ma famille,

A mes collègues,

A mes amis, ...

Dont la patience, le soutien et la compréhension m'ont permis de mener ce travail.

Pr Denis Gallot, merci. Merci pour ton soutien indéfectible tout au long de mon cursus, dans mon travail de recherche et dans mon activité médicale de tous les jours. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir donné les moyens de réaliser ce travail tout en continuant à m'épanouir au sein du service d'Obstétrique. Tu restes mon maître dans de nombreux domaines. Merci de ta confiance et de ta compréhension. En espérant que nous puissions travailler encore longtemps ensemble !

Merci Dr Loïc Blanchon pour ton aide très précieuse et ton soutien tout au long de ce travail. Sans toi, j'aurais été bien perdue dans ce monde scientifique...

Je remercie les Pr Alexandra Benachi et Véronique Houfflin-Debargue pour me faire l'honneur de rapporter ce travail et de participer à mon jury.

Je voudrais remercier le Pr Vincent Sapin pour m'avoir accueillie dans son équipe de recherche avec toute sa bienveillance.

Merci au Pr Didier Lemery pour m'avoir donné la possibilité de mener ce travail tout en poursuivant mon activité au sein du service d'Obstétrique.

Je remercie l'ensemble de l'équipe de recherche, Karen, Cécile, Pierre, Corinne, Gaël et Geoffroy pour leur aide et la bonne ambiance qu'ils ont su créer.

Je remercie l'ensemble de mes collègues hospitaliers pour m'avoir donné du temps pour réaliser ce travail, tout particulièrement Nathalie, une co-chef d'exception.

Je remercie l'ensemble de l'équipe du service, aides-soignantes, sage-femmes, secrétaires et médecins, pour leur soutien et leur compréhension dans les moments les plus difficiles.

Ainsi que l'ensemble des personnes du service commun : Marie-Diane, Nadia, Françoise, Laurence, Agostinha, Eric et Christian...

## TABLE DES MATIERES

<b>ABREVIATIONS</b> .....	p.6
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	p.8
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	p.11
<u>Partie I : Développements pulmonaire et diaphragmatique normaux</u> .....	p.11
1. Le développement pulmonaire .....	p.11
1.1. Les voies aériennes.....	p.11
1.2. La vascularisation pulmonaire.....	p.14
1.3. Facteurs régulant le développement pulmonaire.....	p.15
1.3.1. Facteurs cellulaires et génétiques.....	p.15
1.3.2. Facteurs mécaniques.....	p.17
2. Le développement diaphragmatique.....	p.19
<u>Partie II : La hernie de coupole diaphragmatique (HCD) congénitale en pathologie humaine</u> .....	p.21
1. Physiopathologie de la HCD congénitale.....	p.21
1.1. Approche anatomo-histologique.....	p.21
1.2. Approche génétique et moléculaire.....	p.23
2. Conséquences pulmonaires de la HCD.....	p.25
3. Données épidémiologiques.....	p.27
4. Diagnostic prénatal de la HCD.....	p.30
4.1. Diagnostic positif de la HCD.....	p.30
4.2. Diagnostic différentiel.....	p.32
4.3. Evaluation pronostique de la HCD.....	p.33
4.3.1. Anomalies associées.....	p.33
4.3.2. Critères pronostiques.....	p.34
5. Principes de la prise en charge anténatale.....	p.41
6. Principes de la prise en charge périnatale de la HCD.....	p.46

<u>Partie III : La vitamine A et les rétinoïdes</u> .....	p.49
1. Généralités.....	p.49
1.1. Définition et propriétés chimiques des rétinoïdes.....	p.49
1.2. Métabolisme de la vitamine A.....	p.50
2. Le métabolisme cellulaire de la vitamine A.....	p.52
2.1. La synthèse de l'acide rétinoïque.....	p.53
2.1.1. Conversion du rétinol en rétinal.....	p.53
2.1.2. Conversion du rétinal en acide rétinoïque.....	p.54
2.1.3. Les cytochromes.....	p.55
2.2. Les récepteurs nucléaires aux rétinoïdes.....	p.55
2.2.1. Place au sein de la superfamille des récepteurs nucléaires.....	p.55
2.2.2. Structure des récepteurs nucléaires.....	p.56
2.2.3. Mécanismes d'action des récepteurs aux rétinoïdes.....	p.57
3. Rétinoïdes et développement embryon-fœtal.....	p.58

<u>Partie IV : Rétinoïdes et HCD</u> .....	p.60
--	------

<b>ETUDES</b> .....	p.62
---------------------	------

<b>PUBLICATIONS</b> .....	p.64
---------------------------	------

Publication N°1: The challenge of prenatal identification of congenital diaphragmatic hernia in the context of hydrops.....	p.65
---	------

Publication N°2: Metabolic disturbances of the vitamin A pathway in human diaphragmatic hernia. ....	p.69
--	------

Publication N°3: Effects of tracheal occlusion with retinoic acid administration on normal lung development. ....	p.82
---	------

Publication N°4: Retinoic acid and tracheal occlusion for diaphragmatic hernia treatment in rabbit fetuses. ....	p.93
--	------

<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b> .....	p.131
---	-------

<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	p.132
--	-------

## ABREVIATIONS

ADH: Alcool DesHydrogenase  
ADN: Acide DésoxyriboNucléique  
AKR: Aldo-Keto Réductases  
AR: Acide Rétinoïque  
CRA: Compte Radial Alvéolaire  
CNV: Copy Number Variant  
COUP-TFII: Chick Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor II  
CRABP : Cellular Retinoic Acid Binding Protein  
CRBP : Cellular Retinol Binding Protein  
CYP26 : Cytochrome P26  
DBP : Dysplasie BronchoPulmonaire  
ECMO : oxygénation par membrane extra-corporelle  
EXIT : EX utero Intrapartum Treatment  
FGF : Fibroblast Growth Factor  
FGFR: FGF Receptor  
HCD : Hernie de Coupole Diaphragmatique  
HNF : Hepatocyte Nuclear Factor  
HTAP : HyperTension Artérielle Pulmonaire  
HRE : Hormone Response Element  
iNO: Oxyde Nitrique inhalé  
LBWR : Lung to Body Weight Ratio  
LHR : Lung Head Ratio  
LRAT : Lecithine:Rétinol AcylTransferase  
MDR : Réductases à chaîne moyenne  
MFIU: Mort Foetale In Utero  
OHF: Oscillations Haute Fréquence  
OT: Occlusion de Trachée  
PI: Pneumocyte de type I  
PII: Pneumocyte de type II  
RALDH: Retinol ALdehyde DesHydrogenase

RAR: Retinoic Acid Receptor  
RARE: Retinoic Acid Response Element  
RE: Rétinyl Ester  
RGO: Reflux Gastro-Oesophagien  
RXR: Retinoid X Receptor  
SD: Semaine de Développement  
SDR: Réductase à chaîne courte  
STRA: Stimulated by Retinoic Acid  
SP: Surfactant Protein  
TFVL: Total Fetal Lung Volume  
TTF : Thyroid Transcription Factor  
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor  
VEGFR: VEGF Receptor



## INTRODUCTION GENERALE

La hernie de coupole diaphragmatique (HCD) congénitale est une anomalie de développement du diaphragme survenant au cours de l'embryogénèse, qui laisse persister une communication entre les cavités péritonéale et pleurale. Elle concerne entre 2 et 4/10000 naissances vivantes, 2,1/10000 en Europe<sup>1</sup> et 2,7/10000 en France<sup>2</sup>. Elle est isolée et sporadique dans 63 à 70% des cas<sup>1,2</sup>. Dans sa forme la plus fréquente (dite de Bochdalek), elle concerne la région postérolatérale de la coupole diaphragmatique gauche (85% des cas)<sup>2</sup>. Ce défaut musculaire rend possible la migration intrathoracique de viscères abdominaux et nuit à l'efficacité inspiratoire des mouvements diaphragmatiques foetaux. Il en résulte une compression des viscères thoraciques qui se solde essentiellement par une hypoplasie pulmonaire (réduction du nombre de ramifications bronchiques), un défaut de maturation alvéolaire et une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), à l'origine de difficultés importantes d'adaptation néonatale. La mortalité périnatale est élevée (environ 50%, comprenant les interruptions de grossesses et les pertes foetales). Malgré les progrès de la prise en charge néonatale, la morbidité reste importante chez les enfants survivants avec un risque accru de dysplasie bronchopulmonaire (DBP), de pathologies pulmonaires obstructives et restrictives, de scoliose, de reflux gastro-oesophagien (RGO), de déficits neurodéveloppementaux et neurosensoriels<sup>3</sup>.

Pour les formes isolées les plus sévères, une prise en charge anténatale est proposée par réalisation d'une occlusion temporaire de la trachée (OT) par voie endoscopique permettant une amélioration de la croissance pulmonaire. Ce geste s'accompagne d'une accélération de la maturation pulmonaire, observée sur modèles animaux, avec une diminution du taux de pneumocytes de type II (PII), cellules sécrétrices de surfactant pulmonaire. Cette molécule tensioactive évite le collapsus alvéolaire associé à l'expiration.

Cet effet délétère de l'OT peut être partiellement corrigé par une désocclusion trachéale avant la naissance (séquence plug-unplug<sup>4</sup>) et/ou par l'administration de stéroïdes<sup>5,6</sup>. L'administration de rétinoïdes pourrait aussi influencer la différenciation pulmonaire et améliorer le pronostic fœtal après OT pour HCD<sup>7</sup>.

Les rétinoïdes sont une famille d'isoprénoïdes comprenant le rétinol (vitamine A) et tous les dérivés biologiques et synthétiques apparentés. La vitamine A est issue de l'alimentation et transformée en forme active, l'acide rétinoïque (AR), par une succession d'étapes enzymatiques. Son action cellulaire est médiée par des récepteurs nucléaires spécifiques, les retinoic acid receptors (RAR) et les retinoid X receptors (RXR). L'AR possède un spectre d'action très large au sein de processus aussi divers que le développement et la croissance embryonnaire, la vision et la reproduction<sup>8</sup>. Il intervient dans tous les stades du développement pulmonaire des mammifères. Des travaux menés sur les modèles murins ont permis d'établir un lien entre rétinoïdes et HCD, notamment dans le modèle nitrofène, herbicide qui interrompt la voie de signalisation des rétinoïdes. Il a été montré qu'une perturbation de la voie métabolique des rétinoïdes (carence maternelle en rétinol, réduction de synthèse d'AR par usage de nitrofène, knock-out des récepteurs nucléaires de l'AR) pouvait entraîner la formation de HCD chez le fœtus. La supplémentation en rétinol ou en AR aux instants clés du développement pulmonaire permettait d'en réduire l'incidence. Une supplémentation maternelle en AR permet de corriger les anomalies de maturation pulmonaire présentes dans les HCD créées chirurgicalement chez des fœtus lapins<sup>7</sup>. L'implication de la voie de signalisation des rétinoïdes dans la physiopathologie de la HCD a été confirmée chez l'homme<sup>9,10</sup> et chez les fœtus ou nouveau-nés présentant une HCD<sup>9,10</sup>. Suivant ces différentes données, nous avons voulu étudier les effets de l'AR injecté dans la trachée en complément d'une OT dans le modèle animal chirurgical lapin de HCD. Pour cela, la recherche d'un

vecteur de l'AR permettant son administration dans la trachée a été réalisée dans un premier temps, puis nous avons étudié les effets de l'AR injecté dans la trachée fœtale au moment de l'OT sur un modèle lapin de HCD.

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

### Partie I : Développements pulmonaire et diaphragmatique normaux

#### 1. Le développement pulmonaire

##### 1.1. Les voies aériennes

Le développement pulmonaire de l'embryon humain débute dès 3 semaines de développement (SD) et se poursuit jusqu'à l'adolescence. 5 stades successifs sont nécessaires à la mise en place du tissu pulmonaire à partir des deux feuillets embryonnaires, l'endoderme et le mésoderme (figure 1). L'endoderme est à l'origine des épithéliums bronchique et pulmonaire, le mésoderme donne naissance aux structures cartilagineuses, musculaires, vasculaires et au tissu conjonctif.

Le premier stade est dit **embryonnaire** et se situe entre la 3<sup>ème</sup> et la 6<sup>ème</sup> SD. Il se caractérise par la formation de la trachée, des bronches souches, des bronches segmentaires et de leur vasculogénèse. Le bourgeon trachéal, première structure pulmonaire, apparaît vers le 26<sup>ème</sup> jour, à partir du sillon laryngo-trachéal, invagination de l'intestin antérieur primitif, endodermique. Il entraîne dans sa croissance quelques ramifications artérielles et veineuses ainsi que le mésenchyme environnant, au sein duquel s'effectueront les divisions bronchiques et vasculaires subséquentes.

Le stade **pseudo-glandulaire** se déroule entre 7 et 17 SD. Il est marqué par la formation de l'arbre bronchique et des structures vasculaires et par la différenciation progressive des cellules épithéliales qui donneront les structures cartilagineuses, les glandes sous-muqueuses, le muscle lisse bronchique et les cellules épithéliales proprement dites. La formation de

l'arbre bronchique se fait par une succession de divisions dichotomiques faisant apparaître 16 à 25 générations bronchiques se terminant à ce stade par des tubules respiratoires. Ce processus classiquement appelé « branching » s'achève définitivement à la fin de ce stade. La croissance ultérieure se fera par étirement et dilatation des voies aériennes existantes. L'épithélium pseudo-stratifié des tubules respiratoires est remplacé par des cellules en colonnes en proximal, qui donneront des cellules ciliées (rôle de nettoyage), et des cellules cuboïdes en distalité qui formeront un épithélium monocouche polarisé. Ces dernières sont des pneumocytes de type II (PII) immatures. Au cours de ce stade, l'aspect du poumon évoque de petits tubules tapissés d'épithélium au sein d'un mésenchyme abondant d'où la dénomination de stade « pseudoglandulaire ». A la fin de ce stade, l'ensemble de l'arbre bronchique et du réseau vasculaire pré-acinaire est mis en place.

Le stade **canaliculaire** s'étend de la 17<sup>ème</sup> à la 27<sup>ème</sup> SD. Il est marqué par l'apparition des acini (unités respiratoires), par la formation de la barrière alvéolo-capillaire et par la différenciation des pneumocytes. Les acini se forment à l'extrémité distale des bronchioles respiratoires, bordées par un réseau de capillaires sanguins. L'amincissement de l'épithélium en contact des capillaires permet la formation de la barrière alvéolo-capillaire, lieu d'échange entre l'air inspiré et le sang. Les cellules épithéliales alvéolaires (pneumocytes) de type I et II (PI et PII, respectivement) apparaissent à partir de l'épithélium primitif. Le PII est une cellule cuboïde qui contient des corps lamellaires. Elle représente 15% de la population cellulaire du poumon adulte et occupe 5% de la surface alvéolaire. Elle est la seule cellule capable de synthétiser l'ensemble des constituants moléculaires du surfactant, molécule tensioactive détectable à partir de la 24<sup>ème</sup> SD. Elle peut se différencier en PI (figure 2).

Le PI représente 8-10% de la population cellulaire du poumon adulte. Il est un élément cellulaire essentiel de la future zone d'échange alvéolo-capillaire dont il constitue 93% de la surface. Il s'agit d'une cellule aplatie, pauvre en organites cytoplasmiques et incapable de se diviser en raison de son état de différenciation terminale. A la fin de ce stade, les échanges gazeux sont possibles et le poumon peut assurer l'hématose même si les structures alvéolaires proprement dites font encore défaut.

Le stade **sacculaire** se situe entre 25 et 40 SD. Le poumon est alors fonctionnel. Ce stade se définit par la dilatation des tubules acinaires, formant des saccules, et l'amincissement des parois alvéolaires. Les saccules sont progressivement cloisonnés en espaces plus petits par septation. En clinique humaine, ce stade représente un des critères de viabilité autorisant la réanimation des prématurés.

Le stade **alvéolaire** s'étend de la 36<sup>ème</sup> SD à l'adolescence. Il se caractérise par l'apparition des alvéoles à partir des saccules dès 30 SD. Le nombre d'alvéoles à la naissance est moitié moindre que celui de l'adulte :  $3.10^8$  à la naissance contre  $6.10^8$  à l'âge adulte. La multiplication des alvéoles se fait par septation essentiellement jusqu'à l'âge de deux ans. Le développement pulmonaire jusqu'à 18-22 ans est essentiellement dû à l'élargissement des bronchioles terminales et des alvéoles.

Le surfactant pulmonaire est un film tensio-actif composé de lipides et de protéines tapissant en un fin film la surface alvéolaire. Son rôle est capital dans la physiologie pulmonaire. Ses capacités biophysiques permettent de prévenir le collapsus alvéolaire en fin d'expiration et de conserver la perméabilité bronchiolaire au cours de la respiration. Il a aussi un rôle immunitaire permettant la protection des poumons face aux agressions et aux infections dues à l'inhalation de particules et de micro-organismes. Il est produit dans les corps lamellaires des PII à partir de la 19<sup>ème</sup> SD mais il n'est synthétisé en quantité suffisante

qu'en fin de grossesse ce qui explique la fréquence des détresses respiratoires par déficit en surfactant chez le prématuré (maladie des membranes hyalines). Il est composé majoritairement de phospholipides (80%) associés à des protéines stabilisatrices (3%) : les « Surfactant Proteins » SP-A, SP-B, SP-C et SP-D. SP-A et SP-D sont des protéines hydrophiles implaquées plus particulièrement dans l'immunité pulmonaire. SP-B et SP-C, lipophiles, donnent le caractère tensioactif au surfactant. Seul le PII synthétise les 4 protéines du surfactant. Les cellules bronchiolaires de Clara sont capables de sécréter SP-A, SP-B et SP-D. SP-C est donc la seule protéine spécifique du PII<sup>13</sup>.

## 1.2. La vascularisation pulmonaire

Le développement de la vascularisation pulmonaire est intimement lié à celui de l'arbre pulmonaire et se fait en concomitance. Les vaisseaux pulmonaires se développent autour des voies aériennes de la 4<sup>ème</sup> à la 16<sup>ème</sup> SD. A travers les interactions épithélium-endothélium, le développement artériel pulmonaire aurait un rôle initiateur sur le développement de l'arbre aérien<sup>14</sup> et déterminant sur le « branching »<sup>15</sup>. Dès l'apparition des ébauches pulmonaires (stade embryonnaire), un réseau vasculaire connecté à la circulation systémique embryonnaire par les artères bronchiques apparaît à leur périphérie par vasculogénèse. A mesure que les ébauches pulmonaires progressent et que le développement de l'arbre bronchique s'opère, de nouveaux capillaires se développent par angiogénèse et accompagnent les structures les plus distales. Ces structures vasculaires se drainent dans les veines pulmonaires. La connexion avec les artères pulmonaires est plus tardive, au stade canaliculaire. Au cours du stade sacculaire, la protrusion des septa dans les saccules entraîne le réseau capillaire ce qui conduit à la formation d'une double couche capillaire. Par la suite le réseau capillaire se complexifie en suivant la multiplication des alvéoles.

### 1.3. Facteurs régulant le développement pulmonaire

L'organogénèse pulmonaire est orchestrée par un ensemble de facteurs génétiques et mécaniques dont l'intervention est variable dans l'espace et le temps et non déterminée par un programme préétabli<sup>16</sup>.

#### 1.3.1. Facteurs cellulaires et génétiques

Le développement pulmonaire dépend des interactions entre l'épithélium, le mésenchyme, les vaisseaux en formation et le muscle lisse bronchique. Le développement de la vascularisation pulmonaire est lié aux interactions épithélio-endothéliales, ce qui favorise un développement fortement intriqué des arbres vasculaires et pulmonaires avec l'intervention de cascades moléculaires communes. Ce système d'interactions est complexe, mettant en jeu des mécanismes autocrines, paracrines et juxtacrines. Il permet la morphogénèse pulmonaire et la différenciation des cellules souches, processus non préalablement défini par un programme global<sup>16</sup>. Les régulateurs biochimiques du développement pulmonaire sont nombreux comprenant des facteurs de transcription, des facteurs de croissance et leur voie de signalisation, des miRNA, la matrice extracellulaire et la voie des rétinoïdes.

Ainsi, l'induction précoce de la morphogénèse pulmonaire est régulée par des gènes et voies de signalisation comme GATA, HNF (hepatocyte nuclear factor), Shh, les rétinoïdes, Wnt, la  $\beta$ -caténine<sup>17</sup> ou FGF10<sup>18</sup>. La différenciation et la prolifération des cellules épithéliales alvéolaires sont soumises à la régulation de nombreux facteurs de transcription, comprenant TTF-1 (thyroid transcription factor-1)<sup>19</sup>, impliqué dans la régulation de l'expression de toutes les protéines du surfactant, SP-A, SP-B, SP-C et SP-D.



Les variations temporelles et spatiales de l'expression de ces différents régulateurs, dont FGF, permettent un développement harmonieux en différenciant les étapes de branching et celles de différenciation alvéolaire<sup>20</sup>.

L'AR joue un rôle essentiel dans le développement pulmonaire. Il intervient à tous les stades de l'embryogénèse et de la morphogénèse. Les arguments expérimentaux qui accréditent cette fonction découlent essentiellement d'études chez l'animal. Des anomalies du développement pulmonaire à type d'hypoplasie ou d'agénésie pulmonaire sont retrouvées lorsque la voie de signalisation des rétinoïdes est expérimentalement perturbée, régime carencé en vitamine A chez des rates gestantes<sup>21</sup> ou souris knock-out pour les gènes  $RAR\alpha/RAR\beta$  ou  $RAR\alpha/RXR\alpha$ <sup>22</sup>. L'AR est fortement impliqué dans le phénomène de ramification, permettant une prolifération normale du mésoderme et l'induction de l'expression de FGF10<sup>23</sup>. Il a une action également à un stade ultérieur, en inhibant le FGF10 lors de la ramification bronchique permettant un développement normal des voies aériennes<sup>24</sup>. Lors des phénomènes d'alvéolarisation péri- et post-nataux, un changement de composition en vitamine A est observé dans le poumon : diminution de la forme de stockage (rétinyl esters (RE)) et augmentation de la forme active (AR)<sup>25</sup>. A ces stades, de nombreuses molécules de la voie de signalisation des rétinoïdes sont détectés, CRBP (Cellular Retinol Binding Protein) I et II, CRABP (Cellular Retinoic Acid Binding Protein) I, RALDH (Retinol ALdehyde DesHydrogenase) 1 et 2,  $RAR\alpha$ ,  $RAR\beta$ ,  $RAR\gamma$ <sup>26</sup> démontrant la fonctionnalité de la signalisation des rétinoïdes lors de l'alvéogénèse. De même, les récepteurs des rétinoïdes ( $RAR\alpha$  et  $\beta$ ,  $RXR\alpha$  et  $\beta$ ) sont retrouvés à tous les stades du développement pulmonaire du lapin, utilisé comme modèle expérimental<sup>27</sup>.

### 1.3.2. Facteurs mécaniques

Les facteurs mécaniques sont essentiels au développement pulmonaire en créant un espace d'expansion intra-thoracique et un jeu de pressions intrapulmonaires, conséquence de la sécrétion de liquide pulmonaire et des mouvements respiratoires. Ces stimuli mécaniques vont permettre la mise en place d'une cascade mécanobiologique favorisant le développement du poumon et de sa vascularisation par des effets sur la croissance et sur la différenciation cellulaire<sup>28</sup>.

La nécessité d'un espace d'expansion s'illustre par la constatation d'une hypoplasie pulmonaire sévère dans les HCD avec présence intrathoracique de viscères abdominaux et est confirmé sur des modèles animaux. La compression induite par un dispositif implantable expansif ou par les viscères abdominaux herniés au travers d'un orifice diaphragmatique créé chirurgicalement ou par administration de nitrofène entraîne un défaut du développement pulmonaire responsable d'hypoplasie<sup>29,30</sup>.

Durant la vie fœtale, le poumon en cours de développement sécrète un liquide générant sous la glotte une pression positive. L'accumulation de liquide pulmonaire au sein des voies aériennes est à l'origine d'une discrète surpression (2-3 mm Hg) qui maintient le tissu pulmonaire dans un état d'étirement relatif<sup>31,32</sup>. La réalisation *in utero* d'une trachéostomie, en favorisant la fuite de liquide pulmonaire, conduit au développement d'un poumon hypoplasique avec augmentation du nombre de PII<sup>32-34</sup>. A l'inverse, une occlusion des voies aériennes, en majorant l'hyperpression par la rétention de liquide pulmonaire, conduit à un poumon hyperplasique avec une réduction des PII<sup>4,5,35</sup>.

Les mouvements respiratoires ont un rôle essentiel en permettant une variation des pressions intrapulmonaires et du volume de liquide pulmonaire retenu dans les voies aériennes. Le fluide produit augmente la pression au niveau des voies aériennes, mais durant

les mouvements respiratoires fœtaux, l'ouverture de la glotte permet une mise à niveau du gradient de pression. Les déplacements de liquide intra-pulmonaire dépendent essentiellement du tonus des muscles laryngés et de l'activité diaphragmatique. Lorsque les mouvements respiratoires fœtaux surviennent, le tonus laryngé se relâche favorisant la fuite de liquide pulmonaire tandis que les mouvements inspiratoires du diaphragme s'opposent à cette fuite<sup>31</sup>. Ce rôle primordial des mouvements respiratoires est illustré par des modèles expérimentaux animaux. Une hypoplasie pulmonaire est observée lorsque le nerf phrénique est sectionné<sup>36</sup> et dans un modèle souris knock-out MyoD où le muscle diaphragmatique est inefficace<sup>37</sup>. En cas de HCD, l'efficacité inspiratoire du diaphragme est nettement réduite puisque l'orifice empêche de créer une dépression pleurale significative. Il en résulte une fuite exagérée de liquide pulmonaire et une réduction de l'état d'étirement tissulaire prédominant du côté homolatéral à l'orifice. Ceci permet de rendre compte des atteintes pulmonaires parfois sévères en dépit d'une migration modeste des viscères abdominaux.

Le péristaltisme bronchique induit par l'action des cellules musculaires lisses péribronchiques favorise ces variations cycliques de pressions intrapulmonaires<sup>38</sup> en induisant un étirement et une relaxation des bourgeons bronchiques. D'origine mésodermique, ces cellules musculaires pourraient être exposées à la même atteinte que les membranes pleuropéritonéales dans la HCD, ce qui favoriserait le développement de l'hypoplasie pulmonaire en ne permettant pas le maintien d'un tonus bronchique suffisant. Cette hypothèse renforcerait la « dual hit hypothesis »<sup>39</sup> basée sur l'observation du modèle murin nitrofène. L'administration de nitrofène, herbicide intervenant sur la voie des rétinoïdes, est responsable d'une atteinte pulmonaire précoce bilatérale et d'une HDC entraînant une majoration de l'atteinte pulmonaire du côté de l'orifice diaphragmatique. En l'absence de nitrofène, l'atteinte précoce pourrait être induite par des facteurs environnementaux ou génétiques.

## 2. Le développement diaphragmatique

Chez l'homme, le diaphragme se forme entre la 3<sup>ème</sup> et la 7<sup>ème</sup> SD par fusion du septum transversum en avant et des membranes pleuro-péritonéales latéralement et en arrière. Le septum transversum, première structure présente, apparaît en regard des somites cervicaux supérieurs durant la 4<sup>ème</sup> SD. Cette fine plaque d'origine mésodermique va séparer le cœur du foie. Ce septum ne cloisonne pas totalement les cavités thoracique et abdominale qui restent en communication dans la région postérieure par les gouttières ou canaux pleuropéritonéaux de part et d'autre de l'intestin primitif (figure 3).

Les membranes pleuro-péritonéales se développent à partir des parois thoraciques postérolatérales et leur extrémité libre se projette en regard des canaux pleuropéritonéaux. Au cours de la 5<sup>ème</sup> SD, la croissance rapide de la portion dorsale de l'embryon par rapport à sa portion ventrale aboutit à une « migration » relative du diaphragme et de ses nerfs issus des racines C3, C4 et C5 vers le niveau des somites thoraciques. A la fin de la 6<sup>ème</sup> SD, les extrémités libres des membranes pleuropéritonéales fusionnent avec le septum transversum réalisant le diaphragme primitif. Les cavités pleurales, péricardique et péritonéale sont alors séparées (figure 4).

Vers la 8<sup>ème</sup> SD, la partie dorsale du diaphragme se situe au niveau des premières vertèbres lombaires. Entre les 9<sup>ème</sup> et 12<sup>ème</sup> SD, les myoblastes migrent des myotomes cervicaux et thoraciques pour coloniser le diaphragme primitif et former les parties musculaires du diaphragme. Ils rejoignent le plexus brachial et poursuivent leur migration jusqu'aux membranes pleuropéritonéales. Ils prolifèrent et colonisent le diaphragme primitif selon trois axes. Ces précurseurs musculaires se différencient alors du centre vers la périphérie en

myotubes primaires puis secondaires. La colonisation musculaire épargne la région du centre tendineux ou centre phrénique et forme des muscles digastriques. Les piliers du diaphragme ont une origine embryonnaire différente, les somites lombaires. Les axones du nerf phrénique, également originaires des somites cervicales, gagnent les membranes pleuropéritonéales via le plexus brachial puis respectent le même schéma de colonisation diaphragmatique avec un léger retard sur les précurseurs musculaires (environ 200  $\mu\text{m}$ )<sup>41</sup>.

Ces événements sont sous la dépendance de nombreux gènes<sup>42</sup>, dont la voie de signalisation des rétinoïdes (figure 5)<sup>40</sup>.

## Partie II : La hernie de coupole diaphragmatique (HCD) congénitale en pathologie humaine

### 1. Physiopathologie de la HCD congénitale

La HCD se définit par la persistance d'un orifice au niveau du diaphragme, responsable d'une communication entre les cavités thoracique et abdominale (figures 6 et 7). Sa formation est très précoce, au cours de la mise en place du diaphragme primitif, soit avant 8 SD. Sa physiopathologie reste méconnue et est probablement multifactorielle.

#### 1.1. Approche anatomo-histologique

La littérature développe essentiellement 5 théories qui résultent de l'observation du modèle murin toxicologique dans lequel la HCD est induite en administrant à la femelle gestante un herbicide : le nitrofène (2,4-dichloro-phenyl-p-nitrophenyl ether)<sup>44</sup>. Nous ne disposons pas de modèle animal avec hernie diaphragmatique spontanée.

La théorie la plus classique repose sur un défaut de fermeture des canaux pleuropéritonéaux qui pourrait être favorisé par l'interposition d'une anse intestinale<sup>44</sup>. Cette hypothèse apparaît très improbable puisque la réintégration abdominale de l'intestin a lieu plusieurs semaines après la constitution du diaphragme primitif. De plus, l'orifice de la hernie se situe souvent plus médialement que l'emplacement du canal pleuropéritonéal.

Une autre théorie considère que l'anomalie du développement pulmonaire précède l'anomalie du développement diaphragmatique. Cette théorie a été encouragée par l'observation d'un retentissement pulmonaire bilatéral et pas seulement limité au côté de la HCD. Iritani *et al.* ont montré que le développement pulmonaire est altéré très précocement dans le modèle nitrofène alors qu'aucune atteinte diaphragmatique n'est encore repérable<sup>45</sup>.

En fait, la migration intrathoracique induit une déviation médiastinale qui peut expliquer à elle seule le retentissement pulmonaire bilatéral. Le retentissement pulmonaire précoce n'a pas été retrouvé en utilisant des doses plus faibles de nitrofène<sup>46,47</sup>. De plus, les agénésies pulmonaires chez l'homme ou chez l'animal ne sont que rarement associées à des HCD<sup>22</sup>. Cette théorie de l'atteinte pulmonaire primitive apparaît désormais peu convaincante. Mais il paraît très probable qu'une atteinte pulmonaire et diaphragmatique ait la même étiologie du fait d'un partage des mêmes voies de signalisation moléculaire impliquées dans leur développement, à l'origine de la « dual hit hypothesis »<sup>39</sup>.

Une troisième théorie est celle d'un défaut de colonisation par le nerf phrénique. Elle s'appuie sur l'observation d'une diminution de la taille et du nombre d'axones au niveau du nerf phrénique du côté atteint<sup>47</sup>, mais il est bien établi que la taille d'un nerf reflète la masse musculaire à innover. L'atteinte du nerf phrénique pourrait donc être considérée comme une conséquence de l'atteinte diaphragmatique.

Une autre théorie évoque une colonisation musculaire insuffisante conduisant à un diaphragme fragile et susceptible de se rompre sous l'effet de la pression abdominale<sup>48</sup>. Cette anomalie pourrait correspondre à une entité particulière de HCD observée chez l'humain qui correspond à une éventration d'un diaphragme membraneux avec persistance d'un sac herniaire. Elle est confirmée par un modèle murin homozygote pour la mutation c-met qui empêche la migration des précurseurs musculaires dans le diaphragme primitif<sup>49</sup>.

La dernière théorie est celle d'une atteinte précoce des membranes pleuropéritonéales, observée dans le modèle nitrofène<sup>47</sup>. Le développement insuffisant de ces membranes pourrait être dû à un excès d'apoptose<sup>50</sup> ou à un déficit de prolifération<sup>51</sup> du contingent cellulaire des somites cervicales, ce qui implique le rôle des crêtes neurales.

Ainsi il apparaît que la HCD n'est pas le fruit d'un simple défaut de fermeture des canaux pleuropéritonéaux. Il s'agirait plutôt d'une atteinte précoce des membranes pleuropéritonéales

associée éventuellement à l'atteinte d'autres contingents cellulaires. La non-conformité du diaphragme primitif conduirait à des anomalies de colonisation musculaire puis nerveuse à l'origine de l'accumulation péri-orificielle de structures musculaires, témoin d'une migration interrompue.

## 1.2. Approche génétique et moléculaire

L'association de HCD à des anomalies génétiques chez l'humain, 10 à 20% des cas, et l'étude de modèles animaux de HCD ont permis d'impliquer plusieurs gènes et plusieurs voies de signalisation dans la genèse de la HCD et d'en expliquer l'hétérogénéité phénotypique. L'approche génétique de la HCD s'appuie sur l'observation de cette pathologie dans des anomalies chromosomiques (trisomies 13, 18 et 21, et tétrasomie 12p), dans des syndromes monogéniques (Ehlers-Danlos, Marfan, Cornélia De Lange, dysplasies cranio-frontales, Matthew-Wood, Golabi), dans des modèles animaux knock-out avec défauts diaphragmatiques vrais (knock-out de CoupTFII, RAR $\alpha/\beta$ , Wnt1, Robo1 ou Slit3) ou défauts musculaires (knock-out de Fog2, GATA4, Pax3, cMet, Lysyl Oxidase, Sim2, HGF, Met, MyoD ou Myogenine), plus récemment sur l'étude de microremaniements (ou CNV) par CGH array (présence sur CRBP1 et 2, LRAT, RALDH4, GATA4, Fog2, STRA6, CoupTFII,...) et sur le séquençage du génome entier.

Des gènes candidats ont pu être testés sur des modèles animaux, pour exemple les protéines de la voie de signalisation FGF (FGF-10 et FGFR2) et VEGF (VEGF, VEGFR1 et VEGFR2) dont l'expression est diminuée dans le modèle nitrofène<sup>52-54</sup>. Ces études ont permis de comprendre certaines étiologies de HCD présentes dans des tableaux syndromiques<sup>40</sup>.

L'étude des anomalies génétiques associées à des HCD chez l'humain a mis en évidence des gènes et des loci probablement impliqués dans la pathogénèse de la HCD. Pour exemple,



il est retrouvé une HCD chez les individus ayant une délétion du chromosome 15 (q26.1-q26.2) qui concerne une petite région où se situe le gène COUP-TFII (chick ovalbumin upstream promoter transcription factor II)<sup>55</sup> dont la souris knock-out présente une HCD<sup>56</sup> et qui est impliqué dans la voie des rétinoïdes. Des études de liaison ont permis de mettre en évidence des mutations du gène codant pour STRA6, récepteur membranaire des rétinoïdes, dans le syndrome de Matthew-Wood défini par l'association d'une microphtalmie ou anophtalmie, d'une HCD, de malformations cardiaques et d'une hypoplasie ou aplasie pulmonaires<sup>57</sup>.

Ces différentes études génétiques permettent de mettre en évidence le rôle de nombreux gènes dans la formation de la HCD. Il est remarquable qu'il existe de façon très fréquente un lien entre le gène imputé et la voie des rétinoïdes.

Cette hypothèse est renforcée par le modèle animal de référence de la HCD, le murin nitrofène, exposé à un inhibiteur des rétinoïdes par action sur RALDH2, et par l'observation en population humaine et animale des effets d'une carence en vitamine A<sup>43,58</sup>.

## 2. Conséquences pulmonaires de la HCD

La morbi-mortalité élevée des HCD est due à l'hypoplasie pulmonaire et au développement d'une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) persistante.

L'hypoplasie pulmonaire est une diminution pathologique du volume pulmonaire, conséquence d'un arrêt du développement alvéolaire en milieu de stade canaliculaire dans la HCD. Cette atteinte se caractérise par une diminution marquée du nombre de divisions bronchiques (12-14 générations dans le poumon homolatéral et 16-18 générations dans le poumon controlatéral au lieu de 25), et par une réduction du nombre des bronchioles terminales et de l'espace alvéolaire. Elle est évaluée par le rapport poids pulmonaire / poids corporel total. Sur le plan histologique, les études autopsiques révèlent une atteinte pulmonaire bilatérale avec une prédominance sur le côté homolatéral à la HCD. De cette observation découle l'hypothèse que l'hypoplasie est le résultat de la compression mécanique réalisée par la hernie des viscères abdominaux en intra-thoracique. Mais le fait que l'hypoplasie est bilatérale peut évoquer un mécanisme commun ou concomitant d'une action sur le développement pulmonaire et diaphragmatique<sup>59</sup>. Cette double hypothèse ou « dual hit hypothesis » expliquerait une atteinte primitive du développement pulmonaire avec un mécanisme secondaire de compression majorant l'hypoplasie en homolatéral.

L'effet de la hernie sur le développement pulmonaire apparaît comme la résultante d'un mécanisme multifactoriel et évolutif avec l'âge gestationnel. Une agression précoce perturbe le développement de l'arbre bronchique tandis qu'une agression plus tardive nuit à la multiplication alvéolaire<sup>60</sup>. Au cours de la HCD, la migration intrathoracique des viscères abdominaux survient habituellement dès le stade pseudoglandulaire conduisant à une altération du « branching » avec réduction de la surface alvéolaire appréciée histologiquement par le compte radial alvéolaire (CRA). Des anomalies épithéliales avec excès de PII<sup>61</sup> ont

aussi été constatées, entraînant des altérations morphologiques avec épaissement des cloisons alvéolaires et des altérations fonctionnelles de la barrière alvéolocapillaire. Une dysplasie broncho-pulmonaire résulte du dysfonctionnement de ce poumon hypoplasique et dysmature et des lésions tissulaires induites par les thérapeutiques ventilatoires en post-natal.

La HCD s'accompagne d'un développement anormal de la vascularisation. Le lit vasculaire se trouve réduit par une diminution du nombre des ramifications vasculaires. De plus les artères pulmonaires présentent un épaissement de la média et de l'adventice alors que les branches artérielles plus distales sont le siège d'une muscularisation inhabituelle<sup>62</sup> avec un développement plus important et plus en distalité des cellules du muscle lisse vasculaire<sup>63</sup>. Ces modifications conduisent à des anomalies fonctionnelles responsables de l'HTAP.

Au final, la surface alvéolaire d'échanges gazeux est très nettement diminuée et la circulation pulmonaire conserve des pressions élevées ce qui entraîne de graves troubles respiratoires chez le nouveau-né. Toutefois, les modifications décrites ne sont pas irréversibles. Si l'atteinte pulmonaire reste compatible avec une hématoxémie suffisante à la période néonatale, un rattrapage postnatal de la croissance alvéolaire va survenir de même qu'un remodelage vasculaire conduisant à une régression progressive de l'HTAP<sup>64</sup>.

### 3. Données épidémiologiques

La HCD concerne 2 à 4/10000 naissances vivantes<sup>1,2,67</sup>. La prévalence en Europe de la HCD isolée est de 1,6/10000 naissances vivantes. Elle est responsable de 1 à 2% de la mortalité infantile.

La HCD présente une grande hétérogénéité phénotypique. Elle est le plus souvent située à gauche (80% des cas) et peut être bilatérale dans 4% des cas<sup>2</sup>. La forme la plus commune est la hernie de Bochdalek dans la région postérolatérale du diaphragme (85%) mais elle peut aussi être en antérieur (hernie de Morgagni) (figure 8).

La taille de l'orifice est variable allant d'une discrète perte de substance à une agénésie complète de coupole. Un sac herniaire est parfois présent.

Elle est isolée dans 54-64% des cas. L'incidence des anomalies congénitales associées est d'environ 40%, réalisant un tableau syndromique connu ou non<sup>1</sup>. Les anomalies associées les plus fréquentes sont cardio-vasculaires (11-15%), musculo-squelettiques, du système nerveux-central et de l'appareil uro-génital<sup>1,65,68</sup> (tableau 1). L'association avec d'autres anomalies n'est pas corrélée au côté de la HCD mais est plus fréquente en cas de HCD bilatérale. Dans 7-16% des cas, elle est associée à des anomalies chromosomiques<sup>1,2,69</sup> (tableau 2), plus fréquemment en cas d'anomalies associées (39% vs. 4%)<sup>69</sup>. Mais il faut différencier les anomalies secondaires à la HCD, comme certaines pathologies cardiaques, persistance du canal artériel ou du foramen ovale, une dextrorotation ou une hypoplasie du cœur gauche, et la malrotation intestinale.

Certains antécédents maternels semblent associés de manière significative à la survenue d'une HCD, comme l'existence d'un diabète pré-existant à la grossesse et la consommation d'alcool<sup>70</sup>.

Les taux de mortalité et de morbidité sont très hétérogènes et très variables d'un hôpital à l'autre, allant respectivement de 5 à 50% et de 20 à 60%. Le taux de naissances vivantes est de 69 à 89% et la survie post-natale est de 47 à 73%<sup>1,2,69</sup>. Sur un registre français, le taux de mort fœtale *in utero* (MFIU) est de 4% et d'interruption médicale de grossesse de 19%<sup>2</sup>. Selon une étude européenne récente<sup>1</sup>, 83% des HCD aboutissent à une naissance vivante, 13% font l'objet d'une interruption de grossesse et 4% présentent une MFIU. Lorsque la HCD est isolée, ces taux sont de 89%, 9% et 2%, respectivement<sup>1</sup>. La survie à 1 semaine de vie est de 69% en Europe, plus importante en cas de HCD isolée (73%)<sup>1</sup>. L'évaluation de la mortalité périnatale est souvent sous-estimée par non intégration des décès survenus avant l'admission en pédiatrie. Ce biais de « mortalité cachée » correspond aux décès par MFIU, interruption médicale de grossesse et décès néonatal très précoce avant transfert, qui peut atteindre 36% des cas de HCD<sup>71</sup>. La grande variabilité peut aussi s'expliquer par le type de HCD considérée, isolée, gauche ou toutes HCD confondues.

Le devenir à long terme des enfants survivants est grevé d'une forte morbidité. Le taux de récupération sans séquelle est d'environ 50%. La morbidité est influencée par de nombreux facteurs, comme la réalisation d'un diagnostic anté-natal, la prise en charge anté-, péri- et post-natale, le moment du traitement chirurgical ou de l'utilisation de l'oxygénation par membrane extra-corporelle (ECMO). Les principales séquelles observées sont respiratoires, digestives, nutritionnelles, orthopédiques (scoliose, déformations thoraciques) et neurologiques (hypotonie, déficit moteur, troubles du langage, déficit auditif). Les complications respiratoires concernent 30 à 50% des enfants, à type de dysplasie bronchopulmonaire (DBP), HTAP persistante et susceptibilité aux infections virales<sup>72</sup>. La DBP est la séquelle post-natale majeure de ces enfants. Sa sévérité est corrélée aux mesures IRM anténatales du volume pulmonaire, au terme de la naissance et au recours à l'ECMO<sup>73,74</sup>. Les complications digestives (reflux gastro-oesophagien (RGO), troubles de l'oralité) sont,

avec l'insuffisance respiratoire, responsables de troubles nutritionnels qui entraînent une altération de la croissance staturo-pondérale difficile à prendre en charge<sup>72</sup>. Les déformations thoraciques telles que le pectus excavatum et les déviations rachidiennes, scolioses, représentent les complications orthopédiques de la HCD et sont présentes chez 21 à 48% des enfants<sup>72</sup>. Ces enfants sont aussi à risque de complications chirurgicales, principalement durant la première année de vie, représentées par la récurrence de la HCD et l'occlusion sur bride<sup>72</sup>. Une morbidité neurologique a été décrite, avec un taux d'infirmité motrice et cérébrale à 5%, liée à un retard de maturation cérébrale, des lésions de la substance blanche et grise et de la capsule interne, et un retard des acquisitions. Elle serait principalement due aux techniques de prise en charge post-natale<sup>72,75</sup>. Les retards de développement neurologique sont associés à l'utilisation de l'ECMO, à une oxygène-dépendance post-natale et à un faible niveau socio-économique<sup>76</sup>. A plus long terme, de jeunes adultes opérés de HCD en post-natal ont un volume pulmonaire identique à une population sans HCD, avec une prévalence plus importante d'asthme et une détérioration modérée des capacités de diffusion alvéolaire<sup>77</sup>. La qualité de vie ressentie à l'âge adulte est identique à celle de la population générale.

L'optimisation des soins anténatals et postnatals, telle quelle est expliciter par le protocole de diagnostic et de soins (PNDS) proposé par la haute autorité de santé (HAS), a pour but de diminuée la morbi-mortalité de la HCD.

#### 4. Diagnostic prénatal de la HCD

Les enjeux du diagnostic prénatal reposent sur la détection anténatale de la HCD et sur son évaluation pronostique. La détection anténatale permet d'organiser la naissance en centre périnatal de type III avec une équipe de néonatalogie prête à accueillir l'enfant. Elle permet également de rechercher des anomalies morphologiques ou chromosomiques associées dont la sévérité peut conduire les parents à solliciter une interruption médicale de grossesse. Enfin, des critères pronostiques prénatals permettent d'identifier les cas les plus sévères qui peuvent relever d'une chirurgie foetale. Le taux de détection anténatale était, au début des années 2000, de 54%, 46% en cas de HCD isolée et 68% en cas de syndrome polymalformatif<sup>2</sup>. Le diagnostic prénatal est plus fréquent en cas de HCD bilatérale (63%, vs. 31% pour la HCD droite et 52% pour la HCD gauche). Les progrès des techniques échographiques ont permis une forte amélioration du diagnostic anténatal de la HCD avec un taux, au début des années 2000, de 73%<sup>67</sup>, soit proche de 50% en cas de HCD isolée et de plus de 80% lorsqu'elle est associée à d'autres anomalies<sup>2</sup>. Il modifie le taux de survie (38% vs. 71%) du fait d'un recours à l'interruption médicale de grossesse<sup>2</sup>. De ce fait, toute suspicion de HCD doit conduire à adresser la patiente auprès d'un centre de référence pour confirmer le diagnostic, évaluer le pronostic et organiser la prise en charge du nouveau-né.

##### 4.1. Diagnostic positif de la HCD

L'image échographique du diaphragme apparaît sous la forme d'un liseré hypoéchogène qui résulte de l'interface ultrasonore entre les structures thoraciques (poumons et médiastin) et les viscères abdominaux (foie essentiellement) (figure 9). Ce liseré est facilement identifiable

sur une coupe sagittale mais sa portion postérieure reste souvent difficile à explorer en raison de l'interposition des viscères abdominaux ou de cônes d'ombres induits par le rachis et les côtes. Puisque la hernie siège le plus souvent à la partie postérieure, la visualisation du liseré diaphragmatique dans sa partie antérieure ne permet pas d'affirmer l'intégrité du diaphragme. En cas de HCD, la visualisation directe de l'orifice diaphragmatique est pratiquement impossible. Le diagnostic échographique repose sur la visualisation de viscères abdominaux dans le thorax, ce qui constitue un signe direct de hernie. Les viscères herniés peuvent être constitués par l'estomac (image anéchogène sur le bord postérolatéral gauche du cœur), le tube digestif (images hétérogènes parfois animées de péristaltisme), le foie (repérage facilité par la migration intra-thoracique de la vésicule biliaire), rarement la rate et exceptionnellement le rein (figure 10). Le doppler couleur favorise l'identification du foie hernié en montrant une déviation du sinus porte vers la gauche ou le trajet transdiaphragmatique des branches portales du lobe hépatique gauche. L'IRM peut permettre de confirmer le diagnostic de HCD et caractériser le contenu herniaire<sup>3</sup>, elle détecte plus facilement le foie hernié que l'échographie<sup>78</sup> (figure 11).

La migration intra-thoracique des viscères abdominaux peut être réduite ce qui rend la détection plus difficile. Elle peut également être tardive ce qui peut conduire à repérer une HCD au troisième trimestre de la grossesse alors que les examens échographiques antérieurs s'étaient révélés normaux.

Des signes indirects favorisent le diagnostic tels que la déviation de l'axe du cœur ou de l'ensemble du médiastin, un hydramnios (favorisé par la compression oesophagienne et/ou la plicature gastrique<sup>79,80</sup>) ou l'impossibilité de repérer l'image gastrique anéchogène dans le quadrant supérieur gauche de l'abdomen<sup>81</sup>. L'observation d'une anasarque fœtale peut aussi être la porte d'entrée au diagnostic (Publication N°1)<sup>82</sup>.



Le diagnostic de HCD droite est souvent plus difficile, le viscère habituellement ascensionné est le foie dont l'échogénicité est proche de celle des poumons<sup>66</sup>.

Une étude a cherché à évaluer rétrospectivement les circonstances d'une non-détection de la HCD<sup>84</sup>. Dans un tiers des cas celle-ci est attribuée à des conditions d'examen médiocres (obésité maternelle, position foetale défavorable) mais dans deux tiers des cas, l'opérateur semble s'être satisfait de coupes approximatives (non respect des critères pour la coupe des 4 cavités cardiaques, pas d'image gastrique évidente sur la coupe abdominale). La connaissance et le respect des règles de bonne pratique sont donc indispensables pour optimiser la détection prénatale de la HCD.

#### 4.2. Diagnostic différentiel

Le diagnostic différentiel le plus délicat est celui d'une éventration diaphragmatique caractérisée par un défaut de la vascularisation du diaphragme, qui peut, comme la HCD, s'associer à d'autres anomalies malformatives, à une hypoplasie pulmonaire et à une forte mortalité<sup>85</sup>.

Le plus fréquent est celui d'une maladie adénomatoïde kystique pulmonaire qui peut réaliser l'aspect d'images liquidiennes multiples intra-thoraciques avec un refoulement du coeur. Dans ce cas, l'interface ultrasonore de la coupole diaphragmatique peut être suivie sur tout son trajet, l'estomac et le foie restent en position intra-abdominale et aucun mouvement de péristaltisme n'est vu au sein des images thoraciques anormales (figure 12). Toutefois la distinction entre ces deux anomalies est parfois difficile et c'est l'IRM foetale qui permettra de fixer le diagnostic.

La séquestration pulmonaire se manifeste par une masse hyperéchogène de forme triangulaire ou arrondie, le plus souvent dans la région postérobasale du champ pulmonaire

gauche. La visualisation au doppler couleur d'une vascularisation systémique provenant de l'aorte thoracique ou abdominale permet d'en faire le diagnostic. Le kyste bronchogénique apparaît sous la forme d'une image anéchogène au sein d'un parenchyme pulmonaire d'aspect normal.

L'atrésie bronchique induit une hyperplasie pulmonaire du territoire correspondant qui se manifeste par une image hyperéchogène régulière. Si l'atrésie porte sur une bronche souche, l'ensemble du poumon devient hyperplasique et son expansion peut conduire à inverser la courbure du diaphragme (convexité caudale).

L'agénésie pulmonaire unilatérale induit une déviation médiastinale majeure. Son diagnostic peut être évoqué en confirmant par le doppler couleur l'absence de branche artérielle pulmonaire.

Des pathologies tumorales peuvent également induire un diagnostic erroné : tératome médiastinal, neuroblastome, lymphangiome, hamartome. Leur caractère hétérogène entraîne parfois la confusion avec des images digestives intra-thoraciques.

#### 4.3. Evaluation pronostique de la HCD

La prise en charge anténatale d'un fœtus présentant une HCD dépend essentiellement de l'évaluation pronostique qui repose sur l'existence d'anomalies associées et l'importance de la hernie évaluée par le contenu de la hernie et le retentissement pulmonaire. Ces éléments doivent aider les médecins à expliquer aux parents les risques et les conséquences de la HCD afin de les aider à prendre une décision pour le devenir de leur enfant. L'appréciation pronostique de la HCD reste délicate, elle s'appuie sur une recherche minutieuse d'anomalies associées et sur l'évaluation de critères dont la valeur prédictive reste discutable.

#### 4.3.1. Anomalies associées

Les anomalies associées réduisent les chances de survie en majorant les difficultés de la réanimation néonatale (cas des cardiopathies par exemple) ou altèrent gravement la qualité de vie notamment par l'apparition de troubles cognitivo-comportementaux (cas de la plupart des anomalies chromosomiques). L'établissement du caryotype fœtal est indispensable. Il est idéalement réalisé sur liquide amniotique ou trophoblaste plutôt que sur sang fœtal car certaines anomalies en mosaïque ne sont pas présentes sur les cellules sanguines (cas de la tétrasomie 12p du syndrome de Pallister-Killian). Les malformations associées sont parfois difficiles à repérer et il ne faut pas hésiter à répéter l'exploration échographique. La réalisation d'une échocardiographie foetale par un référent est conseillée en raison de l'association fréquente entre HDC et cardiopathie et en raison des difficultés à mener une exploration cardiaque satisfaisante lorsque le cœur est dévié.

#### 4.3.2. Critères pronostiques

Lorsque la HCD est isolée, une évaluation du pronostic, la plus précise possible, est nécessaire. Il n'existe pas de facteur pronostique ayant une valeur prédictive positive de 100%. Actuellement, les facteurs pronostiques validés sont le rapport « poumon sur tête » (« Lung-to-Head Ratio» des anglo-saxons (LHR)) observé/attendu (o/a)), la mesure du volume pulmonaire en IRM et la position du foie, qui estiment de façon plus ou moins directe le degré d'hypoplasie pulmonaire.

Le LHR o/a permet une évaluation indirecte de l'hypoplasie pulmonaire, facteur pronostique principal de la HCD. Le LHR s'évalue en échographie 2D sur une coupe thoracique transversale passant par les 4 cavités cardiaques. Plusieurs méthodes de mesure ont pu être proposées (figure 13)<sup>86</sup>.

Le plus couramment utilisé est le produit des deux plus grands diamètres orthogonaux du poumon droit (mm<sup>2</sup>), en cas de HCD gauche, divisé par la circonférence céphalique (mm) mesurée sur une coupe du diamètre bipariétal<sup>87,88</sup> (figure 14).

L'évaluation pulmonaire est indirectement ajustée à la biométrie foetale par la mesure de la circonférence céphalique. Cette technique d'appréciation du volume pulmonaire est très grossière mais a l'avantage de ne pas imposer le suivi exhaustif de tout le contour pulmonaire. La mesure du LHR nécessite un temps d'apprentissage d'environ 70 mesures<sup>89</sup>. Le LHR est l'un des seuls critères pronostiques à avoir prouvé son intérêt au cours d'études prospectives<sup>79,88,90,91</sup>. Il a initialement été décrit avec une mesure réalisée entre 24 et 26 SA et les seuils retenus ne sont validés que pour cette période. En cas de LHR<0,6 aucun foetus ne semble avoir survécu, tandis qu'un LHR>1,4 serait de très bon pronostic (survie proche de 100%)<sup>87,88</sup>. Pour les valeurs intermédiaires, la survie serait autour de 60%.

Afin de s'affranchir de l'effet « âge gestationnel », il a été étudié le rapport du LHR observé sur le LHR attendu pour l'âge gestationnel (LHR o/a)<sup>92,93</sup>. Le LHR o/a d'un poumon sain est compris entre 65 et 100% et est en moyenne de 40% en cas de HCD gauche. Il est corrélé à l'hypoplasie pulmonaire évaluée en post-mortem<sup>94</sup>. Le calcul du LHR o/a peut être réalisé sur différents logiciels disponibles sur internet :

- [http://fr.ap-hm.fr/sites/default/files/files/Hernies%20diaphrag/calculette\\_lhr.html](http://fr.ap-hm.fr/sites/default/files/files/Hernies%20diaphrag/calculette_lhr.html),
- <http://www.perinatology.com/calculators/LHR.htm>,
- <http://www.totaltrial.eu>.

Une stratification en 4 niveaux a été proposée<sup>96</sup> (figure 15) :

- Pour un LHR o/a inférieur à 15%, l'hypoplasie pulmonaire est extrême, le taux de survie est quasi nul.
- Pour un LHR o/a entre 15 et 25%, l'hypoplasie pulmonaire est sévère, le taux de survie est égal ou inférieur à 20%.
- Pour un LHR o/a entre 26 et 35% ou un LHR o/a entre 36 et 45% avec le foie en intrathoracique, l'hypoplasie est modérée, le taux de survie est compris entre 30 et 60%.
- Pour un LHR o/a entre 36 et 45% ou supérieur à 45% avec hernie du foie, l'hypoplasie est moyenne et le taux de survie dépasse 75%<sup>92</sup>.

Le LHR o/a est corrélé à la mortalité post-natale, à la nécessité d'une ECMO, au risque d'une dépendance ventilatoire et au développement d'une HTAP en post-natal<sup>97-100</sup>.

La valeur pronostique du LHR o/a est fonction de la présence ou non d'une hernie du foie<sup>101,102</sup>, mais aussi du côté de la HCD<sup>92</sup>. La survie est quasi nulle en cas de LHR o/a inférieur à 46% en cas de hernie droite.

Le LHR o/a est prédictif de la morbi-mortalité après traitement anté-natal par occlusion de trachée per foetoscopie (FETO)<sup>101,102</sup>.

Il est aussi possible d'apprécier le volume pulmonaire par échographie 3D (figure 16)<sup>95</sup>. Le rapport du volume mesuré sur le volume attendu pour l'âge gestationnel apparaît plus réduit chez les foetus porteurs de HCD ne survivant pas en période néonatale<sup>95</sup>. Une étude comparant la mesure en échographie 2D du LHR o/a et la mesure en échographie 3D du volume pulmonaire montrait que le LHR o/a avait une meilleure valeur prédictive<sup>103</sup>. La mesure du volume pulmonaire à l'échographie nécessite une expertise dans le maniement de

l'échographie 3D que ne nécessite pas la mesure du LHR, ce dernier paraît donc plus adapté à la pratique courante<sup>106</sup>.

La mesure du volume pulmonaire en IRM est réalisée en séquence pondérée T2 sur les deux poumons, il s'agit d'un volume pulmonaire total (figure 17).

Comme pour les mesures échographiques, le volume pulmonaire mesuré est reporté au volume attendu (TFVL : total fetal lung volume).

- Pour un TFVL o/a inférieur ou égal à 25%, la survie post-natale est de 12% en cas de foie hernié et de 40% en l'absence de hernie hépatique.
- Pour un TFVL o/a compris entre 26 et 35%, la survie est de 37,5 et 85%. Pour un TFVL o/a entre 36 et 45%, la survie est de 64 et 86%.
- Pour un TFVL o/a de plus de 45%, la survie est de 75 et 86% (figure 18)<sup>105</sup>.

La mesure du volume pulmonaire total est plus performante en IRM qu'en échographie 3D avec un poumon ipsilatéral visualisé dans 60% des cas en échographie et dans 100% des cas en IRM<sup>105</sup>. Le TFVL o/a est corrélé à la mortalité<sup>98,99</sup>, à la survenue d'une HTAP en post-natal<sup>98</sup> et au développement d'une DBP<sup>73</sup>. L'IRM a l'avantage de ne pas être limitée par les mensurations maternelles ni par la position fœtale.

Les résultats des études comparant les valeurs prédictives des mesures échographiques 2D et des mesures IRM sont contradictoires, soit en faveur de la mesure du LHR o/a<sup>99,107</sup>, soit du TFVL o/a<sup>108</sup>, soit avec des résultats équivalents<sup>105</sup>. De toute évidence, les deux mesures doivent être utilisées. La mesure du LHR o/a est un paramètre accessible en pratique courante et peut être fait dans le temps du diagnostic de la HCD. L'acquisition IRM complète l'échographie 2D par la mesure du TFVL o/a, du volume de foie hernié et en précisant la position de l'estomac<sup>109</sup>.

La présence du foie en intrathoracique est un facteur pronostique essentiel de la HCD entraînant une diminution significative de la survie néonatale (45-53% vs. 74-83%)<sup>98,107,111,112</sup> et une augmentation de la morbidité, plus de recours à l'ECMO<sup>100</sup> et risque augmenté d'HTAP en post-natal<sup>98,113</sup>. Le diagnostic de hernie hépatique peut être parfois délicat en échographie du fait de l'échogénicité du foie, en cas de doute, une imagerie complémentaire par IRM doit être réalisée. Il est aussi rendu difficile par différents degrés d'ascension possible allant de la simple ascension d'une partie du lobe gauche à une luxation de la majeure partie du foie dans le thorax.

La valeur pronostique de la hernie hépatique en intrathoracique peut être affinée par l'évaluation en IRM du volume du foie hernié, mesuré par le calcul du ratio du volume de foie hernié sur le volume de la cavité thoracique<sup>104,114</sup> ou par la proportion de foie hernié<sup>104,115,116</sup>, mais sa valeur prédictive comparée à celle du TFVL o/a est discutable<sup>104,116</sup>. Sa mesure avant FETO est corrélée au risque de mortalité post-natale<sup>104</sup>.

La migration de l'estomac en intrathoracique est un facteur pronostique de la mortalité et de la morbidité néonatales<sup>113,117,118,110</sup>, probable reflet d'un défaut important. Elle est associée à une augmentation de l'HTAP néonatale<sup>113</sup>, à un recours plus fréquent à l'ECMO, à plus de difficultés respiratoires et à une réparation chirurgicale plus difficile<sup>118</sup>. Une classification de la position de l'estomac a été proposée en 4 grades (figure 19)<sup>110</sup>.

La position de l'estomac dans le thorax semble aussi avoir une valeur pronostique, avec plus de morbi-mortalité en cas d'estomac en position médiane ou postérieure dans le thorax gauche ou en rétrocardiaque<sup>118</sup>, ou de grade 4, indépendamment du LHR o/a<sup>110</sup>. Ce facteur prédictif est retrouvé chez les fœtus bénéficiant d'une OT<sup>110</sup>.

Le pronostic d'une HCD est fonction du degré d'hypoplasie pulmonaire, mais aussi de la sévérité de l'HTAP persistante. L'évaluation de la vascularisation pulmonaire fait l'objet de nombreuses recherches. De nombreux paramètres ont été étudiés comme la dilatation du tronc pulmonaire avec discordance entre les branches droite et gauche<sup>120</sup>, le nombre de bifurcations visualisées sur un angiogramme pulmonaire obtenu par Doppler énergie (moins de 3 niveaux)<sup>121</sup>, ou le doppler de l'artère pulmonaire<sup>122-124</sup>, qui ont des valeurs prédictives négatives élevées. Un index prénatal de HTAP a été proposé, comprenant les diamètres des artères pulmonaires droite et gauche, de l'aorte et la longueur du cervelet obtenus par IRM, ainsi que la mesure de l'index modifié de McGoon (somme des diamètres des artères pulmonaires droite et gauche rapportée au diamètre de l'aorte)<sup>125</sup>. Mais aucun critère pronostique d'HTAP n'a été validé.

La HCD droite est associée à une morbidité et une mortalité augmentées<sup>93,99,101,107,112,114,126</sup>. Pour les HCD droites, on retrouve plus souvent la nécessité d'un traitement de l'HTAP (iNO et Sildénafil), d'oxygénothérapie, d'une trachéostomie, d'un matériel prothétique pour la réparation chirurgicale, et une augmentation du risque de récurrence.

La taille du défaut est un facteur pronostique important, difficilement accessible en prénatal. L'importance des viscères herniés en est un reflet indirect. Lally *et al.*<sup>119</sup> ont proposé une classification en 5 stades à partir de la taille du défaut (A à D) (figure 20) et de la présence d'une anomalie cardiaque sévère (tableau 3).



Le terme de la découverte de la HCD apparait comme un facteur prédictif indépendant du devenir néonatal dans la HCD isolée (figure 21)<sup>127</sup>. Plus le diagnostic est tardif, meilleur est le taux de survie. L'identification précoce au cours de la grossesse de viscères dans le thorax est le reflet d'une HCD importante avec compression pulmonaire plus précoce et plus sévère. Un diagnostic tardif de HCD peut s'expliquer par la présence intra-thoracique uniquement d'anses intestinales avec l'estomac en intra-abdominal, ce qui signe une HCD de bon pronostic<sup>106</sup>. Ainsi, un diagnostic post-natal de HCD apparait associé à une meilleure survie, quelque soit le site de la HCD et à un moindre recours à l'ECMO ou à un matériel prothétique pour la réparation chirurgicale du défaut (donc un orifice de plus petite taille)<sup>128</sup>.

En fait, il est fort possible que la recherche d'un facteur pronostique anténatal idéal soit un leurre! Il est facile de concevoir que la biométrie d'un poumon, à fortiori non ventilé, n'est pas le reflet direct de sa future capacité à assurer l'hématose. Cette limite ne disparaîtra pas en dépit des efforts déployés pour apprécier au mieux le volume pulmonaire. De plus, l'atteinte pulmonaire de la HCD se modifie au cours de la gestation avec une tendance à l'aggravation difficilement anticipable<sup>129,130</sup>. Toutefois, même si l'estimation pronostique individuelle doit se satisfaire d'une relative médiocrité, nous disposons de critères capables de définir des niveaux de risque. Ceci permet la sélection des foetus pouvant retirer un bénéfice d'une prise en charge chirurgicale *in utero*. A ce jour, l'évaluation du pronostic d'une HCD est réalisée par échographie, par la mesure du LHR o/a et la position du foie, complétée par la mesure IRM du TFVL o/a et confirmation de la position du foie.

## 5. Principes de la prise en charge anténatale

L'hypoplasie pulmonaire induite par la HCD reste fréquemment au-delà des possibilités thérapeutiques offertes par les progrès de la réanimation néonatale. La chirurgie anténatale a pour objectif de réduire la mortalité en limitant l'hypoplasie pulmonaire et l'HTAP.

L'approche initiale mimait la chirurgie néonatale et consistait à replacer les viscères herniés dans l'abdomen et à suturer le diaphragme au cours d'une laparotomie maternelle avec extériorisation du fœtus par hystérotomie<sup>131</sup>. Les résultats se sont montrés décevants en raison de la survenue quasi systématique d'accouchements très prématurés (rupture des membranes, inefficacité de la tocolyse) dans un délai insuffisant pour permettre une récupération pulmonaire significative<sup>132</sup>. De plus, la réduction intra-abdominale du foie se compliquait fréquemment d'un décès foetal attribué à la plicature de la veine ombilicale dans son trajet intra-hépatique<sup>133</sup>. Inspirées par les observations faites chez les fœtus atteints du syndrome d'obstruction congénitale de l'axe aérien (*congenital high-airway obstruction syndrome-CHAOS*) qui présentent une croissance pulmonaire impressionnante, de nombreuses études ont été menées chez l'animal (mouton, lapin) montrant que l'OT permet de corriger l'hypoplasie pulmonaire<sup>134,135</sup> et de remodeler favorablement la vasculature pulmonaire<sup>136</sup>. L'OT permet une accumulation de liquide intra-pulmonaire contenu dans les bronches, sécrété par l'épithélium respiratoire et normalement évacué en direction du carrefour aérodigestif. Cette accumulation stimule le développement pulmonaire.

Les modèles chirurgicaux de HCD les plus souvent utilisées en expérimentation animale sont les fœtus murins, ovins ou lapins. Le modèle lapin a pour avantage son faible

coût, sa taille (plus petit qu'un mouton, mais de taille suffisante pour réaliser facilement les chirurgies d'OT ou de HCD), des portées nombreuses et une période de gestation courte (32 jours pour la lapine contre 145 jours pour la brebis). Il a été validé sur le plan histologique<sup>136,137</sup> et sur le plan fonctionnel<sup>138,139</sup>. Le développement pulmonaire du lapin présente les mêmes phases que celui de l'homme<sup>140</sup> (figure 22) avec une naissance au stade alvéolaire<sup>136</sup>.

L'expérimentation animale nous a appris que la chirurgie *in utero* de correction de HCD doit être réalisée à la fin de la phase canaliculaire ou au début de la phase sacculaire du développement pulmonaire soit aux alentours de 28-29 SA chez l'homme<sup>137,141</sup>. Un essai actuellement en cours étudie l'intérêt d'une OT plus tardive, entre 30 SA et 32 SA et 6 jours) dans les formes modérées (LHR o/a entre 25 et 35% ou LHR o/a entre 36 et 45% avec hernie du foie)<sup>142</sup>. L'expérimentation animale a permis d'observer que sur les poumons de fœtus porteurs de HCD, immatures à terme avec peu d'alvéoles et des septa épais, l'OT fœtale augmente, de manière significative, le rapport poids pulmonaire/poids corporel (*lung to body weight ratio*-LBWR) et le nombre d'espaces alvéolaires, entraîne une maturation de la vascularisation pulmonaire, mais accentue le déficit en cellules alvéolaires, les PII, ayant pour conséquence une diminution de la production de surfactant<sup>5,143-145</sup>. Cet effet délétère de l'OT peut être partiellement corrigé par une désocclusion trachéale avant la naissance (séquence plug-unplug<sup>4</sup>) et/ou l'administration de stéroïdes peu avant la naissance<sup>5,6</sup>. Ces deux thérapies demandent de pouvoir anticiper la naissance.

Dès lors, plusieurs techniques d'OT ont été tentées. Un abord chirurgical de la trachée a été initialement réalisé avec les problèmes inhérents à la nécessité d'une hystérotomie, puis le geste a été réalisé par endoscopie. La chirurgie foetale s'est d'abord contentée de la simple pose d'un clip, mais cette méthode a été abandonnée car associée à une prématurité importante et à des lésions importantes de la trachée et des nerfs laryngés<sup>90,148</sup>.

En 2004, le groupe « FETO task group » a étudié et validé une technique d'OT par la mise en place d'un ballonnet intra-trachéal gonflable au cours d'une procédure foetoscopique percutanée (un seul trocard de 3.3 mm)<sup>146</sup> (figure 23). Idéalement le ballonnet est mis en place aux alentours de 28 SA, soit à la fin de la période canaliculaire du développement pulmonaire, et est retiré à 34 SA de manière à réduire les effets délétères sur la maturation pulmonaire.

La désocclusion trachéale *in utero* peut être effectuée préférentiellement par voie foetoscopique (50-67%) ou par une ponction écho-guidée (19-21% des cas) en fonction de l'accessibilité. En cas de mise en travail, le retrait du ballon doit être effectué en urgence dans 28% des cas, soit par une procédure EXIT (11-21% des cas), soit par une désocclusion par laryngo-trachéoscopie périnatale (1-7%) en urgence peuvent s'avérer nécessaires<sup>146,149</sup> (figure 24). Cette dernière procédure peut s'avérer très périlleuse avec un risque important d'hypoxie et de décès en dépit du recours à des intervenants expérimentés. L'accouchement est possible par voie vaginale puisqu'il n'y a pas d'hystérotomie et l'accueil pédiatrique se fait dans les conditions habituelles.

Une étude réalisée sur 7 ans avec 210 procédures de FETO sur des fœtus présentant une HCD sévère (foie hernié et LHR o/a < 27-28%)<sup>139</sup> montrait que le traitement anténatal permettait une amélioration du taux de survie de 24% à 49% en cas de HCD gauche et de 0% à 35% en cas de HCD droite (tableau 4). La complication principale était la rupture prématurée des membranes. Elle survenait dans les 3 semaines suivant le geste pour 17% des fœtus opérés et dépendait de la durée opératoire. Le terme moyen à l'accouchement après FETO était de 34 à 35 SA<sup>106,151,152</sup>, il s'élevait avec l'expérience de l'opérateur<sup>106</sup>. Les facteurs prédictifs de morbi-mortalité post-natale étaient la prématurité<sup>102,151</sup>, la durée de l'OT<sup>151</sup> et le délai entre le retrait du ballon d'occlusion et la naissance (>24h)<sup>102</sup>. Les effets secondaires rapportés étaient essentiellement liés à une augmentation du diamètre trachéal pouvant être assimilée à une trachéomégalie<sup>153</sup> sans manifestation clinique, en dehors d'une toux à l'effort<sup>154</sup>.

Une étude récente<sup>155</sup> portait sur l'OT précoce (22-24 SA) dans les formes sévères (LHR o/a<0,17 et foie en intra-thoracique) en comparant l'évolution de 8 fœtus ayant eu une OT précoce à 9 fœtus avec OT plus tardive et 10 témoins. Elle permettrait une amélioration de la survie de 0% à 62% avec une diminution de l'HTAP. Ces résultats sont à confirmer par une étude randomisée.

De nombreuses recherches ont porté sur une approche pharmacologique de la prise en charge anténatale de la HCD pour traiter l'hypoplasie, l'immaturité et l'hypertension artérielle pulmonaires. L'administration était soit maternelle avec un passage transplacentaire soit directement au fœtus, en intra-trachéal, dans un même temps opératoire que l'OT.

La corticothérapie anténatale dans le modèle de HCD induite par l'administration de nitrofène chez la rate gestante entraînait une augmentation de la production de surfactant, améliorait la compliance et le développement pulmonaires et agissait sur les paramètres histologiques de

l'HTAP<sup>156</sup>. Un essai randomisé chez l'humain n'a pas pu démontrer d'intérêt à la réalisation systématique d'une corticothérapie en cas de HCD en dehors du contexte particulier de la prématurité<sup>157</sup>.

L'administration maternelle de Sildenafil, étudiée sur le modèle nitrofène<sup>158</sup> et sur un modèle chirurgical lapin<sup>159</sup>, semblait agir sur la vascularisation pulmonaire en améliorant les paramètres liés à l'HTAP.

L'administration maternelle de simvastatine dans le modèle nitrofène pourrait améliorer la vascularisation pulmonaire et agir sur l'HTAP<sup>160</sup>.

L'utilisation de la vitamine A dans le modèle nitrofène a largement démontré son efficacité sur le développement du diaphragme et du poumon. Mais la limitation importante de ce modèle pour l'étude de cette thérapeutique est l'action directe du nitrofène sur la voie des rétinoïdes qui entraîne une inhibition de la synthèse de l'AR. Les effets de l'administration maternelle de vitamine A ont été étudiés sur deux modèles chirurgicaux de HCD, le lapin et le mouton. Dans le modèle ovin, il était retrouvé une amélioration de la morphologie pulmonaire évaluée par l'épaisseur des parois septales et la taille des alvéoles, ainsi qu'une amélioration de la fonction pulmonaire<sup>161</sup>. L'étude menée par Gallot *et al.* sur le modèle lapin montrait une normalisation de la production de surfactant et de la distribution des pneumocytes<sup>162</sup>. Aucune étude n'a été menée chez l'homme.

Des thérapeutiques ont été étudiées en complément de la réalisation d'une OT : les corticostéroïdes en injection maternelle<sup>6</sup> et les cellules souches en intra-trachéal<sup>163</sup>. L'administration de corticoïdes en anténatal améliorait la fonction respiratoire chez le fœtus ovin<sup>164</sup>. L'injection intra-tracheale de cellules souches chez le fœtus HCD de lapin semblait avoir un effet bénéfique sur la paroi des bronchioles terminales, sans effet sur la vascularisation pulmonaire<sup>163</sup>.

## 6. Principes de la prise en charge périnatale de la HCD

Les objectifs de la prise en charge médicale sont d'assurer une oxygénation tissulaire et la décarboxylation tout en minimisant le baro-volotraumatisme du poumon, d'assurer une fonction circulatoire adéquate en limitant les conséquences de l'HTAP et de prévenir la morbidité respiratoire et digestive<sup>165</sup>.

Les principes de cette prise en charge sont l'utilisation d'une ventilation douce avec hypercapnie permissive et une réparation chirurgicale différée après stabilisation. Le recours à l'utilisation d'oxyde nitrique inhalé (iNO), à la ventilation à oscillations haute fréquence (OHF) et à l'ECMO est parfois nécessaire.

Le premier geste à assurer en salle de naissance est l'intubation endotrachéale du nouveau-né. La ventilation au masque est proscrite du fait du risque de distension des structures digestives herniées (estomac, intestin) pouvant compromettre la fonction respiratoire. La mise en place d'une sonde nasogastrique est également recommandée afin d'affaïsser l'estomac. L'administration systématique de surfactant n'améliore pas le devenir de ces enfants et n'est pas recommandée. L'utilisation de prostaglandines afin d'éviter la fermeture du canal artériel peut être utile pour limiter le risque de défaillance du ventricule droit<sup>165</sup>.

Comme le risque de barotraumatisme au cours de la ventilation mécanique de poumons hypoplasiques est élevé, l'évolution des pratiques s'est progressivement faite vers des stratégies réduisant ce risque en favorisant la ventilation spontanée ou avec une pression positive maximale de 24 cmH<sub>2</sub>O avec hypercapnie permissive permettant une réduction de la mortalité et de la morbidité respiratoire<sup>166-168</sup>.

Le recours à l'OHF, afin d'obtenir une alcalose respiratoire, a parfois été proposé, mais des travaux ont montré que l'OHF était responsable de lésions de baro-volotraumatisme telles que le pneumothorax et la DBP<sup>165</sup>.

Actuellement, le recours au iNO est recommandée chez les enfants porteurs d'une HTAP persistante<sup>169</sup>, mais son intérêt en cas de HCD n'est pas démontré<sup>168</sup>. Il ne diminue pas le risque de décès ou le recours à l'ECMO<sup>165</sup>.

L'ECMO est une technique de circulation extra-corporelle permettant de pallier la défaillance respiratoire (équivalent de poumon artificiel) en assurant une oxygénation et une décarboxylation adéquates tout en limitant le baro-volotraumatisme du poumon. Elle est indiquée lorsque l'hypoxémie persiste malgré une prise en charge médicale optimale. Pour être utilisée, les enfants doivent avoir un âge gestationnel supérieur à 34 SA et un poids de naissance supérieur à 2 kg. Les chances de survie après l'usage de l'ECMO en situation de HDC sont de 20-50% c'est-à-dire les plus faibles de toutes les situations où l'ECMO est utilisée (inhalation méconiale, sepsis, défaillance respiratoire d'autre origine)<sup>165</sup>. La réalisation d'une EXIT-ECMO n'a d'influence ni sur la survie ni sur la morbidité<sup>170</sup>.

La réparation chirurgicale est envisagée après obtention de la stabilité clinique. Jusqu'aux années 1980, la chirurgie réparatrice de la HCD était pratiquée en urgence. La revue de la Cochrane Database comparant la chirurgie immédiate (< 24 heures) versus retardée (> 24 heures) ne retrouvait pas de différence significative<sup>171</sup>. La chirurgie différée a l'avantage de permettre la recherche de malformations associées, d'obtenir une stabilité hémodynamique et respiratoire et ainsi de réaliser la chirurgie dans un environnement optimal. Elle est habituellement réalisée à 24h post-natal par laparotomie avec une incision sous-costale. Après réintégration abdominale des viscères herniés, les berges de l'orifice diaphragmatique sont suturées. Une autre alternative est la laparoscopie si la stabilité hémodynamique et pulmonaire de l'enfant le permet. Un risque accru de récurrence de HCD est



associé à cette technique<sup>172</sup>. En cas d'orifice de grande taille, un patch de matériel synthétique ou un lambeau musculaire aide à combler la perte de substance. Le résultat chirurgical est contrôlé par une radiographie thoracique<sup>66</sup>.

Le « CDH EURO Consortium » a repris l'ensemble de ces principes et a proposé en 2015 une standardisation de la prise en charge postnatale<sup>173</sup>. Il rappelait que la sévérité de la HCD doit être évaluée par une équipe multidisciplinaire expérimentée après considération des facteurs pronostiques anténatals (LHR o/a, position du foie, association à d'autres malformations congénitales ou syndrome, étude chromosomique et génétique). Il préconisait de réaliser une corticothérapie anténatale seulement en cas de risque d'accouchement prématuré avant 34 SA, de programmer l'accouchement à 39 SA dans un centre hospitalier de type III disposant d'une équipe de chirurgie pédiatrique. Il recommandait une intubation en salle de naissance, sans administration de surfactant systématique. En cas de facteurs anténatals de bon pronostic (LHR o/a > 50% et foie intra-abdominal), il rappelait que la ventilation spontanée est possible. La ventilation mécanique conventionnelle est la stratégie initiale optimale. Il préconisait de réaliser une échocardiographie dans les 24 premières heures. Des mensurations diminuées de l'artère pulmonaire droite et du ventricule gauche en cours de diastole pourraient être évocateurs d'un pronostic plus sombre<sup>174</sup>.

## Partie III : La vitamine A et les rétinoïdes

### 1. Généralités

Les rétinoïdes sont une famille d'isoprénoïdes comprenant le rétinol (vitamine A) et tous les dérivés biologiques et synthétiques apparentés. Ils possèdent un spectre d'action très large au sein de processus aussi divers que le développement et la croissance embryonnaire, la vision ou la reproduction<sup>8</sup>, en agissant sur l'organogénèse, l'homéostasie des tissus, la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi que sur l'apoptose (figure 25). L'apport indispensable de la vitamine A pour la vie de l'individu adulte et pour le développement embryonnaire a été mis en évidence dès les années 1930, par Hale<sup>177</sup>. Durant l'embryogénèse, l'apport de vitamine A nécessite une fine régulation. Un déficit entraînerait des malformations sévères dans quasiment tous les organes<sup>22,178</sup> et une hypervitaminose aurait des effets tératogènes<sup>179,180</sup>.

#### 1.1. Définition et propriétés chimiques des rétinoïdes

Le terme vitamine A désigne tous les composés possédant l'activité biologique du rétinol (figure 26). L'AR est la principale forme biologiquement active des rétinoïdes. Il existe deux stéréoisomères, le *9-cis*-AR et le *tout-trans*-AR.

La structure générale de base du rétinol est composée d'un cycle  $\beta$ -ionone hydrophobique contenant un groupe polaire à son extrémité. Le transport de la vitamine A, liposoluble, nécessite l'intervention de nombreuses protéines porteuses pour assurer son passage à travers les phases hydrophiles telles que le plasma ou les liquides intra- et extracellulaires.

L'AR se lie à des récepteurs intranucléaires, les Retinoic Acid Receptors (RAR) et les Retinoid X Receptors (RXR), capables de s'hétérodimériser et d'interagir avec l'acide désoxyribonucléique (ADN) au niveau d'éléments de réponse spécifiques, les Retinoic Acid Responsive Elements (RARE). Ce complexe ligand-récepteurs agit comme activateur des facteurs de transcription pour plus de 500 gènes cibles<sup>181</sup>.

## 1.2. Métabolisme de la vitamine A

Aucune espèce animale ne possède la capacité de synthétiser la vitamine A *de novo*. Les plantes et certains micro-organismes tels que les bactéries, les algues et les champignons sont capables de synthétiser des caroténoïdes, pigments responsables des couleurs (jaune, orange, rouge) de nombreux fruits et légumes. La plupart de ceux-ci peuvent être absorbés et stockés par les animaux, comme la lutéine et la zéaxanthine dans l'œil humain, le  $\beta$ -carotène dans le corps jaune bovin et l'œuf de poulet. Les animaux peuvent les métaboliser en forme biologiquement active telle que les rétinoïdes. Ainsi, les végétaux contiennent essentiellement des carotènes précurseurs du rétinol et les aliments d'origine animale, notamment le foie, contiennent du rétinol et des rétinyl esters (RE).

Les caroténoïdes prorétinoïdes, comme le  $\beta$ -carotène, sont transportés dans les entérocytes. Puis le  $\beta$ -carotène est soit transformé en rétinol (ou rétinaldéhyde) et se lie à sa protéine de transport intracellulaire, soit incorporé sans modification dans les chylomicrons. Le rétinol produit à partir de  $\beta$ -carotène est réduit en rétinol par une rétinol réductase.

Le clivage symétrique du  $\beta$ -carotène donne deux molécules de rétinaldéhyde. Le rétinaldéhyde peut soit être oxydé en AR, soit être réduit en rétinol qui sera converti en RE, forme de stockage de la vitamine A dans les tissus. *In vivo*, 95% des rétinoïdes provient du  $\beta$ -carotène.

Les RE d'origine alimentaire sont hydrolysés en rétinol soit dans la lumière de l'intestin, soit au niveau du pôle apicale des entérocytes. Le rétinol, à l'intérieur des entérocytes, quel que soit son origine, se lie à CRBP (Cellular Retinol Binding Protein) et est estérifié en RE. Les RE ainsi obtenus sont transportés avec la graisse alimentaire et le cholestérol dans les chylomicrons, qui sont sécrétés dans le système lymphatique. Les RE sont stockées principalement dans le foie, mais aussi, en période fœtale, dans d'autres organes tels que le rein, le poumon ou le placenta<sup>182</sup>. Une fois transférés dans les hépatocytes, les RE sont hydrolysés à nouveau en rétinol. Ce dernier est soit transféré vers les cellules stellaires hépatiques pour être ré-estérifié et stocké, soit sécrété dans le sang, lié à sa protéine de transport, la Retinol Binding Protein (RBP)<sup>183</sup> pour plus de 90% du rétinol plasmatique total. La principale fonction de la RBP est de mobiliser les réserves de rétinoïdes hépatiques et de transporter le rétinol dans les tissus périphériques<sup>183,184</sup> ou à l'embryon en cours de grossesse<sup>185,186</sup>. Les taux sanguins du complexe RBP-rétinol chez les humains et les animaux sont finement régulés et maintenus stables, mais la biodisponibilité et la bioconversion du rétinol et des caroténoïdes sont très influencées par de nombreux facteurs tels que la dénutrition protéino-énergétique, la carence en zinc, la consommation de graisses, l'alcool, les infections et le degré de transformation des produits alimentaires.

Le complexe RBP-rétinol ainsi transporté dans le sang peut alors se fixer sur des cellules cibles porteuses d'un récepteur membranaire à la RBP, le STRA6 (Stimulated by Retinoic Acid 6). Cette grande protéine de membrane localisée à la surface des cellules a, entre autres, pour fonctions la reconnaissance du complexe RBP-rétinol et son transport à l'intérieur de la cellule<sup>187</sup>. Elle agit ainsi sur la régulation du flux de rétinol dans la cellule. Son expression est diminuée dans les tissus dont le contenu en rétinoïdes est élevé, comme la peau ou le foie<sup>187</sup>.

Dans les cellules, le rétinol est ensuite soit oxydé en rétinal puis en sa forme active, l'AR, soit stocké sous forme de RE. Un tel stockage extra-hépatique de RE peut s'avérer crucial pour les organes ayant besoin de quantités importantes de rétinoïdes pour leur développement.

## 2. Le métabolisme cellulaire de la vitamine A

La vitamine A exerce son activité intracellulaire par le biais de métabolites oxydés du rétinol, le rétinal et l'AR (figure 27)<sup>188</sup>.

Du fait de leur propriété hydrophobe, le rétinol, le rétinal et l'AR ne peuvent pas circuler librement dans le cytoplasme. Le rétinol et le rétinal sont pris en charge par des protéines de transport, les Cellular Retinol Binding Proteins (CRBP)<sup>176</sup>. Après liaison aux CRBP, le rétinol est soit estérifié et stocké sous forme de RE dans des gouttelettes lipidiques, soit transformé en rétinal par une première réaction d'oxydation réversible. Une deuxième réaction d'oxydation irréversible transforme le rétinal en AR, forme biologiquement active de la vitamine A.

Les deux stéréoisomères de l'AR (tout-*trans* et 9-*cis*) s'associent à d'autres protéines de transport intracellulaires, les Cellular Retinoic Acid Binding Proteins (CRABP 1 et 2), qui vont les conduire jusqu'au noyau de la cellule. L'AR se lie à ses récepteurs nucléaires spécifiques (RAR ou RXR). La dégradation de l'AR est ensuite assurée par des hydroxylases appartenant au cytochrome P450 sous famille 26 (CYP26).

## 2.1. La synthèse de l'acide rétinoïque

La source principale de la synthèse des métabolites actifs des rétinoïdes dans les cellules cibles est le rétinol tout-*trans* capté dans le plasma. Cependant, les lipoprotéines cellulaires contenant des RE, du rétinol et des caroténoïdes, ainsi que les RE stockés dans les gouttelettes lipidiques des cellules cibles ou des cellules voisines peuvent contribuer à cette synthèse<sup>189</sup>.

### 2.1.1. Conversion du rétinol en rétinol

L'oxydation du rétinol en rétinol est réalisée par des oxydoréductases. Cette super-famille d'enzymes comprend les déshydrogénases/réductases à chaîne moyenne (MDRs) dont les alcool déshydrogénases (ADHs)<sup>190-192</sup>, les déshydrogénases/réductases à chaîne courte (SDRs) dont les rétinol déshydrogénases (RoDHs) et les aldo-keto réductases (AKRs).

#### 2.1.1.1. Les alcools déshydrogénases (ADHs)

Les ADHs appartiennent à la famille des MDRs. Chez la souris et chez l'homme, tous les gènes sont localisés dans un même cluster, dans le même ordre et avec la même orientation transcriptionnelle<sup>193</sup>. Cette extrême conservation de structure des gènes suggère que ces ADHs ont des fonctions très conservées chez les mammifères. Les ADHs sont présentes au niveau du cytosol.

#### 2.1.1.2. Les déshydrogénases/réductases à chaîne courte (SDRs)

Les déshydrogénases/réductases à chaîne courte (SDRs) peuvent oxyder le rétinol libre comme le rétinol lié à CRBP1<sup>176</sup>. Alors que les ADHs sont cytosoliques, les SDRs sont microsomales. Il existe de nombreux gènes des SDRs murins identifiés dans l'espèce humaine.

#### 2.1.1.3. Les aldo-keto réductases (AKRs)

Plus récemment, les aldo-keto réductases (AKRs) ont été définies comme un groupe d'enzymes cytosoliques qui pourraient contribuer aux conversions oxydoréductives des rétinoïdes. Plusieurs membres des AKRs ont une activité rétinaldéhyde réductase<sup>194</sup>.

#### 2.1.2. Conversion du rétinol en acide rétinoïque

Le rétinol est oxydé de manière irréversible en AR par les Rétinol Aldéhydes Déshydrogénases (RALDHs). Elles agissent sur le rétinol libre, non lié à CRBP1. Elles sont au nombre de quatre, RALDH1, -2, -3 et -4<sup>189</sup>. RALDH2 est la première enzyme exprimée au cours du développement embryonnaire, sa fonction est de fournir l'AR nécessaire au développement embryonnaire<sup>195</sup>. Les souris KO pour ce gène présentent de graves anomalies développementales, similaires à celles décrites chez les animaux carencés en vitamine A<sup>196</sup>.

### 2.1.3. Les cytochromes

Le catabolisme de l'AR *tout-trans* est un mécanisme important pour réguler les concentrations d'AR dans les cellules et tissus ce qui participe à la régulation des signaux induits par les rétinoïdes. Les cytochromes spécifiquement impliqués dans le catabolisme de l'AR sont des hydroxylases appartenant au cytochrome P450 sous-famille 26 (CYP26). CYP26 comporte en fait trois gènes (CYP26A1, B1 et C1). Leur activité catalytique est semblable mais leurs profils d'expression diffèrent en fonction des organes<sup>197</sup>, ce qui suggère des rôles différents pour chacune de ces enzymes<sup>198</sup>. La région proximale en amont du promoteur du gène de CYP26A1 contient un RARE fonctionnel ; sa transcription est donc inductible par l'AR<sup>199</sup>. Seule CYP26B1 est exprimée dans le poumon fœtal<sup>27</sup>, son expression est induite par l'AR<sup>200</sup>.

## 2.2. Les récepteurs nucléaires aux rétinoïdes

L'AR (*9-cis* ou *tout-trans*) s'associe aux protéines de liaison CRABP1 et 2 (Cellular Retinoic Acid Binding Proteins) pour permettre son transport jusqu'aux récepteurs nucléaires spécifiques régulant ainsi sa distribution dans la cellule.

### 2.2.1. Place au sein de la superfamille des récepteurs nucléaires

Les récepteurs des rétinoïdes appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires d'hormones comme les récepteurs des hormones stéroïdiennes. On distingue deux familles de récepteurs des rétinoïdes : les Retinoic Acid Receptors (RARs) et les Retinoid X Receptors (RXRs)<sup>201,202</sup>. Les RARs peuvent être activés par l'AR *tout-trans* et l'AR *9 cis*, alors que les



RXRs ne peuvent être activés que par l'AR 9 *cis*. Les RARs doivent s'hétérodimériser avec les RXRs pour interagir avec l'ADN. Les RXRs ont la particularité de pouvoir s'hétérodimériser avec beaucoup d'autres récepteurs nucléaires. Les deux familles de récepteurs des rétinoïdes se composent de trois isotypes,  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  codés par des gènes séparés et donnant de nombreux variants par épissage alternatif.

### 2.2.2. Structure des récepteurs nucléaires

Ces récepteurs nucléaires possèdent 5 domaines ayant chacun une fonction spécifique (figure 28).

Le domaine amino-terminal contient une région A/B très variable en taille et en séquence. Elle possède une fonction d'activation de la transcription indépendante de la fixation du ligand (AF1).

Le domaine central de liaison à l'ADN (DBD : DNA Binding Domain, région C) est fortement conservé entre les membres de cette superfamille. Il contient deux doigts de zinc établissant des contacts avec des séquences nucléotidiques spécifiques appelées éléments de réponse spécifiques de l'AR (RARE).

Le domaine D est une région charnière entre le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de liaison du ligand. Il a un rôle conformationnel.

La région carboxy-terminale (LBD : Ligand Binding Domain, région E et parfois F) est nécessaire à la liaison du ligand, à l'éventuelle dimérisation du récepteur, à l'interaction avec les protéines du choc thermique et à l'attache des coactivateurs nucléaires (NCoAs) et des corépresseurs (NCoRs). Le centre du LBD contient la fonction d'activation 2 (AF2) dont l'activité transcriptionnelle est ligand-dépendante et qui est directement impliquée dans la liaison des NCoAs et NCoRs au récepteur<sup>204</sup>.

Le domaine F est une petite région C-terminale contiguë au domaine E qui n'est pas présente dans tous les récepteurs nucléaires (cas des RXRs). Sa fonction est encore mal caractérisée mais il semble moduler l'activité AF1 et AF2 des RAR (démonstré pour RAR $\alpha$ )<sup>205</sup>.

### 2.2.3. Mécanismes d'action des récepteurs aux rétinoïdes

Les récepteurs nucléaires régulent la transcription des gènes cibles en liant des séquences d'ADN spécifiques nommées éléments de réponse aux hormones ou Hormone Response Element (HREs). Ces éléments sont situés dans les régions régulatrices des gènes cibles situées en amont du promoteur. Dans certains cas, ils se trouvent dans des séquences enhancers situées plusieurs kilobases en amont du site d'initiation transcriptionnelle. Les récepteurs nucléaires sont liés aux HREs même en l'absence de leur ligand. Cette liaison se fait essentiellement sous la forme d'hétérodimères avec RXR comme partenaire préférentiel. L'hétérodimérisation avec RXR augmente fortement l'efficacité de liaison à l'ADN et l'activité transcriptionnelle. Les HREs correspondant aux éléments de réponse à l'AR sont dénommés Retinoic Acid Response Element (RAREs).

La régulation de la transcription dépend de l'interaction des membres de la famille des récepteurs nucléaires avec des classes générales de molécules qui remplissent les fonctions de coactivateurs (NCoAs) ou de corepresseurs (NCoRs)<sup>206</sup>. La transition d'une forme transcriptionnellement inactive à une forme active se manifeste par une structure globale plus compacte pour le récepteur.

Les récepteurs nucléaires peuvent aussi exercer des effets répressifs sur la transcription. Ces effets peuvent être dus à une concurrence pour la liaison sur l'ADN avec d'autres transactivateurs d'activité plus intense (inhibition passive) ou à la formation d'hétérodimères transcriptionnellement inactifs. De plus, certains récepteurs sont capables d'empêcher la

transcription de façon ligand-dépendante par transrépression, qui implique une compétition limitant la fixation des complexes coactivateurs.

### 3. Rétinoïdes et développement embryono-fœtal

Les rétinoïdes sont essentiels au développement embryonnaire et à celui du placenta. Synthétisé dans tous les tissus embryonnaires, l'AR est impliqué dans le contrôle de l'expression de nombreux gènes clés du développement et dans la formation de nombreux organes (cerveau postérieur<sup>207-209</sup>, yeux<sup>210</sup>, cœur<sup>211,212</sup>, poumon<sup>24</sup>). L'embryon puis le fœtus sont totalement dépendants de l'organisme maternel et du passage transplacentaire pour l'apport en rétinol. Le passage transplacentaire est optimisé pour permettre un flux maximum de rétinol de la mère vers le fœtus. Le rétinol transporté dans le sang maternel par la RBP est capté par les cellules trophoblastiques qui sont porteuses d'un récepteur membranaire à la RBP. Le mécanisme principal de transfert implique la RBP. Si le placenta a la capacité de transférer le rétinol du pool maternel vers le pool fœtal, il est également démontré que le rétinol peut être stocké dans le placenta sous forme de RE par l'intermédiaire des fibroblastes de l'axe mésenchymateux des villosités<sup>182</sup>. Ainsi, au cours du développement embryonnaire, l'homéostasie des rétinoïdes peut être conservée dans les tissus malgré les variations des concentrations maternelles. Dans des conditions d'excès de vitamine A, LRAT (Lecithin-retinol acyltransferase), enzyme clé du stockage de la vitamine A, et le cytochrome CYP26A1 ont un rôle de régulation en agissant sur le catabolisme de l'AR<sup>213,214</sup>. De même STRA6, récepteur spécifique du complexe RBP-rétinol, a un rôle de régulation des concentrations de rétinoïdes du fait de sa capacité de transport bidirectionnel<sup>215</sup>.

L'effet tératogène d'un excès de vitamine A a été établi au cours des années 1950 et a été décrit dans de nombreuses espèces animales : rat, souris, cobaye, hamster, lapin, primate.

Chez la rate gestante, les malformations induites peuvent correspondre à des anomalies de fermeture du tube neural (anencéphalie, exencéphalie), des fentes palatines, des anomalies oculaires (anophtalmie, microophtalmie, aplasie des paupières), des anomalies auriculaires (anotie, hypoplasie de l'oreille moyenne), des anomalies urinaires voire des anomalies du comportement. Chez l'homme, l'excès de vitamine A a été tenu pour responsable de quelques dizaines de cas de malformations congénitales<sup>216</sup>. Il s'agissait de malformations cérébrales, cardiaques, auriculaires, urétrales, squelettiques ou de fentes faciales. Aucune dose-seuil n'a été mise en évidence. La période à risque malformatif se limite au premier trimestre. L'exposition aux dérivés de synthèse de la vitamine A (isotrétinoïne et acitrétine) expose à un risque de malformation dans plus de 20% des cas et justifie la prescription concomitante et systématique d'une contraception efficace chez les femmes en âge de procréer<sup>217</sup>.

La carence maternelle en rétinol est responsable dans de nombreux modèles animaux (cochon, poulet, rat, souris, lapin) de malformations fœtales (syndrome de carence en vitamine A) dont la fréquence peut atteindre 30%<sup>43</sup>. Ce syndrome peut associer une microophtalmie voire une anophtalmie à des atteintes de l'appareil cardiocirculatoire, respiratoire (notamment HCD) et génito-urinaire<sup>21</sup>.

#### Partie IV : Rétinoïdes et HCD

La première preuve publiée d'un lien entre rétinoïdes et HCD est venu de l'examen des nouveaux-nés de rates gestantes carencées en vitamine A<sup>21,218,219</sup>. 25 à 45% des nouveau-nés présentaient une HCD. Ce taux était diminué lorsque la vitamine A était introduite dans le régime alimentaire après la première moitié de la grossesse. Plus récemment, les concentrations plasmatiques au cordon en rétinol et RBP ont été retrouvées diminuées chez les enfants avec HCD<sup>9,220</sup>. Une association significative entre la carence alimentaire en vitamine A pendant la grossesse et le risque de HCD chez le fœtus humain a été retrouvée (OR=7.2 pour des apports en vitamine A inférieurs à 800 µg d'équivalent d'activité rétinol (apports journaliers recommandés))<sup>221</sup>. L'étude de l'ensemble de la voie de signalisation des rétinoïdes par Coste *et al.*<sup>10</sup>, au sein de notre équipe, a permis de retrouver une diminution de l'expression des ARNm de CRBP2 et CYP26B1 chez des fœtus présentant une HCD.

Les fœtus de souris knock-out RARα/β et de rates gestantes exposées à du nitrofène présentaient des anomalies comparables avec 15-25% de HCD<sup>22,222</sup>. Le nitrofène est responsable d'une interruption de la voie des rétinoïdes par inhibition dose-dépendante de l'activité de RALDH2<sup>223</sup>.

Sur un modèle chirurgical animal de HCD, donc sans interruption de la voie de signalisation des rétinoïdes, l'administration d'AR aux lapines gestantes permettait de normaliser l'expression des protéines du surfactant et la différenciation des cellules alvéolaires, soit les taux de pneumocytes I et II mais ne corrigeait pas l'hypoplasie pulmonaire<sup>7</sup>. Cette constatation a permis d'évoquer l'intérêt d'un traitement par AR au cours de la prise en charge anténatale de la HCD afin d'améliorer les anomalies de différenciation

des pneumocytes. L'administration pourrait être réalisée par voie intra-trachéale au moment de la mise en place du ballon d'occlusion trachéale afin de potentialiser les effets de l'AR *in situ*.

## ETUDES

L'acide rétinoïque (AR) pourrait être un traitement anténatal adjuvant de l'OT dans la HCD. Les travaux de Karen COSTE ont démontré l'implication de perturbations de la voie de signalisation des rétinoïdes dans la HCD<sup>10</sup> (Publication N°2). Un travail princeps de notre équipe avait étudié les effets d'une administration maternelle de rétinoïdes sur le poumon HCD et avait mis en évidence une amélioration de la différenciation des pneumocytes sans effet sur la croissance pulmonaire<sup>162</sup>. Il soulignait ainsi l'importance de l'OT anténatale dans le traitement de l'hypoplasie pulmonaire secondaire à la HCD. L'un des effets secondaires de l'OT sur le développement pulmonaire est le déficit en cellules alvéolaires, les PII, ayant pour conséquence une diminution de la production de surfactant<sup>5,143-145</sup>. Cet effet délétère de l'OT peut être partiellement corrigé par une désocclusion trachéale avant la naissance (séquence plug-unplug<sup>4</sup>) et/ou l'administration de stéroïdes peu avant la naissance<sup>5,164</sup>. Mais ces deux thérapies demandent de pouvoir anticiper la naissance.

Devant les données de la littérature et les résultats des recherches menées par notre équipe, nous avons voulu évaluer l'intérêt de l'administration intratrachéale d'AR en situation de HCD avec OT. Une première phase menée sur poumons sains a consisté à identifier le véhicule le plus adapté à l'administration intratrachéale en raison du caractère lipophile de l'AR (Publication N°4)<sup>224</sup>. Notre étude s'est concentrée sur deux véhicules potentiels, les liposomes et le Miglyol® (capric triclyceride), utilisé en ophtalmologie. Les expérimentations ont été menées sur fœtus de lapins à poumons sains, sans HCD. Les résultats montraient que ces deux véhicules pouvaient être utilisés pour délivrer l'AR en intra-trachéal et que l'apport d'AR sur poumon sain semblait améliorer la production de surfactant. Cet effet était significatif avec l'utilisation des liposomes.

A la suite de ce travail, nous avons étudié les effets de l'adjonction d'AR à l'OT sur le poumon dans un contexte de HCD. Au vu des résultats précédents, nous avons utilisé les liposomes comme véhicule de l'AR. Ce travail est soumis auprès de « Prenatal Diagnosis ».



## **PUBLICATIONS**

PUBLICATION N°1

**The challenge of prenatal identification of congenital diaphragmatic hernia in the context  
of hydrops**

Rossi Amélie, Delabaere Amélie, Delmas-Laurichesse Hélène, Gallot Denis

**Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2014 Nov;182:238-9.**

La constatation d'une anasarque fœtale peut être la porte d'entrée au diagnostic de HDC. Différentes étiologies peuvent être évoquées dans ce contexte. La compression médiastinale par les viscères herniés peut gêner le retour veineux et entraîner une insuffisance cardiaque. Une angulation anormale du foie et la constriction hépatique par l'anneau herniaire du diaphragme peuvent entraîner une congestion hépatique par compression des veines hépatiques. Ces mécanismes pourraient expliquer que l'anasarque est plus souvent observée dans les HDC droites. D'autres pathologies associées peuvent être impliquées dans la physiopathologie de l'anasarque, comme un canal thoracique anormal, une ischémie intestinale et/ou une séquestration pulmonaire associée. En théorie, l'hydrothorax peut participer à l'hypoplasie pulmonaire, mais il n'est pas classiquement décrit comme facteur pronostique péjoratif.

La présence de la communication entre les cavités thoracique et abdominale dans la HDC explique qu'un hydrothorax soit très souvent associé à une ascite. Toutefois, la visualisation du défaut diaphragmatique n'est pas toujours aisée.

*In utero*, il peut être proposé un drainage de l'hydrothorax associé ou non à la réalisation d'une OT.

En conclusion, la présence d'une anasarque ne facilite pas toujours le diagnostic de HDC. En présence de l'association d'un hydrothorax et d'une ascite, les coupes diaphragmatiques doivent être suivies consciencieusement.



Contents lists available at ScienceDirect

# European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ejogrb](http://www.elsevier.com/locate/ejogrb)

## LETTER TO THE EDITOR—BRIEF COMMUNICATION

## The challenge of prenatal identification of congenital diaphragmatic hernia in the context of hydrops

**Keywords:**

Congenital diaphragmatic hernia  
Hydrops  
Ascites  
Prenatal diagnosis  
Ultrasound

Dear Editors,

Although congenital diaphragmatic hernia (CDH) is relatively common, its combination with hydrops fetalis is rare and its prognosis is controversial. We report two cases illustrating that prenatal detection of the diaphragmatic defect remains a challenge in this context. Firstly, a 30 year old patient, gravida 2 para 1, obese (BMI = 33), was referred to our center at 29 weeks of gestation (WG) for polyhydramnios and hydrops fetalis associated with threatened preterm labor. Ultrasound examination revealed a deepest pocket of amniotic fluid at 15 cm, ascites and hydrothorax, and revealed no structural anomaly and normal peak systolic blood flow in the middle cerebral artery. Amniodrainage (3120 ml) and ascites puncture (182 ml) were performed. Hydrothorax puncture failed. One day later, patient delivered and the neonate died a few

minutes after birth. Karyotype and screening for infection were normal (46 XX). Ascites puncture demonstrated no lymphocytes. Necropsy revealed a large right-sided CDH with liver herniation and major pulmonary hypoplasia. Secondly a 33 year old patient, gravida 2 para 1, was referred at 18 WG for hydrops fetalis. Ultrasound examination confirmed ascites and left pleural effusion leading to a major right mediastinal deviation and revealed no structural anomaly and normal peak systolic blood flow in the middle cerebral artery. Amniocentesis was performed (metabolic diseases screening and karyotype) and ascites puncture (20 ml) demonstrated a lymphocytic cytology. The next day US examination confirmed disappearance of fetal effusions and demonstrated a left-sided CDH with herniated liver and stomach, major mediastinal shift and observed/expected lung to head ratio at 0.23 (Fig. 1). One week later, ascites and left pleural effusion recurred and parents opted for termination of pregnancy. Necropsy revealed a large left-sided CDH with herniation of liver and stomach and major pulmonary hypoplasia (lung to body weight ratio was 0.005). Cytogenetic investigations demonstrated a 8p23.1 deletion involving GATA 4 gene which has already been described in the context of CDH.

Literature reported only a few cases with association of CDH and hydrops (Table 1). Different etiologies of fluid effusion can be evoked in this context. Mediastinal compression by herniated organs can alter venous blood flow ultimately leading to low output cardiac failure. Abnormal liver angulation and diaphragmatic ring constriction may cause liver congestion due to hepatic veins kinking. This mechanism could explain the apparent higher prevalence of fetal effusions in right-sided CDH [1,2]. An abnormal



Fig. 1. Left parasagittal view of case 2 demonstrating posterolateral diaphragmatic defect and recurrent hydrops at 19 WG.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2014.09.042>  
0301-2115/© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Table 1**  
Previously published cases of CDH associated with hydrops.

	n	Gestational age at diagnosis	Ultrasound signs	Prenatal intervention	Neonatal survival
Gilsanz et al. [2]	5	- 3 in postnatal period - 33 WG - 30 WG	- Misdiagnosed as "cystic mass in the right side of the chest" - Right hydrothorax, ascites and CDH	- Thoracic drainage (36 WG) - Abstention	- 2 alive - 1 neonatal death - Death after neonatal surgery - Neonatal death
Benaceraff and Frigoletto [4]	1	- 34 WG	- Polyhydramnios - Right CDH - Subcutaneous edema, ascites, right hydrothorax	- Thoracic drainage withdrawing ascites and hydrothorax	- Neonatal surgery - Death at 3 month
Lau et al. [3]	1	- 35 WG	- Left hydrothorax at 20 WG - Diagnosis of left CDH at 35 WG, associated with hydrothorax and ascites	- Abstention - Labor induction for cardiac dilatation	- Alive
Sydorak et al. [5]	15	- 25 WG (average)	- 9 left CDH, 5 associated with anomalies (leading to TOP) - 6 right CDH	- 5/10: FETO - 1/10: hydrothorax and ascites drainage - 4/10: abstention	- 4 alive - 1 death at day 3 - Alive - No survivor
Van Mieghem et al. [1]	28	- 25 WG (average)	- 14 left CDH, 9 liver herniation - 14 right CDH, 14 liver herniation (8 cases of TOP)	- 15 FETO (5 with thoracic drainage) - 1 thoracic drainage - 4 abstention	- 6 alive - Not alive - 2 alive

CDH congenital diaphragmatic hernia/FETO fetoscopic endotracheal occlusion/TOP termination of pregnancy/WG weeks of gestation

thoracic duct could also play a role in effusion as well as bowel ischemia and/or association with pulmonary sequestration [1–3]. Theoretically, hydrothorax could participate to lung compression but it is not usually described as a poor prognosis predictor. Survival is reported after conservative management in this context (Table 1). Communication between pleural and peritoneal cavities virtually reduces these two compartments to a single one. It can therefore facilitate disseminated effusion leading to the diagnosis of hydrops. This hypothesis is supported by the fact that pleural effusion is usually located on the side of the diaphragmatic defect and by disappearance of pleural effusion after ascites puncture as illustrated by our case 2. Nevertheless, ascites puncture does not necessarily reduce pleural effusion as observed in our case 1. This can be explained by herniated viscera entrapped in the diaphragmatic defect resulting in occlusion of the communication. *In-utero* treatment of effusion associated or not with a treatment of CDH by fetoscopic endoluminal tracheal occlusion can be performed [4,5]. Consensual guidelines are still lacking concerning the use of these procedures in this context.

In conclusion, hydrops does not necessarily facilitate the identification of diaphragmatic defect. Facing ascites and hydrothorax especially left-sided, sonographers should evocate CDH and observe the diaphragmatic structure very cautiously.

#### Conflict of interest

No conflict of interest.

#### References

- [1] Van Mieghem T, Cruz-Martinez R, Allegaert K, et al. Outcome of fetuses with congenital diaphragmatic hernia and associated intrafetal fluid effusions managed in the era of fetal surgery. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol* 2012;39:50–5.
- [2] Gilsanz V, Emons D, Hansmann M, et al. Hydrothorax, ascites, and right diaphragmatic hernia. *Radiology* 1986;158:243–6.
- [3] Lau TK, Fung HY, Fung TY. Fetal diaphragmatic hernia presented with transient unilateral pleural effusion. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol* 1997;9:125–7.

- [4] Benaceraff BR, Frigoletto Jr FD. In utero treatment of a fetus with diaphragmatic hernia complicated by hydrops. *Am J Obstet Gynecol* 1986;155:817–8.
- [5] Sydorak RM, Goldstein R, Hirose S, et al. Congenital diaphragmatic hernia and hydrops: a lethal association? *J Pediatr Surg* 2002;37:1678–80.

A. Rossi

CHU Clermont-Ferrand, CHU Estaing, Maternal Fetal Medicine Unit,  
1 place Lucie et Raymond Aubrac, 63003 Clermont-Ferrand Cedex 1,  
France

A. Delabaere<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>CHU Clermont-Ferrand, CHU Estaing, Maternal Fetal Medicine Unit,  
1 place Lucie et Raymond Aubrac, 63003 Clermont-Ferrand Cedex 1,  
France

<sup>b</sup>R2D2-EA7281, Université d'Auvergne, Faculté de Médecine, Place  
Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand, France

H. Delmas-Laurichesse

A.M. Beaufrère

D. Lémery

CHU Clermont-Ferrand, CHU Estaing, Maternal Fetal Medicine Unit,  
1 place Lucie et Raymond Aubrac, 63003 Clermont-Ferrand Cedex 1,  
France

D. Gallot<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>CHU Clermont-Ferrand, CHU Estaing, Maternal Fetal Medicine Unit,  
1 place Lucie et Raymond Aubrac, 63003 Clermont-Ferrand Cedex 1,  
France

<sup>b</sup>R2D2-EA7281, Université d'Auvergne, Faculté de Médecine, Place  
Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand,  
France

\*Corresponding author at: Unité de Médecine Fœtale, CHU Estaing,  
1 place Lucie et Raymond Aubrac, 63003 Clermont-Ferrand  
Cedex 1, France. Tel.: +33 4 73 755 086; fax: +33 4 73 750 565  
E-mail address: dgallot@chu-clermontferrand.fr (D. Gallot).

Received 20 February 2014

PUBLICATION N°2

**Metabolic disturbances of the vitamin A pathway in human diaphragmatic hernia.**

Coste K, Beurskens LW, Blanc P, Gallot D, Delabaere A, Blanchon L, Tibboel D, Labbé A,  
Rottier RJ, Sapin V.

**Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2015 Jan 15;308(2):L147-57.**

L'analyse transcriptionnelle des composants clés de la voie de signalisation des rétinoïdes, sur des poumons issus de fœtus humains atteint de HCD, de fœtus de rates gestantes exposées au nitrofène et de fœtus lapins avec HCD chirurgicale, retrouvait une anomalie de la régulation des gènes CRPB2, CYP26B1 et ALDH1A2. L'étude du profil d'expression de ce dernier suggérait que la surexpression de ALDH1A2 était une conséquence de la lésion pulmonaire induite par la HCD. Ces résultats permettaient de conclure qu'une interruption de la voie de signalisation des rétinoïdes pouvait expliquer une partie de la pathogénie de la HCD. Ils viennent compléter un schéma mécanistique dans lequel la voie de signalisation des rétinoïdes peut être perturbée par des mutations monogénétiques multiples ou par une altération génomique large dans les formes non-isolées de HCD, ou elle peut être affectée par des modifications de l'expression génique plus discrètes dans des formes isolées.

## Metabolic disturbances of the vitamin A pathway in human diaphragmatic hernia

Karen Coste,<sup>1\*</sup> Leonardus W. J. E. Beurskens,<sup>2\*</sup> Pierre Blanc,<sup>1</sup> Denis Gallot,<sup>1</sup> Amélie Delabaere,<sup>1</sup> Loïc Blanchon,<sup>1</sup> Dick Tibboel,<sup>2</sup> André Labbé,<sup>1</sup> Robbert J. Rottier,<sup>2</sup> and Vincent Sapin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clermont Université, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France; and <sup>2</sup>Department of Pediatric Surgery, Erasmus MC, Rotterdam, The Netherlands

Submitted 23 April 2014; accepted in final form 27 October 2014

Coste K, Beurskens LW, Blanc P, Gallot D, Delabaere A, Blanchon L, Tibboel D, Labbé A, Rottier RJ, Sapin V. Metabolic disturbances of the vitamin A pathway in human diaphragmatic hernia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 308: L147–L157, 2015. First published November 21, 2014; doi:10.1152/ajplung.00108.2014.—Congenital diaphragmatic hernia (CDH) is a common life-threatening congenital anomaly resulting in high rates of perinatal death and neonatal respiratory distress. Some of the nonisolated forms are related to single-gene mutations or genomic rearrangements, but the genetics of the isolated forms (60% of cases) still remains a challenging issue. Retinoid signaling (RA) is critical for both diaphragm and lung development, and it has been hypothesized that subtle disruptions of this pathway could contribute to isolated CDH etiology. Here we used time series of normal and CDH lungs in humans, in nitrofen-exposed rats, and in surgically induced hernia in rabbits to perform a systematic transcriptional analysis of the RA pathway key components. The results point to *CRBP2*, *CYP26B1*, and *ALDH1A2* as deregulated RA signaling genes in human CDH. Furthermore, the expression profile comparisons suggest that *ALDH1A2* overexpression is not a primary event, but rather a consequence of the CDH-induced lung injury. Taken together, these data show that RA signaling disruption is part of CDH pathogenesis, and also that dysregulation of this pathway should be considered organ specifically.

retinoids; metabolism; diaphragmatic hernia; human; animal models

CONGENITAL DIAPHRAGMATIC HERNIA (CDH) is a life-threatening birth defect with a worldwide incidence ranging from 1 in 2,000 to 1 in 4,000 newborns. The protrusion of abdominal viscera into the chest through the diaphragm defect is associated with the pulmonary hypoplasia and pulmonary hypertension that mainly account for the high mortality and morbidity rates (20). CDH occurs as either an isolated congenital anomaly or as a nonisolated defect (also called complex or syndromic CDH). A small subset of nonisolated CDH is recognized as composed of Mendelian disorders caused by single-gene mutations or recurrent genomic rearrangements (3). By contrast, most isolated CDH cases are sporadic and thought to stem from multifactorial inheritance. Despite recent genome-wide screenings (3, 42), the genetic alterations that contribute to isolated CDH are still poorly understood. Another relevant approach in such situations is to perform functional analyses on candidate genes or signaling. Among these candidates, retinoid signaling dysregulation appears to be a recurrent theme in both animal models and human sporadic or inherited cases of

nonisolated CDH. Through the canonical RA signaling pathway, retinol (Ret) is converted into retinal (Retal) by several enzymes [alcohol dehydrogenases (ADH), short-chain dehydrogenase reductase (DHRS), and retinol dehydrogenase (RDH)] and into the active component retinoic acid (RA) by aldehyde dehydrogenases (ALDH), of which ALDH1A2, also known as retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2), is the main one during development (Fig. 1) (30). The two main isoforms of RA (all-*trans* and 9-*cis* RA) are the ligands for the nuclear retinoic acid receptors (RARs) and retinoid X receptors (RXRs), acting in heterodimeric combinations to regulate the transcription of target genes containing RA response elements (RARE) (Fig. 1) (24). RA is degraded by members of the cytochrome P-450 family: CYP26A1, CYP26B1, and CYP26C1 (39). Intracellular retinoids are bound to specific proteins: cellular retinol-binding proteins (CRBP1 and CRBP2) and cellular retinoic acid binding proteins (CRABP1 and CRABP2). A balance between RA synthesis and degradation determines the intracellular RA concentration.

The possibility that the disruption of any of these multiple steps could be involved in isolated CDH is the “retinoid hypothesis.” This hypothesis has been extensively reviewed over the past decade (4, 12, 13, 17, 28, 41) and is strongly supported by several lines of evidence.

1) Fetuses exposed to maternal vitamin A deficient diet (VAD) display CDH (31%) and pulmonary hypoplasia (4%) (44). This phenotype is present in 100% of the fetuses if the deficiency concerns RA (37). In both VAD and teratogenic RA models, CDH incidence is reduced by vitamin A intake or reintroduction (1, 29, 31, 40, 44).

2) The phenotype of the RAR alpha/beta knockout mice recapitulates most of the lung defects observed in VAD animal models (6, 26).

3) RA-induced genes (such as *Gata4* and *Coup-tfII*) are expressed in the pleuropertoneal folds (7), and pharmacological ALDH1A2 inhibition results in posterolateral diaphragm defect (27). In the prospective lung mesoderm, RA signaling provides a *Fgf10*-inductive signal through *Tgfβ1* repression (8).

4) In human nonisolated CDH, chromosomal rearrangements containing RA pathway-related genes have been reported (12, 36). Mutations in RA pathway genes have also been identified in Mendelian conditions featuring CDH. This is especially the case for Matthew-Wood syndrome (MIM no. 601186), in which *STRA6*, a gene coding the retinol binding protein receptor, is mutated (11, 32). Recently, mutations in *LRP2* have also been shown to cause Donnai-Barrow syndrome (MIM no. 222448). *LRP2* encodes the multiligand receptor megalin. Retinol binding protein (RBP) is known to

\* K. Coste and L. W. J. E. Beurskens contributed equally to this work.  
Address for reprint requests and other correspondence: V. Sapin, Laboratoire de Biochimie Médicale, 4R3, Faculté de Médecine, 28 place Henri-Dunant, BP38, F-63001 Clermont-Ferrand Cedex, France (e-mail: vincent.sapin@udamail.fr).



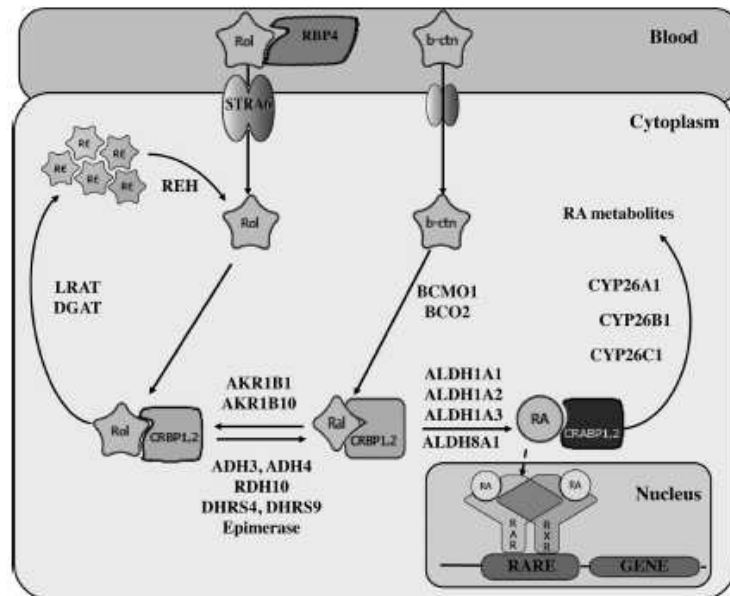


Fig. 1. Overview of the retinoid signaling (RA) signaling pathway. Through a multistep cytosolic process, plasmatic retinol and  $\beta$ -carotene are converted into retinaldehyde and finally into retinoic acid. Retinol can be stored as retinyl ester. RA is transferred down to the nucleus where it binds to RA receptor dimers (RAR/RXR) and acts at short DNA sequences (RA response elements) to activate the transcription of target genes. Alternatively, intracellular RA can be catabolized through the cytochrome *P*-450 pathway. AKR1B1 and AKR1B10, aldo-keto reductase 1B1 and 1B10; ADH3 and ADH4, alcohol dehydrogenase 3 and 4; ALDH1A1, ALDH1A2, and ALDH1A3, aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1 to A3 (also known as RALDH1-3); ALDH8A1, aldehyde dehydrogenase 8 family, member A1 (also known as RALDH4); b-ctn,  $\beta$ -carotene; BCMO1,  $\beta$ -carotene 15,15'-monooxygenase 1; BCO2,  $\beta$ -carotene oxygenase 2; CRABP1 and CRABP2, cellular RA binding protein 1 and 2; CRBP1 and CRBP2, cellular retinol binding protein 1 and 2; CYP26A1, CYP26B1, and CYP26C1, cytochrome *P*-450 A1, B1, and C1; DGAT, diacylglycerol acyl transferase; DHRS4 and DHRS9, short-chain dehydrogenase reductase 4 and 9; LRAT, lecithin retinol acyltransferase; RA, retinoic acid; Ral, retinaldehyde; RAR, retinoic acid receptor; RARE, retinoic acid response element; RBP4, retinol binding protein 4; RDH10, retinol dehydrogenase 10 (all-*trans*); RE, retinyl esters; REH, retinyl ester hydrolase; Rol, retinol; RXR, retinoid X receptor; STRA 6, stimulated by retinoic acid 6.

be one of the megalin ligands, and megalin deficient patients have increased RBP urine spillage (14).

5) Finally, CDH has been demonstrated to be strongly associated with low retinol and RBP levels in newborns, independently of maternal retinol status (2, 22).

Even with all this attractive evidence of RA signaling involvement in nonisolated CDH, the role of this pathway in the isolated forms remains elusive. One possibility is that at least a subset of cases is promoted by low vitamin A intake. Retrospective questionnaires about maternal periconceptional nutrient intakes yields conflicting results (45). In the developing world, where vitamin A intake could be expected to be low, CDH is not reported to occur at higher rates (43). However, lack of birth defect registries may cause CDH incidence to be underestimated. Another possibility is that the RA pathway is intrinsically affected by subtle functional defects of one or more signaling components. Previously, a temporal and spatial expression study of the nuclear receptor genes RAR ( $\alpha, \beta, \gamma$ ) and RXR ( $\alpha, \beta, \gamma$ ) failed to demonstrate any difference between human CDH lungs, hypoplastic lungs due to other causes, and normal lungs (33). Here we extended this first line of analysis using transcriptional screening from the retinol binding protein receptor gene (*STRA6*) to the downstream actors of the RA pathway throughout

the lung development. Comparing different conditions (human normal lungs, human CDH lungs, wild-type and nitrofen-exposed lungs in the rat, and wild-type and hernia-injured lungs in the rabbit), we show that RA signaling is affected by several transcriptional alterations in human CDH, of which *ALDH1A2* overexpression is probably the most striking. The results from the rabbit CDH surgical model suggest that this dysregulation may be secondary to the lung injury process.

#### MATERIALS AND METHODS

**Chemicals.** All-*trans* retinol, all-*trans* RA (ATRA) and dimethylsulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France), culture medium and additives from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France), and the transfection reagent GeneJammer from Stratagene (Amsterdam, The Netherlands).

**Human tissue collection.** With the approval of the Erasmus MC Medical Ethical Committee and the informed consent of the parents, human lung samples were obtained from the tissue bank of the Department of Pathology, Erasmus MC (Rotterdam). The selected lung tissues were collected after elective termination of pregnancy or at autopsy. The characteristics of the nine CDH patients are reported in Table 1. Lung tissues from 10 stage-matched fetuses without pulmonary abnormalities were used as controls (Table 1).

Table 1. Characteristics of the nine congenital diaphragmatic hernia patients

Gestational Age (weeks)/Lung Developmental Stage	Sex	Lung Weight-to-Body Weight Ratio	Phenotype/Malformations	Karyotype
<i>Normal lungs</i>				
13.5 (pseudoglandular)	M	n.a.	n.a.	n.a.
14 (pseudoglandular)	F	n.a.	n.a.	n.a.
15 (pseudoglandular)	F	n.a.	n.a.	n.a.
17 (pseudoglandular)	M	normal	Trisomy 13	47, XY, +13
17.5 (canalicular)	M	n.a.	n.a.	n.a.
26 (canalicular)	F	normal	HLHS	46, XX
26 (canalicular)	M	normal	n.a.	n.a.
28.5 (saccular)	M	normal	ASD, RDS	46, XY
31 (saccular)	F	normal	hydrothorax	46, XX
34 (saccular)	M	normal	EA, hydrocephalus	46, XY
<i>CDH-injured lungs</i>				
21 (canalicular)	M	0.02	isolated CDH	46, XY
22 (canalicular)	M	n.a.	isolated CDH	46, XY
25 (canalicular)	M	0.012	n.a.	n.a.
34 (saccular)	M	0.005	PCH	46, XY
34 (saccular)	M	0.008	testes and kidney cysts	46, XY
37 (saccular)	M	0.005	isolated CDH	46, XY
38 (saccular-alveolar)	F	0.011	isolated CDH	n.a.
40 (alveolar)	M	<0.001	Meckel's diverticulum	46, XY
41 (alveolar)	M	0.006	isolated CDH	46, XY

ASD, atrial septal defect; CDH, congenital diaphragmatic hernia; EA, esophagus atresia; HLHS, hypoplastic left heart syndrome; n.a., not available; PCH, pontocerebellar hypoplasia; RDS, respiratory distress syndrome.

**Animal CDH induction: rabbit surgical and rat nitrofen models.** New Zealand rabbits (Charles River, l'Arbresle, France) and pregnant Sprague-Dawley rats (Harlan Laboratories, Horst, The Netherlands) were respectively shipped at *day 17* and *day 7* of gestation. The Ethics Committees for Animal Experimentation of the Faculties of Medicine at Clermont-Ferrand and Rotterdam approved the experiments (they conformed to NIH guidelines). For rabbit spatiotemporal expression studies, lung tissue was collected at embryonic *day 21* (pseudoglandular stage), *day 26* (canalicular stage), *day 28* (saccular stage) and *day 31* (alveolar stage). Diaphragmatic hernia was created by surgery at embryonic *day 23* (pseudoglandular stage), and lungs were collected at embryonic *day 29* (saccular stage) as previously described (9, 10). For the teratogenic model, rats received 100 mg of nitrofen at embryonic *day 9* as previously described (33).

**Alveolar epithelial cell line A549 culture and treatment.** The A549 cell line, purchased from the American Tissue Culture Collection (LGC Standart, Molsheim, France), was treated with ATRA (Sigma-Aldrich) in DMSO (vehicle) or with DMSO alone for 6, 12, 24, and 48 h. Cells were transfected using GeneJammer with 1 µg of reporter DR5-*tk*-CAT plasmid and 1 µg of cytomegalovirus (CMV)-*β*-galactosidase vector serving as internal control to normalize variations in transfection efficiency. The CAT measurements were performed as previously described (23).

**RNA extraction and RT-PCR experiments.** TRIzol (Invitrogen) reagent was used to extract total RNA from all samples and from the A549 cell line. Complementary DNA (cDNA) was generated using Superscript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen). Specific oligonucleotide primers were originally generated using the web program Primer3 and PerlPrimer (Table 2 and Ref. 23 for human *RARs* and *RXR*s primers). PCR amplification was carried out in a DNA-Engine PTC-200 (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). Only high-quality RNA samples (RNA integrity number less than or equal to 9 on a scale up to 10) checked using Bioanalyzer (Agilent) were included in the analysis.

**Real-time quantitative PCR assays.** Real-time PCR was performed by using Lightcycler Syber Green technology (Roche Diagnostics, Meylan, France) and by using the same couples of primers and cDNA generation as described above. All the experimental steps followed the MIQE guidelines (5). Quantitative data were corrected for three housekeeping genes: *RPLP0*, *18S rRNA*, and *β-actin*.

**ALDH1A2 immunohistochemistry protocol.** Sections of normal human lungs, wild-type rabbit lungs, and rabbit CDH lungs were stained by incubation with anti-ALDH1A2 rabbit polyclonal primary antibody [ALDH1A2 (N-20): sc-22591; Santa Cruz Biotechnology] diluted 1:200 in PBS (Tebu, Le Perray-en-Yvelines, France). The samples were then examined, after Hoechst nuclear counterstaining, under a Zeiss Axiophot microscope.

**ALDH1A2 Western blotting protocol.** The extracts of total proteins were loaded (40 µg/lane) and separated on SDS-PAGE gel, and incubated overnight with goat anti-ALDH1A2 antibody (sc-22591, Santa Cruz Biotechnology) and anti-GAPDH antibody (sc-20357, Santa Cruz Biotechnology) diluted, respectively, 1:200 and 1:100. The blots were incubated with peroxidase conjugated secondary anti-IgG antibody (Abcam) diluted 1:5,000. Blots were stained using a chemiluminescence procedure (ECL Plus kit; Amersham). Band quantification was then performed using Scion software.

**Statistical analysis.** Results are expressed as means ± SD. Given the small size of the samples, Mann-Whitney *U*-test or alternatively Kruskal-Wallis one-way analysis of variance were performed to determine significance. A *P* value of <0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

**Expression pattern of RA signaling genes during human lung development.** Twenty-five critical RA signaling genes were screened by qualitative RT-PCR at the pseudoglandular, canalicular, and saccular stages in a series of 10 whole human lungs (Fig. 2A and Table 1). Most of the genes were expressed from the pseudoglandular to the saccular stages. This was the case in particular for genes encoding 1) the main components of RetA uptake and intracellular transport (*STRA6*, *CRBP1*, and *CRBP2*), 2) the RetA/β-carotene-to-RetA converting enzymes (*ADH3*, *ADH4*, *DHRS4*, *DHRS9*, *RDH10* and epimerase, *BCMO1*, and *BCO2*), 3) the RetA-to-RetA aldoketoreductases (*AKR1B1* and *AKR1B10*), 4) the RetA-to-RA converting enzymes (*ALDH1A1* and *ALDH1A2*), 5) the cellular retinoic acid binding proteins (*CRABP1* and *CRABP2*), 6) the RA degrading enzyme (*CYP26B1*), and 7) the enzymes for storage and

Table 2. Primers sequences used for PCR genes amplifications

Gene	Sequence (5'-3')		Product Size, bp
	Forward	Reverse	
<b>Human</b>			
Alcohol dehydrogenase 3 ( <i>ADH3</i> )	ATGAAGTTCGGCATTAAAGATG	TTTCAAGCAGTAGTTGGCTCT	239
Alcohol dehydrogenase 4 ( <i>ADH4</i> )	AACCTGCCTGGTTAATTTAT	ACTTTCAACTTCCCAGAACT	231
Short chain dehydrogenase 4 ( <i>DHRS4</i> )	CAAGGGTGTTTTACTGACAT	TATCCTAGTCTGCAATGCTG	235
Short chain dehydrogenase 9 ( <i>DHRS9</i> )	AAACCTCAGAGAGACTTCCT	TCTAGTCTCAGGCAGTCACT	169
Retinol dehydrogenase 10 ( <i>RDH10</i> )	CATACCTGGAGCTGAACCTGT	CGAGGAAGCTCTTAAAGAA	278
Epimerase ( <i>EPIM</i> )	TGAACACTGAGGACTCTATGA	TTCAACTATGCTGATTTCAC	242
Aldo-keto reductase family 1, member 1 ( <i>AKR1B1</i> )	CCTGGACCTCTACCTTATTC	AACTGCAGGCTTATCTCA	235
Aldo-keto reductase family 1, member 10 ( <i>AKR1B10</i> )	CAAGATTAAGGACATTTGCTG	AGTCTTCCAAATGAGAGGAT	233
Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1 ( <i>ALDH1A1</i> )	TACTCACCATTGGAAGATT	TTGTGAACATCTCTCTATC	151
Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2 ( <i>ALDH1A2</i> )	TGACTCCAGCAAGATAGAG	TGGATTATAGACAGGGAAACA	179
Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3 ( <i>ALDH1A3</i> )	ACCTGGAGGTCAGTTC	CTGTATCCATCTCTCCAG	291
Aldehyde dehydrogenase 8 family, member A1 ( <i>ALDH8A1</i> )	TAGATTTCTACGACCCATCA	TAAGGTTTTCCCTTGGTCT	224
Cytochrome P-450 family 26 subfamily A polypeptide 1 ( <i>CYP26A1</i> )	AAGCTCTGGGACCTGACT	TGTAGATGAAGCCGTATTTTC	163
Cytochrome P-450 26 B1 ( <i>CYP26B1</i> )	ACCTCTTGGAGTCTACCAG	GCTCTCAATGAGGAGGTC	194
Cytochrome P-450 26 C1 ( <i>CYP26C1</i> )	GGAGAACCTCTTCTCAGTC	CTTGCACCTGTGAATGATTAG	191
Lecithin:retinol acyltransferase ( <i>LRAT</i> )	CTAACATCTGGTCAATCAG	TGAAGCAAGAACTCTCTCT	236
Diacylglycerol acyl transferase ( <i>DGAT</i> )	CTGCAGGATCTTTTATTCAG	ATCCTTCAGGAACAGAGAAA	171
Retinyl esters hydrolase ( <i>REH</i> )	GACTCTTGTCCATGTGAAGG	TGTTGAACCTGGTAAAGAAC	206
Cellular retinol binding protein 1 ( <i>CRBP1</i> )	GATCTGACAGGCAATAGATGA	CTTCTTGAATATCTTGGTTC	180
Cellular retinol binding protein 2 ( <i>CRBP2</i> )	ATGAAAATCTTGAAGGGCTAC	GAAATCCACATCATAGTTCC	155
Cellular retinoic acid binding protein 1 ( <i>CRABP1</i> )	ACCCTGAGATCACTTCAA	TCACTCTGGGACATAAATTC	234
Cellular retinoic acid binding protein 2 ( <i>CRABP2</i> )	GAATTTGCTCAAAGTGGTC	CTGCTCAGACCCATTTTAT	243
Stimulated by retinoic acid 6 ( <i>STRA6</i> )	GGATTCCTGAGCCTTTGGTA	TAGCTGAAAAGCACCAGCTTC	253
Beta-carotene 15,15'-monooxygenase 1 ( <i>BCMO1</i> )	ATAGGAAAGAACAGCTGGAG	GTTGTAGGTATCGCTTCTCA	218
Beta-carotene oxygenase 2 ( <i>BCO2</i> )	FTTTTTGAACCTTTGATGTC	ACCCGAATAACCTTATAGGA	293
Ribosomal protein, large, P0 ( <i>RPLP0</i> )	AGGCTTAGGTATCCCAACT	GCAGAGTTTCCCTGTGTATA	219
<b>Rabbit</b>			
Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2 ( <i>ALDH1A2</i> )	TAACAATGAATGGCAGAACT	CACACAGAACCAGAGAGAA	156
Ribosomal protein, large, P0 ( <i>RPLP0</i> )	GGAACTCCAACACTCTCTCT	GAGGTCTCTCTGGTGA	256
<b>Rat</b>			
Cellular retinol binding protein 1 ( <i>CRBP1</i> )	TGAACCTCACCTGGAGATGAG	CTCGAGACCAAGGTTATCTG	97
Microsomal short chain dehydrogenase 4 ( <i>DHRS4</i> )	GAAAATTAGAAAGGCTAGGCA	TCTCCGCAATGATGAACTG	89
Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1 ( <i>ALDH1A1</i> )	GGTACTGTGGGTTAACTGCT	TTCCAGACATCTTGAATCCAC	71
Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2 ( <i>ALDH1A2</i> )	ATGGGTGAGTTTGGCTTACG	AAGGAGGCTCTGATAGGT	134
Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3 ( <i>ALDH1A3</i> )	TCGAGAGTGGGAAGAAGGAA	AGAAGACGGTGGGTTTGATG	90
Cytochrome P-450 family 26 subfamily A polypeptide 1 ( <i>CYP26A1</i> )	ACCCTTCGATTTGAATCCTCC	ATCTGGTAAACCGTTCAAGCT	77
Cytochrome P-450 26 B1 ( <i>CYP26B1</i> )	AGAGCTGCAAGCTGCTATC	CGCCCACTAAGTGTGCTT	145
Lecithin:retinol acyltransferase ( <i>LRAT</i> )	AGGCTGAGAAAGTTTCAGGA	GATGCCAGGCTGTGTAGAT	110
Ribosomal protein s18 ( <i>RP18</i> )	AAGTATAGCCAGGTTCTGGC	CCGAAAGATCATTTCTTCTGG	189

hydrolysis of retinyl esters (*DGAT* and *REH*). Consistent with animal models, this result suggests that RA pathways play a critical role throughout lung development in humans. By contrast, *ALDH1A3* and *ALDH8A1* expression was found to be restricted to the canalicular stage, whereas *CYP26A1*, *CYP26C1*, and *LRAT* were not expressed. Pooling the 10 human lung samples and matching the results with positive controls, we confirmed that *CYP26A1*, *CYP26C1*, and *LRAT* were not expressed in human fetal lungs (Fig. 2B). Since the endodermal and mesodermal compartments were not discriminated by this whole lung screening, we also performed qualitative RT-PCR on the human alveolar epithelial cell line A549. The same expression pattern was found for all the genes (Fig. 2A). To further analyze the functional significance of this metabolic expression pattern, we performed an RA-dependent *CAT* gene reporter assay in A549 cells. After 24-h incubation with 1  $\mu\text{mol/l}$  of retinol or RA, we observed, respectively, a 2.4-fold ( $P < 0.05$ ) and 4.1-fold ( $P < 0.05$ ) induction of *CAT* expression (Fig. 2C), demonstrating that the RA signaling gene expression pattern in this lung epithelial cell line is consistent with the metabolic activity of the pathway.

*Changes in RA signaling gene expression in human CDH lungs.* Next we examined the expression levels of the above RA signaling genes in human CDH-injured lungs. The 9 samples originated mainly from isolated CDH ( $n = 6$ ) or alternatively from nonisolated CDH ( $n = 3$ ), with a gestational age ranging from 21 to 41 wk (Table 1). The nonisolated CDH did not display classical RA signaling-related malformations. The relative expression of each gene of the panel was measured by quantitative PCR (qPCR), and the means of human CDH samples ( $n = 9$ ) and normal human lungs ( $n = 10$ ) were compared (Fig. 3A). As described above for normal human lungs, *LRAT*, *CYP26A1*, and *CYP26C1* were not expressed in CDH lungs. None of the other RA signaling genes showed any statistically significant difference of expression between CDH and normal lungs, apart from three striking exceptions (Fig. 3A). Two genes, *CRBP2* and *CYP26B1*, showed a complete transcriptional extinction in CDH-injured lungs. Because both of them were known to be regulated by retinoic acid levels in other conditions, we tested their potential regulation by ATRA in the A549 human alveolar cell line. We showed that 1  $\mu\text{mol/l}$  RA increased *CYP26B1* expression by the 6th hour (1.8-fold,

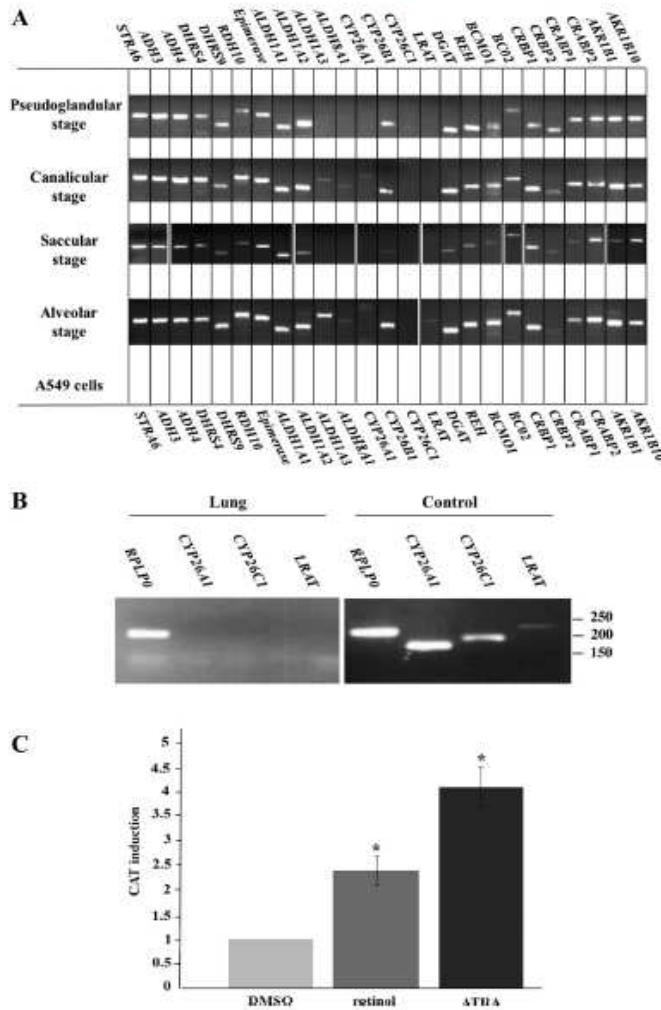


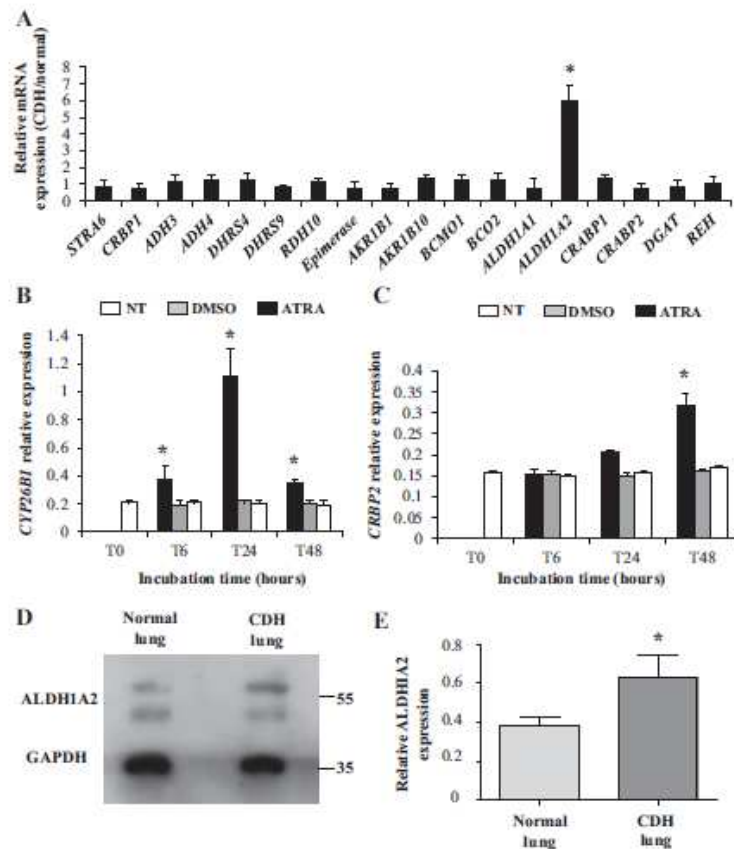
Fig. 2. RA signaling components are expressed throughout the human lung development. **A**: representative qualitative PCR (qPCR) showing the expression timing of 25 RA signaling related genes at the pseudoglandular, canaliculate, and saccular stages. Patterns in whole lungs are similar to the expression profile in the human alveolar epithelial cell line A549. Spaces demarcate independent gels. **B**: positive controls using tissue mix (liver, kidney, heart, and placenta) demonstrate that *CYP26B1*, *CYP26A1*, and *LRAT* are not expressed in the human fetal lung. Samples were processed in parallel, and PCR products were controlled on different agarose gels. **C**: CAT gene reporter assay in A549 cells after 24 h of incubation with 1  $\mu\text{mol/l}$  of retinol or RA. \* $P < 0.05$ ;  $n = 4$ . RPLP0, ribosomal protein, large, P0.

$P = 0.03$ ) with highest induction level (5.3-fold,  $P = 0.019$ ) at the 24th hour (Fig. 3B). *CRBP2* was also induced by RA treatment, but later (48 h) and to a lesser degree (2-fold,  $P = 0.03$ ), with a progressive increase between 6 and 48 h of treatment (Fig. 3C). Together, these data were strongly suggestive of intracellular RA depletion in human CDH lungs. Because *ALDH1A2* is mainly responsible for Ral-to-RA conversion, such loss of *CRBP2* and *CYP26B1* expression could result from a primitive decrease in *ALDH1A2* transcription. On the contrary, we found that *ALDH1A2* was strongly overexpressed (5.9-fold,  $P = 0.03$ ) in human CDH lungs (Fig. 3A). Consistent with the *ALDH1A2* mRNA overexpression, the respective protein level showed a 1.6-fold increase ( $P = 0.028$ ) (Fig. 3, D and E).

*Pulmonary RA pathway gene expression in teratogenic and surgical CDH models.* To gain further insight into the RA pathway transcriptional signature of human CDH-affected lungs, we performed a second round of qRT-PCR in two CDH animal models.

First we screened the expression of RA signaling genes in the rat nitrofen-induced CDH model (7, 13, 31). This model has been extensively investigated over the past decade. Nitrofen toxicity is now thought to act through aldehyde dehydrogenase inhibition—mostly of *ALDH1A2*—which leads to a decrease in RA levels. Over the RA signaling gene panel we tested, the expression of *Aldh1a1* and *Aldh1a2* mRNA was not significantly affected in nitrofen-exposed lungs (Fig. 4A). *Cyp26a1* expression appeared to be only slightly and not

Fig. 3. Diaphragmatic hernia disrupts RA signaling gene expression in human lung. **A:** relative mRNA expression of the RA signaling genes panel [congenital diaphragmatic hernia (CDH)/normal, respectively,  $n = 9$  and  $n = 10$ ] as measured by qPCR. *CYP26B1* and *CRBP2* are not expressed in CDH-injured lungs. **B** and **C:** bar chart showing, respectively, *CYP26B1* and *CRBP2* relative induction in A549 cells as measured by qPCR ( $n = 4$ ) after treatment (6th, 24th, and 48th hours). White bar: no treatment (NT); gray bar: vehicle (DMSO); black bar (ATRA,  $1 \mu\text{mol/l}$ ). **D:** representative image of Western blotting with ALDH1A2 and GAPDH specific antibodies in one human CDH-injured lung and one normal human lung. According to the manufacturer's technical information, the ALDH1A2 antibody (sc-22591) detects two ALDH1A2 isoforms around 55 kDa. **E:** relative ALDH1A2 protein levels in normal human lungs ( $n = 4$ ) and human CDH-injured lungs ( $n = 4$ ). Results are corrected for GAPDH protein levels. \* $P < 0.05$ .



statistically reduced, whereas *Cyp26b1* and *Lrat* mRNA levels were halved ( $P < 0.05$ ). Furthermore, *Dhrs4* mRNA level showed a 1.5-fold increase ( $P < 0.05$ ). Together, these data were consistent with a pattern of intracellular RA decrease. However, the transcription level of aldehyde dehydrogenase genes—especially *Aldh1a2*—remained unchanged, supporting the view, in parallel, that the *ALDH1A2* overexpression in human CDH was not primarily promoted by a decrease in RA levels and positive feedback.

We thus went on to consider the rabbit CDH surgical model (10). In this model, diaphragmatic hernia results only from the surgical procedure on a wild-type background. Thus no genetic or toxic RA signaling disruption occurs, and any mRNA level variation in RA signaling genes is expected to be secondary to lung CDH-related injury. The hernia was created at day 23 (pseudoglandular stage), and the qRT-PCRs were performed at day 29 (saccular stage) on the ipsilateral lung. *Crpb2* and *Cyp26b1* expression levels remained unchanged. By contrast, we detected a dramatic 10.1-fold increase ( $P < 0.001$ ) in *Aldh1a2* transcript level (Fig. 4B). This mRNA increase correlated with a 3.2-fold increase ( $P = 0.029$ ) in the ALDH1A2

protein level (Fig. 4, C and D). Because this induction could result from a putative systemic transregulatory factor, we compared *Aldh1a2* mRNA expression in brains from CDH-affected and control rabbit fetuses. The surgical procedure did not affect the mRNA expression of *Aldh1a2* in brain tissues (data not shown). During rabbit lung development, the retinaldehyde dehydrogenase ALDH1A2 was found to be specifically localized in the epithelial compartment from bronchi down to saccules (Fig. 5, E–G) and later down to alveoli (Fig. 5, M–O). A similar pattern was evidenced in human fetal lungs at the saccular and alveolar stages (Fig. 5, A–D and I–K). The surgically induced CDH in the rabbit did not modify the site-specific ALDH1A2 localization in epithelial cells along the airways (Fig. 5, Q–T). Further quantitative analysis of *Aldh1a2* mRNA level throughout the rabbit lung development showed two bursts of expression, respectively, at the pseudoglandular and saccular stages (Fig. 6A). Comparing this developmental sequence with *ALDH1A2* expression in human fetal lung, we observed similar timing (Fig. 6B). In particular, *Aldh1a2* mRNA levels appeared to be consistently high at the saccular stage, in both rabbits and

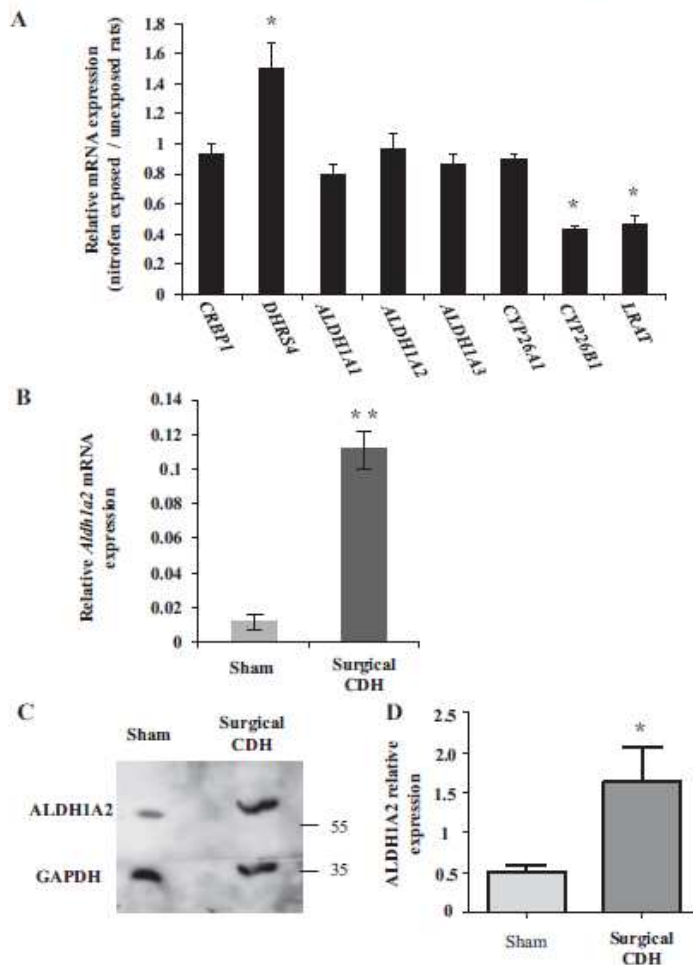


Fig. 4. RA signaling genes are deregulated in animal CDH models. **A**: rat nitrofen CDH model; relative mRNA expression in lungs from nitrofen-exposed rats ( $n = 5$ ) as measured by qPCR. **B**: rabbit surgical CDH model. Relative *Aldh1a2* expression in control lungs ( $n = 4$ ) and CDH-injured lungs ( $n = 4$ ) as measured by qPCR. **C**: rabbit surgical CDH model; representative image of Western blotting with ALDH1A2 and GAPDH specific antibodies in one rabbit CDH-injured lung and one normal rabbit lung. **D**: rabbit surgical CDH model; relative ALDH1A2 lung protein levels in sham group ( $n = 4$ ) and CDH group ( $n = 4$ ). \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.001$ .

humans. Taken together, these data suggest that *Aldh1a2* is strongly overexpressed at the saccular stage in surgically induced CDH and human CDH.

#### DISCUSSION

Multifactorial diseases result from multiple common variants with small effect sizes and environmental factors. Unlike syndromic CDH, isolated CDH etiology in humans is thought to arise from a complex inheritance (41). In this case, identifying small size variants or subtle transcriptional shifts requires huge cohorts of cases and controls, far more than is technically feasible in congenital defects. Therefore, by analyzing the expression of 25 genes of the candidate RA signaling pathway in 10 human normal lungs and 9 human CDH lungs, we expected to detect only significant variations of expression.

One striking feature of this stringent transcriptional screening was the overexpression of *ALDH1A2* mRNA in human CDH lungs, subsequently confirmed at the protein level. *ALDH1A2* is known to be the functionally most important aldehyde dehydrogenase during mammalian development (30). During human lung development, *ALDH1A1* and *ALDH1A2* transcripts were detected from the pseudoglandular to the saccular stages, whereas *ALDH1A3* and *ALDH8A1* were expressed only at the canalicular stage. The *ALDH1A2* expression levels were higher at the pseudoglandular and saccular stages, with a maximum at the saccular stage. Together, these data strongly support the idea that *ALDH1A2* expression is critical along these two distinct time windows to supply appropriate intracellular RA levels. This critical expression pattern of aldehyde dehydrogenases during human lung development raises the question of how *ALDH1A2* is overexpressed in

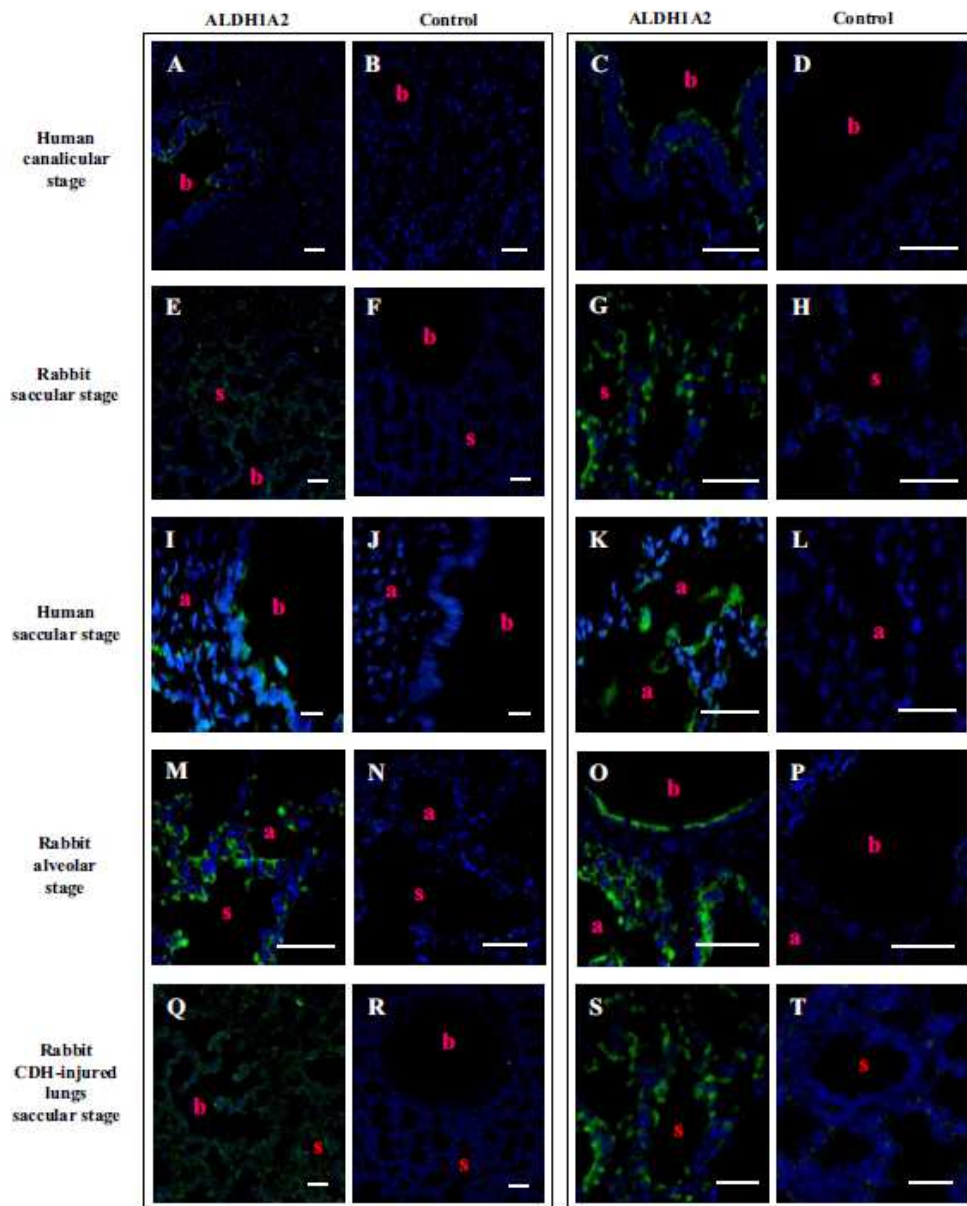


Fig. 5. Lung epithelial ALDH1A2 localization is not modified by rabbit surgically induced diaphragmatic hernia. Immunostained sections of human lung (A-D: canalicular stage; I-L: saccular stage), rabbit lung (E-H: saccular stage; M-P: alveolar stage), and CDH-injured lung in rabbit (Q-T: saccular stage) showing the temporal and site-specific expression of ALDH1A2 in the epithelial cells from bronchi down to alveoli. Q-T: CDH-injured lungs in rabbits showing increased ALDH1A2 staining in epithelial cells, without modification of localization. Right: higher magnifications. Counterstaining: Hoechst; b, bronchi; s, saccule; a, alveoli. Scale bar: 100  $\mu$ m.

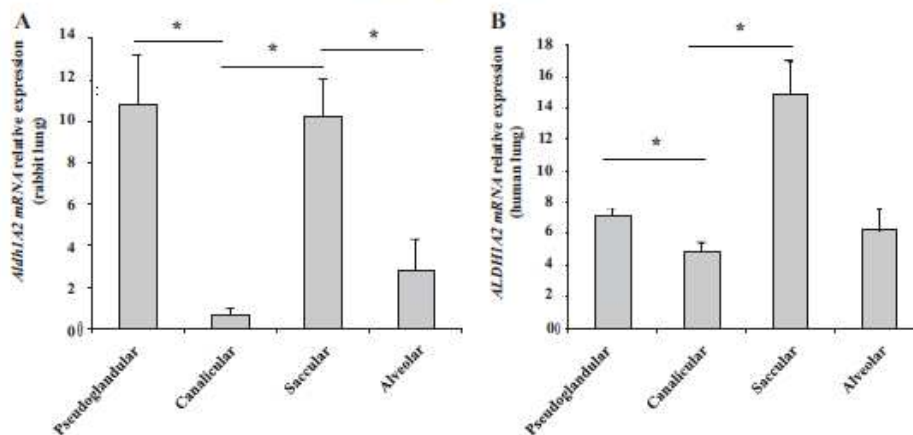


Fig. 6. *Aldh1A2* is strongly expressed at the saccular stage, in both rabbit and human lungs. Relative *Aldh1a2* mRNA expression in rabbit (A) and human lung (B), as measured by qPCR from the pseudoglandular to the alveolar or alternatively saccular stage (pseudoglandular stage:  $n = 4$ ; the following stages:  $n = 3$ ). \* $P < 0.05$ .

human CHD lungs. This transcriptional shift could reflect either a molecular signature of intracellular retinoid depletion or an intrinsic disruption of the pathway.

The former hypothesis was supported by the dramatic extinction of *CRBP2* and *CYP26B1* expression in the human CDH lungs. Yet both of these genes are known to be retinoid-induced in vivo and in vitro (29, 31, 34, 46). Furthermore, *Lrat* and *Cyp26b1* were found to be expressed at low levels in the rat nitrofen model, whereas *Cyp26a1* expression remains unaffected, as previously described (31). Conversely, *Dhrs4* was upregulated. These transcriptional modifications can be interpreted as cellular metabolic adaptations to nitrofen-induced RA depletion. Retinol storage and retinoic acid catabolism decrease, whereas the retinol-to-retinal conversion increases to overcome the intracellular RA depletion. Consistent with this picture, *Lrat* and *Cyp26b1* expression levels are also decreased in the mouse VAD model (34, 35). Together, these data support the idea that *CRBP2* and *CYP26B1* mRNA decreases in human CDH lungs are indirect marks of RA depletion. However, the transcription levels of *DGAT*, *REH* (the human retinyl ester storage enzyme), and *DHRS4* remains stable. These contrasting data suggest that, if present, the intracellular RA deficiency is not a primary event. Rather, the low retinol and RBP levels found in human newborns (2) probably induce chronic intracellular retinoid deficiency and secondary RA depletion. Consistent with previous data (31), another finding from our screening in the rat nitrofen model is that *Aldh1a2* expression is not sensitive to RA decrease. Thus *ALDH1A2* overexpression in human CDH lungs is unlikely to result from low intracellular RA levels.

An important feature of the nitrofen model is that aldehyde dehydrogenase inhibition impairs lung development, diaphragm development, or both (15, 19). RA signaling is involved in both lung and diaphragm development, and it is usually difficult to parse out the respective effects of the hernia and the RA signal disruption on lung development. This fact is further illustrated by the Matthew-Wood syndrome (MIM no.

601186), where lung hypoplasia can occur independently of the diaphragmatic hernia (11). Thus a critical issue in understanding the cause of *ALDH1A2* overexpression in human CDH lung was to study the transcriptional consequences of diaphragmatic hernia on a wild-type background. In the light of this concern, we took advantage of the rabbit model to investigate this last hypothesis. The temporal *ALDH1A2* and spatial *ALDH1A2* expression patterns were very similar during rabbit and human lung development. In particular, *ALDH1A2* showed a burst of expression at the saccular stage both in humans and rabbits. It has been previously proposed that this specific sequence plays a critical role in RA-dependent alveolization (21). But most importantly, just as in human CDH, we found that both *Aldh1a2* mRNA and *ALDH1A2* protein levels were strongly increased in rabbit hernia-injured lungs. Therefore, we concluded that *ALDH1A2* overexpression in human CDH is likely to be a mechanistic side effect of the hernia rather than a constitutive disruption of the RA pathway. The retinoid pathway regulates a wide range of cellular behaviors during embryonic development and adult homeostasis (6, 38). Of note, RA signaling is involved in tissue regeneration and repair. Consistent with our findings in the rabbit CDH surgical model, *ALDH1A2* increases in the first week after rat spinal cord injury, suggesting that retinoid signaling is not involved in the early phase of inflammation in vivo, but rather promotes tissue regeneration in subsequent phases of the inflammatory reaction (16). Furthermore, in situ hybridization experiments showed that *Aldh1a2* is strongly expressed around the wound at day 2 during caudal fin regeneration in zebrafish (25). Thus we consider that the *Aldh1a2/ALDH1A2* overexpression in rabbit and human CDH could result from the hernia-mediated lung injury. The herniated organs not only reduce the lung expansion space in the chest, but also compress lung tissues. How tissue compression intrinsically impairs the lung developmental program is still unclear. Moreover, lung volume measurements in human fetuses with CDH demonstrate that lung volume can vary dramatically and is of major interest for



the fetal prognosis and postnatal outcome (18). Beside the volume of the hernia and the intensity of the compression, the timing of the compression could also modulate the tissue injury. In the rabbit CDH surgical model, the homolateral lung experiences acute compression. Conversely, in human CDH, tissue compression is expected to be more progressive, and lung hypoplasia occurs or is aggravated concomitant to the hernia. Although the timing and the extent of the hernia are controlled in our surgical model, the human CDH samples we analyzed may represent heterogeneous conditions, especially in hernia severity. Therefore, determining the etiology of the lung developmental changes in CDH remains a critical issue. Comparisons can be made only if appropriate precautions are taken, and we can only suppose from the above discussion that rabbit *Aldh1a2* and human *ALDH1A2* overexpression is related to lung tissue injury.

In conclusion, although metabolic retinoid signaling disruption does probably not recapitulate the complete pathogenesis of CDH, our systematic screening in a human CDH cohort identified a molecular signature for the retinoid pathway disruption. On the one hand, *CYP26B1* and *CRBP2* downregulation suggests that intracellular fetal lung levels of RA are low, consistent with low retinol and RBP levels found in cord fetal blood. On the other hand, *ALDH1A2* upregulation is not expected to be secondary to low RA levels. Rather the CDH rabbit model we used suggests it could be due to lung tissue injury per se. Thus this study completes the overall CDH mechanistic picture where the retinoid signaling can be primarily disrupted by single-gene mutations or large genomic alterations in the nonisolated forms, or only be affected by subtle primary or secondary modifications in the isolated forms. In the second case, how these modifications contribute to lung damage requires further investigation.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Prof. R. R. de Krijger (pathologist) for support in collecting post mortem lung tissue, Dr. I. Sluiter for support in collecting rat lung tissue, and A. Herbet for qPCR experiment adjustment on human and rabbit samples.

#### GRANTS

K. Coste was supported by the French Pediatric Pulmology and Allergology Society (SP2A).

#### DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

K.C. and L.W.B. performed experiments; K.C. and V.S. analyzed data; K.C., L.W.B., and V.S. interpreted results of experiments; K.C. and L.W.B. prepared figures; K.C., P.B., and V.S. drafted manuscript; K.C., L.W.B., P.B., D.G., A.D., L.B., D.T., A.L., R.J.R., and V.S. edited and revised manuscript; K.C., L.W.B., P.B., D.G., A.D., L.B., D.T., A.L., R.J.R., and V.S. approved final version of manuscript; D.T. and V.S. conception and design of research.

#### REFERENCES

1. Babiuk RP, Thebaud B, Greer JJ. Reductions in the incidence of nitrofen-induced diaphragmatic hernia by vitamin A and retinoic acid. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L970–L973, 2004.
2. Beurskens LWJE, Tibboel D, Lindemans J, Duvekot JJ, Cohen-Overbeek TE, Veenma DCM, de Klein A, Greer JJ, Steegers-Theunissen RPM. Retinol status of newborn infants is associated with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatrics* 126: 712–720, 2010.
3. Brady PD, DeKoninck P, Fryns JP, Devriendt K, Deprest JA, Vermeesch JR. Identification of dosage-sensitive genes in fetuses referred with severe isolated congenital diaphragmatic hernia. *Prenat Diagn* 33: 1283–1292, 2013.
4. Brady PD, Srisupundit K, Devriendt K, Fryns JP, Deprest JA, Vermeesch JR. Recent developments in the genetic factors underlying congenital diaphragmatic hernia. *Fetal Diagn Ther* 29: 25–39, 2011.
5. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55: 611–622, 2009.
6. Clagett-Dame M, Knutson D. Vitamin A in reproduction and development. *Nutrients* 3: 385–428, 2011.
7. Clugston RD, Zhang W, Greer JJ. Gene expression in the developing diaphragm: significance for congenital diaphragmatic hernia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294: L665–L675, 2008.
8. Duester G. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell* 134: 921–931, 2008.
9. Flemmer AW, Jani JC, Bergmann F, Muensterer OJ, Gallot D, Hajek K, Sugawara J, Till H, Deprest JA. Lung tissue mechanics predict lung hypoplasia in a rabbit model for congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Pulmonol* 42: 505–512, 2007.
10. Gallot D, Coste K, Jani J, Roublova X, Marceau G, Velemir L, Verheyen A, Lemery D, Sapin V, Deprest J. Effects of maternal retinoic acid administration in a congenital diaphragmatic hernia rabbit model. *Pediatr Pulmonol* 43: 594–603, 2008.
11. Golzio C, Martinovic-Bouriel J, Thomas S, Mougou-Zrelli S, Grattagliano-Bessieres B, Bonniere M, Delahaye S, Munnich A, Encharazavi F, Lyonnet S, Vekemans M, Attie-Bitach T, Etchevers HC. Matthew-Wood syndrome is caused by truncating mutations in the retinol-binding protein receptor gene *STRA6*. *Am J Hum Genet* 80: 1179–1187, 2007.
12. Goumy C, Gouas L, Marceau G, Coste K, Veronese L, Gallot D, Sapin V, Vago P, Tchirkov A. Retinoid pathway and congenital diaphragmatic hernia: hypothesis from the analysis of chromosomal abnormalities. *Fetal Diagn Ther* 28: 129–139, 2010.
13. Greer JJ, Babiuk RP, Thebaud B. Etiology of congenital diaphragmatic hernia: the retinoid hypothesis. *Pediatr Res* 53: 726–730, 2003.
14. Kantarci S, Al-Gazali L, Hill RS, Donnai D, Black GCM, Bieth E, Chassaing N, Lacombe D, Devriendt K, Teebi A, Loscertales M, Robson C, Liu T, MacLaughlin DT, Noonan KM, Russell MK, Walsh CA, Donahoe PK, Poher BR. Mutations in *LRP2*, which encodes the multiligand receptor megalin, cause Donnai-Barrow and facio-otico-acoustico-renal syndromes. *Nat Genet* 39: 957–959, 2007.
15. Keijzer R, Liu J, Deimling J, Tibboel D, Post M. Dual-hit hypothesis explains pulmonary hypoplasia in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia. *Am J Pathol* 156: 1299–1306, 2000.
16. Kern J, Schrage K, Koopmans GC, Joosten EA, McCaffery P, Mey J. Characterization of retinaldehyde dehydrogenase-2 induction in NG2-positive glia after spinal cord contusion injury. *Int J Dev Neurosci* 25: 7–16, 2007.
17. Klaassens M, de Klein A, Tibboel D. The etiology of congenital diaphragmatic hernia: still largely unknown? *Eur J Med Genet* 52: 281–286, 2009.
18. Kotecha S, Barbato A, Bush A, Claus F, Davenport M, Delacourt C, Deprest J, Eber E, Frenckner B, Greenough A, Nicholson AG, Anton-Pacheco JL, Midulla F. Congenital diaphragmatic hernia. *Eur Respir J* 39: 820–829, 2012.
19. Leinwand MJ, Tefft JD, Zhao J, Coleman C, Anderson KD, Warburton D. Nitrofen inhibition of pulmonary growth and development occurs in the early embryonic mouse. *J Pediatr Surg* 37: 1263–1268, 2002.
20. Logan JW, Rice HE, Goldberg RN, Cotten CM. Congenital diaphragmatic hernia: a systematic review and summary of best-evidence practice strategies. *J Perinatol* 27: 535–549, 2007.
21. Maden M. Retinoids in lung development and regeneration. *Curr Top Dev Biol* 61: 153–189, 2004.
22. Major D, Cadenas M, Fournier L, Leclerc S, Cloutier R. Retinol status of newborn infants with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int* 13: 547–549, 1998.
23. Marceau G, Gallot D, Borel V, Lemery D, Dastugue B, Dechelotte P, Sapin V. Molecular and metabolic retinoid pathways in human amniotic membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 346: 1207–1216, 2006.
24. Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P. Function of retinoic acid receptors during embryonic development. *Nucl Recept Signal* 7: e002, 2009.

25. Mathew LK, Sengupta S, Franzosa JA, Perry J, La Du J, Andreasen EA, Tanguay RL. Comparative expression profiling reveals an essential role for *raldh2* in epimorphic regeneration. *J Biol Chem* 284: 33642–33653, 2009.
26. Mendelsohn C, Löhnes D, Decimo D, Lufkin T, LeMeur M, Chambon P, Mark M. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development* 120: 2749–2771, 1994.
27. Mey J, Babiuk RP, Clugston R, Zhang W, Greer JJ. Retinal dehydrogenase-2 is inhibited by compounds that induce congenital diaphragmatic hernias in rodents. *Am J Pathol* 162: 673–679, 2003.
28. Montedonico S, Nakazawa N, Puri P. Congenital diaphragmatic hernia and retinoids: searching for an etiology. *Pediatr Surg Int* 24: 755–761, 2008.
29. Nakazawa N, Montedonico S, Takayasu H, Paradisi F, Puri P. Disturbance of retinol transportation causes nitrofen-induced hypoplastic lung. *J Pediatr Surg* 42: 345–349, 2007.
30. Niederreither K, Dolle P. Retinoic acid in development: towards an integrated view. *Nat Rev Genet* 9: 541–553, 2008.
31. Noble BR, Babiuk RP, Clugston RD, Underhill TM, Sun H, Kawaguchi R, Walfish PG, Blomhoff R, Gundersen TE, Greer JJ. Mechanisms of action of the congenital diaphragmatic hernia-inducing teratogen nitrofen. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293: L11079–L11087, 2007.
32. Pasutto F, Stüchi H, Hammersen G, Gillessen-Kaesbach G, Fitzpatrick DR, Nurnberg G, Brasch F, Schirmer-Zimmermann H, Tolmie JL, Chitayat D, Houge G, Fernandez-Martinez L, Keating S, Mortier G, Hennekam RCM, von der Wense A, Slavotinek A, Meinecke P, Bitoun P, Becker C, Nurnberg P, Reis A, Rauch A. Mutations in *STRA6* cause a broad spectrum of malformations including anophthalmia, congenital heart defects, diaphragmatic hernia, alveolar capillary dysplasia, lung hypoplasia, and mental retardation. *Am J Hum Genet* 80: 550–560, 2007.
33. Rajatapiti P, Keijzer R, Blommaert PE, Lamers WH, Krijger RR DE, Visser TJ, Tibboel D, Rottier R. Spatial and temporal expression of glucocorticoid, retinoid, and thyroid hormone receptors is not altered in lungs of congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Res* 60: 693–698, 2006.
34. Reijntjes S, Blentic A, Gale E, Maden M. The control of morphogen signalling: regulation of the synthesis and catabolism of retinoic acid in the developing embryo. *Dev Biol* 285: 224–237, 2005.
35. Ross AC. Retinoid production and catabolism: role of diet in regulating retinol esterification and retinoic Acid oxidation. *J Nutr* 133: 291S–296S, 2003.
36. Scott DA. Genetics of congenital diaphragmatic hernia. *Semin Pediatr Surg* 16: 88–93, 2007.
37. See AWM, Kaiser ME, White JC, Clagett-Dame M. A nutritional model of late embryonic vitamin A deficiency produces defects in organogenesis at a high penetrance and reveals new roles for the vitamin in skeletal development. *Dev Biol* 316: 171–190, 2008.
38. Sommer A, Vyas KS. A global clinical view on vitamin A and carotenoids. *Am J Clin Nutr* 96: 1204S–1206S, 2012.
39. Thatcher JE, Isoherranen N. The role of CYP26 enzymes in retinoic acid clearance. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 5: 875–886, 2009.
40. Thébaud B, Tibboel D, Rambaud C, Mercier JC, Bourbon JR, Dinh-Xuan AT, Archer SL. Vitamin A decreases the incidence and severity of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 277: L423–L429, 1999.
41. Veenma DCM, de Klein A, Tibboel D. Developmental and genetic aspects of congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Pulmonol* 47: 534–545, 2012.
42. Wat MJ, Veenma D, Hogue J, Holder AM, Yu Z, Wat JJ, Hanchard N, Shchelochkov OA, Fernandes CJ, Johnson A, Lally KP, Slavotinek A, Danhaive O, Schaible T, Cheung SW, Rauw KA, Tonk VS, Tibboel D, de Klein A, Scott DA. Genomic alterations that contribute to the development of isolated and non-isolated congenital diaphragmatic hernia. *J Med Genet* 48: 299–307, 2011.
43. West KJ. Vitamin A deficiency disorders in children and women. *Food Nutr Bull* 24: S78–S90, 2003.
44. Wilson JG, Roth CB, Warkany J. An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. *Am J Anat* 92: 189–217, 1953.
45. Yang W, Shaw GM, Carmichael SL, Rasmussen SA, Waller DK, Pober BR, Anderka M. Nutrient intakes in women and congenital diaphragmatic hernia in their offspring. *Birth Defects Res Clin Mol Teratol* 82: 131–138, 2008.
46. Zhang L, Luker KE, Shao JS, Levin MS, Suh E, Li E. Analysis of human cellular retinol-binding protein II promoter during enterocyte differentiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282: G1079–G1087, 2002.

PUBLICATION N°3

**Effects of tracheal occlusion with retinoic acid administration on normal lung development.**

Delabaere A, Marceau G, Coste K, Blanchon L, Déchelotte PJ, Blanc P, Sapin V, Gallot D.

**Prenat Diagn. 2017 Feb 2. doi: 10.1002/pd.5012.**

Les données de la littérature dont le travail effectué au sein de notre équipe par Gallot *et al.*<sup>7</sup> ont permis d'établir le rôle de l'AR dans le développement pulmonaire et son effet possible sur la maturation pulmonaire dans un contexte de HDC. Une administration maternelle d'AR permettait d'induire l'expression de différents gènes impliqués dans la voie de signalisation des rétinoïdes<sup>225</sup>, la formation d'alvéoles<sup>226</sup> et la production des protéines du surfactant<sup>7</sup>. Mais l'AR ne permettait pas de corriger l'hypoplasie pulmonaire pour laquelle il est actuellement proposé de réaliser une OT per fetoscopie dans les formes les plus sévères de HDC en pratique clinique.

Au vu de l'ensemble de ces données, notre équipe a voulu étudier la possibilité d'administrer de l'AR directement au fœtus, au plus près du tissu cible, le poumon, en complément de l'OT, donc en administration intra-trachéale. Afin de pouvoir délivrer de l'AR dans la trachée fœtale, dans le même temps opératoire que l'OT, il était nécessaire de trouver un véhicule pour cette molécule lipophile à instiller dans un milieu aqueux. En utilisant un modèle de fœtus lapin à poumon sain, nous avons étudié deux véhicules possibles, les liposomes et le Miglyol®. Les liposomes sont couramment utilisés pour l'administration, notamment intraveineuse, de l'AR. Le Miglyol®, huile neutre, est utilisé en ophtalmologie pour l'application de l'AR du fait de ses capacités de transport de molécules hydrophobes dans un milieu aqueux. Nous avons donc comparé les effets de l'injection intratrachéale, en complément d'une OT, de ces deux molécules, vides ou couplées à de l'AR, et de sérum physiologique. Nous avons pu confirmer que l'OT, quelque soit la molécule injectée dans la trachée, permettait d'augmenter le volume pulmonaire et de modifier l'anatomie des voies aériennes en augmentant le CRA. Il était observé qu'une injection intratrachéale de sérum physiologique augmentait l'activité apoptotique. La production de SP-B, protéine du surfactant, évaluée par PCR, était diminuée lorsque du sérum physiologique ou des liposomes

seuls étaient administrés dans la trachée. Ce phénomène n'était pas retrouvé avec le Miglyol® ou avec l'adjonction d'AR. Si la production de surfactant était évaluée par compte des cellules positives à un marquage SP-B en immunohistochimie, il était retrouvé une diminution en cas d'administration de sérum physiologique et une augmentation en cas d'adjonction d'AR. Cet effet semblait plus marqué lorsque l'AR était couplé aux liposomes.

En conclusion, ces premiers résultats pouvaient nous laisser penser que l'AR en injection intra-trachéale, en complément de l'OT, pouvait avoir un effet sur la maturation des pneumocytes et sur la production de surfactant, et que le véhicule le plus intéressant était les liposomes.

## ORIGINAL ARTICLE

## Effects of tracheal occlusion with retinoic acid administration on normal lung development

Amélie Delabaere<sup>1,2\*</sup>, Geoffroy Marceau<sup>1,3</sup>, Karen Coste<sup>1,4</sup>, Loïc Blanchon<sup>1</sup>, Pierre-Jean Déchelotte<sup>5</sup>, Pierre Blanc<sup>1</sup>, Vincent Sapin<sup>1,3</sup> and Denis Gallot<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>EA7281 – Retinoids, Reproduction Developmental Diseases, Auvergne University, Clermont-Ferrand, France

<sup>2</sup>Fetal Maternal Medicine Unit, Obstetrics and Gynecology Department, Clermont-Ferrand University Hospital, Clermont-Ferrand, France

<sup>3</sup>Biochemistry and Molecular Biology Department, Clermont-Ferrand University Hospital, Clermont-Ferrand, France

<sup>4</sup>Department of Paediatrics, Clermont-Ferrand University Hospital, Clermont-Ferrand, France

<sup>5</sup>Department of Pathology, Clermont-Ferrand University Hospital, Clermont-Ferrand, France

\*Correspondence to: Amélie Delabaere. E-mail: adelabaere@chuc Clermont-Ferrand.fr

### ABSTRACT

**Introduction** Tracheal occlusion (TO) is an investigational therapy for severe congenital diaphragmatic hernia that decreases pulmonary hypoplasia, but sustained TO also induces deficient surfactant synthesis. Intramuscular maternal administration of retinoic acid (RA) in a surgical rabbit model of congenital diaphragmatic hernia showed a beneficial effect on lung maturation. We evaluated the potential of RA delivery into the trachea and studied the combined effects of TO and RA on normal lung development.

**Methods** Experiments were performed on normal rabbit fetuses. Liposomes and capric triglyceride (Miglyol®), alone and with RA, were administered in the trachea just before TO (d26). Lung morphology and surfactant production were studied at term (d30).

**Results** Tracheal occlusion increased lung weight and enhanced alveolar development but increased apoptotic activity and decreased surfactant expression. Tracheal injection of RA improved surfactant production to levels of normal controls.

**Conclusion** We established the potential of liposome and Miglyol as RA vehicle for delivering this bioactive molecule in the fetal airways. Tracheal RA injection seems to oppose the effects of TO in fetuses with normal lungs. © 2017 John Wiley & Sons, Ltd.

Funding sources: Fondation Avenir for the grant ETO-593

Conflicts of interest: None declared

### INTRODUCTION

Congenital diaphragmatic hernia (CDH) is a rare developmental anomaly (1/2500 newborns).<sup>1</sup> Severe respiratory distress in CDH patients is caused by abdominal viscera protrusion through the diaphragmatic defect into the chest combined with pulmonary hypoplasia and pulmonary hypertension. Pulmonary hypoplasia is associated with a decrease in number of bronchial branches and alveoli, thickening of alveolar walls, and reduction in alveolar air spaces and gas-exchange surface area. Despite progress in neonatal care, CDH is still lethal in up to 30% of cases.<sup>2,3</sup> Prenatal intervention by fetoscopic tracheal occlusion (TO) stimulates lung growth, improves gas exchange, and can decrease neonatal complications and mortality in isolated CDH cases with severe pulmonary hypoplasia.<sup>4–7</sup> The survival rate in severe left CDH was only 49.1% after fetal TO, compared with 24.1% in fetuses without TO.<sup>7</sup>

In order to improve pulmonary development and to decrease respiratory insufficiency, several preclinical studies have investigated drug treatments for CDH.<sup>8</sup> Retinoic acid (RA) administration is one strategy proposed among others by our research group,<sup>9</sup> as the retinoid signaling pathway could be disrupted in CDH.<sup>10–13</sup> RA, an active metabolite of vitamin A, is an important regulator of proliferation, differentiation, and maintenance of lung epithelial cells.<sup>14</sup> The importance of vitamin A in vertebrate lung development was first demonstrated by observations on fetuses exposed to a maternal vitamin A-deficient diet presenting either pulmonary hypoplasia or CDH.<sup>15,16</sup> In clinical cases of non-isolated CDH, chromosomal rearrangements containing RA pathway-related genes have been reported,<sup>17,18</sup> such as Matthew-Wood syndrome, in which STRA6, a gene coding the retinol binding protein receptor, has undergone mutation.<sup>19,20</sup> Moreover, it has been shown that CDH is strongly associated with low

retinol and retinol binding protein levels in newborns, independently of maternal retinol status.<sup>21,22</sup> In the nitrofen-induced CDH mouse model, the early prenatal administration of vitamin A decreases the incidence of CDH, increases lung growth, and restores lung maturation.<sup>23</sup> Nitrofen interacts with the retinoid signaling pathway by inhibiting retinaldehyde dehydrogenase-2.<sup>24,25</sup>

The rabbit surgical model of CDH has the benefit of not disrupting the retinoid signaling pathway and can thus serve to investigate pulmonary effects of RA.<sup>9</sup> Studies using the rabbit surgical model of CDH have demonstrated that systemic maternal administration of RA upregulates pulmonary expression of several genes involved in the retinoid signaling pathway<sup>26</sup> and stimulates alveolarization<sup>27</sup> and surfactant protein expression.<sup>9</sup>

Here, we used the rabbit model to study the combined effects of TO and RA administration on normal lung development. Potential advantages of tracheal RA injection over maternal administration include a limited systemic diffusion of RA in pregnant rabbits, a potentiation of pulmonary effects, and the ability to inject the RA just before TO. The main objective of this study was to evaluate the effects of potential RA vehicles. The secondary objective was to study the effects of RA administration combined with TO on normal fetal lungs.

## METHODS

### Animals

Tracheal occlusion and tracheal administration of molecules were performed in accordance with current guidelines on animal well-being. The experiment was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Clermont-Ferrand Faculty of Medicine (approval number: CE18-10). Pregnant New Zealand White rabbits were housed in separate cages at normal room temperature and daylight with free access to food and water before and after surgery.

### Preparation of solution for tracheal injection

To study the pulmonary effects of a local injection of potential RA vehicles, we injected liposomes and Miglyol<sup>®</sup>, alone and with RA, at the time of a TO procedure.

A powder of empty liposomes (Antigenics Inc.<sup>®</sup>, Lexington, MA) was diluted with NaCl 0.9% according to the manufacturer's instructions. Capric triglyceride or Miglyol solution (Sasol Olefins & Surfactants, Hamburg, Germany) is a neutral oil with very good solubility characteristics that is used as a vehicle for hydrophobic molecules in hydrophilic media. All-trans retinoic acid (ATRA) liposomes were prepared by diluting Atragen<sup>®</sup> powder (Antigenics Inc.) with NaCl 0.9% to obtain an ATRA concentration of  $10^{-3}$  mol/L (i.e. the most commonly used concentration for therapeutic use). The Miglyol ATRA was prepared at a concentration of  $10^{-3}$  mol/L.

### Surgical procedure

In each time-dated pregnant rabbit, four fetuses were subjected to TO and tracheal injection at a gestational age of 26 days, which is the end of the canalicular phase of fetal rabbit

lung development. Products administered into the trachea were saline solution as control, liposomes, Miglyol, ATRA liposomes, or ATRA Miglyol. Rabbits were sedated with ketamine 50 mg/kg (Imalgene<sup>®</sup>, Laboratoire Rhône Mérieux<sup>®</sup>, Lyon, France) and xylazine 5 mg/kg (Rompun<sup>®</sup>, Bayer HealthCare<sup>®</sup>, Leverkusen, Germany) intramuscularly. All animals received medroxyprogesterone 7 mg (Depo-Prodasone<sup>®</sup>, Pfizer Holding France, Paris, France) and penicillin G 300 000 IU (Peni G<sup>®</sup>, Glaxo Smith Kline, Marly-le-Roi, France) intramuscularly for tocolysis and antibiotic prophylaxis. The rabbits spontaneously breathed O<sub>2</sub>-enriched air (2 L/min). General anesthesia was maintained with an intravenous injection of ketamine 25 mg/kg every 15 to 30 min. All surgical procedures were carried out in aseptic conditions. The gravid bicornuate uterus was exposed through a midline abdominal incision. A 1.5-cm transversal linear incision of all layers of the uterine wall was made on the antimesometrial side of the selected gestational sacs. Four 6-0 polypropylene stitches (Prolene<sup>®</sup>, Ethicon, France) were placed on the border of the uterine incision to prevent membrane dislodgement. The fetal head and neck were exposed by gentle manipulation. An anterior transverse incision in the neck was performed. The fetal trachea was identified, dissected, and separated from the esophagus. The injection of 300  $\mu$ L of solution was performed into the trachea with a thin (31 Gauge) needle inserted into the tracheal lumen. After injection, an immediate ligature of the trachea caudal of the injection site was performed with a 3-0 polyglactin suture (Vicryl<sup>®</sup>, Ethicon, France). The skin was closed using an interrupted 6-0 polypropylene suture. The fetus was put back inside its gestational sac. The uterine wall was closed in one layer, using a running 6-0 polypropylene suture. The maternal laparotomy was closed in three layers with a 3-0 polyglactin suture.

### Cesarean section and tissue harvesting

At day 30 (alveolar phase), fetuses were delivered by cesarean section immediately after maternal sacrifice with an intravenous bolus of pentobarbital 5 to 10 mL (Doletal<sup>®</sup>, Vétoquinol SA, Lure, France). Sacrifice was realized after premedication with ketamine 50 mg/kg (Imalgene, Laboratoire Rhône Mérieux) and xylazine 5 mg/kg (Rompun, Bayer HealthCare) intramuscularly. Operated and immediate adjacent non-operated fetuses were assigned to six groups: non-operated fetuses (NO group), fetuses undergoing tracheal injection of saline solution (Saline group), liposomes (Lip group), Miglyol (Mig group), and liposomes loaded with ATRA (ATRA-Lip group) or Miglyol loaded with ATRA (ATRA-Mig group) as well as TO. Any stillborn fetuses were recorded as non-survivors and excluded from further analysis. Each fetus was weighed. The thorax was opened through an anterior midline incision, and lungs were extracted and weighed. Lung-to-body-weight ratio (LBWR) was calculated. The right and left lungs were separated. The left lung was used for histological analyses. Immersion and inflation with 4% paraformaldehyde under 25-cm H<sub>2</sub>O pressure were performed for 24 h.<sup>28</sup> Before embedding in paraffin, the left lung was divided into anterior and posterior parts. The right lung was snap-

frozen (in liquid nitrogen) and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for molecular biology analysis.

#### Lung morphometry (airways)

Airway morphometry measurements were performed on 5- $\mu\text{m}$  sections of paraffin-embedded hematoxylin and eosin-stained lung (anterior half). Morphometric evaluation was performed using the radial alveolar count (RAC) at  $\times 40$  magnification, according to the method of Emery and Mithal.<sup>29</sup> A line was dropped from the center of each terminal respiratory bronchiole to the nearest connective tissue septum at right angle to the epithelium. The count of number of alveoli cut by this line was performed on two or three histological sections to obtain at least ten counts per fetus. The assessor was blinded to the fetal treatment groups.

#### *In situ* cell death detection assay

An indirect terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling assay (*in situ* cell death detection POD Kit<sup>®</sup>, Roche Diagnostics<sup>®</sup>, Meylan, France) was used to evaluate lung cell apoptosis. Sections of the posterior half of the fetal left lungs were pretreated with 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of proteinase K (Roche Diagnostics) in phosphate buffered saline (PBS) for 15 min at  $37^{\circ}\text{C}$  and washed in PBS. Specimens were then exposed to the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling reaction mixture containing the enzyme solution and the label solution for 1 h at  $37^{\circ}\text{C}$  in a moist chamber. Slides were washed in PBS. Hoechst 33258 (1:200; 10 min) was used to visualize nuclei. Controls consisted of omitting the enzyme solution (negative control) or adding DNase I (positive control). Pre-tests established the absence of false positive cells count (like reticulocytes) in the counts. The two assessors (G. M. and A. D.) were blinded to the fetal treatment groups. The number of positive cells was determined by counting the number of positively stained cells per field in 20 random non-overlapping fields, using an Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss<sup>®</sup>), at  $\times 400$ . This count was reported as a percentage of total number of cells based on Hoechst-stained nuclei.

#### RNA extraction and polymerase chain reaction of surfactant protein B and caveolin genes

Total RNA was extracted from the right lung using the RNeasyMini Kit (Qiagen<sup>®</sup>, Venlo, the Netherlands). RNA quality was assessed by RNA-to-protein ratio (260 nm/280 nm) and by gel electrophoresis (1.6% agarose) to observe the presence of intact 28S and 18S RNA bands. cDNA was generated using the Superscript First-strand Synthesis System for real-time PCR (Life Technologies, Saint-Aubin, France). Specific oligonucleotide primers were originally generated using the web program Primer3 (<https://www.broadinstitute.org/scientific-community/software/criteria=Primer%20Design>) on the basis of the published sequences of each specific gene [surfactant protein B (SP-B) and Caveolin 1] and designed to avoid genomic DNA amplification (Table 1). Transcripts were independently quantified in three different experiments and normalized by the geometric mean of three housekeeping genes (ribosomal house-keeping gene,

Table 1 Oligonucleotides used for PCR amplification of surfactant protein B, Caveolin 1, RPLPO, GAPDH, and  $\beta$ -actin

Gene	Sequence (5'-3')
SP-B	Forward: ACTGTCTACAGGAAGTCTG Reverse: GAAGTAGACGTCACAGCACG
Caveolin 1	Forward: GTGAACGAGAAGCAAGTGTA Reverse: TATTTCGTCACAGTGAAGGT
RPLPO	Forward: GACCTGGAAGTCCAAGTCTG Reverse: ACTCAGTCTCCACAGACAAA
GAPDH	Forward: AGACACGATGGTGAAGGTGC Reverse: TGCCGTGGGTGGAATCATAAC
$\beta$ -actin	Forward: ATGTTTGTATGGCGCTGAA Reverse: CGAAGTGGTCTGGATGA

Specific primers for surfactant protein B (SP-B), Caveolin 1, and RPLPO (ribosomal house-keeping gene), GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), and  $\beta$ -actin were designed.

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and  $\beta$ -actin). All the steps followed the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-time PCR Experiments guidelines.<sup>30</sup> Primers used are detailed in Table 1. Real-time PCR was performed using Lightcycler SYBR Green technology (Roche Diagnostics), the primer pairs and generated cDNA described previously. The ratio between SP-B mRNA, which is synthesized by type-II pneumocytes, and Caveolin 1 mRNA, which is more specific to type-I pneumocytes,<sup>31</sup> was calculated.

#### Immunohistochemistry for surfactant protein B

Anterior halves of the paraffin-embedded lungs (5- $\mu\text{m}$  sections) were deparaffinized in toluene and hydrated by ethanol. Tissue preparations were incubated for 10 min with proteinase K and then rinsed. In order to prevent non-specific binding of primary antibodies, sections were preincubated for 30 min with 10% normal bovine serum (dilution 1:25; X0907 DakoCytomation<sup>®</sup>, Glostrup, Denmark). The goat polyclonal anti-SP-B antibody (sc-7704; Santa Cruz Biotechnology<sup>®</sup>, Santa Cruz, CA) was applied at room temperature (1:200, overnight). After rinsing with PBS, the slides were incubated with a mouse peroxidase-conjugated anti-goat antibody (ab6985; Abcam<sup>®</sup>, Cambridge, UK) at room temperature (1:1000, 60 min) and revealed with the TSA Plus<sup>®</sup> Fluorescein System kit (PerkinElmer<sup>®</sup>, Waltham, MA). Nuclei were stained by Hoechst 33258 (1:200; 10 min). Negative controls were performed without primary antibody incubation.<sup>32</sup> Slides were photographed under an Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss) at  $\times 100$  and  $\times 400$ . Morphometric analysis was limited to the air-exchanging parenchyma excluding bronchi and bronchioles to observe only alveolar epithelial type-II cells and not bronchiolar club cells. The number of positive cells was determined by counting the number of positively stained cells per field in ten random non-overlapping fields, at  $\times 400$ . This count was reported as a percentage of the total number of cells based on Hoechst-stained nuclei. The assessor was blinded to the fetal treatment groups.



#### Determination of tissue concentration of retinoic acid

Concentration of RA was determined by liquid chromatography–mass spectrometry (Vitas® – Analytical Services, Oslo, Norway) from samples of initial solutions, liposomes and Miglyol loaded with RA, and right-lung tissues stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### Statistical analysis

All data analysis was performed with SPSS software (version 22, SPSS Inc., Chicago, IL). Continuous variables were compared using a Kruskal–Wallis test for multiple comparisons and a Mann–Whitney test for pairwise comparisons. Values were expressed as median and interquartile range (IQR). Differences were considered significant when  $p < 0.05$ .

## RESULTS

#### Surgery and gross anatomy

Fetal mortality was not different between the NO group [44.4% ( $n = 4/9$ )] and the operated groups [54.5% ( $n = 24/44$ )], without statistical difference depending on the nature of the

intratracheal solution injected. Fetal mortality was 62.5% ( $n = 5/8$ ) in the Saline group, 60.0% ( $n = 6/10$ ) in the Lip group, 50.0% ( $n = 4/8$ ) in the Mig group, 60.0% ( $n = 6/10$ ) in the ATRA-Lip group, and 37.5% ( $n = 3/8$ ) in the ATRA-Mig group.

The LBWR was significantly higher in the Saline group compared with the NO group (0.041; IQR 0.037–0.041 vs 0.021; IQR 0.005–0.028,  $p = 0.036$ ). This increase was observed for all TO groups without significant difference between them (Lip group: 0.038; IQR 0.034–0.038; Mig group: 0.051; IQR 0.050–0.051; ATRA-Lip group: 0.048; IQR 0.036–0.051; and ATRA-Mig group: 0.030; IQR 0.029–0.030) (Figure 1A).

#### Airway morphometry

Morphometric analysis of fetal lungs by RAC revealed a significant improvement of alveolar development in the Saline group compared with the NO group (3.67; IQR 3.64–3.67 vs 2.67; IQR 2.53–3.15,  $p = 0.036$ ). This development was observed for all TO groups without significant difference between groups (Lip group: 3.81; IQR 3.31–4.75; Mig group: 6.25; IQR 6.00–6.25; ATRA-Lip group: 4.03; IQR 3.46–4.68; and ATRA-Mig group:

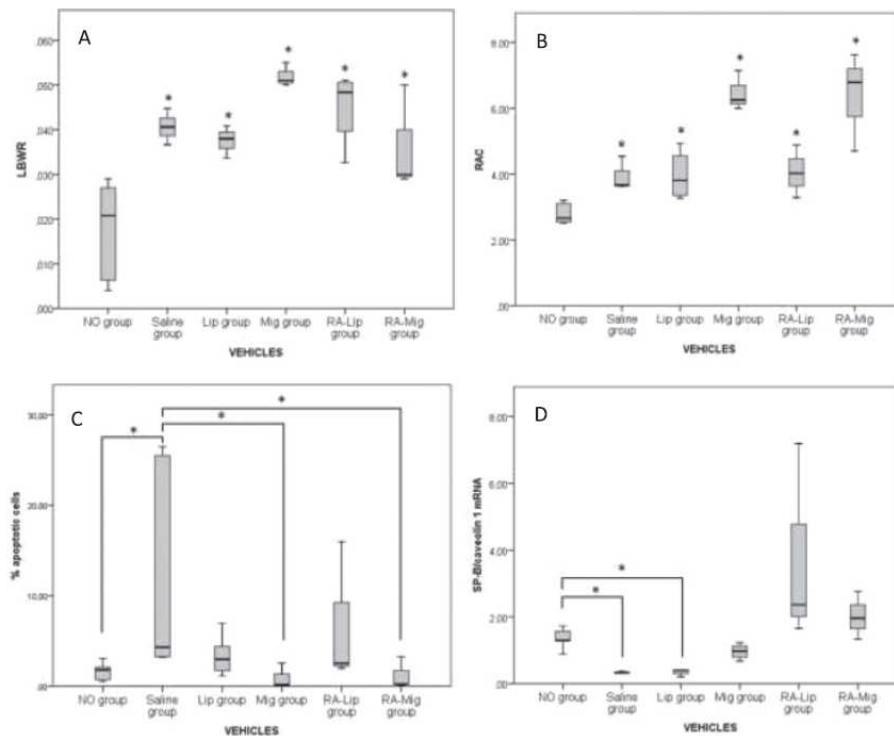


Figure 1 Rabbit lung morphometry and apoptotic cell count and surfactant mRNA expression in non-operated animals and different treatment groups with tracheal occlusion. (A) Lung-to-body-weight ratio (LBWR) (\* indicates  $p < 0.05$  vs NO group). (B) Radial alveolar count (RAC) (\* indicates  $p < 0.05$  vs NO group). (C) Apoptotic cell count by *in situ* cell death detection assay (TUNEL) (\* indicates  $p < 0.05$  vs Saline group). (D) Surfactant protein B (SP-B) reported to caveolin mRNA expression (\* indicates  $p < 0.05$  vs NO group). NO, non-operated

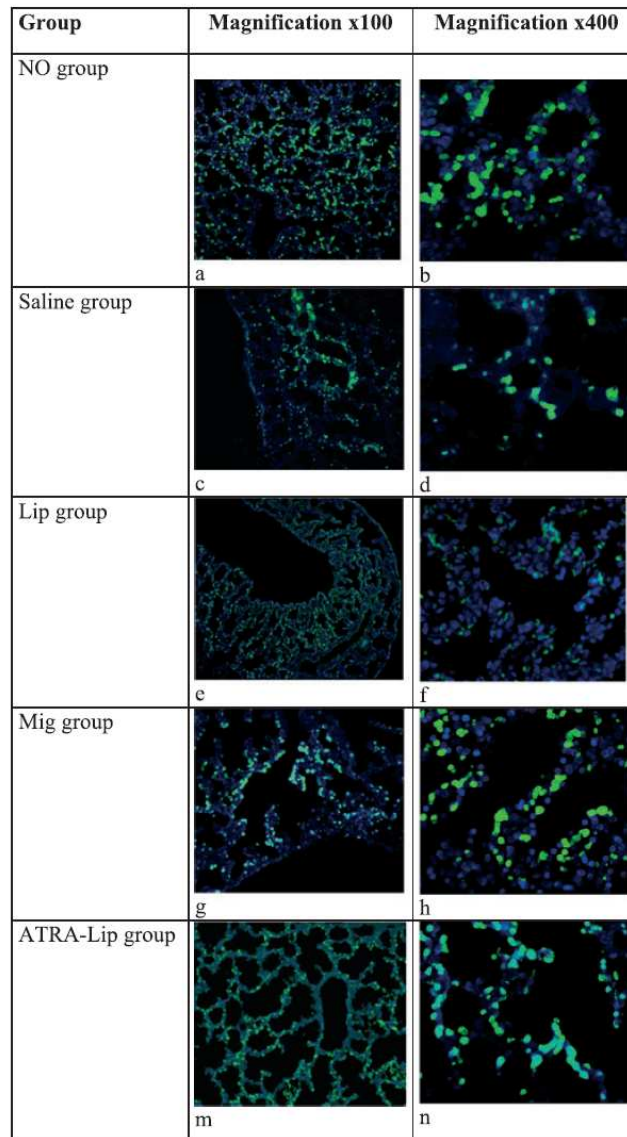


Figure 2 Surfactant protein B (SP-B) immunohistochemistry. (A) The protein SP-B was marked in green and the nuclei in blue (original magnification  $\times 100$  and  $\times 400$ ). (B) Percentage of SP-B positive cells (\* indicates  $p < 0.05$  vs NO group;  $\alpha$  indicates  $p < 0.05$ , Lip vs ATRA-Lip groups). Immunohistochemical expression of SP-B decreased in fetuses treated by TO with intratracheal injection of saline solution or empty vehicles, compared with NO fetuses. NO group ( $n = 5$ ): non-operated fetuses; Saline group ( $n = 3$ ): fetuses treated by tracheal occlusion (TO) and tracheal saline injection; Lip group ( $n = 4$ ): fetuses treated by TO and tracheal liposomes injection; Mig group ( $n = 4$ ): fetuses treated by TO and tracheal Miglyol<sup>®</sup> injection; ATRA-Lip group ( $n = 4$ ): fetuses treated by TO and tracheal injection of liposomes loaded with all-trans retinoic acid (ATRA); ATRA-Mig group ( $n = 5$ ): fetuses treated by TO and tracheal injection of Miglyol<sup>®</sup> loaded with ATRA

6.79; IQR 4.71–6.79). RAC tended to be higher in the Mig group compared with the Lip-group ( $p=0.057$ ), but it was not significantly different between the ATRA-Mig and ATRA-Lip groups ( $p=0.114$ ) (Figure 1B).

#### *In situ* cell death detection assay

Apoptotic activity was significantly increased in the Saline group compared with the NO group (4.32; IQR 3.27–25.75 vs 1.81; IQR 0.75–2.19%,  $p=0.036$ ). Apoptosis was significantly decreased in the Mig group (vs 0.18; IQR 0.17–0.18±1.36%,  $p=0.024$ ) and ATRA-Mig group (vs 0.24; IQR 0.14–0.24%,  $p=0.048$ ) in comparison with the Saline group. No significant difference was found between Lip and Mig groups and ATRA-Lip and ATRA-Mig groups (Lip group: 3.00; IQR 1.59–5.05; ATRA-Lip group: 2.54; IQR 1.99–2.54) ( $p=0.167$  and  $p=0.400$ , respectively) (Figure 1C).

#### Pulmonary gene expression levels of surfactant protein B and Caveolin 1

The SP-B/Caveolin 1 mRNA ratio was significantly decreased in the Saline groups compared with the NO group (0.40; IQR 0.21–0.40 vs 1.29; IQR 1.09–1.65,  $p=0.036$ ). No significant difference was observed among TO groups in comparison with the Saline group (Lip groups: 0.40; IQR 0.21–0.40; Mig group: 0.90; IQR 0.74–1.18; ATRA-Lip group: 2.36; IQR 1.65–2.36; ATRA-Mig group: 1.96; IQR 1.33–1.96) (Figure 1D).

#### Immunohistochemistry for surfactant protein B

The SP-B-positive cell count was significantly decreased in the Saline group in comparison with the NO group (0.22; IQR 0.21–0.22 vs 0.49; IQR 0.42–0.60,  $p=0.036$ ). In comparison with the Saline group, no difference was observed among fetuses with TO and without ATRA (Lip group: 0.26; IQR 0.22–0.31 and Mig group: 0.21; IQR 0.13–0.40,  $p=0.032$ ). When ATRA was injected, the SP-B-positive cell count was higher compared with the Saline group ( $p=0.034$ ). These results were not significant when the vehicle type was different (ATRA-Lip group: 0.51; IQR 0.46–0.53,  $p=0.057$  and ATRA-Mig group: 0.44; IQR 0.42–0.44,  $p=0.1$ ). In comparison with vehicles alone, SP-B expression was increased when ATRA was injected with liposomes (Lip group vs ATRA-Lip group,  $p=0.029$ ) (Figure 2).

#### Tissue retinoic acid concentration

The RA concentrations confirmed that ATRA was present at high concentrations in loaded solutions (2068.0 ng/g for Miglyol with ATRA vs 11.6 ng/g for Miglyol alone, 7160.0 ng/g for liposomes with ATRA vs 0.1 ng/g for liposomes alone). No RA was detectable above background levels in any of the treatment groups (vehicle alone or vehicle with ATRA) 4 days after TO (Table 2).

#### DISCUSSION

Our results confirmed earlier observed effects of TO on pulmonary morphometry, showing significantly higher LBWR and RAC.<sup>33,34</sup> We also confirmed a reduction of type-II pneumocytes, as illustrated by a lower SP-B/Caveolin 1 mRNA expression ratio and a decrease of SP-B positive cells by immunohistochemistry. Tracheal administration of RA

Table 2 Retinoic acid concentrations in injected solutions and fetal pulmonary tissues

Samples	Concentration (ng/g)
Solutions	
Miglyol <sup>®</sup> solution	11.6
Miglyol <sup>®</sup> loaded RA solution	2068
Liposomes solution	0.1
Liposomes loaded RA solution	7160
Fetal pulmonary tissues	
NO group lung	0.4
Lip group lung	0.7
Mig group lung	0.3
ATRA-Lip group lung	0.4
ATRA-Mig group lung	0.5

Miglyol<sup>®</sup> solution: solution of Miglyol<sup>®</sup> without RA; Miglyol<sup>®</sup>-loaded RA solution: solution of Miglyol<sup>®</sup> with ATRA; liposomes solution: solution of liposomes without RA; liposome-loaded RA solution: solution of liposomes with ATRA; NO group: non-operated fetuses; lip group: fetuses treated by TO and tracheal injection of liposomes; Mig group: fetuses treated by TO and tracheal injection of Miglyol<sup>®</sup>; ATRA-Lip group: fetuses treated by TO and tracheal injection of liposomes with ATRA; ATRA-Mig group: fetuses treated by TO and tracheal injection of Miglyol<sup>®</sup> with ATRA. ATRA, all-trans retinoic acid; NO, non-operated; RA, retinoic acid; TO, tracheal occlusion.

appeared to normalize SP-B protein expression, particularly when it was delivered by liposomes.

Previous studies in lambs with hypoplastic lungs due to CDH had demonstrated that *in utero* reversal of TO restored surfactant production and improved postnatal pulmonary function.<sup>35,36</sup> In clinical practice, TO is typically removed at 34 weeks, either by fetal tracheoscopy or by puncturing the balloon through the maternal abdomen.<sup>37–39</sup> The mean gestational age at delivery after TO was 34 to 35 weeks.<sup>38,39</sup> When labor occurs before *in utero* TO removal, the balloon can be removed during delivery by *ex utero* intrapartum treatment or immediately after birth by tracheoscopy or percutaneous puncture. Surfactant production is not restored in these patients presenting preterm delivery.

Davey *et al.*<sup>40</sup> had demonstrated that a glucocorticoids maternal administration 48 h before delivery restored surfactant production. This strategy requires birth anticipation. Therefore, we are interested by the therapeutic administration during TO procedure, which may lead a sustainable surfactant restoration.

Coste *et al.*<sup>12</sup> confirmed that the RA signaling pathway is a key player in diaphragm and lung development and in CDH pathogenesis. RA is a pharmacological agent that could be used to attenuate developmental lung hypoplasia. Tracheal ATRA injection could correct the side effects of TO on surfactant production, even in preterm neonates.

We chose to test the potential of RA treatment in fetal rabbits. Lung development of the fetal rabbit mimics that of the human lung. The long pseudoglandular phase allows the creation of a diaphragmatic defect in sufficiently large fetuses. The rabbit surgical model offers several key advantages: widely

available animals with large litter sizes and no primary disruption of the retinoid signaling pathway, contrary to the toxic nitrofen-induced rodent model of CDH.<sup>9</sup> We previously studied pulmonary effects of intramuscular administration of RA into fetuses with and without CDH.<sup>9</sup> We found no impact on gross anatomic, morphologic, cell proliferation, apoptosis, or proliferation indices in hypoplastic CDH lungs. Surfactant protein mRNA expression was restored to normal levels in the hypoplastic CDH lungs after maternal RA administration.<sup>9</sup>

Prenatal treatment for severe forms of CDH by fetoscopic TO<sup>4,37,41</sup> could be the best time to administer RA directly into the trachea in order to increase its concentration directly in contact with the airway epithelium. The major obstacle to this strategy is the hydrophobicity of RA, which thus requires the use of lipophilic vehicles. The present study examined two potential vehicles of RA, that is, liposomes and Miglyol, and their effects after tracheal administration in addition to TO. Furthermore, we also studied the pulmonary effects of intratracheal RA vectored by liposomes or Miglyol. To improve the identification of RA effects on pulmonary cell differentiation, we performed the TO earlier in pulmonary development than what is typically done in the CDH model (d26 vs d28). We did so to increase the TO effects, especially on surfactant production.<sup>42</sup> In most studies performing TO in normal rabbit lungs, TO was even performed slightly earlier (d24–d25).<sup>33,43,44</sup>

The relatively high fetal mortality over the course of our experiments might be explained by pulmonary overpressure due to TO with intratracheal solution injection on normal lungs, early gestational age at TO, and the large number of fetuses (four) operated.

As in many other studies conducted in CDH animal models undergoing TO, the results here confirmed an increase of lung weight,<sup>34</sup> pulmonary maturity measured by RAC,<sup>33</sup> cell apoptosis,<sup>42</sup> and abnormal pneumocyte differentiation,<sup>45</sup> the major side effect of TO. The normalization of SP-B protein

expression in normal lung was achieved by tracheal administration of liposomes loaded with RA (vs TO alone). This effect was not observed in ATRA-Mig group. Therefore, it seems that liposomes are the most appropriate vehicle to deliver RA into the trachea, despite the fact that tracheal injection of ATRA solubilized with Miglyol seemed to have slightly better results for RAC and apoptotic activity.

Absence of RA detected in lung tissue at 4 days after injection was due to the short half-life of RA *in vivo*.<sup>46</sup> It also underlines that the duration of RA exposure is relatively short after a single bolus injection. Indeed, even if the animal model and the administration were different, a previous study reported that after a single bolus administration, RA was not detectable in the lung tissue after 24 h.<sup>46</sup>

In conclusion, the observations reported here indicate that the most appropriate RA vehicle for intratracheal injection seemed liposomes, with potential effect on surfactant production. This study was conducted in rabbit fetuses with normally developing lungs, so the next step scheduled is to repeat the protocol in CDH animals to confirm the effects observed here on surfactant production.

#### WHAT'S ALREADY KNOWN ABOUT THIS TOPIC?

- Tracheal occlusion is a therapy for congenital diaphragmatic hernia that decreases pulmonary hypoplasia, but it also induces deficient surfactant synthesis. Previous studies have demonstrated that maternal administration of retinoic acid stimulated surfactant expression in the fetal rabbit congenital diaphragmatic hernia model.

#### WHAT DOES THIS STUDY ADD?

- Intratracheal injection of retinoic acid increases surfactant expression following tracheal occlusion in normal fetal lungs.

#### REFERENCES

- Gallot D, Coste K, Francannet C, *et al*. Antenatal detection and impact on outcome of congenital diaphragmatic hernia: a 12-year experience in Auvergne, France. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006;125(2):202–5.
- Geggel RL, Murphy JD, Langleben D, *et al*. Congenital diaphragmatic hernia: arterial structural changes and persistent pulmonary hypertension after surgical repair. *J Pediatr* 1985;107(3):457–64.
- Shehata SM, Sharma HS, van der Staak FH, *et al*. Remodeling of pulmonary arteries in human congenital diaphragmatic hernia with or without extracorporeal membrane oxygenation. *J Pediatr Surg* 2000;35(2):208–15.
- Jani JC, Nicolaidis KH, Gratacos E, *et al*. Severe diaphragmatic hernia treated by fetal endoscopic tracheal occlusion. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009;34(3):304–10.
- Dekoninck P, Gratacos E, Van Mieghem T, *et al*. Results of fetal endoscopic tracheal occlusion for congenital diaphragmatic hernia and the set up of the randomized controlled TOTAL trial. *Early Hum Dev* 2011;87(9):619–24.
- Al-Maary J, Eastwood MP, Russo FM, *et al*. Fetal tracheal occlusion for severe pulmonary hypoplasia in isolated congenital diaphragmatic hernia: a systematic review and meta-analysis of survival. *Ann Surg* 2016;264(6):929–933.
- Deprest J, Brady P, Nicolaidis K, *et al*. Prenatal management of the fetus with isolated congenital diaphragmatic hernia in the era of the TOTAL trial. *Semin Fetal Neonatal Med* 2014;19(6):338–48.
- Eastwood MP, Russo FM, Toelen J, *et al*. Medical interventions to reverse pulmonary hypoplasia in the animal model of congenital diaphragmatic hernia: a systematic review. *Pediatr Pulmonol* 2015;50(8):820–38.
- Gallot D, Coste K, Jani J, *et al*. Effects of maternal retinoic acid administration in a congenital diaphragmatic hernia rabbit model. *Pediatr Pulmonol* 2008;43(6):594–603.
- Gallot D, Marceau G, Coste K, *et al*. Congenital diaphragmatic hernia: a retinoid-signaling pathway disruption during lung development? *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005;73(8):523–31.
- Greer JJ, Babiuk RP, Thebaud B. Etiology of congenital diaphragmatic hernia: the retinoid hypothesis. *Pediatr Res* 2003;53(5):726–30.
- Coste K, Beurskens LW, Blanc P, *et al*. Metabolic disturbances of the vitamin A pathway in human diaphragmatic hernia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015;308(2):L147–57.
- Kutasy B, Friedmacher F, Pes L, *et al*. Antenatal retinoic acid administration increases trophoblastic retinol-binding protein

- dependent retinol transport in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Res* 2016;79(4):614–20.
14. Chytil F. Retinoids in lung development. *Faseb J* 1996;10(9):986–92.
  15. Wilson JG, Roth CB, Warkany J. An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. *Am J Anat* 1953;92(2):189–217.
  16. See AW, Kaiser ME, White JC, *et al.* A nutritional model of late embryonic vitamin A deficiency produces defects in organogenesis at a high penetrance and reveals new roles for the vitamin in skeletal development. *Dev Biol* 2008;316(2):171–90.
  17. Holder AM, Klaassens M, Tibboel D, *et al.* Genetic factors in congenital diaphragmatic hernia. *Am J Hum Genet* 2007;80(5):825–45.
  18. Goumy C, Gouas L, Marceau G, *et al.* Retinoid pathway and congenital diaphragmatic hernia: hypothesis from the analysis of chromosomal abnormalities. *Fetal Diagn Ther* 2010;28(3):129–39.
  19. Golzio C, Martinovic-Bouriel J, Thomas S, *et al.* Matthew-Wood syndrome is caused by truncating mutations in the retinol-binding protein receptor gene STRA6. *Am J Hum Genet* 2007;80(6):1179–87.
  20. Pasutto F, Sticht H, Hammersen G, *et al.* Mutations in STRA6 cause a broad spectrum of malformations including anophthalmia, congenital heart defects, diaphragmatic hernia, alveolar capillary dysplasia, lung hypoplasia, and mental retardation. *Am J Hum Genet* 2007;80(3):550–60.
  21. Major D, Cadenas M, Fournier L, *et al.* Retinol status of newborn infants with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int* 1998;13(8):547–9.
  22. Beurskens LW, Tibboel D, Lindemans J, *et al.* Retinol status of newborn infants is associated with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatrics* 2010;126(4):712–20.
  23. Thebaud B, Tibboel D, Rambaud C, *et al.* Vitamin A decreases the incidence and severity of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *Am J Physiol* 1999;277(2 Pt 1):L423–9.
  24. Mey J, Babiuk RP, Clugston R, *et al.* Retinal dehydrogenase-2 is inhibited by compounds that induce congenital diaphragmatic hernias in rodents. *Am J Pathol* 2003;162(2):673–9.
  25. Chen MH, MacGowan A, Ward S, *et al.* The activation of the retinoic acid response element is inhibited in an animal model of congenital diaphragmatic hernia. *Biol Neonate* 2003;83(3):157–61.
  26. Doi T, Sugimoto K, Puri P. Prenatal retinoic acid up-regulates pulmonary gene expression of COUP-TFII, FOG2, and GATA4 in pulmonary hypoplasia. *J Pediatr Surg* 2009;44(10):1933–7.
  27. Sugimoto K, Takayasu H, Nakazawa N, *et al.* Prenatal treatment with retinoic acid accelerates type I alveolar cell proliferation of the hypoplastic lung in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2008;43(2):367–72.
  28. Wu J, Yamamoto H, Gratacos E, *et al.* Lung development following diaphragmatic hernia in the fetal rabbit. *Hum Reprod* 2000;15(12):2483–8.
  29. Emery JLMA. The number of alveoli in the terminal respiratory unit of man during late intrauterine life and childhood. *Arch Dis Child* 1960;35:544–7.
  30. Bustin SA, Benes V, Garson JA, *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;55(4):611–22.
  31. Williams TM, Lisanti MP. The caveolin proteins. *Genome Biol* 2004;5(3):214.
  32. Wu J, Ge X, Verbeken EK, *et al.* Pulmonary effects of in utero tracheal occlusion are dependent on gestational age in a rabbit model of diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2002;37(1):11–7.
  33. De Paepe ME, Johnson BD, Papadakis K, *et al.* Temporal pattern of accelerated lung growth after tracheal occlusion in the fetal rabbit. *Am J Pathol* 1998;152(1):179–90.
  34. Kitano Y, Yang EY, von Allmen D, *et al.* Tracheal occlusion in the fetal rat: a new experimental model for the study of accelerated lung growth. *J Pediatr Surg* 1998;33(12):1741–4.
  35. Flageole H, Evrard VA, Vandenberghe K, *et al.* Tracheoscopic endotracheal occlusion in the ovine model: technique and pulmonary effects. *J Pediatr Surg* 1997;32(9):1328–31.
  36. Davey MG, Hedrick HL, Bouchard S, *et al.* Temporary tracheal occlusion in fetal sheep with lung hypoplasia does not improve postnatal lung function. *J Appl Physiol* 2003;94(3):1054–62.
  37. Deprest J, Gratacos E, Nicolaides KH. Fetoscopic tracheal occlusion (FETO) for severe congenital diaphragmatic hernia: evolution of a technique and preliminary results. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2004;24(2):121–6.
  38. Benachi A, Saada J, Martinovic J, *et al.* Congenital diaphragmatic hernia: antenatal care. *Rev Mal Respir* 2011;28(6):800–8.
  39. Ali K, Grigoratos D, Cornelius V, *et al.* Outcome of CDH infants following fetoscopic tracheal occlusion – influence of premature delivery. *J Pediatr Surg* 2013;48(9):1831–6.
  40. Davey MG, Danzer E, Schwarz U, *et al.* Prenatal glucocorticoids improve lung morphology and partially restores surfactant mRNA expression in lambs with diaphragmatic hernia undergoing fetal tracheal occlusion. *Pediatr Pulmonol* 2006;41(12):1188–96.
  41. Ruano R, Yoshisaki CT, da Silva MM, *et al.* A randomized controlled trial of fetal endoscopic tracheal occlusion versus postnatal management of severe isolated congenital diaphragmatic hernia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2012;39(1):20–7.
  42. De Paepe ME, Johnson BD, Papadakis K, *et al.* Lung growth response after tracheal occlusion in fetal rabbits is gestational age-dependent. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;21(1):65–76.
  43. De Paepe ME, Sardesai MP, Johnson BD, *et al.* The role of apoptosis in normal and accelerated lung development in fetal rabbits. *J Pediatr Surg* 1999;34(5):863–70 discussion 70–1.
  44. De Paepe ME, Mao Q, Luks FL. Expression of apoptosis-related genes after fetal tracheal occlusion in rabbits. *J Pediatr Surg* 2004;39(11):1616–25.
  45. Yoshizawa J, Chapin CJ, Sbragia L, *et al.* Tracheal occlusion stimulates cell cycle progression and type I cell differentiation in lungs of fetal rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285(2):L344–53.
  46. Raleigh SM, Verschoyle RD, Bowskill C, *et al.* Pulmonary availability of isotretinoin in rats after inhalation of a powder aerosol. *Br J Cancer* 2000;83(7):935–40.

PUBLICATION N°4

**Retinoic acid and tracheal occlusion for diaphragmatic hernia treatment in rabbit fetuses.**

Delabaere A, Blanchon L, Coste K, Clairefonf G, Belville Corinne, Marceau G, Blanc P,  
Sapin V, Gallot D.

**Prenat Diagn. Under review**

Après avoir trouvé un véhicule adéquat au transport de l'AR dans la trachée, nous avons étudié les effets de l'AR couplé à des liposomes en injection intratrachéale en complément de l'OT sur un modèle chirurgical lapin de HCD.

Les lapines gestantes ont toutes été opérées par Denis Gallot et Amélie Delabaere, au sein de l'animalerie de la faculté de médecine de Clermont-Ferrand. Au 23<sup>ème</sup> jour de gestation, une HCD foetale était créée. Au 28<sup>ème</sup> jour de gestation, une OT était réalisée chez certains fœtus HCD avec une injection intra-trachéale de liposomes seuls ou chargés d'AR dans un même temps. Au 30<sup>ème</sup> jour de gestation, les fœtus étaient extraits par hystérotomie. Le rapport poids pulmonaire/ poids total était mesuré. Après dissection du fœtus lapin, le poumon gauche était réservé pour les analyses histologiques et le poumon droit pour les analyses de biologie moléculaires.

Les résultats confirmaient les données obtenues après OT, soit une augmentation du poids pulmonaire et une modification des voies aériennes avec une augmentation du nombre des alvéoles. L'étude des tissus conjonctifs montrait que le contenu en collagène était normalisé suite à l'OT, alors qu'il était diminué en cas de HCD seule. Les résultats sur l'expression de l'élastine ne permettaient ni de confirmer ni d'infirmer les données de la littérature, probablement du fait d'une analyse qui manquait de finesse. L'activité apoptotique était augmentée en cas d'OT. L'AR semblait pouvoir diminuer ce phénomène. Afin d'avoir un aperçu de l'effet de l'AR sur l'HTAP, nous avons étudié l'expression d'un récepteur de l'endothéline (EDNRA). Elle était augmentée en cas de HDC seule. L'amélioration liée à la réalisation d'une OT semblait augmentée par l'ajout d'AR. L'étude de l'expression des protéines du surfactant (SP-B et SP-C) mettait en évidence une augmentation de production en cas de HDC seule, pouvant être rapportée à une diminution de la différenciation des PII en

PI. Cette production était fortement altérée par l'OT et normalisée par un ajout d'AR. L'AR semblait rétablir une différenciation pulmonaire comparable à celle d'un poumon sain.

En conclusion, une administration intratrachéale d'AR dans un même temps opératoire que l'OT pourrait améliorer la vascularisation et la maturation pulmonaires.

Cette étude a bénéficié du soutien financier de la Fondation de l'Avenir.





**Retinoic acid and tracheal occlusion for diaphragmatic hernia treatment in rabbit fetuses**

Journal:	<i>Prenatal Diagnosis</i>
Manuscript ID	PD-17-0155
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	31-Mar-2017
Complete List of Authors:	DELABAERE, AMELIE; University hospital of Clermont-Ferrand, Gynaecology and obstetrics; Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Obstetrics and Gynecology Blanchon, Loic; Universite d'Auvergne, EA7281 - Retinoids, Reproduction Developmental Diseases COSTE, KAREN; Centre Hospitalier Universitaire de Clermont-Ferrand Clairefond, Gael; Université Clermont Auvergne Belville, Corinne; Université Clermont Auvergne Geoffroy, Marceau; Université d'Auvergne, EA7281 - Retinoids, Reproduction Developmental Diseases; Centre Hospitalier Universitaire de Clermont-Ferrand, Biochemistry and Molecular Biology Department Blanc, Pierre; Centre Hospitalier Universitaire de Clermont-Ferrand SAPIN, VINCENT; Centre Hospitalier Universitaire de Clermont-Ferrand GALLOT, DENIS; CHU Clermont-Ferrand, Maternite Hotel-Dieu
KeyWords:	FETAL THERAPY, Diaphragmatic hernia, Retinoids, Tracheal occlusion, Fetal surgery, Pulmonary hypoplasia

SCHOLARONE™  
Manuscripts

<http://mc.manuscriptcentral.com/pd>

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Retinoic acid and tracheal occlusion for diaphragmatic hernia treatment in rabbit fetuses**

Running head: Retinoic acid in fetal diaphragmatic hernia treatment

Wordcount: Manuscript: 3494; Tables: 2; Figures: 5

Delabaere Amélie

“Translational approach to epithelial injury and repair” team, Université Clermont Auvergne,  
CNRS, Inserm, GReD, 63000 Clermont-Ferrand, France.

Fetal Maternal Medicine Unit, Obstetrics and Gynecology Department, Clermont-Ferrand  
University Hospital, 63000 Clermont-Ferrand, France.

Blanchon Loïc

“Translational approach to epithelial injury and repair” team, Université Clermont Auvergne,  
CNRS, Inserm, GReD, 63000 Clermont-Ferrand, France.

Coste Karen

“Translational approach to epithelial injury and repair” team, Université Clermont Auvergne,  
CNRS, Inserm, GReD, 63000 Clermont-Ferrand, France.

Department of Pediatrics, Clermont-Ferrand University Hospital, 63000 Clermont-Ferrand,  
France.

Clairefond Gael

“Translational approach to epithelial injury and repair” team, Université Clermont Auvergne,  
CNRS, Inserm, GReD, 63000 Clermont-Ferrand, France.

Belville Corinne

“Translational approach to epithelial injury and repair” team, Université Clermont Auvergne,  
CNRS, Inserm, GReD, 63000 Clermont-Ferrand, France.

Marceau Geoffroy

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

“Translational approach to epithelial injury and repair” team, Université Clermont Auvergne,  
CNRS, Inserm, GReD, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Clermont-Ferrand University Hospital,  
63000 Clermont-Ferrand, France.

Blanc Pierre

EA7281 – “Translational approach to epithelial injury and repair”, Auvergne University,  
63000 Clermont-Ferrand, France.

Sapin Vincent

“Translational approach to epithelial injury and repair” team, Université Clermont Auvergne,  
CNRS, Inserm, GReD, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Clermont-Ferrand University Hospital,  
63000 Clermont-Ferrand, France.

Gallot Denis

“Translational approach to epithelial injury and repair” team, Université Clermont Auvergne,  
CNRS, Inserm, GReD, 63000 Clermont-Ferrand, France.

Fetal Maternal Medicine Unit, Obstetrics and Gynecology Department, Clermont-Ferrand  
University Hospital, 63000 Clermont-Ferrand, France.

Corresponding author and reprint requests: Amélie Delabaere, Obstetrics and Gynecology  
Department, Clermont-Ferrand University Hospital, 1 place Lucie-et-Raymond-Aubrac,  
63003 Clermont-Ferrand Cedex 1, France,  
Tel: + 33473755079, Fax: +33473755281 E-mail: [adelabaere@chu-clermontferrand.fr](mailto:adelabaere@chu-clermontferrand.fr)

No conflicts of interest to report.

**ACKNOWLEDGMENTS:** We thank Fondation Avenir for the grant ETO-593

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**What's already known about this topic?**

The significant perinatal mortality in diaphragmatic hernia (DH) is explained by pulmonary hypoplasia and pulmonary arterial hypertension. Antenatal tracheal occlusion (TO) decreases hypoplasia but induces deficient surfactant synthesis. Previous studies have demonstrated that maternal administration of retinoic acid (RA) stimulated pulmonary surfactant expression in a fetal rabbit DH model.

**What does this study add?**

RA with TO in DH improves pulmonary differentiation and vascularization studied by surfactant and endothelin receptor expression analysis.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**ABSTRACT** (160 words)

**Introduction:** Lung hypoplasia and pulmonary arterial hypertension (PAH) in congenital diaphragmatic hernia (DH) lead to high perinatal death rates. Fetoscopic tracheal occlusion (TO) improves DH lung development, but a major side effect is abnormal pneumocyte differentiation. This study aimed to evaluate the potential benefit of adjunctive intra-tracheal RA to reduce adverse effects of TO in a surgical model of rabbit DH.

**Methods:** A left diaphragmatic defect was created at d23 in 34 fetal rabbits. At d28, fetuses underwent sham surgery or TO with injection of empty or RA-loaded liposomes. At d30, fetuses were harvested. Lungs were processed for histology, immunohistochemistry, and gene expression quantification.

**Results:** Tracheal RA injection during TO process had no effect on lung-to-body-weight ratio, radial alveolar count and lung connective tissue composition. Apoptotic activity and endothelin receptor expression were decreased. The major effect was recovery of normal pneumocyte differentiation.

**Conclusion:** Intra-tracheal RA under TO decreased endothelin receptor expression, a potential marker of PAH, and improved pneumocyte differentiation.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### **INTRODUCTION**

Congenital diaphragmatic hernia (DH) is a rare developmental anomaly (1/2,500 newborns)<sup>1</sup>. DH patients experience severe respiratory distress caused by pulmonary hypoplasia and pulmonary arterial hypertension (PAH). The pulmonary hypoplasia is associated with a decrease in number of bronchial branches and alveoli, alveolar wall thickening, reduction in alveolar air spaces and gas-exchange surface area. The PAH is associated with a decrease in number of pulmonary arteries, adventitial thickening, medial hyperplasia and peripheral extension of the muscle layer into the smaller intra-acinar arterioles<sup>2,3</sup>. In addition, altered elastin and collagen contents contribute to abnormal pulmonary compliance<sup>4,5</sup>. Despite progress in neonatal care, DH is still fatal in up to 30% of cases<sup>6,7</sup>.

Prenatal intervention by fetoscopic tracheal occlusion (TO) stimulates lung growth, improves gas exchange, and can decrease neonatal complications and mortality in isolated DH cases with severe pulmonary hypoplasia<sup>8-11</sup>. Survival rate in severe left DH was 49.1% after fetal TO, compared to 24.1% in fetuses without TO<sup>11</sup>. In animal models of DH, TO reduced PAH<sup>12-15</sup>, and accelerates the differentiation of type-II pneumocytes (PII) into type-I pneumocytes (PI)<sup>16</sup>, leading to primary surfactant deficiency and impaired respiratory gas exchange<sup>17</sup>.

To improve pulmonary development and decrease respiratory insufficiency in DH, several pre-clinical research studies have investigated drug treatments<sup>18,19</sup>. Retinoic acid (RA) administration is one strategy proposed by our research group<sup>20</sup>, on the basis of evidence of retinoid signaling pathway disruption in DH<sup>21-24</sup>. RA, an active metabolite of vitamin A, is an important regulator of proliferation, differentiation and maintenance of lung epithelial and arterial smooth muscle cells<sup>25,26</sup>. The importance of vitamin A in vertebrate lung development was first demonstrated by observations on fetuses exposed to a maternal vitamin A-deficient diet presenting either pulmonary hypoplasia or DH<sup>25,27</sup>. It has been shown that DH is strongly

1  
2  
3 associated with low retinol and RBP levels in newborns<sup>28,29</sup>. In the nitrofen-induced DH  
4 mouse model, early prenatal administration of vitamin A decreases incidence of DH,  
5 increases lung growth, and restores lung maturation<sup>30</sup>. Nitrofen interacts with the retinoid  
6 signalling pathway by inhibiting retinaldehyde dehydrogenase-2<sup>31,32</sup>. The retinoid signaling  
7 pathway is not disrupted in the surgical rabbit DH model, which makes it a more appropriate  
8 model for investigating pulmonary effects of RA<sup>20</sup>. Studies using the surgical rabbit model of  
9 DH have demonstrated that systemic maternal administration of RA reversed some functional  
10 effects of DH, stimulated alveolarization<sup>33</sup>, normalized PII/PI ratio and increased surfactant  
11 protein expression<sup>20</sup>.

12  
13 We decided to combine TO and intra-tracheal RA supplementation. Potential advantages of  
14 tracheal RA include limited maternal systemic diffusion of RA with potentiation of  
15 pulmonary effects. We had previously demonstrated that liposomes make a good vehicle for  
16 delivering the RA in the trachea<sup>34</sup>.

17  
18 The main objective of this study was to evaluate the effects of combining TO with intra-  
19 tracheal RA-loaded liposome administration on pulmonary maturation in DH rabbit fetuses.  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## **METHODS**

### *Animals*

All procedures for DH creation, TO surgery and tracheal administration of RA were performed in accordance with current guidelines on animal well-being. All experiments were first approved by the Committee on Animal Research Ethics of Clermont-Ferrand Faculty of Medicine (approval number CE18-10). The study used pregnant New Zealand White rabbits housed in separate cages under normal room-temperature and daylight conditions with free access to food and water before and after surgery.

### *Experimental design*

In each time-dated pregnant rabbit, two fetuses were subjected to surgical creation of DH at d23 (pseudo-glandular stage), as previously described<sup>30,35</sup>. The same fetuses were operated at d28 (canalicular stage). The first group underwent cervicotomy without TO (SHAM-group). The second group underwent TO with intra-tracheal injection of liposomes (LIP-group). The third group underwent TO with intra-tracheal injection of liposomes loaded with RA (RA-group). The non-operated littermates (NO-group) constituted internal controls. All fetuses were harvested by caesarean section at d30 (alveolar stage).

### *Preparation of solutions for tracheal injection*

Products administered into the trachea were empty liposomes or all-trans retinoic acid-loaded liposomes. The powder of empty liposomes (Atragen<sup>®</sup>, Antigenics Inc., Lexington, MA) was diluted with NaCl 0.9% following the manufacturer's instructions. RA-loaded liposomes were prepared by diluting the Atragen<sup>®</sup> powder with NaCl 0.9% to obtain a RA concentration of  $10^{-3}$  mol/L (i.e. the most widely used concentration for therapeutic use).



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

#### *Anesthesia and surgical protocol*

Rabbits (Charles River®, l'Arbresle, France) were shipped at d19 of gestation. At d23, rabbits were sedated with ketamine 50 mg/kg (Imalgene®, Laboratoire Rhône Mérieux®, Lyon, France) and xylazine 5 mg/kg (Rompun®, Bayer HealthCare®, Leverkusen, Germany) intramuscularly. All animals received medroxyprogesterone 7 mg (Depo-Prodasone®, Pfizer Holding France, Paris, France) and penicillin G 300,000 IU (Peni G®, GlaxoSmithKline, Marly-le-Roi, France) intramuscularly for tocolysis and antibiotic prophylaxis. The rabbits spontaneously breathed O<sub>2</sub>-enriched air (2 L/min). General anesthesia was maintained with intravenous injection of ketamine 25 mg/kg every 15 to 30 min. All surgical procedures were carried out in aseptic conditions. The gravid bicornuate uterus was exposed through a midline abdominal incision. In each doe, the two ovarian-end fetuses underwent DH creation. A 1.5-cm transversal linear incision of all layers of the uterine wall was made on the antimesometrial side of selected gestational sacs. Four 6-0 polypropylene sutures (Prolene®, Ethicon, France) were placed on the border of the uterine incision to prevent membrane dislodgement. The fetal body was exposed by gentle manipulation. The diaphragm was exposed through a low left lateral thoracotomy using purpose retractors and microscissors to partially excise the membranous part. The thoracotomy was closed with interrupted 6-0 Prolene sutures. The skin was closed using an interrupted 6-0 polypropylene suture. The fetus was put back inside its gestational sac. The uterine wall was closed in one layer, using a running 6-0 polypropylene suture. The maternal laparotomy was closed in three layers with a 3-0 polyglactin suture (Vicryl®, Ethicon, France). At day 28, previously operated fetuses underwent sham operation or tracheal ligation. The gravid uterus was once again exposed and a new uterine incision performed. The fetal head and neck were exposed by gentle manipulation. An anterior transverse cervicotomy was performed. The fetal trachea was

1  
2  
3 identified, dissected, and separated from the esophagus. No ligation was performed in the  
4 SHAM-group. The injection of 300  $\mu$ L of solution (empty liposomes in the LIP-group and  
5 RA-loaded liposomes in the RA-group) was performed into the trachea with a thin needle (31-  
6  
7 gauge) inserted into the tracheal lumen. After injection, an immediate ligation of the trachea  
8  
9 caudal of the injection site was performed with a 3-0 polyglactin suture (Vicryl<sup>®</sup>, Ethicon,  
10  
11 France). The uterine wall and the maternal laparotomy were closed similarly to the first  
12  
13 procedure.  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20

#### 21 *Caesarean section and tissue harvesting*

22  
23 At d30, fetuses were delivered by caesarean section, immediately after maternal sacrifice with  
24 an intravenous bolus of pentobarbital 5-10 mL (Dolethal<sup>®</sup>, Vétquinol SA, Lure, France).  
25 Sacrifice was performed after premedication with ketamine 50 mg/kg and xylazine 5 mg/kg  
26 intramuscularly. Operated and immediately-adjacent non-operated fetuses were assigned to  
27 four groups: non-operated fetuses (NO-group), DH fetuses operated without TO (SHAM-  
28 group), DH fetuses with tracheal injection of empty liposomes and TO (LIP-group), and DH  
29 fetuses with tracheal injection of RA-loaded liposomes and TO (RA-group). Any stillborn  
30 fetuses were recorded as non-survivors and excluded from further analysis. Each fetus was  
31 weighed. The thorax was opened through an anterior midline incision and lungs were  
32 extracted and weighed. Lung-to-body-weight-ratio (LBWR) was calculated. Right and left  
33 lungs were separated. The left lung was used for histological analyses. Immersion and  
34 inflation with 4% paraformaldehyde under 25 cmH<sub>2</sub>O pressure were performed for 24 hours<sup>36</sup>.  
35 Before embedding in paraffin, the left lung was divided into anterior and posterior parts. The  
36 right lung was snap-frozen (in liquid nitrogen) and stored at -80°C for molecular biology  
37 analysis.  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

#### *Lung morphometry (airways)*

Airway morphometry measurements were performed on 5- $\mu$ m sections of paraffin-embedded H&E-stained lung (anterior half). Morphometric evaluation was performed using radial alveolar count (RAC) at x40 magnification, according to the method of Emery & Mithal<sup>37</sup>. A line was dropped from the center of each terminal respiratory bronchiole to the nearest connective tissue septum at right-angle to the epithelium. The count of number of alveoli cut by this line was performed on two or three histological sections to obtain at least 10 counts per fetus. The assessor was blinded to the fetal treatment groups.

#### *Connective tissue quantification*

On 5- $\mu$ m lung tissue sections, parenchymal collagen and elastin content were estimated from Sirius and orcein-stained sections, which selectively stained for collagen and elastin, respectively, with 20 random non-overlapping fields per lung captured at x400 magnification (BX51, Olympus®, Melville, NY). Percent collagen and elastin in total tissue content was measured by the counting method with a 50  $\times$  100 square grid eyepiece, excluding vessels and airways.

#### *RNA extraction, RT-PCR experiments and RT-qPCR assays*

Total RNA was extracted from the right lung using the RNeasy Mini Kit (Qiagen®, Venlo, Netherlands). RNA quality was assessed by RNA-to-protein ratio (260 nm/280 nm). cDNA was generated using the Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Life Technologies, Saint-Aubin, France). Specific oligonucleotide primers were originally generated using the web program Primer3 (<https://www.broadinstitute.org/scientific-community/software?criteria=Primer%20Design>) based on the published sequences of each specific gene (tropoelastin, caspase-3, endothelin-1 receptor type-A (EDNRA), SP-B, SP-C

1  
2  
3 and RT140) and designed to avoid genomic DNA amplification (Table 1). Transcripts were  
4  
5 independently quantified in three different experiments, and normalized by geometric mean of  
6  
7 three housekeeping genes (RPLP0, GAPDH and  $\beta$ -actin). All steps followed the MIQE  
8  
9 guidelines<sup>38</sup>. Real-time PCR was performed using Lightcycler SYBR Green technology  
10  
11 (Roche Diagnostics®, Meylan, France), the primer pairs and generated cDNA as above.  
12  
13

#### 14 15 16 *In Situ Cell Death Detection Assay*

17  
18 An indirect terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling  
19  
20 (TUNEL) assay (In Situ Cell Death Detection Kit, POD®, Roche Diagnostics®, Meylan,  
21  
22 France) was used to evaluate lung cell apoptosis. Sections of the posterior half of the fetal left  
23  
24 lungs were pre-treated with 10  $\mu$ g/mL of proteinase K (Roche Diagnostics®, Meylan, France)  
25  
26 in phosphate-buffered saline (PBS) for 15 min at 37°C, and washed in PBS. Specimens were  
27  
28 exposed to the TUNEL reaction mixture containing the enzyme solution and label solution for  
29  
30 1 h at 37°C in a moist chamber. Slides were washed in PBS. Hoechst 33258 (1:200; 10 min)  
31  
32 was used to visualize nuclei. Controls consisted of omitting the enzyme solution (negative  
33  
34 control) or adding DNase I (positive control). Pre-tests established the absence of false-  
35  
36 positive cells (like reticulocytes for example) in the counts. The two observers (G.M. and  
37  
38 A.D.) were blinded to animal ID. Number of positive cells was determined by counting the  
39  
40 number of positively-stained cells per field in 20 random non-overlapping fields, using an  
41  
42 Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss®) at x400. This count was reported as percentage of total  
43  
44 number of cells based on Hoechst-stained nuclei.  
45  
46  
47  
48  
49

#### 50 51 52 *Immunohistochemistry for Caspase 3*

53  
54 Anterior halves of the paraffin-embedded lungs (5- $\mu$ m sections) were deparaffinized in  
55  
56 toluene and hydrated by ethanol. Tissue preparations were incubated for 10 minutes with  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

proteinase K, then rinsed. To prevent non-specific binding of primary antibodies, sections were pre-incubated for 30 min with 10% normal bovine serum (dilution 1:25; X0907 DakoCytomation<sup>®</sup>, Glostrup, Denmark). Goat polyclonal anti-Caspase-3 antibody (sc-22140; Santa Cruz Biotechnology<sup>®</sup>, Santa Cruz, CA) was applied at room temperature (1:100; overnight). After rinsing with PBS, the slides were incubated with a mouse peroxidase-conjugated antigoat antibody (ab6985; Abcam<sup>®</sup>, Cambridge, UK) at room temperature (1:1000, 60 min), and revealed with the TSA Plus<sup>®</sup> Fluorescein System kit (PerkinElmer<sup>®</sup>, MA). Nuclei were stained by Hoechst 33258 (1:200; 10 min). Negative controls were performed without primary antibody incubation<sup>39</sup>. Slides were photographed under an Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss<sup>®</sup>) at x100 and x400. The morphometric analysis was limited to the air-exchanging parenchyma excluding bronchi and bronchioles. The count of positive cells was performed by Inaris software<sup>®</sup> (X63, 6.1.5, Bitplane, Zurich, Switzerland). This count was reported as percentage of total number of cells based on Hoechst-stained nuclei. The assessor was blinded to the fetal treatment groups.

#### *Immunohistochemistry for SP-B*

Slides were prepared and analyzed in the same way as for caspase-3 immunohistochemistry. Sections were incubated in the presence of goat polyclonal anti-surfactant protein B antibody (sc-7704; Santa Cruz Biotechnology<sup>®</sup>, Santa Cruz, CA; 1:200, overnight).

#### *Immunohistochemistry for RTI<sub>40</sub>*

Slides were prepared and analyzed in the same way as for caspase-3 immunohistochemistry. Sections were incubated in the presence of the goat polyclonal anti-RTI<sub>40</sub> antibody (sc-23564; Santa Cruz Biotechnology<sup>®</sup>, Santa Cruz, CA; 1:200; overnight).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

*Statistical analysis*

All data analysis was performed with SPSS software (version 22, SPSS, Inc, Chicago, IL). Continuous variables were compared using a Kruskal-Wallis test for multiple comparisons and a Mann-Whitney test for pairwise comparisons. Values were expressed as median and interquartile range (IQR). Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

For Peer Review

## RESULTS

### *Animal surgery and gross anatomy*

Survival rate was 50% (n=17/34) after double intervention, 70.6% (n=24/34) after DH surgical creation, and 70.8% (n=17/24) after cervicotomy on post-DH survivors (66.7% (n=6/9) in the SHAM-group, 62.5% (n=5/8) in the LIP-group, and 85.7% (n=6/7) in the RA-group ( $p=0.683$ ). Five control fetuses were harvested (NO-group).

Results are summarized in Table 2.

### *Airway morphometry*

LBWR was increased by TO on DH, similar to that of the NO-group. DH without TO decreased LBWR compared to the NO-group (Figure 1, Part A).

RAC, used for morphometric analysis, was improved under TO, similar to that of the NO-group. DH without TO decreased RAC compared to the NO-group (Figure 1, Part B).

### *Connective tissue analyses*

Collagen proportion was decreased under TO, similar to that of the NO-group. It was increased under DH without TO, compared to the NO-group (Figure 1, Part C).

Elastin content evaluation by histologic count and by qPCR was not significantly different among groups (Figure 1, Part D and E).

### *Apoptotic cellular activity*

Apoptotic activity was evaluated by TUNEL, caspase-3 immunohistochemistry and caspase-3 mRNA expression.

1  
2  
3 Apoptotic activity evaluated by TUNEL was increased under TO, compared to the NO-group  
4 (Figure 2, Part A).

5  
6  
7 Caspase-3-positive cell count and mRNA expression were decreased under TO with RA,  
8  
9 similar to that of the RA- and the NO-groups (Figure 2, Part B and C).

#### 10 11 12 13 14 *Pulmonary gene expression levels of EDNRA*

15 EDNRA mRNA expression was decreased under TO with RA, similar to that of the RA- and  
16  
17 NO-groups. DH without TO increased EDNRA expression compared to the NO-group  
18  
19 (Figure 3).

#### 20 21 22 23 24 *Pulmonary surfactant production*

25 Representative images used to quantify SP-B/RTI<sub>40</sub>-positive cell ratio are given in Figure 4.  
26  
27 SP-B/RTI<sub>40</sub>-positive cell ratio was increased under TO with RA, similar to that of the SHAM-  
28  
29 and NO-groups. It decreased under TO with empty liposomes and increased without TO  
30  
31 (Figures 4 and 5, Part A).

32 We also calculated the ratio between SP-B and SP-C mRNA, which are strongly synthesized  
33  
34 by PII, and RTI<sub>40</sub> mRNA, which is more specific to PI<sup>40,41</sup>. The SP-B/RTI<sub>40</sub> mRNA ratio was  
35  
36 increased under TO with RA, similar to that of the SHAM- and NO-groups. It decreased  
37  
38 under TO with empty liposomes (Figure 5, Part B). SP-C/RTI<sub>40</sub> mRNA ratio increased under  
39  
40 TO with RA, similar to that of the SHAM- and NO-groups. It decreased under TO with empty  
41  
42 liposomes (Figure 5, Part C).

#### 43 44 45 46 47 **DISCUSSION**

48 This study was designed to observe the pulmonary effects of tracheal RA injection with TO  
49  
50 on rabbit fetuses with surgical DH, with special focus on pneumocyte differentiation. Our  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 results showed that intra-tracheal RA administration led to a normalization of pneumocyte  
4 differentiation, whereas TO alone accelerated PII differentiation to PI. Other effects on DH  
5 fetuses induced by RA under TO were decrease in apoptotic activity and EDNRA expression.  
6  
7  
8 Our observations on airway morphometry confirmed the LBWR and RAC decreases  
9 associated with were corrected by TO<sup>42,43</sup>, with no RA effect. Collagen content decreased  
10 under TO whereas it was increased in non-treated DH fetuses.

11  
12 Apoptotic activity, in semi-quantitative TUNEL evaluation, was increased under TO<sup>44</sup>,  
13 without RA effect. Caspase-3 expression showed a decrease in apoptotic activity with RA  
14 administration.

15  
16 The expression of EDNRA, implicated in PAH, was normalized under TO with RA, whereas  
17 it was increased in non-treated DH fetuses.

18  
19 Fetoscopic TO is currently proposed for severe congenital DH. This intervention decreases  
20 pulmonary hypoplasia, but the major side effect observed in animal models is abnormal  
21 differentiation of pneumocytes with a reduction in PII surfactant-producing cells<sup>16,17</sup>. Previous  
22 studies in lamb DH models had demonstrated that *in utero* reversal of TO restored surfactant  
23 production and improved post-natal pulmonary function<sup>17,45</sup>. In clinical practice, TO is usually  
24 removed at 34 weeks, either by fetal tracheoscopy or by puncturing the balloon through the  
25 maternal abdomen<sup>46-48</sup>. The mean delivery gestational age after TO was 34-35 weeks<sup>47,48</sup>.  
26  
27 Davey et al.<sup>49</sup> had demonstrated that maternal glucocorticoids administration 48 hours before  
28 delivery restored surfactant production, but this strategy requires anticipation of birth.

29  
30 The critical role of the RA signaling pathway in lung development has been demonstrated in  
31 knockout mice and toxic rodent models for DH<sup>22,50</sup>. Coste et al.<sup>23</sup> confirmed the key player of  
32 RA signaling pathway in diaphragm and lung development and in DH pathogenesis.

33  
34 The choice of fetal rabbit model to study RA treatment was current in lung development  
35 studies. Its long pseudoglandular phase allows the creation of a diaphragmatic defect in  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 sufficiently large fetuses, after which the pups are born with lungs at a comparable stage of  
4 development to humans. The surgical rabbit model offers other key advantages: widely  
5 available animals with large litter sizes and no primary disruption of the retinoid signaling  
6 pathway, contrary to the toxic nitrofen-induced rodent model of DH. We previously studied  
7 pulmonary effects of maternal administration of RA<sup>20</sup>, and found no impact on gross  
8 anatomic, morphologic, cell proliferation or apoptosis indexes in hypoplastic DH lungs.  
9 Furthermore, surfactant protein expression was restored to normal levels in the hypoplastic  
10 DH lungs after maternal RA administration<sup>20</sup>.

11  
12 The prenatal fetoscopic TO treatment for severe forms of DH<sup>8,46,51</sup> could be the best  
13 opportunity to administer RA into the trachea to increase RA concentration directly in contact  
14 with the airway epithelium. In a previous study, we had tested and determined that liposomes  
15 are the most appropriate vehicle for delivering RA through the trachea<sup>34</sup>.

16  
17 As in many other studies conducted in DH animal models undergoing TO, the results obtained  
18 here confirmed the significant pulmonary hypoplasia characterized by decreased LBWR and  
19 RAC<sup>52,53</sup> in DH fetuses, and positive effects of TO that normalized LBWR<sup>42</sup> and RAC<sup>43</sup>.

20  
21 Functional studies in neonates and in animal models demonstrated that DH induces poor lung  
22 compliance and increases airway resistance, and that both are reversed by TO<sup>54,55</sup>. All studies  
23 concerned the tropoelastin RNA expression on DH foetuses found a decrease in DH fetuses,  
24 corrected by TO<sup>4,5</sup>. No statistical difference was found in our study when DH or TO was  
25 performed. The interpretation of elastic fiber deposits count on lung histologic slides is  
26 complicated by space alterations of elastin deposition in DH lungs as condensed aggregates at  
27 the tip of the alveolar secondary septal crests and secondary septa<sup>5,56</sup>. Our evaluation of total  
28 elastic content was comparable among the different groups, whereas decreased in DH lungs  
29 for Boucherat et al<sup>4</sup> and increased for Jani et al., with normalization after TO<sup>55</sup>. As in Jani et  
30 al.<sup>55</sup>, our results showed that collagen content (measured by histology) decreased under TO  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 whereas it was increased in DH. These results are difficult to interpret with the data here. An  
4 histologic study on space elastin organization and a mechanical study are needed to assess RA  
5 effects on pulmonary compliance and airway resistance<sup>55</sup>.  
6  
7

8  
9 Cell apoptotic activity was increased under TO<sup>44</sup>. The intra-tracheal RA adjunction seemed to  
10 reduce cell apoptotic activity, as demonstrated by caspase 3 immunohistochemistry.  
11

12  
13 In animal DH models, TO reduced pulmonary arterial reactivity evaluated by vascular  
14 morphometry<sup>13</sup> and by Doppler measurement of pulmonary artery pulsatility index (PI)<sup>14,15</sup>. A  
15 biochemical hallmark of PAH is an increase of endothelin-1 (ET-1) expression. This protein  
16 is expressed by endothelial cells and its effects are directed through two distinct receptor  
17 subtypes: the ET-A receptor, encoded by EDNRA gene and localized on vascular smooth  
18 muscle cells, which induces vasoconstriction and cell proliferation; the ET-B receptor,  
19 encoded by EDNRB gene and localized on vascular endothelial cells<sup>57</sup>. Studies in DH patients  
20 and animal models have observed an increase of ET-1 levels in the plasma<sup>58</sup> and in the lungs<sup>59</sup>  
21 as well as increased vasoconstrictor responses to ET-1<sup>60</sup> and increased EDNRA and EDNRB  
22 expression levels<sup>61,62</sup>. ET-1 mRNA expression and transcriptional activity in endothelial cells  
23 are suppressed by RA<sup>63</sup>. This mechanism may be implicated in the "ATRA syndrome"  
24 described in patients with acute promyelocytic leukemia which occasionally develop  
25 hypotension during retinoid treatment<sup>64</sup>. Our results revealed an increase of EDNRA mRNA  
26 expression, and a previous study in this same model<sup>13</sup> reported that TO led to an EDNRA  
27 decrease that even more potent with tracheal RA adjunction. As an adjunct to human amniotic  
28 stem cells<sup>33</sup>, RA could have an interesting effect on PAH.  
29  
30

31  
32 Our main hypothesis was confirmed by pneumocyte studies. TO decreased PII/PI ratio, as  
33 previously described<sup>65,66</sup>, and RA adjunction allowed PII/PI ratio to recover to normal levels.  
34  
35

36  
37 In conclusion, the adjunction of intra-tracheal RA with TO as antenatal DH treatment  
38 corrects the main side effect of TO by significantly improving pneumocyte differentiation and  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 surfactant production. The intra-tracheal RA seems to have beneficial effect on pulmonary  
4 vascularization, as EDNRA expression, studied as a marker of PAH, was found to decrease.  
5  
6 Intra-tracheal RA could therefore have therapeutic interest in antenatal DH treatment, to  
7  
8 improve surfactant production and lung vascularization reactivity. Deeper studies are now  
9  
10 needed to further investigate RA effects on DH lung vascularization before tracheal RA  
11  
12 adjunction can be trialed in human fetuses.  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Peer Review

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

COMPETING INTERESTS STATEMENT

The authors declare that they do not have any competing or financial interests to report.

For Peer Review

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank "Fondation de l'Avenir" for financial support via grant ETO-593.

For Peer Review

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

#### AUTHORS' CONTRIBUTIONS

All authors contributed to the design and execution of the experiments, and A.D. wrote the manuscript.

For Peer Review

**REFERENCES**

1. Gallot D, Coste K, Francannet C, et al. Antenatal detection and impact on outcome of congenital diaphragmatic hernia: a 12-year experience in Auvergne, France. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006;125(2):202-5.
2. IJsselstijn H, Tibboel D. The lungs in congenital diaphragmatic hernia: do we understand? *Pediatr Pulmonol.* 1998;26(3):204-18.
3. Rottier R, Tibboel D. Fetal lung and diaphragm development in congenital diaphragmatic hernia. *Semin Perinatol.* 2005;29(2):86-93.
4. Boucherat O, Benachi A, Barlier-Mur AM, et al. Decreased lung fibroblast growth factor 18 and elastin in human congenital diaphragmatic hernia and animal models. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175(10):1066-77.
5. Vuckovic A, Herber-Jonat S, Flemmer AW, et al. Alveolarization genes modulated by fetal tracheal occlusion in the rabbit model for congenital diaphragmatic hernia: a randomized study. *PLoS One.* 2013;8(7):e69210.
6. Geggel RL, Murphy JD, Langleben D, et al. Congenital diaphragmatic hernia: arterial structural changes and persistent pulmonary hypertension after surgical repair. *J Pediatr.* 1985;107(3):457-64.
7. Shehata SM, Sharma HS, van der Staak FH, et al. Remodeling of pulmonary arteries in human congenital diaphragmatic hernia with or without extracorporeal membrane oxygenation. *J Pediatr Surg.* 2000;35(2):208-15.
8. Jani JC, Nicolaidis KH, Gratacos E, et al. Severe diaphragmatic hernia treated by fetal endoscopic tracheal occlusion. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009;34(3):304-10.
9. Dekoninck P, Gratacos E, Van Mieghem T, et al. Results of fetal endoscopic tracheal occlusion for congenital diaphragmatic hernia and the set up of the randomized controlled TOTAL trial. *Early Hum Dev.* 2011;87(9):619-24.
10. Al-Maary J, Eastwood MP, Russo FM, et al. Fetal Tracheal Occlusion for Severe Pulmonary Hypoplasia in Isolated Congenital Diaphragmatic Hernia: A Systematic Review and Meta-analysis of Survival. *Annals of surgery.* 2016.
11. Deprest J, Brady P, Nicolaidis K, et al. Prenatal management of the fetus with isolated congenital diaphragmatic hernia in the era of the TOTAL trial. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2014;19(6):338-48.
12. Luks FI, Wild YK, Piasecki GJ, et al. Short-term tracheal occlusion corrects pulmonary vascular anomalies in the fetal lamb with diaphragmatic hernia. *Surgery.* 2000;128(2):266-72.
13. Roubliova XI, Verbeken EK, Wu J, et al. Effect of tracheal occlusion on peripheral pulmonary vessel muscularization in a fetal rabbit model for congenital diaphragmatic hernia. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;191(3):830-6.
14. Sylvester KG, Rasanen J, Kitano Y, et al. Tracheal occlusion reverses the high impedance to flow in the fetal pulmonary circulation and normalizes its physiological response to oxygen at full term. *J Pediatr Surg.* 1998;33(7):1071-4; discussion 4-5.
15. Cruz-Martinez R, Moreno-Alvarez O, Prat J, et al. Lung tissue blood perfusion changes induced by in utero tracheal occlusion in a rabbit model of congenital diaphragmatic hernia. *Fetal Diagn Ther.* 2009;26(3):137-42.
16. Flecknoe S, Harding R, Maritz G, et al. Increased lung expansion alters the proportions of type I and type II alveolar epithelial cells in fetal sheep. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;278(6):L1180-5.
17. Davey MG, Hedrick HL, Bouchard S, et al. Temporary tracheal occlusion in fetal sheep with lung hypoplasia does not improve postnatal lung function. *J Appl Physiol.* 2003;94(3):1054-62.



- 1
  - 2
  - 3
  - 4
  - 5
  - 6
  - 7
  - 8
  - 9
  - 10
  - 11
  - 12
  - 13
  - 14
  - 15
  - 16
  - 17
  - 18
  - 19
  - 20
  - 21
  - 22
  - 23
  - 24
  - 25
  - 26
  - 27
  - 28
  - 29
  - 30
  - 31
  - 32
  - 33
  - 34
  - 35
  - 36
  - 37
  - 38
  - 39
  - 40
  - 41
  - 42
  - 43
  - 44
  - 45
  - 46
  - 47
  - 48
  - 49
  - 50
  - 51
  - 52
  - 53
  - 54
  - 55
  - 56
  - 57
  - 58
  - 59
  - 60
18. Stathopoulos E, Rolland PH, Hery G, et al. Acute effect of a dual ETA-ETB receptor antagonist on pulmonary arterial vasculature in preterm lamb fetuses with surgically induced diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int*. 2011;27(3):295-301.
19. Shue EH, Schechter SC, Gong W, et al. Antenatal maternally-administered phosphodiesterase type 5 inhibitors normalize eNOS expression in the fetal lamb model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*. 2014;49(1):39-45; discussion
20. Gallot D, Coste K, Jani J, et al. Effects of maternal retinoic acid administration in a congenital diaphragmatic hernia rabbit model. *Pediatr Pulmonol*. 2008;43(6):594-603.
21. Gallot D, Marceau G, Coste K, et al. Congenital diaphragmatic hernia: a retinoid-signaling pathway disruption during lung development? *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2005;73(8):523-31.
22. Greer JJ, Babiuk RP, Thebaud B. Etiology of congenital diaphragmatic hernia: the retinoid hypothesis. *Pediatr Res*. 2003;53(5):726-30.
23. Coste K, Beurskens LW, Blanc P, et al. Metabolic disturbances of the vitamin A pathway in human diaphragmatic hernia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015;308(2):L147-57.
24. Kutasy B, Friedmacher F, Pes L, et al. Antenatal retinoic acid administration increases trophoblastic retinol-binding protein dependent retinol transport in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Res*. 2016;79(4):614-20.
25. See AW, Kaiser ME, White JC, et al. A nutritional model of late embryonic vitamin A deficiency produces defects in organogenesis at a high penetrance and reveals new roles for the vitamin in skeletal development. *Dev Biol*. 2008;316(2):171-90.
26. Milano JM, Topouzis S, Majesky MW, et al. Retinoid receptor expression and all-trans retinoic acid-mediated growth inhibition in vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 1996;93(10):1886-95.
27. Wilson JG, Roth CB, Warkany J. An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. *Am J Anat*. 1953;92(2):189-217.
28. Major D, Cadenas M, Fournier L, et al. Retinol status of newborn infants with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int*. 1998;13(8):547-9.
29. Beurskens LW, Tibboel D, Lindemans J, et al. Retinol status of newborn infants is associated with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatrics*. 2010;126(4):712-20.
30. Thebaud B, Tibboel D, Rambaud C, et al. Vitamin A decreases the incidence and severity of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *Am J Physiol*. 1999;277(2 Pt 1):L423-9.
31. Mey J, Babiuk RP, Clugston R, et al. Retinal dehydrogenase-2 is inhibited by compounds that induce congenital diaphragmatic hernias in rodents. *Am J Pathol*. 2003;162(2):673-9.
32. Chen MH, MacGowan A, Ward S, et al. The activation of the retinoic acid response element is inhibited in an animal model of congenital diaphragmatic hernia. *Biol Neonate*. 2003;83(3):157-61.
33. Sugimoto K, Takayasu H, Nakazawa N, et al. Prenatal treatment with retinoic acid accelerates type I alveolar cell proliferation of the hypoplastic lung in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*. 2008;43(2):367-72.
34. Delabaere A, Geoffroy M, Coste K, et al. Effects of Tracheal Occlusion with Retinoic Acid Administration on Normal Lung Development. *Prenat Diagn*. 2017.
35. Flemmer AW, Jani JC, Bergmann F, et al. Lung tissue mechanics predict lung hypoplasia in a rabbit model for congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Pulmonol*. 2007;42(6):505-12.

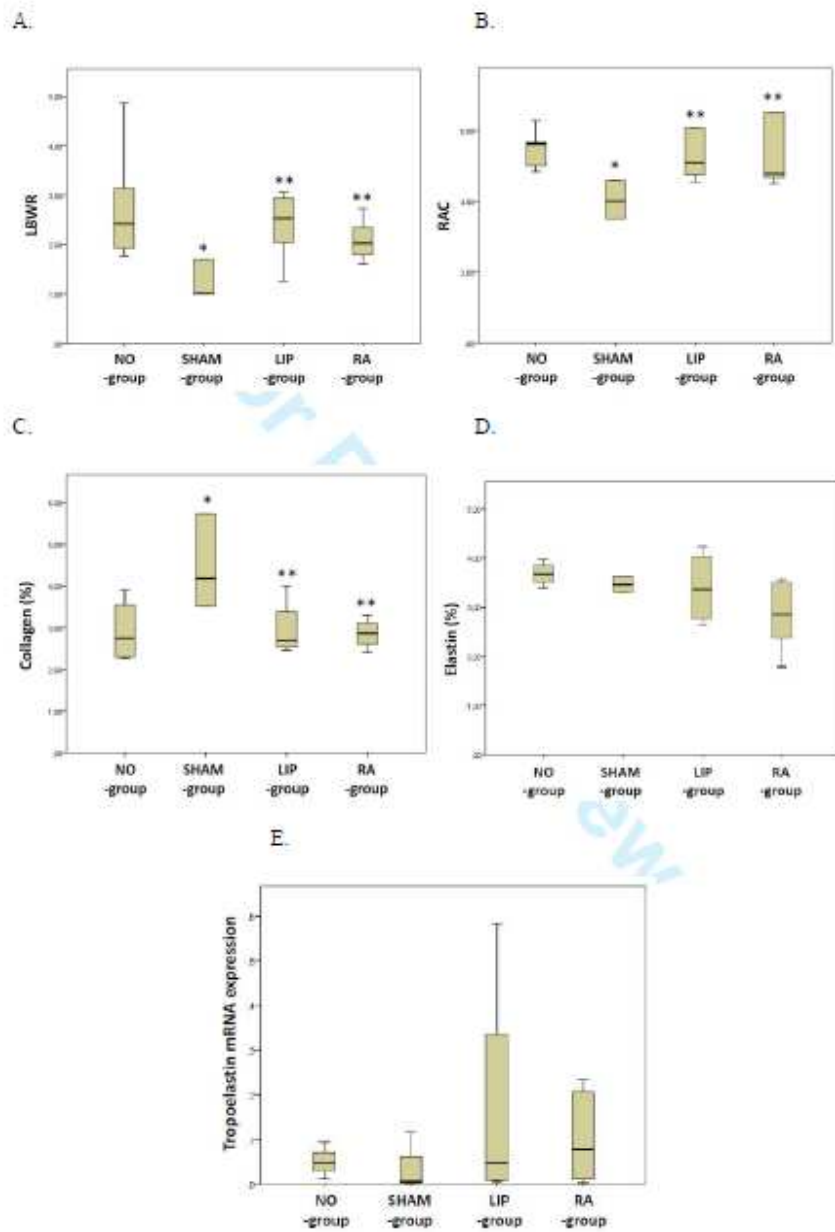
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

36. Wu J, Yamamoto H, Gratacos E, et al. Lung development following diaphragmatic hernia in the fetal rabbit. *Human reproduction*. 2000;15(12):2483-8.
37. Emery JL MA. The number of alveoli in the terminal respiratory unit of man during late intrauterine life and childhood. *Arch Dis Child*. 1960;35:544-7.
38. Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611-22.
39. Wu J, Ge X, Verbeken EK, et al. Pulmonary effects of in utero tracheal occlusion are dependent on gestational age in a rabbit model of diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*. 2002;37(1):11-7.
40. Williams TM, Lisanti MP. The caveolin proteins. *Genome biology*. 2004;5(3):214.
41. Williams MC. Alveolar type I cells: molecular phenotype and development. *Annu Rev Physiol*. 2003;65:669-95.
42. Kitano Y, Yang EY, von Allmen D, et al. Tracheal occlusion in the fetal rat: a new experimental model for the study of accelerated lung growth. *J Pediatr Surg*. 1998;33(12):1741-4.
43. De Paepe ME, Johnson BD, Papadakis K, et al. Temporal pattern of accelerated lung growth after tracheal occlusion in the fetal rabbit. *Am J Pathol*. 1998;152(1):179-90.
44. De Paepe ME, Johnson BD, Papadakis K, et al. Lung growth response after tracheal occlusion in fetal rabbits is gestational age-dependent. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999;21(1):65-76.
45. Flageole H, Evrard VA, Vandenberghe K, et al. Tracheoscopic endotracheal occlusion in the ovine model: technique and pulmonary effects. *J Pediatr Surg*. 1997;32(9):1328-31.
46. Deprest J, Gratacos E, Nicolaides KH. Fetoscopic tracheal occlusion (FETO) for severe congenital diaphragmatic hernia: evolution of a technique and preliminary results. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2004;24(2):121-6.
47. Benachi A, Saada J, Martinovic J, et al. [Congenital diaphragmatic hernia: antenatal care]. *Rev Mal Respir*. 2011;28(6):800-8.
48. Ali K, Grigoratos D, Cornelius V, et al. Outcome of CDH infants following fetoscopic tracheal occlusion - influence of premature delivery. *J Pediatr Surg*. 2013;48(9):1831-6.
49. Davey MG, Danzer E, Schwarz U, et al. Prenatal glucocorticoids improve lung morphology and partially restores surfactant mRNA expression in lambs with diaphragmatic hernia undergoing fetal tracheal occlusion. *Pediatr Pulmonol*. 2006;41(12):1188-96.
50. Clugston RD, Klattig J, Englert C, et al. Teratogen-induced, dietary and genetic models of congenital diaphragmatic hernia share a common mechanism of pathogenesis. *Am J Pathol*. 2006;169(5):1541-9.
51. Ruano R, Yoshisaki CT, da Silva MM, et al. A randomized controlled trial of fetal endoscopic tracheal occlusion versus postnatal management of severe isolated congenital diaphragmatic hernia. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2012;39(1):20-7.
52. Roubliova XI, Deprest JA, Biard JM, et al. Morphologic changes and methodological issues in the rabbit experimental model for diaphragmatic hernia. *Histol Histopathol*. 2010;25(9):1105-16.
53. DeKoninck P, Toelen J, Roubliova X, et al. The use of human amniotic fluid stem cells as an adjunct to promote pulmonary development in a rabbit model for congenital diaphragmatic hernia. *Prenat Diagn*. 2015;35(9):833-40.
54. Keller RL, Hawgood S, Neuhaus JM, et al. Infant pulmonary function in a randomized trial of fetal tracheal occlusion for severe congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Res*. 2004;56(5):818-25.
55. Jani JC, Flemmer AW, Bergmann F, et al. The effect of fetal tracheal occlusion on lung tissue mechanics and tissue composition. *Pediatr Pulmonol*. 2009;44(2):112-21.

- 1  
2  
3 56. Benachi A, Delezoide AL, Chailley-Heu B, et al. Ultrastructural evaluation of lung  
4 maturation in a sheep model of diaphragmatic hernia and tracheal occlusion. *Am J Respir Cell*  
5 *Mol Biol.* 1999;20(4):805-12.  
6 57. Michael JR, Markewitz BA. Endothelins and the lung. *Am J Respir Crit Care Med.*  
7 1996;154(3 Pt 1):555-81.  
8 58. Kobayashi H, Puri P. Plasma endothelin levels in congenital diaphragmatic hernia. *J*  
9 *Pediatr Surg.* 1994;29(9):1258-61.  
10 59. Okazaki T, Sharma HS, McCune SK, et al. Pulmonary vascular balance in congenital  
11 diaphragmatic hernia: enhanced endothelin-1 gene expression as a possible cause of  
12 pulmonary vasoconstriction. *J Pediatr Surg.* 1998;33(1):81-4.  
13 60. Coppola CP, Au-Fliegner M, Gosche JR. Endothelin-1 pulmonary vasoconstriction in  
14 rats with diaphragmatic hernia. *J Surg Res.* 1998;76(1):74-8.  
15 61. Dingemann J, Doi T, Rutenstock E, et al. Upregulation of endothelin receptors A and  
16 B in the nitrofen induced hypoplastic lung occurs early in gestation. *Pediatr Surg Int.*  
17 2010;26(1):65-9.  
18 62. de Lagausie P, de Buys-Roessingh A, Ferkdadjji L, et al. Endothelin receptor  
19 expression in human lungs of newborns with congenital diaphragmatic hernia. *J Pathol.*  
20 2005;205(1):112-8.  
21 63. Yokota J, Kawana M, Hidai C, et al. Retinoic acid suppresses endothelin-1 gene  
22 expression at the transcription level in endothelial cells. *Atherosclerosis.* 2001;159(2):491-6.  
23 64. Frankel SR, Eardley A, Lauwers G, et al. The "retinoic acid syndrome" in acute  
24 promyelocytic leukemia. *Ann Intern Med.* 1992;117(4):292-6.  
25 65. Yoshizawa J, Chapin CJ, Sbragia L, et al. Tracheal occlusion stimulates cell cycle  
26 progression and type I cell differentiation in lungs of fetal rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol*  
27 *Physiol.* 2003;285(2):L344-53.  
28 66. Benachi A, Chailley-Heu B, Delezoide AL, et al. Lung growth and maturation after  
29 tracheal occlusion in diaphragmatic hernia. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(3 Pt  
30 1):921-7.  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Figure 1:** Lung morphometry and connective tissue quantification



<http://mc.manuscriptcentral.com/pd>

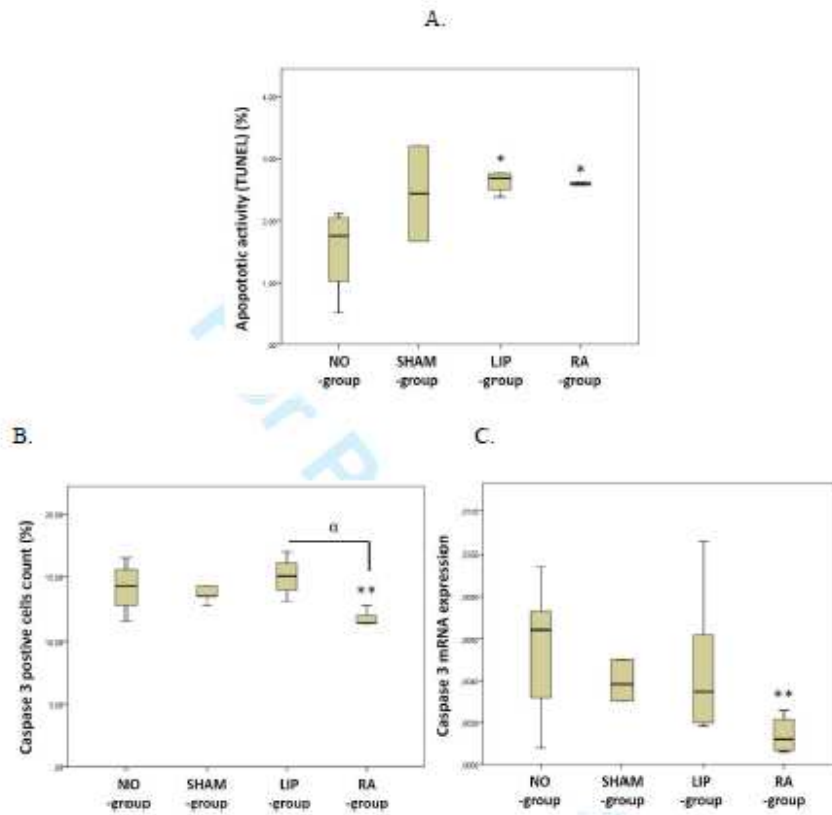
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

A. Lung-to-body weight ratio (LBWR); B. Radial alveolar count (RAC); C. Collagen proportion; D. Elastin proportion; E. Tropoelastin mRNA expression (\*  $p < 0.05$  vs. NO-group; \*\*  $p < 0.05$  vs. SHAM-group)

For Peer Review

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

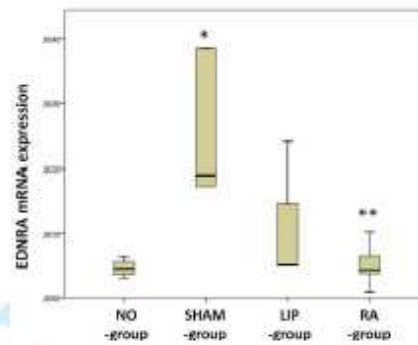
**Figure 2:** Apoptotic cellular activity



A. Apoptotic activity evaluated by TUNEL; B. Caspase 3 positive cells count; C. Caspase 3 mRNA expression (\*  $p < 0.05$  vs. NO-group; \*\*  $p < 0.05$  vs. SHAM-group;  $\alpha$   $p < 0.05$  between the LIP-group and the RA-group)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

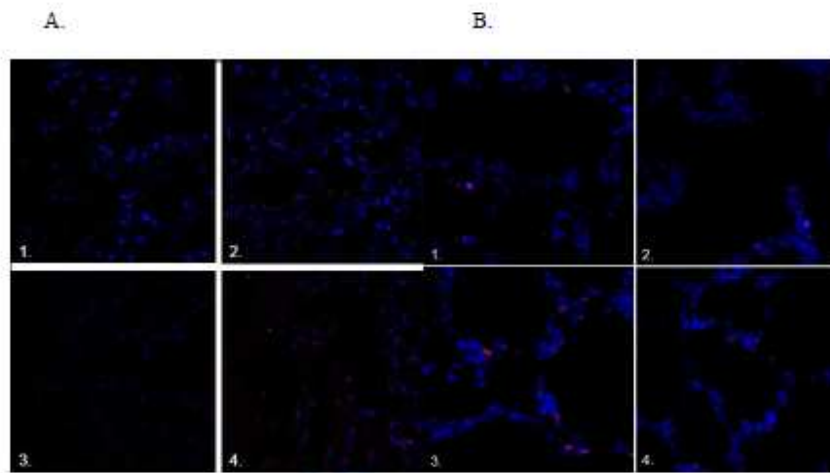
**Figure 3:** Pulmonary gene expression levels of Type A endothelin-1 receptor (EDNRA)



EDNRA mRNA expression (\*  $p < 0.05$  vs. NO-group; \*\*  $p < 0.05$  vs. SHAM-group)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Figure 4:** SP-B and RT1<sub>40</sub> immunohistochemistry



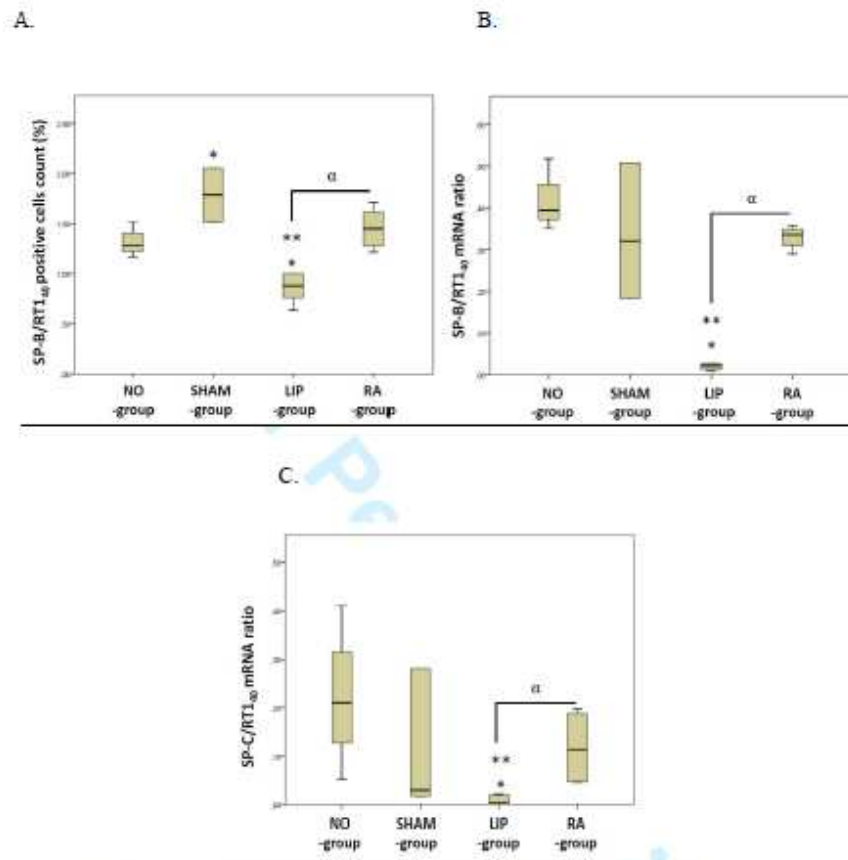
A. SP-B immunochemistry

B. RT1<sub>40</sub> immunochemistry

1. NO-group. 2. SHAM-group. 3. LIP-group. 4. RA-group.

The cell nuclei are labelled blue. SP-B and RT1<sub>40</sub> proteins was marked in red.



**Figure 5:** Pulmonary surfactant production

A. SP-B/RT140 positive cells ratio; B. SP-B/RT140 mRNA ratio; C. SP-C/RT140 mRNA ratio  
 (\*  $p < 0.05$  vs. NO-group; \*\*  $p < 0.05$  vs. SHAM-group;  $\alpha$   $p < 0.05$  between the LIP-group and the RA-group)

**Table 1** Oligonucleotides used for PCR amplification

Gene	Sequence (5'-3')
Tropoelastin	Forward: AGCCAAATACGGTGCTGCT
	Reverse: CACCTGGGTAAATGGGAGAC
Caspase 3	Forward: GCCAGAAAATACCGGTTGAA
	Reverse: ACACAGGGACTGGATGAACC
EDNRA	Forward: AGGGGTGAACAGCACAAAAC
	Reverse: ATGTTCACTGAGGGCAATCC
SP-B	Forward: ACTGTCTACAGGAAGTCTG
	Reverse: GAAGTAGACGTCAAGCACG
SP-C	Forward: CAAAGAGGCCTTGATGGAGA
	Reverse: ATCTCTAGGACCATCTCGGT
Caveolin 1	Forward: GTGAACGAGAAGCAAGTGTA
	Reverse: TATTTTCGTCACAGTGAAGGT
RPLP0	Forward: GACCTGGAAGTCCAATACT
	Reverse: ACTCAGTCTCCACAGACAAA
GAPDH	Forward: AGACACGATGGTGAAGGTCG
	Reverse: TGCCGTGGGTGGAATCATACT
$\beta$ actin	Forward: ATGTTTGTGATGGGCGTGAA
	Reverse: CGAAGTGGTCGTGGATGA

Table 2: Results

	Groups				Comparisons					
	NO-group	SHAM-group	LIP-group	RA-group	RA-group vs.			LIP-group vs.		SHAM-group vs.
					NO-group	SHAM-group	LIP-group	NO-group	SHAM-group	NO-group
LBWR	2.421 (1.850-4.000)	1.009 (1.005-1.702)	2.537 (1.653-2.999)	2.026 (1.748-2.441)	0.492	0.009	0.429	0.841	0.017	0.004
RAC	4.011 (3.511-4.601)	4.011 (3.511-4.601)	5.100 (4.660-6.091)	4.785 (4.683-6.530)	0.492	0.009	1.000	0.690	0.017	0.004
Collagen proportion (%)	3.68 (3.45-3.91)	4.18 (3.51-5.74)	2.69 (2.50-3.70)	2.87 (2.51-3.20)	1.000	0.010	1.000	0.686	0.038	0.038
Elastin proportion (%)	3.68 (3.45-3.91)	3.45 (3.30-3.61)	3.36 (2.70-4.13)	2.85 (2.08-3.52)	0.063	0.190	0.286	0.886	1.000	0.114
Tropoelastin mRNA	0.0481 (0.0200-0.0818)	0.0052 (0.0022-0.0878)	0.0477 (0.0061-0.0459)	0.0771 (0.0066-0.2200)	0.343	0.886	0.730	0.343	0.286	1.000
TUNEL (%)	1.75 (0.77-2.07)	2.43 (1.66-3.20)	2.68 (2.44-2.76)	2.59 (2.57-2.62)	0.029	1.000	0.686	0.029	1.000	0.343
Caspase 3 positive cells (%)	14.43 (12.24-16.06)	13.60 (13.22-14.43)	15.07 (13.68-16.55)	11.47 (11.45-12.48)	0.063	0.016	0.016	0.486	0.190	0.556
Caspase 3 mRNA	0.0064 (0.0020-0.0084)	0.0038 (0.0030-0.0050)	0.0035 (0.0019-0.0084)	0.0012 (0.0006-0.0023)	0.052	0.010	0.063	0.841	0.931	0.429
EDNRA mRNA	0.0004 (0.0003-0.0006)	0.0019 (0.0017-0.0039)	0.0005 (0.0005-0.0019)	0.0004 (0.0002-0.0008)	0.100	0.004	1.000	0.200	0.114	0.010
SP-B/RTI <sub>98</sub> positive cells ratio	1.28 (1.19-1.46)	1.79 (1.52-2.05)	0.88 (0.70-1.00)	1.45 (1.26-1.64)	0.257	0.257	0.004	0.016	0.016	0.029
SP-B/RTI <sub>98</sub> mRNA ratio	0.395 (0.362-0.487)	0.320 (0.183-0.508)	0.021 (0.010-0.026)	0.336 (0.300-0.352)	0.057	0.726	0.029	0.029	0.010	0.257
SP-C/RTI <sub>98</sub> mRNA ratio	0.210 (0.090-0.363)	0.030 (0.0189-0.281)	0.003 (0.003-0.022)	0.114 (0.047-0.192)	0.114	0.476	0.016	0.016	0.052	0.725

LBWR: lung-body-weight ratio; RAC : radial alveolar count.

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La HCD congénitale est une anomalie de développement du diaphragme survenant au cours de l'embryogénèse, qui laisse persister une communication entre les cavités péritonéale et pleurale. Elle concerne entre 2 et 4/10000 naissances vivantes. Ce défaut musculaire permet la migration intrathoracique de viscères abdominaux et nuit à l'efficacité inspiratoire des mouvements diaphragmatiques foetaux. Il en résulte une compression des viscères thoraciques qui se solde essentiellement par une hypoplasie pulmonaire, un défaut de maturation alvéolaire et une HTAP, à l'origine de difficultés importantes à l'adaptation néonatale. La mortalité périnatale est élevée (environ 50%, comprenant les interruptions de grossesses et les pertes foetales). Malgré les progrès de la prise en charge néonatale, la morbidité reste importante chez les enfants survivants avec un risque accru de DBP, de pathologies pulmonaires obstructives et restrictives, de scoliozes, de RGO, de déficits neurodéveloppementaux et neurosensoriels<sup>3</sup>.

Pour les formes isolées les plus sévères, une prise en charge anténatale est proposée par réalisation d'une OT par voie endoscopique permettant une amélioration de la croissance pulmonaire. Ce geste s'accompagne d'une accélération de la maturation pulmonaire, observée sur modèles animaux, avec une diminution du taux de PII, cellules sécrétrices de surfactant pulmonaire. Cet effet délétère de l'OT peut être partiellement corrigé par une désocclusion trachéale avant la naissance (séquence plug-unplug<sup>4</sup>) et/ou par l'administration de stéroïdes<sup>5,6</sup>. L'administration de rétinoides pourrait aussi influencer la différenciation pulmonaire et améliorer le pronostic foetal après OT pour HCD. L'AR intervient dans tous les stades du développement pulmonaire des mammifères. Des travaux menés sur les modèles murins ont permis d'établir un lien entre rétinoides et HCD, notamment dans le modèle nitrofen. Il a été montré qu'une perturbation de la voie métabolique des rétinoides pouvait entraîner la

formation de HCD chez le fœtus. La supplémentation en rétinol ou en AR aux instants clés du développement pulmonaire permettait d'en réduire l'incidence. Une supplémentation maternelle en AR permet de corriger les anomalies de maturation pulmonaire présentes dans les HCD créées chirurgicalement chez des fœtus lapins<sup>7</sup>. Mais l'AR ne permet pas de corriger l'hypoplasie pulmonaire pour laquelle il est actuellement proposé de réaliser une OT per fetoscopie dans les formes les plus sévères de HDC en pratique clinique.

Suite à ces données, nous avons étudié les effets d'une administration d'AR directement dans la trachée foetale, au plus près du tissu cible, le poumon, en complément de l'OT. Afin de pouvoir délivrer de l'AR en intra-trachéal, dans le même temps opératoire que l'OT, il était nécessaire de trouver un véhicule pour cette molécule lipophile à instiller en milieu aqueux. En utilisant un modèle de fœtus lapin à poumon sain, nous avons étudié deux véhicules possibles, les liposomes et le Miglyol<sup>®</sup>. Les liposomes sont couramment utilisés pour l'administration, notamment intraveineuse, de l'AR. Le Miglyol<sup>®</sup>, huile neutre, est utilisé en ophtalmologie pour l'application de l'AR du fait de ses capacités de transport de molécules hydrophobes dans un milieu aqueux. En comparant les effets de l'injection intratrachéale, en complément d'une OT, de ces deux molécules, vides ou couplées à de l'AR, et de sérum physiologique, nous avons pu confirmer que l'OT, quelque soit la molécule injectée dans la trachée, permettait d'augmenter le volume pulmonaire et de modifier l'anatomie des voies aériennes en augmentant le CRA. La production de SP-B, protéine du surfactant, était conservée avec l'adjonction d'AR alors qu'elle était diminuée lorsque du sérum physiologique était administré. Cet effet semblait plus marqué lorsque l'AR était couplé aux liposomes. Les liposomes ont donc été choisis comme véhicule pour étudier les effets de l'injection intratrachéale d'AR couplée à l'OT sur le modèle chirurgical lapin de HDC. Nos résultats montraient que l'administration d'AR semblait diminuer le phénomène d'apoptose, potentialisait l'effet de l'OT sur l'expression d'EDNRA, reflet d'HTAP, et normalisait la

production des protéines du surfactant, diminuée en cas d'OT. En conclusion, l'administration intratrachéale d'AR en même temps que l'OT pourrait améliorer la vascularisation et la maturation pulmonaires.

Afin d'étayer les possibilités de l'AR dans ce contexte, des études complémentaires devront être menées, notamment avec un plus grand nombre de fœtus lapin. Une expérimentation sur un autre modèle animal, ovin par exemple, pourrait déterminer si ces résultats sont valables sur d'autres espèces. Une analyse plus fine du contenu en tissus conjonctifs avec étude de la distribution spatiale<sup>144,227</sup> et des études mécaniques<sup>139</sup> permettraient de mieux comprendre les effets éventuels sur la compliance et l'élasticité pulmonaires. Pour évaluer les effets de l'AR sur la vasculopathie artérielle pulmonaire, des mesures histologiques<sup>136,228</sup>, des marqueurs moléculaires du remodelage vasculaire (endothéline 1, VEGF, FGF)<sup>54,229</sup>, des mesures dopplers<sup>113,230,231</sup> et invasives des pressions intravasculaires pourraient être étudiés sur des fœtus et nouveau-nés de modèles animaux.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. McGivern MR, Best KE, Rankin J, et al. Epidemiology of congenital diaphragmatic hernia in Europe: a register-based study. *Archives of disease in childhood Fetal and neonatal edition*. 2015;100(2):F137-44.
2. Gallot D, Boda C, Ughetto S, et al. Prenatal detection and outcome of congenital diaphragmatic hernia: a French registry-based study. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2007;29(3):276-83.
3. Kotecha S, Barbato A, Bush A, et al. Congenital diaphragmatic hernia. *Eur Respir J*. 2012;39(4):820-9.
4. Flageole H, Evrard VA, Piedboeuf B, et al. The plug-unplug sequence: an important step to achieve type II pneumocyte maturation in the fetal lamb model. *J Pediatr Surg*. 1998;33(2):299-303.
5. Bratu I, Flageole H, Laberge JM, et al. Surfactant levels after reversible tracheal occlusion and prenatal steroids in experimental diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*. 2001;36(1):122-7.
6. Davey MG, Danzer E, Schwarz U, et al. Prenatal glucocorticoids improve lung morphology and partially restores surfactant mRNA expression in lambs with diaphragmatic hernia undergoing fetal tracheal occlusion. *Pediatr Pulmonol*. 2006;41(12):1188-96.
7. Gallot D, Coste K, Jani J, et al. Effects of maternal retinoic acid administration in a congenital diaphragmatic hernia rabbit model. *Pediatr Pulmonol*. 2008;43(6):594-603.
8. Blomhoff R. Transport and metabolism of vitamin A. *Nutr Rev*. 1994;52(2 Pt 2):S13-23.
9. Beurskens LW, Tibboel D, Lindemans J, et al. Retinol status of newborn infants is associated with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatrics*. 2010;126(4):712-20.
10. Coste K, Beurskens LW, Blanc P, et al. Metabolic disturbances of the vitamin A pathway in human diaphragmatic hernia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015;308(2):L147-57.
11. Hislop AA. Airway and blood vessel interaction during lung development. *J Anat*. 2002;201(4):325-34.
12. Fuchs S, Hollins AJ, Laue M, et al. Differentiation of human alveolar epithelial cells in primary culture: morphological characterization and synthesis of caveolin-1 and surfactant protein-C. *Cell Tissue Res*. 2003;311(1):31-45.
13. Nkadi PO, Merritt TA, Pillers DA. An overview of pulmonary surfactant in the neonate: genetics, metabolism, and the role of surfactant in health and disease. *Mol Genet Metab*. 2009;97(2):95-101.
14. Awasthi S, Wolf R, White G. Ontogeny and phagocytic function of baboon lung dendritic cells. *Immunol Cell Biol*. 2009;87(5):419-27.
15. Lazarus A, Del-Moral PM, Ilovich O, et al. A perfusion-independent role of blood vessels in determining branching stereotypy of lung airways. *Development*. 2011;138(11):2359-68.
16. Blanc P, Coste K, Pouchin P, et al. A role for mesenchyme dynamics in mouse lung branching morphogenesis. *PLoS One*. 2012;7(7):e41643.
17. Goss AM, Tian Y, Tsukiyama T, et al. Wnt2/2b and beta-catenin signaling are necessary and sufficient to specify lung progenitors in the foregut. *Dev Cell*. 2009;17(2):290-8.
18. Sakiyama J, Yamagishi A, Kuroiwa A. Tbx4-Fgf10 system controls lung bud formation during chicken embryonic development. *Development*. 2003;130(7):1225-34.

19. Weng T, Liu L. The role of pleiotrophin and beta-catenin in fetal lung development. *Respir Res.* 2010;11:80.
20. Chang DR, Martinez Alanis D, Miller RK, et al. Lung epithelial branching program antagonizes alveolar differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(45):18042-51.
21. Wilson JG, Roth CB, Warkany J. An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. *Am J Anat.* 1953;92(2):189-217.
22. Mendelsohn C, Lohnes D, Decimo D, et al. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development.* 1994;120(10):2749-71.
23. Desai TJ, Malpel S, Flentke GR, et al. Retinoic acid selectively regulates Fgf10 expression and maintains cell identity in the prospective lung field of the developing foregut. *Dev Biol.* 2004;273(2):402-15.
24. Malpel S, Mendelsohn C, Cardoso WV. Regulation of retinoic acid signaling during lung morphogenesis. *Development.* 2000;127(14):3057-67.
25. McGowan SE, Harvey CS, Jackson SK. Retinoids, retinoic acid receptors, and cytoplasmic retinoid binding proteins in perinatal rat lung fibroblasts. *Am J Physiol.* 1995;269(4 Pt 1):L463-72.
26. Maden M, Hind M. Retinoic acid in alveolar development, maintenance and regeneration. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2004;359(1445):799-808.
27. Coste K, Gallot D, Marceau G, et al. Expression of retinoid receptors during rabbit lung development. *Animal.* 2007;1:403-9.
28. Warbuton D, Bellusci S, De Langhe S, et al. Molecular Mechanisms of Early Lung Specification and Branching Morphogenesis. *Pediatric Research.* 2005;57(5):26-36.
29. Harrison MR, Jester JA, Ross NA. Correction of congenital diaphragmatic hernia in utero. I. The model: intrathoracic balloon produces fatal pulmonary hypoplasia. *Surgery.* 1980;88(1):174-82.
30. Hill AC, Adzick NS, Stevens MB, et al. Fetal lamb pulmonary hypoplasia: pulmonary vascular and myocardial abnormalities. *Ann Thorac Surg.* 1994;57(4):946-51.
31. Hooper SB, Harding R. Fetal lung liquid: a major determinant of the growth and functional development of the fetal lung. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1995;22(4):235-47.
32. Nardo L, Hooper SB, Harding R. Stimulation of lung growth by tracheal obstruction in fetal sheep: relation to luminal pressure and lung liquid volume. *Pediatr Res.* 1998;43(2):184-90.
33. Alcorn D, Adamson TM, Lambert TF, et al. Morphological effects of chronic tracheal ligation and drainage in the fetal lamb lung. *J Anat.* 1977;123(Pt 3):649-60.
34. Harding R, Hooper SB. Regulation of lung expansion and lung growth before birth. *J Appl Physiol (1985).* 1996;81(1):209-24.
35. De Paepe ME, Johnson BD, Papadakis K, et al. Temporal pattern of accelerated lung growth after tracheal occlusion in the fetal rabbit. *Am J Pathol.* 1998;152(1):179-90.
36. Miller AA, Hooper SB, Harding R. Role of fetal breathing movements in control of fetal lung distension. *J Appl Physiol (1985).* 1993;75(6):2711-7.
37. Inanlou MR, Kablar B. Abnormal development of the diaphragm in mdx:MyoD<sup>-/-</sup> (9th) embryos leads to pulmonary hypoplasia. *Int J Dev Biol.* 2003;47(5):363-71.
38. Jesudason EC, Smith NP, Connell MG, et al. Peristalsis of airway smooth muscle is developmentally regulated and uncoupled from hypoplastic lung growth. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006;291(4):L559-65.
39. Keijzer R, Liu J, Deimling J, et al. Dual-hit hypothesis explains pulmonary hypoplasia in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia. *Am J Pathol.* 2000;156(4):1299-306.



40. Klaassens M, de Klein A, Tibboel D. The etiology of congenital diaphragmatic hernia: still largely unknown? *Eur J Med Genet.* 2009;52(5):281-6.
41. Allan DW, Greer JJ. Embryogenesis of the phrenic nerve and diaphragm in the fetal rat. *J Comp Neurol.* 1997;382(4):459-68.
42. Merrell AJ, Kardon G. Development of the diaphragm -- a skeletal muscle essential for mammalian respiration. *FEBS J.* 2013;280(17):4026-35.
43. Gallot D, Marceau G, Coste K, et al. Congenital diaphragmatic hernia: a retinoid-signaling pathway disruption during lung development? *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2005;73(8):523-31.
44. Gosche JR, Islam S, Boulanger SC. Congenital diaphragmatic hernia: searching for answers. *Am J Surg.* 2005;190(2):324-32.
45. Iritani I. Experimental study on embryogenesis of congenital diaphragmatic hernia. *Anat Embryol (Berl).* 1984;169(2):133-9.
46. Kluth D, Tenbrinck R, von Ekesparre M, et al. The natural history of congenital diaphragmatic hernia and pulmonary hypoplasia in the embryo. *J Pediatr Surg.* 1993;28(3):456-62; discussion 62-3.
47. Allan DW, Greer JJ. Pathogenesis of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in fetal rats. *J Appl Physiol (1985).* 1997;83(2):338-47.
48. Skandalakis J GS, Ricketts R. The diaphragm. In *Embryology for Surgeons*, ed J Skandalakis, S Gray, pp 491-539 Baltimore, MD: Williams and Wilkins. 1994.
49. Babiuk RP, Greer JJ. Diaphragm defects occur in a CDH hernia model independently of myogenesis and lung formation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;283(6):L1310-4.
50. Alles AJ, Losty PD, Donahoe PK, et al. Embryonic cell death patterns associated with nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 1995;30(2):353-8; discussion 9-60.
51. Clugston RD, Zhang W, Alvarez S, et al. Understanding abnormal retinoid signaling as a causative mechanism in congenital diaphragmatic hernia. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009;42(3):276-85.
52. Teramoto H, Yoneda A, Puri P. Gene expression of fibroblast growth factors 10 and 7 is downregulated in the lung of nitrofen-induced diaphragmatic hernia in rats. *J Pediatr Surg.* 2003;38(7):1021-4.
53. Chang R, Andreoli S, Ng YS, et al. VEGF expression is downregulated in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 2004;39(6):825-8; discussion -8.
54. Sbragia L, Nassr AC, Goncalves FL, et al. VEGF receptor expression decreases during lung development in congenital diaphragmatic hernia induced by nitrofen. *Braz J Med Biol Res.* 2014;47(2):171-8.
55. Klaassens M, van Dooren M, Eussen HJ, et al. Congenital diaphragmatic hernia and chromosome 15q26: determination of a candidate region by use of fluorescent in situ hybridization and array-based comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet.* 2005;76(5):877-82.
56. Pereira FA, Tsai MJ, Tsai SY. COUP-TF orphan nuclear receptors in development and differentiation. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57(10):1388-98.
57. Pasutto F, Sticht H, Hammersen G, et al. Mutations in STRA6 cause a broad spectrum of malformations including anophthalmia, congenital heart defects, diaphragmatic hernia, alveolar capillary dysplasia, lung hypoplasia, and mental retardation. *Am J Hum Genet.* 2007;80(3):550-60.
58. Greer JJ, Babiuk RP, Thebaud B. Etiology of congenital diaphragmatic hernia: the retinoid hypothesis. *Pediatr Res.* 2003;53(5):726-30.

59. Ackerman KG, Herron BJ, Vargas SO, et al. Fog2 is required for normal diaphragm and lung development in mice and humans. *PLoS Genet.* 2005;1(1):58-65.
60. Wigglesworth JS, Desai R, Guerrini P. Fetal lung hypoplasia: biochemical and structural variations and their possible significance. *Arch Dis Child.* 1981;56(8):606-15.
61. Davey MG, Biard JM, Robinson L, et al. Surfactant protein expression is increased in the ipsilateral but not contralateral lungs of fetal sheep with left-sided diaphragmatic hernia. *Pediatr Pulmonol.* 2005;39(4):359-67.
62. Chinoy MR. Pulmonary hypoplasia and congenital diaphragmatic hernia: advances in the pathogenetics and regulation of lung development. *J Surg Res.* 2002;106(1):209-23.
63. Sluiter I, van der Horst I, van der Voorn P, et al. Premature differentiation of vascular smooth muscle cells in human congenital diaphragmatic hernia. *Exp Mol Pathol.* 2013;94(1):195-202.
64. Beals DA, Schloo BL, Vacanti JP, et al. Pulmonary growth and remodeling in infants with high-risk congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 1992;27(8):997-1001; discussion -2.
65. Boda. *Hernie diaphragmatique et diagnostic anténatal: étude rétrospective du registre France Centre-Est des malformations de 1986 à 2003.* Thèse pour le Doctorat d'Etat de Médecine, Clermont-Ferrand. 2005:126 pp.
66. Leeuwen L, Fitzgerald DA. Congenital diaphragmatic hernia. *J Paediatr Child Health.* 2014.
67. Wright JC, Budd JL, Field DJ, et al. Epidemiology and outcome of congenital diaphragmatic hernia: a 9-year experience. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2010;25(2):144-9.
68. Dott MM, Wong LY, Rasmussen SA. Population-based study of congenital diaphragmatic hernia: risk factors and survival in Metropolitan Atlanta, 1968-1999. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2003;67(4):261-7.
69. Samangaya RA, Choudhri S, Murphy F, et al. Outcomes of congenital diaphragmatic hernia: a 12-year experience. *Prenat Diagn.* 2012;32(6):523-9.
70. McAteer JP, Hecht A, De Roos AJ, et al. Maternal medical and behavioral risk factors for congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 2014;49(1):34-8; discussion 8.
71. Burgos CM, Frenckner B. Addressing the hidden mortality in CDH: A population-based study. *J Pediatr Surg.* 2016.
72. Pennaforte T, Rakza T, Fily A, et al. [The long-term follow-up of patients with a congenital diaphragmatic hernia: review of the literature]. *Arch Pediatr.* 2013;20 Suppl 1:S11-8.
73. Debus A, Hagelstein C, Kilian AK, et al. Fetal lung volume in congenital diaphragmatic hernia: association of prenatal MR imaging findings with postnatal chronic lung disease. *Radiology.* 2013;266(3):887-95.
74. Zalla JM, Stoddard GJ, Yoder BA. Improved mortality rate for congenital diaphragmatic hernia in the modern era of management: 15 year experience in a single institution. *J Pediatr Surg.* 2015;50(4):524-7.
75. Danzer E, Hedrick HL. Neurodevelopmental and neurofunctional outcomes in children with congenital diaphragmatic hernia. *Early Hum Dev.* 2011;87(9):625-32.
76. Wynn J, Aspelund G, Zygmunt A, et al. Developmental outcomes of children with congenital diaphragmatic hernia: a multicenter prospective study. *J Pediatr Surg.* 2013;48(10):1995-2004.
77. Spoel M, van der Cammen-van Zijp MH, Hop WC, et al. Lung function in young adults with congenital diaphragmatic hernia; a longitudinal evaluation. *Pediatr Pulmonol.* 2013;48(2):130-7.
78. Hubbard AM, Crombleholme TM, Adzick NS, et al. Prenatal MRI evaluation of congenital diaphragmatic hernia. *Am J Perinatol.* 1999;16(8):407-13.

79. Harrison MR, Mychaliska GB, Albanese CT, et al. Correction of congenital diaphragmatic hernia in utero IX: fetuses with poor prognosis (liver herniation and low lung-to-head ratio) can be saved by fetoscopic temporary tracheal occlusion. *J Pediatr Surg.* 1998;33(7):1017-22; discussion 22-3.
80. Adzick NS, Vacanti JP, Lillehei CW, et al. Fetal diaphragmatic hernia: ultrasound diagnosis and clinical outcome in 38 cases. *J Pediatr Surg.* 1989;24(7):654-7; discussion 7-8.
81. Graham G, Devine PC. Antenatal diagnosis of congenital diaphragmatic hernia. *Semin Perinatol.* 2005;29(2):69-76.
82. Rossi A, Delabaere A, Delmas-Laurichesse H, et al. The challenge of prenatal identification of congenital diaphragmatic hernia in the context of hydrops. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2014;182:238-9.
83. Toelen J, Carlon M, Claus F, et al. The fetal respiratory system as target for antenatal therapy. *Facts Views Vis Obgyn.* 2011;3(1):22-35.
84. Lewis DA, Reickert C, Bowerman R, et al. Prenatal ultrasonography frequently fails to diagnose congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 1997;32(2):352-6.
85. Dillon E, Renwick M, Wright C. Congenital diaphragmatic herniation: antenatal detection and outcome. *Br J Radiol.* 2000;73(868):360-5.
86. Jani J, Peralta CF, Benachi A, et al. Assessment of lung area in fetuses with congenital diaphragmatic hernia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007;30(1):72-6.
87. Metkus AP, Filly RA, Stringer MD, et al. Sonographic predictors of survival in fetal diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 1996;31(1):148-51; discussion 51-2.
88. Lipshutz GS, Albanese CT, Feldstein VA, et al. Prospective analysis of lung-to-head ratio predicts survival for patients with prenatally diagnosed congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 1997;32(11):1634-6.
89. Cruz-Martinez R, Figueras F, Moreno-Alvarez O, et al. Learning curve for lung area to head circumference ratio measurement in fetuses with congenital diaphragmatic hernia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2010;36(1):32-6.
90. Flake AW, Crombleholme TM, Johnson MP, et al. Treatment of severe congenital diaphragmatic hernia by fetal tracheal occlusion: clinical experience with fifteen cases. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;183(5):1059-66.
91. Paek BW, Coakley FV, Lu Y, et al. Congenital diaphragmatic hernia: prenatal evaluation with MR lung volumetry--preliminary experience. *Radiology.* 2001;220(1):63-7.
92. Jani J, Nicolaidis KH, Keller RL, et al. Observed to expected lung area to head circumference ratio in the prediction of survival in fetuses with isolated diaphragmatic hernia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007;30(1):67-71.
93. Jani J, Nicolaidis KH, Benachi A, et al. Timing of lung size assessment in the prediction of survival in fetuses with diaphragmatic hernia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008;31(1):37-40.
94. Jani JC, Cordier AG, Martinovic J, et al. Antenatal ultrasound prediction of pulmonary hypoplasia in congenital diaphragmatic hernia: correlation with pathology. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2011;38(3):344-9.
95. Ruano R, Benachi A, Joubin L, et al. Three-dimensional ultrasonographic assessment of fetal lung volume as prognostic factor in isolated congenital diaphragmatic hernia. *BJOG.* 2004;111(5):423-9.
96. Deprest JA, Flemmer AW, Gratacos E, et al. Antenatal prediction of lung volume and in-utero treatment by fetal endoscopic tracheal occlusion in severe isolated congenital diaphragmatic hernia. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2009;14(1):8-13.
97. Madenci AL, Sjogren AR, Treadwell MC, et al. Another dimension to survival: predicting outcomes with fetal MRI versus prenatal ultrasound in patients with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 2013;48(6):1190-7.

98. Ruano R, Takashi E, da Silva MM, et al. Prediction and probability of neonatal outcome in isolated congenital diaphragmatic hernia using multiple ultrasound parameters. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2012;39(1):42-9.
99. Alfaraj MA, Shah PS, Bohn D, et al. Congenital diaphragmatic hernia: lung-to-head ratio and lung volume for prediction of outcome. *Am J Obstet Gynecol.* 2011;205(1):43 e1-8.
100. Russo FM, Eastwood MP, Keijzer R, et al. Lung size and liver herniation predict the need for extra corporeal membrane oxygenation but not pulmonary hypertension in isolated congenital diaphragmatic hernia: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016.
101. Jani J, Keller RL, Benachi A, et al. Prenatal prediction of survival in isolated left-sided diaphragmatic hernia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2006;27(1):18-22.
102. Done E, Gratacos E, Nicolaidis KH, et al. Predictors of neonatal morbidity in fetuses with severe isolated congenital diaphragmatic hernia undergoing fetoscopic tracheal occlusion. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013;42(1):77-83.
103. Jani JC, Peralta CF, Ruano R, et al. Comparison of fetal lung area to head circumference ratio with lung volume in the prediction of postnatal outcome in diaphragmatic hernia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007;30(6):850-4.
104. Cannie MM, Cordier AG, De Laveaucoupet J, et al. Liver-to-thoracic volume ratio: use at MR imaging to predict postnatal survival in fetuses with isolated congenital diaphragmatic hernia with or without prenatal tracheal occlusion. *Eur Radiol.* 2013;23(5):1299-305.
105. Jani J, Cannie M, Sonigo P, et al. Value of prenatal magnetic resonance imaging in the prediction of postnatal outcome in fetuses with diaphragmatic hernia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008;32(6):793-9.
106. Benachi A, Saada J, Martinovic J, et al. [Congenital diaphragmatic hernia: antenatal care]. *Rev Mal Respir.* 2011;28(6):800-8.
107. Schaible T, Kohl T, Reinshagen K, et al. Right- versus left-sided congenital diaphragmatic hernia: postnatal outcome at a specialized tertiary care center. *Pediatr Crit Care Med.* 2012;13(1):66-71.
108. Bebbington M, Victoria T, Danzer E, et al. Comparison of ultrasound and magnetic resonance imaging parameters in predicting survival in isolated left-sided congenital diaphragmatic hernia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2014;43(6):670-4.
109. Nawapun K, Eastwood M, Sandaite I, et al. Correlation of observed-to-expected total fetal lung volume with intrathoracic organ herniation on magnetic resonance imaging in fetuses with isolated left-sided congenital diaphragmatic hernia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;46(2):162-7.
110. Cordier AG, Jani JC, Cannie MM, et al. Stomach position in prediction of survival in left-sided congenital diaphragmatic hernia with or without fetoscopic endoluminal tracheal occlusion. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;46(2):155-61.
111. Mullassery D, Ba'ath ME, Jesudason EC, et al. Value of liver herniation in prediction of outcome in fetal congenital diaphragmatic hernia: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2010;35(5):609-14.
112. Mayer S, Klaritsch P, Petersen S, et al. The correlation between lung volume and liver herniation measurements by fetal MRI in isolated congenital diaphragmatic hernia: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Prenat Diagn.* 2011;31(11):1086-96.
113. Lusk LA, Wai KC, Moon-Grady AJ, et al. Fetal ultrasound markers of severity predict resolution of pulmonary hypertension in congenital diaphragmatic hernia. *Am J Obstet Gynecol.* 2015;213(2):216 e1-8.

114. Cannie M, Jani J, Chaffiotte C, et al. Quantification of intrathoracic liver herniation by magnetic resonance imaging and prediction of postnatal survival in fetuses with congenital diaphragmatic hernia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008;32(5):627-32.
115. Zamora IJ, Olutoye OO, Cass DL, et al. Prenatal MRI fetal lung volumes and percent liver herniation predict pulmonary morbidity in congenital diaphragmatic hernia (CDH). *J Pediatr Surg.* 2014;49(5):688-93.
116. Ruano R, Lazar DA, Cass DL, et al. Fetal lung volume and quantification of liver herniation by magnetic resonance imaging in isolated congenital diaphragmatic hernia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2014;43(6):662-9.
117. Kitano Y, Okuyama H, Saito M, et al. Re-evaluation of stomach position as a simple prognostic factor in fetal left congenital diaphragmatic hernia: a multicenter survey in Japan. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2011;37(3):277-82.
118. Basta AM, Lusk LA, Keller RL, et al. Fetal Stomach Position Predicts Neonatal Outcomes in Isolated Left-Sided Congenital Diaphragmatic Hernia. *Fetal Diagn Ther.* 2016;39(4):248-55.
119. Lally KP, Lasky RE, Lally PA, et al. Standardized reporting for congenital diaphragmatic hernia--an international consensus. *J Pediatr Surg.* 2013;48(12):2408-15.
120. Sokol J, Bohn D, Lacro RV, et al. Fetal pulmonary artery diameters and their association with lung hypoplasia and postnatal outcome in congenital diaphragmatic hernia. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;186(5):1085-90.
121. Mahieu-Caputo D, Aubry MC, El Sayed M, et al. Evaluation of fetal pulmonary vasculature by power Doppler imaging in congenital diaphragmatic hernia. *J Ultrasound Med.* 2004;23(8):1011-7.
122. Cruz-Martinez R, Castanon M, Moreno-Alvarez O, et al. Usefulness of lung-to-head ratio and intrapulmonary arterial Doppler in predicting neonatal morbidity in fetuses with congenital diaphragmatic hernia treated with fetoscopic tracheal occlusion. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013;41(1):59-65.
123. Rasanen J, Wood DC, Debbs RH, et al. Reactivity of the human fetal pulmonary circulation to maternal hyperoxygenation increases during the second half of pregnancy: a randomized study. *Circulation.* 1998;97(3):257-62.
124. Broth RE, Wood DC, Rasanen J, et al. Prenatal prediction of lethal pulmonary hypoplasia: the hyperoxygenation test for pulmonary artery reactivity. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;187(4):940-5.
125. Vuletin JF, Lim FY, Cnota J, et al. Prenatal pulmonary hypertension index: novel prenatal predictor of severe postnatal pulmonary artery hypertension in antenatally diagnosed congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 2010;45(4):703-8.
126. Partridge EA, Peranteau WH, Herkert L, et al. Right- versus left-sided congenital diaphragmatic hernia: a comparative outcomes analysis. *J Pediatr Surg.* 2016;51(6):900-2.
127. Bouchghoul H, Senat MV, Storme L, et al. Congenital diaphragmatic hernia: does gestational age at diagnosis matter when evaluating morbidity and mortality? *Am J Obstet Gynecol.* 2015;213(4):535 e1-7.
128. Mesas Burgos C, Hammarqvist-Vejde J, Frenckner B, et al. Differences in Outcomes in Prenatally Diagnosed Congenital Diaphragmatic Hernia Compared to Postnatal Detection: A Single-Center Experience. *Fetal Diagn Ther.* 2016;39(4):241-7.
129. Emery JL, Mithal A. The number of alveoli in the terminal respiratory unit of man during late intrauterine life and childhood. *Arch Dis Child.* 1960;35:544-7.
130. Bargo F, Beaudoin S, Barbet P. Fetal lung growth in congenital diaphragmatic hernia. *Fetal Diagn Ther.* 2006;21(1):39-44.

131. Harrison MR, Adzick NS, Longaker MT, et al. Successful repair in utero of a fetal diaphragmatic hernia after removal of herniated viscera from the left thorax. *N Engl J Med.* 1990;322(22):1582-4.
132. Harrison MR, Adzick NS, Bullard KM, et al. Correction of congenital diaphragmatic hernia in utero VII: a prospective trial. *J Pediatr Surg.* 1997;32(11):1637-42.
133. Harrison MR, Adzick NS, Flake AW, et al. Correction of congenital diaphragmatic hernia in utero: VI. Hard-earned lessons. *J Pediatr Surg.* 1993;28(10):1411-7; discussion 7-8.
134. DiFiore J, Wilson J. Lung development. *Semin Pediatr Surg.* 1994;3(4):221-32.
135. Hedrick MH, Estes JM, Sullivan KM, et al. Plug the lung until it grows (PLUG): a new method to treat congenital diaphragmatic hernia in utero. *J Pediatr Surg.* 1994;29(5):612-7.
136. Roubliova XI, Verbeken EK, Wu J, et al. Effect of tracheal occlusion on peripheral pulmonary vessel muscularization in a fetal rabbit model for congenital diaphragmatic hernia. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;191(3):830-6.
137. Wu J, Ge X, Verbeken EK, et al. Pulmonary effects of in utero tracheal occlusion are dependent on gestational age in a rabbit model of diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 2002;37(1):11-7.
138. Flemmer AW, Jani JC, Bergmann F, et al. Lung tissue mechanics predict lung hypoplasia in a rabbit model for congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Pulmonol.* 2007;42(6):505-12.
139. Jani JC, Flemmer AW, Bergmann F, et al. The effect of fetal tracheal occlusion on lung tissue mechanics and tissue composition. *Pediatr Pulmonol.* 2009;44(2):112-21.
140. Roubliova X, BJM, Ophalvens L., Gallot D., Jani J., Verbeken E., Van de Ven C., Tibboel D. and Deprest J. Morphology of the developing fetal lung – the rabbit experimental model: A. Méndez-Vilas and J. Díaz (Eds.); 2007. 417-25 p.
141. Davey MG, Hedrick HL, Bouchard S, et al. Temporary tracheal occlusion in fetal sheep with lung hypoplasia does not improve postnatal lung function. *J Appl Physiol.* 2003;94(3):1054-62.
142. Dekoninck P, Gratacos E, Van Mieghem T, et al. Results of fetal endoscopic tracheal occlusion for congenital diaphragmatic hernia and the set up of the randomized controlled TOTAL trial. *Early Hum Dev.* 2011;87(9):619-24.
143. Benachi A, Chailley-Heu B, Delezoide AL, et al. Lung growth and maturation after tracheal occlusion in diaphragmatic hernia. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(3 Pt 1):921-7.
144. Benachi A, Delezoide AL, Chailley-Heu B, et al. Ultrastructural evaluation of lung maturation in a sheep model of diaphragmatic hernia and tracheal occlusion. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999;20(4):805-12.
145. De Paepe ME, Johnson BD, Papadakis K, et al. Lung growth response after tracheal occlusion in fetal rabbits is gestational age-dependent. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999;21(1):65-76.
146. Deprest J, Gratacos E, Nicolaidis KH. Fetoscopic tracheal occlusion (FETO) for severe congenital diaphragmatic hernia: evolution of a technique and preliminary results. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2004;24(2):121-6.
147. Deprest J, Brady P, Nicolaidis K, et al. Prenatal management of the fetus with isolated congenital diaphragmatic hernia in the era of the TOTAL trial. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2014;19(6):338-48.
148. Harrison MR, Sydorak RM, Farrell JA, et al. Fetoscopic temporary tracheal occlusion for congenital diaphragmatic hernia: prelude to a randomized, controlled trial. *J Pediatr Surg.* 2003;38(7):1012-20.

149. Jimenez JA, Eixarch E, DeKoninck P, et al. Balloon removal after fetoscopic endoluminal tracheal occlusion for congenital diaphragmatic hernia. *Am J Obstet Gynecol.* 2017.
150. Jani JC, Nicolaides KH, Gratacos E, et al. Severe diaphragmatic hernia treated by fetal endoscopic tracheal occlusion. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009;34(3):304-10.
151. Ali K, Grigoratos D, Cornelius V, et al. Outcome of CDH infants following fetoscopic tracheal occlusion - influence of premature delivery. *J Pediatr Surg.* 2013;48(9):1831-6.
152. Ali K, Bendapudi P, Polubothu S, et al. Congenital diaphragmatic hernia-influence of fetoscopic tracheal occlusion on outcomes and predictors of survival. *Eur J Pediatr.* 2016;175(8):1071-6.
153. Jani J, Valencia C, Cannie M, et al. Tracheal diameter at birth in severe congenital diaphragmatic hernia treated by fetal endoscopic tracheal occlusion. *Prenat Diagn.* 2011;31(7):699-704.
154. Fayoux P, Hosana G, Devisme L, et al. Neonatal tracheal changes following in utero fetoscopic balloon tracheal occlusion in severe congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 2010;45(4):687-92.
155. Ruano R, Peiro JL, da Silva MM, et al. Early fetoscopic tracheal occlusion for extremely severe pulmonary hypoplasia in isolated congenital diaphragmatic hernia: preliminary results. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013;42(1):70-6.
156. Jeanty C, Kunisaki SM, MacKenzie TC. Novel non-surgical prenatal approaches to treating congenital diaphragmatic hernia. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2014;19(6):349-56.
157. Lally KP, Bagolan P, Hosie S, et al. Corticosteroids for fetuses with congenital diaphragmatic hernia: can we show benefit? *J Pediatr Surg.* 2006;41(4):668-74; discussion - 74.
158. Luong C, Rey-Perra J, Vadivel A, et al. Antenatal sildenafil treatment attenuates pulmonary hypertension in experimental congenital diaphragmatic hernia. *Circulation.* 2011;123(19):2120-31.
159. Russo FM, Toelen J, Eastwood MP, et al. Transplacental sildenafil rescues lung abnormalities in the rabbit model of diaphragmatic hernia. *Thorax.* 2016;71(6):517-25.
160. Makanga M, Maruyama H, Dewachter C, et al. Prevention of pulmonary hypoplasia and pulmonary vascular remodeling by antenatal simvastatin treatment in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015;308(7):L672-82.
161. Lewis NA, Holm BA, Rossman J, et al. Late administration of antenatal vitamin A promotes pulmonary structural maturation and improves ventilation in the lamb model of congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int.* 2011;27(2):119-24.
162. Gallot D, Coste K, Francannet C, et al. Antenatal detection and impact on outcome of congenital diaphragmatic hernia: a 12-year experience in Auvergne, France. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006;125(2):202-5.
163. DeKoninck P, Toelen J, Roubliova X, et al. The use of human amniotic fluid stem cells as an adjunct to promote pulmonary development in a rabbit model for congenital diaphragmatic hernia. *Prenat Diagn.* 2015;35(9):833-40.
164. Davey MG, Danzer E, Schwarz U, et al. Prenatal glucocorticoids and exogenous surfactant therapy improve respiratory function in lambs with severe diaphragmatic hernia following fetal tracheal occlusion. *Pediatr Res.* 2006;60(2):131-5.
165. Storme L, Rakza T, Sfeir R, et al. Prise en charge médicale per- et postnatale de la hernie congénitale diaphragmatique. *Rev Med Perinat.* 2009;1:26-36.
166. Boloker J, Bateman DA, Wung JT, et al. Congenital diaphragmatic hernia in 120 infants treated consecutively with permissive hypercapnea/spontaneous respiration/elective repair. *J Pediatr Surg.* 2002;37(3):357-66.

167. Downard CD, Jaksic T, Garza JJ, et al. Analysis of an improved survival rate for congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 2003;38(5):729-32.
168. Puligandla PS, Grabowski J, Austin M, et al. Management of congenital diaphragmatic hernia: A systematic review from the APSA outcomes and evidence based practice committee. *J Pediatr Surg.* 2015;50(11):1958-70.
169. Finer NN, Barrington KJ. Nitric oxide for respiratory failure in infants born at or near term. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006(4):CD000399.
170. Shieh HF, Wilson JM, Sheils CA, et al. Does the ex utero intrapartum treatment to extracorporeal membrane oxygenation procedure change morbidity outcomes for high-risk congenital diaphragmatic hernia survivors? *J Pediatr Surg.* 2017;52(1):22-5.
171. Moyer V, Moya F, Tibboel R, et al. Late versus early surgical correction for congenital diaphragmatic hernia in newborn infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2002(3):CD001695.
172. Tsao K, Lally PA, Lally KP. Minimally invasive repair of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 2011;46(6):1158-64.
173. Snoek KG, Reiss IK, Greenough A, et al. Standardized Postnatal Management of Infants with Congenital Diaphragmatic Hernia in Europe: The CDH EURO Consortium Consensus - 2015 Update. *Neonatology.* 2016;110(1):66-74.
174. Yamoto M, Inamura N, Terui K, et al. Echocardiographic predictors of poor prognosis in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 2016;51(12):1926-30.
175. Ross AC, Li NQ, Wu L. The components of VARA, a nutrient-metabolite combination of vitamin A and retinoic acid, act efficiently together and separately to increase retinyl esters in the lungs of neonatal rats. *J Nutr.* 2006;136(11):2803-7.
176. Napoli JL. Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1440(2-3):139-62.
177. Hale F. The relation of vitamin A to anophthalmos in pigs. *Am J Ophthalmology.* 1933;18:1087-93.
178. Lohnes D, Mark M, Mendelsohn C, et al. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development.* 1994;120(10):2723-48.
179. Kastner P, Mark M, Chambon P. Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell.* 1995;83(6):859-69.
180. Means AL, Gudas LJ. The roles of retinoids in vertebrate development. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:201-33.
181. Balmer JE, Blomhoff R. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res.* 2002;43(11):1773-808.
182. Sapin V, Chaib S, Blanchon L, et al. Esterification of vitamin A by the human placenta involves villous mesenchymal fibroblasts. *Pediatr Res.* 2000;48(4):565-72.
183. Quadro L, Hamberger L, Colantuoni V, et al. Understanding the physiological role of retinol-binding protein in vitamin A metabolism using transgenic and knockout mouse models. *Mol Aspects Med.* 2003;24(6):421-30.
184. Quadro L, Blaner WS, Salchow DJ, et al. Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein. *EMBO J.* 1999;18(17):4633-44.
185. Quadro L, Hamberger L, Gottesman ME, et al. Transplacental delivery of retinoid: the role of retinol-binding protein and lipoprotein retinyl ester. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004;286(5):E844-51.
186. Quadro L, Hamberger L, Gottesman ME, et al. Pathways of vitamin A delivery to the embryo: insights from a new tunable model of embryonic vitamin A deficiency. *Endocrinology.* 2005;146(10):4479-90.



187. Kawaguchi R, Yu J, Honda J, et al. A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science*. 2007;315(5813):820-5.
188. Clagett-Dame M, Knutson D. Vitamin A in reproduction and development. *Nutrients*. 2011;3(4):385-428.
189. Blomhoff R, Blomhoff HK. Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol*. 2006;66(7):606-30.
190. Duester G, Farres J, Felder MR, et al. Recommended nomenclature for the vertebrate alcohol dehydrogenase gene family. *Biochem Pharmacol*. 1999;58(3):389-95.
191. Duester G. Function of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase gene families in retinoid signaling. *Adv Exp Med Biol*. 1999;463:311-9.
192. Jornvall H, Persson B, Krook M, et al. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry*. 1995;34(18):6003-13.
193. Szalai G, Duester G, Friedman R, et al. Organization of six functional mouse alcohol dehydrogenase genes on two overlapping bacterial artificial chromosomes. *Eur J Biochem*. 2002;269(1):224-32.
194. Crosas B, Hyndman DJ, Gallego O, et al. Human aldose reductase and human small intestine aldose reductase are efficient retinal reductases: consequences for retinoid metabolism. *Biochem J*. 2003;373(Pt 3):973-9.
195. Niederreither K, McCaffery P, Drager UC, et al. Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. *Mech Dev*. 1997;62(1):67-78.
196. Gale E, Zile M, Maden M. Hindbrain respecification in the retinoid-deficient quail. *Mech Dev*. 1999;89(1-2):43-54.
197. Abu-Abed S, MacLean G, Fraulob V, et al. Differential expression of the retinoic acid-metabolizing enzymes CYP26A1 and CYP26B1 during murine organogenesis. *Mech Dev*. 2002;110(1-2):173-7.
198. Reijntjes S, Gale E, Maden M. Generating gradients of retinoic acid in the chick embryo: Cyp26C1 expression and a comparative analysis of the Cyp26 enzymes. *Dev Dyn*. 2004;230(3):509-17.
199. Loudig O, Babichuk C, White J, et al. Cytochrome P450RAI(CYP26) promoter: a distinct composite retinoic acid response element underlies the complex regulation of retinoic acid metabolism. *Mol Endocrinol*. 2000;14(9):1483-97.
200. Lampen A, Meyer S, Nau H. Effects of receptor-selective retinoids on CYP26 gene expression and metabolism of all-trans-retinoic acid in intestinal cells. *Drug Metab Dispos*. 2001;29(5):742-7.
201. Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *Faseb J*. 1996;10(9):940-54.
202. Mangelsdorf DJ, Ong ES, Dyck JA, et al. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature*. 1990;345(6272):224-9.
203. de Lera AR, Bourguet W, Altucci L, et al. Design of selective nuclear receptor modulators: RAR and RXR as a case study. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6(10):811-20.
204. Lefebvre P. Molecular basis for designing selective modulators of retinoic acid receptor transcriptional activities. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*. 2001;1(2):153-64.
205. Lefebvre B, Mouchon A, Formstecher P, et al. Distinct modes of interaction of the retinoic acid receptor alpha with natural and synthetic retinoids. *Mol Cell Endocrinol*. 1998;139(1-2):161-9.
206. Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev*. 2000;14(2):121-41.

207. Niederreither K, Vermot J, Schuhbauer B, et al. Retinoic acid synthesis and hindbrain patterning in the mouse embryo. *Development*. 2000;127(1):75-85.
208. White JC, Highland M, Kaiser M, et al. Vitamin A deficiency results in the dose-dependent acquisition of anterior character and shortening of the caudal hindbrain of the rat embryo. *Dev Biol*. 2000;220(2):263-84.
209. Gould A, Itasaki N, Krumlauf R. Initiation of rhombomeric Hoxb4 expression requires induction by somites and a retinoid pathway. *Neuron*. 1998;21(1):39-51.
210. Wagner E, McCaffery P, Drager UC. Retinoic acid in the formation of the dorsoventral retina and its central projections. *Dev Biol*. 2000;222(2):460-70.
211. Dersch H, Zile MH. Induction of normal cardiovascular development in the vitamin A-deprived quail embryo by natural retinoids. *Dev Biol*. 1993;160(2):424-33.
212. Niederreither K, Vermot J, Messaddeq N, et al. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse. *Development*. 2001;128(7):1019-31.
213. Ross AC. Retinoid production and catabolism: role of diet in regulating retinol esterification and retinoic Acid oxidation. *J Nutr*. 2003;133(1):291S-6S.
214. Kim YK, Wassef L, Hamberger L, et al. Retinyl ester formation by lecithin: retinol acyltransferase is a key regulator of retinoid homeostasis in mouse embryogenesis. *J Biol Chem*. 2008;283(9):5611-21.
215. Isken A, Golczak M, Oberhauser V, et al. RBP4 disrupts vitamin A uptake homeostasis in a STRA6-deficient animal model for Matthew-Wood syndrome. *Cell Metab*. 2008;7(3):258-68.
216. Guillonneau M, Jacqz-Aigrain E. [Teratogenic effects of vitamin A and its derivatives]. *Arch Pediatr*. 1997;4(9):867-74.
217. Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, et al. Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med*. 1985;313(14):837-41.
218. Andersen DH. Effect of diet during pregnancy upon the incidence of congenital hereditary diaphragmatic hernia in the rat; failure to produce cystic fibrosis of the pancreas by maternal vitamin A deficiency. *Am J Pathol*. 1949;25(1):163-85.
219. Warkany J, Roth CB, Wilson JG. Multiple congenital malformations; a consideration of etiologic factors. *Pediatrics*. 1948;1(4):462-71.
220. Major D, Cadenas M, Fournier L, et al. Retinol status of newborn infants with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int*. 1998;13(8):547-9.
221. Beurskens LW, Schrijver LH, Tibboel D, et al. Dietary vitamin A intake below the recommended daily intake during pregnancy and the risk of congenital diaphragmatic hernia in the offspring. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2013;97(1):60-6.
222. Lohnes D, Mark M, Mendelsohn C, et al. Developmental roles of the retinoic acid receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1995;53(1-6):475-86.
223. Mey J, Babiuk RP, Clugston R, et al. Retinal dehydrogenase-2 is inhibited by compounds that induce congenital diaphragmatic hernias in rodents. *Am J Pathol*. 2003;162(2):673-9.
224. Delabaere A, Geoffroy M, Coste K, et al. Effects of Tracheal Occlusion with Retinoic Acid Administration on Normal Lung Development. *Prenat Diagn*. 2017.
225. Doi T, Sugimoto K, Puri P. Prenatal retinoic acid up-regulates pulmonary gene expression of COUP-TFII, FOG2, and GATA4 in pulmonary hypoplasia. *J Pediatr Surg*. 2009;44(10):1933-7.
226. Sugimoto K, Takayasu H, Nakazawa N, et al. Prenatal treatment with retinoic acid accelerates type 1 alveolar cell proliferation of the hypoplastic lung in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*. 2008;43(2):367-72.

227. Boucherat O, Benachi A, Barlier-Mur AM, et al. Decreased lung fibroblast growth factor 18 and elastin in human congenital diaphragmatic hernia and animal models. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175(10):1066-77.
228. Acker SN, Seedorf GJ, Abman SH, et al. Altered pulmonary artery endothelial-smooth muscle cell interactions in experimental congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Res.* 2015;77(4):511-9.
229. Goncalves FL, Figueira RL, Simoes AL, et al. Effect of corticosteroids and lung ventilation in the VEGF and NO pathways in congenital diaphragmatic hernia in rats. *Pediatr Surg Int.* 2014;30(12):1207-15.
230. DeKoninck P, D'Hooge J, Van Mieghem T, et al. Speckle tracking echocardiography in fetuses diagnosed with congenital diaphragmatic hernia. *Prenat Diagn.* 2014;34(13):1262-7.
231. Manso PH, Figueira RL, Prado CM, et al. Early neonatal echocardiographic findings in an experimental rabbit model of congenital diaphragmatic hernia. *Braz J Med Biol Res.* 2015;48(3):234-9.