

**Hypertension pulmonaire associée à la dysplasie
broncho- pulmonaire du nouveau-né prématuré : état
actuel des connaissances et étude de l'intérêt du célastrol**
Claire-Marie Pilard

► **To cite this version:**

Claire-Marie Pilard. Hypertension pulmonaire associée à la dysplasie broncho- pulmonaire du nouveau-né prématuré : état actuel des connaissances et étude de l'intérêt du célastrol. Médecine humaine et pathologie. 2018. <dumas-01986269>

HAL Id: dumas-01986269

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01986269>

Submitted on 18 Jan 2019

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.

Université de Bordeaux
U.F.R. DES SCIENCES MEDICALES

Année 2017-2018

N° 3030

Thèse pour l'obtention du

DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement

Par PILARD Claire-Marie, Madeleine, Anne

Née le 08 septembre 1988 à Gien (045)

Le 25 avril 2018

Titre de la thèse

**Hypertension pulmonaire associée à la dysplasie broncho-pulmonaire
du nouveau-né prématuré : état actuel des connaissances et
étude de l'intérêt du céléstrol.**

Directrice de thèse

Dr Mathilde DUBOIS

Jury

Pr FAYON Michael (PU-PH en pneumopédiatrie).....Président
Pr JARREAU Pierre-Henri (PU-PH en réanimation néonatale).....Rapporteur
Pr BRISSAUD Olivier (PU-PH en réanimation pédiatrique).....Juge
Dr DUMAS-DE-LA-ROQUE Eric (PH en néonatalogie).....Juge
Dr DUBOIS Mathilde (Maître de conférence en Pharmacologie).....Directrice
Dr JALAL Zakaria (PH en cardiopathie congénitale).....Juge

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admise à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admise dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçue à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonorée et méprisée si j'y manque.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury pour leur présence aujourd'hui, en particulier le Pr Jarreau qui a fait le déplacement depuis Paris.

Merci au Pr Fayon d'avoir accepté de présider mon jury.

Merci aux Pr Brissaud pour son aide précieuse et son apprentissage lors de mon stage d'interne dans son service.

Enfin, merci au Dr Jalal pour son encadrement lors de ma découverte du monde de la cardiopathie congénitale.

Je souhaite ensuite remercier le Dr Mathilde Dubois qui m'a accompagnée tout au long de mon master 2 recherche et ensuite lors la réalisation de cette thèse. Merci de m'avoir ouvert les portes de la recherche et d'avoir eu la patience de tout m'apprendre, du simple pipetage à la réalisation méticuleuse du Western Blot. Merci pour toutes tes lectures, corrections, améliorations et conseils dans la rédaction de mon mémoire puis de ma thèse. Ce travail te doit tout ! Merci pour ta gentillesse et ton humour qui ont grandement participé à rendre cette année de recherche passionnante et distrayante. Enfin, merci pour ton humanité lors des manipulations animales qui ont rendu ces moments un peu moins douloureux.

Je remercie également les Dr Eric Dumas de la Roque et Laurent Renesme pour leur aide dans mon apprentissage de la néonatalogie mais également lors de mes premiers pas dans un laboratoire de recherche. Les journées de manipulations en votre présence ont toujours été un vrai plaisir, même si les résultats n'ont pas toujours été au rendez-vous. Votre bonne humeur au quotidien, tant dans le service qu'au laboratoire, est un vrai réconfort. Il me tarde de rejoindre votre équipe !

Je voudrais ensuite remercier ma famille et mes amis pour leur soutien inconditionnel depuis toutes ces années.

Merci à mes parents, Patricia et Fabrice, pour leur soutien moral et matériel depuis toujours. Vous avez grandement participé à la concrétisation de mon rêve de petite fille, devenir pédiatre. Merci pour votre présence indéfectible et vos conseils précieux tout au long de ces années d'études. Merci d'avoir toujours cru en moi.

Merci à ma grand-mère, Amani, pour sa présence aujourd'hui. Je suis fière de t'avoir à mes côtés en ce jour si particulier.

Une pensée pour mes autres grands-parents, Bernard, Elisabeth et Gaston ainsi que pour mon oncle Beñat avec qui je n'aurai pas la chance de partager cette journée mais qui m'accompagnent au quotidien.

Merci à mes trois frères, Benoit, Etienne et Jean-Guilhem pour leur soutien un peu bourru parfois mais bien solide. Les moments passés ensemble sont (la plupart du temps) un vrai régal !

Merci à mes belles sœurs, Zohra et Inès pour leur gentillesse et leur bonne humeur.

Merci à ma belle-mère, Loren pour ses pâtisseries qui ont été une source de réconfort lors de certaines après-midi de travail.

Merci à mes cousins et cousines, Kattina et Mathieu, JB et Ashley, Antton, Laurine, Emma, Yuna et Anaëlle, Chouchou et Margaux pour tous les bons moments passés ensemble et pour tous ceux à venir.

Merci également à Céline d'être là aujourd'hui, ta présence me touche.

Merci à mon parrain, Alain pour m'avoir fait oublier ma thèse le temps d'une balade nocturne dans la neige.

Merci à ma marraine, Anne pour les we entre filles et ta présence réconfortante.

Merci à ma tante et mon oncle, Dominique et Eric pour votre affection depuis toujours.

Merci à mes amis, ceux de toujours, Maïder, Katixa, Marion, Jérémy, Natacha, Bénédicte, Morgane (et ce cher Antoine) pour toutes ces années d'amitié. On a chacun pris des routes différentes mais on a toujours su le faire ensemble. Merci pour votre soutien et tous ces moments géniaux depuis le collège pour certaines.

Merci également aux nouveaux amis rencontrés au fils des stages, Sarah et Mathieu (et surtout Victor !), Camille, Mélanie, Audrey, Solène et tous les autres. Je suis heureuse de débiter ma carrière avec vous à mes côtés.

Merci à Camille (et Jojo) pour les heures de révision en D4, pour notre voyage inoubliable en Indonésie et surtout pour son amitié sans faille depuis presque 10 ans.

TABLE DES MATIERES

PARTIE I : ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES CLINIQUES DE LA DYSPLASIE BRONCHO-PULMONAIRE (DBP)

1. Définition.....	10
2. Epidémiologie	12
3. Physiopathologie	13
3.1. Développement pulmonaire normal.....	13
3.2. Impact de la prématurité.....	14
3.3. Angiogenèse, vasculogenèse et alvéolisation	14
3.4. Rôle de la génétique	14
4. Principales complications de la DBP.....	16
4.1. Hypertension pulmonaire liée à la DBP (HTP-DBP)	16
4.1.1. Définition	16
4.1.2. Epidémiologie.....	16
4.1.3. Physiopathologie.....	17
4.1.4. Mécanismes moléculaires de régulation du tonus vasculaire pulmonaire.....	17
4.1.5. Moyens diagnostiques.....	18
4.1.5.1. Clinique	18
4.1.5.2. Electrocardiogramme (ECG).....	19
4.1.5.3. Echocardiographie transthoracique (ETT)	19
4.1.5.4. Cathétérisme cardiaque	20
4.1.5.5. Biomarqueurs.....	22
4.2. Complications respiratoires.....	22
4.2.1. Altérations de la fonction respiratoire.....	22
4.2.2. « Asthme » et wheezing	23
4.2.3. Altération des défenses pulmonaires.....	23
4.2.4. Intolérance à l'exercice	24
4.3. Complications neuro-développementales.....	24
5. Prise en charge thérapeutique.....	25
5.1. Thérapeutiques actuelles de la DBP	25
5.1.1. Surfactant	25
5.1.2. Techniques de ventilation	26
5.1.2.1. Non invasives.....	26
5.1.2.2. Invasives.....	26
5.1.2.2.1. Synchronisation	27
5.1.2.2.2. Mode volume ou pression-contrôlé(e).....	27
5.1.2.2.3. Ventilation non conventionnelle ou haute fréquence	27
5.1.2.2.4. Neurally Adjusted Ventilatory Assist (NAVA)	28
5.1.2.3. Hypercapnie permissive.....	29
5.1.3. Oxygénothérapie	29
5.1.4. Nutrition et apports hydriques	30
5.1.4.1. Nutrition	30
5.1.4.2. Apports hydriques.....	31
5.1.5. Prise en charge d'un canal artériel persistant.....	31
5.1.6. Corticoïdes	32
5.1.6.1. Corticothérapie anténatale.....	32
5.1.6.2. Corticothérapie post-natale	32
5.1.6.2.1. Corticothérapie inhalée	33
5.1.6.2.2. Corticothérapie systémique	33
5.1.6.2.2.1. Précoce (<J8)	33
5.1.6.2.2.2. Tardive (>J7).....	34
5.1.6.2.3. Corticoïdes et surfactant.....	35
5.1.7. Bronchodilatateurs.....	35
5.1.8. Monoxyde d'azote inhalé	35

5.1.9.	Citrate de caféine.....	36
5.1.10.	Diurétiques.....	36
5.1.11.	Macrolides	37
5.1.12.	Palivizumab (Synagis ®).....	38
5.1.13.	Vaccinations.....	38
5.2.	Perspectives	38
5.2.1.	Vitamine A.....	38
5.2.2.	Inositol.....	39
5.2.3.	Anti-oxydants.....	39
5.2.3.1.	Superoxyde dismutase	39
5.2.3.2.	N-acétylcystéine	40
5.2.3.3.	Autres.....	40
5.2.4.	Cellules souches	40
5.3.	Prise en charge de l'HTP-DBP	42
5.3.1.	Prise en charge globale.....	42
5.3.1.1.	Comorbidités	42
5.3.1.2.	Nutrition et apports hydriques.....	42
5.3.1.3.	Protection sensorielle.....	43
5.3.2.	Vasodilatateurs pulmonaires	43
5.3.2.1.	Oxygène.....	43
5.3.2.2.	Monoxyde d'azote inhalé.....	43
5.3.2.3.	Sildénafil	44
5.3.2.4.	Prostanoïdes	45
5.3.2.5.	Bosentan	45
5.3.2.6.	Inhibiteurs calciques	45
5.3.3.	Nouvelle perspective : la thérapie cellulaire	47
5.4.	Suivi	47

PARTIE 2 : EFFETS DU CELASTROL DANS UN MODELE MURIN D'HTP-DBP INDUITE PAR L'HYPEROXIE.

1.	INTRODUCTION.....	49
1.1.	Modèles de DBP	49
1.2.	Mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'HTP-DBP	50
1.2.1.	Rôle de l'hème-oxygénase 1 (HO-1).....	50
1.2.1.1.	Activité enzymatique	50
1.2.1.2.	Activité non-enzymatique.....	51
1.2.2.	Rôle de l'hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α).....	51
1.2.3.	Rôle du Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).....	51
1.2.4.	Réactivité vasculaire pulmonaire et rôle du calcium intracellulaire	52
1.3.	Le célastrol	54
1.4.	Objectifs de l'étude	55
2.	MATERIEL ET METHODES.....	56
2.1.	Etude de l'HTP-DBP dans le modèle animal.....	56
2.1.1.	Modèle animal d'HTP-DBP	56
2.1.2.	Traitement.....	57
2.1.3.	Mesures échocardiographiques.....	57
2.1.4.	Mesure du remodelage vasculaire, de l'alvéolisation et de la densité vasculaire	58
2.1.4.1.	Fixation du poumon à pression constante.....	58
2.1.4.2.	Préparation des coupes.....	58
2.1.4.3.	Etude du remodelage vasculaire et de l'alvéolisation par coloration Eosine-Hematoxyline	59
2.1.4.4.	Analyse de la densité vasculaire par immunomarquage.....	59
2.1.5.	Evaluation de l'hypertrophie ventriculaire droite.....	60
2.1.6.	Etude de la réactivité artérielle pulmonaire	60
2.1.6.1.	Dispositif expérimental.....	60
2.1.6.2.	Etude de la réactivité vasculaire	61
2.1.7.	Etude de l'expression protéique	62

2.1.7.1.	Extraction des protéines.....	62
2.1.7.2.	Western Blot.....	62
2.2.	Modèle cellulaire.....	63
2.2.1.	Obtention de CMLV pulmonaires fœtales.....	63
2.2.2.	Exposition des CMLV à l'hyperoxie et au célastrol.....	63
2.2.3.	Mesure de calcium intracellulaire.....	64
2.3.	Analyses statistiques.....	65
3.	RESULTATS	66
3.1.	Effets du célastrol sur la survie au cours de l'HTP-DBP.....	66
3.2.	Effets du célastrol sur le poids au cours de l'HTP-DBP.....	67
3.3.	Effets du célastrol sur le TAAP au cours de l'HTP-DBP	67
3.4.	Effets du célastrol sur le remodelage cardiaque au cours de l'HTP-DBP	68
3.5.	Effets du célastrol sur le remodelage vasculaire au cours de l'HTP-DBP	69
3.6.	Effets du célastrol sur la densité vasculaire au cours de l'HTP-DBP	70
3.7.	Effets du célastrol sur l'alvéolisation au cours de l'HTP-DBP	71
3.8.	Effets du célastrol sur la réactivité vasculaire pulmonaire au cours de l'HTP-DBP	72
3.8.1.	Effets du célastrol sur la réponse contractile des artères intra-pulmonaires	72
3.8.2.	Effets du célastrol sur la vasorelaxation des artères intra-pulmonaires.....	73
3.9.	Effets du célastrol sur l'expression protéique de HO-1 au cours de l'HTP-DBP	74
3.10.	Effets du célastrol sur le calcium intracellulaire des CMLV fœtales.....	75
4.	DISCUSSION.....	76

Lexique

[Ca ²⁺] _i : concentration calcique intracellulaire	MLCK : kinase de la MLC
AAP : <i>American Academy of Pediatrics</i>	MMH : maladie des membranes hyalines
ADN : acide désoxyribonucléique	NAC : N-acétylcystéine
Afssaps : Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé	NaF : sodium fluoride
AHA : <i>American Heart Association</i>	NAVA : <i>Neurally Adjusted Ventilatory Assist</i>
AMP(c) : adénosine monophosphate (cyclique)	NaVO ₄ : sodium orthovanadate
ATP : adénosine triphosphate	NIH : <i>National Institutes of Health</i>
ATS : <i>American Thoracic Society</i>	NO(i) : monoxyde d'azote (inhalé)
BNP : <i>Brain Natriuretic Peptide</i>	NOS : NO synthase
BPCO : broncho-pneumopathie chronique obstructive	OHF : oscillation haute fréquence
BSA : <i>bovine serum albumine</i>	OR(a) : <i>Odds ratio</i> (ajusté)
CaM : calmoduline	PAP : pressions artérielles pulmonaires
CAP : canal artériel persistant	PAPd : PAP diastolique
CMLV : cellules musculaires lisses vasculaires	PAPm : PAP moyenne
CO : monoxyde de carbone	PAPs : PAP systolique
CPE : cellules progénitrices endothéliales	PBS : <i>phosphate buffered saline</i>
CSM : cellules souches mésenchymateuses	PC : périmètre crânien
DAPI : 4'-6-diamino-2-phénylindole	PDE : phosphodiesterases
DBP : dysplasie broncho-pulmonaire	PFA : paraformaldéhyde
DHA : acide docosahexaénoïque	PGF2 α : prostaglandine F2 α
DMSO : diméthylsulfoxyde	PGI ₂ : prostacycline
ECG : électrocardiogramme	PHD : prolyl-hydroxylases
EDTA : acide éthylène-diamine-tétra-acétique	PMSF : fluorure de phénylméthylsulfoxyde
EGTA : acide éthylène-glycol-tétra-acétique	POD : pression de l'oreille droite
eNAC : <i>epithelial Na⁺ channel</i>	PPC(N) : pression positive continue (nasale)
eNOS : NO-synthase endothéliale	PVDF : fluorure de polyvinylidène
ET-1 : endothéline-1	pVHL : <i>protein Von Hippel Lindau</i>
ETT : échocardiographie transthoracique	RCIU : retard de croissance intra-utérin
FC : fréquence cardiaque	RIPA : <i>radio immunoprecipitation assay</i>
FDA : <i>Food and Drugs Administration</i>	ROP : rétinopathie du prématuré
FiO ₂ : fraction inhalée d'oxygène	ROS : Reactive Oxygen Species
GCs : guanosine cyclase soluble	RVP : résistance vasculaire pulmonaire
GMP(c) : guanosine monophosphate (cyclique)	RVS : résistance vasculaire systémique
GTP : guanosine triphosphate	SA : semaines d'aménorrhées
HIF : <i>hypoxia inducible factor</i>	SAC : semaines d'âge corrigé
HIV : hémorragie intra-ventriculaire	SaO ₂ : saturation en oxygène
HO-1 : hème oxygénase-1	SNP : nitroprussiate de sodium
HRE : <i>hypoxia response element</i>	SOD : superoxyde dismutase
HRP : <i>horse radish peroxidase</i>	TAAP : temps d'accélération dans l'artère pulmonaire
HSHC : hémisuccinate d'hydrocortisone	TBS-T : <i>tris buffered saline-tween</i>
HTAP : hypertension artérielle pulmonaire	TNF- α : <i>tumor necrosis factor-α</i>
HTP : hypertension pulmonaire	VEGF : <i>vascular endothelial growth factor</i>
HVD : hypertrophie ventriculaire droite	VEGFR : récepteurs de VEGF
IC : intervalle de confiance	VEMS : volume expiré maximal en 1 seconde
IgG : immunoglobulines G	VG : ventricule gauche
IL : interleukine	VHF : ventilation à haute fréquence
IM : intra-musculaire	VNI : ventilation non invasive
IT : insuffisance tricuspide	VNPI : ventilation nasale à pression positive intermittente
MLC : chaîne légère de la myosine	vWF : facteur von Willebrandt

PARTIE I :

ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES CLINIQUES DE LA DYSPLASIE BRONCHO-PULMONAIRE (DBP)

1. Définition

La DBP est la pathologie respiratoire chronique la plus fréquente chez les enfants prématurés. Elle a initialement été décrite par *Northway et al.* en 1967 (1) à partir d'une cohorte de nouveau-nés modérément prématurés (moyenne d'âge gestationnel de 34 semaines d'aménorrhées (SA)) dont l'étude histologique des poumons a révélé une inflammation diffuse et une fibrose importante des voies aériennes ainsi que du parenchyme pulmonaire du fait d'une ventilation mécanique agressive et d'une supplémentation en O₂ importante lors de la prise en charge d'une détresse respiratoire néonatale.

Avec l'amélioration des techniques et thérapeutiques de prise en charge des nouveau-nés prématurés (surfactant exogène, nouvelles stratégies ventilatoires, corticoïdes anténataux, nutrition et traitement du canal artériel persistant (CAP)), une « nouvelle » DBP a été décrite dans les années 1990 (ère post-surfactant), qui touche les nouveau-nés extrêmes prématurés (moyenne d'âge 28 SA) et qui est caractérisée par une altération du développement pulmonaire distal avec une hypoalvéolisation et un appauvrissement du réseau vasculaire pulmonaire associé à des vaisseaux dystrophiques (2). Elle ne peut donc plus être considérée comme étant uniquement la conséquence d'agressions environnementales post-natales mais plutôt comme la résultante d'interactions entre un poumon très immature, un environnement non physiologique et une probable disposition génétique (3). En effet, pour un même âge gestationnel à la naissance et avec une prise en charge réanimatoire identique, tous les nouveau-nés prématurés ne développeront pas forcément une DBP.

En 2001, une conférence de consensus de la *US National Institutes of Health* (NIH) a proposé une nouvelle définition de la DBP et de sa sévérité en fonction des besoins ventilatoires à l'approche du terme (Tableau 1) (4).

Tableau 1 : **Critères diagnostiques NIH de la DBP** (d'après la référence (3)).
(SAC = semaines d'âge corrigé ; PPC = pression positive continue ; FiO₂ = fraction inhalée d'O₂)

	Age gestationnel à la naissance	
	< 32 SA	> 32 SA
Délai d'évaluation	36 SAC ou sortie	> J28 mais < J56 ou sortie
Oxygénothérapie	> 21% pendant au moins 28 jours	
Dysplasie broncho-pulmonaire		
Légère	En air ambiant à 36 SAC ou sortie	En air ambiant à J56 ou sortie
Modérée	FiO ₂ < 30% à 36 SAC ou sortie	FiO ₂ < 30% à J56 ou sortie
Sévère	FiO ₂ > 30%, avec ou sans PPC ou ventilation mécanique à 36 SAC ou sortie	FiO ₂ > 30%, avec ou sans PPC ou ventilation mécanique à J56 ou sortie

L'une des limites de cette définition étant la grande variabilité dans le diagnostic des besoins en O₂ selon les centres, *Walsh et al.* ont proposé en 2003 une évaluation standardisée des besoins en O₂ à 36 SAC par un test de réduction en O₂ (Figure 1) (5).

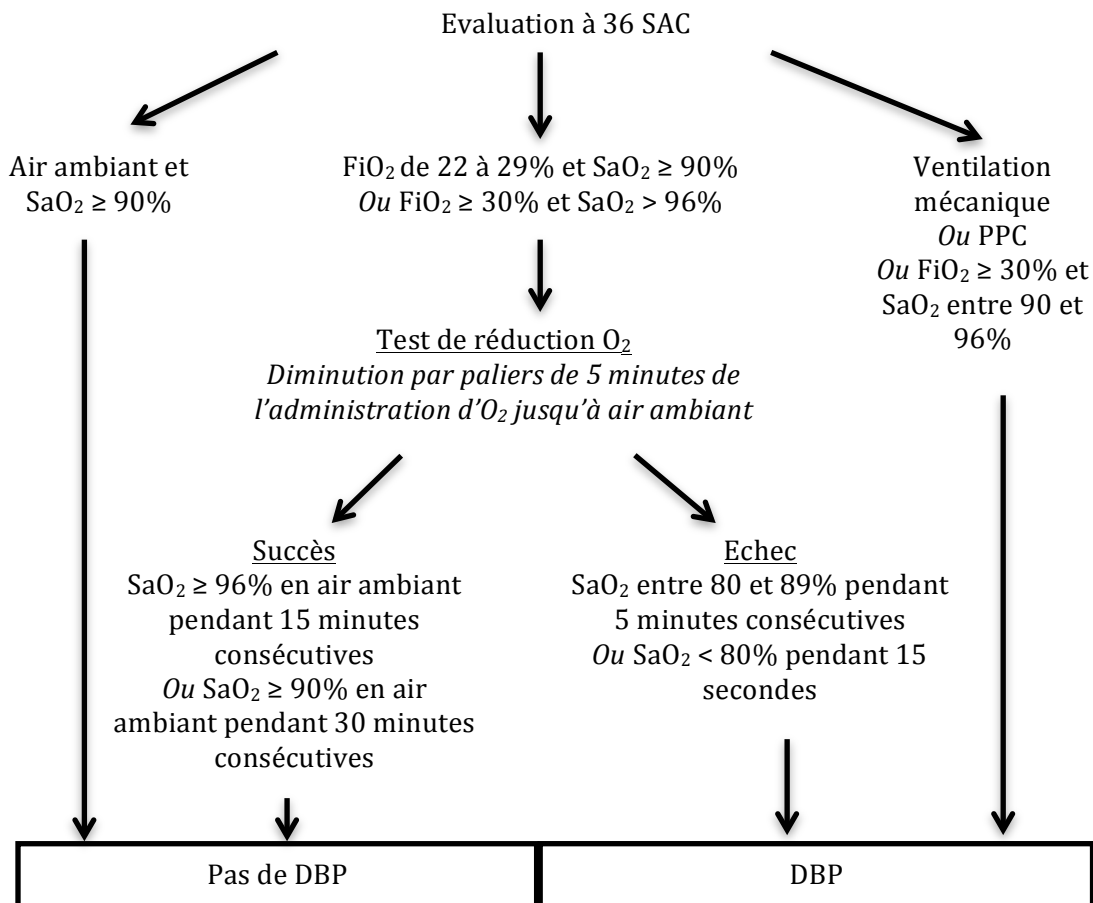


Figure 1 : **Test de réduction en O₂ de Walsh** (d'après la référence (3)).
(SaO₂ = saturation en O₂)

2. Epidémiologie

La prématurité (naissance avant 37 SA) concerne 5 à 12% des naissances dans les pays industrialisés. En France, elle représente 60 000 naissances par an dont 10 000 (1,2%) avant 32 SA (6).

La DBP touche principalement les nouveau-nés prématurés avant 32 SA et pesant moins de 1000g à la naissance mais d'autres facteurs de risque existent dont la ventilation mécanique et l'oxygénothérapie, l'inflammation et les infections ainsi que la présence d'un CAP et d'apports hydriques importants (7). Son incidence varie énormément selon les centres et la définition utilisée, avec des chiffres pouvant aller de 25% à plus 75% selon les cohortes.

Selon l'étude française EPIPAGE 2, parmi les survivants à 36 SAC, 26% des moins de 27 SA et 5% des nouveau-nés prématurés entre 27 et 31 SA ont développé une DBP (6).

L'incidence de la DBP sévère est en diminution avec l'amélioration des techniques de prise en charge néonatale mais les formes modérées sont plus fréquentes du fait de l'augmentation de la survie de nouveau-nés très prématurés.

La DBP est une pathologie respiratoire chronique et représente un coût important du fait des complications à long terme respiratoires mais également nutritionnelles, cardiovasculaires et neuro-développementales qu'elle peut engendrer. Parmi ces complications, l'hypertension pulmonaire associée à la DBP (HTP-DBP) est l'une des plus graves du fait de la forte mortalité qu'elle engendre.

3. Physiopathologie

3.1. Développement pulmonaire normal

Le développement pulmonaire normal peut être divisé en 5 étapes : embryonnaire (3-7 SA), pseudo-glandulaire (5-17 SA), canaliculaire (16-26 SA), sacculaire (24-38 SA) et alvéolaire (jusqu'à 2-3 ans) (Figure 2). Il s'agit d'un processus physiologique qui nécessite une expression synchronisée spatio-temporelle de nombreux facteurs angiogéniques et de croissance ainsi que de leurs récepteurs.

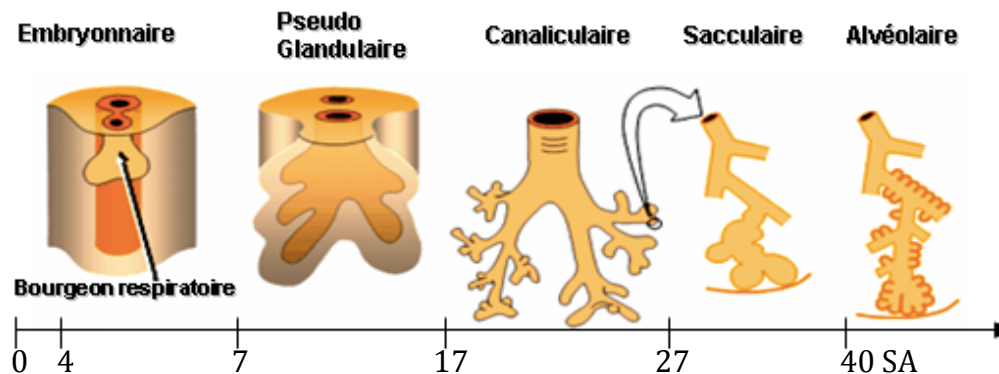


Figure 2 : Stades de développement pulmonaire (d'après la référence (8))

Lors du stade embryonnaire, le bourgeon trachéal se différencie du bourgeon œsophagien et la morphogenèse des voies aériennes broncho-pulmonaires se met en place jusqu'à la fin du stade pseudo-glandulaire. Le stade canaliculaire permet le développement des bronchioles et la maturation de l'épithélium respiratoire alvéolaire. Durant ce stade, les cellules épithéliales alvéolaires de type II se différencient permettant l'initiation de la synthèse de surfactant et le tissu interstitiel s'amincit pour former les futures unités d'échanges gazeux. La circulation pulmonaire distale se met également en place grâce au phénomène de vasculogenèse. Vient ensuite le stade sacculaire durant lequel les sacs alvéolaires se développent. Les crêtes alvéolaires contiennent alors un double-réseau capillaire. La septation secondaire se met en place lors du stade alvéolaire ce qui permet d'augmenter la surface d'échanges gazeux. De plus, le double-réseau capillaire fusionne afin de former une barrière alvéolo-capillaire fine et améliorer ainsi les capacités d'hématose (9).

3.2. Impact de la prématurité

In utero, le poumon est dans un milieu liquidien, hypoxique et le débit vasculaire pulmonaire est faible. La naissance prématurée induit en elle-même une rupture des conditions physiologiques nécessaires au développement pulmonaire normal. En effet, le poumon immature est exposé à un milieu aérien, riche en O₂ et le débit vasculaire pulmonaire augmente brutalement (3).

A cela se rajoutent les effets iatrogènes liés à la prise en charge réanimatoire de ces nouveau-nés extrêmes prématurés : les baro- et volotraumatismes de la ventilation mécanique, les infections en lien avec la pose de voies centrales et le stress oxydatif entraîné par la supplémentation en O₂. Ces différents éléments sont susceptibles d'induire une réponse inflammatoire importante avec un relargage majeur de médiateurs pro-inflammatoires (interleukines (IL) 6 et 8, IL-1 β et TNF- α (*tumor necrosis factor- α*)), ce qui peut aboutir à une infiltration inflammatoire pulmonaire responsable du remodelage de la matrice extracellulaire (épaississement des septa et dépôts de fibrine), de l'augmentation de la perméabilité capillaire et de la raréfaction de la microvascularisation (10).

3.3. Angiogenèse, vasculogenèse et alvéolisation

La croissance vasculaire durant le développement se fait selon 2 mécanismes distincts qui sont :

- La vasculogenèse = différenciation des cellules endothéliales à partir de précurseurs mésenchymateux
- L'angiogenèse = croissance de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants (11).

Ces phénomènes nécessitent l'expression coordonnée de nombreux facteurs angiogéniques dont le *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) qui est synthétisé par les cellules épithéliales alvéolaires et active ainsi la migration et différenciation des cellules endothéliales adjacentes. Cette communication épithélio-endothéliale pulmonaire est essentielle pour permettre une alvéolisation normale. En effet, dans de nombreux modèles animaux, l'inhibition du VEGF ou de ses récepteurs entraîne une perturbation de l'alvéolisation et aboutit à des lésions histologiques similaires à celles de la DBP chez le nouveau-né prématuré (9,12).

3.4. Rôle de la génétique

A âge gestationnel et prise en charge néonatale identiques, l'évolution vers une DBP est différente entre deux nouveau-nés prématurés, ce qui laisse supposer l'existence d'une susceptibilité génétique à l'origine de la DBP. Plusieurs études de concordance (13,14) effectuées chez des jumeaux estiment que l'héritabilité de la DBP modérée à sévère est de l'ordre de 50 à 80%. A l'inverse, la variabilité pour la DBP légère semble expliquée par les effets environnementaux sans évidence d'hérédité.

Dans une étude récente de séquençage de l'exome de 50 nouveau-nés atteints de DBP (15), les auteurs ont mis en évidence 258 gènes avec des mutations rares non synonymes associés à la survenue de la DBP. En effet, ces gènes pour la plupart sont impliqués dans la structure et la fonction pulmonaires. Ainsi, si ces résultats sont confirmés, ils témoignent du caractère polygénique de la DBP.

D'autre part, une étude d'association génomique (16) réalisée dans 3 centres français sur 418 nouveau-nés prématurés avant 28 SA a montré que le gène SPOCK2 (surexpression de l'allèle C et du locus

rs1245560) serait un gène de susceptibilité pour la DBP modérée à sévère chez les enfants caucasiens après ajustement sur les facteurs de risque cliniques de DBP (poids de naissance, sexe, CAP, sepsis postnatal et nécessité d'une 2^{ème} dose de surfactant) (Odd Ratio ajusté (ORa) 2,96 ; Intervalle de confiance (IC) 95% [1,37-6,4]) et africains (ORa 4,87 ; IC 95% [1,88-12,63]). Les études animales complémentaires ont mis en évidence que l'ARNm de SPOCK2 est surexprimé à la phase alvéolaire dans les fibroblastes et les cellules épithéliales pulmonaires de rats exposés à l'hyperoxie. Il jouerait un rôle dans le renouvellement de la matrice extracellulaire et la migration cellulaire via des interactions avec les protéines de la famille des métalloprotéases.

Les différences de profils épigénétiques qui sont en partie expliquées par des effets environnementaux peuvent également contribuer à la susceptibilité à développer une DBP, et font déjà l'objet de nombreuses études.

4. Principales complications de la DBP

4.1. Hypertension pulmonaire liée à la DBP (HTP-DBP)

4.1.1. Définition

Le diagnostic d'hypertension pulmonaire (HTP) est fait devant une pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) supérieure à 25 mmHg au repos lors d'un cathétérisme cardiaque droit. L'HTP associée à la DBP appartient au groupe 3 de la classification des HTP, dans la sous-catégorie des pathologies pulmonaires développementales (17).

4.1.2. Epidémiologie

L'HTP survient chez près d'1/4 des patients avec DBP modérée à sévère (18). La mortalité est fortement impactée par la présence d'HTP. En effet, la présence d'une HTP sévère tardive est corrélée avec une mortalité de 70% et une HTP persistante au-delà des premiers mois de vie est associée à 47% de mortalité dans les 2 ans suivant le diagnostic (Figure 3) (19).

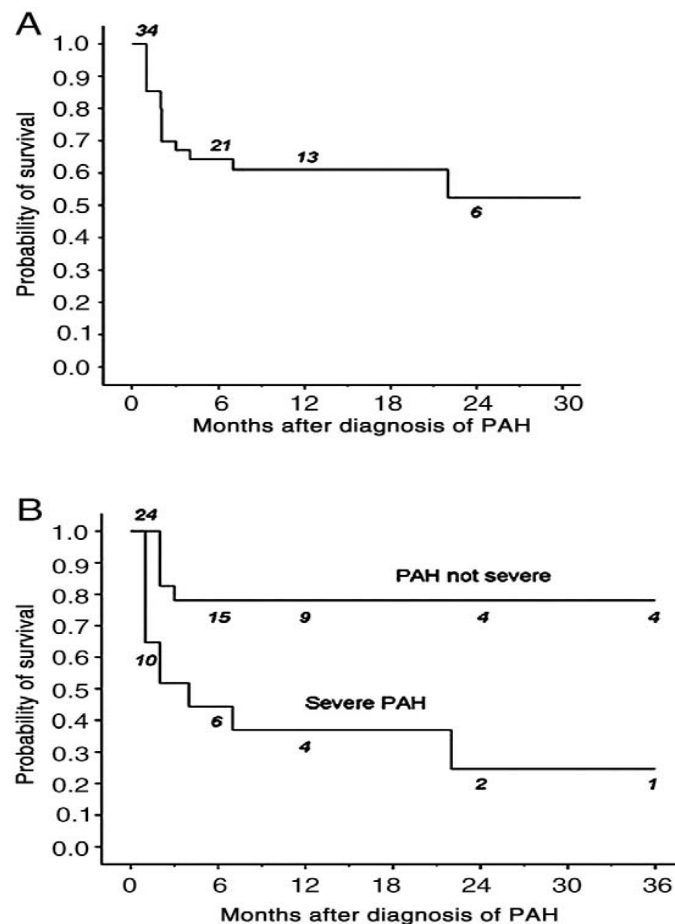


Figure 3 : **Courbes de survie dans l'HTP-BDP chez le nouveau-né prématuré humain** (d'après la référence (20))

A. Survie avec une HTP-DBP toute sévérité confondue.

B. Survie avec une HTP-DBP non sévère (courbe supérieure) et sévère (courbe inférieure)

4.1.3. Physiopathologie

Les mécanismes de l'HTP-DBP sont multifactoriels et impliquent des modifications morphologiques et fonctionnelles :

- Le remodelage vasculaire décrit dans la DBP avec l'épaississement de la média et la néomuscularisation des petites artères pulmonaires,
- La diminution de la surface alvéolo-capillaire par appauvrissement du réseau capillaire,
- Les anomalies de tonus et de réactivité vasculaires responsables d'une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires (RVP).

Cela va conduire à une augmentation de la pression artérielle pulmonaire (PAP) puis à une hypertrophie du ventricule droit (HVD) du fait de l'augmentation de la post-charge, et dans les formes les plus sévères, à une défaillance cardiaque droite avec décès.

Les facteurs de risque principaux de l'HTP-DBP sont l'extrême prématurité, le retard de croissance intra-utérin (RCIU), l'oligoamnios, la durée de ventilation mécanique, l'oxygénothérapie prolongée et une DBP sévère (18).

4.1.4. Mécanismes moléculaires de régulation du tonus vasculaire pulmonaire

Le tonus vasculaire pulmonaire est régulé via 3 voies de signalisation principales (Figure 4) :

- Le monoxyde d'azote (NO) est un gaz qui agit comme une molécule signal. Il est synthétisé dans la cellule endothéliale à partir de l'acide aminé L-arginine par des enzymes appelées NO synthase (NOS). L'isoforme endothéliale eNOS est fortement exprimée dans la circulation pulmonaire et lutte contre la vasoconstriction. La guanylate cyclase soluble (GCs) est un récepteur endogène du NO dans les cellules musculaires lisses vasculaire (CMLV). Après activation par le NO, elle transforme le GTP (guanosine triphosphate) en GMPc (guanosine monophosphate cyclique), messenger secondaire dont les effets principaux sont la vasodilatation, l'inhibition de la prolifération des CMLV, la prévention de la fibrose et des effets anti-thrombotiques et anti-inflammatoires (21).
- La prostacycline (PGI₂) est un métabolite de l'acide arachidonique produit de façon endogène par les cellules endothéliales. La PGI₂ active une adénylate cyclase qui va synthétiser de l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) à partir de l'ATP (adénosine triphosphate). L'AMPc entraîne une vasodilatation par diminution de la concentration calcique intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) dans les CMLV (22).

Les phosphodiesterases (PDE) sont une famille d'enzymes qui dégradent et inactivent le GMPc et l'AMPc afin de réguler leurs concentrations et leurs effets. La PDE5 est particulièrement exprimée dans le poumon et elle catabolise le GMPc, ce qui limite son effet vasodilatateur.

- L'endothéline-1 (ET-1) est un puissant vasoconstricteur endogène produit également par les cellules endothéliales en réponse à l'hypoxie. Elle favorise les dysfonctionnements endothéliaux, la prolifération des CMLV et le remodelage (inflammation et fibrose). L'ET-1 peut se lier à 2 récepteurs couplés à des protéines G, ET-A et ET-B. La liaison ET-1/ET-A entraîne alors une vasoconstriction alors que la liaison ET-1/ET-B induit une vasorelaxation par libération de NO et prostacycline (22).

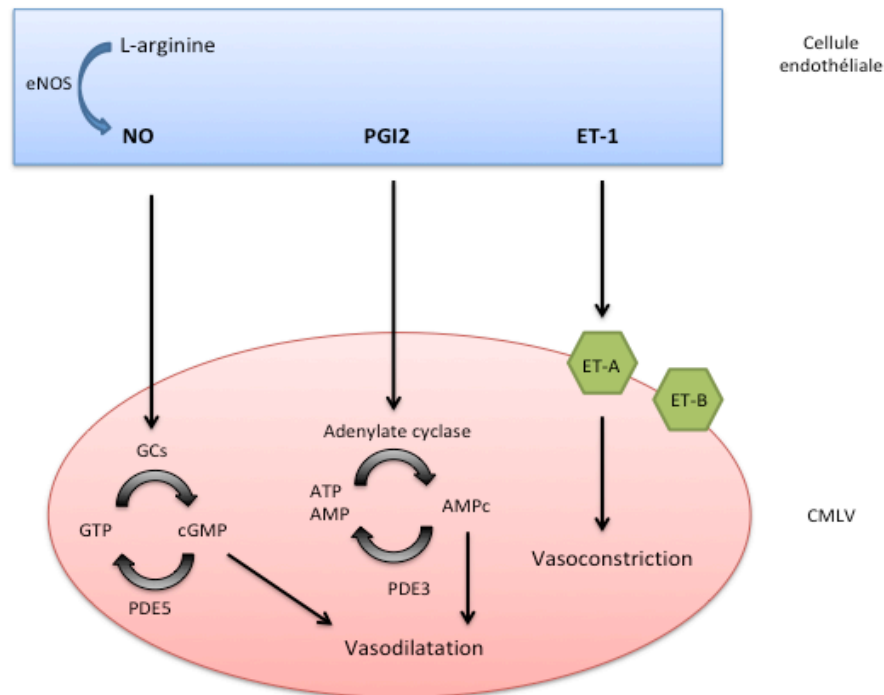


Figure 4 : Voies de régulation du tonus vasculaire pulmonaire (d'après la référence (22)).

4.1.5. Moyens diagnostiques

4.1.5.1. Clinique

A la phase initiale, en cas de shunts perméables tels que le CAP, une communication inter-atriale ou inter-ventriculaire, une HTP sévère supra-systémique donnera un tableau d'hypoxémie réfractaire du fait d'un shunt droit-gauche. De plus, en cas de CAP, on peut observer une différentielle de SaO_2 de plus de 5 points entre les membres inférieurs et supérieurs (23).

De façon plus chronique, on suspectera une HTP-DBP devant un enfant qui est dépendant d'un support ventilatoire ou d'une oxygénothérapie qui semblent disproportionnés par rapport au degré de la pathologie pulmonaire sous-jacente, dans le cas d'épisodes récurrents de cyanose ou encore devant des troubles alimentaires avec une altération de la croissance pondérale et une dyspnée lors de la prise alimentaire (24).

Plus rarement, on pourra observer des signes d'insuffisance cardiaque droite compliquant l'HTP-DBP comme la tachycardie, un reflux hépato-jugulaire et une hépatomégalie.

4.1.5.2. Electrocardiogramme (ECG)

L'ECG peut éventuellement montrer des signes d'HVD dans les formes d'HTP chronique mais ces modifications sont très peu corrélées aux PAP estimées à l'échocardiographie (22). Il ne peut donc pas être utilisé comme moyen de dépistage ou de diagnostic d'une HTP du fait de sa faible sensibilité (67%) et spécificité (69%) (18).

4.1.5.3. Echocardiographie transthoracique (ETT)

L'ETT est la technique la plus largement utilisée pour l'évaluation des pressions pulmonaires et de la fonction cardiaque droite dans la population néonatale. Elle diagnostique correctement l'absence ou la présence d'une HTP dans 79% des cas mais elle ne détermine correctement la sévérité de l'HTP que dans 47% des cas (22).

Le paramètre diagnostique principal est la mesure de la vitesse maximale (V_{max}) du flux d'insuffisance tricuspide (IT), également appelée ITV et qui permet de calculer la PAP systolique (PAPs) selon la loi de Bernoulli : $PAPs = 4 \times (V_{max})^2 + POD$. La POD étant la pression dans l'oreillette droite, estimée échographiquement par l'aspect de la veine cave inférieure (23). Ainsi, l'HTP est définie à l'ETT par des PAPs ≥ 40 mmHg. Cependant, l'IT n'est présente que dans 61% des cas et elle peut être modifiée en cas de sténose pulmonaire ou communication inter-ventriculaire. Cela implique qu'en l'absence d'une IT significative, la méthode d'estimation des PAPs est insuffisante pour évaluer le degré d'HTP (25).

La mesure du temps d'accélération du flux dans l'artère pulmonaire (TAAP) qui est le temps entre le début du flux pulmonaire et le pic de vélocité de ce flux, a été validée chez l'homme et l'animal. Le TAAP est inversement corrélé à la PAPs avec une normale supérieure à 100msec.

Enfin, en présence d'une insuffisance valvulaire pulmonaire modérée, les PAPm et diastolique peuvent être estimées en mesurant le pic du gradient de vitesse au début (vitesse protodiastolique V_{pd}) et à la fin de la diastole (vitesse télédiastolique V_{td}) (18). Ainsi, toujours selon la loi de Bernoulli : $PAPm \text{ (mmHg)} = 4 \times V_{pd}^2 + POD$ et $PAP \text{ diastolique (PAPd)} = 4 \times V_{td}^2 + POD$. On peut ensuite calculer les PAPs selon la formule $PAPs = 3 \times PAPm - 2 \times PAPd$.

Les autres paramètres échographiques utilisés pour mettre en évidence une HTP sont l'aplanissement du septum inter-ventriculaire en systole voire le bombement dans le ventricule gauche (VG) en cas de pressions ventriculaires droites supra-systémiques, l'élargissement ou dilatation des cavités droites et la présence d'un shunt droit-gauche au niveau du CAP ou du foramen ovale perméable (18).

Il n'existe pas à l'heure actuelle de recommandations consensuelles pour le dépistage de l'HTP-DBP à l'aide de l'ETT. Cependant, l'*American Heart Association* (AHA) et l'*American Thoracic Society* (ATS) recommandent des ETT précoces chez les nouveau-nés prématurés qui nécessitent une oxygénothérapie et un support ventilatoire importants surtout en cas d'oligoamnios et de RCIU, en cas d'absence d'amélioration clinique respiratoire, chez le prématuré à 36 SAC qui nécessite un soutien ventilatoire ou une oxygénothérapie disproportionnés par rapport à la pathologie respiratoire sous-jacente, en cas d'épisodes récurrents de cyanose, en cas de troubles alimentaires avec croissance pondérale altérée ou devant une hypercapnie (24).

4.1.5.4. Cathétérisme cardiaque

Le cathétérisme cardiaque est le *gold standard* pour l'évaluation des pressions et des résistances vasculaires pulmonaires. Il s'agit d'une technique invasive, réalisée sous anesthésie générale et nécessitant donc une intubation dont les risques dans ce contexte de DBP sont à évaluer et anticiper.

Le but du cathétérisme est de confirmer l'HTP-DBP et sa sévérité, d'exclure ou documenter des malformations cardiaques associées, de rechercher la présence de vaisseaux collatéraux aorto-pulmonaires, une obstruction veineuse pulmonaire ou une dysfonction cardiaque gauche, et enfin de tester la vasoréactivité pulmonaire à l'aide de monoxyde d'azote inhalé (NOi) ou O₂ afin de déterminer la réponse à une éventuelle thérapie vasodilatatrice pulmonaire. On considère que la réponse à ce test est positive si l'on observe une diminution $\geq 20\%$ de la PAPm avec une augmentation ou absence de changement de l'index cardiaque et une diminution ou absence de changement du ratio RVP sur résistances vasculaires systémiques (RVS) (19,24).

L'AHA et l'ATS recommandent la réalisation d'un cathétérisme cardiaque chez les enfants atteints de DBP qui ont des signes persistants de pathologie cardiorespiratoire sévère ou une dégradation clinique non liée à l'atteinte respiratoire sous-jacente, chez les enfants suspects d'avoir une HTP-DBP significative malgré une prise en charge optimale de leur pathologie respiratoire sous-jacente, chez les enfants candidats à une thérapie vasodilatatrice pulmonaire ainsi que chez les enfants qui présentent des tableaux d'œdèmes pulmonaires récurrents inexplicables (24).

Au total, étant donné l'association fréquente entre DBP et HTP, plusieurs auteurs dont l'AHA et l'ATS ont proposé un algorithme de dépistage de l'HTP-DBP pour les nouveau-nés grands prématurés (Figure 5).

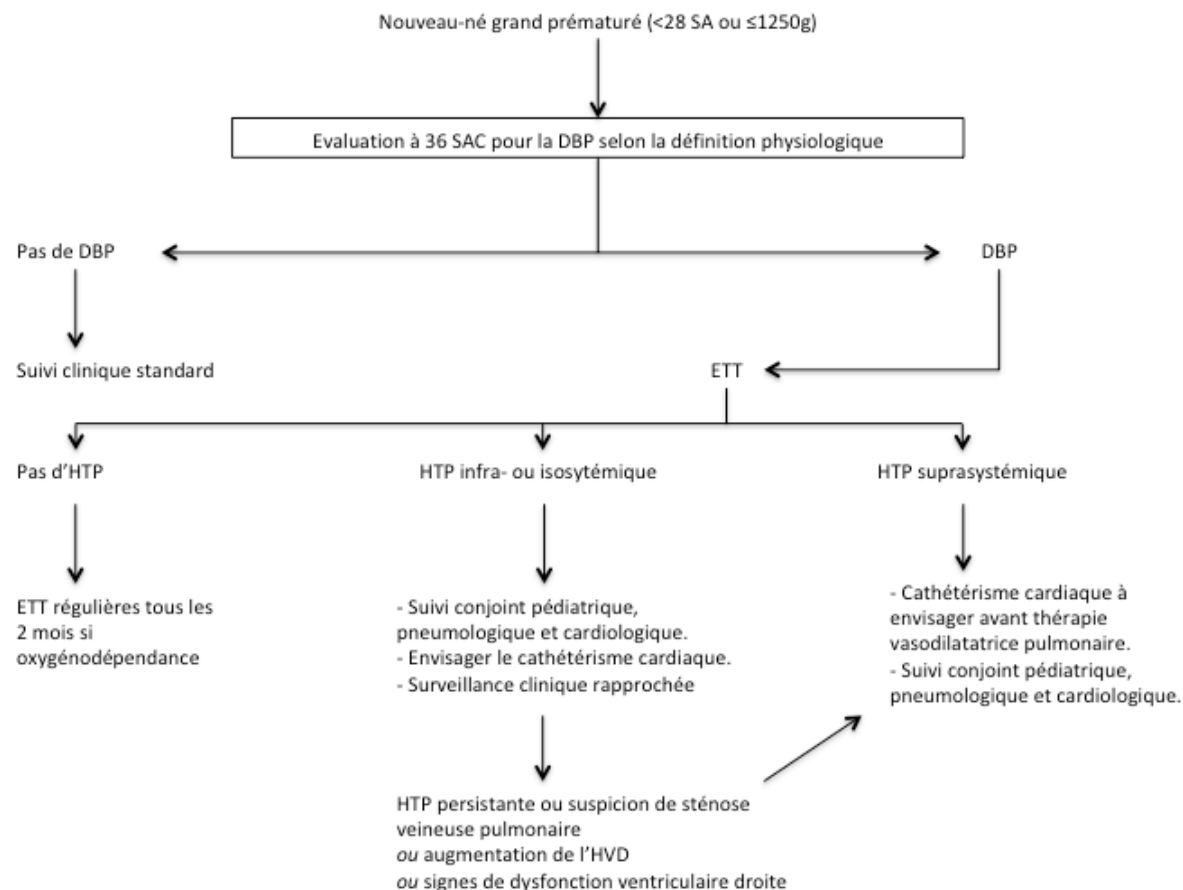


Figure 5 : Algorithme de dépistage de l'HTP-DBP chez les nouveau-nés grands prématurés (d'après la référence (18)).

4.1.5.5. Biomarqueurs

Le *Brain-type Natriuretic Peptide* (BNP) est un peptide sécrété par les cardiomyocytes en réponse à un facteur hormonal comme l'angiotensine II ou dans le contexte de dilatation des cavités cardiaques. Il induit une natriurèse et une vasodilatation et inhibe les effets du système rénine-angiotensine-aldostérone (18,22).

Le NT-proBNP est le fragment inactif relargué à partir du clivage du pro-BNP en BNP.

Ces 2 molécules ont été proposées comme biomarqueurs de la dilatation du ventricule droit car il semble exister une corrélation positive entre le taux de BNP et le diagnostic d'HTP dans la population pédiatrique. Le BNP peut également être utilisé pour monitorer la réponse au traitement car il diminue avec l'augmentation de la fonction ventriculaire droite (18,22,24).

Les valeurs pédiatriques sont encore incertaines avec une augmentation physiologique post-natale puis diminution <50pg/ml entre 6-9 mois et nouvelle augmentation à la fin de l'adolescence pour atteindre les valeurs adultes (<100pg/ml) (24).

4.2. Complications respiratoires

4.2.1. Altérations de la fonction respiratoire

Selon les études de suivi d'anciens prématurés, jusqu'à 78% des extrêmes prématurés (<26 SA) ont des anomalies fonctionnelles respiratoires à l'âge de 11 ans, surtout ceux avec une DBP (26).

La compliance pulmonaire est nettement altérée chez les nouveau-nés avec DBP fixée du fait d'un rétrécissement des voies aériennes, d'une fibrose interstitielle, d'œdème et d'atélectasies (27). Il peut également y avoir une augmentation globale des résistances aux flux inspiratoire et expiratoire responsable d'une limitation sévère de ce flux respiratoire, surtout pour des volumes pulmonaires faibles (28). La présence d'une trachéomalacie, fréquente chez le nouveau-né prématuré, peut également entraîner une limitation de ce flux respiratoire. Cependant, des études longitudinales sur des enfants atteints de DBP ont mis en évidence une rémission progressive de ces dysfonctionnements pulmonaires sévères à l'âge de 2-3 ans (28).

Une méta-analyse (29) récente avait mis en évidence une réduction moyenne du volume expiratoire maximal par seconde (VEMS) de 20% à l'âge scolaire chez les anciens nouveau-nés prématurés avec DBP contre 5% chez les nouveau-nés prématurés sans DBP. Seule une minorité de ces enfants (32%) répond aux bronchodilatateurs ce qui montre le caractère fixé de ce syndrome obstructif. En effet, malgré l'amélioration de la prise en charge des nouveau-nés prématurés, il semble persister des anomalies de croissance des voies aériennes directement en lien avec la naissance prématurée, la vulnérabilité des poumons très immatures même à des pressions ventilatoires basses et des concentrations en O₂ faibles, l'augmentation de la compliance pulmonaire et des anomalies de structure pulmonaire (30). Ce phénomène de couloir ou « tracking » de la fonction respiratoire de la naissance jusqu'à l'âge adulte est expliqué à 50% par des facteurs génétiques mais également par des facteurs prénataux tels que le tabagisme maternel ou le RCIU qui sont responsables d'anomalies de croissance des voies aériennes, des alvéoles et de la microvascularisation pulmonaire. Il est également

expliqué par les agressions environnementales post-natales liées à la prise en charge réanimatoire de ces nouveau-nés prématurés mais également liées à l'exposition à des contaminants aériens (polluants, tabagisme passif, agents infectieux). Ainsi, les enfants survivants de DBP ont une tendance augmentée à développer un phénotype de broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) à long terme. A ce phénomène se surajoute la forte prévalence du tabagisme (environ 30%) chez les jeunes adultes de 18-22 ans anciens prématurés qui accélère le déclin de la fonction respiratoire (26,31).

4.2.2. « Asthme » et wheezing

Il existe une augmentation importante du taux de toux chronique et *wheezing* chez les enfants en âge préscolaire et scolaire nés prématurés, et surtout chez ceux ayant eu une DBP ou une ventilation mécanique (27). La prévalence de symptômes proches de l'asthme est également augmentée dans cette population, avec une hyperréactivité des voies aériennes qui touche jusqu'à 50-60% des adolescents avec antécédent de DBP. La physiopathologie de cet « asthme » n'est pas clairement établie mais les mécanismes sont différents de ceux de l'asthme allergique. En effet, le NO expiré, marqueur d'inflammation à éosinophiles dans l'asthme allergique, est normal chez les enfants avec DBP et la réponse aux bronchodilatateurs β 2-agonistes est réduite (27). L'altération de croissance des voies aériennes serait possiblement à l'origine de ces symptômes respiratoires qui ne semblent pas s'amender avec l'âge.

Le risque d'« asthme » ou *wheezing* est inversement corrélé avec l'âge gestationnel. Ainsi, dans une récente méta-analyse européenne, les nouveau-nés prématurés nés avant 28 SA avaient un risque élevé de *wheezing* préscolaire (OR 3,87 ; IC 95% [2,7-5,53]) ou d'« asthme » entre 5 et 10 ans (OR 2,92 ; IC 95% [1,84-4,62]), et ce risque persistait en cas de prématurité modérée (32). De même, dans l'étude EPICure, 25% des nouveau-nés extrêmes prématurés nés avant 26 SA avaient des symptômes d'« asthme » à l'âge de 11 ans contre seulement 13% ($p<0,001$) des contrôles nés à terme (30). Enfin, l'étude française EPIPAGE 1 a confirmé ces résultats et a montré que les enfants prématurés nés avant 33 SA avaient plus de crises d'« asthme » dans les 12 derniers mois (19,5% versus 8,8% ; $p<0,05$) et de toux chronique à 5 ans (10,3% versus 6,7% ; $p<0,05$) que les enfants nés à terme (33).

4.2.3. Altération des défenses pulmonaires

Selon l'étude de cohorte EPIPAGE 1, sur les 376 nouveau-nés prématurés nés avant 29 SA, 178 (47,3% ; IC 95% [42,3-52,4%]) ont été réhospitalisés au moins une fois dans les 9 mois qui ont suivi la sortie d'hospitalisation en néonatalogie. Parmi eux, 55% ont été hospitalisés au moins une fois pour troubles respiratoires. De plus, ce taux d'hospitalisation était plus élevé pour les enfants avec une DBP (OR 2,2 ; IC 95% [1,3-3,7]), ceux sortis d'hospitalisation initiale entre août et octobre (OR 2,5 ; IC 95% [1,2-5,1]) ou entre novembre et janvier (OR 3,2 ; IC 95% [1,5-6,8]) et ceux vivants avec des enfants de moins de 6 ans (OR 3,4 ; IC 95% [1,6-7,5]) du fait du risque infectieux supérieur (34).

En effet, les nouveau-nés prématurés ont une susceptibilité augmentée aux infections respiratoires même communes qui peuvent être responsables d'une morbidité sévère voire du décès. Les études

épidémiologiques et animales ont montré que la DBP augmente la susceptibilité aux lésions pulmonaires viro-induites avec des anomalies de réponse inflammatoire (35,36).

4.2.4. Intolérance à l'exercice

Les enfants ayant eu une DBP ont une diminution des performances à l'exercice du fait d'un défaut d'adaptation ventilatoire et d'une diminution des échanges gazeux (27).

Par ailleurs, une étude sur des enfants anciens prématurés âgés de 7 à 14 ans ayant eu une DBP a mis en évidence une hypoxémie dans 60% des cas lors du pic d'activité avec une augmentation concomitante de la capnie, reflet d'une hypoventilation alvéolaire en lien avec l'absence d'augmentation du volume courant lors de l'exercice (37).

Il existe également chez ces enfants un risque de bronchoconstriction induite par l'exercice (36).

4.3. Complications neuro-développementales

Les enfants nés prématurés avec DBP ont un risque plus élevé de paralysie cérébrale et de retard des fonctions motrices et cognitives en comparaison à des contrôles appariés sur l'âge gestationnel (38). De plus, une étude de cohorte récente a mis en évidence que l'HTP-DBP est un facteur de risque indépendant de quotient intellectuel inférieur à 70 à l'âge de 3 ans chez des anciens prématurés nés avant 28 SA (39). Enfin, un lien a été fait entre ventilation mécanique prolongée ≥ 28 jours ou hospitalisation prolongée après 43 SAC et altération du développement neuro-psychomoteur chez les enfants nés prématurés (40).

L'usage précoce (première semaine de vie) des corticoïdes systémiques est également responsable d'un défaut de croissance du périmètre crânien (PC) et d'une augmentation du risque de paralysie cérébrale (41).

5. Prise en charge thérapeutique

5.1. Thérapeutiques actuelles de la DBP

5.1.1. Surfactant

Le surfactant endogène est synthétisé par les pneumocytes de type II dès la 20^{ème} semaine d'aménorrhée. Il est composé majoritairement de phospholipides et de protéines et joue un rôle primordial d'agent tensio-actif de la surface alvéolaire dès la première respiration, ce qui maintient une capacité résiduelle fonctionnelle, limite le travail respiratoire et améliore les échanges gazeux.

La maladie des membranes hyalines (MMH) est due à une insuffisance quantitative ou qualitative de surfactant, et se manifeste par une détresse respiratoire aiguë à la naissance. Elle survient préférentiellement chez le nouveau-né prématuré et son incidence est inversement proportionnelle à l'âge gestationnel.

Une méta-analyse de la Cochrane a mis en évidence que l'instillation prophylactique de surfactant par intubation endotrachéale chez les nouveau-nés à risque de MMH augmentait le risque de lésions pulmonaires ou de décès en comparaison de la mise en place d'une pression positive continue nasale (PPCN) pour stabiliser le nouveau-né puis l'instillation sélective de surfactant chez les nouveau-nés ayant une MMH (RR 1,13 ; IC 95% [1,02-1,25]) (42). Ainsi, l'administration précoce (avant H2 de vie) de surfactant exogène animal en cas de MMH permettait une amélioration rapide de l'état respiratoire, diminuait significativement la mortalité néonatale (RR 0,68 ; IC 95% [0,57-0,82]) et le critère composite décès ou DBP à J28 (RR 0,83 ; IC 95% [0,77-0,9]) (43).

Concernant le mode d'administration, depuis quelques années plusieurs techniques ont été développées qui visent à réduire au minimum la durée d'intubation (méthode INSURE (*Intubation SURfactant Extubation*)) ou qui se passent complètement de l'intubation comme la méthode LISA (*Less Invasive Surfactant Therapy*) qui consiste à injecter le surfactant exogène dans la trachée via un cathéter de petit diamètre et sous ventilation par PPCN. Une méta-analyse récente portant sur près de 6000 nouveau-nés prématurés de < 33 SA a montré que l'instillation de surfactant par méthode LISA permettait une diminution significative du risque de DBP ou décès à 36 SAC (OR 0,49 ; IC 95% [0,3-0,79]), du risque de DBP seule (OR 0,53 ; IC 95% [0,27-0,96]) et du risque d'hémorragie intraventriculaire (HIV) sévère (OR 0,44 ; IC 95% [0,19-0,99]) en comparaison de la ventilation mécanique. Dans cette étude, la méthode LISA semble être la meilleure stratégie et elle se place donc comme alternative à la méthode INSURE qui nécessite une intubation suivie par une extubation rapide. La méthode INSURE apparaît donc comme la 2^{ème} meilleure option (44).

Les recommandations européennes (45) et de l'*American Academy of Pediatrics* (AAP) (46) sont donc la mise en place d'une PPCN précoce et l'instillation rapide de surfactant (200 mg/kg) pour les enfants avec tableau de MMH.

5.1.2. Techniques de ventilation

Quel que soit le mode ventilatoire utilisé, les objectifs principaux sont de limiter les traumatismes sur le poumon (volotraumatismes et barotraumatisme), maintenir une capacité résiduelle fonctionnelle optimale et assurer une bonne synchronisation patient-respirateur.

5.1.2.1. *Non invasives*

Il a clairement été démontré que la ventilation mécanique est responsable de lésions pulmonaires barotraumatiques (lésions causées par des pressions élevées) et volotraumatiques (lésions causées par des volumes importants) qui sont responsables d'un étirement tissulaire excessif avec rupture alvéolaire et altération de l'épithélium respiratoire conduisant à un œdème et de l'inflammation (47). Pour ces raisons, des supports ventilatoires non invasifs ont été mis au point afin de limiter la morbidité néonatale en lien avec la ventilation mécanique.

La PPCN seule n'a pas montré d'efficacité pour la diminution du risque de DBP. En effet, dans l'étude SUPPORT qui a étudié 1316 nouveau-nés prématurés entre 24 et < 28 SA, le taux de DBP/décès n'était pas significativement différent entre les groupes PPCN et intubation pour instillation de surfactant (48). Mais, comme démontré précédemment, la PPCN précoce associée à l'instillation sélective de surfactant à l'aide d'une technique moins invasive (méthode LISA) ou avec une intubation courte (méthode INSURE) diminue de façon significative le risque de DBP/décès (43,44).

L'autre mode de ventilation non invasive fréquemment utilisé en unités de soins intensifs néonataux est la ventilation nasale à pression positive intermittente (VNPPI) qui consiste à appliquer une pression inspiratoire positive à une fréquence réglée via une interface nasale. Elle peut être synchronisée ou non synchronisée à la respiration spontanée du patient. Les différents essais randomisés contrôlés qui ont comparé l'utilisation de la PPCN versus la VNPPI n'ont pas mis en évidence de différence significative pour la diminution de l'incidence du critère composite DBP/décès (49). Ces résultats ont été confirmés dans un essai randomisé contrôlé multicentrique qui a comparé la VNPPI à la PPCN chez 1009 nouveau-nés prématurés de moins de 1000g et < 30 SA nécessitant un soutien ventilatoire dans les 28 premiers jours de vie. Le taux de survie à 36 SAC sans DBP n'était pas significativement différent entre les groupes (38,4% versus 36,7% ; $p=0,56$) (50). Cependant, il serait intéressant d'effectuer des essais randomisés contrôlés comparant la VNPPI à la ventilation invasive pour la réduction du risque de DBP.

5.1.2.2. *Invasives*

Bien que les recommandations actuelles tendent à limiter le recours à l'intubation en première intention, il semblerait que près de 50% des nouveau-nés prématurés placés sous PPCN juste après la naissance sont intubés secondairement pour des apnées ou une détresse respiratoire (51). Le choix d'une ventilation invasive la plus performante et la moins délétère possible pour le poumon du nouveau-né prématuré est donc primordial.

5.1.2.2.1. Synchronisation

L'utilisation d'une ventilation synchronisée sur la fréquence respiratoire du nouveau-né ventilé est possible et recommandée. Selon les respirateurs utilisés, le dispositif de détection est différent : variation de débit ou de pression, ou encore électromyogramme diaphragmatique dans le mode NAVA (*Neurally Adjusted Ventilatory Assist*).

Une méta-analyse de la Cochrane a mis en évidence que l'utilisation d'une ventilation synchronisée dans les services de soins intensifs de néonatalogie diminuait de façon significative le risque de pneumothorax (RR 0,69 ; IC 95% [0,51-0,93]) et la durée de ventilation mécanique (différence moyenne = -38,3 heures ; IC 95% [-53,9 à -22,69]) en comparaison d'une ventilation invasive non synchronisée. Cependant, les auteurs n'ont pas mis en évidence d'effet significatif sur l'incidence de la DBP (52).

5.1.2.2.2. Mode volume ou pression-contrôlé(e)

La ventilation en volume-contrôlé est une alternative à la ventilation en pression-contrôlée plus largement utilisée en néonatalogie et qui consiste à régler une pression d'insufflation fixe. La ventilation en volume-contrôlé consiste à régler un volume courant cible et le respirateur régulera la pression inspiratoire à chaque cycle, toujours en dessous d'un seuil maximal réglé, afin de délivrer ce volume courant cible. La pression inspiratoire n'est donc pas fixe mais varie à chaque cycle et s'adapte à l'évolution de la compliance pulmonaire. Ce mode de ventilation limiterait donc le risque de volotraumatisme et la surdistension pulmonaire mis en jeu dans le développement de la DBP (53).

Une méta-analyse de la Cochrane comparant ces 2 modes de ventilation a montré que l'utilisation du mode volume-contrôlé permettait une diminution significative du critère composite décès ou DBP (RR 0,73 ; IC 95% [0,59-0,89]). Il permettait également une diminution significative du risque de pneumothorax (RR 0,52 ; IC 95% [0,31-0,87]), de la durée moyenne de ventilation (différence moyenne = -1,35 ; IC 95% [-1,83 à -0,86]), du risque d'hypocapnie (RR 0,49 ; IC 95% [0,33-0,72]) et du risque combiné de leucomalacie périventriculaire ou de HIV sévère (RR 0,47 ; IC [95% 0,27-0,80]) (54).

5.1.2.2.3. Ventilation non conventionnelle ou haute fréquence

La ventilation à haute fréquence (VHF) a été développée dans le but d'éviter les lésions barotraumatiques causées par les larges variations de pression dans la ventilation conventionnelle à pression positive intermittente mais également volotraumatique en diminuant les forces de cisaillement par diminution des variations du volume alvéolaire. Elle consiste à ventiler avec un volume courant très faible et une fréquence respiratoire très rapide supérieure à 5 Hz (300 cycles/min). Le volume courant est généré de manière différente selon le type de VHF : soit par interruption du débit à haute fréquence, soit par oscillation d'une membrane ou d'un piston (ventilation par oscillation à haute fréquence (OHF)) (53).

Une méta-analyse de la Cochrane étudiant plus de 4000 enfants n'a pas mis en évidence de différence de mortalité à J28 ou au terme corrigé entre ventilation par OHF et ventilation conventionnelle.

Concernant le risque de DBP, il était significativement réduit dans le groupe OHF (RR 0,86 ; IC 95% [0,78-0,96]) mais cet effet n'était pas constant entre les études. Le risque de pneumothorax ou d'emphysème pulmonaire interstitiel était plus fréquent dans le groupe OHF (RR 1,19 ; IC 95% [1,05-1,34]), alors que celui de rétinopathie du prématuré (*retinopathy of prematurity* ou ROP) était diminué (RR 0,81 ; IC 95% [0,70-0,93]). Enfin, les auteurs n'ont pas mis en évidence de différence pour le risque de HIV sévère ou de leucomalacie périventriculaire entre les 2 groupes, ni concernant le développement neurologique à long terme. En conclusion, la ventilation par OHF ne peut actuellement pas être recommandée en première intention pour la prise en charge ventilatoire des nouveau-nés prématurés à risque de DBP du fait du risque plus important de pneumothorax et d'un bénéfice encore incertain sur le développement d'une DBP (55). Elle reste, à l'heure actuelle, un mode de ventilation de sauvetage pour les enfants les plus sévères.

5.1.2.2.4. Neurally Adjusted Ventilatory Assist (NAVA)

La ventilation en mode NAVA est une nouvelle technique de ventilation synchronisée qui utilise comme dispositif de détection du mouvement inspiratoire du patient ventilé le signal électromyographique (dépolarisation) du diaphragme. Une sonde nasogastrique au bout de laquelle sont placées des électrodes va être positionnée de façon précise à proximité du diaphragme et les électrodes vont ainsi enregistrer l'activité électrique du diaphragme. La ventilation délivrée (en pression) sera proportionnelle à l'activité électrique du diaphragme. Ce mode de ventilation permet une meilleure synchronisation patient-machine et une assistance proportionnelle aux besoins du patient en réduisant le délai de déclenchement du ventilateur. Il permet également de limiter les lésions pulmonaires liées à la ventilation car le volume courant, la pression moyenne et la fréquence respiratoire sont variables à chaque cycle respiratoire du patient.

Il existe peu d'études comparant la NAVA et la ventilation conventionnelle chez le nouveau-né prématuré. Parmi les quelques essais réalisés, il semblerait que la NAVA permette une diminution de la pression inspiratoire positive, de la FiO₂ et qu'elle améliore la décarboxylation (56,57).

Une méta-analyse de la Cochrane portant sur un seul essai randomisé-contrôlé n'a pas mis en évidence de différence entre la NAVA et la ventilation conventionnelle sur la durée de ventilation ni sur le taux de DBP, pneumothorax ou HIV (58).

Des essais randomisés-contrôlés de plus grandes tailles sont donc nécessaires afin de juger de l'intérêt de la NAVA pour la prévention du risque de DBP chez le nouveau-né prématuré.

Le mode NAVA peut également être utilisé en ventilation non invasive (VNI). Il n'existe pas à ce jour d'études de l'effet de la VNI NAVA sur l'incidence de la DBP mais il pourrait être intéressant dans la prise en charge ventilatoire initiale pour éviter le recours à l'intubation ou en relai de la ventilation invasive pour diminuer la durée d'intubation.

5.1.2.3. *Hypercapnie permissive*

Des études observationnelles de nouveau-nés prématurés exposés à une hyperventilation ont montré que ces enfants étaient plus à risque de DBP du fait de la ventilation trop importante (59,60) et d'atteintes neurologiques suite à l'hypocapnie (leucomalacie périventriculaire et paralysie cérébrale) (61,62). De là est né le concept d'hypercapnie permissive qui consiste à limiter volontairement les paramètres de ventilation du patient et tolérer une capnie élevée afin de limiter les lésions pulmonaires volotraumatiques.

Elle a été largement étudiée chez l'adulte mais peu d'études randomisées contrôlées existent chez le nouveau-né prématuré. Une méta-analyse de la Cochrane portant sur 2 essais n'a pas mis en évidence d'effet de l'hypercapnie permissive sur la diminution de l'incidence du critère composite décès ou DBP à 36 SA (RR 0,84 ; IC 95% [0,54-1,31]) ni sur la diminution des HIV sévères ou la leucomalacie périventriculaire. Le développement neurologique à long terme n'avait pas été étudié (63). Plus récemment, *Thome et al* ont confirmé ces résultats lors d'un essai randomisé-contrôlé multicentrique (essai PHELIBI) étudiant les effets de l'hypercapnie permissive entre J1 et J14 de vie chez 359 nouveau-nés prématurés avant 29 SA et avec un poids de naissance compris entre 400 et 1000 grammes. L'étude a été stoppée après une analyse intermédiaire qui ne montrait pas d'effet significatif de l'hypercapnie permissive pour le critère composite décès ou DBP modérée à sévère à 36 SA en comparaison du groupe contrôle (36% versus 30% ; p=0,18). Les auteurs n'ont également pas montré de différence pour la mortalité, les HIV, la ROP (64) ni le développement neurologique à 2 ans d'âge corrigé (65).

5.1.3. **Oxygénothérapie**

L'O₂ est un des principaux facteurs de risque de développement d'une DBP. Il est responsable de la production d'espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species* ou ROS) dont les radicaux libres qui vont entraîner un stress oxydant important au sein du poumon immature ce qui perturbe de manière importante les différents signaux de facteurs de croissance, la structure de la matrice extracellulaire, le développement alvéolaire et induit de l'apoptose (18). Dans les modèles animaux, l'hyperoxie aggrave les lésions pulmonaires, participe au remodelage vasculaire pulmonaire et induit un arrêt de la croissance alvéolaire au stade sacculaire (7). L'O₂ est également toxique pour la rétine du prématuré né avant 32 SA puisqu'il participe au développement d'une rétinopathie avec le développement anormale de la microvascularisation pouvant entraîner un décollement de rétine. On estime qu'environ la moitié des nouveau-nés prématurés avant 28 SA développe une ROP, tout stade confondu. L'administration d'O₂ doit donc être prudente chez le nouveau-né prématuré, et ce dès la salle de naissance.

Il n'existe pas de recommandations précises sur les cibles de SaO₂ mesurée à l'aide d'un oxymètre de pouls chez le nouveau-né prématuré. Cependant, une méta-analyse de 5 essais randomisés-contrôlés (4911 nouveau-nés prématurés < 28 SA) comparant des valeurs cibles basses de SaO₂ (85-89%) à des valeurs cibles hautes de SaO₂ (91-95%) a montré qu'une SaO₂ basse était responsable d'une augmentation significative de la mortalité durant l'hospitalisation initiale ou lors du suivi jusqu'à 18-

24 mois (RR 1,41 ; IC 95% [1,14-1,74]) et du risque d'entérocolite ulcéro-nécrosante (RR 1,25 ; IC 95% [1,05-1,49]). Elle permettait cependant la diminution significative du risque de ROP sévère (RR 0,74 ; IC 95% [0,59-0,92]). Les auteurs n'ont pas mis en évidence de différence sur la survenue de lésions cérébrales ni sur la DBP (RR 1,25 ; IC 95% [1,05-1,49]). En conclusion, ils recommandaient des valeurs cibles de SaO₂ entre 90-95% pour les enfants de < 28 SA et jusqu'à 36 SAC (66,67).

Une fois la DBP établie, les enfants atteints sont souvent sujets à des accès d'hypoxie. Or, l'hypoxie active la prolifération des CMLV pulmonaires et est un puissant activateur de la vasoconstriction pulmonaire. Lutter contre cette hypoxie locale ou diffuse via une oxygénothérapie réduit la néomuscularisation des petites artères pulmonaires et la réactivité vasculaire qui caractérisent l'atteinte vasculaire de la DBP et peuvent conduire à l'HTP-DBP (9). Ainsi, plusieurs auteurs recommandent, une fois le terme atteint, une valeur cible de SaO₂ supérieure à 92% voire 95% chez les enfants avec DBP établie et donc à risque d'HTP-DBP (9,36,68).

5.1.4. Nutrition et apports hydriques

5.1.4.1. Nutrition

Les enfants atteints de DBP ont une augmentation de leur métabolisme de base en lien avec un travail respiratoire augmenté, une inflammation chronique et une iatrogénie importante (diurétiques, corticothérapie, restriction hydrique). Leur croissance staturo-pondérale est souvent inférieure à celle des nouveau-nés sans DBP. Or, le retard de croissance intra- et extra-utérin sont des facteurs de risque de DBP (51,69). En effet, des études expérimentales ont montré qu'une nutrition insuffisante dans un contexte d'hyperoxie majorait le risque de DBP (70). *Mataloun et al* ont étudié les effets de la restriction nutritionnelle chez un modèle de lapin broncho-dysplasique après exposition à l'hyperoxie, et ils ont montré que la dénutrition amplifiait les changements d'architecture pulmonaire induits par l'hyperoxie (71). Enfin, *Zana-Taïeb et al* ont mis en évidence un arrêt de l'alvéolisation à J21 dans un modèle de rats RCIU suite à régime maternel pauvre en protéines tout au long de la gestation (72).

Par conséquent, les besoins caloriques chez ces enfants sont 15-25% plus élevés avec des apports énergétiques recommandés >130kcal/kg/j surtout lors des phases d'instabilité. Pour ce faire, l'AAP recommande d'utiliser des formules enrichies ou d'enrichir le lait maternel jusqu'à 6 mois de vie. Concernant les apports protéiques, ils sont nécessaires pour une bonne croissance pulmonaire et pour la réparation tissulaire pulmonaire dans ce contexte de DBP. Les apports recommandés sont donc élevés, autour de 3,5-4,2g/kg/j après la première semaine de vie (3,51).

Depuis quelques années, la recherche s'est intéressée aux acides gras polyinsaturés à chaînes longues et surtout à l'acide docosahexaénoïque (DHA) qui appartient aux oméga-3 et possède des propriétés anti-inflammatoires. Les modèles animaux de supplémentation de l'alimentation en DHA ont montré une diminution des lésions pulmonaires induites par l'hyperoxie chez le raton broncho-dysplasique (73), ainsi qu'une diminution de l'infiltration cellulaire inflammatoire dans les poumons de rats broncho-dysplasiques issus de mères ayant été supplémentées en DHA pendant la gestation (74). Cependant, les études cliniques actuelles n'ont pas confirmé ces résultats. En effet, une méta-analyse réalisée en 2014 (7 études, 1156 patients) n'a pas montré d'effet bénéfique sur la diminution de

l'incidence de la DBP chez les nouveau-nés prématurés ≤ 32 SA (RR 0,88 ; IC95 [0,74-1,05]) (75). Un essai randomisé-contrôlé avec 1273 nouveau-nés prématurés de < 29 SA ayant reçu une alimentation entérale enrichie en DHA versus placebo a montré une augmentation de l'incidence de la DBP dans le groupe DHA (RR 1,13 ; IC 95% [1,02-1,25]) et du critère composite décès ou DBP avant 36 SAC (RR 1,11 ; IC 95% [1-1,23]) (76). Enfin, un essai randomisé-contrôlé de phase 3 est en cours au Canada (MOBYDick Trial) afin de déterminer si la supplémentation maternelle en DHA des mères allaitantes diminue la survie sans DBP à 36 SAC chez des nouveau-nés prématurés < 30 SA (77).

5.1.4.2. Apports hydriques

Concernant les apports liquidiens, aucune étude n'a mis en évidence de lien entre restriction des liquides et diminution de l'incidence de la DBP (78). Par conséquent, les apports hydriques doivent être suffisants pour fournir les nutriments et calories nécessaires à une croissance pondérale harmonieuse et être adaptés aux pertes de l'enfant. Les recommandations sont généralement entre 130-150ml/kg/j après J4 de vie (51).

5.1.5. Prise en charge d'un canal artériel persistant

Environ 70% des nouveau-nés prématurés avant 28 SA ont un CAP. L'effet pathologique de ce canal dépend de l'importance du shunt gauche-droit qu'il entraîne. Initialement, il va être responsable d'œdème et d'hémorragie pulmonaires en lien avec une augmentation du débit sanguin pulmonaire. Parallèlement à ce phénomène, il va y avoir une augmentation simultanée du débit lymphatique pulmonaire qui va compenser l'excès de passage de fluides et de protéines dans le poumon. Cependant, il arrive fréquemment que ce système de drainage soit dépassé, alors l'œdème pulmonaire augmente de manière importante et altère la fonction du surfactant. Il est alors souvent nécessaire de majorer les paramètres ventilatoires ce qui augmente le risque de DBP. Il n'existe cependant pas à ce jour d'essai clinique ayant prouvé le lien entre CAP et DBP (79).

Un modèle expérimental de babouins prématurés conçu pour étudier les effets du CAP sur l'évolution de la DBP a mis en évidence que la fermeture médicamenteuse d'un CAP après 2 semaines de vie permettait une amélioration de la mécanique pulmonaire et une augmentation de la croissance alvéolaire. Cependant, il semblerait que ces effets étaient en lien avec l'ibuprofène et non la fermeture du CAP. En effet, l'ibuprofène permet d'une part, l'augmentation de l'expression de canaux sodiques ENaC (*Epithelial Na⁺ channel*) qui augmentent la clairance hydrique pulmonaire et d'autre part, l'ibuprofène possède des propriétés anti-inflammatoires qui améliorent la croissance pulmonaire distale (80). A l'inverse, il a été montré que la fermeture chirurgicale du CAP chez ce même modèle de babouins était responsable d'une morbidité néonatale par altération de l'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse, augmentation de l'expression de médiateurs pro-inflammatoires et diminution de l'expression des canaux ENaC (81).

5.1.6. Corticoïdes

5.1.6.1. Corticothérapie anténatale

La corticothérapie anténatale est recommandée chez toute femme enceinte à risque d'accouchement prématuré avant 34 SA depuis 1994 car il a été montré qu'elle diminue significativement la mortalité et morbidité néonatales. Ces résultats ont à nouveau été prouvés dans la méta-analyse de la Cochrane en 2017 qui a montré que la corticothérapie anténatale par bétaméthasone ou dexaméthasone en comparaison à un placebo était significativement associée à une diminution de la mortalité périnatale (RR 0,72 ; IC 95% [0,58-0,89]) et néonatale (RR 0,69 ; IC 95% [0,59-0,81]), de l'incidence de MMH (0,59 ; IC 95% [0,56-0,77]), des HIV (RR 0,55 ; IC 95% [0,4-0,76]), d'entérocolite ulcéro-nécrosante (RR 0,5 ; IC 95% [0,32-0,78]), des besoins en ventilation mécanique (RR 0,68 ; IC 95% [0,56-0,84]) et des infections systémiques précoces avant 48h de vie (RR 0,6 ; IC 95% [0,41-0,88]). Les auteurs n'ont cependant pas mis en évidence d'effet de la corticothérapie anténatale sur la DBP (RR 0,86 ; IC 95% [0,42-0,79]) (82).

Dans une méta-analyse récente, *Sotiriadis et al* ont montré que la corticothérapie anténatale avait également un effet sur le développement neurologique à long terme avec une diminution significative du risque de paralysie cérébrale (RR 0,68 ; IC 95% [0,56-0,82]), de handicap sévère (RR 0,79 ; IC 95% [0,73-0,85]) et d'index de développement psychomoteur < 70 (RR 0,829 ; IC 95% [0,737-0,933]) ainsi qu'une augmentation significative de la survie sans séquelle (RR 1,19 ; IC 95% [1,06-1,33]). Les auteurs ont ensuite mis en évidence une supériorité de la bétaméthasone sur la dexaméthasone pour ces critères de développement neurologique (83).

5.1.6.2. Corticothérapie post-natale

L'inflammation, qu'elle soit anténatale (chorioamniotite, rupture prématurée des membranes, ...) ou postnatale (ventilation mécanique, O₂ et infections) favorise le développement de la DBP. De plus, les nouveau-nés prématurés ont une immaturité de l'axe corticotrope avec une production de cortisol quasi-nulle avant 23 SA et qui ne devient significative qu'à partir de 30 SA. Avant ce terme, la synthèse de cortisol nécessaire à la survie du fœtus est assurée par le placenta. La naissance prématurée avant 30 SA prive le nouveau-né de cette synthèse placentaire et altère sa réponse au stress (84).

Les glucocorticoïdes jouent également un rôle important au niveau pulmonaire puisqu'ils accélèrent la maturation de la structure parenchymateuse, augmente la production de surfactant, améliorent la compliance pulmonaire, diminuent la perméabilité vasculaire et augmentent la clairance de l'eau dans les poumons (4). Il a d'ailleurs été montré que les nouveau-nés prématurés qui développent une DBP avaient une cortisolémie plus basse durant la première semaine vie en comparaison de sujets contrôles sains (85).

5.1.6.2.1. Corticothérapie inhalée

Une méta-analyse récente de la Cochrane a comparé les effets d'une corticothérapie inhalée à un placebo dans les 2 premières semaines de vie chez 1088 nouveau-nés prématurés pesant moins de 1500 grammes à la naissance. Les auteurs ont mis en évidence une diminution significative de l'incidence de la DBP à 36 SAC chez les survivants (RR 0,76 ; IC 95% [0,63-0,93]) ainsi que du critère composite décès ou DBP à 36 SAC (RR 0,86 ; IC 95% [0,75-0,99]). Il n'a pas été montré de différence pour les complications à court terme (hypertension artérielle systémique, hyperglycémie, perforations digestives, infections) ni pour les effets indésirables sur le développement neurologique (86).

Cependant, 2 autres méta-analyses de la Cochrane qui ont comparé les corticoïdes systémiques aux corticoïdes inhalés pour la prévention (avant J7) et pour le traitement (après J7) de la DBP n'ont pas montré de bénéfices supérieurs des corticoïdes inhalés sur les corticoïdes systémiques pour l'incidence de la DBP à J28 et à 36 SAC ni pour la mortalité. A l'inverse, les corticoïdes inhalés dans la première semaine de vie allongeaient la durée moyenne de ventilation (différence moyenne = 4 jours ; IC 95% [0,2-8]) ainsi que la durée d'oxygénodépendance (différence moyenne = 11 jours ; IC 95% [2-20]). Les auteurs n'ont pas mis en évidence de différence significative sur le développement neurologique à l'âge de 7 ans dans les 2 études. En conclusion, les corticoïdes inhalés ne peuvent être recommandés pour la prise en charge préventive ou curative des nouveau-nés à risque de DBP (87,88).

5.1.6.2.2. Corticothérapie systémique

5.1.6.2.2.1. *Précoce (<J8)*

Une méta-analyse de la Cochrane portant sur 29 essais (3750 enfants) a montré que les corticoïdes systémiques dans la première semaine de vie permettaient une diminution significative du taux de DBP à J28 (RR 0,87 ; IC 95% [0,81-0,93]) et 36 SAC (RR 0,79 ; IC 95% [0,71-0,88]), du critère composite décès ou DBP J28 et 36 SAC, du taux de CAP, de ROP et d'échec d'extubation. Les auteurs ont cependant mis en évidence une augmentation significative des effets indésirables immédiats (hémorragies et perforations digestives, hyperglycémie, hypertension artérielle systémique, cardiomyopathie hypertrophique et retard de croissance) ainsi que des effets néfastes sur le développement neurologique (retard de développement, paralysie cérébrale (RR 1,45 ; IC 95% [1,06-1,98]) et examen neurologique anormal). L'analyse par sous-groupe selon le type de corticoïdes a montré des effets bénéfiques comme néfastes plus importants avec la dexaméthasone en comparaison de l'hémisuccinate d'hydrocortisone (HSHC). En conclusion, malgré des effets respiratoires bénéfiques, la corticothérapie systémique précoce par dexaméthasone ne peut être recommandée du fait des complications neurologiques importantes qu'elle entraîne (41).

Récemment, l'étude PREMILOC, essai randomisé-contrôlé multicentrique et en double aveugle a étudié les effets d'une corticothérapie par HSHC dans les 10 premiers jours de vie chez 523 nouveau-nés prématurés entre 24 et 27+6 SA. Les auteurs ont mis en évidence une augmentation significative de la survie sans DBP à 36 SAC dans le groupe traité versus groupe placebo (OR 1,48 ; IC 95% [1,02-

2,16] ; $p=0,04$) ainsi qu'une augmentation du nombre de patients extubés (OR 2,07 ; IC 95% [1,42-3,02]) et du nombre de patients sevrés en O₂ à 36 SAC (OR 1,31 ; IC 95% [1,02-1,68]). Ils n'ont pas montré de différence pour les effets indésirables à court terme ni pour la croissance du PC à 36 SAC. Après ajustement sur l'âge gestationnel, les auteurs ont montré une diminution du taux de décès avant la sortie dans le groupe 26-27 SA (ORa 0,45 ; IC 95% [0,22-0,91]) mais cependant une augmentation du nombre de sepsis tardifs avant la sortie dans le groupe 24-25 SA (ORa 1,87 ; IC 95% [1,09-3,21]) (89). Une seconde étude, menée par la même équipe et sur la même cohorte de patients, a évalué les effets de la corticothérapie précoce par HSHC sur le développement neurologique à 2 ans de vie. 93% des enfants randomisés initialement ont pu être évalués (194/266 dans le groupe traité et 185/257 dans le groupe placebo). Les auteurs n'ont pas mis en évidence de différence sur la survie sans anomalie du développement neurologique, avec des anomalies légères ou avec des anomalies modérées à sévères. Le quotient de développement global n'était pas significativement différent entre les groupes, ni l'incidence de paralysie cérébrale ou tout autre anomalie majeure du développement neurologique (84). Ces nouveaux résultats, s'ils sont confirmés par d'autres études, pourraient impacter la prise en charge préventive de la DBP chez les nouveau-nés prématurés.

5.1.6.2.2.2. *Tardive (>J7)*

La dernière méta-analyse de la Cochrane (21 essais ; 1424 enfants) a montré que les corticoïdes systémiques après J7 de vie, en comparaison à un placebo, permettaient une diminution de la mortalité néonatale (jusqu'à J28) (RR 0,4 ; IC 95% [0,28-0,85]), ainsi que du taux de DBP à J28 (RR 0,87 ; IC 95% [0,81-0,94]) et 36 SAC (RR 0,77 ; IC 95% [0,67-0,88]). Les corticoïdes diminuaient également le risque d'échec d'extubation à J3, J7 et J28, l'oxygénothérapie au domicile et le critère composite décès ou DBP à J28 et 36 SAC. Cependant, ils étaient responsables d'une augmentation du taux d'effets indésirables à court terme ainsi que d'une augmentation significative du taux de ROP (RR 1,38 ; IC 95% [1,07-1,79]). Le taux de paralysie cérébrale n'était pas différent entre les 2 groupes ni le critère composite décès ou paralysie cérébrale. La majorité des essais étudiés portaient sur la dexaméthasone. En conclusion, cette étude a mis en avant des effets bénéfiques de la corticothérapie systémique tardive par dexaméthasone, à savoir une diminution de la mortalité néonatale sans augmentation des effets indésirables neurologiques mais également un risque important d'effets indésirables à court terme qui nécessite une utilisation prudente et restreinte aux enfants les plus graves qui restent dépendants d'une ventilation mécanique (90).

Deux essais randomisés contrôlés, l'étude STOP-BPD (91) et une autre conduite par le *NIHCD Network* (92), qui étudient les effets d'un traitement tardif par HSHC sur la DBP chez des nouveau-nés prématurés de moins de 30 SA sont actuellement en cours.

5.1.6.2.3. Corticoïdes et surfactant

Le budésonide est un corticoïde qui possède un effet anti-inflammatoire pulmonaire prolongé car après administration, 80% restent dans le poumon pendant environ 8h et l'on retrouve 5 à 10% de budésonide après une semaine de traitement. Il inhibe la synthèse de cytokines pro-inflammatoires mais augmente également l'expression de protéines anti-inflammatoires. Après injection intra-trachéale, seuls 4% du budésonide passent dans la circulation systémique durant les 8 premières heures, ce qui diminue de manière importante le risque d'effets indésirables systémiques (93). Les études expérimentales animales ont montré que l'association du budésonide avec le surfactant en instillation intra-trachéale permettait une meilleure distribution du budésonide dans le poumon en comparaison à la nébulisation (94) et que le budésonide permettait une augmentation du recrutement alvéolaire et de la synthèse de surfactant endogène dans un modèle de lapin prématuré en comparaison au surfactant ou au budésonide seul (95).

Une méta-analyse récente (2 études ; 381 nouveau-nés prématurés pesant moins de 1500g à la naissance) a montré que l'instillation concomitante de surfactant et budésonide diminuait significativement le risque de DBP (RR 0,57 ; IC 95% [0,43-0,76]) ainsi que le critère composite décès ou DBP (RR 0,6 ; IC 95% [0,49-0,74]) en comparaison au surfactant seul. Les auteurs n'ont pas mis en évidence de différence pour la mortalité (93).

5.1.7. Bronchodilatateurs

Il existe peu d'études sur l'intérêt des bronchodilatateurs chez le patient bronchodysplasique. Cependant, à ce jour, l'utilisation d'un traitement par bronchodilatateurs β_2 -agonistes pour la prévention de la DBP n'a pas montré de bénéfices supplémentaires (96). De plus, leur usage doit être prudent et limité aux enfants avec des signes cliniques ou fonctionnels d'obstruction réversible des voies aériennes lors des explorations fonctionnelles respiratoires ou en cas d'exacerbations. En effet, ces traitements peuvent entraîner une réponse paradoxale en cas de trachéo-bronchomalacie associée (27,68).

5.1.8. Monoxyde d'azote inhalé

Les RVP sont souvent augmentées chez les nouveau-nés atteints de DBP par remodelage des petites artères pulmonaire et diminution de la densité vasculaire. Le NO est un puissant vasodilatateur pulmonaire synthétisé entre autre par les cellules endothéliales et épithéliales pulmonaires. Il inhibe la prolifération des CML vasculaires et bronchiques (97) et joue un rôle important dans l'angiogenèse en stimulant la prolifération et la migration des cellules endothéliales via le VEGF (98,99). Il possède également des propriétés anti-inflammatoires et plusieurs études animales ont montré que le NO endogène ou inhalé joue un rôle dans la croissance alvéolaire du poumon distal (99–101). Enfin, il a également été prouvé que l'expression pulmonaire de la NOS, enzyme qui dégrade la L-citrulline en NO, est diminuée dans les modèles animaux de DBP (97,102).

Pour toutes ces raisons, le NOi est une thérapeutique d'intérêt pour la prise en charge des nouveau-nés prématurés à risque de DBP. Cependant, malgré de nombreuses études, il semblerait que le NOi ne

soit pas efficace pour la prévention de la DBP. En effet, une méta-analyse récente a distingué 3 indications d'utilisation du NOi : hypoxémie précoce dans les 3 premiers jours de vie (8 études ; 958 patients), usage de routine pour pathologie respiratoire (4 études ; 1924 patients) et traitement tardif après J3 de vie devant un risque augmenté de DBP (3 études ; 1075 patients). Aucune de ces études n'a montré d'effet du NOi sur l'incidence de la DBP (103).

5.1.9. Citrate de caféine

La caféine est une méthylxantine utilisée en prévention des apnées centrales du prématuré chez les nouveau-nés avant 34 SA du fait de ses propriétés activatrices des centres respiratoires (104).

Dans un essai randomisé-contrôlé étudiant les effets de la caféine versus placebo chez 2006 nouveau-nés prématurés pesant 500 à 1250g, les auteurs ont mis en évidence une diminution significative de l'incidence de la DBP à 36 SAC (OR 0,63 ; IC 95% [0,52-0,76]) (105). De plus, les auteurs ont également montré que la caféine améliorait la survie sans handicap neuro-développemental à 18-21 mois d'âge corrigé (OR 0,77 ; IC 95% [0,64-0,93]), diminuait le risque de retard du développement (OR 0,81 ; IC 95% [0,66-0,99]) et diminuait le risque de paralysie cérébrale (OR 0,58 ; IC 95% [0,39-0,87]) (106). Les mécanismes mis en jeu restent cependant méconnus.

Ainsi, la caféine est recommandée chez les nouveau-nés prématurés de moins de 32 SA avec une dose de charge de 20mg/kg/j en IV suivie par une dose d'entretien de 5mg/kg/j en IV jusqu'à 34 SAC.

5.1.10. Diurétiques

Les diurétiques sont fréquemment prescrits en unités de soins intensifs néonatales chez des nouveau-nés prématurés hypoxémiques avec œdème pulmonaire ou en cas de pathologie respiratoire sévère avec trouble de l'homéostasie hydrique. Le furosémide est un diurétique le plus fréquemment prescrit du fait de son efficacité rapide mais il n'est pas recommandé à long terme car il possède de nombreux effets indésirables (alcalose, hyponatrémie, hypokaliémie, ototoxicité, néphrocalcinose et ostéopénie). De plus, lorsque l'administration d'un diurétique est répétée plusieurs jours, des mécanismes d'adaptation hormonale et rénale peuvent limiter la réponse à ce diurétique. L'association de 2 diurétiques avec des sites d'action différents sur le néphron permet donc de dépasser ce mécanisme adaptatif (68).

Une méta-analyse de la Cochrane (6 études) a montré que l'association d'un diurétique thiazidique et de la spironolactone pendant 4 semaines chez des nouveau-nés prématurés après 3 semaines de vie avec une DBP améliorait la compliance pulmonaire et diminuait le recours à un traitement par furosémide. Les auteurs ont également montré une diminution de la mortalité (RR 0,30 ; IC 95% [0,009-0,93]) (107).

5.1.11. Macrolides

Ureaplasma urealytica est un germe commensal du tractus génito-urinaire chez l'adulte et il est l'organisme le plus fréquemment isolé dans la culture de liquide amniotique. On considère qu'environ 28 à 33% des nouveau-nés prématurés avec un poids de naissance ≤ 1500 g ont une colonisation du tractus respiratoire par *Ureaplasma* (108). De plus, une méta-analyse de 39 études a montré une association significative entre *Ureaplasma* et DBP à J28 (OR 3,04 ; IC 95% [2,41-3,83]) ainsi qu'à 36 SAC (OR 2,22 ; IC 95% [1,42-3,47]) (109).

Les macrolides sont des antibiotiques actifs sur les *Ureaplasma* avec également de puissants effets immuno-modulateurs et anti-inflammatoires via l'inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires dans le poumon.

L'érythromycine, en traitement préventif comme curatif n'a pas montré d'effet sur la réduction du risque de DBP chez les enfants intubés (110).

L'azithromycine est un macrolide de nouvelle génération plus puissant que l'érythromycine. Des études faites sur les aspirations trachéales d'enfants intubés ont montré que l'azithromycine entraîne une diminution de la production d'IL-6 et IL-8 par les cellules trachéales (111). Cependant, des essais cliniques adultes ont montré que l'azithromycine pouvait être responsable d'épisodes de torsades de pointe par allongement de l'espace QT (112). Les méta-analyses réalisés sur la population pédiatrique ont montré un effet significatif de l'azithromycine en traitement prophylactique sur la diminution de l'incidence de la DBP (RR 0,83 ; IC 95% [0,71-0,97]) sans augmentation du nombre d'effets secondaires imputables au traitement (113,114). Cette méta-analyse a été réalisée à partir de 3 études dont 2 sur une population de nouveau-nés prématurés ventilés mécaniquement et pesant < 1250 g (115) ou < 1000 g (116) à la naissance qui ont reçu un traitement par azithromycine 10mg/kg/j pendant 7 jours initié entre J1 et J3 puis 5mg/kg/j jusqu'à sevrage de la ventilation mécanique ou de l'O₂ (durée maximale de traitement 6 semaines). La 3^{ème} étude (117) a été réalisée sur une population de nouveau-nés prématurés avant 32 SA et pesant < 1500 g à la naissance qui ont reçu à partir de J7 de vie un traitement par azithromycine 10mg/kg/j pendant 7 jours puis 5mg/kg/j pendant 7 jours. Au final, du fait des données chez l'adulte, les auteurs recommandaient donc la réalisation d'études pharmacologiques de qualité avant d'autoriser l'usage en routine de l'azithromycine dans les unités de soins intensifs de néonatalogie.

Enfin, concernant la clarithromycine, il existe encore peu d'études mais un essai randomisé-contrôlé versus placebo a étudié l'impact de la clarithromycine sur l'incidence de la DBP à 36 SAC chez 224 nouveau-nés prématurés pesant entre 750 et 1250g à la naissance. L'incidence de la DBP était significativement plus bas dans le groupe traité que dans le groupe placebo (OR 27,2 ; IC 95% [2,5-296,1]) (118).

5.1.12. Palivizumab (Synagis ®)

Le palivizumab est un anticorps monoclonal dirigé contre la glycoprotéine F du VRS (virus syncytial respiratoire), principal germe à l'origine des décompensations respiratoires sévères chez le nouveau-né atteint de DBP. Il est recommandé en prophylaxie des infections à VRS chez les enfants de moins de 2 ans atteints d'une pathologie respiratoire chronique. La dose est de 15mg/kg avec une injection mensuelle pendant la saison du VRS (octobre-avril en général). Il permet une réduction de la morbi-mortalité liée aux infections à VRS chez ces enfants à haut risque (51,68).

5.1.13. Vaccinations

Le vaccin Prevenar13® contre le pneumocoque est fortement recommandé chez les nouveau-nés prématurés et les nourrissons à risque élevé d'insuffisance pulmonaire à l'âge de 2, 3 et 4 mois avec un rappel à l'âge de 11 mois (119).

De la même façon, le vaccin saisonnier contre le virus de la grippe est recommandé chez les enfants avec DBP à partir de l'âge de 6 mois avec 2 doses de 0,25mL à 1 mois d'intervalle le premier hiver puis 1 dose unique les années suivantes (119).

L'entourage proche doit également se mettre à jour pour le vaccin contre la coqueluche et se faire vacciner contre le virus de la grippe au moins les 2 premières années de vie (119).

5.2. Perspectives

5.2.1. Vitamine A

La vitamine A joue un rôle clé dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium respiratoire et dans la régulation de la croissance pulmonaire. Le déficit en vitamine A augmente le risque DBP par défaut de réparation tissulaire pulmonaire, augmentation de la perte de cellules ciliées et de la métaplasie squameuse, augmentation de la susceptibilité aux infections et hypoalvéolisation (120). La plus grande partie du stock en vitamine A se faisant lors du 3^{ème} trimestre, les nouveau-nés prématurés avant 32 SA présentent une carence en vitamine A qui persiste du fait de la perte de la supplémentation maternelle placentaire, d'apports entéraux faibles dans les premières semaines de vie et des difficultés d'administration de la vitamine A par voie IV (formes pharmaceutiques disponibles peu concentrées et non compatibles avec la limitation des volumes parentéraux liée aux petits poids de ces enfants). Les recommandations européennes actuelles concernant la supplémentation en vitamine A sont une dose quotidienne de 1000 à 3300UI/kg (121).

Une méta-analyse de 10 études (1460 enfants) a comparé les effets d'une supplémentation intramusculaire (IM) en vitamine A versus placebo sur l'incidence de la DBP. Les auteurs ont montré que la vitamine A permettait une diminution du critère composite DBP à J28 ou décès en comparaison à un placebo (RR 0,93 ; IC 95% [0,88-0,99]) et du risque de DBP à 36 SAC (RR 0,87 ; IC 95% [0,77-0,99]). Ils n'ont pas montré de différence sur le développement neurologique à 18-22 mois d'âge corrigé et n'ont pas rapporté d'effets indésirables en dehors de la douleur causée par les injections IM. En conclusion, les auteurs laissaient l'indication d'une supplémentation en vitamine A par voie IM à

l'appréciation des cliniciens qui évalueront la balance bénéfice-risque entre la faible diminution du risque de DBP et l'acceptabilité d'un traitement par injections IM répétées (122).

Par ailleurs, un essai randomisé-contrôlé multicentrique est en cours afin d'étudier les effets d'une administration continue IV de vitamine A durant la première semaine de vie chez les nouveau-nés prématurés pesant moins de 1000g sur l'incidence de la DBP à 36 SAC (123).

5.2.2. Inositol

L'inositol ou vitamine B7 est un nutriment essentiel pour la croissance et la survie cellulaire. Au niveau pulmonaire, il active la maturation de nombreux composants du surfactant. Le lait maternel contient un fort taux d'inositol et les nouveau-nés à terme ou prématurés proches du terme ont une synthèse endogène suffisante d'inositol pour remplir leurs besoins nutritionnels, ce qui n'est pas le cas des nouveau-nés grands prématurés surtout en cas de nutrition parentérale prolongée ou d'allaitement artificiel (69,124,125). Une méta-analyse récente de la Cochrane a montré que la supplémentation en inositol chez le nouveau-né prématuré diminuait le risque de décès néonatal (3 études ; n=355 ; RR 0,53 ; IC 95% [0,31-0,91]), de décès avant l'âge d'1 an (3 études ; n=355 ; RR 0,55 ; IC 95% [0,4-0,77]) ainsi que celui de ROP et de HIV sévères. Cependant, elle n'a pas montré d'effet de l'inositol sur l'incidence de la DBP (126). Un essai randomisé-contrôlé multicentrique de phase 3 est en cours afin de tester les effets d'une supplémentation en inositol chez des prématurés de < 28 SA sur la survie sans ROP sévère mais également sur l'incidence de la DBP à 36 SAC (127).

5.2.3. Anti-oxydants

Il existe, chez tout individu sain, une balance entre la production de ROS et leur élimination par les défenses anti-oxydantes. Cependant, un déséquilibre de cette balance du fait d'un déficit en enzymes anti-oxydantes et de l'exposition fréquente à des concentrations importantes d'O₂ va conduire à la survenue de certaines pathologies chez l'enfant prématuré telles que la DBP, la ROP, les HIV ou la leucomalacie périventriculaire. La supplémentation en molécules anti-oxydantes pourrait donc prévenir le développement de ces pathologies.

5.2.3.1. Superoxyde dismutase

L'enzyme superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme anti-oxydante ubiquitaire qui dégrade le radical superoxyde qui est extrêmement toxique en peroxyde d'hydrogène. Or, l'expression de la SOD est diminuée dans les modèles animaux de DBP hyperoxique (128,129).

La rhSOD est une enzyme CuZn SOD recombinante humaine testée chez des nouveau-nés prématurés avec MMH dans le but de prévenir le développement de lésions pulmonaires liées au stress oxydatif (130,131). Cependant, une méta-analyse de la Cochrane incluant 2 essais randomisés-contrôlés dont l'un datant de l'ère pré-surfactant, n'a pas montré de différence pour les critères de mortalité avant la sortie, d'oxygénodépendance à J28 et à 36 SAC entre le groupe traité par rhSOD en instillations intra-trachéales et le groupe placebo (132).

5.2.3.2. *N-acétylcystéine*

La N-acétylcystéine (NAC) est un précurseur du glutathion, molécule anti-oxydante qui diminue les lésions causées par le stress oxydatif. Les nouveau-nés prématurés ont un déficit relatif en glutathion inversement proportionnel à l'âge gestationnel (69). Les études de supplémentation en NAC chez l'animal ont montré une diminution des lésions pulmonaires hyperoxiques (133). Cependant, les études cliniques sont moins encourageantes puisqu'une méta-analyse n'a pas mis en évidence d'effet de la supplémentation en NAC sur le risque de décès à 36 SAC ni sur l'incidence de la DBP (134).

5.2.3.3. *Autres*

Les essais réalisés sur d'autres molécules anti-oxydantes tel le sélénium (135), la vitamine E (136) ou les caroténoïdes (137) n'ont pas mis en évidence d'effet significatif sur la diminution de l'incidence de la DBP chez le nouveau-né prématuré.

5.2.4. *Cellules souches*

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont des cellules multipotentes capables d'auto-renouvellement et différenciation en plusieurs types cellulaires. Elles sont obtenues à partir de la moelle osseuse hématopoïétique, du cordon ombilical (sang ou gelée de Wharton), du placenta ou du tissu cutané. Ces cellules ont la capacité de migrer (phénomène de « homing ») vers un site de lésion tissulaire afin de le réparer. Elles possèdent également des propriétés immunomodulatrices, anti-inflammatoires, anti-apoptotiques et pro-angiogéniques (138).

Parmi ces CSM, les cellules progénitrices endothéliales (CPE) issues de la moelle osseuse hématopoïétique ont la capacité de se mobiliser vers les sites de lésions vasculaires afin de promouvoir une néovascularisation. Les études expérimentales (139) suggèrent que les CPE circulantes et pulmonaires sont diminuées dans les modèles animaux de DBP et les études cliniques (140) retrouvent cette diminution des CPE dans le sang de cordon de nouveau-né prématurés avec DBP modérée à sévère. Par conséquent, la thérapie cellulaire semble être une approche prometteuse pour le traitement et la prévention de la DBP. En effet, plusieurs études animales ont montré que l'injection de cellules souches issues de la moelle osseuse hématopoïétique permettait de restaurer les structures alvéolaires et vasculaires pulmonaires de rats atteints de DBP après exposition à l'hyperoxie (141–143). De plus, un essai clinique de phase 1 a montré que l'injection intra-trachéale de CSM allogéniques humaines issues du sang de cordon ombilical chez 9 prématurés à haut risque de DBP permettait une diminution du taux de DBP modérée à sévère (144). Les auteurs ont publié les résultats après 2 ans de suivi de ces enfants et ils n'ont pas mis en évidence d'effets délétères sur le développement neurologique de ces enfants. De plus, il semblerait que le traitement par CSM diminue la morbidité respiratoire (oxygénothérapie à domicile, asthme, infections respiratoires) et améliore la croissance pondérale (145).

Récemment, une méta-analyse de 25 essais précliniques sur les effets de la thérapie cellulaire chez le modèle murin de DBP hyperoxique a montré une augmentation de l'alvéolisation, une diminution de l'inflammation et de la fibrose pulmonaires ainsi qu'une augmentation de l'angiogenèse pulmonaire

indépendamment du type cellulaire utilisé, de la dose injectée, du moyen et du délai d'administration (146).

Plus que le remplacement cellulaire au sein des tissus lésés, le bénéfice de la thérapie cellulaire semble être médié par un mécanisme paracrine. En effet, le milieu de culture des CSM est riche en composants tels que les exosomes qui permettent le transport de protéines ou de matériel génétique entre les cellules (147). Cela est renforcé par la démonstration d'un faible taux de transplantation cellulaire dans les tissus lésés mais également la mise en évidence *in vivo* (143) et *in vitro* (142) que l'injection du milieu de culture de CSM prévient et/ou restaure la croissance vasculaire et alvéolaire de rats exposés à l'hyperoxie chronique.

L'application de la thérapie cellulaire chez l'humain va nécessiter d'autres études afin de préciser les conditions exactes d'utilisation (voie d'administration, doses, types cellulaires ou milieu de culture, etc.) et de s'assurer de l'absence d'effets indésirables graves tel que le risque tumoral. En effet, ce risque est fortement présent dans la thérapie cellulaire par 2 mécanismes principaux : la transformation maligne directe des cellules transplantées, surtout en cas de manipulations ultérieures et d'utilisation de cellules autologues (diminution de la clairance immunologique), ou bien par un effet immunosuppresseur des cellules transplantées qui favorise la croissance d'une tumeur maligne préexistante (148).

5.3. Prise en charge de l'HTP-DBP

Les mécanismes histopathologiques à l'origine de l'HTP-DBP sont multiples avec une part « fixe » tel que le remodelage vasculaire et la diminution de la densité vasculaire qui sont à l'heure actuelle peu impactés par les thérapeutiques disponibles, et un autre mécanisme plus réversible via les thérapeutiques vasodilatatrices, qui est l'hyperréactivité vasculaire. De plus, il existe très peu d'études de ces traitements en population pédiatrique et beaucoup de recommandations sont tirées d'avis d'experts à partir des essais réalisés chez l'adulte. Par conséquent, la prise en charge des enfants atteints d'HTP-DBP reste un véritable dilemme pour les prescripteurs.

Les recommandations utilisées dans ce chapitre sont celles de l'AHA et l'ATS (recommandations américaines à partir d'un consensus d'expert en cardiologie) et les recommandations du *European paediatric pulmonary vascular disease network* (recommandations européennes également basées sur un consensus d'expert).

5.3.1. Prise en charge globale

5.3.1.1. *Comorbidités*

La prise en charge initiale de l'HTP-DBP consiste à traiter une pathologie respiratoire sous-jacente. Ainsi, il est nécessaire de rechercher et traiter de façon systématique un reflux gastro-œsophagien chronique, extrêmement fréquent chez le nouveau-né prématuré et pouvant conduire à des pneumopathies d'inhalation. Les enfants à risque ou atteints d'HTP-DBP doivent également avoir une évaluation des voies aériennes par fibroscopie à la recherche entre autre d'une paralysie des cordes vocales, d'une sténose sous-glottique ou d'une trachéo-bronchomalacie. Enfin, il convient de réaliser une exploration fonctionnelle respiratoire à la recherche d'une bronchoréactivité pouvant répondre à un traitement bronchodilatateur (19,22).

L'investigation et le traitement de comorbidités respiratoires sont d'ailleurs recommandés par l'AHA et l'ATS avec une classe de recommandation I et un niveau de preuve B (24).

5.3.1.2. *Nutrition et apports hydriques*

A l'image de la DBP, la persistance d'une dénutrition potentialise les lésions pulmonaires induites par l'hyperoxie et interfère avec la croissance pulmonaire alvéolaire et vasculaire. Par conséquent, il est nécessaire d'assurer un support nutritionnel adéquat pour une bonne croissance pulmonaire.

Il n'existe pas de preuve en faveur d'une restriction hydrique dans la prise en charge de l'HTP-DBP mais l'usage de diurétiques (thiazidiques et spironolactone) est recommandé en cas de surcharge hydrique évidente si la pré-charge est normale (classe de recommandation IIa, niveau de preuve B selon recommandations européennes et classe de recommandation IIb, niveau de preuve C selon les recommandations américaines) (17,24).

5.3.1.3. Protection sensorielle

Il est nécessaire de limiter les stimulations sensorielles sympathiques qui peuvent majorer les RVP et le bronchospasme chez les enfants avec HTP-DBP. Pour cela, les soins douloureux doivent être réduits et encadrer par une sédation-analgésie. L'environnement doit être calme avec la mise en place si besoin de protections auditives et la réduction de la luminosité (149). Chez les enfants ventilés, le recours à une curarisation en association à une sédation continue peut être nécessaire pour une meilleure synchronisation patient-respirateur (150)

5.3.2. Vasodilatateurs pulmonaires

Les thérapies vasodilatatrices doivent être utilisées avec prudence et après avoir éliminé des anomalies associées tels les shunts gauche-droit, les anomalies de fonction ventriculaire gauche et une sténose des veines pulmonaires (classe de recommandation I, niveau de preuve B selon les recommandations américaines) (17,24).

5.3.2.1. Oxygène

L'hypoxie est responsable d'une augmentation de la croissance des CMLV pulmonaires et est un puissant stimulus de la vasoconstriction pulmonaire. La lutte contre l'hypoxie via une oxygénothérapie limite la néomuscularisation des petites artères pulmonaires et la vasoréactivité importante caractéristiques de la pathologie pulmonaire vasculaire dans la DBP (9).

L'O₂ est un puissant vasodilatateur pulmonaire qui diminue les résistances vasculaires des voies aériennes. Il doit être administré en première intention chez tout nouveau-né avec une HTP suspectée ou établie afin de maintenir des SaO₂ entre 92 et 95% une fois le terme théorique atteint (classe de recommandation IIa, niveau de preuve C pour les recommandations américaines (24) et classe de recommandation I, niveau de preuve A pour les recommandations européennes (151)). La mesure de la SaO₂ pré-ductale doit être continue via une oxymétrie pulsée afin de s'assurer de l'absence d'épisodes hypoxiques mais également de prévenir l'hyperoxie qui majore l'inflammation pulmonaire et altère la croissance alvéolaire et vasculaire du poumon (9,17,19,151).

5.3.2.2. Monoxyde d'azote inhalé

Le NOi est recommandé dans le traitement de l'HTP-DBP des nouveau-nés ventilés mécaniquement pour améliorer l'oxygénation et réduire le recours à la circulation extracorporelle (*ECMO* ou *ExtraCorporeal Membrane Oxygenation*), technique d'assistance circulatoire extracorporelle (classe de recommandation I, niveau de preuve A pour les recommandations européennes (151) et classe de recommandation IIa, niveau de preuve C pour les recommandations américaines (24)). Il n'existe pas de recommandation sur la posologie à administrer mais elle doit permettre une amélioration de l'oxygénation du patient avec la FiO₂ la plus basse possible (amélioration du rapport ventilé/perfusé). De plus, une posologie > 20 ppm n'a pas montré de bénéfice supplémentaire pour la prise en charge de l'HTP toute étiologie confondue (24).

5.3.2.3. *Sildénafil*

Le sildénafil est un inhibiteur de la PDE5. Il augmente la réponse au NOi et prévient de l'effet rebond après sevrage brutal en NOi.

Dans une étude rétrospective de 25 enfants de moins de 2 ans avec une HTP associée à pathologie respiratoire chronique (18 enfants avec une HTP-DBP), *Mourani et al.* ont montré qu'un traitement prolongé par sildénafil oral permettait une amélioration échographique des signes d'HTP dans 88% et un sevrage du NOi dans 83% des cas après une moyenne de 40 jours de traitement (152). Une deuxième étude rétrospective de 21 nouveau-nés prématurés avec une HTP-DBP traités par sildénafil oral a mis en évidence une diminution significative des PAP estimées à l'ETT mais sans amélioration des échanges gazeux après 48h de traitement. Les auteurs expliquaient ces résultats du fait d'une composante « fixée » de l'HTP dans la DBP (hypoalvéolisation, remodelage vasculaire, diminution de la densité vasculaire) qui entraînait un effet moindre du sildénafil dans cette pathologie multifactorielle (153).

Enfin, l'essai randomisé-contrôlé multicentrique STARTS-2 avec 234 enfants atteints d'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) âgés de 1 à 17 ans et randomisés pour recevoir une dose faible, moyenne ou forte de sildénafil ou un placebo a montré une augmentation de la mortalité chez les enfants traités par sildénafil forte dose en fonction du poids (60 mg/j entre 8 et 20kg ; 120 mg/j si > 20 et 45kg ; 240 mg/j si > 45kg) pendant au moins 3 ans, surtout chez ceux avec une forme sévère d'HTAP, pesant plus de 20kg et traités pour une HTAP idiopathique en comparaison des enfants traités par des doses moyennes ou faibles (154). La *Food and Drugs Administration* (FDA) a par la suite émis un avertissement contre l'usage du sildénafil chez les enfants entre 1 et 17 ans traités en monothérapie pour une HTAP idiopathique (155). Au niveau européen, l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (Afssaps) a publié en 2011 un rappel des consignes de prescription du sildénafil pour le traitement de l'HTAP dans la population pédiatrique. Ainsi, la dose recommandée dans le résumé des caractéristiques du produit est de 10 mg trois fois par jour chez les enfants de $\leq$ 20kg et 20 mg trois par jour chez ceux de > 20kg (156).

Cependant, le sildénafil oral reste recommandé dans le traitement de l'HTP-DBP, surtout en cas d'inefficacité du NOi (classe de recommandation IIa, niveau de preuve B selon les recommandations européennes). La voie IV peut être utilisée chez les enfants dont la biodisponibilité digestive est méconnue (17,24,151). La dose d'initiation recommandée est 0,5mg/kg/dose toutes les 8h avec une augmentation graduelle toutes les 2 semaines jusqu'à atteinte des PAP désirées et en l'absence d'hypotension artérielle systémique. La dose maximale de traitement est 2mg/kg/dose toutes les 6h (19,24,51).

5.3.2.4. Prostanoïdes

Selon les recommandations actuelles, les prostanoïdes administrés via une voie centrale, une pompe ou inhalés dans le cas de l'iloprost peuvent être efficaces pour la prise en charge de l'HTP-DBP (classe de recommandation IIa, niveau de preuve B selon les recommandations européennes) (151). Il existe cependant peu d'études sur l'usage de cette classe pharmaceutique dans l'HTP-DBP.

L'époprosténol est un des prostanoïdes les plus anciennement utilisé pour le traitement de l'HTAP sévère chronique. Il améliore l'hémodynamique pulmonaire, la qualité de vie, la tolérance à l'effort et la survie chez les adultes et les enfants avec HTAP idiopathique ou secondaire. Sa faible demi-vie nécessite une injection continue, ce qui expose aux complications d'une voie centrale (22).

Un des autres inconvénients des prostanoïdes est l'aggravation de l'hypoxémie par vasodilatation pulmonaire de régions non ou mal aérées, ce qui majore les anomalies de rapport ventilation/perfusion (effet shunt) (19,68).

5.3.2.5. Bosentan

Le bosentan est un inhibiteur non sélectif des récepteurs de l'ET-1, largement utilisé dans l'HTAP de l'adulte. Il existe très peu d'études sur les effets du bosentan dans l'HTP-DBP mais une forme pédiatrique a récemment été approuvée par les autorités européennes pour le traitement de l'HTAP idiopathique ou secondaire. Les effets indésirables sont principalement une hépatotoxicité dose-dépendante, une tératogénicité et une possible infertilité masculine (22).

En conclusion, le bosentan peut éventuellement être utilisé en 2^{ème} intention dans l'HTP-DBP en tenant compte du faible niveau de preuve de son efficacité et innocuité (17).

5.3.2.6. Inhibiteurs calciques

Les inhibiteurs calciques telle la nifédipine peuvent diminuer de manière aigue les PAP et les RVP chez les enfants avec DBP. Cependant, les études comparant l'efficacité de la nifédipine à celle de l'O₂ n'ont pas montré de bénéfice supérieur. De plus, en comparaison au NOi, la réponse aux inhibiteurs calciques dans l'HTP-DBP est moindre (157). Enfin, les inhibiteurs calciques peuvent entraîner une hypotension artérielle systémique et altérer la fonction myocardique, surtout chez le jeune enfant (19,51).

Au total, l'algorithme de prise en charge de l'HTP-DBP (Figure 6) selon les recommandations actuelles préconise le NOi en première intention pour les formes symptomatiques ou sévères puis une transition ou l'ajout de sildénafil si persistance de signes cliniques et/ou échographiques d'HTP. Si le sevrage du NOi est impossible malgré l'ajout du sildénafil, l'ajout du bosentan peut être envisagé en 3^{ème} intention (51).

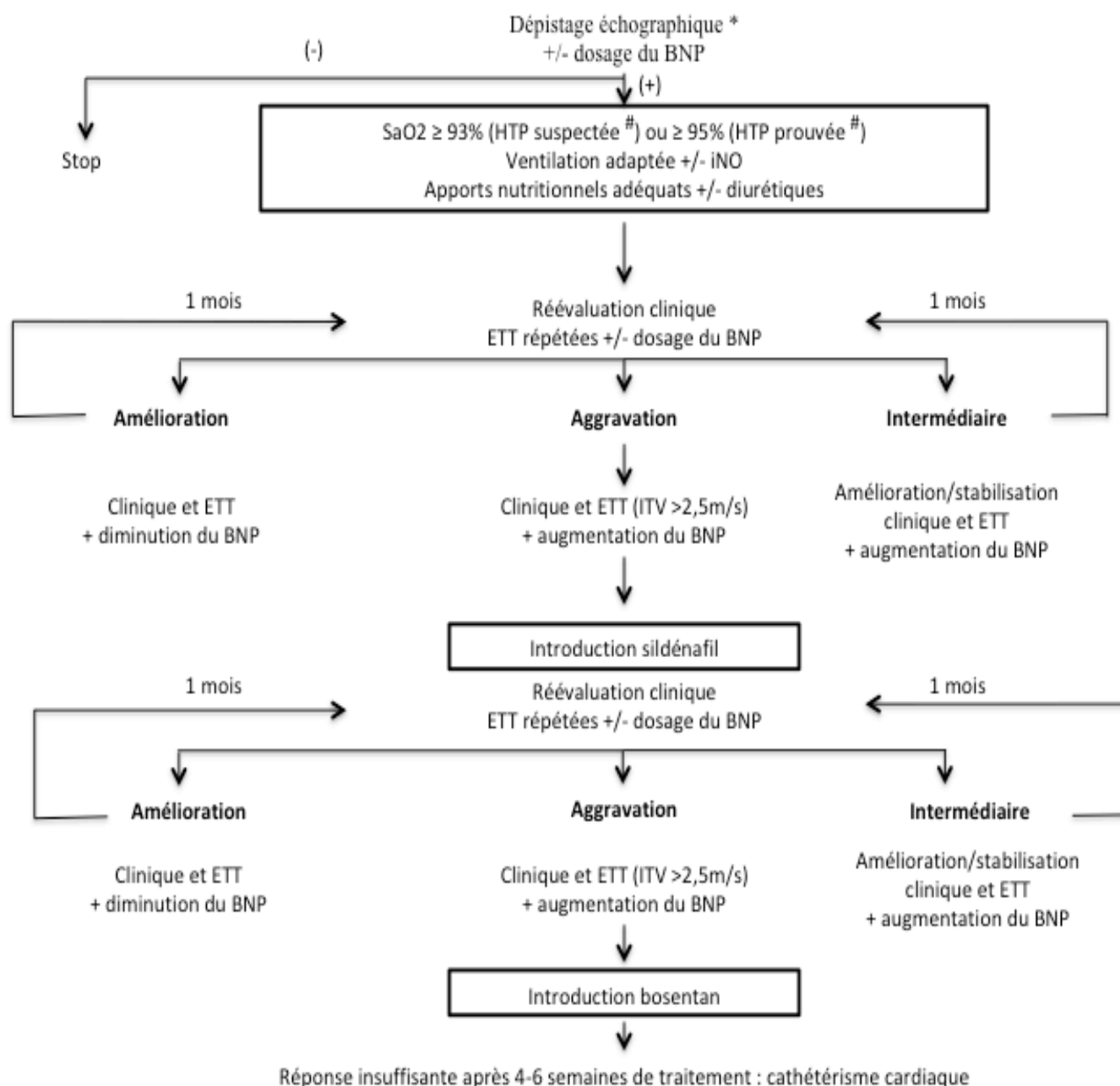


Figure 6 : **Algorithme de prise en charge de l'HTP-DBP** (d'après la référence (17))

* : Critères de dépistage :

- DBP sévère ou naissance prématuré <28 SA

- Amélioration clinique lente i.e. oxygénodépendance prolongée, désaturations fréquentes ou retard de croissance extra-utérin

: Si ITV >2,5m/s à l'ETT et différentielle de SaO₂ pré- et post-ductale > 10%

5.3.3. Nouvelle perspective : la thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire semble être un traitement prometteur également pour l'HTP-DBP. En effet, *Hansmann et al* ont montré qu'une injection IV de CSM issues de la moelle osseuse hématopoïétique chez le raton atteint d'HTP-DBP après exposition à l'hyperoxie permettait une diminution de la fibrose pulmonaire parenchymateuse, de l'HTP et de l'HVD ainsi qu'une augmentation de la densité vasculaire pulmonaire (158). Ces résultats ont récemment été confirmés dans une méta-analyse de 25 études expérimentales, toutes réalisées sur le modèle murin d'HTP-DBP hyperoxique, qui retrouvait un effet bénéfique de la thérapie cellulaire sur l'HTP, l'angiogenèse pulmonaire et le remodelage vasculaire des artères pulmonaires indépendamment de la source cellulaire, la dose injectée, le moyen et le délai d'administration (146).

5.4. Suivi

Il n'existe pas de recommandations précises concernant le suivi des enfants atteints de DBP. La prise en charge doit être pluridisciplinaire (neurologique, pneumologique, néonatalogique, diététique, etc.) et le rythme des consultations adapté à la sévérité de l'état clinique de l'enfant. La mise en place d'un suivi psychomotricien est fréquente, en association avec des séances de kinésithérapie.

Concernant le suivi cardiologique des enfants atteints d'HTP-DBP prouvée ou suspectée, il doit être rapproché et comprendre la mesure de la SaO₂ pré- et post-ductale, une ETT et des bilans biologiques (BNP, NT-proBNP et troponine) selon l'état clinique et la sévérité de la pathologie (151). Plus précisément, durant l'hospitalisation, une ETT doit être réalisée au moins 1 à 2 fois par mois chez les enfants suspects d'HTP, et de manière plus rapprochée en cas d'augmentation des besoins en O₂ ou du soutien ventilatoire, d'hypoxémie et de signes cliniques de dysfonction ventriculaire droite. Après la sortie d'hospitalisation, les enfants atteints de DBP avec oxygénodépendance doivent avoir une ETT tous les 3 mois et ceux non oxygénodépendants mais à risque d'HTP doivent avoir une ETT tous les 3 à 6 mois.

Concernant les enfants atteints d'HTP-DBP et traités par vasodilatateurs, il est recommandé de réaliser une ETT 2 fois par semaine lors de la phase aiguë. Puis ils doivent avoir une ETT dans les 2 à 4 semaines qui suivent l'initiation du traitement puis tous les 4 à 6 mois si stabilisation (17,19).

PARTIE 2 :

EFFETS DU CELASTROL DANS UN MODELE MURIN D’HTP-DBP INDUITE PAR L’HYPEROXIE.

1. INTRODUCTION

1.1. Modèles de DBP

Il existe plusieurs modèles animaux de DBP selon le stimulus lésionnel utilisé : l'hyperoxie, la ventilation mécanique, l'infection intra- ou extra-utérine (*Ureaplasma urealyticum*) ou l'inflammation stérile (injection intra-utérine de lipopolysaccharides bactériens), qui sont appliqués chez plusieurs espèces animales comme la souris, le rat, le lapin, l'agneau prématuré, le porcelet prématuré et le primate non humain prématuré (159). Parmi ces modèles de DBP, celui induit par l'hyperoxie est le plus utilisé car il est relativement facile à mettre en place et que les effets délétères d'une exposition à une forte concentration d'O₂ ont été largement documentés autant chez le nouveau-né animal que chez l'adulte. En effet, l'hyperoxie est responsable de la production de ROS qui peuvent directement altérer les cellules pulmonaires via des inactivations enzymatiques et des lésions d'ADN ce qui permet de reproduire, d'un point de vue histologique, les altérations observées dans l'HTP-DBP humaine, à savoir une diminution et un élargissement des alvéoles, un épaississement des septa alvéolaires ainsi qu'un remodelage vasculaire important marqué par un appauvrissement de la microvascularisation et un épaississement de la média des artères pulmonaires (160). Les cellules endothéliales sont également très sensibles au stress oxydatif lié à l'hyperoxie et à l'inflammation. En effet, l'hyperoxie entraîne la migration et l'incorporation de fibroblastes interstitiels dans la sous-couche endothéliale de micro-vaisseaux pulmonaires non muscularisés. Ces fibroblastes acquièrent ensuite des caractéristiques de cellules contractiles et forment une nouvelle lamina élastique responsable de l'augmentation des RVP (9). Enfin, au niveau moléculaire, les modèles animaux de DBP hyperoxique ont clairement montré une diminution des facteurs angiogéniques comme *Hypoxia Inducible Factor* (HIF) (161,162) et VEGF (11,163).

Le choix du rat comme modèle animal est justifié par le fait que les ratons à terme ont des poumons au stade sacculaire, ce qui correspond au stade de développement des nouveau-nés prématurés humains avant 32 SA. Par conséquent le poumon du raton est programmé pour être entièrement fonctionnel au stade sacculaire dès la naissance, ce qui n'est pas le cas chez le nouveau-né humain prématuré. Ainsi certains mécanismes adaptatifs peuvent être initiés en réponse à l'hyperoxie chez le raton mais être absents chez le nouveau-né prématuré humain du fait de son immaturité, ce qui pourrait entraîner des différences entre les 2 modèles (2). Cependant, dans les autres espèces, une césarienne avant terme est nécessaire pour étudier les poumons au stade sacculaire, ce qui rend contraignant et onéreux le protocole expérimental. L'autre argument en faveur du modèle murin est la durée de gestation qui est relativement courte par rapport aux autres espèces utilisées (lapin 31 jours, porc 60-67 jours, agneau 5 mois, primate 9 mois versus 21 jours pour le rat) avec un nombre important de ratons par portée. Enfin, l'entretien en animalerie est plus simple et moins coûteux. C'est pour cela que nous avons choisi d'utiliser le modèle de DBP induit par l'hyperoxie chez le raton.

1.2. Mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'HTP-DBP

1.2.1. Rôle de l'hème-oxygénase 1 (HO-1)

1.2.1.1. Activité enzymatique

Dans le poumon, HO-1 est exprimée dans les cellules épithéliales alvéolaires, les macrophages alvéolaires, les cellules endothéliales et les CMLV (164).

HO-1 est une enzyme anti-oxydante hautement induite par l'hyperoxie et l'inflammation qui permet la dégradation de l'hème en biliverdine et en monoxyde de carbone (CO). L'hème est une molécule pro-oxydante qui participe à la formation de ROS. La biliverdine est rapidement convertie en bilirubine par la biliverdine réductase et la bilirubine apporte une cytoprotection en diminuant la peroxydation des lipides au niveau cellulaire (Figure 7). Le CO, quant à lui, possède de nombreux rôles dont un effet inhibiteur sur la prolifération et migration des CMLV ainsi que des propriétés anti-inflammatoires. Il possède également une action anti-apoptotique endothéliale (164,165).

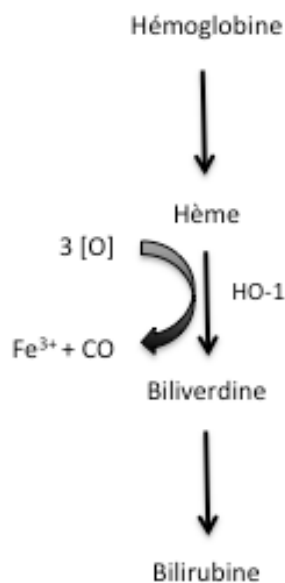


Figure 7 : Voie de la bilirubine

Dans un modèle murin de DBP hyperoxique, la surexpression constitutive de HO-1 dans les cellules épithéliales alvéolaires diminue l'inflammation pulmonaire et le remodelage artériel pulmonaire et augmente la densité vasculaire (164).

HO-1 a également un effet protecteur sur les cellules endothéliales. L'hyperoxie entraîne une fuite endothéliale avec extravasation d'hémoglobine et d'hème dans l'espace interstitiel et alvéolaire, ce qui conduit à des lésions endothéliales sévères. La surexpression d'HO-1 dans ce même modèle murin de DBP hyperoxique maintient l'intégrité endothéliale et diminue l'œdème (164).

1.2.1.2. Activité non-enzymatique

Les souriceaux sont plus résistants à l'hyperoxie que les adultes qui meurent dans les premiers jours d'exposition. Une des explications pourrait être l'augmentation dans le poumon de l'expression d'HO-1 au niveau nucléaire après exposition à l'hyperoxie mais sans augmentation de l'activité HO-1. En effet, il semblerait que la fraction nucléaire de HO-1 puisse modifier l'activation de facteurs de transcription impliqués dans le cycle cellulaire et la réparation de l'ADN (166).

De plus, dans un modèle de souris transgéniques HO-1^{-/-} en air ambiant, l'alvéolisation est diminuée en comparaison des souris sauvages. Cela suggère que HO-1 participe au développement alvéolaire indépendamment de son activité cytoprotectrice anti-oxydante (166).

1.2.2. Rôle de l'hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α)

HIF-1α est un facteur de transcription ubiquitaire qui contrôle jusqu'à 500 gènes, parmi lesquels de nombreux sont impliqués dans la prolifération et la survie des cellules endothéliales. En normoxie, HIF-1α est peu détectable car il subit une hydroxylation par les prolyl-hydroxylases (PHD) puis est lié à la protéine pVHL (*Von Hippel Lindau protein*) qui va induire son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. En hypoxie, l'activité des PHD est inhibée et HIF-1α s'accumule puis se transloque dans le noyau où il se dimérise avec la sous-unité HIF-1β constitutive pour former le facteur de transcription HIF-1. Ce complexe HIF-1 peut ensuite se fixer sur une séquence HRE (*Hypoxia Response Element*) dans le promoteur de gènes cibles dont VEGF afin d'initier leur transcription.

L'hyperoxie dans un modèle d'agneau prématuré avec détresse respiratoire sévère altère l'expression de HIF, ce qui conduit à une diminution de l'expression de facteurs angiogéniques tel VEGF (167). De plus, les études de délétion de gènes ont montré que la délétion d'une isoforme d'HIF-1α entraîne un défaut de développement vasculaire embryonnaire létal. A l'inverse, la stabilisation pharmacologique de HIF par un inhibiteur de PHD chez le primate prématuré entraîne une augmentation de la croissance vasculaire et alvéolaire chez les animaux exposés à l'hyperoxie (161).

L'induction de l'angiogenèse via l'expression de HIF paraît donc intéressante dans un modèle de DBP induite par l'hyperoxie.

1.2.3. Rôle du Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Le VEGF est un peptide pro-mitogène synthétisé par l'épithélium alvéolaire qui active la prolifération, migration et différenciation des cellules endothéliales adjacentes par mécanisme paracrine. Il agit grâce à 2 récepteurs tyrosine-kinase, VEGFR1 et VEGFR2 exprimés par les cellules endothéliales (168).

Dans les études de DBP chez l'Homme, le VEGF est diminué dans les aspirations trachéales de nouveau-nés à risque qui ont développé une DBP ainsi que ceux qui sont morts de DBP (11). Dans les études chez l'animal, l'hyperoxie diminue l'expression du VEGF et de ses récepteurs, et l'inhibition sélective du VEGF ou de ses récepteurs entraîne une diminution de la croissance vasculaire et alvéolaire (169). Enfin, dans les études de délétion de gènes chez la souris, l'inactivation d'un seul

allèle du VEGF entraîne le décès *in utero* du fait de la diminution importante des cellules endothéliales, et les souris VEGFR^{-/-} ont un défaut de développement vasculaire létal (98).

Les effets pro-mitogène, anti-apoptotique et pro-angiogénique du VEGF sur les cellules endothéliales se font via l'activation et l'expression de la eNOS qui permet la production de NO. En effet, l'angiogenèse induite par le VEGF est altérée dans un modèle de souris eNOS^{-/-} (163) alors qu'une thérapie par NOi diminue le remodelage des petites artères pulmonaires et augmente la densité artérielle ainsi que l'alvéolisation dans un modèle de rats traités par un inhibiteur sélectif du VEGFR en période néonatale (100). Enfin, les études de thérapie génique par VEGF ont montré une amélioration de l'architecture pulmonaire tant sur le plan alvéolaire que vasculaire, une augmentation de l'expression de la eNOS et une augmentation de la survie après exposition à l'hyperoxie avec cependant une augmentation de l'œdème et des hémorragies pulmonaires. Il semblerait que le VEGF surexprimé majore la perméabilité capillaire avec des vaisseaux immatures et fenêtrés à l'analyse par microscopie électronique (170,171).

1.2.4. Réactivité vasculaire pulmonaire et rôle du calcium intracellulaire

Des modèles animaux d'HTP néonatales ont montré qu'une augmentation de la pression vasculaire pulmonaire conduit à des altérations de la croissance vasculaire et alvéolaire. En effet, l'obstruction partielle chirurgicale du canal artériel de fœtus d'agneaux entraîne une HTP néonatale à l'origine de modifications histologiques pulmonaires proches de celles de la DBP avec entre autre un épaississement de la média des artérioles pulmonaires, une diminution de la densité vasculaire et une hypoalvéolisation (172,173). Cela suggère que le stress hémodynamique causé par l'augmentation de la PAP pourrait être un mécanisme supplémentaire de développement de la DBP. De plus, des études chez l'animal ont montré qu'un traitement par NOi limite la survenue de telles altérations histologiques dans des modèles murins de DBP (100,101), ce qui renforce l'hypothèse que la régulation du tonus vasculaire joue un rôle clé dans le développement de la DBP.

Il existe très peu d'études de la vasoréactivité pulmonaire dans l'HTP-DBP mais une étude réalisée au sein de notre laboratoire INSERM U1045 sur le même modèle de rats dysplasiques par hyperoxie chronique a montré des altérations de la vasoréactivité pulmonaire chez ces animaux. En effet, l'hyperoxie est responsable d'une augmentation de la réactivité vasculaire en réponse à des agents contractants (sérotonine et phényléphrine) et d'une diminution de la relaxation en réponse à l'acétylcholine (174). Il semble donc intéressant d'étudier les effets du célastrol sur la réactivité vasculaire artérielle dans notre modèle d'HTP-DBP.

La vasoconstriction pulmonaire persistante et le remodelage vasculaire (épaississement de la média) impliqués dans la survenue de l'HTP-DBP sont en lien direct avec la contraction et la prolifération des CMLV pulmonaires (175). Or, le calcium intracellulaire est un stimulus majeur de la prolifération des CMLV pulmonaires par l'activation de kinases calcium-dépendantes et de nombreux facteurs de transcription impliqués dans la croissance cellulaire. Il est également nécessaire pour la contraction des CMLV pulmonaires. En effet, le calcium intracellulaire va augmenter par libération à partir de stocks intracellulaires (réticulum endoplasmique) ou par entrée dans la cellule via des canaux

calciques membranaires et se lier à la calmoduline (CaM). Cette liaison Ca^{2+} -CaM va activer la kinase de la chaîne légère de myosine (MLCK) qui va alors phosphoryler la chaîne légère de la myosine (MLC) permettant ainsi la réalisation d'un pont actine-myosine et la contraction cellulaire (Figure 8).

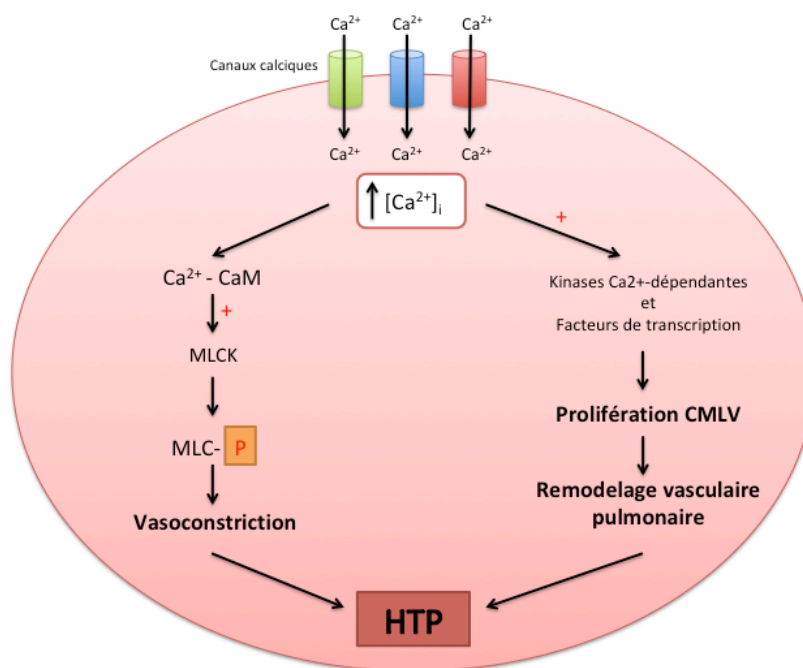


Figure 8 : **Rôle du calcium intracellulaire de la CMLV pulmonaire dans la physiopathologie de l'HTP** (d'après la référence (175)).

De plus, dans la même étude préliminaire réalisée dans notre laboratoire, nous avons mis en évidence une augmentation de la concentration calcique intracellulaire $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dans les CMLV pulmonaires de rats après exposition à l'hyperoxie en comparaison aux contrôles normoxiques. La stimulation par la phényléphrine et la sérotonine entraînait une augmentation rapide de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dans les CMLV pulmonaires de rats en hyperoxie et en normoxie mais cette réponse était significativement augmentée dans les CMLV pulmonaires de rats en hyperoxie (174). Il semble donc également intéressant d'étudier les effets du célastrol sur la réponse calcique intracellulaire des CMLV pulmonaires.

1.3. Le célastrol

Egalement connu sous le nom de triptérine, le célastrol est un tripternoïde dérivé de la racine de la *Trypterigium wilfordii* (connue sous le nom de Vigne du Dieu du Tonnerre) utilisée en médecine traditionnelle chinoise.

Dans un modèle murin d'hypertension systémique, le célastrol à la dose de 1mg/kg en injection intra-péritonéale quotidienne pendant 16 jours diminue la pression systémique en augmentant l'expression et l'activité de HO-1 dans les CMLV aortiques, limitant ainsi le remodelage vasculaire et l'hypertrophie cardiaque (176). Il nous a donc semblé intéressant d'étudier les effets du célastrol dans l'HTP-DBP.

D'autres études ont mis en évidence des effets du célastrol sur des cibles moléculaires impliquées dans la survenue de l'HTP-DBP. En effet, *Han et al.* ont montré que le célastrol induit l'accumulation de la protéine HIF-1 α indépendamment de la tension en O₂ dans un modèle de lignée cellulaire cancéreuse. Il augmente aussi la translocation nucléaire de HIF-1 α et favorise ainsi la transcription de ses gènes cibles dont celui du VEGF (177).

Le célastrol est étudié depuis quelques années pour ses propriétés anti-inflammatoire et anti-oxydante. Plusieurs études ont rapporté un effet bénéfique voire curatif du célastrol dans des modèles de pathologies inflammatoires. Par exemple, *Pinna et al.* ont montré que le célastrol diminue la synthèse de cytokines pro-inflammatoires comme IL-6 et IL-8 dans des biopsies intestinales de patients atteints de maladie de Crohn (178). De même, le célastrol à des posologies variables de 6 à 20 mg/kg/j par voie orale diminue l'inflammation dans des modèles murins d'arthrite (179,180). Il diminue également la synthèse de molécules pro-inflammatoires dans de nombreux types cellulaires dont les CML et les cellules endothéliales (181) et il augmente l'expression et l'activité de HO-1 dans un modèle de lignée cellulaire de kératocytes humains (182). Enfin, dans le modèle de rat hypertendu systémique, le célastrol aurait un effet antioxydant direct en diminuant la production de ROS (176).

Le célastrol semble donc être un candidat intéressant dans le traitement préventif de l'HTP-DBP.

Cependant, dans une étude récente, *Liu et al.* ont montré que le célastrol à la posologie de 100 μ g/kg en injection intra-péritonéale quotidienne pendant 3 semaines entraînait une perte de poids d'environ 30% dans un modèle de souris obèses. Cette perte de poids était liée à une diminution des prises alimentaires, ce qui suggère un effet anorexigène du célastrol (183). Or, dans notre modèle, la prise de poids et les apports nutritionnels post-utérins sont primordiaux car ils peuvent avoir une influence négative sur la sévérité de l'HTP-DBP (70).

1.4. Objectifs de l'étude

Nous disposons dans notre équipe de l'INSERM U1045 d'un modèle d'HTP-DBP induite par l'hyperoxie chez le raton qui a été bien caractérisé (159). Une étude préliminaire dans ce modèle a suggéré un effet préventif du célastrol à la posologie de 1mg/kg/j en injection intra-péritonéale sur la survenue de l'HTP-DBP (diminution de l'index de Fulton et augmentation du TAAP). Nous voulions donc confirmer ces effets du célastrol dans ce modèle et en approfondir les mécanismes. Par ailleurs, nous avons accès à des poumons de fœtus humains issus d'interruptions médicales de grossesse grâce à une collaboration avec les services d'anatomopathologie et d'obstétriques du CHU de Bordeaux. Ces tissus nous permettront de confirmer sur cellules humaines certains mécanismes observés dans notre modèle animal.

Par conséquent, les objectifs de cette étude sont :

- 1 Confirmer l'effet préventif du célastrol sur le modèle raton hyperoxique d'HTP-DBP dans une étude de plus grand effectif,
- 2 Déterminer la dose minimale efficace afin de minimiser les effets indésirables tel que le retard de croissance dû à l'anorexie,
- 3 Préciser les effets du célastrol sur les différentes altérations caractéristiques de l'HTP-DBP (remodelage cardiaque et vasculaire, hypoalvéolisation, etc.),
- 4 Etudier les mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'HTP-DBP et les effets du célastrol sur ces derniers.
- 5 Etudier l'influence de l'hyperoxie et du célastrol sur la réponse calcique de CMLV pulmonaires fœtales.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Etude de l'HTP-DBP dans le modèle animal

2.1.1. Modèle animal d'HTP-DBP

Des rates Wistar gestantes ont été achetées ou obtenues après accouplement au laboratoire. Leur durée de gestation est de 21 jours. Après les vingt-quatre premières heures de vie, les portées ont été réduites ou équilibrées à 12 ratons par portée. Une portée a été affectée au groupe normoxie et une autre au groupe hyperoxie. Le groupe hyperoxie a été placé dans une enceinte reliée à un concentrateur d'O₂ permettant d'assurer une FiO₂ de 90%, contrôlée par un oxymètre (Figure 9). Le groupe normoxique a été placé dans une cage en air ambiant (FiO₂ 21%). L'exposition a été maintenue pendant 14 jours, avec un échange quotidien des mères entre les groupes normoxie et hyperoxie afin d'éviter tout biais lié à la toxicité de l'hyperoxie sur les mères.

Le protocole a été accepté par le comité d'éthique régional d'Aquitaine sous le numéro 2015091112352424APAFIS#1739.

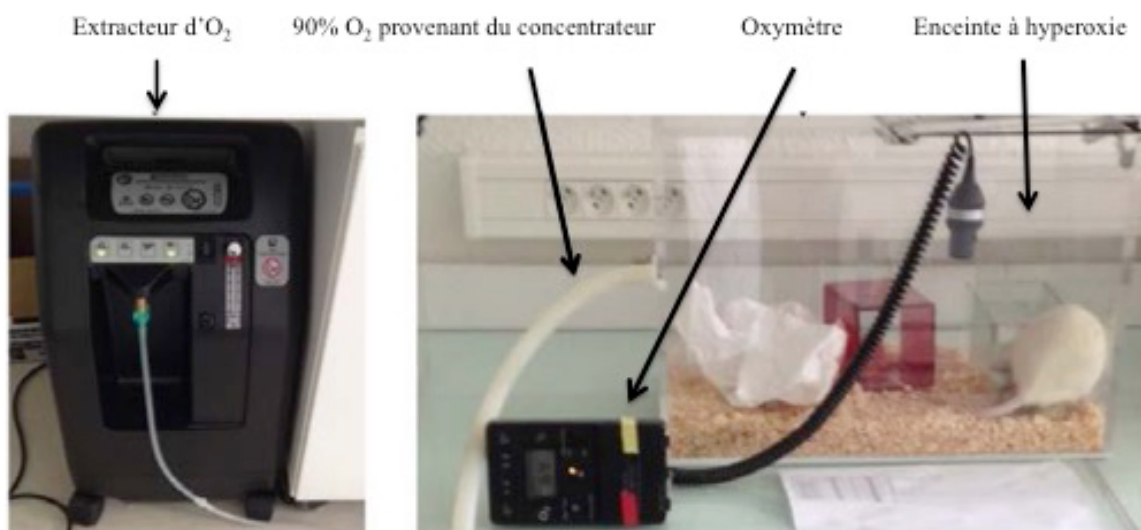


Figure 9 : **Modèle expérimental d'HTP-DBP induite par l'hyperoxie chez le raton.**

2.1.2. Traitement

Dans chaque groupe, normoxie et hyperoxie, ont été testées 3 doses de célastrol : 1mg/kg/j, 0,5mg/kg/j et 0,1mg/kg/j en plus des contrôles.

Les animaux ont été traités quotidiennement par injection intra-péritonéale de 10 μ L/g de NaCl 0,9% (groupe contrôle) ou de célastrol dilué dans du NaCl 0,9% (groupes traités) (Tableau 2).

A l'occasion de ce traitement journalier, les animaux ont également été pesés et les décès ont été répertoriés.

Tableau 2 : **Protocole de traitement**

Traitement	Volume injecté	Concentration de célastrol dans la solution injectée
Contrôle	10 μ L/g	0
Célastrol 0,1mg/kg	10 μ L/g	0,01mg/mL
Célastrol 0,5mg/kg	10 μ L/g	0,05mg/mL
Célastrol 1mg/kg	10 μ L/g	0,1mg/mL

2.1.3. Mesures échocardiographiques

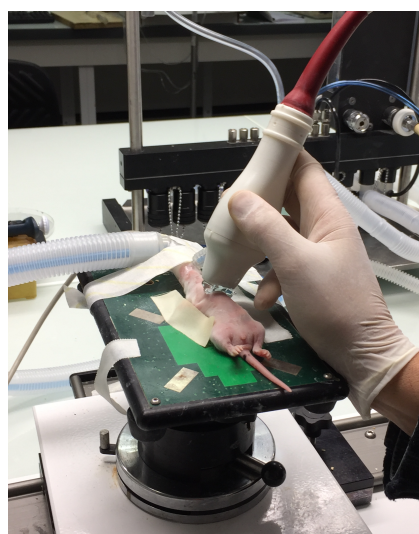
Au 14^{ème} jour de vie, une ETT (appareil Vevo 770 de VisualSonic, sonde MS400) a été réalisée sous anesthésie générale inhalée avec de l'isoflurane (Figure 10).

Le TAAP et la fréquence cardiaque (FC) ont été mesurés en coupe parasternale gauche petit axe.

Les résultats obtenus par la suite sont la moyenne de 3 mesures consécutives du TAAP, réalisées par le même opérateur en aveugle, et rapportées sur la FC.

Le TAAP reflète les pressions pulmonaires et plus ce temps est raccourci, plus les pressions sont élevées.

A.



B.

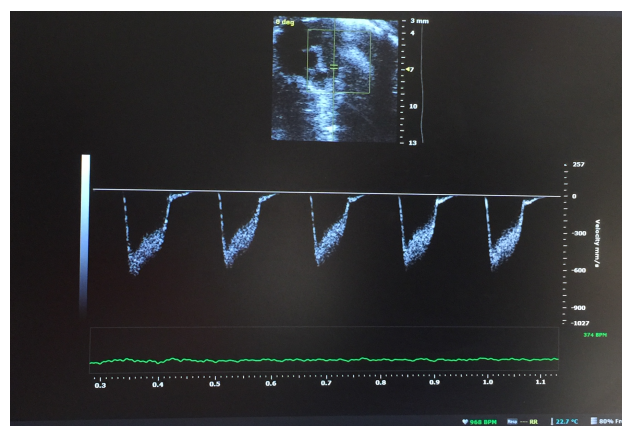


Figure 10 : **A. Dispositif d'échocardiographie ; B. Exemple de mesure doppler du TAAP.**

2.1.4. Mesure du remodelage vasculaire, de l'alvéolisation et de la densité vasculaire

2.1.4.1. Fixation du poumon à pression constante

La fixation à pression constante des poumons permet une ouverture homogène des alvéoles au sein des poumons mais également entre les différents animaux. Ce processus évite le risque de biais lors de l'évaluation de l'alvéolisation.

Les rats ont été euthanasiés par injection d'une dose létale de pentobarbital. La trachée a été mise à nu puis cathétérisée par un cathlon 18G relié à une colonne remplie de 20 cm de paraformaldéhyde 4% (PFA 4%). Le PFA a été injecté dans les voies aériennes pendant une heure et avec une pression constante de 20 cm de PFA 4% (Figure 11). La trachée a ensuite été ligaturée en aval du cathéter et les poumons ont été extraits et conservés en PFA 4%.

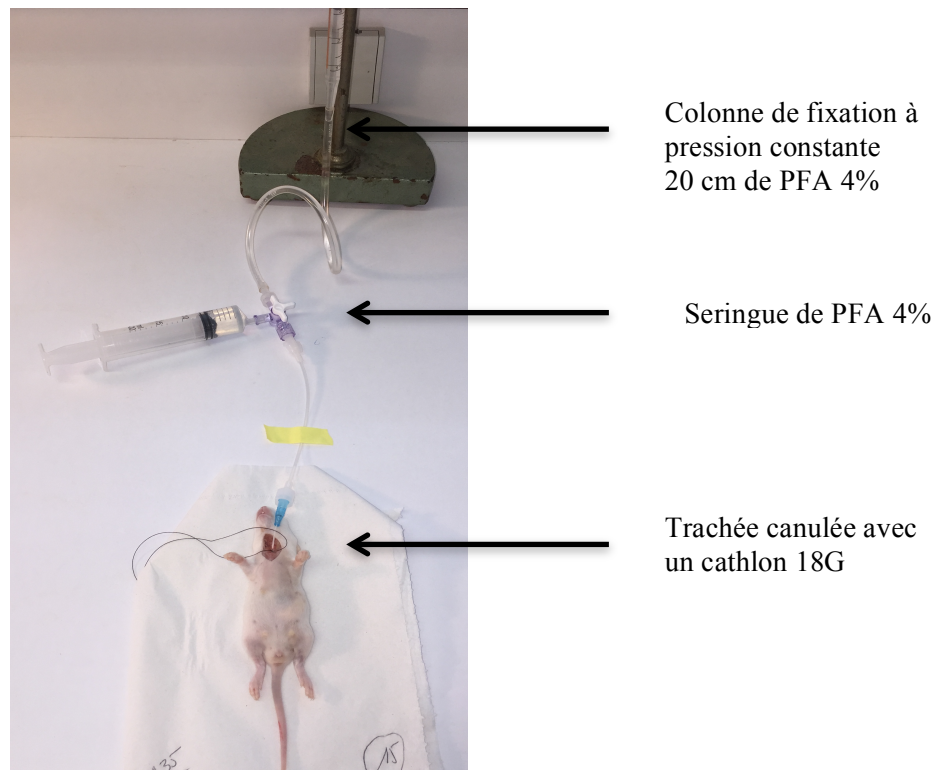


Figure 11 : **Dispositif de fixation des poumons à pression constante.**

2.1.4.2. Préparation des coupes

Le lobe du poumon gauche a été disséqué puis déshydraté par des bains successifs de PBS (*phosphate buffered-saline*), alcool à 50%, 80%, 95% et 100% puis de xylène, et enfin inclus dans de la paraffine. Des coupes de 2,5 μ m ont été réalisées au microtome (Leica).

2.1.4.3. Etude du remodelage vasculaire et de l'alvéolisation par coloration Eosine-Hematoxyline

Les lames ont été déparaffinées dans des bains de xylène puis réhydratées.

Elles ont ensuite été colorées à l'hémalum mayer, colorant nucléaire qui marque en bleu les acides nucléiques, puis colorées à l'éosine aqueuse après un bain d'ammoniac, afin de marquer en rose le cytoplasme.

Les lames ont par la suite été scannées au Bordeaux Imaging Center (BIC) à l'aide d'un NanoZoomer (Hamamatsu) puis étudiées à l'aide du logiciel NDPView.

Pour l'étude du remodelage vasculaire, seuls les vaisseaux d'un diamètre inférieur à 100 µm ont été sélectionnés. Sur chaque coupe et pour chaque vaisseau, les aires externes et internes ont été mesurées manuellement puis le pourcentage d'épaisseur de la média de ces vaisseaux a été calculé selon la formule $((\text{aire externe} - \text{aire interne}) / \text{aire externe}) \times 100$. Le résultat obtenu pour chaque coupe correspond à la moyenne de tous les vaisseaux de la coupe. L'augmentation de l'épaisseur de la média reflète le remodelage vasculaire observé dans l'HTP.

L'étude de l'alvéolisation a consisté à tracer une ligne de 2 mm (verticale ou horizontale) de manière aléatoire sur la coupe et à compter le nombre d'intersections entre cette ligne et les septa alvéolaires. La mesure a été réalisée dans 7 champs différents sur chaque coupe. Le diamètre alvéolaire moyen a ensuite été calculé en divisant 2 mm par le nombre d'intersections comptées pour chaque ligne. Le résultat obtenu pour chaque coupe correspond à la moyenne de ces 7 calculs. L'augmentation du diamètre alvéolaire moyen est le reflet d'une hypoalvéolisation, principale anomalie histologique de la DBP.

2.1.4.4. Analyse de la densité vasculaire par immunomarquage

Une seconde série de lames a été déparaffinée puis réhydratée. Elles ont ensuite été perméabilisées dans un bain de Triton 0,2% puis un démasquage des sites antigéniques a été réalisé avec de la Pronase 0,1%. Les sites de liaison aspécifique ont été bloqués par de la BSA 5% (albumine de sérum bovin diluée dans du *Tris Buffered Saline (TBS)*) pendant 45 minutes. Les coupes ont ensuite été incubées pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire (IgG polyclonales de lapin anti-facteur von Willebrandt (vWF), Millipore, diluées au 1/50ème) puis avec l'anticorps secondaire (anticorps anti-lapin couplé au fluorochrome Alexa Fluor 568 rouge, Life TechnologiesTM, dilué au 1/200ème) pendant deux heures. Des coupes de contrôle négatif ont été incubées pendant une nuit à 4°C avec un tampon de blocage de TBS-BSA 0,5% puis avec l'anticorps secondaire pendant deux heures.

Les lames ont ensuite été montées avec un milieu de montage (Dakomounting medium) contenant du 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) afin de marquer les noyaux puis conservées à -20°C. Les lames ont été scannées au BIC au NanoZoomer et étudiées à l'aide du logiciel NDPView.

Cet immunomarquage anti-vWF permet de marquer les cellules endothéliales. Les vaisseaux peuvent ensuite être comptabilisés dans 4 champs par coupe, sélectionnés de manière aléatoire et au grossissement x10 (environ 1mm²). Le résultat obtenu pour chaque coupe correspond à la moyenne de ces 4 champs.

2.1.5. Evaluation de l'hypertrophie ventriculaire droite

Après extraction du bloc cœur-poumons, le cœur a été isolé puis les oreillettes réséquées. La paroi libre du ventricule droit (VD) a ensuite été séparée du ventricule gauche (VG) et du septum inter-ventriculaire (SIV).

L'évaluation de l'hypertrophie du ventricule droit a été réalisée par le rapport de Fulton = (Poids du VD) / (Poids du VG + SIV). Une augmentation de cet index est pathologique et indique un remaniement du VD, pathognomonique d'une HTP.

2.1.6. Etude de la réactivité artérielle pulmonaire

2.1.6.1. Dispositif expérimental

Les artères intra-pulmonaires de 1^{er} ordre sont disséquées sous loupe à partir du poumon gauche (Figure 12) puis des segments d'environ 2mm de longueur sont montés dans des cuves de myographe Mulvany (Multi Myograph System, model 610M, J.P. Trading, Aarhus, Denmark) contenant une solution de Krebs à 37°C (119 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,5 mM CaCl₂, 1,17 mM MgSO₄, 1,18 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 5,5 mM Glucose). Le pH est de 7,4 et la solution est homogénéisée avec un mélange de carbogène contenant 95% d'O₂ et 5% de CO₂.

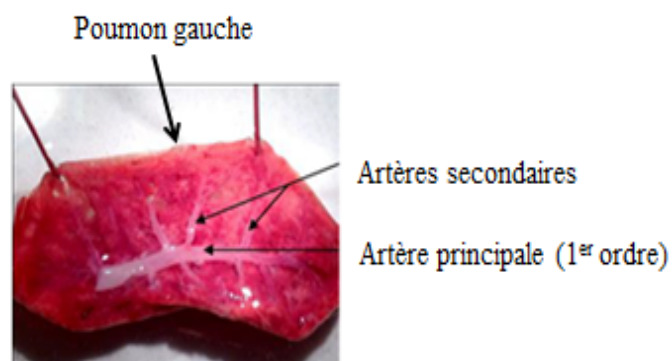


Figure 12 : Arbre artériel du poumon gauche de raton

Le montage dans les cuves de myographe consiste à passer 2 fils de tungstène de 40µm de diamètre dans la lumière des segments d'artères pulmonaires. Les extrémités des fils sont ensuite fixées sur les mâchoires de la cuve. Une de ces extrémités est reliée à un capteur de force isométrique, lui-même relié à un amplificateur et au système d'acquisition et de traitement des données. L'autre extrémité, mobile, est reliée à une vis micrométrique permettant d'étirer les vaisseaux dans le plan horizontal (Figure 13).

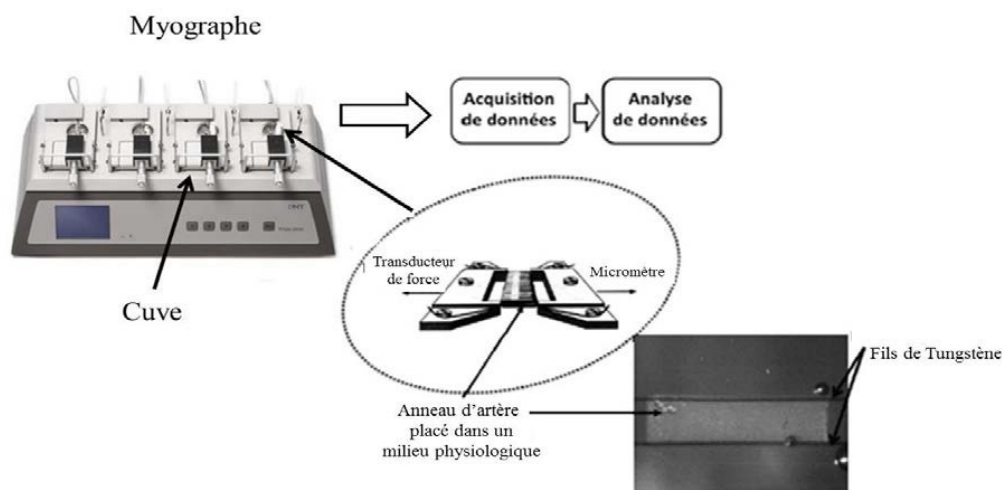


Figure 13 : **Schéma du montage d'un segment d'artère dans une cuve de myographe**

La force développée par l'artère (F , en mN) est mesurée par le capteur et traitée par le logiciel d'acquisition Myodaq 2.04 qui calcule la tension pariétale de l'artère (T , en mN/mm) en fonction du temps selon la formule suivante : $T = F / 2l$, avec l la longueur du vaisseau du mm.

2.1.6.2. *Etude de la réactivité vasculaire*

Les vaisseaux sont étirés en fonction de leur tension optimale de repos (étirement pour lequel le meilleur niveau de contraction est produit) déterminée préalablement ($3,99 \text{ mN/mm}^2$ pour les artères intra-pulmonaires de rats normoxiques et $7,98 \text{ mN/mm}^2$ pour les artères intra-pulmonaires de rats hyperoxiques).

Au bout d'une heure, la fonctionnalité des vaisseaux est contrôlée via une première étape de contraction au KCl 80 mM, puis les cuves sont rincées avec du Krebs pendant 1 heure.

L'activité contractile des artères intra-pulmonaires est ensuite étudiée en réponse à des doses cumulatives d'agents contractants (phényléphrine, sérotonine et prostaglandine $F2\alpha$ ou $PGF2\alpha$) permettant d'obtenir des concentrations croissantes de 10^{-10} à 10^{-3} M.

La phényléphrine, la sérotonine et la $PGF2\alpha$ sont respectivement des agonistes des récepteurs $\alpha 1$ adrénergiques, 5-HT $1a$ et 5-HT $1b$, et FP présents sur les CMLV et dont l'activation entraîne une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ à l'origine de la contraction des CMLV.

La réponse de ces artères à des agents relaxants (acétylcholine, nitroprussiate de sodium ou SNP et isoprénaline) est étudiée aux mêmes concentrations croissantes, après une pré-contraction (environ 90% de la contraction maximale) à la phényléphrine à concentration $3 \cdot 10^{-7}$ M.

L'acétylcholine est un neurotransmetteur agoniste qui agit via des récepteurs muscariniques situés au niveau des cellules endothéliales. Sa fixation entraîne une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ à l'origine de l'activation de la eNOS qui va produire le NO responsable de la relaxation des CMLV. L'isoprénaline est un agoniste des récepteurs $\beta 2$ -adrénergiques situés au niveau des CMLV qui possède une action vasorelaxante indépendante du NO et de l'endothélium. Enfin, le SNP est un donneur de NO qui va agir directement sur les CMLV, induisant une relaxation indépendante de l'endothélium.

Les tracés sont obtenus grâce au logiciel Myodaq 2.02 puis analysés afin de réaliser des courbes doses-réponses pour chaque agent utilisé.

2.1.7. Etude de l'expression protéique

2.1.7.1. Extraction des protéines

Les artères intra-pulmonaires de 1^{er} et 2nd ordres du lobe pulmonaire gauche et de 2 lobes pulmonaires droits ont été disséquées sous loupe puis conservées à -80°C. Elles ont ensuite été broyées manuellement à l'aide d'un mini-potter dans 100 µL de tampon de lyse composé de 150 mM NaCl, 0,5 mM sodium deoxycholate, 0,1 mM SDS, 50 mM Tris-HCl, 0,1% de Triton X100, 1% d'un cocktail Sigma d'inhibiteurs de protéases, 1 mM de PMSF (fluorure de phénylméthylsulfonyl), 5 mM d'EDTA (acide éthylène-diamine-tétra-acétique), 1 mM d'EGTA (acide éthylène-glycol-tétra-acétique), 10 mM de NaF (sodium fluoride) et 2 mM de NaVO₄ (sodium orthovanadate). Les homogénats obtenus ont ensuite été agités pendant 1h à 4°C puis centrifugés à 4°C pendant 10 minutes à 16 000 G. Le surnageant contenant les protéines a été recueilli puis conservé à -80°C.

Un dosage des protéines de chaque échantillon a été réalisé selon la méthode de Lowry (kit BioRad).

2.1.7.2. Western Blot

Des gels de séparation avec différents pourcentages d'acrylamide ont été réalisés selon la protéine étudiée (6% pour HIF-1α ou 12% pour VEGF et HO-1) puis 50 µg de protéines ont été déposés. La migration des protéines a été effectuée par électrophorèse puis les protéines ont été transférées sur des membranes de fluorure de polyvinylidène (PVDF).

Une fois le transfert réalisé, un blocage des sites de liaison aspécifique a été effectué pendant 1 heure avec du TBS-T (*TBS-Tween* 0,1%) - 5% lait. Puis les membranes ont été incubées avec l'anticorps primaire (Tableau 3) pendant une nuit à 4°C sous légère agitation. Elles ont ensuite été lavées (3 x 5 minutes) au TBS-T puis incubées pendant 2 heures avec l'anticorps secondaire couplé à l'enzyme *Horse Radish Peroxydase* (HRP) à température ambiante sous légère agitation.

Les membranes ont été lavées au TBS-T (3 x 5 minutes) puis révélées à l'aide d'un kit de chimiluminescence Bio-Rad. L'acquisition a été faite grâce au MolecularImager® Gel DOC™ XRS+ system (Bio-Rad) et les Western Blots ont été analysés grâce au logiciel ImageLab™ 5.1 Software (Bio-Rad).

Les résultats sont exprimés en ratio de l'intensité de la protéine d'intérêt sur celle de la β-actine.

Pour des raisons techniques, les Western Blots HIF-1α et VEGF n'ont pas abouti.

Tableau 3 : **Anticorps utilisés pour la réalisation des Western Blots**

Anticorps primaire				Anticorps secondaire		
Cible	Taille	Fournisseur	Dilution	Cible	Fournisseur	Dilution
HIF-1α	132 kDa	Santa-Cruz	1/200	IgG de lapin	BioRad	1/2000
VEGF	21 et 42 kDa	Santa-Cruz	1/200	IgG de lapin	BioRad	1/2000
HO-1	32 kDa	Santa-Cruz	1/200	IgG de lapin	BioRad	1/2000
β-actine	42 kDa	Sigma	1/10000	IgG de souris	BioRad	1/10000

2.2. Modèle cellulaire

2.2.1. Obtention de CMLV pulmonaires fœtales

Un fragment d'artère pulmonaire a été disséqué à partir d'un lobe de poumon fœtal obtenu suite à une interruption médicale de grossesse à 22 SA en raison d'un RCIU sévère (autorisation de l'Agence de Biomédecine pour le recueil et l'utilisation en recherche après consentement maternel). L'artère a ensuite été coupée en morceaux d'environ 1 à 2 mm² qui ont été placés en puits sur une plaque 6 puits contenant du milieu de culture (DMEM-HEPES additionné de 1% de pénicilline - streptomycine, 1% de pyruvate de sodium, 1% d'acides aminés non essentiels et 10% de sérum de veau fœtal). Les plaques de culture ont ensuite été placées dans un incubateur humidifié à 37°C en air ambiant additionné de 5% de CO₂. Le milieu de culture a été changé toutes les 48 heures. Après environ 1 semaine, les cellules arrivées à confluence ont été dissociées à la trypsine - EDTA et mises en culture en flasque. Les cellules ont ensuite été régulièrement passées lorsqu'elles atteignaient la confluence et utilisées avant le 5ème passage pour toutes les expérimentations. Un immunomarquage dirigé contre l' α -actine du muscle lisse et la calponine a confirmé qu'il s'agissait bien d'une population de CML.

2.2.2. Exposition des CMLV à l'hyperoxie et au céléstrol

Les cellules ont étéensemencées à 20 000 cellules par puits en plaque 96 puits et placées dans un incubateur humidifié à 37°C en air ambiant additionné de 5% de CO₂ (condition normoxique) ou en air avec 60% d'O₂ additionné de 5% de CO₂ (condition hyperoxique). Du céléstrol (dilué en DMSO) aux concentrations de 0,1 ou 0,3 μ M ou un volume équivalent de DMSO (< 1/4000ème) pour le contrôle a été ajouté au milieu de culture décrit précédemment. Après 24h de culture, le milieu a été remplacé par un milieu sans sérum (DMEM-HEPES additionné de 1% de pénicilline - streptomycine, 1% de pyruvate de sodium, 1% d'acides aminés non essentiels et 1% insuline - transferrine - sélénium SIGMA) contenant les mêmes concentrations de céléstrol et DMSO. Les mesures de calcium ont été réalisées après à nouveau 24h de culture.

2.2.3. Mesure de calcium intracellulaire

La $[Ca^{2+}]_i$ est estimée à l'aide d'une sonde calcique de synthèse Fluo-4 acétoxyméthylester (AM). Le groupement AM permet à la sonde de traverser la membrane plasmique des cellules. Une fois dans le cytoplasme, des estérases endogènes vont cliver le groupement AM ce qui permet à la sonde Fluo-4 de se lier au calcium intracellulaire. Cette liaison se traduit par une augmentation de l'intensité de la fluorescence de la sonde. Il est ainsi possible de suivre les variations de $[Ca^{2+}]_i$ par la mesure en temps réel de l'intensité de la fluorescence du Fluo-4 (Figure 14).

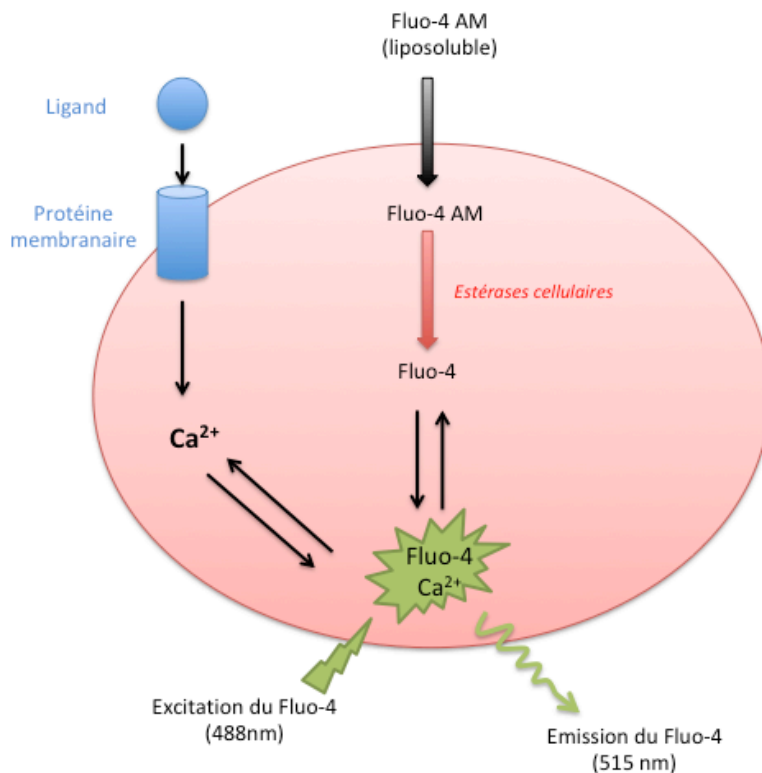


Figure 14 : Schéma de mesure du calcium intracellulaire dans les CMLV pulmonaires fœtales par la sonde Fluo-4 AM (d'après la référence (184))

Ainsi, les CMLV pulmonaires fœtales ont été chargées avec cette sonde Fluo-4 AM dans une solution physiologique MAC (NaCl 130 mM, KCl 5,6 mM, $CaCl_2$ 2 mM, $MgCl_2$ 1 mM, HEPES 8 mM et glucose 11 mM ; pH 7,4) pendant 30 minutes à 37°C et dans l'obscurité. Les puits ont ensuite été rincés au MAC afin d'éliminer la sonde encore présente dans le milieu extracellulaire puis la plaque a été placée sur l'objectif X20 du microscope confocal Nikon®. Les cellules ont ensuite été stimulées par l'ajout dans le milieu de 0,3 μ M d'ET-1. La sonde Fluo-4 a ensuite été excitée par un laser à une longueur d'onde de 488nm et l'émission fluorescente a été enregistrée toutes les 4 secondes à 515nm via une caméra, ce qui a permis l'obtention d'une cinétique des variations de fluorescence, elle-même reflet de la $[Ca^{2+}]_i$.

L'acquisition des images a été réalisée avec le logiciel EZ-C1 de Nikon®. Les résultats sont exprimés selon le rapport F/F_0 avec F = réponse fluorescente maximale et F_0 = réponse fluorescente initiale. En effet, un signal de base peut être mesuré après stimulation lumineuse et malgré l'absence de stimulation par un agoniste. Cela s'explique par une concentration constante du cytoplasme en calcium libre.

2.3. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en valeurs brutes et sont présentés comme la moyenne $\pm$ SEM de n observations indépendantes.

L'étude statistique des données non paramétriques a été réalisée à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test a posteriori de comparaisons multiples de Dunn via le logiciel StatView.

L'analyse statistique des courbes de survie a été réalisée à l'aide d'un test de LogRank via le logiciel GraphPad Prism.

Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$ pour le test de Kruskal-Wallis et le test de LogRank, et à $p < 0,0018$ pour le test de Dunn en raison de la comparaison de 8 conditions différentes.

Concernant les comparaisons des courbes concentration-réponses de réactivité vasculaire, elles ont été réalisées via une analyse de variance à 2 facteurs avec un seuil de significativité fixé à $p < 0,05$.

3. RESULTATS

3.1. Effets du célastrol sur la survie au cours de l'HTP-DBP

A J14, le taux de survie dans le groupe hyperoxique contrôle est de 56,25% contre 100% dans le groupe normoxique contrôle ($p=0,0109$) (Figure 15).

Les taux de survie dans les groupes hyperoxiques célastrol 1mg/kg/j et 0,5mg/kg/j sont respectivement de 100% et 88,23%, et sont significativement différents de celui du groupe hyperoxique contrôle ($p=0,0038$ et $p=0,0496$ respectivement).

Le taux de survie du groupe hyperoxique célastrol 0,1mg/kg/j est de 72,22% et n'est pas significativement différent de celui du groupe hyperoxique contrôle ($p=0,4713$).

Le célastrol diminue donc significativement la mortalité dans ce modèle d'HTP-DBP aux posologies de 1mg/kg/j et 0,5mg/kg/j.

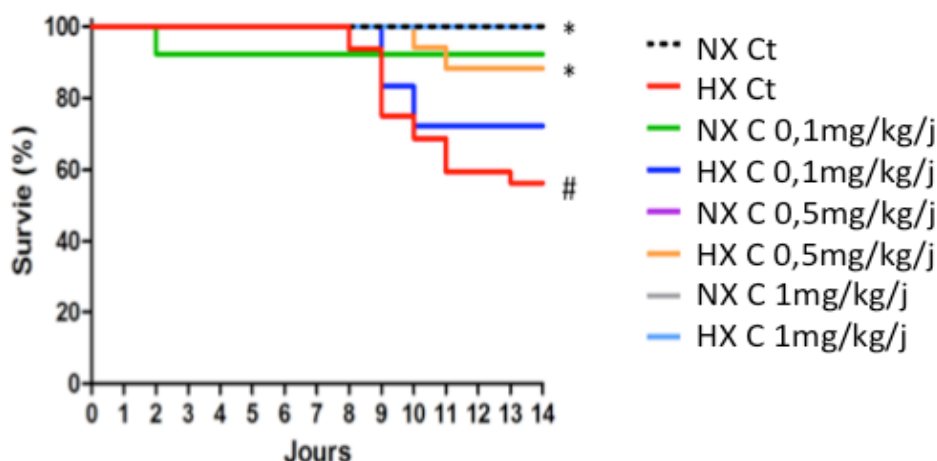


Figure 15 : Effets de l'hyperoxie et du célastrol sur la survie à J14.

Courbe de Kaplan Meyer avec $n=12$ à 29 rats.

* = significativement différent de l'hyperoxie contrôle ; # = significativement différent des normoxiques à la même dose de traitement.

HX = hyperoxie ; NX = normoxie ; Ct = contrôle ; C = célastrol

3.2. Effets du célastrol sur le poids au cours de l'HTP-DBP

Ni l'hyperoxie, ni le célastrol ou l'association des deux n'ont entraîné de modification significative du poids des rats ($p=0,4826$) (Figure 16).

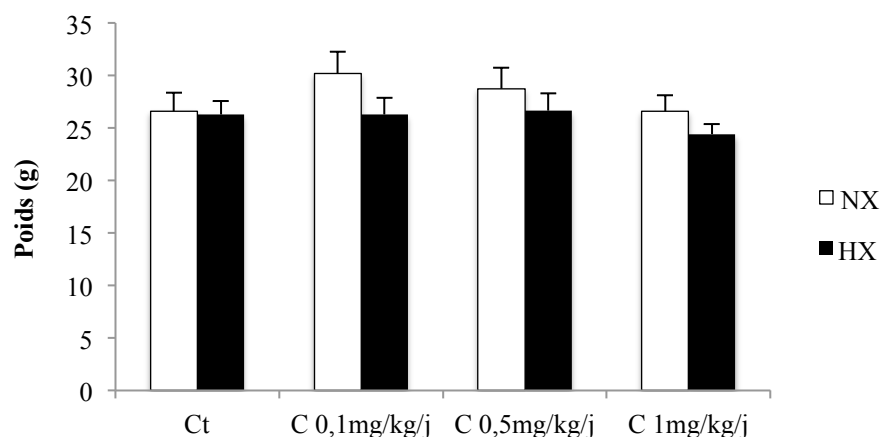


Figure 16 : Effets de l'hyperoxie et du célastrol sur le poids des rats à J14.

Les résultats sont présentés comme les moyennes $\pm$ SEM avec $n = 12$ à 28 rats.

HX = hyperoxie ; NX = normoxie ; Ct = contrôle ; C = célastrol

3.3. Effets du célastrol sur le TAAP au cours de l'HTP-DBP

Le TAAP/FC est significativement diminué dans le groupe hyperoxique contrôle en comparaison du groupe normoxique contrôle ($p<0,0001$) (Figure 17), ce qui confirme le développement d'une HTP chez ces rats. On observe également une différence significative du TAAP/FC dans le groupe hyperoxique célastrol 1mg/kg/j versus hyperoxique contrôle ($p<0,0001$).

Le célastrol à la posologie de 1mg/kg/j normalise donc le TAAP/FC chez les animaux soumis à l'hyperoxie.

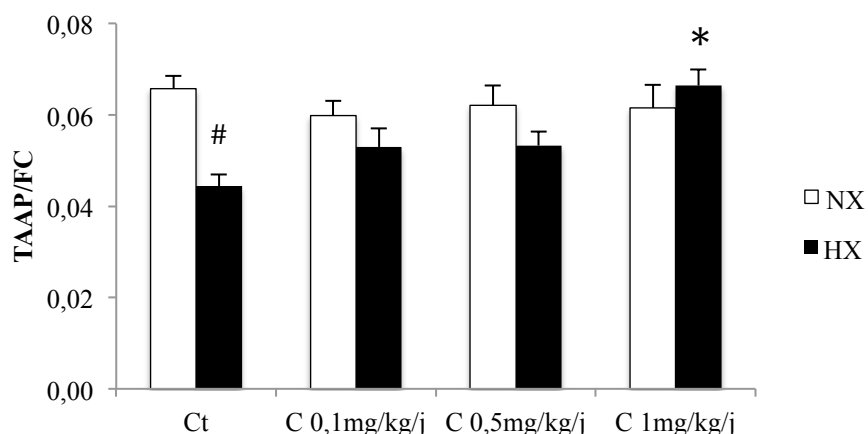


Figure 17 : Effets de l'hyperoxie et du célastrol sur le TAAP à J14.

Les résultats sont présentés comme les moyennes $\pm$ SEM avec $n = 12$ à 28 rats.

* = significativement différent de l'hyperoxie contrôle ; # = significativement différent des normoxiques à la même dose de traitement.

HX = hyperoxie ; NX = normoxie ; Ct = contrôle ; C = célastrol

3.4. Effets du célastrol sur le remodelage cardiaque au cours de l'HTP-DBP

L'hyperoxie est responsable d'une augmentation significative de l'index de Fulton dans le groupe contrôle en comparaison du groupe normoxique contrôle ($p < 0,0001$) (Figure 18). Ce résultat confirme la présence d'une hypertrophie cardiaque induite par l'HTP dans le groupe hyperoxique contrôle. De plus, les 3 groupes hyperoxiques traités sont tous significativement différents du groupe hyperoxique contrôle ($p < 0,0001$) mais sont cependant significativement différents des groupes normoxiques recevant la même dose de traitement.

Le célastrol diminue donc significativement le remodelage cardiaque droit sans toutefois le normaliser.

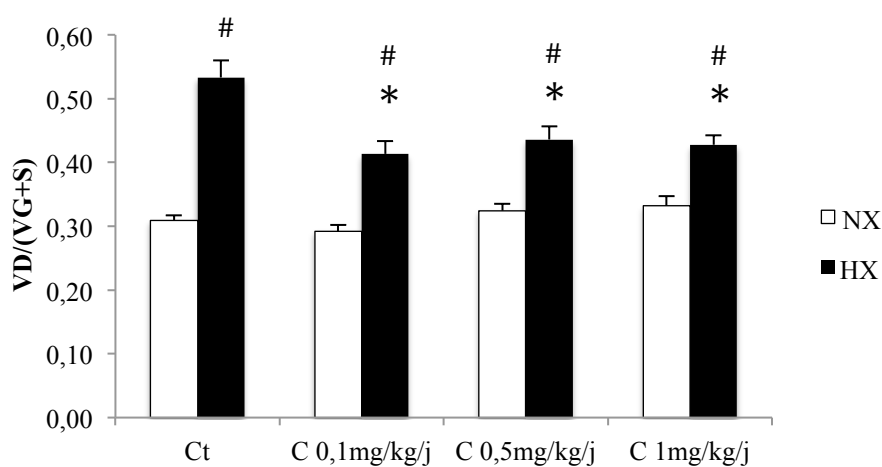


Figure 18 : Effets de l'hyperoxie et du célastrol sur l'index de Fulton à J14.

Les résultats sont présentés comme les moyennes $\pm$ SEM avec $n = 12$ à 27 rats.

* = significativement différent de l'hyperoxie contrôle ; # = significativement différent des normoxiques à la même dose de traitement.

HX = hyperoxie ; NX = normoxie ; Ct = contrôle ; C = célastrol

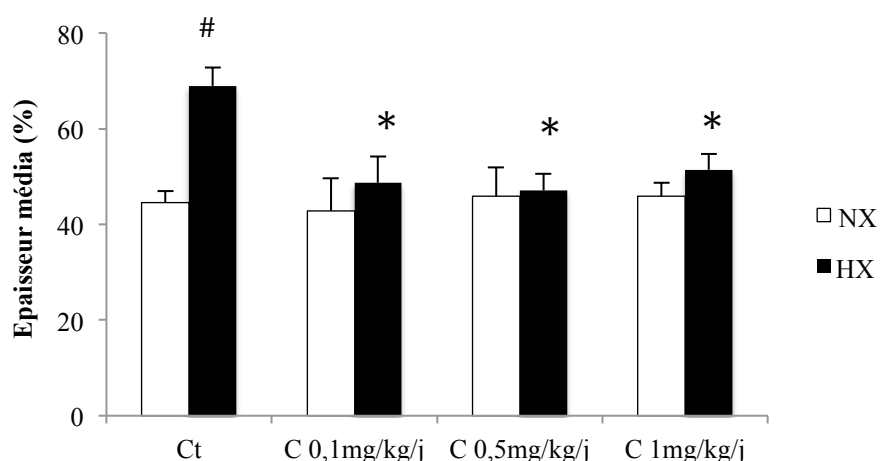
3.5. Effets du célastrol sur le remodelage vasculaire au cours de l'HTP-DBP

L'épaisseur de la média des petites artères pulmonaires est significativement augmentée dans le groupe hyperoxique contrôle versus le groupe normoxique contrôle ($p < 0,0001$) (Figure 19).

De plus, les groupes hyperoxiques traités 1mg/kg/j, 0,5mg/kg/j et 0,1mg/kg/j sont significativement différents du groupe hyperoxique contrôle avec $p = 0,0003$, $p = 0,0003$ et $p = 0,0007$ respectivement. Par ailleurs, il n'existe pas de différence significative entre les groupes hyperoxiques traités et les groupes normoxiques traités.

Le célastrol diminue donc significativement le remodelage vasculaire dans l'HTP-DBP.

A.



B.

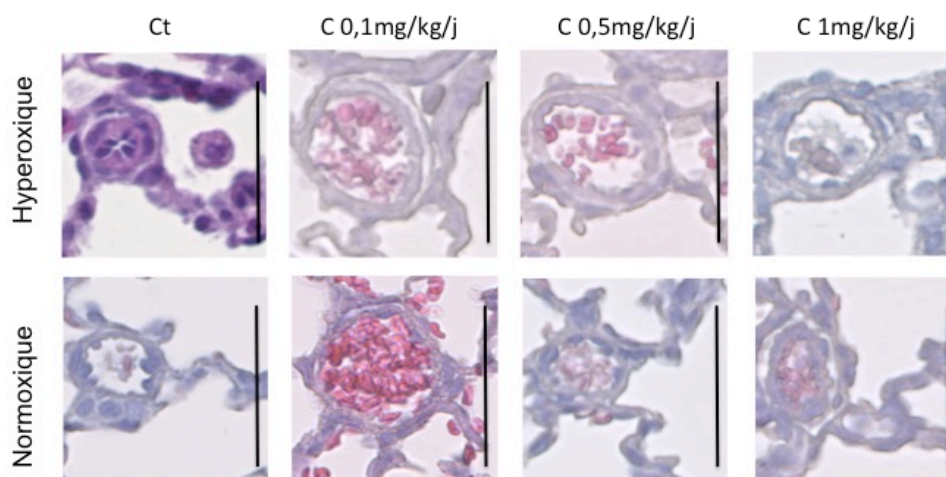


Figure 19 : Effets de l'hyperoxie et du célastrol sur le remodelage vasculaire à J14.

A. Epaisseur moyenne de la média. Les résultats sont présentés comme les moyennes $\pm$ SEM avec $n = 4$ à 12 rats.

B. Coupes histologiques représentatives d'artères pulmonaires après coloration à l'éosine-hématoxyline.

* = significativement différent de l'hyperoxie contrôle ; # = significativement différent des normoxiques à la même dose de traitement.

HX = hyperoxie ; NX = normoxie ; Ct = contrôle ; C = célastrol

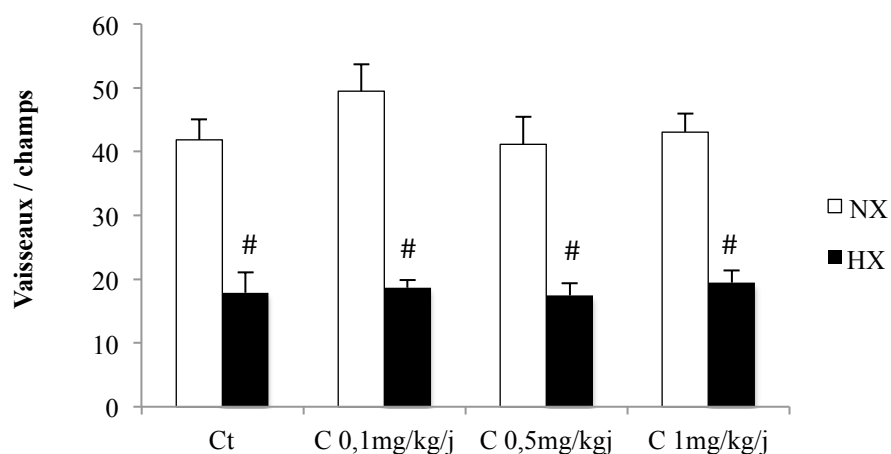
La barre d'échelle correspond à 50 μ m.

3.6. Effets du célastrol sur la densité vasculaire au cours de l'HTP-DBP

Il existe une diminution significative de la densité vasculaire entre les groupes hyperoxiques contrôle et traités versus les groupes normoxiques de la même condition ($p < 0,0001$) (Figure 20), ce qui est typique de la DBP.

Le célastrol n'a donc aucun effet sur la densité vasculaire dans ce modèle d'HTP-DBP.

A.



B.

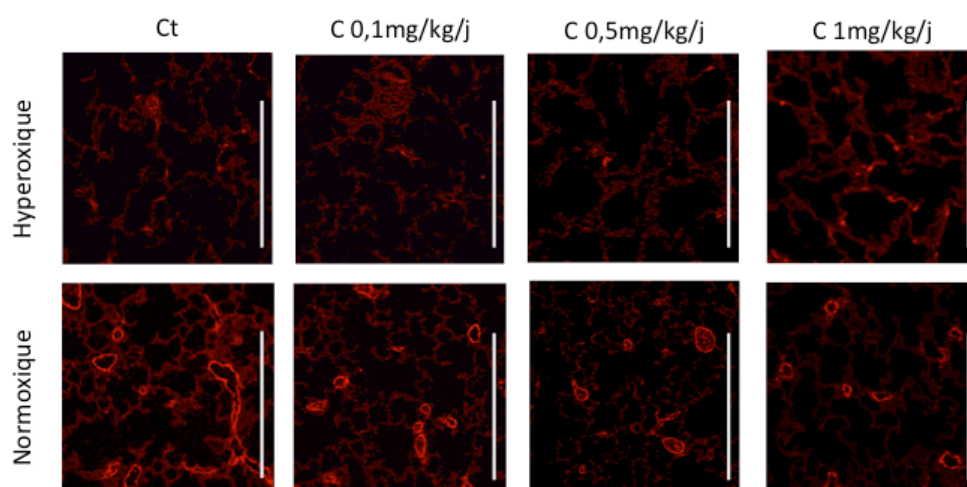


Figure 20 : Effets de l'hyperoxie et du célastrol sur la densité vasculaire à J14.

A. Densité vasculaire. Les résultats sont présentés comme les moyennes $\pm$ SEM avec $n = 4$ à 6 rats.

B. Coupes histologiques de poumons représentatives après immunomarquage vWF.

= significativement différent des normoxiques à la même dose de traitement.

HX = hyperoxie ; NX = normoxie ; Ct = contrôle ; C = célastrol

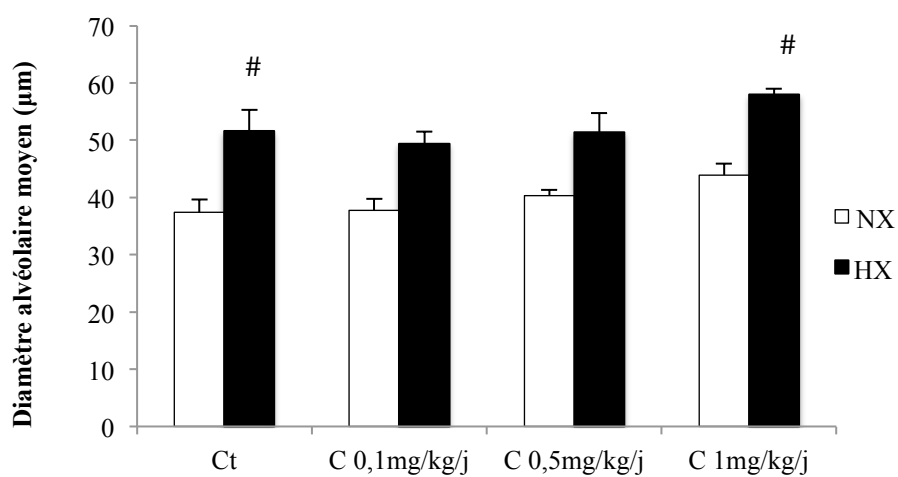
La barre d'échelle correspond à 250 μ m.

3.7. Effets du célastrol sur l'alvéolisation au cours de l'HTP-DBP

Le diamètre alvéolaire moyen est significativement augmenté dans le groupe hyperoxique contrôle en comparaison au groupe normoxique contrôle ($p < 0,0001$) (Figure 21), ce qui confirme chez ces rats l'hypoalvéolisation typique de la DBP. De même, il existe une augmentation du diamètre alvéolaire moyen dans les groupes hyperoxiques traités au célastrol (augmentation significative uniquement pour le groupe hyperoxique célastrol 1mg/kg/j).

Le célastrol n'a donc pas d'effet sur l'alvéolisation dans ce modèle d'HTP-DBP.

A.



B.

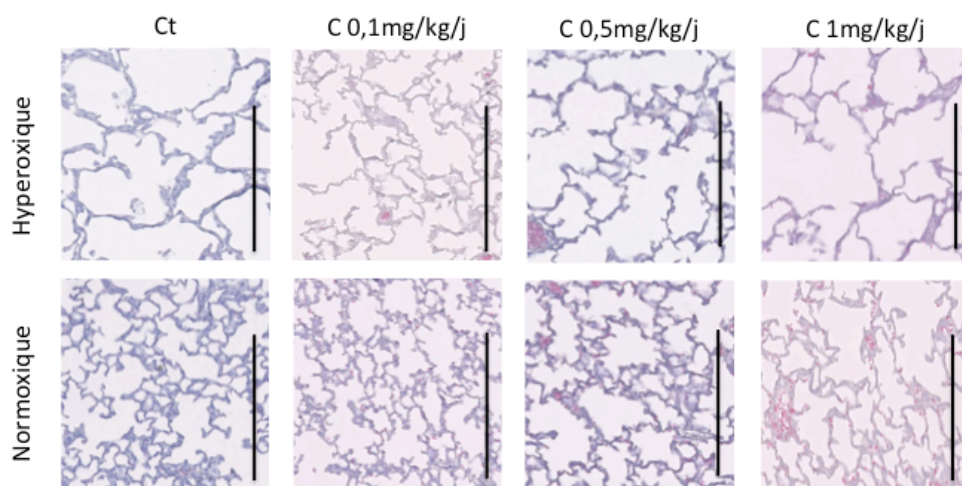


Figure 21 : **Effets de l'hyperoxie et du célastrol sur l'alvéolisation à J14.**

A. Diamètre alvéolaire moyen. Les résultats sont présentés comme les moyennes $\pm$ SEM avec $n = 4$ à 8 rats.

B. Coupes histologiques représentatives de poumons après coloration à l'éosine-hématoxyline.

= significativement différent des normoxiques à la même dose de traitement.

HX = hyperoxie ; NX = normoxie ; Ct = contrôle ; C = célastrol

La barre d'échelle correspond à 250µm.

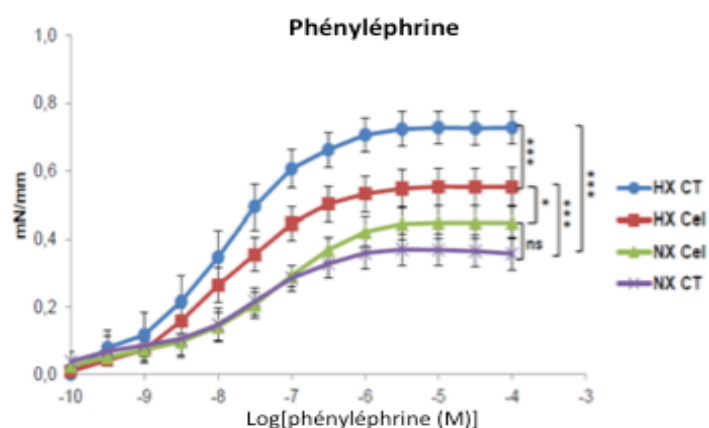
3.8. Effets du célastrol sur la réactivité vasculaire pulmonaire au cours de l'HTP-DBP

3.8.1. Effets du célastrol sur la réponse contractile des artères intra-pulmonaires

La réponse contractile à la phényléphrine et à la sérotonine est significativement augmentée pour les artères intra-pulmonaires des rats en hyperoxie ($p < 0,001$) (Figure 22). Un traitement par célastrol 1mg/kg/j permet une réduction significative de la réponse contractile à la phényléphrine ($p < 0,001$) induite par l'hyperoxie sans toutefois permettre un retour à l'état basal. Le célastrol n'a cependant pas d'effet sur la réponse contractile à la sérotonine.

Concernant le $\text{PGF}_2\alpha$, il n'est pas mis en évidence de modification de la réponse contractile entre les groupes normoxiques et hyperoxiques.

A.



B.

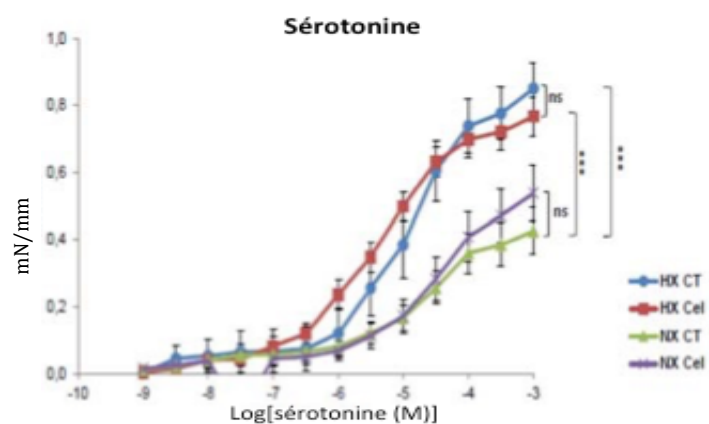


Figure 22 : Effets de l'hyperoxie et du célastrol sur la réponse contractile d'artères intra-pulmonaires à différents agents contractants

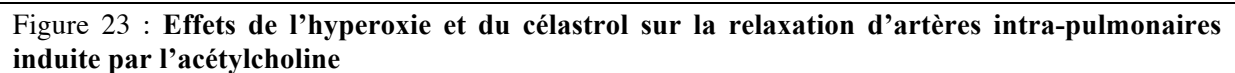
A. Réponses contractiles à la phényléphrine

B. Réponses contractiles à la sérotonine

Les résultats sont présentés comme les moyennes $\pm$ SEM avec $n=11-18$ anneaux vasculaires provenant de 9-10 animaux dans les groupes hyperoxiques et $n=8$ anneaux vasculaires provenant de 4 animaux dans les groupes normoxiques.

ns = non significatif ; * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$

L'hyperoxie entraîne une diminution de la relaxation des artères intra-pulmonaires en réponse à l'acétylcholine ($p < 0,05$) (Figure 23). Concernant l'isoprénaline et le SNP, il n'y a pas de différence entre les conditions normoxiques et hyperoxiques. De plus, il n'a pas été mis en évidence de différence significative de relaxation vasculaire pulmonaire entre les groupes hyperoxiques traité et contrôle, quel que soit l'agent relaxant utilisé. Le célastrol n'a donc pas d'effet sur l'altération de la réponse à l'acétylcholine induite par l'hyperoxie.

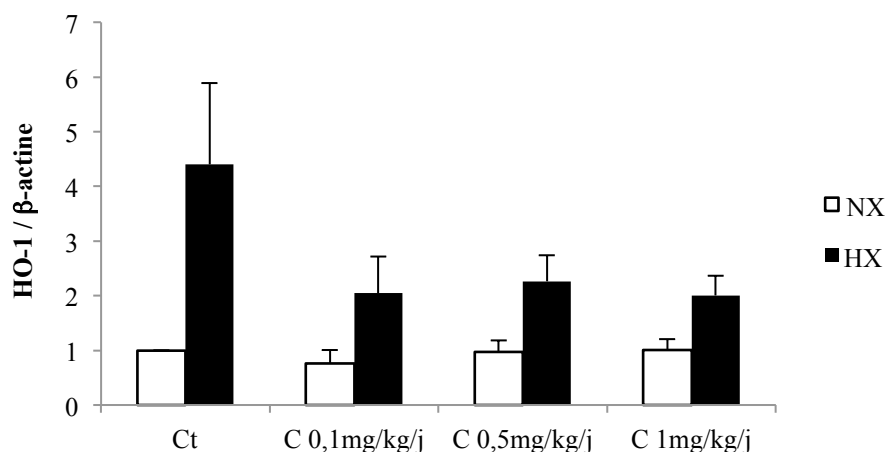


ns = non significatif ; * = $p < 0,05$

3.9. Effets du célastrol sur l'expression protéique de HO-1 au cours de l'HTP-DBP

L'hyperoxie semble augmenter l'expression protéique de HO-1 dans le groupe contrôle mais cette augmentation n'atteint pas le seuil de significativité ($p=0,0137$) (Figure 24), sans doute en raison de la variabilité importante entre les échantillons. De plus, il semble que le célastrol tende à diminuer l'expression protéique de HO-1 chez les rats exposés à l'hyperoxie.

A.



B.

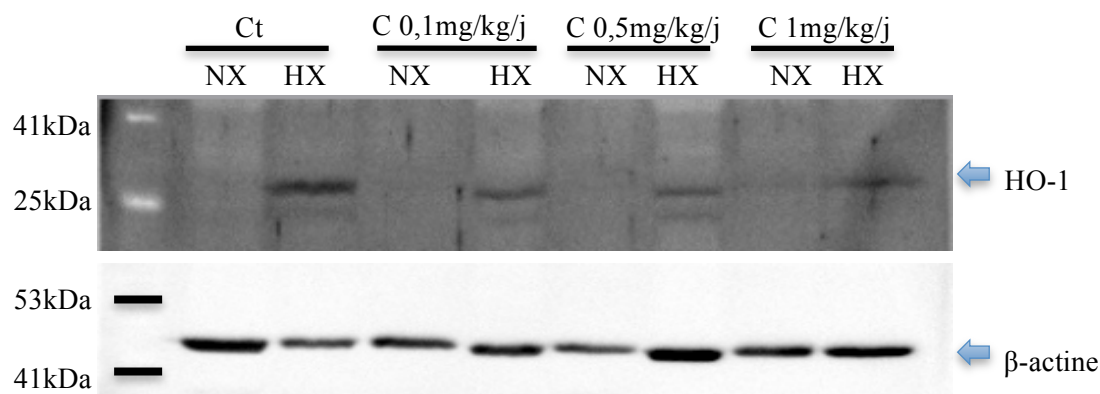


Figure 24 : Expression protéique de HO-1 dans les artères pulmonaires

A. Quantification de l'expression protéique de HO-1 dans les artères pulmonaires. Les résultats sont présentés comme les moyennes $\pm$ SEM avec $n = 5$ à 6 rats.

B. Western Blots représentatifs de HO-1 et β -actine

HX = hyperoxie ; NX = normoxie ; Ct = contrôle ; C = célastrol

3.10. Effets du célastrol sur le calcium intracellulaire des CMLV fœtales

L'hyperoxie augmente de façon significative la $[Ca^{2+}]_i$ en réponse à l'ET-1 dans les CMLV fœtales en comparaison aux CMLV fœtales contrôles normoxiques ($p=0,0002$). Le célastrol aux posologies de 0,1 et 0,3 μM entraîne une diminution significative de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les CMLV fœtales après exposition à l'hyperoxie en comparaison aux CMLV fœtales normoxiques traitées (Figure 25) (respectivement $p=0,0002$ et $p<0,0001$).

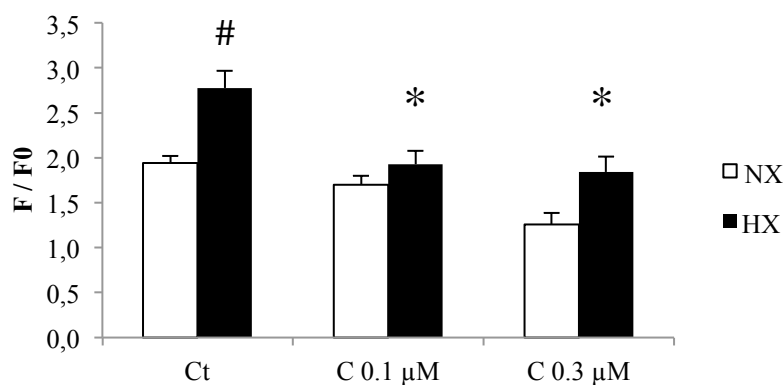


Figure 25 : Effets du célastrol sur la $[Ca^{2+}]_i$ des CMLV fœtales

Les résultats sont présentés comme les moyennes $\pm$ SEM avec $n = 3$ passages cellulaires.

* = significativement différent de l'hyperoxie contrôle ; # = significativement différent des normoxiques à la même dose de traitement.

HX = hyperoxie ; NX = normoxie ; Ct = contrôle ; C = célastrol

4. DISCUSSION

L'HTP-DBP est une des complications les plus sévères de la DBP survenant chez les nouveau-nés prématurés avant 32 SA. Elle est responsable d'une mortalité importante : quasiment 1 enfant sur 2 atteint d'HTP-DBP persistante décède dans les 2 premières années suivant le diagnostic (19). Le célastrol est une molécule aux propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes qui a aussi montré des effets bénéfiques sur des voies de signalisation impliquées dans la survenue de l'HTP-DBP (176,177). Il nous a donc semblé intéressant de l'étudier en tant que traitement préventif de la survenue d'une HTP-DBP dans un modèle murin hyperoxique. Dans ce modèle, nous avons montré que le célastrol améliore de façon significative la survie, les pressions pulmonaires reflétées par le TAAP, le remodelage cardiaque droit et vasculaire pulmonaire ainsi que l'hyperréactivité vasculaire des artères pulmonaires. A l'inverse, nous n'avons pas mis en évidence d'effet du célastrol sur la densité vasculaire pulmonaire et l'alvéolisation. Il semble donc que le célastrol ait un effet bénéfique sur l'HTP sans améliorer la DBP en elle-même.

Nous avons choisi un modèle de rats exposés à l'hyperoxie pendant 14 jours car le poumon du raton à la naissance à terme est au stade sacculaire, tout comme le nouveau-né prématuré humain né avant 32 SA. De plus, ce modèle de DBP hyperoxique est déjà largement utilisé dans la littérature.

Des apports nutritionnels insuffisants et un retard de croissance post-utérin majorant le risque de survenue de la DBP (70), nous avons limité le nombre de rats par portée à 12. Ce nombre permet d'obtenir des rats vivants malades à J14, même si la mortalité reste très élevée dans le groupe hyperoxique contrôle (43,75%).

Des études ont clairement montré que le célastrol est anorexigène (183). Chez le nouveau-né prématuré de faible poids de naissance, cet effet secondaire pourrait freiner l'utilisation du célastrol en prévention de l'HTP-DBP. Cependant, l'ensemble des nouveau-nés prématurés nés avant 32 SA voire avant 34 SA sont nourris par sonde naso-gastrique du fait de l'absence de coordination succion-déglutition à ce terme, ce qui rend négligeable le risque d'anorexie secondaire à la prise de célastrol dans cette population. A l'inverse, dans notre modèle murin, n'ayant pas de moyen de contrôle des prises alimentaires des rats, cet effet secondaire du célastrol pourrait fortement impacter le développement et la sévérité de l'HTP-DBP. De plus, une étude préliminaire menée au sein de notre laboratoire sur ce même modèle d'HTP-DBP hyperoxique traité par du célastrol à la dose de 1mg/kg/j suggérait que le célastrol associé à l'hyperoxie entraînait une diminution du poids des rats. Pour ces raisons et aux vues des données de la littérature sur le célastrol et la prise pondérale, nous avons choisi d'étudier 3 doses de célastrol : 1mg/kg/j, 0,5mg/kg/j et 0,1mg/kg/j afin de voir si le traitement est toujours efficace à posologies inférieures et si l'effet anorexigène diminue. Nous avons donc trouvé que le célastrol agit selon un effet dose-dépendant sur certains paramètres (survie et TAAP) et que la posologie de 1mg/kg/j semble être la dose la plus intéressante car elle permet une meilleure survie (identique à celle des animaux normoxiques) et n'entraîne pas de modification du poids contrairement aux données publiées dans d'autres modèles et lors de notre étude préliminaire de faible effectif.

Il s'agit de la première étude ayant mis en évidence un effet bénéfique du célastrol sur l'HTP par la diminution du remodelage artériel pulmonaire et cardiaque droit ainsi que l'amélioration du flux sanguin systolique dans l'artère pulmonaire. Ces résultats sont en accord avec ceux de *Yu et al.* qui ont mis en évidence une diminution de la prolifération des CMLV de l'aorte thoracique et des artères spléniques ainsi qu'une diminution du remodelage cardiaque dans un modèle de rat adulte hypertendu systémique (176).

Concernant les effets du célastrol sur la voie du VEGF, les données de la littérature sont contradictoires. En effet, *Han et al.* ont mis en évidence un effet du célastrol sur l'expression du VEGF via l'augmentation de HIF-1 α (177) mais d'autres études ont montré un effet inhibiteur du célastrol sur la vasculogénèse et l'angiogénèse par diminution de l'expression des récepteurs VEGFR dans des modèles de xénogreffe de gliome humain et de tumeur prostatique humaine chez la souris (185,186). De plus, *Ma et al.* ont montré un effet inhibiteur du célastrol sur la traduction de l'ARNm de HIF-1 α dans un modèle de cellules d'hépatome humain (187) et *Huang et al.* ont également mis en évidence une diminution *in vitro* du niveau d'ARNm et de la translocation nucléaire de HIF-1 α dans des cellules endothéliales et cancéreuses humaines traitées avec du célastrol (188,189). Dans notre modèle, nous n'avons pas montré d'amélioration de la densité vasculaire pulmonaire chez les ratons bronchodysplasiques traités par célastrol. Malheureusement, les Western Blots HIF et VEGF n'ayant pas abouti, nous ne pouvons pas conclure sur les effets du célastrol sur la voie de signalisation HIF-VEGF dans notre modèle d'HTP-DBP hyperoxique. De nouveaux Western Blots vont donc être réalisés, et aux vues de la littérature, il semble intéressant d'étudier également l'expression des VEGFR dans ce modèle.

Si l'on considère que le célastrol pourrait avoir un effet inhibiteur sur le signal VEGF, cela pourrait également expliquer l'hypoalvéolisation mise en évidence chez les ratons hyperoxiques traités. En effet, selon la « théorie vasculaire », le développement vasculaire pulmonaire normal est une condition nécessaire pour une bonne croissance alvéolaire (9). Ce phénomène est confirmé dans les études sur le raton traité par inhibiteur du VEGFR qui mettent en évidence des anomalies majeures de la croissance pulmonaire distale (98,169).

Concernant l'étude de la réactivité vasculaire, il existe peu de données à ce jour qui permettent de comprendre le rôle exact du tonus vasculaire dans la survenue de l'HTP-DBP. L'efficacité du NOi dans la prise en charge aigue de l'HTP-DBP fait supposer que l'augmentation du tonus vasculaire pulmonaire contribue de manière importante au développement de cette pathologie. Dans cette étude, nous avons mis en évidence une diminution de la vasorelaxation des artères intra-pulmonaires de ratons exposés à l'hyperoxie en réponse à l'acétylcholine, sans modification de la réponse au SNP, donneur de NO et à l'isoprénaline, agent relaxant indépendant du NO et de l'endothélium. Ces résultats indiquent donc que la réduction de la réponse à l'acétylcholine induite par l'hyperoxie tient son origine dans la cellule endothéliale productrice de NO, et non dans la CMLV. Ces données concordent avec celles d'une étude précédente réalisée au sein de notre laboratoire (174) qui avait mis en évidence une dysfonction endothéliale des vaisseaux pulmonaires de ratons après exposition à 14

jours d'hyperoxie. Cette dysfonction était en lien avec une diminution de l'activité de la eNOS dans ces mêmes vaisseaux.

Enfin, concernant l'effet du céléstrol sur la diminution de la réponse contractile à la phényléphrine des artères intra-pulmonaires de rats exposés à l'hyperoxie, une étude a montré que le céléstrol diminuait l'expression de Ca^{2+} -ATPases 2b du réticulum sarco(endo)plasmique (SERCA2b) (190). Ces SERCA ont comme rôle principal de faire rentrer le calcium du cytosol vers la lumière du réticulum endoplasmique. Une diminution de leur expression est responsable d'une diminution de la concentration calcique du réticulum endoplasmique, ce qui pourrait expliquer la baisse de la réponse contractile à la phényléphrine pour les vaisseaux intra-pulmonaires de rats hyperoxiques traités par céléstrol 1mg/kg/j. Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus sur notre modèle cellulaire lors des mesures de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En effet, nous avons montré que le céléstrol à la posologie de 0,1 et 0,3 μM diminue la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ des CMLV fœtales pulmonaires exposées à l'hyperoxie.

Il serait intéressant de poursuivre l'étude des effets du céléstrol sur la réactivité vasculaire pulmonaire en testant la réponse contractile des artères intra-pulmonaires de rats à l'ET-1 afin de voir si cela concorde avec les résultats obtenus sur le modèle cellulaire. En effet, les différents essais réalisés avec les agents contractants (sérotonine et phényléphrine) utilisés lors de l'étude de la réactivité vasculaire pulmonaire n'ont pas entraîné de réponse calcique cellulaire dans le modèle de CMLV fœtales pulmonaires. Cela pourrait s'expliquer par l'absence d'expression des récepteurs 5-HT1a, 5-HT1b et $\alpha 1$ -adrénergiques chez le fœtus humain à 22 SA en comparaison au raton né à terme (191).

Au niveau moléculaire, malgré l'absence de résultat significatif, il semble que l'hyperoxie augmente l'expression de la protéine HO-1 dans les artères pulmonaires de rats non traités. Ce résultat est cohérent avec les autres études de l'effet de l'hyperoxie et du stress oxydatif sur l'expression de HO-1 (164,165). Le céléstrol, quant à lui semble induire une diminution de l'expression de HO-1 dans les artères pulmonaires de rats exposés à l'hyperoxie, même si nous n'avons pas obtenu de résultat significatif. Cette tendance pourrait s'expliquer par un effet antioxydant du céléstrol. En effet, dans un modèle de rat adulte hypertendu systémique, le céléstrol a un effet inhibiteur direct sur la production de ROS (176). Ce résultat serait à confirmer avec un effectif plus important du fait des grands écart-types.

Pour finir, le principal biais dans cette étude est lié au fait que le modèle est très sévère. En effet, la mortalité y est importante à la fin de la première semaine d'hyperoxie dans les groupes contrôle et céléstrol 0,1mg/kg/j. Ainsi, l'ensemble des paramètres évalués à la fin du protocole à J14 (TAAP, Fulton, etc.) ne concerne que les animaux les plus résistants et les moins malades. De plus, du fait de la diminution des portées avec le décès de rats à la fin de la première semaine d'hyperoxie, les animaux survivants ont des apports alimentaires plus importants, ce qui pourrait limiter la survenue de l'HTP-DBP dans notre modèle.

Au final, dans notre étude, nous avons montré que le céléstrol a un effet préventif dose-dépendant sur le développement de l'HTP dans un modèle de DBP hyperoxique du raton même s'il ne semble pas avoir d'effet sur la DBP en elle-même. Il pourrait également avoir un effet antioxydant direct par la

diminution de la production des ROS ce qui est une propriété intéressante dans ce contexte d'exposition à l'hyperoxie. Pour toutes ces raisons, le célastrol est une molécule intéressante pour le traitement préventif de l'HTP-DBP chez le nouveau-né prématuré mais les mécanismes exacts mis en jeu restent encore à déterminer.

Bibliographie

1. Northway WHJ, Rosan RC, Porter DY. Pulmonary Disease Following Respirator Therapy of Hyaline-Membrane Disease. *N Engl J Med*. 1967;276(7):357-68.
2. Buczynski BW, Maduekwe ET, O'Reilly MA. The Role of Hyperoxia in the Pathogenesis of Experimental BPD. *Semin Perinatol*. 2013;37(2):69-78.
3. Jarreau PH, Delacourt C. La dysplasie bronchopulmonaire : physiopathologie et évidences pour la prévention et la prise en charge. In: *Néonatalogie : bases scientifiques*, Paris, Elsevier Masson, 2016, pp. 283-299.
4. Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary Dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(7):1723-9.
5. Walsh MC, Wilson-Costello D, Zadell A, Newman N, Fanaroff A. Safety, Reliability, and Validity of a Physiologic Definition of Bronchopulmonary Dysplasia. *J Perinatol*. 2003;23(6):451-6.
6. Ancel P-Y, Goffinet F, Kuhn P, Langer B, Matis J, Hernandorena X, et al. Survival and Morbidity of Preterm Children Born at 22 Through 34 Weeks' Gestation in France in 2011: Results of the EPIPAGE-2 Cohort Study. *JAMA Pediatr*. 2015;169(3):230-8.
7. Chess PR, D'Angio CT, Pryhuber GS, Maniscalco WM. Pathogenesis of Bronchopulmonary Dysplasia. *Semin Perinatol*. 2006;30(4):171-8.
8. Clement A. Malformations du Système Respiratoire [Internet]. *RespiRare* Centre de référence des maladies respiratoires rares. [cité 4 sept 2017]. Disponible sur: http://epar.iplesp.upmc.fr/site_respire/index.php/fr/dev
9. Parker TA, Abman SH. The pulmonary circulation in bronchopulmonary dysplasia. *Semin Neonatol*. 2003;8(1):51-61.
10. Kinsella JP, Greenough A, Abman SH. Bronchopulmonary dysplasia. *The Lancet*. 2006;367(9520):1421-31.
11. Bhatt AJ, Pryhuber GS, Huyck H, Watkins RH, Metlay LA, Maniscalco WM. Disrupted Pulmonary Vasculature and Decreased Vascular Endothelial Growth Factor, Flt-1, and TIE-2 in Human Infants Dying with Bronchopulmonary Dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(10):1971-80.
12. Jakkula M, Cras TDL, Gebb S, Hirth KP, Tuder RM, Voelkel NF, et al. Inhibition of angiogenesis decreases alveolarization in the developing rat lung. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2000;279(3):L600-7.
13. Bhandari V, Gruen JR. The Genetics of Bronchopulmonary Dysplasia. *Semin Perinatol*. 2006;30(4):185-91.
14. Lavoie PM, Pham C, Jang KL. Heritability of Bronchopulmonary Dysplasia, Defined According to the Consensus Statement of the National Institutes of Health. *Pediatrics*. 2008;122(3):479-85.
15. Li J, Yu K-H, Oehlert J, Jelliffe-Pawłowski LL, Gould JB, Stevenson DK, et al. Exome Sequencing of Neonatal Blood Spots and the Identification of Genes Implicated in Bronchopulmonary Dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192(5):589-96.

16. Hadchouel A, Durrmeyer X, Bouzigon E, Incitti R, Huusko J, Jarreau P-H, et al. Identification of SPOCK2 As a Susceptibility Gene for Bronchopulmonary Dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184(10):1164-70.
17. Hilgendorff A, Apitz C, Bonnet D, Hansmann G. Pulmonary hypertension associated with acute or chronic lung diseases in the preterm and term neonate and infant. The European Paediatric Pulmonary Vascular Disease Network, endorsed by ISHLT and DGPK. *Heart*. 2016;102(Suppl 2):ii49-ii56.
18. Altit G, Dancea A, Renaud C, Perreault T, Lands LC, Sant'Anna G. Pathophysiology, screening and diagnosis of pulmonary hypertension in infants with bronchopulmonary dysplasia - A review of the literature. *Paediatr Respir Rev*. 2017;23:16-26.
19. Mourani PM, Mullen M, Abman SH. Pulmonary hypertension in bronchopulmonary dysplasia. *Prog Pediatr Cardiol*. 2009;27(1):43-8.
20. Khemani E, McElhinney DB, Rhein L, Andrade O, Lacro RV, Thomas KC, et al. Pulmonary Artery Hypertension in Formerly Premature Infants With Bronchopulmonary Dysplasia: Clinical Features and Outcomes in the Surfactant Era. *Pediatrics*. 2007;120(6):1260-9.
21. Dasgupta A, Bowman L, D'Arsigny C, Archer S. Soluble Guanylate Cyclase: A New Therapeutic Target for Pulmonary Arterial Hypertension and Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Clin Pharmacol Ther*. 2015;97(1):88-102.
22. Berkelhamer SK, Mestan KK, Steinhorn RH. Pulmonary hypertension in bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol*. 2013;37(2):124-31.
23. Dumas de la Roque E, Storme L, Mauriat P, Bonnet S. Hypertension pulmonaire de l'enfant et du nouveau-né en réanimation. Partie II : diagnostic et traitement. *Arch Pédiatrie*. 2011;18(2):195-203.
24. Abman SH, Hansmann G, Archer SL, Ivy DD, Adatia I, Chung WK, et al. Pediatric Pulmonary Hypertension: Guidelines From the American Heart Association and American Thoracic Society. *Circulation*. 2015;132(21):2037-99.
25. Mourani PM, Sontag MK, Younoszai A, Ivy DD, Abman SH. Clinical Utility of Echocardiography for the Diagnosis and Management of Pulmonary Vascular Disease in Young Children With Chronic Lung Disease. *Pediatrics*. 2008;121(2):317-25.
26. Stocks J, Hislop A, Sonnappa S. Early lung development: lifelong effect on respiratory health and disease. *Lancet Respir Med*. 2013;1(9):728-42.
27. Baraldi E, Filippone M. Chronic Lung Disease after Premature Birth. *N Engl J Med*. 2007;357(19):1946-55.
28. Baraldi E, Carraro S, Filippone M. Bronchopulmonary dysplasia: Definitions and long-term respiratory outcome. *Early Hum Dev*. 2009;85(10, Supplement):S1-3.
29. Kotecha SJ, Edwards MO, Watkins WJ, Henderson AJ, Paranjothy S, Dunstan FD, et al. Effect of preterm birth on later FEV1: a systematic review and meta-analysis. *Thorax*. 2013;68(8):760-6.
30. Fawke J, Lum S, Kirkby J, Hennessy E, Marlow N, Rowell V, et al. Lung Function and Respiratory Symptoms at 11 Years in Children Born Extremely Preterm. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(2):237-45.

31. Martinez FD. Early-Life Origins of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med*. 2016;375(9):871-8.
32. Sonnenschein-van der Voort AMM, Arends LR, de Jongste JC, Annesi-Maesano I, Arshad SH, Barros H, et al. Preterm birth, infant weight gain, and childhood asthma risk: A meta-analysis of 147,000 European children. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(5):1317-29.
33. Renard M-E, Truffert P. Pronostic respiratoire clinique à 5 ans du grand prématuré. Cohorte EPIPAGE. *Arch Pédiatrie*. 2008;15(5):592-4.
34. Lamarche-Vadel A, Blondel B, Truffert P, Burguet A, Cambonie G, Selton D, et al. Re-hospitalization in infants younger than 29 weeks' gestation in the EPIPAGE cohort. *Acta Pædiatrica*. 2004;93(10):1340-5.
35. Silva DMG, Nardiello C, Pozarska A, Morty RE. Recent advances in the mechanisms of lung alveolarization and the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. 2015;309(11):L1239-72.
36. Davidson LM, Berkelhamer SK. Bronchopulmonary Dysplasia: Chronic Lung Disease of Infancy and Long-Term Pulmonary Outcomes. *J Clin Med*. 2017;6(1):4.
37. Karila C, Saulnier J-P, Elie C, Taupin P, Scheinmann P, Le Bourgeois M, et al. Hypoventilation alvéolaire à l'exercice chez des enfants avec dysplasie bronchopulmonaire. *Rev Mal Respir*. 2008;25(3):303-12.
38. Short EJ, Klein NK, Lewis BA, Fulton S, Eisengart S, Kerckmar C, et al. Cognitive and Academic Consequences of Bronchopulmonary Dysplasia and Very Low Birth Weight: 8-Year-Old Outcomes. *Pediatrics*. 2003;112(5):e359-e359.
39. Nakanishi H, Uchiyama A, Kusuda S. Impact of pulmonary hypertension on neurodevelopmental outcome in preterm infants with bronchopulmonary dysplasia: a cohort study. *J Perinatol*. 2016;36(10):890.
40. Trittman JK, Nelin LD, Klebanoff MA. Bronchopulmonary dysplasia and neurodevelopmental outcome in extremely preterm neonates. *Eur J Pediatr*. 2013;172(9):1173-80.
41. Doyle LW, Cheong JL, Ehrenkranz RA, Halliday HL. Early (< 8 days) systemic postnatal corticosteroids for prevention of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2017,10:CD001146.
42. Rojas-Reyes MX, Morley CJ, Soll R. Prophylactic versus selective use of surfactant in preventing morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2012;3:CD000510.
43. Seger N, Soll R. Animal derived surfactant extract for treatment of respiratory distress syndrome. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2009;2:CD007836.
44. Isayama T, Iwami H, McDonald S, Beyene J. Association of Noninvasive Ventilation Strategies With Mortality and Bronchopulmonary Dysplasia Among Preterm Infants: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*. 2016;316(6):611-24.
45. Sweet DG, Carnielli V, Greisen G, Hallman M, Ozek E, Plavka R, et al. European Consensus Guidelines on the Management of Neonatal Respiratory Distress Syndrome in Preterm Infants - 2013 Update. *Neonatology*. 2013;103(4):353-68.
46. Committee on Fetus and Newborn. Respiratory Support in Preterm Infants at Birth. *Pediatrics*. 2014;133(1):171-4.

47. Keszler M. Mechanical ventilation strategies. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2017;22(4):267-74.
48. SUPPORT Study Group of the Eunice Kennedy Shriver NICHD Neonatal Research Network. Early CPAP versus Surfactant in Extremely Preterm Infants. *N Engl J Med.* 2010;362(21):1970-9.
49. Bhandari V. The potential of non-invasive ventilation to decrease BPD. *Semin Perinatol.* 2013;37(2):108-14.
50. Kirpalani H, Millar D, Lemyre B, Yoder BA, Chiu A, Roberts RS. A Trial Comparing Noninvasive Ventilation Strategies in Preterm Infants. *N Engl J Med.* 2013;369(7):611-20.
51. Abman SH, Collaco JM, Shepherd EG, Keszler M, Cuevas-Guaman M, Welty SE, et al. Interdisciplinary Care of Children with Severe Bronchopulmonary Dysplasia. *J Pediatr.* 2017;181:12-28.e1.
52. Greenough A. Synchronized mechanical ventilation for respiratory support in newborn infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2016;9: CD000456.
53. Lopez E, Jarreau PH. Les différents modes de ventilation : quelles évidences ? In: *Néonatalogie : bases scientifiques*, Paris, Elsevier Masson, 2016, pp. 137-147.
54. Klingenberg C, Wheeler KI, McCallion N, Morley CJ, Davis PG. Volume-targeted versus pressure-limited ventilation in neonates. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2017,10:CD003666.
55. Cools F, Offringa M, Askie LM. Elective high frequency oscillatory ventilation versus conventional ventilation for acute pulmonary dysfunction in preterm infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2015,3:CD000104.
56. Stein H, Alosch H, Ethington P, White DB. Prospective crossover comparison between NAVA and pressure control ventilation in premature neonates less than 1500 grams. *J Perinatol.* 2013;33(6):452.
57. Lee J, Kim H-S, Sohn JA, Lee JA, Choi CW, Kim E-K, et al. Randomized Crossover Study of Neurally Adjusted Ventilatory Assist in Preterm Infants. *J Pediatr.* 2012;161(5):808-813.e2.
58. Rossor TE, Hunt KA, Shetty S, Greenough A. Neurally adjusted ventilatory assist compared to other forms of triggered ventilation for neonatal respiratory support. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2017,6:CD012251.
59. Kraybill EN, Runyan DK, Bose CL, Khan JH. Risk factors for chronic lung disease in infants with birth weights of 751 to 1000 grams. *J Pediatr.* 1989;115(1):115-20.
60. Garland JS, Buck RK, Allred EN, Leviton A. Hypocarbica Before Surfactant Therapy Appears to Increase Bronchopulmonary Dysplasia Risk in Infants With Respiratory Distress Syndrome. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 1995;149(6):617-22.
61. Graziani LJ, Spitzer AR, Mitchell DG, Merton DA, Stanley C, Robinson N, et al. Mechanical Ventilation in Preterm Infants: Neurosonographic and Developmental Studies. *Pediatrics.* 1992;90(4):515-22.
62. Fujimoto S, Togari H, Yamaguchi N, Mizutani F, Suzuki S, Sobajima H. Hypocarbica and cystic periventricular leukomalacia in premature infants. *Arch Dis Child.* 1994;71(2):F107-110.

63. Woodgate PG, Davies MW. Permissive hypercapnia for the prevention of morbidity and mortality in mechanically ventilated newborn infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2001,2:CD002061.
64. Thome UH, Genzel-Boroviczeny O, Bohnhorst B, Schmid M, Fuchs H, Rohde O, et al. Permissive hypercapnia in extremely low birthweight infants (PHELBI): a randomised controlled multicentre trial. *Lancet Respir Med*. 2015;3(7):534-43.
65. Thome UH, Genzel-Boroviczeny O, Bohnhorst B, Schmid M, Fuchs H, Rohde O, et al. Neurodevelopmental outcomes of extremely low birthweight infants randomised to different PCO₂ targets: the PHELBI follow-up study. *Arch Dis Child - Fetal Neonatal Ed*. 2017;102(5):F376-82.
66. Saugstad OD, Aune D. Optimal Oxygenation of Extremely Low Birth Weight Infants: A Meta-Analysis and Systematic Review of the Oxygen Saturation Target Studies. *Neonatology*. 2014;105(1):55-63.
67. Askie LM, Darlow BA, Davis PG, Finer N, Stenson B, Vento M, et al. Effects of targeting lower versus higher arterial oxygen saturations on death or disability in preterm infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2017,4:CD011190.
68. Pérez Tarazona S, Rueda Esteban S, Alfonso Diego J, Barrio Gómez de Agüero MI, Callejón Callejón A, Cortell Aznar I, et al. Guidelines for the follow up of patients with bronchopulmonary dysplasia. *An Pediatr a Engl Ed*. 2016;84(1):61.e1-61.e9.
69. Ma L, Zhou P, Neu J, Lin H-C. Potential Nutrients for Preventing or Treating Bronchopulmonary Dysplasia. *Paediatr Respir Rev*. 2017;22:83-8.
70. Wedgwood S, Warford C, Agvateesiri SC, Thai P, Berkelhamer SK, Perez M, et al. Postnatal growth restriction augments oxygen-induced pulmonary hypertension in a neonatal rat model of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Res*. 2016;80(6):894-902.
71. Mataloun MMGB, Rebello CM, Mascaretti RS, Dohnnikoff M, Leone CR. Pulmonary responses to nutritional restriction and hyperoxia in premature rabbits. *J Pediatr (Rio J)*. 2006;82(3):179-85.
72. Zana-Taïeb E., Butruille L., Franco-Montoya ML, Lopez E., Vernier F., Grandvuillemin I., et al. Effect of two models of intrauterine growth restriction on alveolarization in rat lungs : morphometric and gene expression analysis. *PLoS ONE*. 2013;8(11).
73. Ma L, Li N, Liu X, Shaw L, Li Calzi S, Grant MB, et al. Arginyl-glutamine dipeptide or docosahexaenoic acid attenuate hyperoxia-induced lung injury in neonatal mice. *Nutrition*. 2012;28(11):1186-91.
74. Rogers LK, Valentine CJ, Pennell M, Velten M, Britt RD, Dingess K, et al. Maternal Docosahexaenoic Acid Supplementation Decreases Lung Inflammation in Hyperoxia-Exposed Newborn Mice. *J Nutr*. 2011;141(2):214-22.
75. Zhang P, Lavoie PM, Lacaze-Masmonteil T, Rhainds M, Marc I. Omega-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids for Extremely Preterm Infants: A Systematic Review. *Pediatrics*. 2014;134(1):120-34.
76. Collins CT, Makrides M, McPhee AJ, Sullivan TR, Davis PG, Thio M, et al. Docosahexaenoic Acid and Bronchopulmonary Dysplasia in Preterm Infants. *N Engl J Med*. 2017;376(13):1245-55.

77. Maternal Omega-3 Supplementation to Reduce Bronchopulmonary Dysplasia - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cité 29 déc 2017]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02371460>
78. Barrington KJ, Fortin-Pellerin E, Pennaforte T. Fluid restriction for treatment of preterm infants with chronic lung disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2017,2:CD005389.
79. Clyman RI. The role of patent ductus arteriosus and its treatments in the development of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol.* 2013;37(2):102-7.
80. McCurnin D, Seidner S, Chang L-Y, Waleh N, Ikegami M, Petershack J, et al. Ibuprofen-Induced Patent Ductus Arteriosus Closure: Physiologic, Histologic, and Biochemical Effects on the Premature Lung. *Pediatrics.* 2008;121(5):945-56.
81. Waleh N, McCurnin DC, Yoder BA, Shaul PW, Clyman RI. Patent Ductus Arteriosus Ligation Alters Pulmonary Gene Expression in Preterm Baboons. *Pediatr Res.* 2011;69(3):212.
82. Roberts D, Brown J, Medley N, Dalziel SR. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2017, 3:CD004454.
83. Sotiriadis A, Tsiami A, Papatheodorou S, Baschat AA, Sarafidis K, Makrydimas G. Neurodevelopmental Outcome After a Single Course of Antenatal Steroids in Children Born Preterm: A Systematic Review and Meta-analysis. *Obstet Gynecol.* 2015;125(6):1385-96.
84. Baud O, Trousson C, Biran V, Leroy E, Mohamed D, Alberti C. Association Between Early Low-Dose Hydrocortisone Therapy in Extremely Preterm Neonates and Neurodevelopmental Outcomes at 2 Years of Age. *JAMA.* 2017;317(13):1329-37.
85. Watterberg KL, Scott SM, Backstrom C, Gifford KL, Cook KL. Links Between Early Adrenal Function and Respiratory Outcome in Preterm Infants: Airway Inflammation and Patent Ductus Arteriosus. *Pediatrics.* 2000;105(2):320-4.
86. Shah VS, Ohlsson A, Halliday HL, Dunn M. Early administration of inhaled corticosteroids for preventing chronic lung disease in very low birth weight preterm neonates. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2017,1:CD001969.
87. Shah SS, Ohlsson A, Halliday HL, Shah VS. Inhaled versus systemic corticosteroids for preventing bronchopulmonary dysplasia in ventilated very low birth weight preterm neonates. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2017,10: CD002058.
88. Shah SS, Ohlsson A, Halliday HL, Shah VS. Inhaled versus systemic corticosteroids for the treatment of bronchopulmonary dysplasia in ventilated very low birth weight preterm infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2017,10:CD002057.
89. Baud O, Maury L, Lebail F, Ramful D, El Moussawi F, Nicaise C, et al. Effect of early low-dose hydrocortisone on survival without bronchopulmonary dysplasia in extremely preterm infants (PREMILOC): a double-blind, placebo-controlled, multicentre, randomised trial. *The Lancet.* 2016;387(10030):1827-36.
90. Doyle LW, Cheong JL, Ehrenkranz RA, Halliday HL. Late (> 7 days) systemic postnatal corticosteroids for prevention of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2017,10:CD001145.
91. Onland W, Offringa M, Cools F, De Jaegere AP, Rademaker K, Blom H, et al. Systemic hydrocortisone to prevent bronchopulmonary dysplasia in preterm infants (the STOP-BPD study); a multicenter randomized placebo controlled trial. *BMC Pediatr.* 2011;11:102.

92. NICHD Neonatal Research Network. Hydrocortisone for BPD - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cité 19 janv 2018]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01353313>
93. Venkataraman R, Kamaluddeen M, Hasan SU, Robertson HL, Lodha A. Intratracheal Administration of Budesonide-Surfactant in Prevention of Bronchopulmonary Dysplasia in Very Low Birth Weight Infants: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pediatr Pulmonol*. 2017;52(7):968-75.
94. Fajardo C, Levin D, Garcia M, Abrams D, Adamson I. Surfactant *versus* Saline as a Vehicle for Corticosteroid Delivery to the Lungs of Ventilated Rabbits. *Pediatr Res*. 1998;43(4):542.
95. Li L, Yang C, Feng X, Du Y, Zhang Z, Zhang Y. Effects of intratracheal budesonide during early postnatal life on lung maturity of premature fetal rabbits. *Pediatr Pulmonol*. 2018;53(1):28-35.
96. Ng G, da Silva O, Ohlsson A. Bronchodilators for the prevention and treatment of chronic lung disease in preterm infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2016,12:CD003214.
97. MacRitchie AN, Albertine KH, Sun J, Lei PS, Jensen SC, Freestone AA, et al. Reduced endothelial nitric oxide synthase in lungs of chronically ventilated preterm lambs. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. 2001;281(4):L1011-20.
98. Abman SH. Impaired Vascular Endothelial Growth Factor Signaling in the Pathogenesis of Neonatal Pulmonary Vascular Disease. In: *Membrane Receptors, Channels and Transporters in Pulmonary Circulation*. Humana Press, Totowa, NJ; 2010. pp. 323-35.
99. Han RNN, Babaei S, Robb M, Lee T, Ridsdale R, Ackerley C, et al. Defective Lung Vascular Development and Fatal Respiratory Distress in Endothelial NO Synthase-Deficient Mice: A Model of Alveolar Capillary Dysplasia? *Circ Res*. 2004;94(8):1115-23.
100. Tang J-R, Markham NE, Lin Y-J, McMurtry IF, Maxey A, Kinsella JP, et al. Inhaled nitric oxide attenuates pulmonary hypertension and improves lung growth in infant rats after neonatal treatment with a VEGF receptor inhibitor. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2004;287(2):L344-51.
101. Lin Y-J, Markham NE, Balasubramaniam V, Tang J-R, Maxey A, Kinsella JP, et al. Inhaled Nitric Oxide Enhances Distal Lung Growth after Exposure to Hyperoxia in Neonatal Rats. *Pediatr Res*. 2005;58(1):22-9.
102. Afshar S, Gibson LL, Yuhanna IS, Sherman TS, Kerecman JD, Grubb PH, et al. Pulmonary NO synthase expression is attenuated in a fetal baboon model of chronic lung disease. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. 2003;284(5):L749-58.
103. Barrington KJ, Finer N, Pennaforte T. Inhaled nitric oxide for respiratory failure in preterm infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2017,1:CD000509.
104. Henderson-Smart DJ, De Paoli AG. Prophylactic methylxanthine for prevention of apnoea in preterm infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2010,12:CD000432.
105. Schmidt B, Roberts RS, Davis P, Doyle LW, Barrington KJ, Ohlsson A, et al. Caffeine Therapy for Apnea of Prematurity. *N Engl J Med*. 2006;354(20):2112-21.
106. Schmidt B, Roberts RS, Davis P, Doyle LW, Barrington KJ, Ohlsson A, et al. Long-Term Effects of Caffeine Therapy for Apnea of Prematurity. *N Engl J Med*. 2007;357(19):1893-902.

107. Brion LP, Primhak RA, Ambrosio-Perez I. Diuretics acting on the distal renal tubule for preterm infants with (or developing) chronic lung disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2002,9:CD001817.
108. Viscardi RM, Kallapur SG. Role of Ureaplasma Respiratory Tract Colonization in Bronchopulmonary Dysplasia Pathogenesis: Current Concepts and Update. *Clin Perinatol.* 2015;42(4):719-38.
109. Lowe J, Watkins WJ, Edwards MO, Spiller OB, Jacqz-aigrain E, Kotecha SJ, et al. Association Between Pulmonary : Ureaplasma Colonization and Bronchopulmonary Dysplasia in Preterm Infants: Updated Systematic Review and Meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J.* 2014;33(7):697-702.
110. Mabanta CG, Pryhuber GS, Weinberg GA, Phelps D. Erythromycin for the prevention of chronic lung disease in intubated preterm infants at risk for, or colonized or infected with Ureaplasma urealyticum. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2003,4:CD003744.
111. Aghai ZH, Kode A, Saslow JG, Nakhla T, Farhath S, Stahl GE, et al. Azithromycin Suppresses Activation of Nuclear Factor-kappa B and Synthesis of Pro-inflammatory Cytokines in Tracheal Aspirate Cells From Premature Infants. *Pediatr Res.* 2007;62(4):483.
112. Howard P. Azithromycin-induced proarrhythmia and cardiovascular death. *Ann Pharmacother.* 2013;47(11):1547-51.
113. Nair V, Loganathan P, Soraisham AS. Azithromycin and Other Macrolides for Prevention of Bronchopulmonary Dysplasia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neonatology.* 2014;106(4):337-47.
114. Smith C, Egunsola O, Choonara I, Kotecha S, Jacqz-Aigrain E, Sammons H. Use and safety of azithromycin in neonates: a systematic review. *BMJ Open.* 2015;5(12):e008194.
115. Ballard HO, Shook LA, Bernard P, Anstead MI, Kuhn R, Whitehead V, et al. Use of azithromycin for the prevention of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants: a randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Pediatr Pulmonol.* 2011;46(2):111-8.
116. Ballard HO, Anstead MI, Shook LA. Azithromycin in the extremely low birth weight infant for the prevention of Bronchopulmonary Dysplasia: a pilot study. *Respir Res.* 2007;8:41.
117. Gharehbaghi M.M., Peirovifar A., Ghojazadeh M., Mahallei M. Efficacy of azithromycin for prevention of bronchopulmonary dysplasia (BDP). *Turk J Med Sci.* 2012;42(6):1070-5.
118. Ozdemir R, Erdevi O, Dizdar EA, Oguz SS, Uras N, Saygan S, et al. Clarithromycin in Preventing Bronchopulmonary Dysplasia in Ureaplasma urealyticum-Positive Preterm Infants. *Pediatrics.* 2011;128(6):e1496-501.
119. calendrier_vaccinations_2017.pdf [Internet]. [cité 28 janv 2018]. Disponible sur: https://www.mesvaccins.net/textes/calendrier_vaccinations_2017.pdf
120. Tyson JE, Wright LL, Oh W, Kennedy KA, Mele L, Ehrenkranz RA, et al. Vitamin A Supplementation for Extremely-Low-Birth-Weight Infants. *N Engl J Med.* 1999;340(25):1962-8.
121. Agostoni C, Buonocore G, Carnielli V, Curtis MD, Darmaun D, Decsi T, et al. Enteral Nutrient Supply for Preterm Infants: Commentary From the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010;50(1):85-91.

122. Darlow BA, Graham PJ, Rojas-Reyes MX. Vitamin A supplementation to prevent mortality and short- and long-term morbidity in very low birth weight infants. Cochrane Database of Systematic Reviews 2016,8:CD000501.
123. Meyer S, Kronfeld K, Gräber S, Butzer R, Wahl H, Gortner L. Vitamin A to prevent bronchopulmonary dysplasia: The NeoVitaA Trial. J Matern Fetal Neonatal Med. 2013;26(5):544-5.
124. Phelps DL, Ward RM, Williams RL, Nolen TL, Watterberg KL, Oh W, et al. Safety and pharmacokinetics of multiple dose *myo*-inositol in preterm infants. Pediatr Res. 2016;80(2):209.
125. Hallman M, Bry K, Hoppu K, Lappi M, Pohjavuori M. Inositol Supplementation in Premature Infants with Respiratory Distress Syndrome. N Engl J Med. 1992;326(19):1233-9.
126. Howlett A, Ohlsson A, Plakkal N. Inositol in preterm infants at risk for or having respiratory distress syndrome. Cochrane Database of Systematic Reviews 2015,2:CD000366.
127. Inositol to Reduce Retinopathy of Prematurity - NCT01954082 [Internet]. ClinicalTrials.gov. [cité 27 janv 2018]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01954082>
128. Morton RL, Das KC, Guo X-L, Iklé DN, White CW. Effect of oxygen on lung superoxide dismutase activities in premature baboons with bronchopulmonary dysplasia. Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol. 1999;276(1):L64-74.
129. Poonyagariyagorn HK, Metzger S, Dikeman D, Mercado AL, Malinina A, Calvi C, et al. Superoxide Dismutase 3 Dysregulation in a Murine Model of Neonatal Lung Injury. Am J Respir Cell Mol Biol. 2014;51(3):380-90.
130. Rosenfeld WN, Davis JM, Parton L, Richter SE, Price A, Flaster E, et al. Safety and Pharmacokinetics of Recombinant Human Superoxide Dismutase Administered Intratracheally to Premature Neonates With Respiratory Distress Syndrome. Pediatrics. 1996;97(6):811-7.
131. Davis JM. Superoxide Dismutase: A Role in the Prevention of Chronic Lung Disease. Biol Neonate. 1998;74(Suppl. 1):29-34.
132. Suresh G, Davis JM, Soll R. Superoxide dismutase for preventing chronic lung disease in mechanically ventilated preterm infants. Cochrane Database of Systematic Reviews 2001,1:CD001968.
133. Langley SC, Kelly FJ. N-acetylcysteine ameliorates hyperoxic lung injury in the preterm guinea pig. Biochem Pharmacol. 1993;45(4):841-6.
134. Soghier LM, Brion LP. Cysteine, cystine or N-acetylcysteine supplementation in parenterally fed neonates. Cochrane Database of Systematic Reviews 2006,4:CD004869.
135. Darlow BA, Austin N. Selenium supplementation to prevent short-term morbidity in preterm neonates. Cochrane Database of Systematic Reviews 2003,4:CD003312.
136. Brion LP, Bell EF, Raghuveer TS. Vitamin E supplementation for prevention of morbidity and mortality in preterm infants. Cochrane Database of Systematic Reviews 2003,4:CD003665.
137. Manzoni P, Guardione R, Bonetti P, Priolo C, Maestri A, Mansoldo C, et al. Lutein and Zeaxanthin Supplementation in Preterm Very Low-Birth-Weight Neonates in Neonatal Intensive Care Units: A Multicenter Randomized Controlled Trial. Am J Perinatol. 2013;30(01):025-32.

138. Distefano G, Sciacca P. Molecular physiopathogenetic mechanisms and development of new potential therapeutic strategies in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Ital J Pediatr.* 2015;41(1):6.
139. Balasubramaniam V, Mervis CF, Maxey AM, Markham NE, Abman SH. Hyperoxia reduces bone marrow, circulating, and lung endothelial progenitor cells in the developing lung: implications for the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol.* 2007;292(5):L1073-84.
140. Baker CD, Balasubramaniam V, Mourani PM, Sontag MK, Black CP, Ryan SL, et al. Cord blood angiogenic progenitor cells are decreased in bronchopulmonary dysplasia. *Eur Respir J.* 2012;40(6):1516-22.
141. Balasubramaniam V, Ryan SL, Seedorf GJ, Roth EV, Heumann TR, Yoder MC, et al. Bone marrow-derived angiogenic cells restore lung alveolar and vascular structure after neonatal hyperoxia in infant mice. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol.* 2009;298(3):L315-23.
142. van Haaften T, Byrne R, Bonnet S, Rochefort GY, Akabutu J, Bouchentouf M, et al. Airway Delivery of Mesenchymal Stem Cells Prevents Arrested Alveolar Growth in Neonatal Lung Injury in Rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180(11):1131-42.
143. Aslam M, Baveja R, Liang OD, Fernandez-Gonzalez A, Lee C, Mitsialis SA, et al. Bone Marrow Stromal Cells Attenuate Lung Injury in a Murine Model of Neonatal Chronic Lung Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180(11):1122-30.
144. Chang YS, Ahn SY, Yoo HS, Sung SI, Choi SJ, Oh WI, et al. Mesenchymal Stem Cells for Bronchopulmonary Dysplasia: Phase 1 Dose-Escalation Clinical Trial. *J Pediatr.* 2014;164(5):966-972.e6.
145. Ahn SY, Chang YS, Kim JH, Sung SI, Park WS. Two-Year Follow-Up Outcomes of Premature Infants Enrolled in the Phase I Trial of Mesenchymal Stem Cells Transplantation for Bronchopulmonary Dysplasia. *J Pediatr.* 2017;185:49-54.e2.
146. Augustine S, Avey MT, Harrison B, Locke T, Ghannad M, Moher D, et al. Mesenchymal Stromal Cell Therapy in Bronchopulmonary Dysplasia: Systematic Review and Meta-Analysis of Preclinical Studies. *STEM CELLS Transl Med.* 2017;6(12):2079-93.
147. Fung ME, Thébaud B. Stem cell-based therapy for neonatal lung disease: it is in the juice. *Pediatr Res.* 2013;75(1-1):2.
148. Mueller M, Kramer BW. Stem cells and Bronchopulmonary Dysplasia - The five questions: Which cells, when, in which dose, to which patients via which route? *Paediatr Respir Rev.* 2017;24:54-9.
149. Meau-Petit V, Thouvenin G, Guillemot-Lambert N, Champion V, Tillous-Borde I, Flamein F, et al. Hypertension artérielle pulmonaire des anciens grands prématurés bronchodysplasiques. *Arch Pédiatrie.* 2013;20(1):44-53.
150. Kaestner M, Schranz D, Warnecke G, Apitz C, Hansmann G, Miera O. Pulmonary hypertension in the intensive care unit. Expert consensus statement on the diagnosis and treatment of paediatric pulmonary hypertension. The European Paediatric Pulmonary Vascular Disease Network, endorsed by ISHLT and DGPK. *Heart.* 2016;102(Suppl 2):ii57-ii66.
151. Hansmann G, Apitz C, Abdul-Khaliq H, Alastalo T-P, Beerbaum P, Bonnet D, et al. Executive summary. Expert consensus statement on the diagnosis and treatment of paediatric pulmonary hypertension. The European Paediatric Pulmonary Vascular Disease Network, endorsed by ISHLT and DGPK. *Heart.* 2016;102(Suppl 2):ii86-ii100.

152. Mourani PM, Sontag MK, Ivy DD, Abman SH. Effects of Long-Term Sildenafil Treatment for Pulmonary Hypertension in Infants with Chronic Lung Disease. *J Pediatr*. 2009;154(3):379-384.e2.
153. Nyp M, Sandritter T, Poppinga N, Simon C, Truog WE. Sildenafil citrate, bronchopulmonary dysplasia and disordered pulmonary gas exchange: any benefits? *J Perinatol*. 2012;32(1):64.
154. Barst RJ, Beghetti M, Pulido T, Layton G, Konourina I, Zhang M, et al. STARTS-2CLINICAL PERSPECTIVE: Long-Term Survival With Oral Sildenafil Monotherapy in Treatment-Naive Pediatric Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation*. 2014;129(19):1914-23.
155. Research C for DE and. Drug Safety and Availability - FDA Drug Safety Communication: FDA recommends against use of Revatio (sildenafil) in children with pulmonary hypertension [Internet]. [cité 26 févr 2018]. Disponible sur: <https://www.fda.gov/drugs/drugsafety/ucm317123.htm>
156. Revatio® (sildénafil) : Communication sur l'augmentation du taux de mortalité lors son utilisation en pédiatrie à des doses supérieures aux doses recommandées dans le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) - Lettre aux professionnels de - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [cité 26 févr 2018]. Disponible sur: <http://www.ansm.sante.fr/S-informer/Informations-de-securite-Lettres-aux-professionnels-de-sante/Revatio-R-sildenafil-Communication-sur-l-augmentation-du-taux-de-mortalite-lors-son-utilisation-en-pediatrie-a-des-doses-superieures-aux-doses-recommandees-dans-le-traitement-de-l-hypertension-arterielle-pulmonaire-HTAP-Lettre-aux-professionnels-de-sante>
157. Mourani PM, Ivy DD, Gao D, Abman SH. Pulmonary Vascular Effects of Inhaled Nitric Oxide and Oxygen Tension in Bronchopulmonary Dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(9):1006-13.
158. Hansmann G, Fernandez-Gonzalez A, Aslam M, Vitali SH, Martin T, Mitsialis SA, et al. Mesenchymal Stem Cell-Mediated Reversal of Bronchopulmonary Dysplasia and Associated Pulmonary Hypertension. *Pulm Circ*. 2012;2(2):170-81.
159. Nardiello C, Mižiková I, Morty RE. Looking ahead: where to next for animal models of bronchopulmonary dysplasia? *Cell Tissue Res*. 2017;367(3):457-68.
160. Porzionato A, Sfriso MM, Mazzatenta A, Macchi V, De Caro R, Di Giulio C. Effects of hyperoxic exposure on signal transduction pathways in the lung. *Respir Physiol Neurobiol*. 2015;209:106-14.
161. Asikainen TM, Chang L-Y, Coalson JJ, Schneider BK, Waleh NS, Ikegami M, et al. Improved lung growth and function through hypoxia-inducible factor in primate chronic lung disease of prematurity. *FASEB J*. 2006;20(10):1698-700.
162. Vadivel A, Alphonse RS, Etches N, van Haaften T, Collins JJP, O'Reilly M, et al. Hypoxia-Inducible Factors Promote Alveolar Development and Regeneration. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013;50(1):96-105.
163. Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest*. 1998;101(4):731-6.
164. Fernandez-Gonzalez A, Mitsialis SA, Liu X, Kourembanas S. Vasculoprotective effects of heme oxygenase-1 in a murine model of hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2012;302(8):L775-84.

165. Dennerly PA. Heme Oxygenase in Neonatal Lung Injury and Repair. *Antioxid Redox Signal*. 2014;21(13):1881-92.
166. Yang G, Biswasa C, Lin QS, La P, Namba F, Zhuang T, et al. Heme oxygenase-1 regulates postnatal lung repair after hyperoxia: Role of β -catenin/hnRNPK signaling. *Redox Biol*. 2013;1(1):234-43.
167. Grover TR, Asikainen TM, Kinsella JP, Abman SH, White CW. Hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α are decreased in an experimental model of severe respiratory distress syndrome in preterm lambs. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2007;292(6):L1345-51.
168. Shifren JL, Doldi N, Ferrara N, Mesiano S, Jaffe RB. In the human fetus, vascular endothelial growth factor is expressed in epithelial cells and myocytes, but not vascular endothelium: implications for mode of action. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;79(1):316-22.
169. Cras TDL, Markham NE, Tuder RM, Voelkel NF, Abman SH. Treatment of newborn rats with a VEGF receptor inhibitor causes pulmonary hypertension and abnormal lung structure. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2002;283(3):L555-62.
170. Thébaud B, Ladha F, Michelakis ED, Sawicka M, Thurston G, Eaton F, et al. Vascular Endothelial Growth Factor Gene Therapy Increases Survival, Promotes Lung Angiogenesis, and Prevents Alveolar Damage in Hyperoxia-Induced Lung Injury: Evidence That Angiogenesis Participates in Alveolarization. *Circulation*. 2005;112(16):2477-86.
171. Cras TDL, Spitzmiller RE, Albertine KH, Greenberg JM, Whitsett JA, Akeson AL. VEGF causes pulmonary hemorrhage, hemosiderosis, and air space enlargement in neonatal mice. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2004;287(1):L134-42.
172. Abman SH, Shanley PF, Accurso FJ. Failure of postnatal adaptation of the pulmonary circulation after chronic intrauterine pulmonary hypertension in fetal lambs. *J Clin Invest*. 1989;83(6):1849-58.
173. Grover TR, Parker TA, Balasubramaniam V, Markham NE, Abman SH. Pulmonary hypertension impairs alveolarization and reduces lung growth in the ovine fetus. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. 2005;288(4):L648-54.
174. Roque ED de la, Smeralda G, Quignard J-F, Freund-Michel V, Courtois A, Marthan R, et al. Altered vasoreactivity in neonatal rats with pulmonary hypertension associated with bronchopulmonary dysplasia: Implication of both eNOS phosphorylation and calcium signaling. *PLOS ONE*. 2017;12(2):e0173044.
175. Kuhr FK, Smith KA, Song MY, Levitan I, Yuan JX-J. New mechanisms of pulmonary arterial hypertension: role of Ca²⁺ signaling. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol*. 2012;302(8):H1546-62.
176. Yu X, Tao W, Jiang F, Li C, Lin J, Liu C. Celastrol Attenuates Hypertension-Induced Inflammation and Oxidative Stress in Vascular Smooth Muscle Cells via Induction of Heme Oxygenase-1. *Am J Hypertens*. 2010;23(8):895-903.
177. Han X, Sun S, Zhao M, Cheng X, Chen G, Lin S, et al. Celastrol Stimulates Hypoxia-Inducible Factor-1 Activity in Tumor Cells by Initiating the ROS/Akt/p70S6K Signaling Pathway and Enhancing Hypoxia-Inducible Factor-1 α Protein Synthesis. *PLOS ONE*. 2014;9(11):e112470.
178. Pinna GF, Fiorucci M, Reimund J-M, Taquet N, Arondel Y, Muller CD. Celastrol inhibits pro-inflammatory cytokine secretion in Crohn's disease biopsies. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;322(3):778-86.

179. Li H, Zhang Y-Y, Tan H-W, Jia Y-F, Li D. Therapeutic effect of tripterine on adjuvant arthritis in rats. *J Ethnopharmacol.* 2008;118(3):479-84.
180. Li H, Jia YF, Pan Y, Pan DJ, Li D, Zhang LX. Effect of tripterine on collagen-induced arthritis in rats. *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* 1997;18(3):270-3.
181. Kannaiyan R, Shanmugam MK, Sethi G. Molecular targets of celastrol derived from Thunder of God Vine: Potential role in the treatment of inflammatory disorders and cancer. *Cancer Lett.* 2011;303(1):9-20.
182. Seo WY, Ju SM, Song HY, Goh AR, Jun J-G, Kang Y-H, et al. Celastrol suppresses IFN-gamma-induced ICAM-1 expression and subsequent monocyte adhesiveness via the induction of heme oxygenase-1 in the HaCaT cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;398(1):140-5.
183. Liu J, Lee J, Salazar Hernandez MA, Mazitschek R, Ozcan U. Treatment of Obesity with Celastrol. *Cell.* 2015;161(5):999-1011.
184. *Sondes_calciques_synthetiques.pdf* [Internet]. [cité 11 févr 2018]. Disponible sur: https://www.arpege.cnrs.fr/wp-content/uploads/2016/01/Sondes_calciques_synthetiques.pdf
185. Huang Y, Zhou Y, Fan Y, Zhou D. Celastrol inhibits the growth of human glioma xenografts in nude mice through suppressing VEGFR expression. *Cancer Lett.* 2008;264(1):101-6.
186. Pang X, Yi Z, Zhang J, Lu B, Sung B, Qu W, et al. Celastrol Suppresses Angiogenesis-Mediated Tumor Growth through Inhibition of AKT/Mammalian Target of Rapamycin Pathway. *Cancer Res.* 2010;70(5):1951-9.
187. Ma J, Ma J, Han LZ, Han LZ, Liang H, Liang H, et al. Celastrol inhibits the HIF-1 α pathway by inhibition of mTOR/p70S6K/eIF4E and ERK1/2 phosphorylation in human hepatoma cells. *Oncol Rep.* 2014;32(1):235-42.
188. Huang S, Tang Y, Cai X, Peng X, Liu X, Zhang L, et al. Celastrol inhibits vasculogenesis by suppressing the VEGF-induced functional activity of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;423(3):467-72.
189. Huang L, Zhang Z, Zhang S, Ren J, Zhang R, Zeng H, et al. Inhibitory action of Celastrol on hypoxia-mediated angiogenesis and metastasis via the HIF-1 α pathway. *Int J Mol Med.* 2011;27(3):407-15.
190. Park SW, Zhou Y, Lee J, Lee J, Ozcan U. Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2b is a major regulator of endoplasmic reticulum stress and glucose homeostasis in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(45):19320-5.
191. Goyal R, Mittal A, Chu N, Zhang L, Longo LD. Alpha(1)-Adrenergic receptor subtype function in fetal and adult cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;298(6):H1797-1806.

TITRE et RESUME en anglais :

Pulmonary Hypertension Associated with Bronchopulmonary Dysplasia of the Premature Newborn: Current State of Knowledge and study of the interest of celastrol.

Introduction. Bronchopulmonary dysplasia is a common pathology of premature newborns caused by oxidative stress and mechanical ventilation in these immature lungs, resulting in hypoalveolization and impaired angiogenesis. It can be complicated by pulmonary hypertension (HTP-DBP), and then right heart failure associated with excess mortality at 2 years of age. Celastrol has anti-inflammatory and antioxidant properties. Furthermore, in a murine model of systemic hypertension, it decreases systemic blood pressure and inhibits vascular remodeling and myocardial hypertrophy by attenuating inflammation and oxidative stress in vascular smooth muscle cells (VSMCs). It is therefore a molecule of choice for the study of a preventive treatment of HTP-DBP.

Materials/Methods. We studied the influence of celastrol in a murine model of hyperoxic HTP-DBP by evaluating survival, HTP with measurement of pulmonary artery acceleration time (PAAT), right vascular remodeling, alveolization as well density, vascular reactivity and remodeling. We also evaluated the calcium response of fetal pulmonary VSMCs.

Results. Celastrol reduces mortality at doses of 1 and 0,5mg/kg/d. At 1mg/kg/d, it normalizes PAAT and reduces vascular hyperreactivity with no effect on the alteration of the response to acetylcholine induced by hyperoxia. It decreases cardiac and vascular remodeling at all concentrations tested but has no effect on alveolization and vascular density. Finally, it decreases also calcium hyperreactivity of fetal pulmonary VSMCs exposed to hyperoxia.

Conclusion. Celastrol has a preventive effect on HTP but not on DBP itself. However, mechanisms involved remain unknown.

RESUME :

Introduction. La dysplasie broncho-pulmonaire (DBP) est une pathologie fréquente du nouveau-né prématuré causée par le stress oxydatif et la ventilation mécanique sur ces poumons immatures, entraînant une hypoalvéolisation et une altération de l'angiogenèse. Elle peut se compliquer par une hypertension pulmonaire (HTP-DBP), puis une défaillance cardiaque droite associée à une surmortalité à l'âge de 2 ans. Le célastrol possède des propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes. De plus, dans un modèle murin d'hypertension systémique, il diminue la tension artérielle systémique et inhibe le remodelage vasculaire ainsi que l'hypertrophie myocardique en atténuant l'inflammation et le stress oxydatif dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV). C'est donc une molécule de choix pour l'étude d'un traitement préventif de l'HTP-DBP.

Matériels/Méthodes. Nous avons étudié l'influence du célastrol dans un modèle murin d'HTP-DBP hyperoxique en évaluant la survie, l'HTP avec la mesure du temps d'accélération dans l'artère pulmonaire (TAAP), le remodelage cardiaque droit, l'alvéolisation ainsi que la densité, le remodelage et la réactivité vasculaires pulmonaires. Nous avons également évalué la réponse calcique de CMLV pulmonaires fœtales.

Résultats. Le célastrol diminue la mortalité aux posologies de 1 et 0,5mg/kg. A 1mg/kg, il normalise le TAAP et réduit l'hyperactivité vasculaire sans effet sur l'altération de la réponse à l'acétylcholine induite par l'hyperoxie. Il diminue les remodelages cardiaque et vasculaire à toutes les concentrations testées mais n'a pas d'effet sur l'alvéolisation et la densité vasculaire. Il diminue également l'hyperactivité calcique des CMLV pulmonaires fœtales exposées à l'hyperoxie.

Conclusion. Le célastrol a un effet préventif sur l'HTP mais pas sur la DBP en elle-même. Cependant, les mécanismes moléculaires mis en jeu restent méconnus.

DISCIPLINE : Pédiatrie

MOTS-CLES : Dysplasie broncho-pulmonaire, hypertension pulmonaire, prématurité, célastrol, hyperoxie.

INTITULE et ADRESSE du LABORATOIRE :

Laboratoire de Pharmacologie - UFR des Sciences Pharmaceutiques - Université de Bordeaux
INSERM U1045 - Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux
146, rue Léo Saignat 33076 Bordeaux cedex