

THESE D'UNIVERSITE
UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE LILLE II
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE

**Etude de la cinétique de l'adaptation respiratoire à la naissance
par la résonance magnétique.**

**Les effets des acides gras polyinsaturés oméga 3 sur la transition
périnatale**

Date de soutenance : Lundi 20 mars 2017

Ali HOUEIJEH

Praticien Hospitalier

Faculté de Médecine Lille 2

CHRU Lille

Mme. la Professeur Véronique Gournay

Rapporteur

M. le Professeur Younes BOUDJEMLINE

Rapporteur

Mme. la Professeur Véronique DUBARGE

Examineur

M. le Professeur Laurent STORME

Directeur

Sommaire

Abréviations.....	6
Résumé.....	7
Résumé en anglais.....	9
I. Introduction.....	11
I.A La transition respiratoire.....	12
I.A.1 Evolution du liquide pulmonaire avant la naissance.....	12
I.A.2 Résorption du liquide pulmonaire avant la naissance:	13
I.A.3 Résorption du liquide pulmonaire en période périnatale.....	13
I.A.3.i Rôle du travail	13
I.A.3.ii La résorption active du Na.....	14
I.A.3.iii Rôle de l'inspiration.....	16
I.B La transition hémodynamique périnatale.....	18
I.B.1 Facteurs mécaniques	19
I.B.2 Shear stress	19
I.B.3 Nitric Oxide NO	19
I.B.4 Les Prostaglandines.....	21
I.B.5 Les canaux potassiques.....	22
I.C Les méthodes d'évaluation de la transition périnatale	22
I.D. Les effets cardio-respiratoires des acides gras polyinsaturés Oméga3.....	24
II. But du travail.....	31
III. Modèles expérimentaux.....	33
III.A Modèle Expérimental chez les fœtus de brebis.....	33
III.A.1 Modèle chirurgicale.....	33

III.A.2	Extraction du fœtus et étude IRM.....	36
III.A.3	Analyse des images IRM.....	39
III.A.4	Les mesures hémodynamiques.....	40
III.B	Modèle expérimental chez les rats.....	42
III.B.1	Supplémentation nutritionnelle des rates.....	43
III.B.2	Analyses histologiques du poumon.....	44
III.C	Fin des protocoles et scarification.....	45
III.D	Statistiques.....	46
IV.	Protocoles.....	47
IV.A	Développer et valider la méthode de MRI pour étudier <i>in vivo</i> la cinétique de la clairance du liquide pulmonaire à la naissance.....	47
IV.B	Les effets des AGPI n3 sur l'adaptation ventilatoire à la naissance.....	47
IV.B.1	Préparation du modèle.....	47
IV.B.2	Extraction du fœtus et étude de l'adaptation à la naissance.....	48
IV.C	Les effets des AGPI n3 sur la circulation pulmonaire périnatale.....	48.
IV.C.1	préparation du modèle.....	48
IV.C.2	Protocoles.....	48

IV.D Le rôle des AGPI n3 dans la prévention des lésions pulmonaires induites par une hyperoxie prolongée.....	55
IV.D.1 Protocoles.....	55
V. Résultats.....	57
V.A Développer et valider la méthode de MRI pour étudier in vivo la cinétique de la clairance du liquide pulmonaire à la naissance.....	57
V.A.1 Liquide et volumes pulmonaires	57
V.A.2 Les fonctions pulmonaires.....	60
V.A.3 Les mécanismes respiratoires.....	61
V.B Les effets des AGPI n3 sur l’adaptation ventilatoire à la naissance.....	63
V.C Les effets des AGPI n3 sur la circulation pulmonaire périnatale.....	66
V.C.1 Protocole Omegaven et Intralipide	66
V.C.2 Protocole LNA et LNA - Omegaven	68
V.C.3 Protocoles TEA et TEA - Omegaven	70
V.C.4 Protocole MS-PPOH – Omegaven.....	72
V.C.5 Protocole EPA et DHA.....	74
V.C.6 Protocole éthanol.....	77
V.D Le rôle des AGPI n3 dans la prévention des lésions pulmonaires induites par une hyperoxie prolongée.....	79

V.D.1 Effets de l'hyperoxie sur la survie.....	79
V.D.2 Effets des AGPI n3 sur le développement pulmonaire.....	80
V.D.3 Effets des AGPI n 3 sur le développement cardiovasculaire.....	82
VI. Discussion.....	
VII. Conclusion et perspectives.....	96
VIII. Références.....	98
IX. Annexes.....	121

Abréviations

AA : Air ambiant

AGPI n3 : Acides gras polyinsaturés oméga 3

AGPI n6: Acides gras polyinsaturés oméga 6

DHA : Acide Docosahexaénoïque

ENaC : Canaux sodiques épithéliaux amiloride-sensitive

EPA : Acide Eicosapentaénoïque

FRC : Capacité fonctionnelle résiduelle

LPA : artère pulmonaire gauche

MRI : Imagerie par résonance magnétique

n3 PUFA: n3 poly-unsaturated fatty acids

n6 PUFA: n6 poly-unsaturated fatty acids

Na/K-ATPase : sodium (Na⁺) potassium (K⁺) adenosine triphosphatase (ATPase)

NO : Nitric Oxide

PAP : Pression artérielle pulmonaire moyenne

RVP et PVR: résistances vasculaires pulmonaires

SSI: serum salé isotonique

LNA : L-Nitro Argénine

TEA : Tetraéthylamonium

Résumé

L'adaptation à la vie extra-utérine requiert la résorption rapide du liquide pulmonaire, la création de la capacité fonctionnelle résiduelle (FRC), ainsi que l'augmentation du débit pulmonaire. Bien que ces mécanismes aient été largement étudiés, leurs cinétiques restent mal connues faute de méthode d'étude non invasive in vivo. L'échec de l'adaptation cardiorespiratoire à la naissance est la principale cause de mortalité et de morbidité de la période néonatale, malgré l'utilisation de stratégie préventive comme la corticothérapie anténatale, et l'amélioration des techniques de réanimation néonatale. Les acides gras polyinsaturés oméga 3 (AGPI n3) que l'on retrouve dans les huiles de poisson ont des effets cardiovasculaires et respiratoires qui pourraient améliorer la transition périnatale. Par ailleurs, leurs propriétés anti-inflammatoires peuvent réduire les conséquences des effets iatrogènes des techniques de réanimation dont la mise en œuvre est nécessaire en cas de maladaptation cardiorespiratoire à la naissance.

Les objectifs de ce travail ont été de :

- Mettre au point et valider une méthode d'exploration de la cinétique de réabsorption du liquide pulmonaire à la naissance par résonance magnétique nucléaire
- Etudier les effets des AGPI n3 sur :
 - l'adaptation ventilatoire à la naissance
 - la circulation pulmonaire périnatale
 - la prévention des lésions pulmonaires induites par une hyperoxie prolongée

Les études ont été réalisées sur les modèles expérimentaux de fœtus de brebis et de rats nouveau-nés exposés à une hyperoxie prolongée. Nous montrons que la technique par IRM

permet d'évaluer la cinétique de clairance du liquide pulmonaire in vivo en situations physiologique et pathologique. Alors que les AGPI n3 améliorent la circulation pulmonaire, ils n'ont pas d'effet sur la clairance du liquide pulmonaire. Par contre, ils réduisent les lésions pulmonaires induites par l'oxygène.

Ces résultats expérimentaux suggèrent que les AGPI n3 pourraient prévenir les échecs d'adaptation cardiorespiratoire à la naissance et ses conséquences à long terme.

Résumé en anglais

Perinatal transition requires clearance of pulmonary fluid, creation of functional respiratory capacity (FRC), and the multiplication of pulmonary blood flow by ten, to ensure gas exchange and blood oxygenation. Physiology of perinatal transition has been broadly studied but the kinetics of its evolution is less known. The aim of our study was to assess the kinetics of the respiratory transition. Besides, we supposed that polyunsaturated fatty-acids omega 3 (n3 PUFA) would improve this transition.

To study the kinetic of respiratory transition, we used the MRI in 3 groups of lambs: premature group (Preterm) with a term of 122-124 days, two groups of late preterm lambs (134-136 days), including one group who received antenatal steroids (Late preterm + steroids), and a group without steroids (Late preterm). Surprisingly, we observed a rapid increase of lung fluid in preterm lambs reaching 30% at the end of the experimentation. Creation of FRC was also impaired in this group. In the Late preterm group, clearance of pulmonary fluid was slowed down with a moderate fall of 10%, whereas, in the Late preterm + steroids group, lung fluid dropped by 50% ($p < 0.05$). Similarly, FRC in the Late preterm + steroids group was higher than the other 2 groups ($p < 0.05$). Respiratory functions were closely related to lung fluid content and to FRC.

We hypothesized that n3 PUFA would improve perinatal transition using two models:

- An acute model: in a chronically instrumented model, catheters were introduced in the jugular and the carotid vessels of lamb fetuses at 122 days of gestation. Lamb fetuses received either Omegaven (n3 PUFA), or Intralipide (n6 PUFA), or isotonique physiological serum (SSI) for 4 days. Respiratory transition was explored by MRI. There was no significant difference between these three groups. Total lung fluid increased by about 20% in Omegaven group and 18% in SSI group ($p > 0.05$).

- A model of Bronchopulmonary dysplasia: pups were exposed to hyperoxia for 10 days, and feeding rats received supplementation by either n3 PUFA (Omacor), n6 PUFA (sunflower oil), or SSI, with control groups that received the same feeding supply but which were exposed to air. Histological studies

showed bronchopulmonary dysplasia lesions in the Hyperoxia groups, characterized by decrease of alveolar number, decrease in the number of secondary alveolar septa, and widening of the interstitial space. These lesions were similar in SSI and n6 PUFA groups, whereas n3 PUFA improved these lesions ($p < 0.05$).

To assess the effects of n3 PUFA in pulmonary vascular resistances (PVR), we studied their effects on fetal circulation characterized by elevated RVP using a chronically instrumented experimental model of lamb fetus. Lamb fetuses received either n3 PUFA (Omegaven), or n6 PUFA (Intralipid). We then explored the action mechanisms of n3 PUFA: 1) NO pathway using L-Nitro Arginine (LNA), 2) potassium channels pathway using Tetraethylammonium (TEA) and 3) epoxides produced by cytochrome P450 using MS-PPOH. Finally, we investigated the effect of Eicosapentaenoic Acid (EPA) perfusion, or Docosahexaenoic Acid (DHA) perfusion in pulmonary circulation. We showed that, unlike Intralipid, Omegaven induced pulmonary vasodilation, and an increase in pulmonary flow. An identical effect was reproduced by EPA infusion, while DHA did not modify PVR. This response was not modified by LNA. But it was reduced by MS-PPOH, and abolished by TEA. These results indicate that n3 PUFA induced pulmonary vasodilation, mediated by epoxides which act on potassium channels.

To conclude, we demonstrated that respiratory transition in preterm lambs even in late preterm ones is altered with the presence of pulmonary edema. n3 PUFA did not improve lung fluid clearance but should be considered in the treatment of pulmonary hypertension, and in the prevention of bronchopulmonary dysplasia of the newborns.

I. Introduction

La naissance nécessite une adaptation rapide des fonctions respiratoire et hémodynamique (Hooper, Kitchen et al. 2009). Cette période transitionnelle débute juste avant la naissance, et se prolonge pendant les premières heures de vie postnatale.

L'adaptation cardiorespiratoire à la naissance consiste essentiellement en 2 phénomènes concomitants:

- la résorption du liquide pulmonaire et l'aération du poumon qui conduit à la création de la Capacité Résiduelle Fonctionnelle (FRC) dès les premières minutes de vie (Hooper, Te Pas et al. 2015, Hooper, Te Pas et al. 2016)
- l'augmentation rapide du débit pulmonaire liée à une réduction des résistances vasculaires pulmonaires. L'augmentation par dix du débit pulmonaire est nécessaire pour assurer l'oxygénation et la décarboxylation du sang, mais aussi pour compenser la baisse de pré-charge du ventricule gauche survenant au clampage du cordon (Milner and Saunders 1977, Saunders and Milner 1978).

L'échec de l'adaptation cardiorespiratoire à la naissance est associé à une mortalité et une morbidité néonatale élevée, notamment chez les enfants prématurés (Hansen, Hazinski et al. 1984, Hooper and Harding 1990). Les progrès de la médecine périnatale sont liés à la découverte de stratégies qui améliorent l'adaptation cardiorespiratoire dans les situations à risque (corticothérapie anténatale, surfactant) (Riou, Leclerc et al. 2002, Deruelle, Houfflin-Debarge et al. 2003, Boland, Joyce et al. 2004, Wilson, Olver et al. 2007, Bird, McDougall et al. 2015, Crawshaw, Hooper et al. 2016), un intérêt grandissant est prêté pour améliorer la transition périnatale et donc le devenir de ces enfants à court et long terme. (Elgellab, Riou et al. 2001, Lines, Davey et al. 2001, Sobotka, Hooper et al. 2011, Storme, Aubry et al. 2013, Barton, Moss et al. 2014, Bhatt, Polglase et al. 2014).

I.A La transition respiratoire : aération pulmonaire et résorption du liquide pulmonaire

I.A.1 Evolution du liquide pulmonaire avant la naissance

Depuis 1948 il est établi que le liquide pulmonaire est secrété par les cellules alvéolaires de façon active (Olver and Strang 1974). Ce liquide est un facteur de croissance et développement pulmonaire, d'où l'origine des interventions fœtales qui visent à favoriser la croissance pulmonaire par l'expansion de la quantité du liquide intra-pulmonaire (Storme et al.2010, Aubry et al. 2013). Les Canaux potassiques et les pompes Na/K ATPase provoquent une entrée du sodium et du chlore dans les cellules épithéliales (Figure 1).

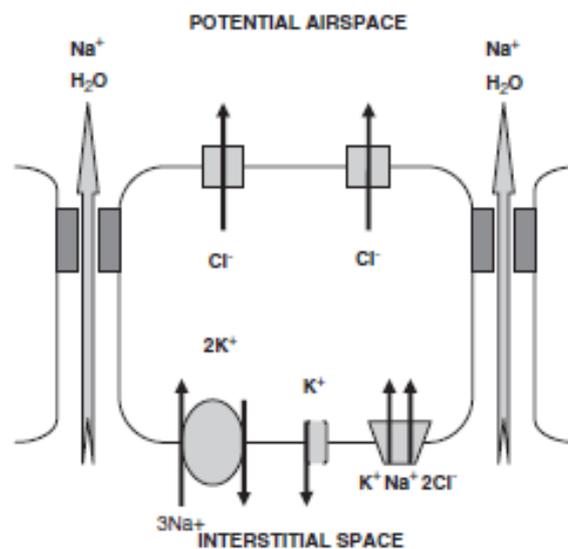


Figure1 : Flux ionique produisant la sécrétion du liquide pulmonaire la pompe Na/K ATPase à la base des cellules endothéliales permet l'entrée du chlore et du sodium dans l'espace intracellulaire. Les canaux de chlore ainsi activés secrètent le chlore dans la lumière hors de la cellule, provoquant un flux concomitant de sodium et d'eau (d'après Olver et al 1974)

La concentration intracellulaire du chlore ainsi que le gradient électro-chimique provoquent une excrétion du chlore dans l'espace alvéolaire, par les canaux de chlore. Ce flux de chlore entraîne un flux

sodique concomitant. Ensemble, ils provoquent l'entrée de l'eau dans la lumière pulmonaire (Olver and Strang 1974). La sécrétion du liquide pulmonaire est indispensable au développement pulmonaire (Olver, Schneeberger et al. 1981). La maturation pulmonaire est marquée par l'augmentation de l'expression de canaux sodiques endothéliaux ENaC et de pompes Na/K ATPase, avec une légère diminution de l'expression des canaux chlore (Wilson, Olver et al. 2007). Vers la fin de la grossesse, la sécrétion de liquide pulmonaire diminue, probablement à cause de la diminution de l'expression des canaux chlore mais la quantité de liquide pulmonaire reste stable pendant le dernier trimestre de la grossesse (Mescher, Platzker et al. 1975).

Les mécanismes et la chronologie de la résorption du liquide pulmonaire restent controversés (Bland 1983, Bland 2001, Hooper, Hawkins et al. 2005, te Pas, Davis et al. 2008, te Pas, Siew et al. 2009, Hooper, Siew et al. 2013). La réalité est probablement un processus différent chez chaque enfant en fonction de son terme et de son mode de naissance. Cette différence est due aux multiples facteurs qui interviennent dans le processus.

I.A.2 Résorption du liquide pulmonaire avant la naissance:

Plusieurs travaux ont évoqué la diminution de la quantité du liquide pulmonaire pendant les derniers jours de la grossesse (Olver, Ramsden et al. 1986, Jain and Eaton 2006). Cette diminution a été contredite par d'autres rapports (Kitchen, Lewis et al. 2005, Lewis, Yagi et al. 2005). Probablement, la résorption du liquide pulmonaire avant le travail semble être peu importante. Elle semble être liée à la diminution de l'expression des canaux chlore, et à la position du fœtus avec la flexion du rachis qui augmente la pression abdominale ainsi que la pression transpulmonaire produisant une expulsion du liquide pulmonaire par la bouche et le nez (Bland 2001).

I.A.3 Résorption du liquide pulmonaire en période périnatale

I.A.3.i Rôle du travail

Le travail joue un rôle très important dans la résorption du liquide pulmonaire. Bland et al. ont montré une augmentation importante du liquide pulmonaire chez les fœtus de lapin euthanasiés juste avant le travail par rapport aux animaux euthanasiés après le travail (Bland, Bressack et al. 1979). Cette augmentation atteignait jusque + 45% chez le fœtus de l'agneau (Bland, Carlton et al. 1989). L'hypothèse mécanique qui était avancée jusqu'à la fin des années 70 a laissé depuis longtemps sa place à un processus de résorption active du liquide pulmonaire (Bland 2001). La compression thoracique est peu significative vu le passage initial de la tête dans le canal vaginal, en sachant que son diamètre dépasse celui de la poitrine. De la même façon, l'accouchement par césarienne et la ligature de la trachée n'empêchent pas la résorption du liquide pulmonaire (Brown, Olver et al. 1983). Il est reconnu actuellement que le travail déclenche la clairance du liquide pulmonaire principalement par la résorption active du sodium comme nous allons discuter.

I.A.3.ii La résorption active du Na

Depuis le début des années 90, l'absorption active de Sodium était reconnue comme le moteur de l'absorption du liquide pulmonaire (Walters, Ramsden et al. 1990). La découverte des canaux sodiques épithéliaux amiloride-sensibles (ENaC) a permis de comprendre le mécanisme de cette résorption active du liquide pulmonaire (Canessa, Horisberger et al. 1993). Les canaux sodiques ENaC sont constitués de 3 sous-unités α , β , γ . La sous-unité α -ENaC est la composante principale qui permet le flux de Sodium dans les cellules endothéliales (Hummler, Barker et al. 1996). Par contre, la délétion des sous-unités β , γ , diminue sensiblement l'efficacité des canaux ENaC sans causer de conséquences respiratoires significatives (Hummler and Planes 2010).

L'expression des canaux ENaC augmente avec la maturation (Janer, Pitkanen et al. 2015) (Helve, Pitkanen et al. 2004). L'activité des α -ENaC s'accroît de façon significative pendant le travail sous l'effet des corticoïdes, de l'ocytocine et de l'adrénaline (Sayegh, Auerbach et al. 1999, Richard, Ramminger et al. 2004, Jain and Eaton 2006). L'activation des canaux sodiques provoque l'entrée de Sodium dans les cellules endothéliales avant d'être transféré vers l'interstitium. Ce transfert vers

l'espace interstitiel est activé par d'autres canaux ioniques situés dans la membrane basale des cellules endothéliales, plus particulièrement par les canaux Sodium (Na^+), Potassium (K^+), Adenosine triphosphatase (ATPase) (la pompe Na/K-ATPase) (Katz, Bentur et al. 2011). La fonction synchronisée de ces canaux avec les canaux ENaCs est primordiale pour maintenir le gradient électro-chimique ionique et électrique afin d'assurer la résorption du liquide pulmonaire (Otulakowski and O'Brodovich 2007). L'expression des canaux, et de la pompe Na/K-ATPase, est également dépendant de la maturité pulmonaire, des hormones thyroïdiennes, des corticoïdes et du taux d'oxygène (Barker and Olver 2002). L'absorption sodique entraîne un flux parallèle de l'eau vers l'interstitium puis vers la circulation (Hanukoglu and Hanukoglu 2016) (Figure 2).

Par ailleurs, si toutes les études montrent que les canaux sodiques jouent un rôle important dans la résorption du liquide pulmonaire, il est très probable qu'ils ne sont pas les seuls facteurs, puisque chez les enfants très prématurés, l'expression des canaux ENaC est très faible sans pour autant empêcher la résorption du liquide pulmonaire et l'installation des échanges gazeux (te Pas, Davis et al. 2008). De plus, l'inhibition de ces canaux ralentit sans arrêter complètement la clairance du liquide pulmonaire (O'Brodovich, Hannam et al. 1990). Finalement, la clairance du liquide pulmonaire par ce seul mécanisme ne peut pas être assurée pendant quelques secondes comme cela est nécessaire pendant la transition périnatale.

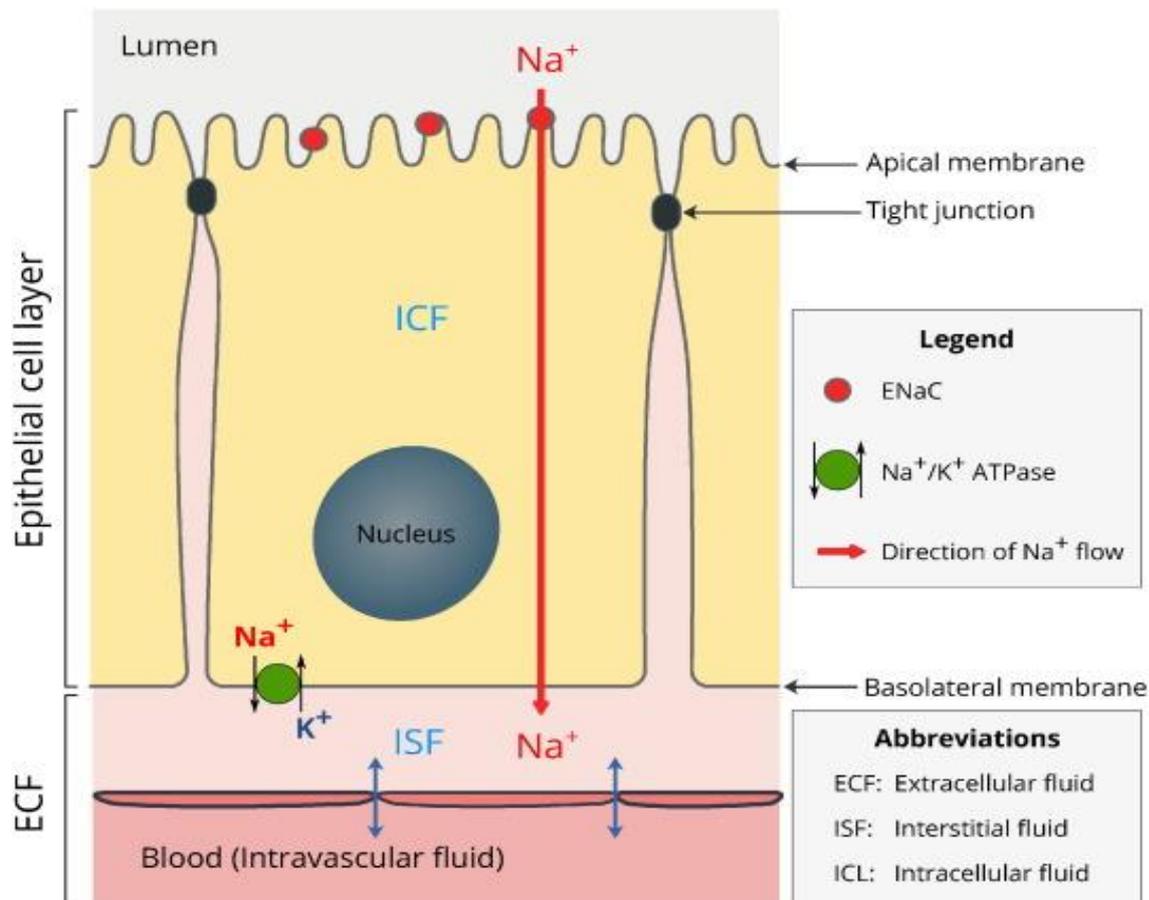


Figure 2 : la résorption active du sodium. Les canaux sodiques endothéliaux provoquent l'entrée de sodium de la lumière alvéolaire vers l'espace intracellulaire. Une sécrétion synchronisée du Sodium vers l'interstitium par la pompe Na/K ATPase est indispensable pour déclencher le passage de l'eau de la lumière vers l'espace interstitielle. D'après (Hanukoglu and Hanukoglu 2016)

I.A.3.iii Rôle de l'inspiration:

L'absorption rapide de sodium nécessite plusieurs heures pour permettre à l'air de remplacer le liquide dans les alvéoles afin d'assurer les échanges gazeux. Ce temps est très long quand on sait que cela doit être achevé dans les secondes qui suivent la naissance (Hooper, Siew et al. 2013, Hooper, Te Pas et al. 2016). Hooper et al. ont démontré que les alvéoles à la naissance sont plus au moins remplies d'eau en fonction du terme et de la voie d'accouchement. L'imagerie des poumons en utilisant le Phase-Contrast X-ray a illustré que les mouvements respiratoires assuraient l'aération pulmonaire et la création de la

FRC en quelques secondes, avec une diminution simultanée du liquide alvéolaire (Hooper, Kitchen et al. 2007, Siew, Wallace et al. 2009). De manière intéressante, les auteurs ont observé un retour partiel du liquide vers les alvéoles entre les inspirations qui a été majoré par l'Amélioride qui inhibe les canaux sodiques (Siew, Wallace et al. 2009, Siew, Wallace et al. 2013). La vitesse de résorption du liquide pulmonaire était 3 fois plus rapide qu'avec l'Adrénaline qui active les canaux ENaC (Olver, Ramsden et al. 1986) (Hooper, Dickson et al. 1988). Ces données indiquent que les mouvements respiratoires après la naissance sont le moteur principal pour la constitution de la FRC et la clairance du liquide pulmonaire vers l'interstitium pulmonaire (te Pas, Davis et al. 2008, te Pas, Siew et al. 2009). Ainsi, Le transfert du liquide pulmonaire vers l'interstitium est aussi la conséquence du gradient de pression généré par les muscles respiratoires et la distension de la paroi thoracique (paroi particulièrement compliant chez le nouveau-né). Les canaux sodiques participent également à maintenir le liquide pulmonaire dans l'interstitium en attendant sa résorption dans la circulation sanguine (Hooper, Te Pas et al. 2016). Cela pourrait expliquer la résorption rapide du liquide pulmonaire même en cas de césarienne et en l'absence de facteurs qui activent les canaux sodiques.

Comme nous l'avons mentionné, une grande partie du liquide pulmonaire passe dans l'espace interstitiel pendant la première minute de vie, ce qui génère une augmentation de la pression dans l'interstitium (Bland, McMillan et al. 1980, Miserocchi, Poskurica et al. 1994). Cette augmentation de pression provoque à la fois un partiel retour du liquide vers les alvéoles (limité par la pression positive maintenue pendant l'expiration), en attendant la résorption du liquide de l'interstitium vers la circulation par les vaisseaux sanguins et lymphatiques.

La compréhension de la résorption du liquide pulmonaire a des intérêts cliniques majeurs. Les techniques de ventilation auparavant destinées pour l'oxygénation, laissent sa place vers des techniques moins invasives qui sont plus efficaces pour créer la FRC et accélérer la résorption du liquide pulmonaire comme la ventilation avec une pression expiratoire positive et un temps d'inspiration longue (te Pas, Siew et al. 2009, Hooper, Siew et al. 2013). D'autre part, les mécanismes décrits sont une épreuve

supplémentaire des bénéfices de l'application d'une pression positive en fin d'expiration qui aide à maintenir le liquide dans l'interstitium (Hooper, Kitchen et al. 2009, Hooper, Te Pas et al. 2016).

I.B La transition hémodynamique périnatale

La circulation fœtale se caractérise par la présence de la circulation placentaire, ainsi que des poumons remplis par le liquide. En conséquence, les résistances vasculaires pulmonaires sont élevées alors que les résistances vasculaires systémiques sont basses, avec un shunt droit gauche par le canal artériel (Rudolph 1979). Le précharge du ventricule gauche est assurée essentiellement par le flux veineux placentaire qui traverse directement le foramen, plus que par le retour veineux pulmonaire en raison du faible débit pulmonaire (Gao and Raj 2010). La transition post natale nécessite une augmentation importante du débit pulmonaire qui sera multiplié par 5 ou 10 (Rudolph 2007). Cette majoration du débit pulmonaire est nécessaire pour assurer les échanges gazeux au niveau pulmonaire, mais aussi pour fournir un débit systémique suffisant aux organes. Le clampage du cordon supprime la circulation placentaire à résistances vasculaires basses, augmente les résistances vasculaires systémiques de 30%, et supprime le retour veineux placentaire qui préchargeait le ventricule gauche (Hooper, Binder-Heschl et al. 2016). Ces facteurs engendrent une baisse du débit systémique qui ne peut se normaliser que par l'augmentation rapide du débit pulmonaire pendant les premières secondes de vie. De nombreuses études récentes montrent l'intérêt du clampage tardif du cordon pour éviter ces modifications aigues du débit systémique qui peuvent conduire à une morbidité importante (Hooper, Binder-Heschl et al. 2016). De même, les dernières recommandations préconisent un clampage tardif à une minute chez les enfants sans pathologie avérée. L'intérêt du clampage tardif est évident en cas de pathologie respiratoire où l'asphyxie paraît compréhensible malgré l'absence de preuve scientifique pour le moment.

Le moteur principal de l'augmentation du débit pulmonaire est la ventilation pulmonaire et la constitution de la FRC. Hooper et al. ont montré que le clampage du cordon ne modifie pas la circulation pulmonaire. Par contre, on observe une augmentation rapide du débit pulmonaire qu'après le début de

la ventilation (Lang, Pearson et al. 2016). Les facteurs qui sont responsables de cette vasodilatation pulmonaire sont multiples.

I.B.1 Facteurs mécaniques

L'expansion des poumons augmente le débit sanguin dans les vaisseaux capillaires pulmonaires par l'augmentation mécanique de leur diamètre (Gao and Raj 2010). Par ailleurs, à l'approche du terme, le volume du liquide pulmonaire est supérieur à la FRC générée à la naissance (Hooper and Wallace 2006). Cela suggère que la pression extraluminale exercée par le liquide en anténatal baisse avec sa résorption facilitant l'augmentation du débit pulmonaire (Polglase, Wallace et al. 2006)

I.B.2 Shear stress

L'augmentation rapide du débit pulmonaire à la naissance en raison de la ventilation, l'expansion du thorax, et l'ouverture des capillaires pulmonaires produit un shear stress qui entraîne une vasodilatation flux dépendant (Storme et al. 1999). Le shear stress augmente essentiellement les substances vasoactives dérivées des cellules endothéliales, et plus particulièrement la production du Nitric Oxide (NO), et la prostacycline PGI₂ (Cornfield, Chatfield et al. 1992, Rairigh, Storme et al. 1999). Par ailleurs, les canaux potassiques sont également impliqués dans l'effet de Shear stress. L'inhibition de ces canaux par le tétraéthylammonium altère la baisse des RVP (Résistances Vasculaires Pulmonaires) chez le fœtus d'agneau lors du clampage du canal artériel (Storme, Rairigh et al. 1999).

I.B.3 Nitric Oxide NO

Le NO est le plus important régulateur des résistances vasculaires pulmonaires en fin de grossesse et en période post natale. Le NO est produit à partir de la L-Argénine par 3 types de NO Synthase :

- Endothéliale, eNOS, qui est la plus efficace au niveau pulmonaire.
- Inducible, iNOS, qui se trouve dans les cellules musculaires et hépatiques et les macrophages.

- Neuronal, nNOS, qui se trouve essentiellement dans le cerveau et les cellules neurologiques.

Le NO produit dans les cellules épithéliales diffuse vers la couche musculaire adjacente. Puis Par le biais de la soluble Guanylyl Cyclase (sGC), le NO induit la formation de cGMP qui à son tour stimule la une cGMP dépendant protéine kinase G (PKG) (Figure 3 et 4). La PKG agit sur les canaux potassiques calcium dépendante et modifie la phosphorylation de la myosine produisant une relaxation des muscles lisses dans la paroi vasculaire et par conséquent une vasodilatation pulmonaire.

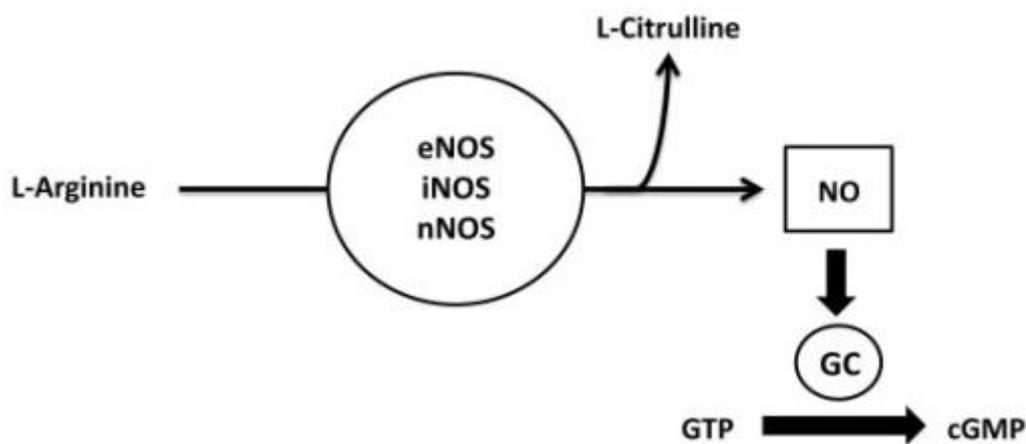


Figure 3 : schéma qui simplifie la synthèse du NO (d'après North et al 1996. GC, Guanylyl Cyclase

En période périnatale l'oxygénation ainsi que le Shear stress augmentent l'expression de eNOS et la sécrétion du NO provoquant une baisse des RVP (Leclerc, Riou et al. 1994, Rairigh, Storme et al. 1999, Jaillard, Riou et al. 2000) (North, Lau et al. 1996).

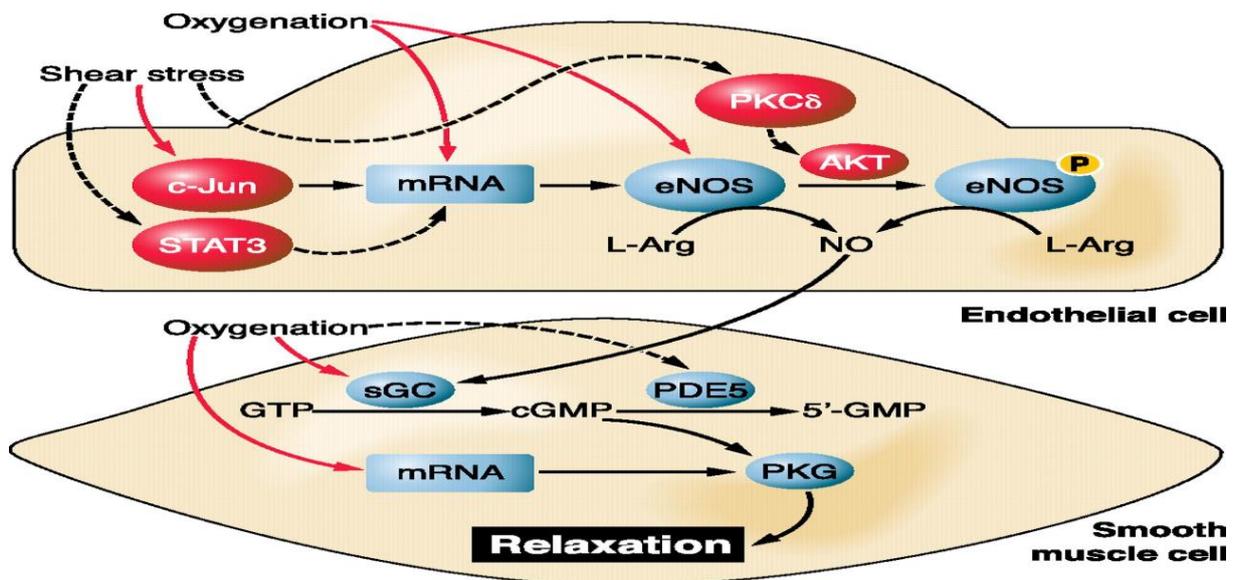


Figure 4 : schéma montrant les mécanismes de la vasodilatation pulmonaire par la voie du NO (d'après North et al 1996)

I.B.4 Les Prostaglandines

Les prostanoides et plus particulièrement La prostacycline PGI₂ sont des vasodilatateurs pulmonaires d'origine majoritaire endothéliale comme le NO. Ils sont produits par les cellules endothéliales et musculaires (20 fois plus par les cellules endothéliales) à partir de l'acide Arachidonique par le biais des cyclooxygénases (COX-1 et COX-2) (Cassin 1993). La production des prostaglandines se multiplie par plus de 5 fois avec la progression de la grossesse chez le fœtus d'agneau à cause de l'augmentation de l'expression de COX1 (Brannon, North et al. 1994, North, Brannon et al. 1994, Shaul, Pace et al. 1999). Néanmoins, il semble que la PGI₂ est peu active dans la régulation du tonus vasculaire pulmonaire pendant la période anténatale, puisque l'Indométhacin ne provoque pas de changements importants des RVP pendant la période anténatale, en raison de l'hyperoxie qui inhibe la COX1 (Ibe, Hillyard et al. 1996). A l'inverse, en cas de Po₂ élevée, et en période postnatale l'Indométhacin induit une vasoconstriction pulmonaire (Leffler, 1981). Cela indique que l'augmentation de la PGI₂ après la naissance participe à la baisse des RVP. Cette augmentation est probablement déclenchée par l'augmentation de la pression en oxygène et le Shear stress (Shaul, Campbell et al. 1992, Alshihabi,

Chang et al. 1996). La PGI2 active une protéine kinase dépendant de cAMP (PKC). La PKC est moins active que la PKG produit par le NO. De plus, l'inhibition de l'eNOS diminue sensiblement l'effet vasodilatateur pulmonaire de la PGI2. Vue dans l'ensemble, ces données sont en faveur d'un effet vasodilatateur pulmonaire de la PGI2 qui reste largement plus faible que le NO pendant la transition périnatale (Gao, 2011).

I.B.5 Les canaux potassiques

Plusieurs type des canaux potassiques ont été identifiés dans l'endothélium des artères pulmonaires : calcium-dépendant (K_{Ca}), ATP-dépendant (K_{ATP}), et voltage-dépendant (K_V) (Ghanayem and Gordon 2001). Ces canaux sont activés par plusieurs stimulateurs comme l'oxygénation, les prostacyclines, et le Shear stress (Storme, Rairigh et al. 1999). L'activation des canaux potassiques génère un flux intracellulaire de Potassium engendrant une hyperpolarisation. L'hyperpolarisation désactive les canaux calciques « Voltage-operated » entraînant une chute du calcium cytoplasmique produisant par conséquence une vasodilatation (Ghanayem and Gordon 2001). A l'inverse, l'inhibition des canaux potassiques réduit la réponse vasodilatatrice pulmonaire de Shear stress, et de l'oxygène (Storme, Rairigh et al. 1999)

I.C Les méthodes d'évaluation de la transition périnatale

L'évaluation de la transition périnatale intéresse les chercheurs depuis le début du XXème siècle. En plus, La quantification de l'œdème pulmonaire est intéressante pour la prise en charge des maladies respiratoires (Staub 1986). La méthode idéale pour cette estimation doit être précise, reproductible, et peu onéreux. Les méthodes de référence (Méthode Gravimétrique pour la quantification du liquide pulmonaire et la dilution de l'Hélium pour la FRC) ne sont pas réalisables in vivo.

L'imagerie pulmonaire est le moyen le plus utilisé in vivo. La radiographie de thorax reste le moyen le plus utilisé en pratique clinique car elle permet d'évaluer rapidement la présence d'un œdème

pulmonaire, mais la quantification du liquide par cette méthode est non fiable (Eisenberg, Hansbrough et al. 1987).

Le Positron Emission Tomography est très sensible pour mesurer l'œdème pulmonaire (Velazquez, Haller et al. 1991). Ces mesures sont bien corrélées avec la méthode gravimétrique avec une sous-estimation de l'ordre de 10 % (Velazquez, Haller et al. 1991). Par contre, cet examen est très irradiant et onéreux (Lange and Schuster 1999).

Le principe de la Résonance Magnétique Nucléaire (IRM) est basé sur la détection de la résonance magnétique nucléaire des protons contenus dans l'organisme. Le parenchyme pulmonaire est habituellement très pauvre en eau chez l'enfant ou l'adulte. Par conséquent, les poumons sont un organe difficile à explorer en IRM pour plusieurs raisons : le faible signal du parenchyme pulmonaire pauvre en eau, les mouvements respiratoires et cardiaques (Failo, Wielopolski et al. 2009, Theilmann, Arai et al. 2009), et la circulation sanguine (Risse, Kuder et al. 2009). Par contre, la haute sensibilité de cet examen à détecter l'eau le rend intéressant dans l'étude des poumons en cas d'œdème pulmonaire. De la même façon, cette méthode paraît très bénéfique pour étudier le poumon fœtal rempli d'eau. L'IRM possède plusieurs avantages :

- Il permet d'étudier la quantité de liquide pulmonaire ainsi que sa distribution et l'évolution spatio-temporelle (Holverda, Theilmann et al. 2011) (Cutillo 1985).
- Il est précis pour mesurer de façon simultanée la capacité résiduelle fonctionnelle (Viard, Vermandel et al. 2007, Viard, Tourneux et al. 2008).
- C'est un examen reproductible et non irradiant (Cutillo 1985)

Des multiples études in vitro ont démontré une corrélation très élevée entre les mesures du liquide et des volumes pulmonaires en IRM, par rapport aux méthodes de référence, en l'occurrence la méthode Gravimétrique pour le liquide pulmonaire et la dilution à l'Hélium pour le volume de gaz. Nombreuses études retrouvent que l'IRM est hautement précise pour mesurer la quantité de liquide pulmonaire. Holverda et al. ont montré une corrélation étroite entre les mesures du liquide pulmonaire en IRM et la

méthode gravimétrique in vitro ($r^2=0.99$) avec un marge d'erreur de 1.8% (Holverda, Theilmann et al. 2011). Les études in vivo confirment la précision de l'IRM avec un coefficient de corrélation de 0.91 avec une marge d'erreur d'environ 10% (Cutillo, Morris et al. 1984, Carroll, Loyd et al. 1985, Wexler, Nicholson et al. 1985, Cutillo, Morris et al. 1989). Les travaux précédents de notre équipe confortent l'utilité de l'IRM pour la mesure du liquide pulmonaire et la FRC (Viard, Vermandel et al. 2007, Viard, Tourneux et al. 2008).

L'IRM a l'avantage d'être un examen non irradiant, reproductible, ce qui rend possible des mesures répétées. Son utilisation en pratique clinique semblait prometteuse pour quantifier l'œdème pulmonaire dans certaines pathologies comme la mucoviscidose et la dysplasie bronchopulmonaire (Adams, Counsell et al. 2002, Walkup, Tkach et al. 2015, Theilmann, Darquenne et al. 2016).

Les inconvénients de l'IRM sont son coût, la nécessité de conditions d'acquisitions strictes sans mouvement et de pause respiratoire ce que peut être difficile chez les enfants.

I.D. Les effets cardio-respiratoires des acides gras polyinsaturés

Oméga3

Les acides gras poly insaturés de type oméga 3 (AGPI n3) ont démontré un effet bénéfique sur la fonction cardio-respiratoire et la fonction pulmonaire chez l'adulte. Ils réduisent la survenue de pathologies cardiovasculaires (athérome, infarctus, hypertension artérielle) et améliorent la mortalité du syndrome de détresse respiratoire aigüe (SDRA) de l'adulte (Chowdhury, Stevens et al. 2012, Bender, Portmann et al. 2014). Chez les nouveau-nés, l'effet protecteur des AGPI n3 sur les fonctions neurologiques a été spécifiquement étudié. Au-delà de leurs effets neurologiques, plusieurs travaux ont montré des effets bénéfiques des AGPI n3 sur la fonction cardiorespiratoire pendant la période périnatale (Houeiجه, Aubry et al. 2011, Storme, Aubry et al. 2013, Sharma, Nkempi et al. 2015, Tenorio-Lopes, Baldy et al. 2016). Les bénéfices des AGPI n3 sont liés à 3 à leurs effets biologiques essentiels :

- Amélioration de la fonction endothéliale, avec accentuation de la vasodilatation endothélium-dépendante (Okuda, Kawashima et al. 1997, Singh, Kathirvel et al. 2010, Houeijeh, Aubry et al. 2011, Mozaffarian and Wu 2011).
- Effets anti-inflammatoires par modulation de la synthèse des médiateurs lipidiques, de la libération des cytokines, et de l'activation des leucocytes (Nakamura, Kariyazono et al. 2005)(Figure 5).
- Effet vasodilatateur pulmonaire par un effet direct sur les canaux potassiques (Nielsen, Wandall-Frosthholm et al. 2013), et par l'augmentation de la production de NO (Okuda, Kawashima et al. 1997, Singh, Kathirvel et al. 2010, Houeijeh, Aubry et al. 2011, Mozaffarian and Wu 2011)

Les acides gras polyinsaturés type 3 et type 6 agissent par leurs métabolites. Leurs mécanismes d'actions sont complexes, multiples et impliqués dans de nombreuses voies biologiques. Les principaux AGPI n3 à effets biologiques sont l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA), tous les 2 dérivés de la conversion de l'acide α -linoléique. Le principal dérivé des acides gras polyinsaturés type 6 est l'acide arachidonique (AA). L'EPA, le DHA, et l'AA sont métabolisés par 3 classes enzymatiques avec un effet compétitif (Figure 6) :

- la voie des cyclooxygénases

Les AGPI n3 produisent des prostaglandines (classe 3) et du thromboxane (classe 3). Par ailleurs, les AGPI n3 augmentent la production de Prostacyclines 2 et 3 qui sont des puissants vasodilatateurs pulmonaires. A l'inverse, l'AA produit des prostaglandines de la série 2 et la thromboxane A2 qui sont des facteurs pro-inflammatoires et des puissants agrégants plaquettaires (Dubois, Abramson et al. 1998, Russo 2009).

- la voie des lipo-oxygénases

L'acide Eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide Docosahexaénoïque (DHA) produisent les leucotriènes (classes 5), des acides hydroxy-eicosatétraénoïques (HETEs) et des lipoxines, qui sont des pro-inflammatoires faibles, contrairement aux leucotriènes de type 4 produits par l'AA (Calder 2004, Russo 2009)

- la voie des cytochromes P450 mono-oxygénases.

Les AGPI n3 produisent des dérivés époxydes tels que les acides époxy-eicosatétraenéoïques (notamment les 17-18 époxy). Une partie des effets du VEGF passe par la production de ces acides époxy-eicosatétraenéoïques (Hercule, Salanova et al. 2007, Fer, Dreano et al. 2008, Morin, Guibert et al. 2008, Morin, Sirois et al. 2009). Ces acides époxy-eicosatétraenéoïques possèdent des propriétés vasodilatatrices plus marquées que les epoxyeicosatrienoic acids (EETs) dérivés « époxy » des AGPI n6. Ils ont la capacité d'activer les canaux potassiques calcium dépendant et de réduire la sensibilité des myofibrilles au calcium (Morin, Guibert et al. 2008, Morin, Sirois et al. 2009).

Il faut noter que les AGPI n3 sont en compétition avec les AGPI n6 sur les mêmes voies métaboliques. Ainsi, une supplémentation en AGPI n3 contribuera à réduire les métabolites produits par les AGPI n6 qui ont un effet pro-inflammatoire (LT5), agrégeant plaquettaire (TXA3), et parfois vasoconstricteur pulmonaire (Rafikova, Meadows et al. 2016) (Figure 5).

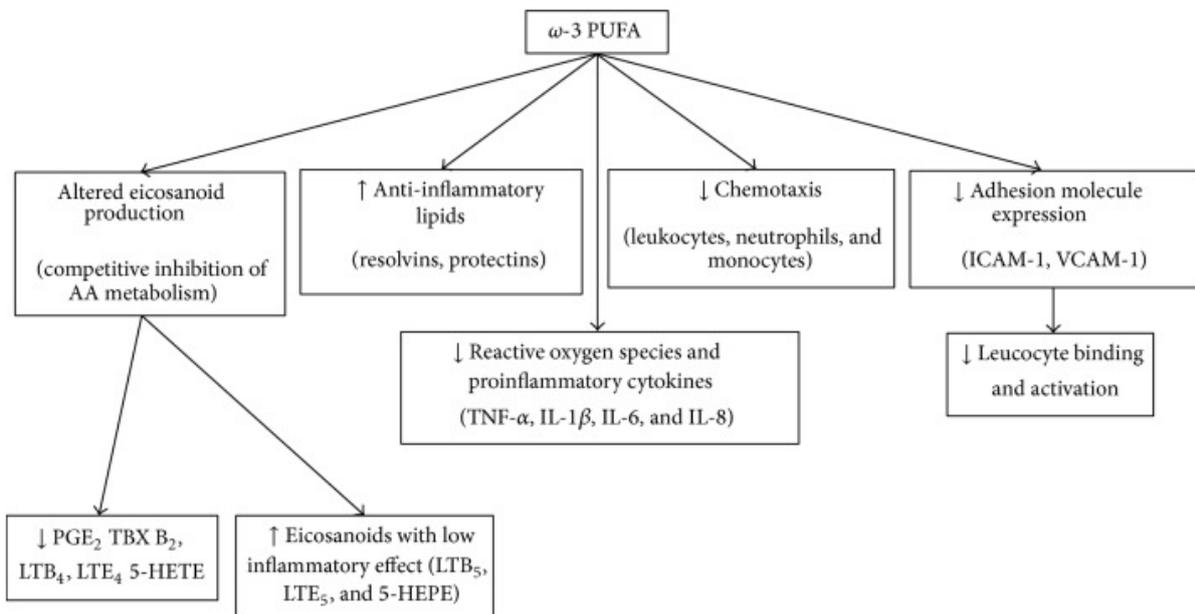


Figure 5 : les effets anti-inflammatoires des AGPI n3 (d'après García de Acilu et al 2015)

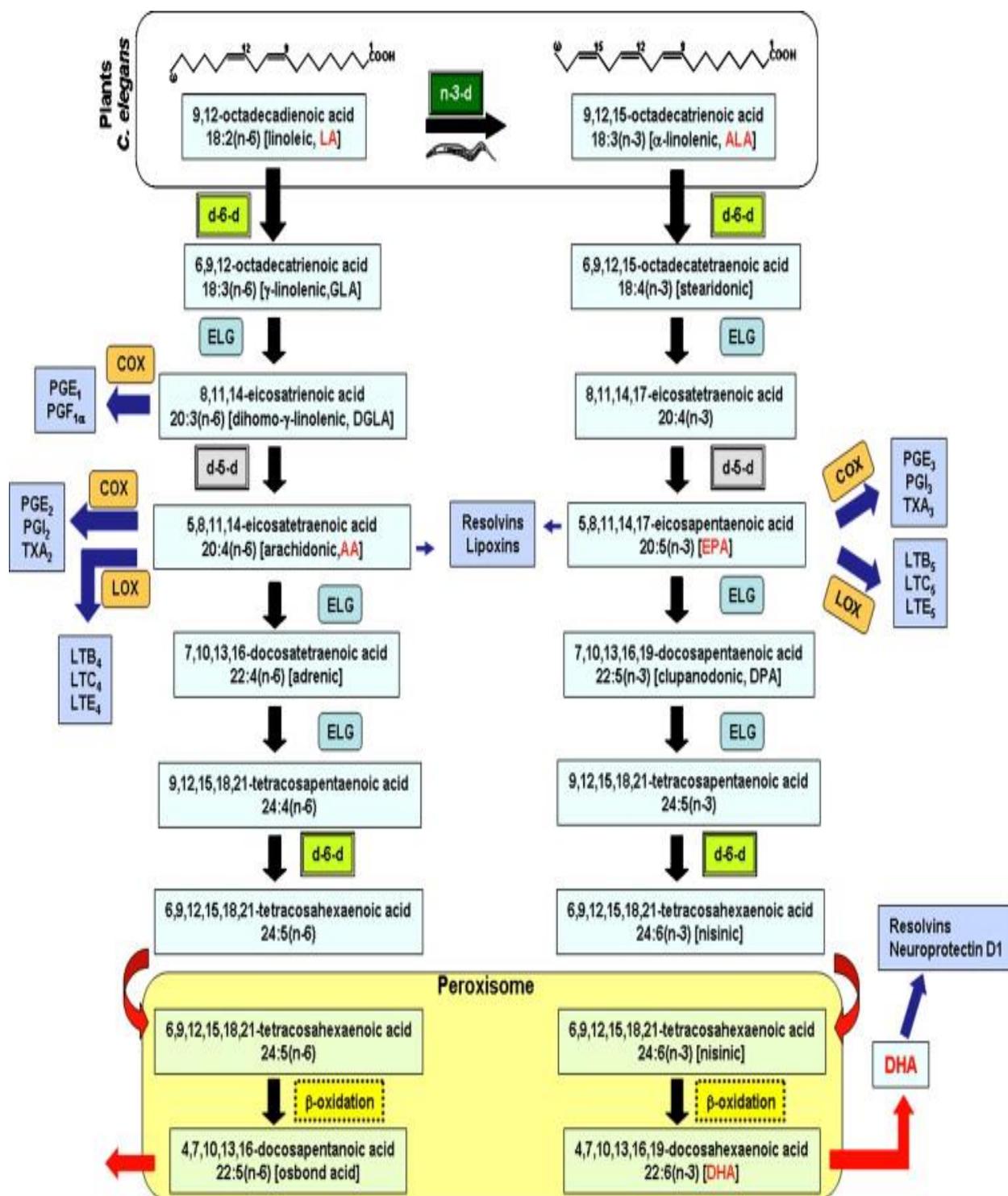


Figure 6 : métabolisme des AGPI n3 et AGPI n6. (ELG= Elongase, d-6-d= d-6- désaturase, LOX=lipo-oxygénase, COX= cyclo-oxygénase, LTB4,C4,E4,B6,C6,E6 sont des leucotriènes, PGE1,E2,E3,F1a sont des prostaglandines, PGI2,I3 sont des prostacyclines. TXA2, thromboxane A2, TXA3, thromboxane A3. (D'après Russo et al. 2009.

- **Les AGPI n3 et les maladies respiratoires des nouveau-nés**

Les AGPI n3 baissent la mortalité et les besoins d'oxygène chez les patients avec syndrome de détresse respiratoire aiguë (Pontes-Arruda, et al. 2008). Des effets bénéfiques ont été également observés chez les enfants atteints de mucoviscidose (Oliver, Watson, 2016). Une étude observationnelle indiquait la baisse des besoins d'oxygène chez les prématurés supplémentés par les AGPI n3 (Beghin, Storme et al. 2015). Les maladies respiratoires restent la première cause de la mortalité néonatale surtout chez les prématurés. L'amélioration de la prise en charge des prématurés a augmenté d'une façon significative la survie des enfants prématurés (Ancel, Goffinet et al, 2015), sans pour autant diminuer l'incidence de la dysplasie bronchopulmonaire (DBP) (Jobe 2012). La dysplasie bronchopulmonaire a été décrite initialement en 1967 comme une fibrose pulmonaire étendue en raison de la ventilation et l'oxygénothérapie (Northway, Rosan et al 1967). L'application de la CPAP, le traitement par surfactant, les corticoïdes anténatals, et l'amélioration de la ventilation mécanique ont amené à une baisse du barotraumatisme et de l'oxygénothérapie. Ces facteurs n'ont pas baissé la survenue de la DBP surtout chez les enfants nés entre 24 et 30 SA. Par contre, une nouvelle physiopathologie de cette maladie a émergé. La nouvelle forme de la DBP se caractérise par une altération importante du processus du développement des alvéoles et des vaisseaux capillaires alvéolaires. Les poumons des enfants prématurés est normalement en phase sacculaire à 24 SA. Les voies aériennes doivent passer plusieurs étapes de divisions avant le début de la création des alvéoles vers 32 SA, et ces processus doivent évoluer malgré la naissance prématurée. Le développement pulmonaire chez les prématurés est le résultat d'un équilibre entre :

- Des facteurs favorisant les lésions pulmonaires: Le retard de croissance, le barotraumatisme, la toxicité de l'oxygène, la chorioamniotite, les infections. Tous ces facteurs ont un effet commun qui est l'inflammation. La présence des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL1, IL6, TNF est confirmé dans les poumons et les sécrétions pulmonaires chez les enfants ou les animaux avec DBP (Jobe, 2006, Jobe 2012, beghin, Storme 2015).

- Des facteurs de réparation et d'incitation à la croissance pulmonaire : Les apports alimentaires optimisés dès la naissance, ventilation douce avec pression positive en fin d'expiration les premières minutes de vie (Jobe 2012).

Plusieurs éléments peuvent faire prédire des effets favorables des AGPI n3 pour prévenir les morbidités respiratoires par:

- L'amélioration de leur état nutritionnel et la croissance.
- Atténuer l'inflammation par la baisse des leucotriènes de la classe 4 (pro-inflammatoires puissants), et l'augmentation des leucotriènes de la classe 5 (effets inflammatoires faibles) (García de Acilu et al 2015)
- Les effets antiagrégants (Rafikova, Meadows et al. 2016).
- L'augmentation de l'activité des canaux ENaC (Mies, Shlyonsky et al. 2004)

Au total, les mécanismes d'actions des AGPI n3 sont complexes, multiples et impliqués dans de nombreuses voies biologiques. Les métabolites de l'EPA et du DHA ont des effets anti-inflammatoires puissants, des effets vasculaires vasodilatateurs et antiagrégants, en diminuant les facteurs pro-inflammatoires issus du métabolisme de l'acide arachidonique, et probablement ils augmentent l'activité des canaux sodiques.

Nous attendons que les AGPI n3 participent à la baisse de la morbidité respiratoire des nouveau-nés par deux mécanismes :

- L'amélioration de la clairance du liquide pulmonaire par l'augmentation de l'activité des canaux sodiques, et la baisse de l'œdème d'origine inflammatoire.
- La prévention de la survenue de la DBP par l'amélioration de développement pulmonaire, la modulation de l'inflammation, ainsi que l'amélioration de l'état nutritionnel.

II. But du travail

II.A Développer et valider une nouvelle méthode pour étudier in vivo la cinétique de la clearance du liquide pulmonaire à la naissance

La résorption du liquide pulmonaire et la création de la FRC ont été largement étudiées en utilisant les techniques de choix qui sont : la méthode gravimétrique pour la quantification du liquide pulmonaire, et la dilution de l'Hélium pour la FRC. Mais ces méthodes ne permettent pas de réaliser ni des mesures répétées ni des mesures in vivo de ces deux paramètres de la transition périnatale.

Le technique de l'IRM offre plusieurs avantages, il permet de :

- Réaliser des mesures spatio-temporelles simultanées et répétées et de la quantité du liquide pulmonaire ainsi que la FRC.
- Faire ces mesures in vivo.
- Détecter et quantifier l'œdème pulmonaire.

Nous avons déjà validé la méthode de l'IRM chez les agneaux nés à terme (Viard et al, 2008). Nous avons voulu explorer la transition respiratoire dans différentes situations pathologiques chez les agneaux prématurés. Pour cela nous avons étudié trois groupes d'animaux:

- Un groupe prématuré 122-124j de gestation (correspondant à 24-26 SA chez l'être humain)
- Un groupe proche du terme 132-134 j de gestation (correspondant à 34-36 SA chez l'être humain).
- Un groupe proche du terme dont les brebis ont reçu un traitement par corticothérapie anténatale, pour explorer l'effet des corticoïdes dans ce groupe qui présente une morbidité respiratoire supérieure aux enfants nés à terme.

II.B Etudier les effets des acides gras polyinsaturés de type Oméga-3 en période périnatale

Les effets biologiques des AGPI n3 et leurs propriétés cardiovasculaires et respiratoires dans les pathologies sévères de l'adulte nous ont amené à faire l'hypothèse que les AGPI n3 pourraient favoriser l'adaptation cardio-respiratoire à la naissance et prévenir les conséquences iatrogènes de la réanimation nécessaire en cas d'échec de la transition. Pour tester ces hypothèses, nous avons étudiés les effets des AGPI n3 sur :

- L'adaptation ventilatoire à la naissance : Nous avons utilisé l'IRM pour explorer la transition respiratoire chez les agneaux prématurés (128j de gestation) ayant reçu une supplémentation anténatale par des AGPI n3.
- La circulation pulmonaire périnatale : les effets vasculaires pulmonaires des AGPI n3 ont été étudiés in vivo chez le fœtus d'agneau.
- La prévention des lésions pulmonaires induites par une hyperoxie prolongée: les effets d'une supplémentation maternelle avant et après la naissance par AGPI n3 ont été étudiés dans un modèle de rats exposés à une hyperoxie de 10 jours.

III. Modèles expérimentaux

Les différentes phases du protocole étaient réalisées dans le Département Hospitalo-Universitaire de Recherche Expérimentale (DHURE) de Lille, portant l'agrément n°59286 pour l'expérimentation animale. Les brebis proviennent d'un élevage de la Creuse ayant reçu l'agrément de la DDSV (Direction Départementale des Services Vétérinaires).

III.A Modèle Expérimental chez les fœtus de brebis

Les protocoles chez le fœtus d'agneau étaient réalisés sur des brebis gestantes de race Colombia-Rambouillet. La gestation était datée par la mise en présence d'un bélier avec la brebis à un jour prédéterminé après stimulation de l'ovulation et confirmée par datation échographique. Cette méthode de datation permet une grande précision dans la datation des brebis étant donné la faible durée de vie du sperme de bélier dans le tractus génital de la brebis (30 heures). Une échographie fœtale avec mesure de la longueur fémorale était réalisée en préopératoire afin d'éliminer une erreur de datation. Les brebis ont été hébergées à l'animalerie à partir de 110 jours de la grossesse. Tous les membres présents pendant les interventions, les expérimentations, et les soins des animaux avaient reçu la certification nécessaire pour les expérimentations animales.

III.A.1 Modèle chirurgicale

Les interventions chirurgicales étaient effectuées entre 122 et 129 jours de gestation selon les protocoles (terme =146 jours). Les gestes chirurgicaux étaient effectués dans une salle de bloc opératoire dédiée. La chirurgie était réalisée en conditions d'asepsie stricte Après badigeon à l'Hibitan, par un chirurgien et un aide opératoire qui ont obtenu la certification requise pour les expérimentations animales. L'anesthésie était assurée par un médecin réanimateur ou anesthésiste, ou par un animalier spécialiste dans l'anesthésie. Deux protocoles d'anesthésie ont été utilisés :

- **Rachis anesthésie** : Les brebis étaient à jeun pendant 24h avant l'extraction. Un cathéter jugulaire a été posé par voie cutané. Les brebis étaient sédâtées et anesthésiées par une injection intra-

veineuse de thiopental 2 à 4 grammes selon l'animal (Pentotal, Hospira, USA), associée à une rachianesthésie à visée analgésique et motrice (Bupivacaïne à 0,25%, 4 ml intrathécal). La ventilation spontanée était maintenue pendant tous les actes chirurgicaux. Une laparotomie médiane sous-ombilicale était effectuée puis une hystérotomie après repérage du fœtus (Figure 7), afin d'accéder à la région cervicale du fœtus. La tête du fœtus était rapidement placée dans un gant afin d'éviter la survenue de mouvements respiratoires. Une analgésie fœtale par NUBAIN (nalbuphine) 10 mg sous-cutané était effectuée avant incision cutanée et dissection des vaisseaux cervicaux. Un cathéter de marque VYGON (Ecouen, France) de taille 4 ou 5 Fr selon la taille du vaisseau était mis en place dans la veine cave supérieure via la veine jugulaire et par l'artère carotide dans l'aorte. Ils étaient fixés par du fil aux vaisseaux puis à la peau du fœtus.

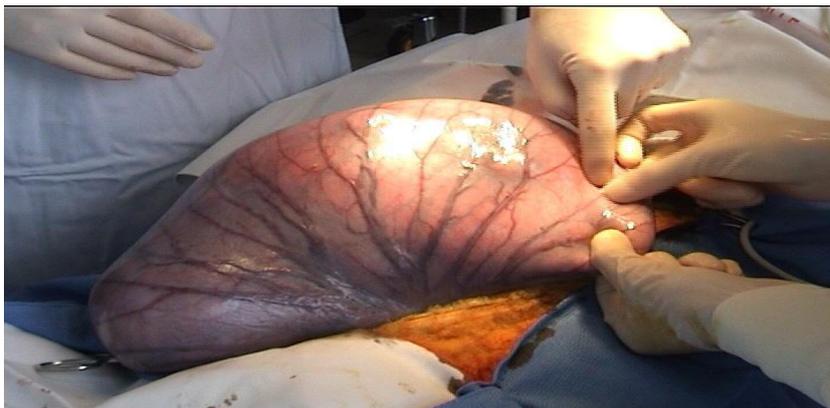


Figure 7 : Extraction de l'utérus et repérage du fœtus avant hystérotomie

- **Anesthésie générale** : après un jeûne de 24h. Une voie veineuse était posée en site jugulaire par abord percutané. Les brebis étaient sédatées (par 0,3 ml de xylazine (SEDAXYLAN® : 20 mg/ml) en intraveineux, après remplissage vasculaire par 500 ml de Ringer contenant 2 grammes de ceftriaxone (Rocephine). L'anesthésie générale était induite par du propofol (DIPRIVAN®, 5 ml à 2%) associé et entretenue au gaz isoflurane (AErrane, 1 à 5%). Le remplissage vasculaire était poursuivi par du Ringer 20 ml/h. L'analgésie était assurée par une injection lors de l'anesthésie d'une ampoule de 20 mg de nalbuphine (Nubain). Après laparotomie médiane sous ombilicale, on procédait à une hystérotomie en regard de la

patte avant-gauche du fœtus. La patte fœtale gauche est extraite après incision utérine. Le fœtus reçoit 10 mg de Nalbuphine (Nubain). Une thoracotomie gauche est effectuée après injection sous-cutanée de Xylocaïne 1%. Des cathéters sont introduits dans l'aorte ascendante et dans la veine cave supérieure par l'artère et la veine axillaire, puis dans le tronc de l'artère pulmonaire, l'artère pulmonaire gauche, et l'oreillette gauche. Un capteur de débit ultrasonique est placé autour de l'artère pulmonaire gauche (Transonic system, capteur 6S) (Figure 8). La circulation placentaire est gardée intacte et le fœtus est replacé dans l'utérus. Un cathéter supplémentaire est introduit dans la cavité amniotique pour mesurer la pression de référence. Deux cent cinquante ml de sérum physiologique chauffé à 39°C associé à 500 mg d'une association Amoxicilline-Acide Clavulanique (Augmentin®) sont injectés dans la cavité amniotique. Les cathéters et le débitmètre sont extériorisés au niveau du flanc latéral gauche de la brebis à travers une tunnelisation sous-cutanée.

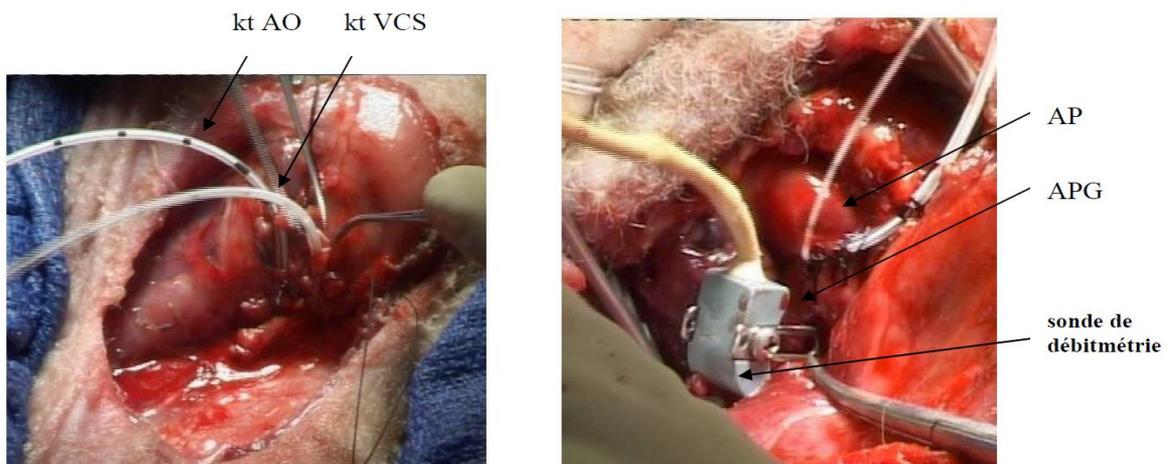


Figure 8 : A gauche, positionnement des cathéters dans l'aorte et la veine cave supérieure par abord axillaire. A droite, Positionnement de la sonde débitmétrie autour de l'APG

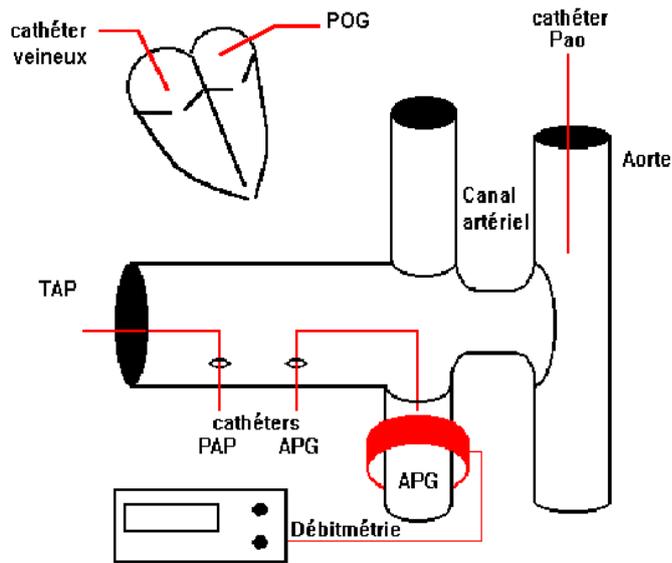


Figure 9 : schéma montrant la position des différents cathéters et la sonde de débitmétrie.

La brebis recevaient 2 g de Rocephine® et 20 mg de Nalbuphine quotidiennement jusqu'à J 3 postopératoire. La perméabilité des cathéters était entretenue par une injection quotidienne de sérum salé isotonique hépariné (1ml = 10UI). La position des cathéters était vérifiée lors de l'autopsie. Les études hémodynamiques débutent 3 jours après la chirurgie pour être à distance du stress opératoire.

III.A.2 Extraction du fœtus et étude IRM

Après l'extraction de la tête comme décrit ci-dessus dans le protocole de rachis anesthésie, l'anesthésie des agneaux était réalisée par sufentanyl ($2\mu\text{g}/\text{min}$) et pancuronium ($400\mu\text{g}/\text{h}$) injectés par le cathéter artériel. Puis sa tête était extraite. L'agneau était ensuite intubé par une sonde de 4,5 mm de diamètre interne munie d'un ballonnet, ce ballonnet était ensuite gonflé par 3 ml d'air. La sonde d'intubation était clampée pour prévenir l'évacuation du liquide pulmonaire.

L'agneau était ensuite extrait de la cavité utérine, séché et enveloppé par des draps préchauffés, et la température était maintenue entre 38 et 39° par une lampe chauffante. Ensuite, l'agneau était placé en décubitus ventral dans l'antenne de tête d'une IRM (type Airis®, 0,2 Tesla à aimant ouvert, Hitachi Medical Systems, Tokyo, Japon) (Figures 10,11). Le cordon ombilical était protégé pendant la première partie de l'expérimentation, afin de permettre la survie de l'agneau avant que la ventilation artificielle ne soit débutée.



Figure 10 : Installation de l'agneau ventilé dans l'antenne de tête de l'IRM



Figure 11 : Installation de la brebis et de l'agneau dans l'IRM.

Une acquisition IRM (Séquence pondérée T2, coupes contigües de 10 mm) en 3 coupes orthogonales (axiale, coronale, et sagittale) a été réalisée au début de l'expérimentation avec le cordon clampé. Malheureusement, cette acquisition nécessite une durée de 3.5 minutes qui n'est pas compatible avec une apnée. Pour cette raison les acquisitions suivantes toutes les 30 minutes ont été réalisées en 2 dimensions sur la coupe coronale (durée 35 sec). En comparant, le volume pulmonaire obtenu par les 3 coupes orthogonales avec celui calculé sur la coupe coronale sur l'acquisition de départ, nous avons défini un facteur de correction qui a été utilisé pour ajuster les volumes pulmonaires estimés sur la coupe

coronale des acquisitions suivantes. Cette correction a permis d'avoir des mesures plus précises des volumes pulmonaires dans nos précédant travaux (Viard, Vermandel et al. 2007, Viard, Tourneux et al. 2008).

La ventilation artificielle était ensuite débutée (= T0 du protocole) sur un ventilateur SERVO 900C (Siemens-Elema AB, Solna, Suède), avec les réglages de base suivants : pression maximale : 30cm d'eau, pression de fin d'expiration : 4cm d'eau, temps inspiratoire : 50%, fréquence respiratoire : 40/min, fraction inspirée en oxygène : 100%. Durant la ventilation, les paramètres respiratoires (pressions inspiratoire et de fin d'expiration, temps inspiratoire, compliance du système respiratoire, résistances des voies respiratoires, volume courant) étaient enregistrés (Méthode du « Least-Square », Florian, Sensor Medics, Miami, USA) à T0 puis toutes les 30 minutes.

Les gaz du sang étaient également mesurés toutes les 30 minutes et les réglages du ventilateur étaient modifiés en fonction de la PaCO₂ mesurée selon le protocole suivant :

Tableau 1 : Protocole des modifications des paramètres de la ventilation

PaCO₂ (mmHg)	Paramètres de la ventilation
< 25	Baisser FR de 10, et Pmax de 5 cmH ₂ O
25-35	Baisser Pmax de 5 cmH ₂ O ou diminuer la FR de 10 si Pmax à 20
35-50	Pas de changement
50-70	Augmentation FR de 20, ou augmentation de la Pmax de 5 cmH ₂ O si FR = 80 /min
>70	Augmentation FR de 20 et de la Pmax de 5 cmH ₂ O, diminution de la PEEP à 3 cmH ₂ O si pO ₂ > 50mmHg.

FR : Fréquence respirateur, Pmax : pression inspiratoire maximale, PEEP : Pression de fin d'expiration
Après 30 minutes de ventilation, le cordon ombilical était sectionné et la brebis euthanasiée par injection de 20ml de T61® (Intervet, Beaucozé, France).

Une séquence IRM 2D était enregistrée toutes les 30 minutes durant laquelle la ventilation du fœtus était maintenue en pause expiratoire (Le déroulement de cette manipulation est résumé dans le tableau 2).

Tableau 2: Déroulement de l'étude de l'adaptation à la naissance.

Temps (minute)	Ventilation	Cordon ombilical	Acquisition des images
T initial	Pas de ventilation	Ouvert	Axiale, sagittale, coronale
T0	Apnée en expiration	Ouvert	Coronale
T30	Apnée en expiration	Clampage	Coronale
T30 à T120 /30 minutes	Apnée en expiration	Clampé	Coronale

III.A.3 Analyse des images IRM

L'analyse des images était réalisée à l'aide du logiciel Artimed® (Unité INSERM 703 : « Thérapies interventionnelles assistées par l'image et la simulation », J ROUSSEAU, Lille), les images étaient ré-analysées à posteriori et le contourage manuel des poumons de l'agneau était réalisé sur les séquences axiales (Figure 12).

Le type de séquence utilisée (pondérée T2, type fast spin echo) permettait d'obtenir un signal proportionnel à la densité de protons et donc à la quantité d'eau présente dans le parenchyme pulmonaire. L'évolution du niveau de gris en IRM sur les coupes permettait donc d'estimer l'évolution du contenu en eau de la coupe de poumon. L'écart entre 2 coupes était de 10 mm, ce qui permettait d'obtenir 6 à 9 coupes contenant du parenchyme pulmonaire par séquence réalisée. Ce type de séquence permet de s'affranchir des artéfacts éventuels liés à la circulation sanguine. En effet, le sang circulant n'émet pas de signal et apparaît noir sur les images. Ce point est important car le débit sanguin pulmonaire augmente après la naissance.

Les images étaient analysées dans les zones déclives (zones ventrales) et dans les zones proclives (zones dorsales). Le niveau de gris sur une coupe ou dans un volume représentait la quantité de protons présents sur cette coupe ou dans ce volume (et donc son contenu total en eau)

L'aire des images contourées et son évolution permettaient de déduire le volume pulmonaire et son évolution en fonction du temps. De précédents travaux de nos équipes ont déjà démontré la bonne corrélation entre l'estimation du volume pulmonaire par cette méthode et l'utilisation d'une méthode de référence comme le calcul par dilution d'hélium (Viard, Vermandel et al. 2007, Viard, Tourneux et al. 2008)



Figure 12 : Coupes coronales avec contourage manuel du volume pulmonaire sur des coupes espacées de 10mm.

III.A.4 Mesures Hémodynamiques

Le capteur de débit était connecté à un débitmètre autocalibré (T201, Transonic Systems, Ithaca, NY, USA) pour la mesure continue du débit sanguin dans l'artère pulmonaire gauche. Le filtre de sortie était réglé à 30 Hz. Les valeurs de débit étaient déterminées à partir du signal de débit sanguin phasique (au moins 30 cycles cardiaques) : le zéro de débit était défini comme la valeur de débit précédant le début de la systole (Figure 13).

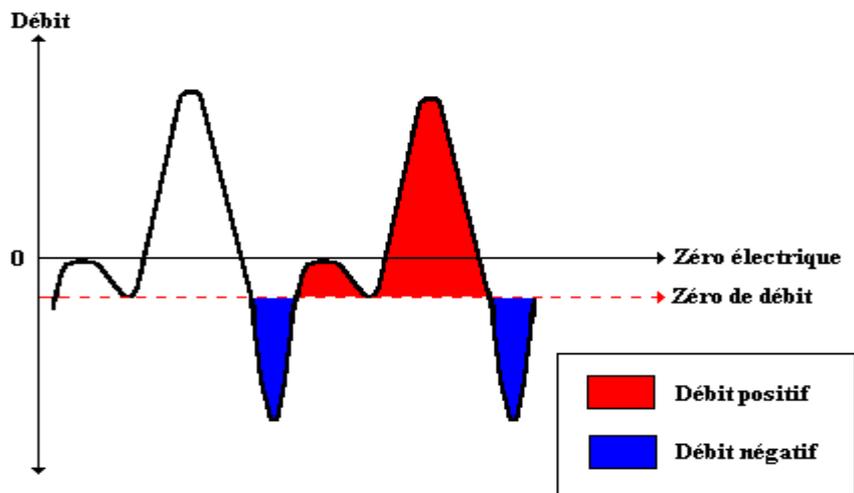


Figure 13 : définition du zéro du débit.

Les cathéters artériels pulmonaire, aortique et de la cavité amniotique étaient connectés à des capteurs de pression (Merlin monitor, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) (Figure 14). Les pressions étaient référencées à la pression amniotique. La fréquence cardiaque était calculée à partir du signal phasique de la pression artérielle pulmonaire. Les résistances vasculaires pulmonaires étaient calculées selon l'équation suivante :

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

Où PAP représente la pression moyenne dans l'artère pulmonaire, POG la pression moyenne dans l'oreillette gauche et Q le débit moyen de l'artère pulmonaire gauche. Les valeurs des pressions et du débit ont été relevés toutes les dix minutes.

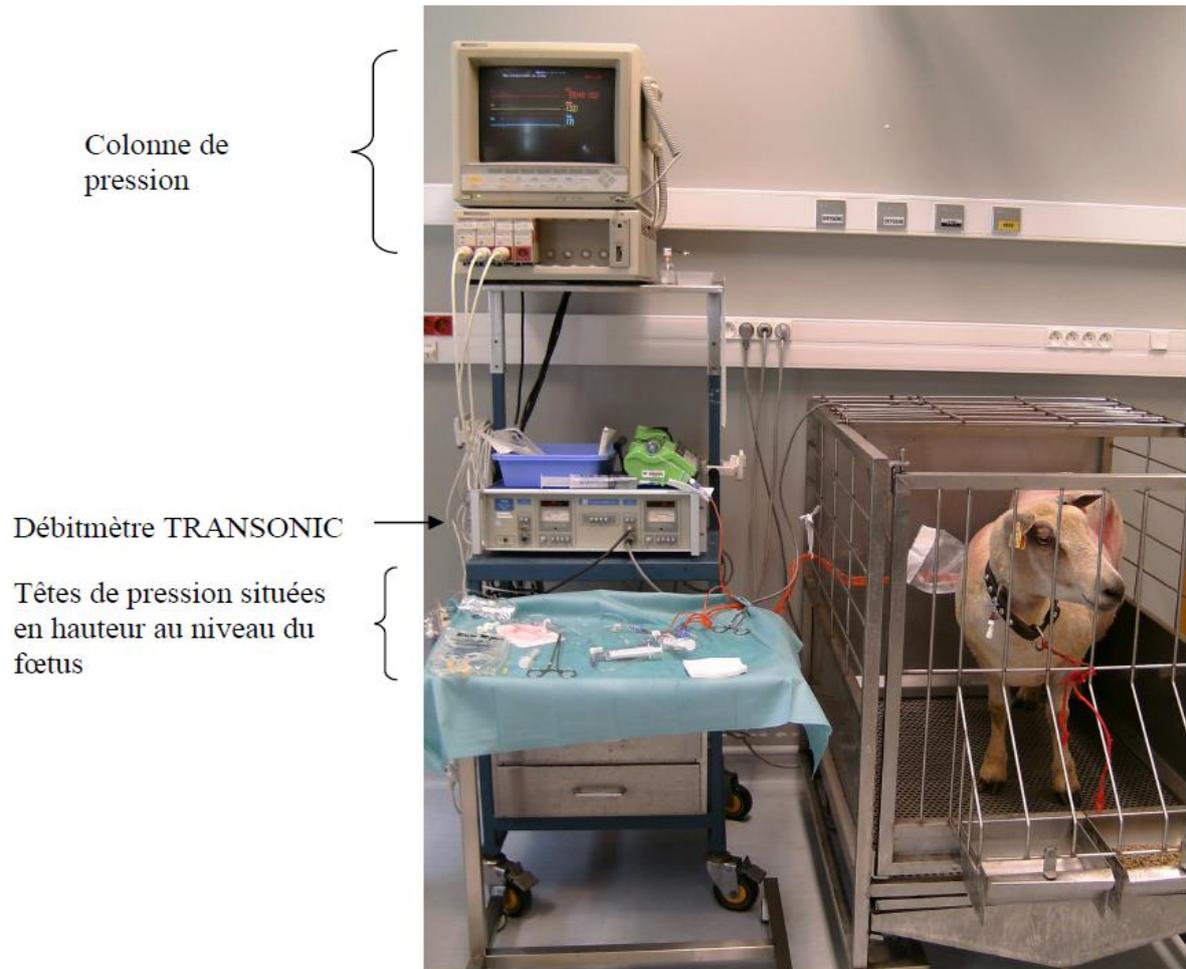


Figure 14 : Installation de la brebis pour la réalisation des mesures

Les gaz du sang, la mesure de la saturation artérielle en oxygène, et la concentration sanguine en lactate étaient réalisés sur des échantillons de sang artériel pulmonaire selon les schémas des protocoles (ABL520, Radiometer, et i-STAT, Abbott Laboratories, Abott Park, IL, USA).

III.B Modèle expérimental chez les ratons

Douze rates Wistar gestantes, étaient commandées auprès de l'Animalerie Janvier, et reçues à J 7 de gestation. Les rates étaient alimentées ad libitum et exposés à des cycles jour-nuit alternativement de 12h pendant toute la durée de l'étude.

III.B.1 Supplémentation nutritionnelle des rates

On débutait à J 14 de gestation, un gavage quotidien par AGPI n6 (Huile de Tournesol) ou par AGPI n3 (Omacor) (Tableau 3), ou par SSI. Ce gavage était poursuivi jusqu'à la fin de l'expérimentation.

La solution ingérée par les rates était constituée de 0,2 ml d'Omacor ou de 0,2ml d'huile de tournesol, auxquels étaient ajoutés 0,8ml d'eau (afin de rincer la sonde de gavage).

Tableau 3: Teneur des produits en Acides gras polyinsaturés insaturés

	Omacor	Huile de Tournesol
Poids	1 g	1 g
Acides gras polyinsaturés	0,9 g	0,8 g
<i>Oméga 3</i>	0,9 g	0 g
ALA	0,1 g	0,002 g
EPA	0,46 g	0 g
DHA	0,38 g	0 g
<i>Oméga 6 (acide oléique)</i>	0 g	0,65 g
Acides gras mono-insaturés	0 g	0,25 g

ALA, acide linoléique, EPA acide eicosapentaénoïque, DHA, acide docosahexaénoïque

La naissance était spontanée à J 21. Après 36H de vie (pour permettre l'adaptation à la vie extra utérine et pour équilibrer les portées à 10 ratons chacune), les ratons et la rate allaitante correspondante étaient placés, soit en hyperoxie avec une fraction inspirée en O₂ (FIO₂) comprise entre 80 et 85% (Groupes O₂), soit laissés en air ambiant (Groupes AA). La durée de l'exposition à l'oxygène ou à l'air était de 10 jours. Pour les animaux des groupes O₂, chaque rate et ses 10 ratons étaient placés dans une enceinte plastifiée (Tente à Oxygène, Société Vygon, France). Le débit de gaz était réglé à 5L/min, permettant ainsi une FIO₂ comprise entre 80 et 85%, tout en maintenant une pression partielle en CO₂ < 1mmHg. La concentration en O₂ dans l'enceinte était mesurée en continue (moniteur d'oxygène Airox BioMS, calibré quotidiennement), tandis que les pressions partielles de CO₂ étaient mesurées par un analyseur aspiratif à mesure spectrophotométrique après calibration (Novametrix®, Solna, Suède). La température

à l'intérieur de l'enceinte était enregistrée de façon continue. Les enceintes étaient ouvertes tous les jours moins de 30 min pour permettre les pesées et les gavages

Les animaux étaient sacrifiés au 11^e jour de vie par décapitation sous anesthésie générale (Isoflurane 4%). Dans chaque portée, la moitié des rats était utilisée pour les études histologiques.

On évaluait chaque jour de l'expérimentation la survie des rats et leur prise de poids. Après le sacrifice, on pesait les poumons pour calculer le ratio (poumon Droit + Gauche) / poids et évaluer ainsi la croissance pulmonaire. Enfin, le cœur était disséqué et on pesait le ventricule droit (VD) et l'ensemble ventricule gauche + septum (VG+S) pour quantifier une éventuelle hypertrophie ventriculaire droite, par le calcul du ratio VD/(VG+S).

III.B.2 Analyses histologiques du poumon

- Préparation tissulaire:

Les poumons étaient préparés in situ selon le protocole décrit par Deruelle et al (Deruelle, Balasubramaniam et al. 2006). On réalisait une thoracotomie médiane. La trachée était canulée par un cathéter de 24G, puis on effectuait une instillation intra-trachéale de paraformaldéhyde (PAF 4%), à une pression continue de 30 cm H₂O pendant 30min. La trachée était ligaturée sous pression, puis le bloc cœur poumon était disséqué et placé pendant 12h dans la solution de PAF 4%. Les poumons ainsi fixés étaient inclus en paraffine. On réalisait des coupes transverses des trois lobes pulmonaires droits (2 coupes/lobe) de 5 µm d'épaisseur. Pour l'étude des lames, on utilisait un microscope (Zeiss-Axiophot 2) couplé à une caméra numérique (Zeiss Axiocam ICc1) et les coupes étaient traitées à l'aide du logiciel Axiovision (Zeiss). Le grossissement utilisé était x50. Les images étaient sauvegardées au format TIFF haute résolution. Elles étaient ensuite exploitées à l'aide du logiciel ImageJ software (image processing software created by Mr. Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA, disponible sur <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

- Analyses histomorphométriques des poumons:

Les lames étaient colorées avec de l'hématoxyline et de l'éosine pour évaluer la structure alvéolaire et le remodelage vasculaire (Deruelle, Balasubramaniam et al. 2006). Les images comprenant des bronches, de larges bronchioles ou des vaisseaux de grand calibre étaient exclues de l'analyse. Deux coupes par poumon étaient sélectionnées de façon aléatoire. Les images étaient analysées en utilisant le Logiciel ImageJ muni du plug-in « Measure and Label ».

L'alvéolisation des poumons était évaluée par la mesure de la distance inter-alvéolaire moyenne ou distance entre 2 parois alvéolaires (Lin, Markham et al. 2005). Elle était mesurée en divisant la longueur totale des quadrillages dessinées sur la lame (10 droites / coupe) par le nombre de paroi alvéolaires traversées par le quadrillage (Cooney and Thurlbeck 1982). L'épaisseur de la paroi inter-alvéolaire était mesurée à l'intersection du quadrillage et des parois alvéolaires pour éviter le biais de sélection des zones de mesure. Le nombre de crêtes alvéolaires secondaires (jonctions de 3 parois) était compté par champ quadrillé sélectionné de façon aléatoire.

La mesure du diamètre externe et de l'épaisseur de la paroi des petits vaisseaux pulmonaires (calibre compris entre 10-50 μm) était effectuée pour rechercher une éventuelle hypertrophie médiale de ces vaisseaux, quantifiée par la formule: $2 \times \text{épaisseur de la paroi} \times 100 / \text{diamètre externe}$

III.C Fin des protocoles et scarification

Le protocole prenait fin en cas de mort in utero de l'agneau, en cas d'avortement prématuré ou par sacrifice en cas de dégradation de l'état général de l'agneau (altération des GDS).

Les animaux ont été sacrifiés par euthanasie au T61® à la posologie de 0,3 mL/Kg (injection à la mère par voie jugulaire). Systématiquement, nous avons réalisé une autopsie pour vérification du bon positionnement des cathéters, recherche d'une étiologie en cas de mort in utero et récupération de la sonde de débitmétrie

III.D Statistiques

Les résultats étaient exprimés sous forme de moyennes affectées de leur écart à la moyenne (SEM) ou sous forme de pourcentage de variation maximale par rapport à la base. Dans chaque protocole, n représente le nombre de fœtus étudiés.

Les analyses statistiques étaient effectuées en utilisant le logiciel Stat View 4.5 pour PC (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). Les statistiques étaient réalisées par un statisticien indépendant. Pour la comparaison de la variation du niveau de gris au cours du temps, les résultats étaient exprimés sous forme de moyennes affectées de leur écart type. Les données étaient analysées en utilisant Friedman test. En cas de différence significative ($p < 0.05$), les sous-groupes ont été analysés par Wilcoxon test.

Pour les études de corrélation, le test de Spearman bidirectionnel était utilisé ainsi que le calcul des coefficients de détermination R^2 .

Les données hémodynamiques étaient analysées en utilisant une analyse de variance (ANOVA) pour mesures répétées. Les différences intergroupes étaient analysées à l'aide du test de Bonferroni-Dunn en raison des comparaisons multiples, lorsque les valeurs de base des populations étaient identiques. Les comparaisons des paramètres gazométriques faisaient appel au test non paramétrique de comparaison de moyennes pour petits effectifs de Mann-Whitney.

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

V. Protocoles

IV.A Développer et valider la méthode de MRI pour étudier *in vivo* la cinétique de la clairance du liquide pulmonaire à la naissance

16 brebis ont été randomisées dans 3 groupes : Preterm (122-124j) (n=5), proche de terme (Late preterm) (134-136 j) (n=5), et proche de terme avec traitement anténatal maternel par corticoïdes (Late preterm + stéroïdes) (n=6). 48h avant la césarienne, les brebis dans le groupe Late preterm + stéroïdes ont reçu une injection de Dexaméthasone 0.5 mg/kg (Qualimed, Puteaux, France), les autres brebis ont reçu une injection intramusculaire d'une quantité identique de sérum physiologique.

Après extraction de la tête du fœtus sous rachis anesthésie comme décrit (Section III.A.1). L'étude IRM a été débutée comme décrit (section III.A.2)

IV.B Les effets des AGPI n3 sur l'adaptation ventilatoire à la naissance

IV.B.1 Préparation du modèle

Les brebis ont été opérées à un terme de 124 j de gestation. La tête des agneaux était extraite et les cathéters ont été posés sous rachis anesthésie comme décrit ci-dessus (section III.A.1). L'utérus et la paroi abdominale étaient refermés et les cathéters étaient extériorisés au niveau du flanc gauche de la brebis après tunnelisation sous-cutanée. Un tirage au sort était ensuite réalisé afin de déterminer dans quel groupe de traitement était placé l'agneau, trois groupes étaient ainsi définis.

- Un groupe Acides gras poly insaturés Omega 3 dans lequel les agneaux recevaient de l'Omegaven (Laboratoires Kabi-Fresenius, France), composé à 10% d'huiles de poisson (cf. Annexe N°1 pour la composition précise)
- Un groupe Témoin lipides dans lequel les agneaux recevaient de l'Intralipide à 10% (Laboratoires Kabi-Fresenius, France), composé à 10% d'huile de soja purifiée et exempt d'acides gras poly insaturés de la série Omega 3 (cf. Annexe N°1 pour la composition précise.). Dans ce cas, 25 mg de vitamine E par 100 ml de lipides (Vitamine E NEPALM®) étaient ajoutés

au mélange afin qu'il n'y ait pas de différence dans la teneur en vitamine E entre les solutés lipidiques.

- Un groupe Témoin dans lequel les agneaux recevaient du sérum physiologique SSI.

Le soluté considéré était perfusé à l'agneau durant 96 heures à un débit de 0,5 ml/h sur le cathéter veineux, la seringue contenant les lipides étant rendue opaque ainsi que la ligne de perfusion. Cette perfusion était débutée le lendemain de l'intervention chirurgicale.

IV.B.2 Extraction du fœtus et étude de l'adaptation à la naissance.

Elle se déroulait sous rachis anesthésie de la même manière que dans le protocole précédent (sections III.A.1 et III.A.2), la curarisation et l'analgésie étaient réalisées sur le cathéter artériel déjà en place.

La perfusion du soluté tiré au sort était poursuivie pendant les 2 heures de l'étude de l'adaptation à la naissance. L'analyse des images IRM était réalisée comme décrite dans le protocole précédent.

IV.C Les effets des AGPI n3 sur la circulation pulmonaire périnatale

IV.C.1 préparation du modèle

Les fœtus de brebis étaient opérés à un terme allant de J127 à J129, selon le protocole d'anesthésie générale décrit dans la section III.A.1.

IV.C.2 Protocoles

. Protocole Omegaven

Au cours de ce protocole, nous avons étudié les effets vasculaires pulmonaires des AGPI n3. Du sérum physiologique (12 ml/h) est injecté dans le cathéter de la veine cave supérieure, Les mesures hémodynamiques sont enregistrées toutes les 10 min (fréquence cardiaque, pression aortique, pression pulmonaire, pression amniotique, débit dans l'artère pulmonaire gauche, pression de l'oreillette gauche).

Après une période de stabilité de 30 minutes, l’Omegaven 10%, 1,2 ml/h associée à du sérum physiologique, 10,8 ml/h étaient perfusés pendant deux heures (Composition de l’Omegaven 10% en annexe1). Puis du sérum physiologique était perfusé pendant une heure supplémentaire après l’arrêt de la perfusion des AGPI n3. Un gaz de sang avec lactates ont été prélevés juste avant et après la perfusion de l’Omegaven.

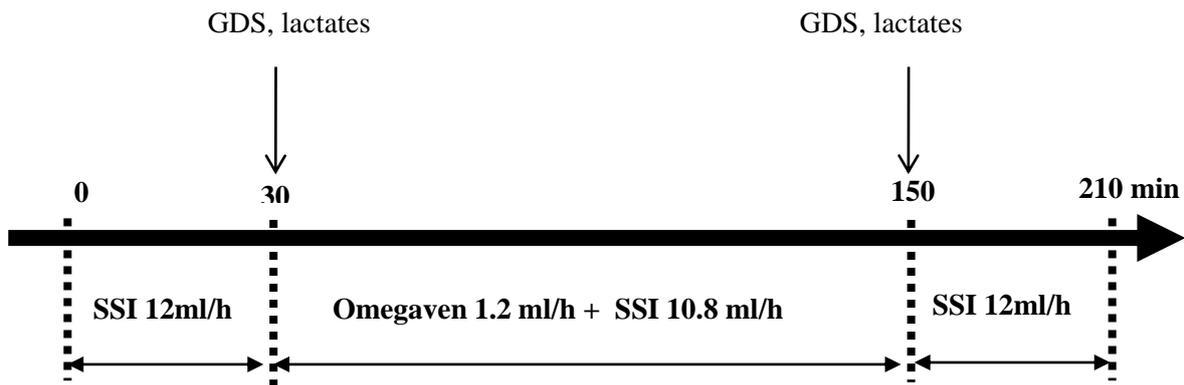


Figure 15 : illustration de protocole Omegaven

. Protocole Intralipide

Au cours de ce protocole, nous avons exploré les effets vasculaires pulmonaires d’AGPI constituées essentiellement des oméga 6. Les animaux reçoivent de l’Intralipide 10% (composition en annexe 1) selon le même protocole que précédemment.

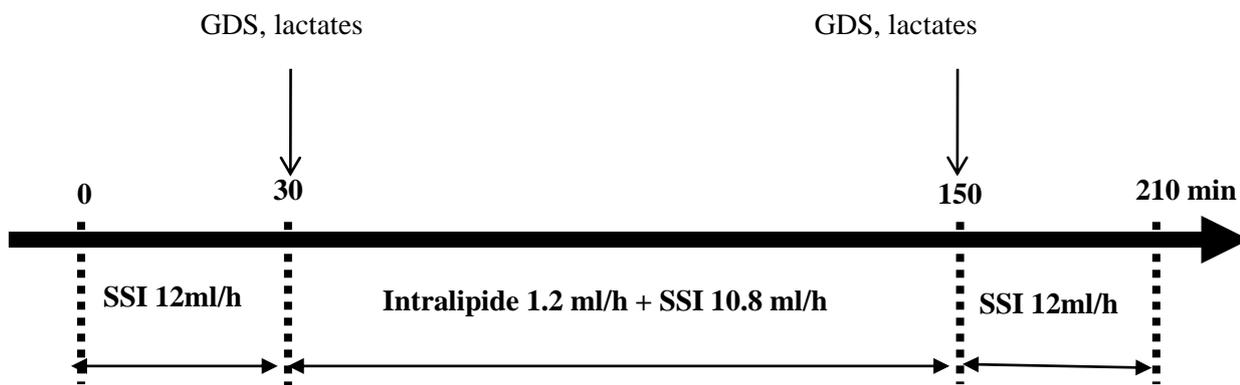


Figure 16 : illustration de protocole Intralipide

. Protocole LNA, Omegaven

Pour savoir si les effets vasculaires pulmonaires des AGPI n3 sont liés à la libération de NO, nous avons étudié les effets AGPI n3 sur les résistances vasculaires pulmonaires en présence d'un inhibiteur de la NO synthase. Le protocole Omegaven est réalisé 30 min après l'injection de L-nitro-arginine (30 mg en perfusion lente de 10 min). La L-nitro-arginine (30 mg) était diluée dans une goutte de chlorhydrique 1M, puis diluée dans 2 ml d'eau, le NaOH 1M est ensuite ajouté jusqu'à obtenir une solution à pH=7.4. Un gaz de sang avec lactates ont été prélevés juste avant l'injection de LNA, et après la fin perfusion de l'Omegaven.

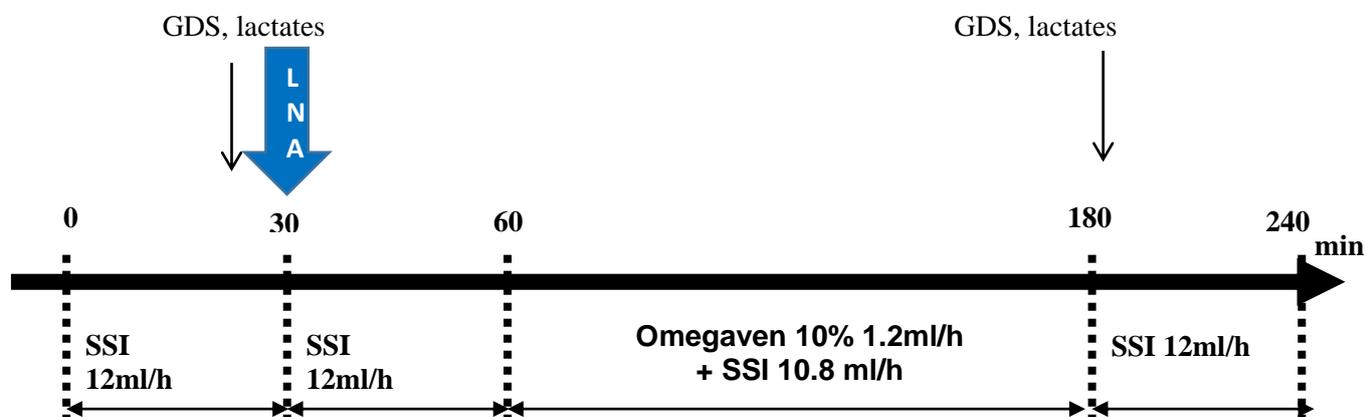


Figure 17 : illustration de protocole Omegaven LNA

. Protocole LNA, témoin

Pour connaître les effets vasculaires pulmonaires d'une inhibition de la NO synthase, les résistances vasculaires pulmonaires ont été mesurées après injection de L-nitro-arginine (30 mg IV sur 10 min) suivi d'une perfusion de SSI 12 ml/h pendant 210 minutes. Un gaz de sang avec lactates ont été prélevés juste avant l'injection de LNA, et après 150 minutes de la perfusion de SSI.

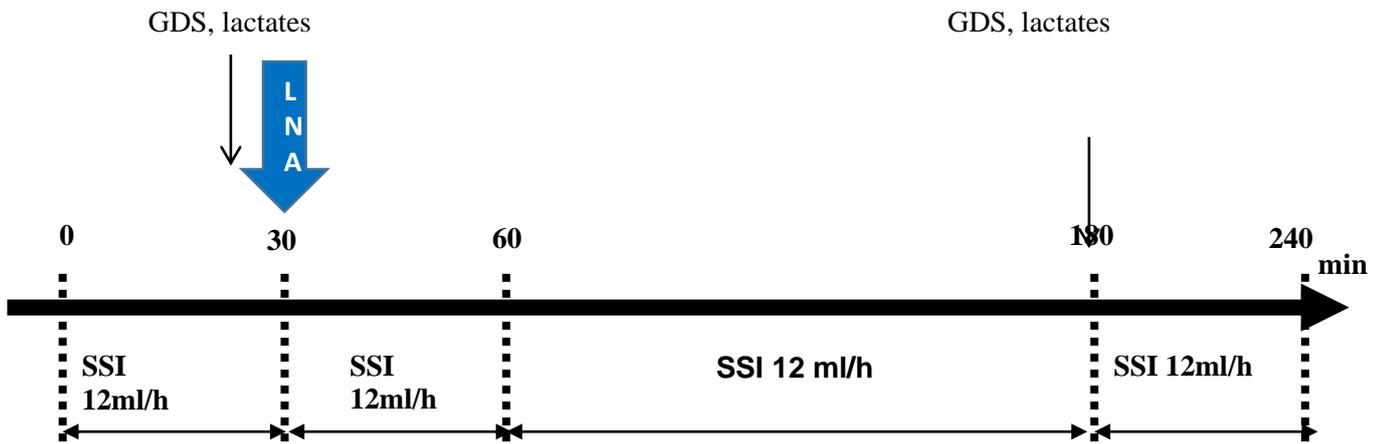


Figure 18 : illustration de protocole LNA, témoin

. Protocole TEA - Omegaven

Pour savoir si les effets vasculaires pulmonaires des AGPI ω -3 sont liés à l'ouverture de canaux potassiques, nous avons étudié les effets du tétraéthylammonium (bloqueur des canaux potassiques calcium- et voltage-dépendant) sur la réponse vasculaire pulmonaire aux AGPI $n3$. Le tétraéthylammonium (Sigma-Aldreich, France) était dilué dans du sérum physiologique pour obtenir une concentration de 1ml=10mg. Une perfusion du tétraéthylammonium (1ml = 10 mg, 6 ml/h) était débutée 10 minutes avant la perfusion de l'Omegaven10% et poursuivie pendant toute la durée de la perfusion de l'Omegaven 1.2 ml/h avec 4.8 ml de SSI. Un gaz de sang avec lactates ont été prélevés juste avant l'injection de TEA, et après la fin perfusion de l'Omegaven

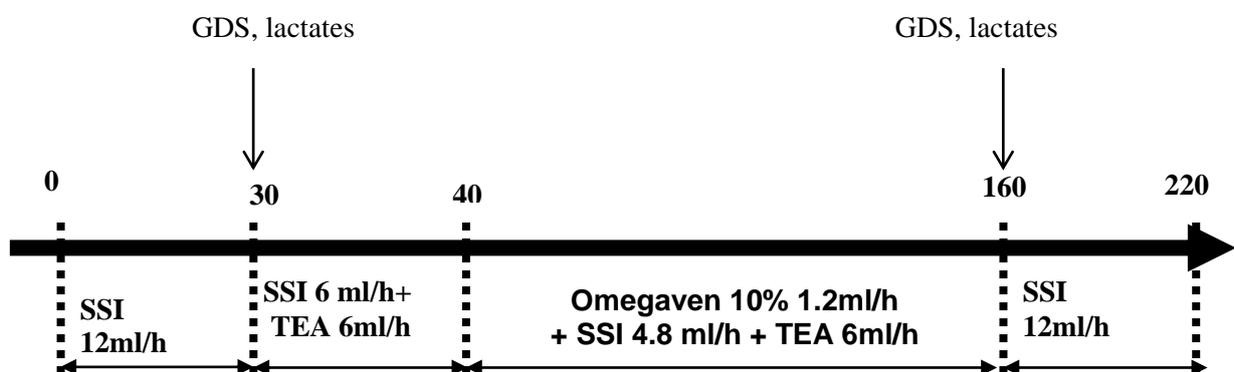


Figure 19 : illustration de protocole Omegaven, TEA

. Protocole TEA, témoin

Pour connaître les effets vasculaires pulmonaires d'une inhibition des canaux potassiques, les résistances vasculaires pulmonaires étaient mesurées pendant une perfusion continue de tétraethylammonium (1 ml = 10 mg, 6 ml/h) + SSI 6ml/h pendant 130 minutes, suivi d'une SSI 12 ml/h pendant une heure. Un gaz de sang avec lactates ont été prélevés juste avant l'injection de TEA, et après la fin son perfusion.

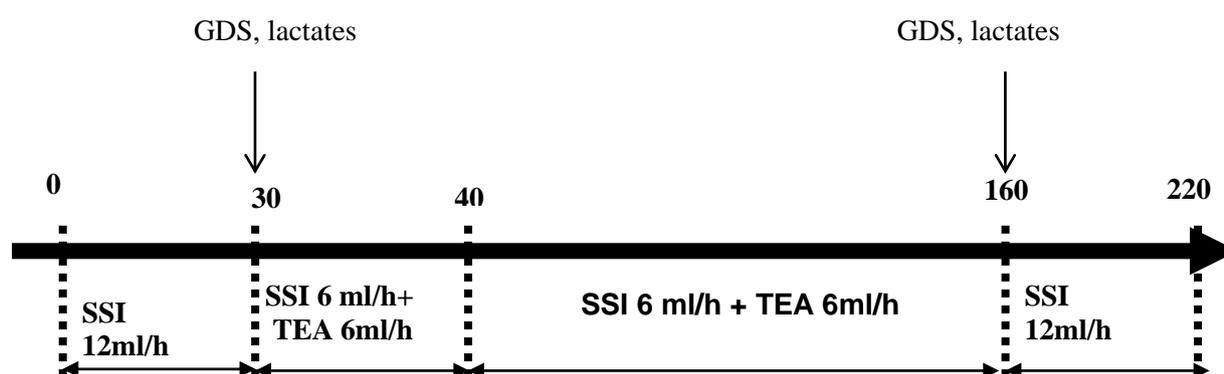


Figure 20 : illustration de protocole TEA, témoin

. Protocole MS-PPOH

Pour savoir si les effets vasculaires pulmonaires des AGPI n3 sont liés à des métabolites produit par la monooxygénase P450, nous avons étudié les effets du -(methylsulfonyl)-2-(2-propynyloxy) – benzenehexanamide (MS-PPOH, 5mg/kg) -Inhibiteur spécifique de la mono-oxygénase P450- sur la réponse vasculaire pulmonaire aux AGPI n3. Le MS-PPOH (SPI-BIO, Paris/France) était dilué dans 0,2 de DMSO (Sigma-Aldreich, France) puis dans 10 de sérum physiologique, puis il était injecté (dans l'artère pulmonaire gauche) 1h avant la perfusion d'AGPI n3. Un gaz de sang avec lactates ont été prélevés juste avant l'injection de MS-PPOH, et après la fin perfusion de l'Omegaven.

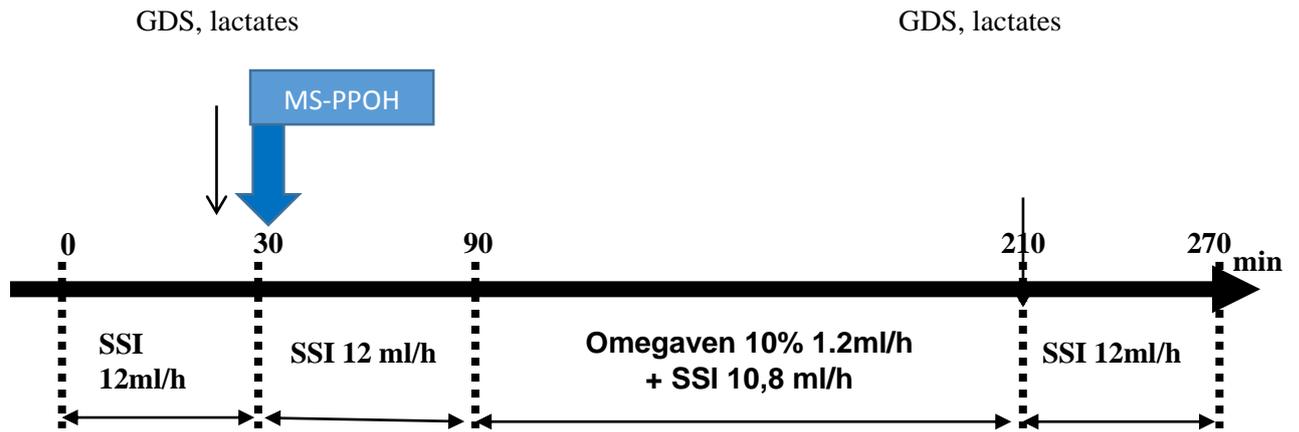


Figure 21 : illustration de protocole Omegaven, MS-PPOH

. Protocole EPA

Pour étudier les effets vasculaires pulmonaires de l'EPA sur le lit vasculaire pulmonaire. Après l'obtention d'une stabilité sous une perfusion de SSI pendant 30 minutes, nous avons perfusé l'EPA (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA). (dose 25 mg dans 0.25 ml d'éthanol) associé à du SSI à un débit de 12 ml/h pendant deux heures, suivie d'une période de surveillance sous SSI 12 ml/h pendant 1 h. Cette dose de l'EPA correspond à la dose d'EPA dans l'Omegaven10% utilisé dans le protocole précédant. Un gaz de sang avec lactates ont été prélevés juste avant et après la perfusion de l'EPA.

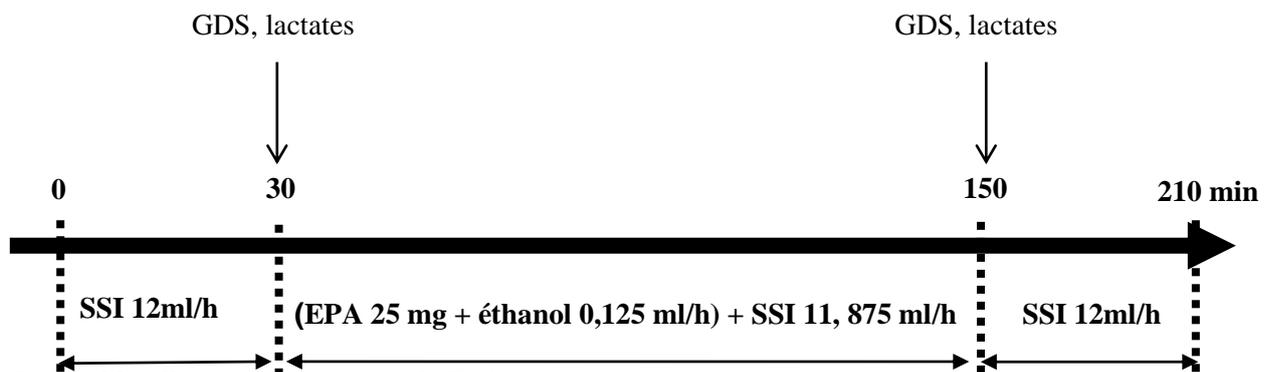


Figure 22 : illustration de protocole EPA

. Protocole DHA

Afin d'identifier les effets vasculaires pulmonaires de la DHA sur le lit vasculaire pulmonaire. Après l'obtention d'une stabilité sous une perfusion de SSI pendant 30 minutes, nous avons perfusé le DHA (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA). (Dose totale de DHA de 50

mg dans 0, 20 ml d'éthanol) associé à du SSI pour un débit total de 12 ml/h pendant deux heures, suivie d'une période de surveillance sous SSI 12 ml/h pendant 1 h. Cette dose de DHA correspond à la dose de DHA dans l'Omegaven utilisé dans le protocole précédent. Un gaz de sang avec lactates ont été prélevés juste avant et après la perfusion de la DHA.

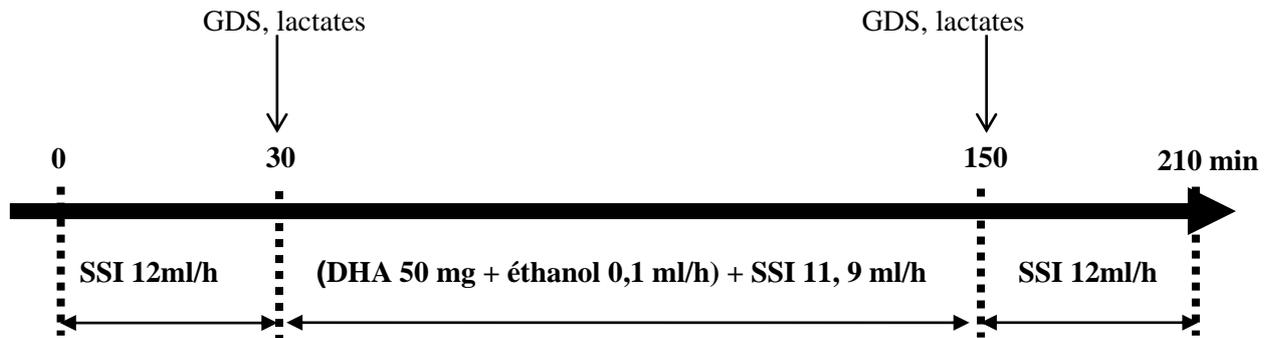


Figure 23 : illustration de protocole DHA

. Protocole Témoin « éthanol »

Après l'obtention d'une stabilité sous une perfusion de SSI pendant 30 minutes, nous avons perfusé l'éthanol (dose totale de l'éthanol 0, 25 ml d'éthanol) associé à du SSI pour un débit total de 12 ml/h pendant deux heures, suivie d'une période de surveillance sous SSI 12 ml/h pendant 1 h. Un gaz de sang avec lactates ont été prélevés juste avant et après la perfusion de l'éthanol.

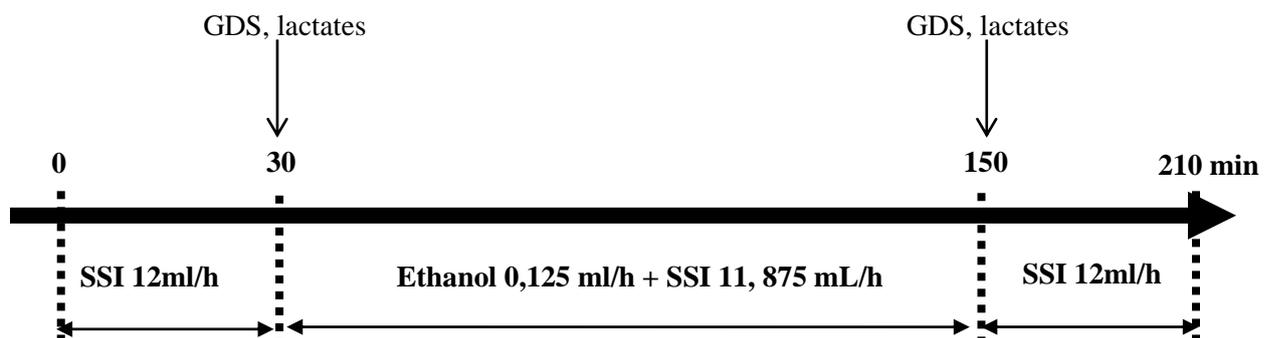


Figure 24 : illustration de protocole éthanol

IV.D Le rôle des AGPI n3 dans la prévention des lésions pulmonaires induites par une hyperoxie prolongée

IV.D.1 Protocoles

Après 1 semaine d'acclimatation, les rates gestantes étaient assignées de façon randomisée dans un des 4 groupes de l'étude :

- Groupe Omega 6 /Air ambiant (**AGPI n6/AA**) : 3 rates adultes supplémentées par gavage en acides gras polyinsaturés oméga 6, et progéniture laissée en air ambiant durant 10 jours.
- Groupe Oméga 6 / Hyperoxie (**AGPI n3/O₂**) : 3 rates adultes supplémentée par gavage en acides gras polyinsaturés oméga 6, et progéniture placée en hyperoxie pendant 10 jours.
- Groupe Oméga 3 / Air ambiant (**AGPI n3/AA**) : 3 rates adultes supplémentées par gavage en acides gras polyinsaturés oméga 3, et progéniture laissée en air ambiant pendant 10 jours.
- Groupe Oméga 3 / Hyperoxie (**AGPI n3/O₂**) : 3 rates adultes supplémentées par gavage en acides gras polyinsaturés oméga 3 et progéniture placée en hyperoxie à la naissance pour une durée de 10 jours.
- Groupe Contrôle /Hyperoxie (**Contrôle/O₂**): 1 rate adulte supplémentée par gavage en sérum physiologique et progéniture placée en hyperoxie à la naissance pour une durée de 10 jours.
- Groupe Contrôle/air ambiant (**Contrôle/AA**): 1 rate adulte supplémentée par gavage en sérum physiologique et progéniture placée en air ambiant à la naissance pour une durée de 10 jours

La dose d'Omacor était déterminée à partir de nos travaux précédents sur l'adaptation hémodynamique chez le fœtus de brebis, chez lequel nous avons administré une solution de 2,4 ml d'Omegaven (EPA: 20 mg/ml et DHA : 25 mg/ml) pendant 2h.

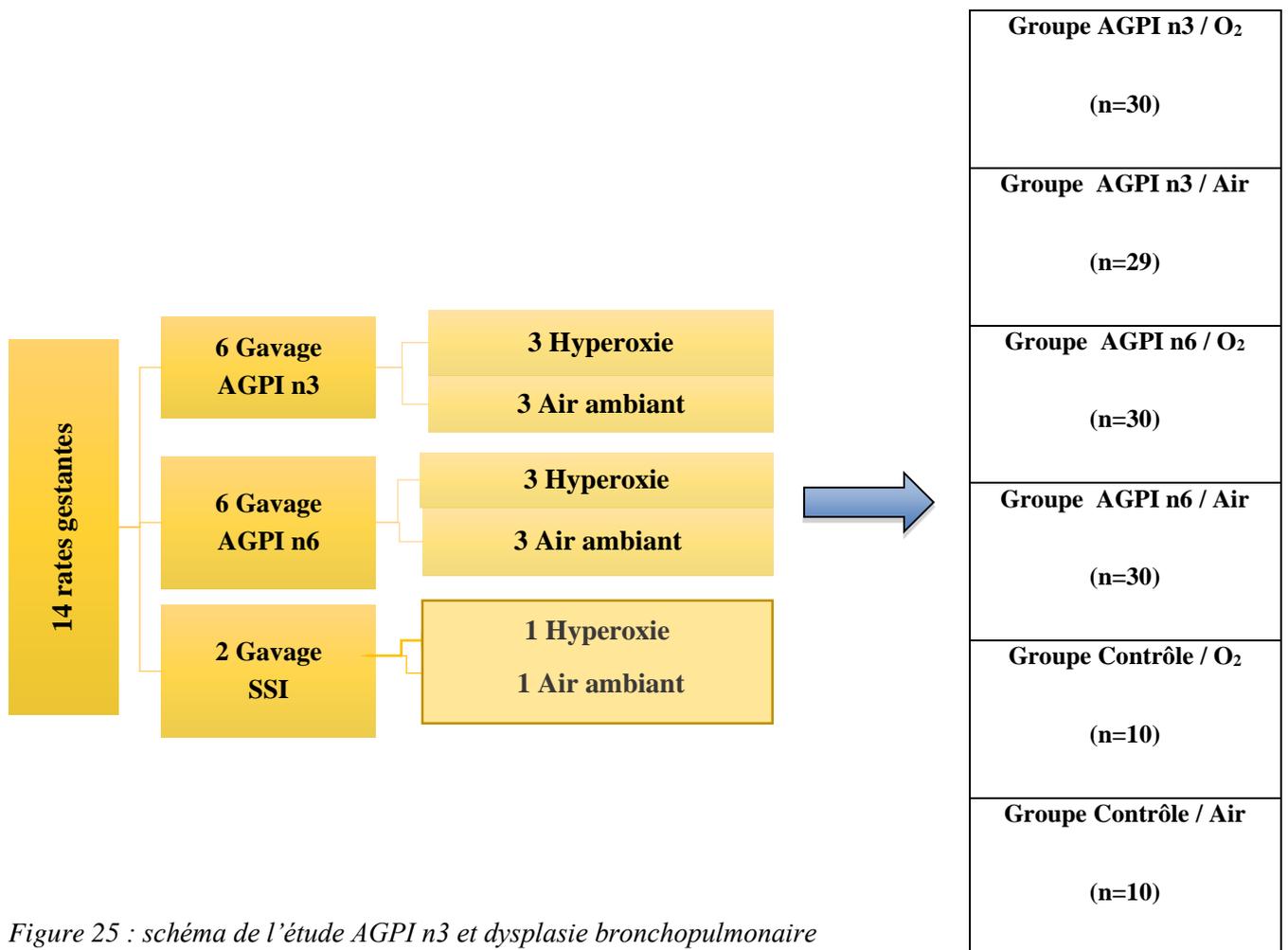
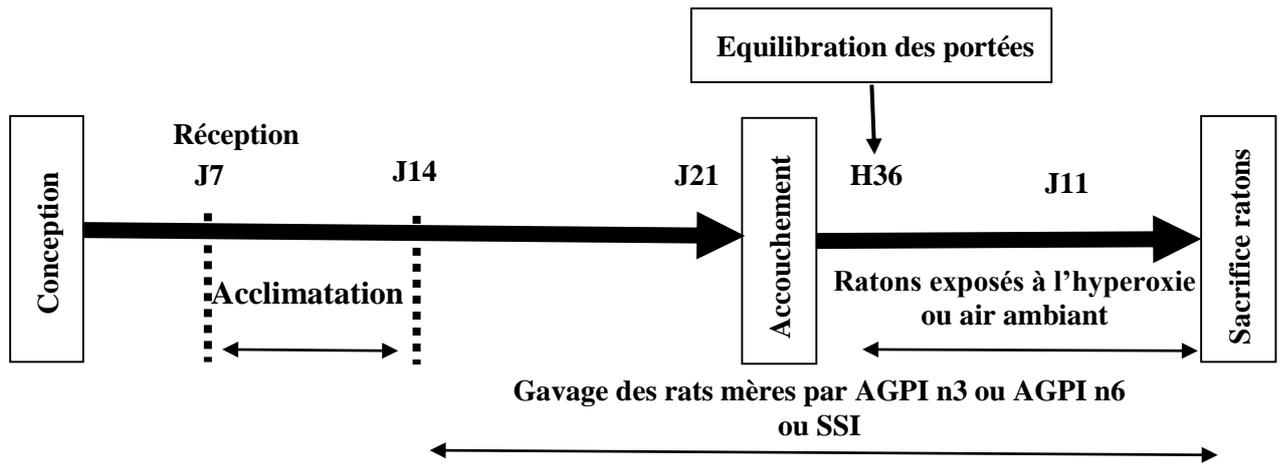


Figure 25 : schéma de l'étude AGPI n3 et dysplasie bronchopulmonaire

V. Résultats

V.A Développer et valider la méthode de MRI pour étudier in vivo la cinétique de la clairance du liquide pulmonaire à la naissance

Le poids de naissance était de 2450 ± 230 g, 3450 ± 800 g, et 3200 ± 650 g dans les groupes preterm, late preterm et late preterm + steroids ($p<0.05$), respectivement.

V.A.1 Liquide et volumes pulmonaires

Le volume pulmonaire à la naissance et avant le début de la ventilation représente la quantité totale. Le volume pulmonaire à (T0) était 38 ± 4 ml/kg, 42 ± 4 ml/kg, et 45 ± 5 ml/kg dans les groupes Preterm, Late preterm, et Late preterm + steroids respectivement ($p=0.15$). Le volume pulmonaire a augmenté d'environ 45% dans chaque groupe ($p<0.05$) (Figure 26). Mais l'augmentation du volume pulmonaire indexé au poids des agneaux était bien plus marquée dans le groupe Late preterm + steroids par rapport au groupe preterm et à partir de la trentième minutes de vie (Figure 26). Concernant le liquide pulmonaire, il diminuait d'environ 45% dans le groupe Late preterm + steroids. Par ailleurs, le liquide pulmonaire n'a pas baissé dans le groupe preterm, au contraire il grimpait d'une façon progressive jusque +30% à 120 min de vie. Finalement, la quantité du liquide pulmonaire restait presque stable dans le groupe Late preterm (Figure 26).

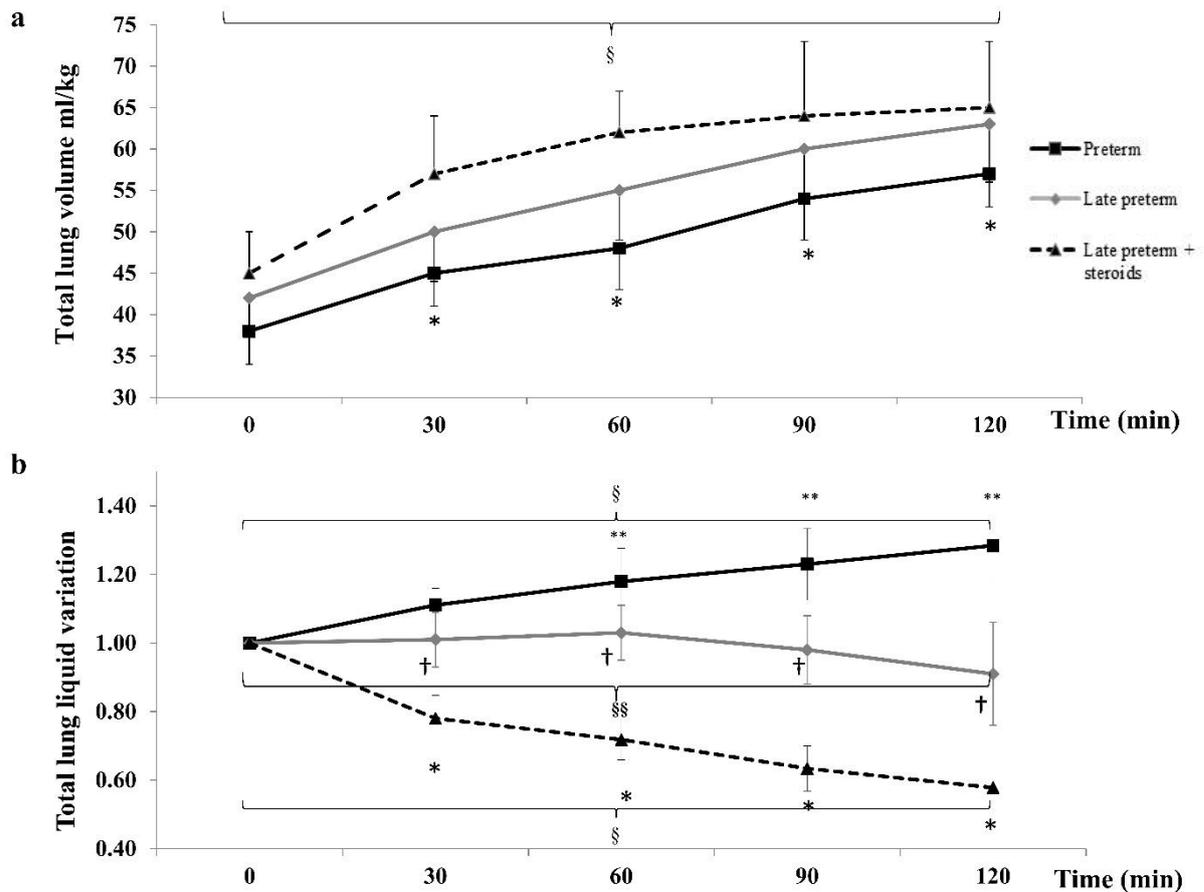


Figure 26: (a) Evolution du volume pulmonaire. Le volume pulmonaire a augmenté dans les 3 groupes. Cette augmentation était plus marquée dans le groupe Late preterm + steroids par rapport au groupe Preterm à partir de 30 minutes de vie. (b) Evolution du liquide pulmonaire. On observe une augmentation progressive et constant jusque + 28% de la quantité totale du liquide pulmonaire dans le groupe Preterm, cette quantité restait relativement stable dans le groupe Late preterm (§§ $p=0.17$), et diminuait de 45% dans le groupe Late preterm + steroids. Résultats exprimés en valeurs moyennes et SEM. * $p<0.05$ entre les groupes Preterm et Late preterm + steroids. ** $p<0.05$ entre les groupes Late preterm et Preterm. † $p<0.05$ entre les groupes late Preterm et Late preterm + steroids. § $p<0.05$ concernant le changement de la quantité du liquide pulmonaire entre le début et la fin de l'expérimentation.

Par conséquent la FRC qui constitue (volume pulmonaire total – volume du liquide pulmonaire) a augmenté rapidement dans le groupe Late preterm + steroids. La constitution de la FRC était plus lente dans le groupe Late preterm, tandis qu'elle était très altérée dans le groupe Preterm. La différence entre les 3 groupes était significative à partir de la trentième minute de vie $p < 0.05$ (Figure 27).

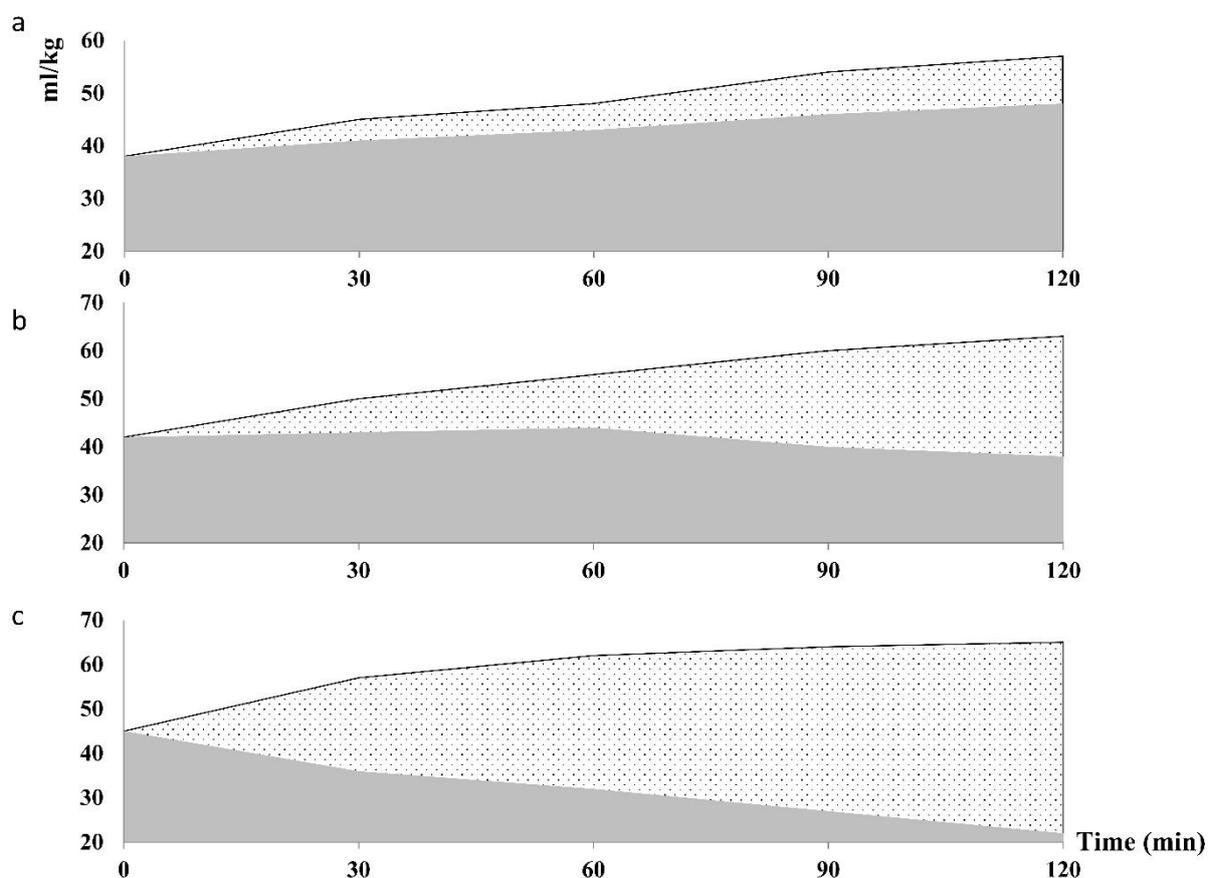


Figure 27: Evolution de la FRC dans le groupe Preterm (a), Late preterm (b), et Late preterm + steroids (c). La FRC était plus élevée dans le groupe Late preterm + steroids que les 2 autres groupes dès la trentième minute de vie ($p < 0.05$). La différence était également significative dès 30 minutes de vie entre le groupe Preterm et le groupe Late preterm. La zone grise représente la quantité du liquide pulmonaire, la zone avec points représente la FRC.

V.A.2 Les fonctions pulmonaires

Les paramètres du gaz du sang, le taux de lactates et la fréquence cardiaque, étaient similaires entre les trois groupes avant le début de la ventilation (Tableau 3). Durant les expérimentations après le début de la ventilation, la FiO₂, la fréquence respiratoire, et les pressions de ventilation étaient plus élevées dans le groupe preterm par rapport aux deux autres groupes (p<0.05) (Tableau 3). Le rapport PaO₂/FiO₂ était plus élevé dans le groupe late preterm + steroids en comparaison avec les autres groupes (Tableau 4). Malgré la majoration des paramètres de ventilation, le PH artériel et la PaO₂ étaient plus bas, tandis que la PaCO₂ et le taux de lactates étaient plus haut dans le groupe preterm par rapport aux autres groupes (p<0.05) (Tableau 4).

Tableau 4: valeurs des gaz de sang dans les trois groupes

	T0			T60			T120		
	Preterm	Late preterm	Late preterm + steroids	Preterm	Late preterm	Late preterm + steroids	Preterm	Late preterm	Late preterm + steroids
FC	175±16	165±17	161±12	185±22*	164±15	160±11	187±18*	154±14	149±9
SpO₂	48±12	55±9	53±12	85±17*	94±5	95±3	78±19*	94±3	94±2
FiO₂	-	-	-	100±0*	36±8	25±4	100±0*	26±3	21±0
FR	-	-	-	60±5*	40±4	40±3	80±5*	40±3	30±5
Pmax	-	-	-	28±5*	24±3	25±4	32±5*	22±3	20±3
Vt	-	-	-	4±1*	7±2	11±4	6±2*	11±3	12±4
PH	7.32±0.1	7.35±0.02	7.36±0.03	7.11±0.1*	7.35±0.06	7.43±0.08	7.15±0.2*	7.32±0.06	7.39±0.06
PaO₂	20±7	23±4	21±3	35±20	46±6	44±5	29±17	42±8	44±5
PaCO₂	51±7	52±6	51±6	89±25*	45±6	39±10	75±33*	47±9	47±12
Bicarb	21±4	24±6	25±5	25±9	22±4	23±4	24±8	24±4	25±5
PO₂/FiO₂	-	-	-	0.3±0.2*	1.3±0.4*	1.8±0.3	0.3±0.2*	1.6±0.3*	2.1±0.2
Lactate	2.2±0.8	1.8±0.5	1.9±0.7	4.2±2.1*	2.1±0.9	1.8±0.7	6.4±3.4*	1.7±0.6	1.9±0.5

FC: fréquence cardiaque BPM; SpO₂: saturation en O₂ en %; FiO₂: fraction de O₂ Inspirée en %; FR, fréquence respiratoire par minute; Pmax, pression inspiratoire maximale en cmH₂O; Vt: volume courant ml/kg; PaO₂ and PaCO₂ en mmHg; Bicarb, bicarbonate en mmol/l; lactate, en mmol/l. Valeurs exprimées en moyenne ± SD. * = p<0.05 en comparaison avec les 2 autres groupes

V.A.3 Les mécanismes respiratoires

Le volume courant augmentait rapidement dans le groupe Late preterm + steroids dépassant largement les 2 autres groupes à 30 minutes de vie, puis il restait stable à environ 15 ml/kg ($p < 0.05$). Le volume courant était faible dans les 2 autres groupes à 30 minutes vie, l'augmentation des paramètres respiratoires a abouti à une légère augmentation légère du volume courant dans le groupe Preterm, et une augmentation plus importante dans le groupe Late preterm avec une différence significative à 120 minutes de vie (Figure 28).

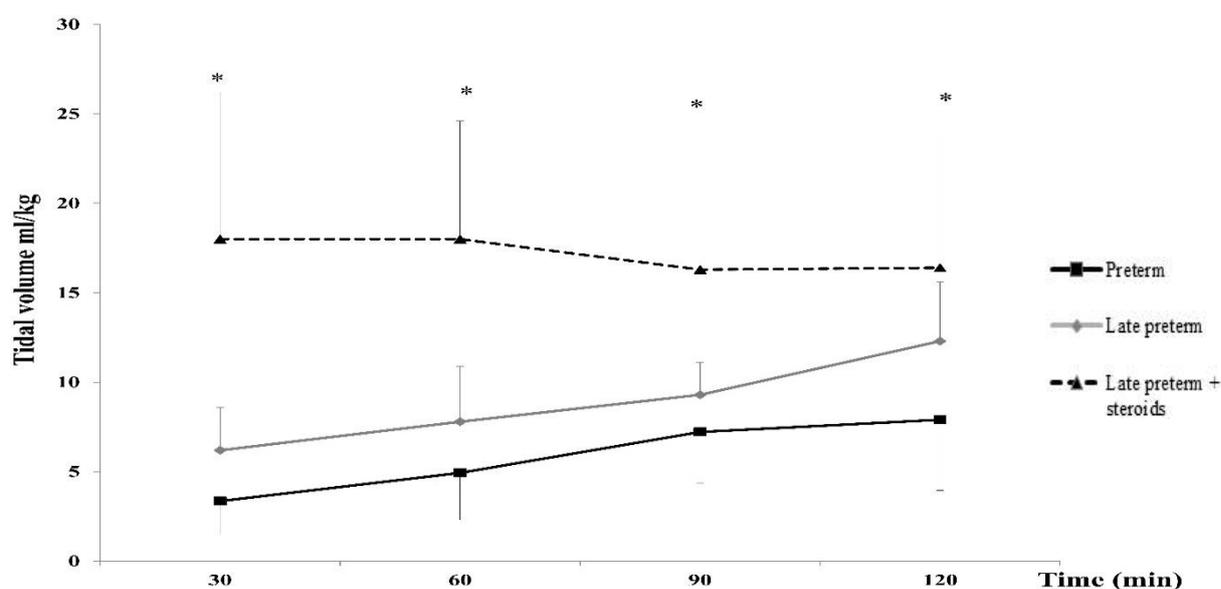


Figure 28 : Evolution du volume courant (Tidal Volume, V_t , ml/kg) dans les 3 groupes. V_t était plus élevé dans le groupe Late preterm + steroids par rapport aux autres groupes pendant toute la durée de ventilation. Résultats exprimés en valeurs moyennes et SEM. *: $p < 0.05$ entre le groupe Preterm et le groupe Late preterm + steroids.

La compliance static du système respiratoire était plus élevée dans le groupe Late preterm + steroids, et plus basse dans le groupe Preterm en comparaison avec les autres groupes à toutes les mesures ($p < 0.05$) (Figure 29). La résistance du système respiratoire était plus élevée dans le groupe Preterm, et plus basse dans les groupes Late preterm (Figure 29)

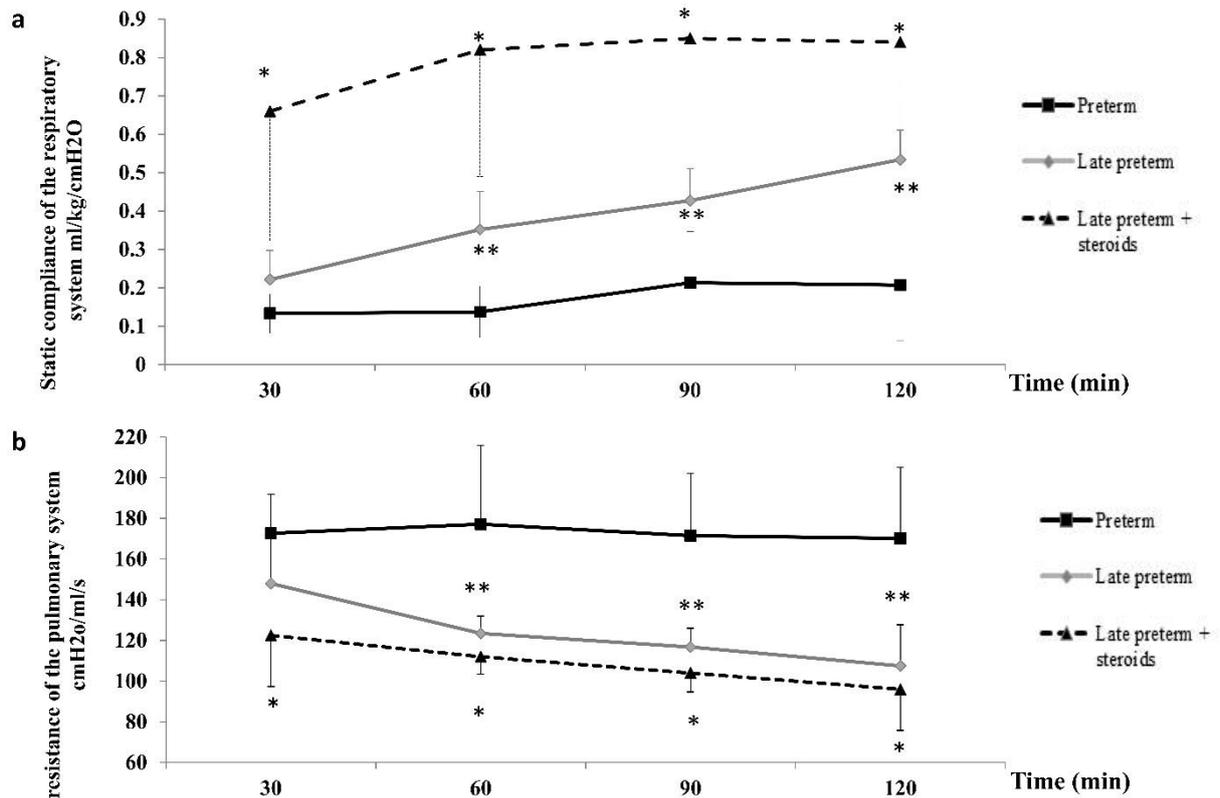


Figure 29: (a) Variation de la compliance du système respiratoire. La compliance static était plus élevée dans le groupe Late preterm+ steroids que les deux autres groupes à tout moment (b) variation de la résistance du système respiratoire. La résistance était plus élevée dans le groupe preterm par rapport aux autres groupes. Résultats exprimés en valeurs moyennes et SEM. * $p < 0.05$ entre les groupes Preterm et Late preterm + steroids. ** $p < 0.05$ entre les groupes Late preterm et Preterm.

Dans les trois groupes, La compliance static du système respiratoire était directement corrélé avec la FRC ($p=0.023$, $r=0.288$) et inversement corrélé avec la quantité du liquide pulmonaire ($p=0.024$, $r=0.226$). Inversement, La résistance du système respiratoire avait une corrélation positive avec la quantité du liquide pulmonaire ($p < 0.001$, $r=0.47$), et négative avec la FRC ($p < 0.001$, $r=0.61$). (Figure 30)

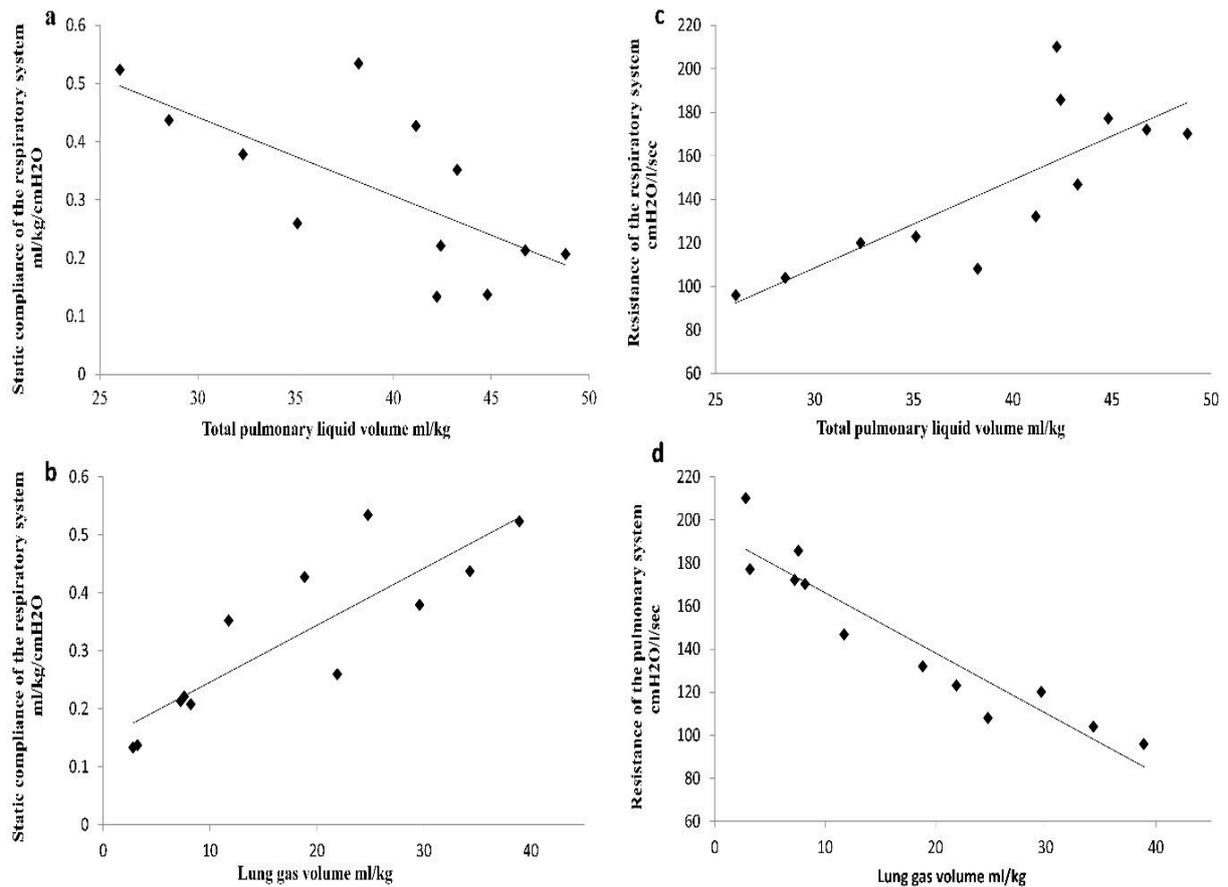


Figure 30: *Corrélation entre le volume pulmonaire, la quantité du liquide pulmonaire avec la compliance static et la résistance du système respiratoire. (a) La compliance static était inversement corrélé avec la quantité du liquide pulmonaire. (b) La compliance static était directement corrélé avec la FRC. Inversement, (c) la résistance du système respiratoire corrélait directement avec la quantité du liquide pulmonaire, (d) et négativement avec la FRC.*

V.B Les effets des AGPI n3 sur l'adaptation ventilatoire à la naissance

Le terme moyen des agneaux inclus était de 127j pour les 3 groupes. Le poids moyen était respectivement de 2925 g (groupe AGPI n3), 2910g (groupe AGPI n6), et 3150 g pour le groupe Contrôle.

Les paramètres des gaz de sang étaient identiques dans les 3 groupes (AGPI n3, AGPI n6, Contrôle) (tableau 5). Dans le groupe AGPI n3, le liquide pulmonaire a augmenté d'environ 22%, contre 24% dans le groupe témoin ($p=0.17$ entre ces deux groupes), l'augmentation était un peu plus marquée dans le groupe AGPI n6 +28% sans qu'elle soit significative (Figure 31).

Tableau 5: valeurs des Gaz du sang dans les 3 groupes à (T0) puis à 60 et 120 minutes après le début de la ventilation

	T0			T60			T120		
	AGPI n3	AGPI n6	Contrôle	AGPI n3	AGPI n6	Contrôle	AGPI n3	AGPI n6	Contrôle
PH	7.32±0.3	7.3±0.07	7.29±0.07	7.18±0.1	7.1±0.1	7.27±0.26*	7.19±0.2	7.1±0.2	7.25±0.2*
PaO₂	20±3	19±7	18±6	83±33	87±36	95±35	40±4	44±19	53±22
PaCO₂	45±7	48±2	47±8	67±19	78±36	63±30	66±6	75±29	57±8*
Bicarb	22±1	23±3	26±2	22±8	20±5	26±5*	21±7	18±6	22±6*
Lactate	3.2±1.8	3.3±2.5	5±2.7	6.6±2.1	8.7±2	6.1±2.7	6.7±2	8.7±0.6	6.1±3*

*Bicarb: bicarbonate en mmol/l; lactate, en mmol/l. Valeurs en moyenne ± DS. * = $p<0.05$ entre les groupes contrôle et AGPI n6.*

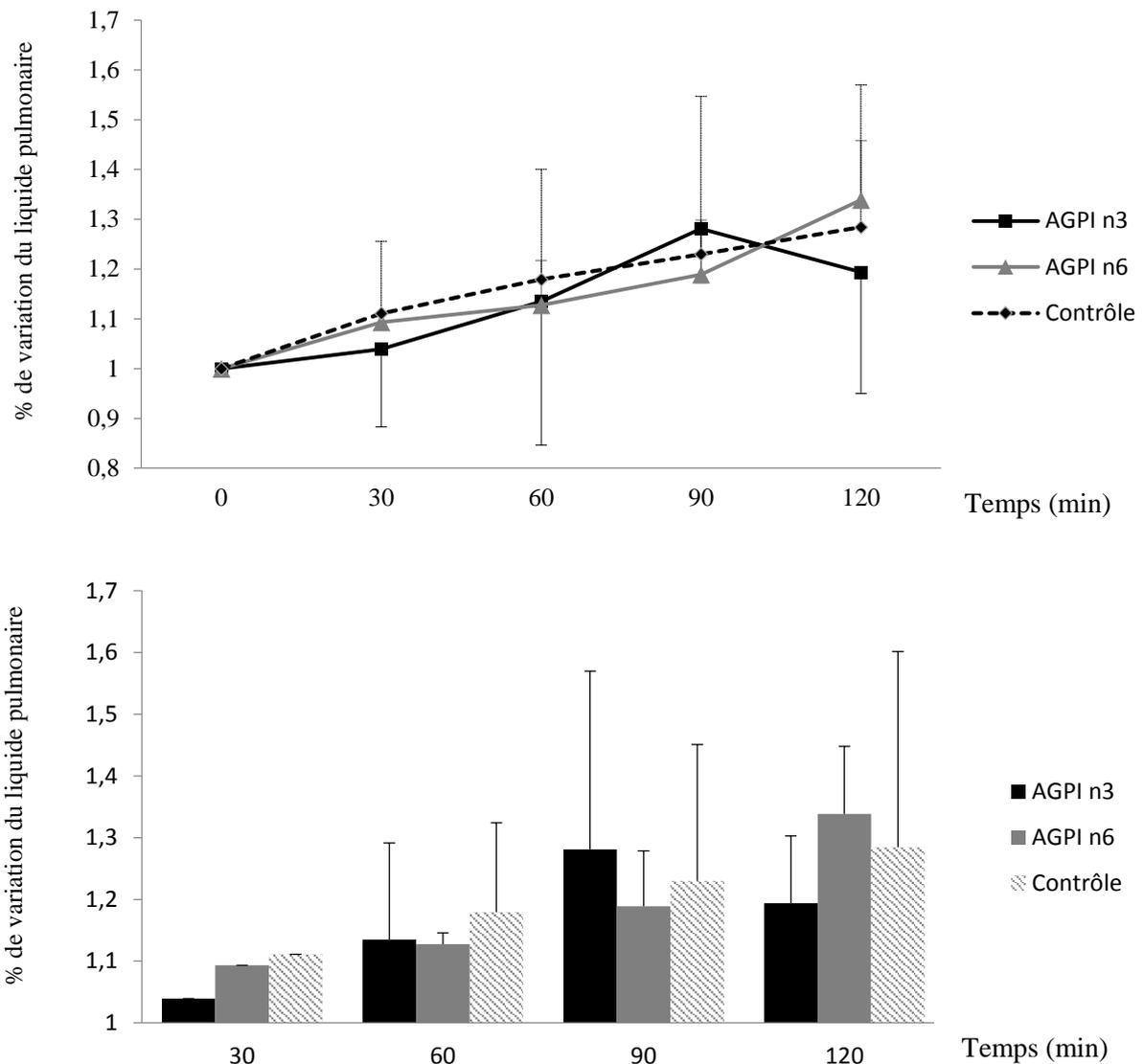


Figure 31 : le pourcentage de variation du liquide pulmonaire dans les 3 groupes. Il n'y avait pas de différence entre les groupes AGPI n3 et le groupe Contrôle. AGPI n3, acides gras polyinsaturés oméga 3, AGPI n6 : acides gras polyinsaturés oméga 6. Résultats exprimés en pourcentage de variation \pm SEM

V.C Les effets des AGPI n3 sur la circulation pulmonaire périnatale

V.C.1 Protocole Omegaven et Intralipide

Nous avons testé les effets des AGPI n3 sur 8 animaux, en moyenne à J4 post opératoire. La perfusion de l'Omegaven n'a pas modifié la fréquence cardiaque (157 ± 2 vs 155 ± 6 bat/min), la pression aortique (45 ± 1 vs 45 ± 2 mmHg), la pression artérielle pulmonaire (47 ± 1 vs 47 ± 2 mmHg), et la pression de

l'oreillette gauche ($2\pm 0,8$ vs $3\pm 0,8$ mmHg). La perfusion de l'Omegaven a induit une augmentation significative des débits pulmonaires (83 ± 3 vs 109 ± 8 ml/min ; $p<0.05$), et une réduction significative d'environ 25 % des résistances vasculaires pulmonaires (RVP) ($43.2\pm 0,8$ vs $33.6\pm 0,8$ dynes.sec. cm⁻⁵; $p<0,05$) (Figure 32). La chute des RVP débutaient environ 20 min après le début de la perfusion des AGPI n3. La vasodilatation pulmonaire persiste après l'arrêt de la perfusion des AGPI n3 pendant plus de 1 heure. Les valeurs de gaz du sang, de la saturation artérielle en O₂ et les concentrations plasmatiques de lactates ne variaient pas en cours d'expérimentation (tableau 6).

Nous avons testé les effets de l'Intralipide sur 5 agneaux, en moyenne à J4 post opératoire. Les PAP, débits de l'artère pulmonaire gauche, et RVP ne se sont pas modifiés de façon significative pendant la perfusion d'Intralipide ($p>0.05$) (Figure 32).

Les valeurs de gaz du sang, de la saturation artérielle en O₂ et les concentrations plasmatiques de lactates ne variaient pas en cours de la perfusion d'Intralipide (tableau 6).

Il existe une différence significative dans l'évolution des résistances vasculaires pulmonaires au cours de la perfusion d'omegavein et d'intralipides ($p<0.05$) (Fig 32).

Les agneaux étaient pesés à la fin de l'expérimentation. Le poids moyen des agneaux était de 3,7 kg. La posologie des lipides était donc d'environ 0,3 ml/kg/h, soit 0,8g/kg (A noter que la posologie habituelle de lipides est d'environ 2g/kg/j pour les nouveau-nés).

Tableau 6 : Valeurs des gaz du sang, de la saturation artérielle en O₂ et de la concentration plasmatique de lactate, avant et après 2 heures de perfusion d'Omegaven 10% ou Intralipide 10%

	Omegaven		Intralipide	
	avant Omegaven	2h après Omegaven	avant Intralipide	2h après Intralipide
pH	7.38±0.01	7.37±0.01	7.37 ± 0.005	7.35 ± 0.01
PCO₂ torr	49±2	50±2	49 ± 1	51±1
PO₂ torr	15±2	15±2	14±1	15±2
HCO₃ mmol/l	28±1	29±1	28±1	27±1
SaO₂ %	51±4	49±4	47±4	48±6
Hb g/dl	12±1	12±1	11±1	11±2
Lactate mmol/l	2±0.55	2±0.5	2±0.55	3±0.52

SaO₂ = saturation artérielle en oxygène, HB= concentration en hémoglobine. Moyenne ± SD

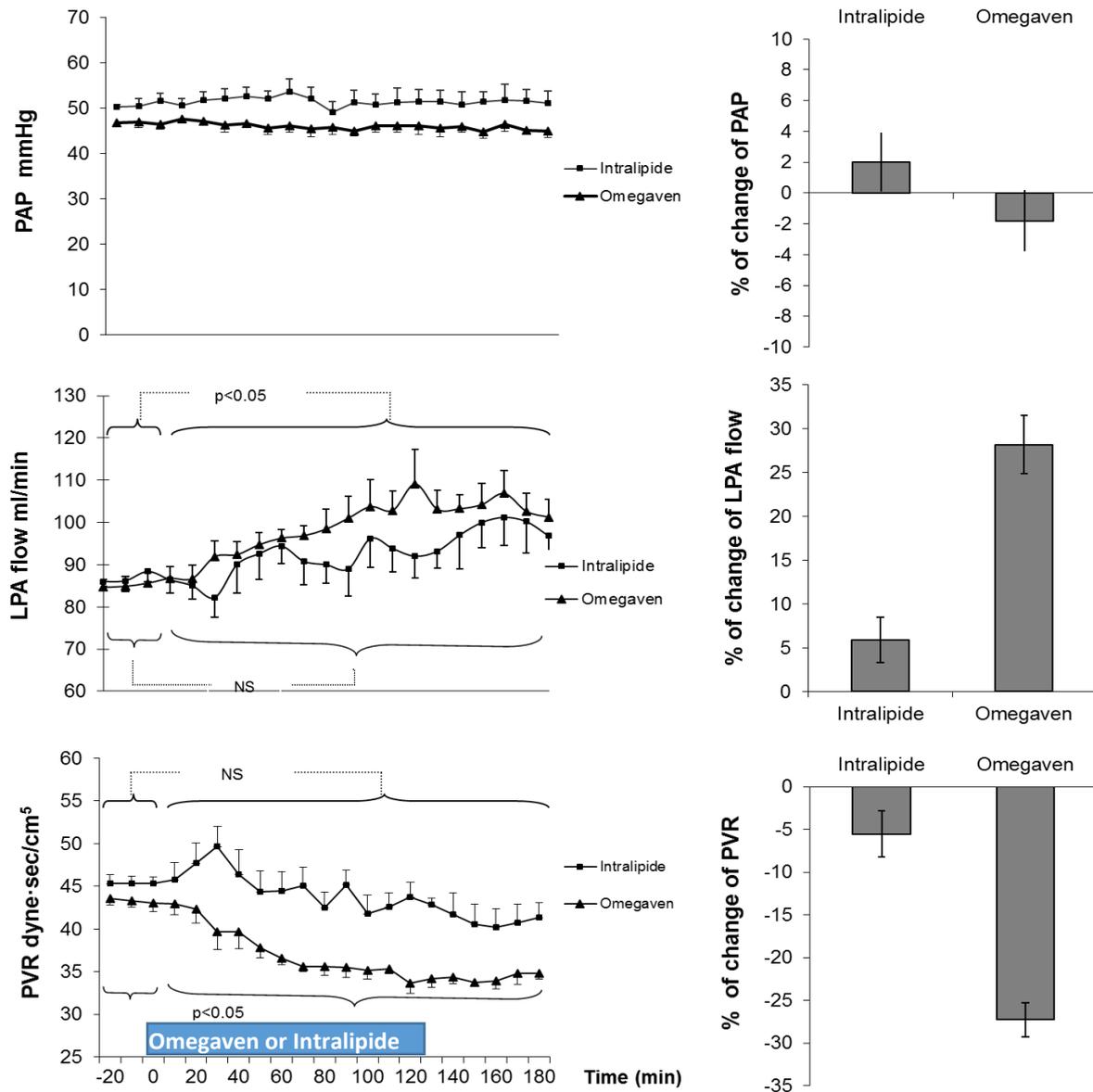


Figure 32 : les effets hémodynamiques pulmonaire de la perfusion de l'Omegaven 10% (n=8) et de l'Intralipide 10% (n=5) (1,2 ml/h pendant 2h) (n=8). La perfusion de l'Omegaven a baissé les RVPs d'environ 25% ($p<0.05$), tandis que le débit de l'artère pulmonaire gauche a augmenté d'environ 30% ($p<0.05$) sans modification de la pression artérielle pulmonaire. La perfusion de l'Intralipide n'a pas modifié ni la résistance vasculaire pulmonaire ni le débit de l'artère pulmonaire gauche (PVR= pulmonary vascular resistance, résistances vasculaires pulmonaires), LPA= left pulmonary artery (artère pulmonaire gauche), PAP=pression artérielle pulmonaire moyenne). Résultats exprimés en valeurs moyennes et SEM

V.C.2 Protocole LNA et LNA - Omegaven

L'injection de LNA a augmenté de façon similaire d'environ 25 % les résistances vasculaires pulmonaires dans les deux groupes ($p < 0.05$). La perfusion de l'Omegaven a réduit de façon significative les résistances vasculaires pulmonaires entre le début à la fin de la perfusion d'oméga-3 d'environ 30 % ($0,78 \pm 0,02$ vs $0,56 \pm 0,03$ mmHg/ml/min: $p < 0,05$). Au cours de la même période, les RVP ne se sont pas modifiées de façon significative dans le groupe « LNA » seul ($0,70 \pm 0,03$ vs $0,65 \pm 0,02$ mmHg/ml/min) (Figure 33). L'évolution des PAP est similaire dans les 2 groupes (Figure 33). La perfusion d'Omegaven a augmenté le débit pulmonaire d'environ 12 % ($p < 0.05$), alors que le débit ne s'est pas modifié dans le groupe sans Omegavein (Figure 33). Les valeurs de gaz du sang, de la saturation artérielle en O_2 et les concentrations plasmatiques de lactates ne variaient pas dans le groupe LNA ou LNA+ Omegaven (tableau 7).

Tableau 7 : Valeurs des gaz du sang, de la saturation artérielle en O_2 et de la concentration plasmatique de lactate, avant et après l'injection de LNA et deux heures de perfusion de sérum physiologique ou AGPI n3.

	LNA + Omegaven		LNA + SSI	
	Avant LNA	Après LNA and 2h d'Omegaven	Avant LNA	Après LNA et 2h de SSI
pH	7.37±0.01	7.34±0.01	7.37±0.01	7.36±0.01
PCO₂ torr	49±2	52±2	45±2	45±2
PO₂ torr	16±1	17±2	17± 1	18±1
HCO₃ mmol/l	28±1	29±0.5	26±1	25±1
SaO₂%	54±3	51±3	55±2	53±6
Hb g/dl	12±1	12±0.3	11±0.8	12±0.7
Lactate mmol/l	1.8±0.3	2.3±0.4	1.5±0.1	2.1±0.4

SaO₂, saturation artérielle en oxygène, Hb, concentration en hémoglobine. Moyenne ± SD

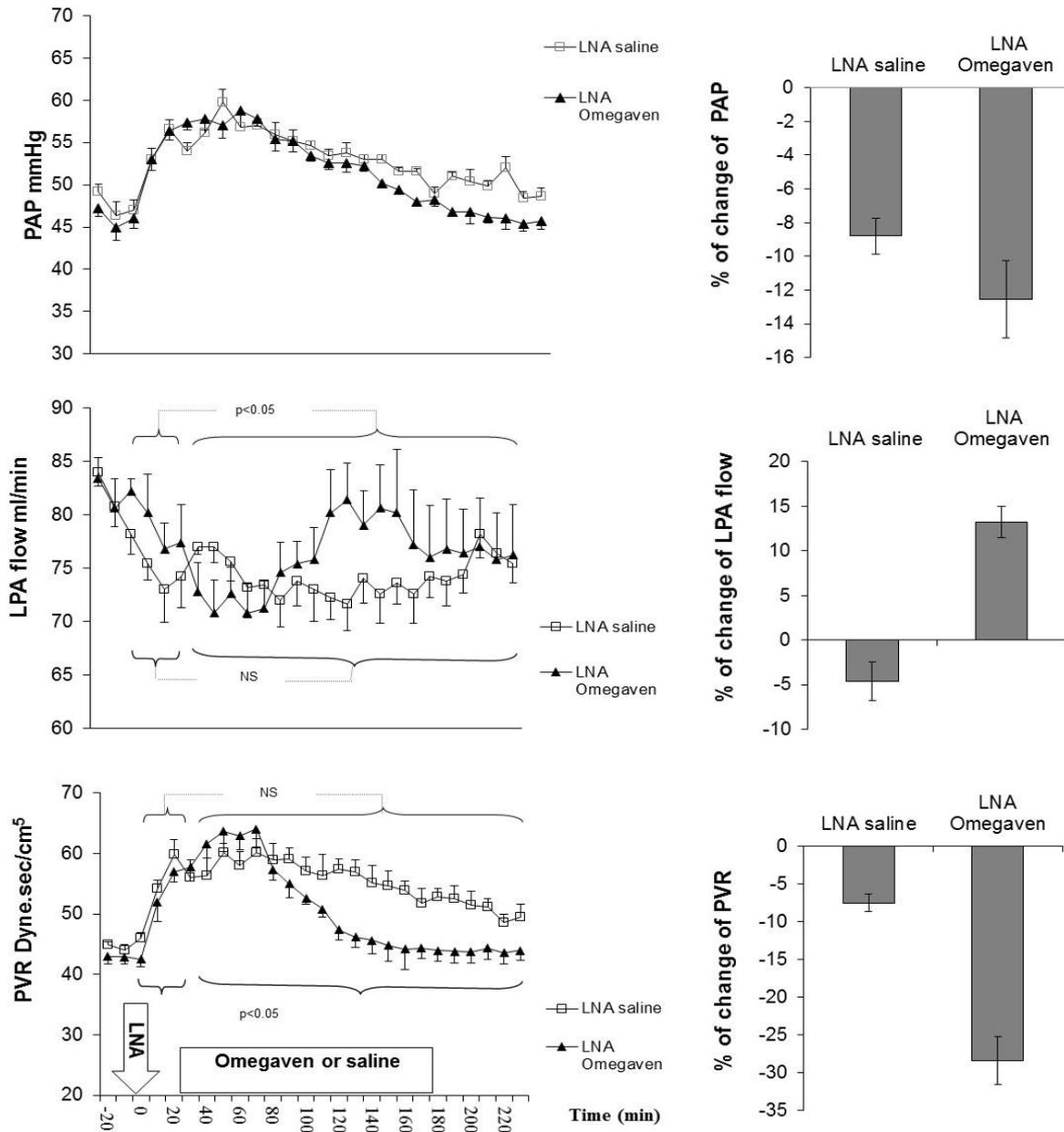


Figure 33; les effets hémodynamiques pulmonaires de l'injection de LNA seul (n=5) ou avec Omegaven (oméga3) (n=5). La perfusion de l'Omegaven a baissé les résistances vasculaires pulmonaires (RVPs) et a augmenté le débit de l'artère pulmonaire gauche (left pulmonary artery LPA) malgré l'inhibition de NO synthase (p<0,05), sans influence sur la pression artérielle pulmonaire moyenne(PAP). Le % de variation du débit de l'artère pulmonaire gauche et des RVPs entre le début et la fin de la perfusion sont plus importants dans le groupe Omegaven que dans le groupe LNA seul (p<0.05). Résultats exprimés en valeurs moyennes \pm SEM. *= p<0.05

V.C.3 Protocoles TEA et TEA - Omegaven

Quatre fœtus d'agneau ont été inclus dans le groupe « TEA » et 5 dans le groupe « TEA - Omegaven ». Les PAP, débit dans l'APG et RVP sont identiques dans les 2 groupes (Figure 34). Notamment, la perfusion d'omegaven n'a pas modifié le débit de l'APG ou les RVP. Le TEA a provoqué une bradycardie significative dans le groupe TEA et le groupe TEA - Omegaven (Respectivement, 146 ± 4 vs 127 ± 4 bat/min ; 154 ± 2 vs 133 ± 10 bat/min ; $p < 0.05$).

Les valeurs du gaz du sang et des lactates sont similaires dans les 2 groupes (Tableau 8)

Tableau 8 : Valeurs des gaz du sang, la saturation artérielle en O_2 et de la concentration plasmatique de lactate, avant et après l'injection de TEA et deux heures de perfusion de sérum physiologique ou AGPI-n3.

	TEA+ Omegaven		TEA + SSI	
	Avant TEA	après TEA and 2 h d'Omegaven	Avant TEA	Après TEA et 2h de SSI
pH	7.37 ± 0.01	7.36 ± 0.01	7.38 ± 0.02	7.38 ± 0.01
PCO₂ torr	49 ± 2	49 ± 3	49 ± 3	49 ± 4
PO₂ torr	15 ± 1	16 ± 2	15 ± 3	15 ± 3
HCO₃ mmol/l	27 ± 1	26 ± 1	29 ± 2	29 ± 2
SaO₂%	48 ± 4	49 ± 5	47 ± 8	44 ± 8
Hb g/dl	11.5 ± 0.1	12 ± 0.5	11.6 ± 0.79	11.3 ± 0.1
Lactate mmol/l	1.63 ± 0.3	1.74 ± 0.2	1.65 ± 0.00	1.3 ± 0.0

SaO₂ = saturation artérielle en oxygène, Hb= concentration en hémoglobine. Moyenne \pm SD

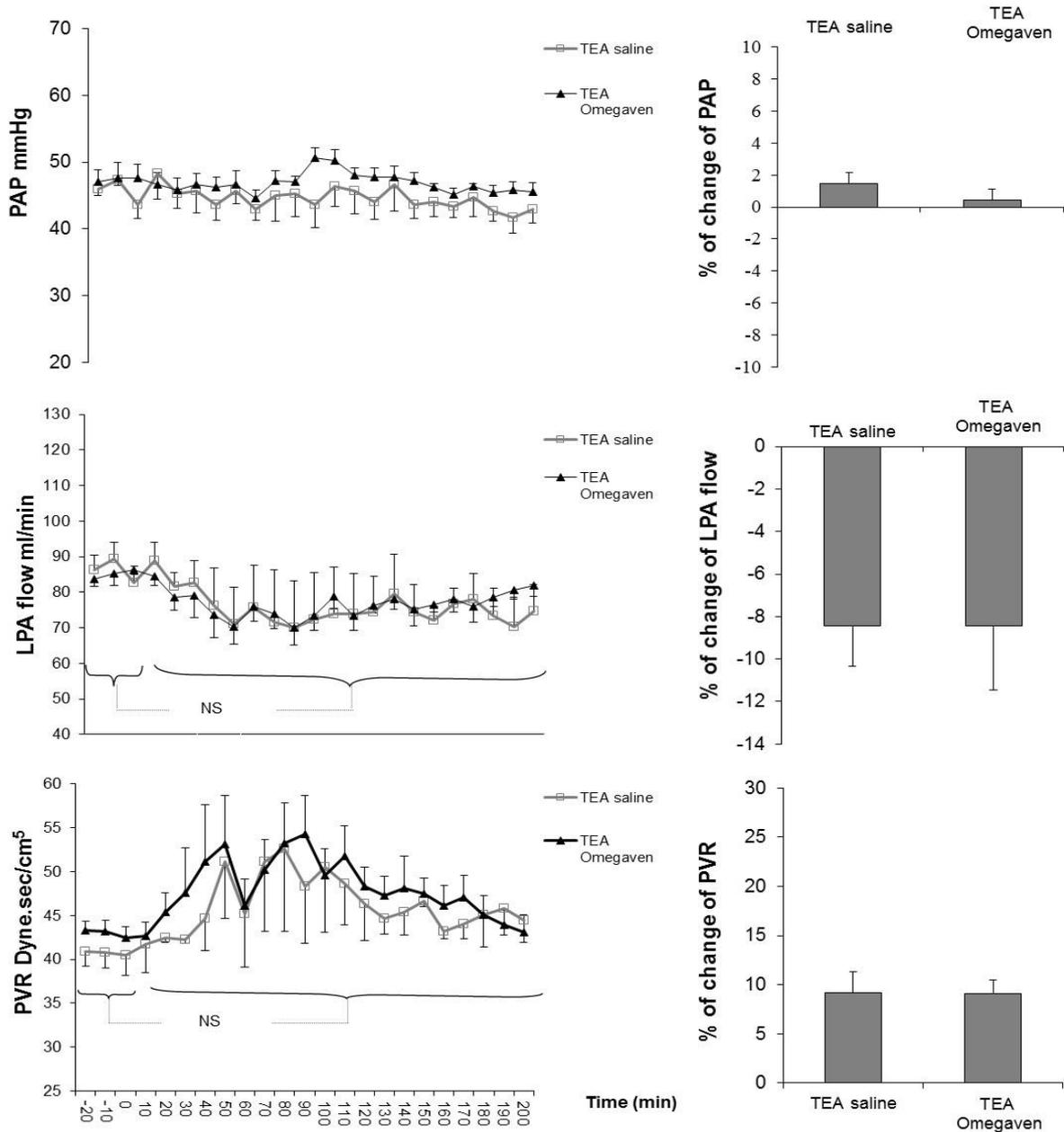


Figure 34: Réponse vasculaire pulmonaire des fœtus d'agneau à l'administration de tétra-éthyl-ammonium (n=5) ou de tétra-éthyl-ammonium + Omegaven (n=5). La pression artérielle pulmonaire moyenne (PAP), comme le débit dans l'artère pulmonaire gauche (left pulmonary artery, LPA) et les résistance vasculaire pulmonaire (RVPs) sont similaires dans les 2 groupes. Résultats exprimés en valeur moyenne \pm SEM (Houeijeh et al 2011). NS, non significative.

V.C.4 Protocole MS-PPOH - Omegaven

Nous avons injecté le MS-PPOH (un inhibiteur sélectif de CYTP450 mono-oxygénase) avant la perfusion de l'Omegaven chez 5 agneaux, en moyenne à J4 postopératoire. Les résistances vasculaires pulmonaires diminuent d'environ 15% ($44 \pm 0,8$ vs $38,4 \pm 5,6$ Dynes.sec.cm⁻⁵; $p < 0,05$) (Figure 35). Cette baisse des RVP exprimée en % de variation des RVP est moins marquée que dans le groupe Omegaven seul ($p < 0,05$) (Figure 35). Le débit de l'artère pulmonaire gauche a augmenté d'environ 20% (80 ± 3 vs 95 ± 6 ml/min ; $p < 0,05$). La pression artérielle pulmonaire et de la fréquence cardiaque ne sont pas modifiées (respectivement : 48 ± 2 vs 48 ± 1 mmHg ; 162 ± 3 vs 169 ± 3 bat/min).

Les valeurs de gaz du sang, de la saturation artérielle en O₂ et les concentrations plasmatiques de lactates ne variaient pas en cours d'expérimentation (tableau 9).

Tableau 9: Valeurs des gaz du sang, de la saturation artérielle en O₂ et de la concentration plasmatique de lactate, avant MS-PPOH et après MS-PPOH et 2 heures de perfusion d'AGPI ω -3.

	MS-PPOH + Omegaven		MS-PPOH + SSI	
	Avant MS-PPOH	Après MS-PPOH et 2h d'Omegaven	Avant MS-PPOH	Après MS-PPOH et 2h de SSI
pH	7.38 ± 0.01	7.37 ± 0.01	7.39 ± 0.03	7.37 ± 0.02
PCO₂ torr	46 ± 1	47 ± 1	47 ± 3	51 ± 2
PO₂ torr	19 ± 0.96	19 ± 1.49	17 ± 2	18 ± 3
HCO₃ mmol/l	27 ± 0.4	28 ± 0.7	28 ± 2	29 ± 2
SaO₂%	55 ± 3	55 ± 5	48 ± 8	47 ± 7
Hb g/dl	11 ± 0.2	12 ± 0.2	11.8 ± 1.1	12.2 ± 1.3
Lactate mmol/l	1.8 ± 0.23	1.9 ± 0.09	2.2 ± 0.1	2.3 ± 0.2

SaO₂ = saturation artérielle en oxygène, Hb= concentration en hémoglobine. Moyenne \pm SD

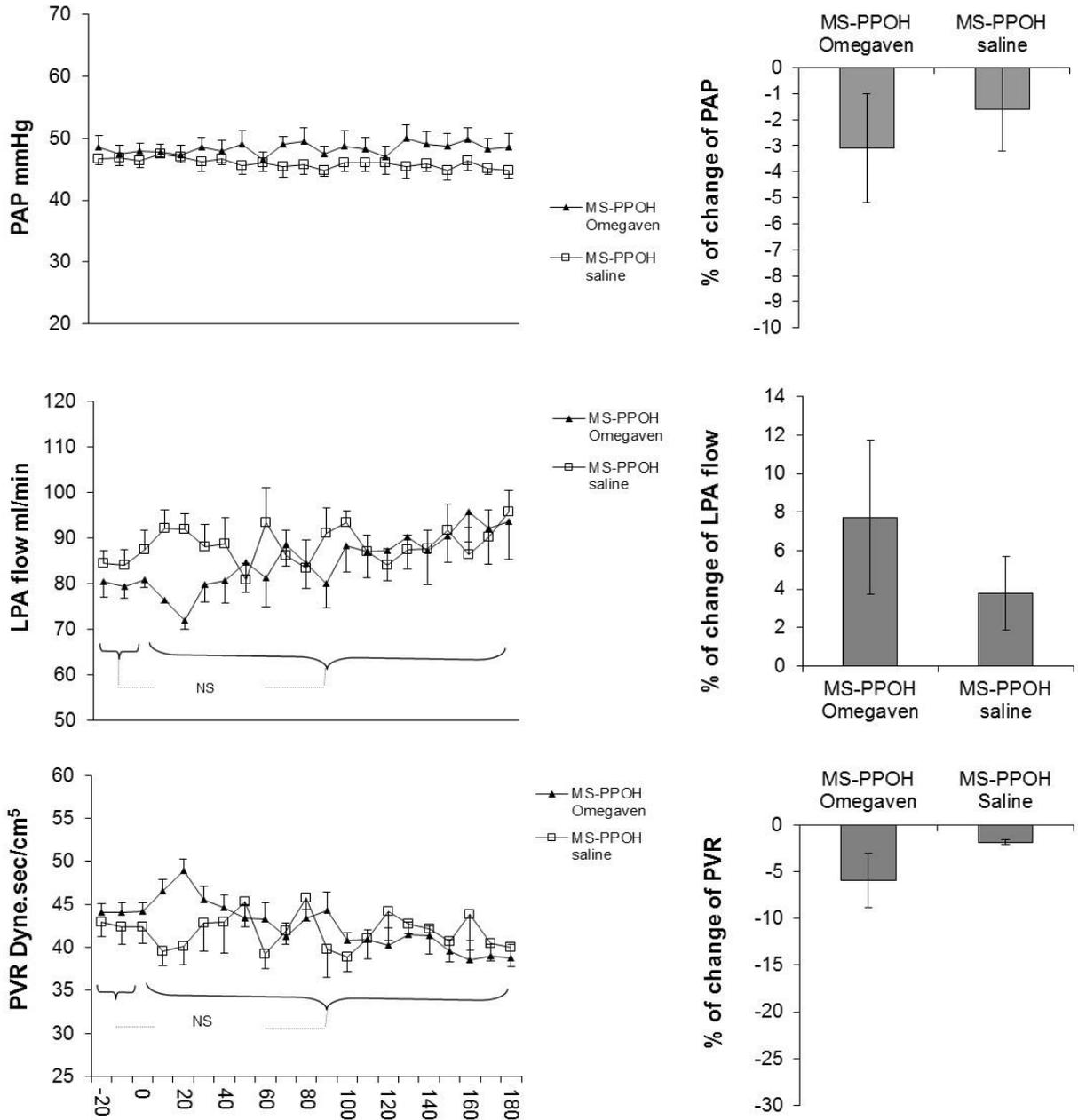


Figure 35: Evolution de la réponse vasculaire pulmonaire à la perfusion avec et sans inhibiteur de Cyt P450 monooxygénase MS-PPOH avec sérum physiologique (n=5) ou l'Omegaven 10% (n=5). Les résistances vasculaires pulmonaire (PVR), le débit de l'artère pulmonaire gauche (left pulmonary artery), ainsi que la pression artérielle pulmonaire moyenne (PAP) n'étaient pas modifiés dans les 2 groupes. Résultats exprimés en moyenne \pm SD. NS, non significative

Pour récapituler, la perfusion d'Omegaven produisait une baisse d'environ 25% des RVP, cet effet restait stable malgré la perfusion de LNA. Il était complètement aboli par la perfusion de TEA, et significativement réduit par la perfusion de MS-PPOH. Nous n'avons pas observé un effet vasodilatateur pulmonaire avec l'autre émulsion lipidique contenant AGPI n6. (Figure 36)

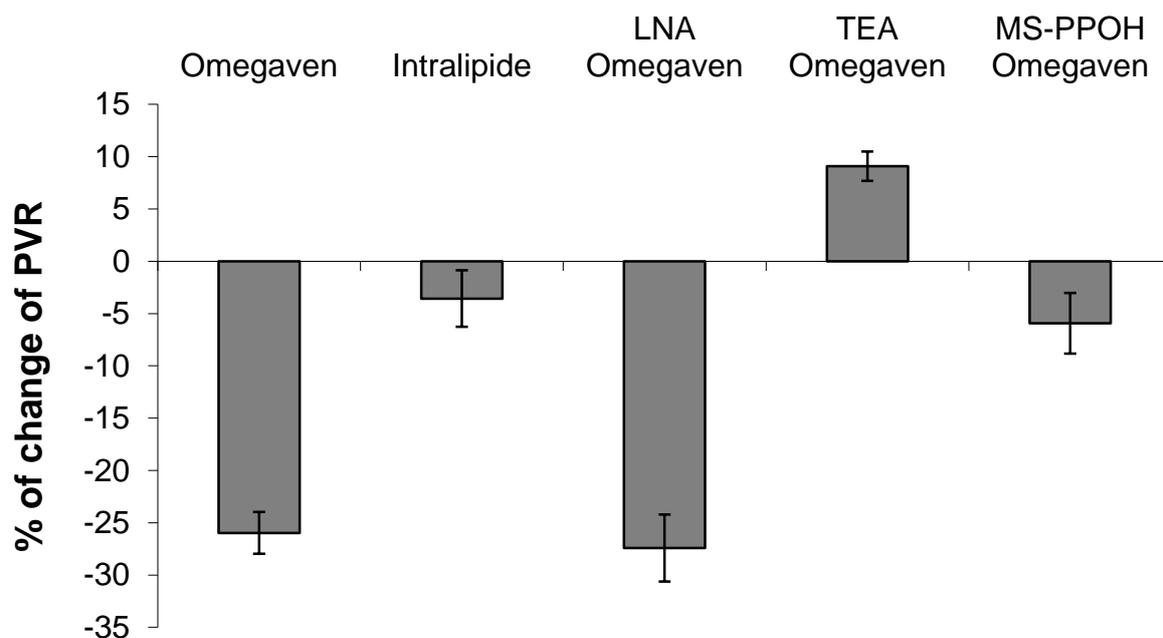


Figure 36 : effets des AGPI n3 et AGPI n6 sur les résistances vasculaires pulmonaires (RVP) par rapport à l'état de base.

L'émulsion lipidique utilisée dans l'étude actuelle (Omegaven) est préparée à partir d'huile de poissons. Elle contient de nombreux AGPI n3 différents, principalement DHA et l'EPA. Pour identifier l'agent actif, Nous testerons cette hypothèse en étudiant la réponse vasculaire pulmonaire à l'EPA et DHA.

V.C.5 Protocole EPA et DHA

Durant l'injection de l'EPA (n=8), il n'était pas observé de modifications dans le temps de la FC, ni de la PAP. On notait une élévation significative du débit de l'APG à partir de la 60ème minute d'injection variant de $84,6 \pm 1,2$ vs $99,7 \pm 1,7$ ml/min ($p < 0,001$). Cette élévation du

débit de l'APG était associée à une réduction significative des RVP de l'APG variant de $0,51 \pm 0,01$ UW ($40.8 \text{ dynes.sec.cm}^{-5}$) vs $0,43 \pm 0,01$ UW ($34.4 \text{ dynes.sec.cm}^{-5}$) ($p < 0,001$). (Figure 37).

Durant l'injection de DHA ($n=7$), il n'était pas retrouvé de modifications statistiquement significatives des FC, PAP ($p=0,540$). Le débit moyen de l'APG de base mesuré à $83,7 \pm 0,17$ ml/min, s'élevait après une heure d'injection de DHA de façon non significative de 6,95%. De même, les variations des RVP constatées n'étaient pas significatives allant de $0,53 \pm 0,004$ UW en base versus $0,50 \pm 0,01$ UW après 60 minutes d'injection de DHA, soit une réduction moyenne des RVP de 4,85 %. (Figure 37)

Les gaz du sang artériel, figurant dans le tableau 10 n'étaient pas modifiés lors de l'injection de l'EPA. Et de DHA

Tableau 10: Modification des gaz du sang artériel pendant l'injection de l'EPA et de DHA

	EPA		DHA	
	avant EPA	2h après EPA	avant DHA	2h après DHA
pH	7.40 ± 0.04	7.38 ± 0.04	$7,39 \pm 0,07$	7.38 ± 0.08
PCO₂ torr	$47,3 \pm 7,49$	$48,1 \pm 8,1$	$46,9 \pm 4,8$	$46,1 \pm 8$
PO₂ torr	$12,7 \pm 4,03$	$13 \pm 4,4$	$13,4 \pm 4,4$	$15,3 \pm 4,6$
HCO₃ mmol/l	$28,9 \pm 3,74$	$28,4 \pm 4,1$	26 ± 1	26 ± 1
SaO₂ %	$49,9 \pm 20,2$	$52,3 \pm 17,8$	$51,7 \pm 19,1$	$54,5 \pm 21,1$
Hb g/dl	12.1 ± 1	12 ± 1	11.6 ± 1	11.7 ± 2
Lactate mmol/l	$4,1 \pm 3,5$	$3,6 \pm 3,8$	$3,05 \pm 3,2$	$3,2 \pm 4,2$

SaO₂ = saturation artérielle en oxygène, Hb= concentration en hémoglobine. Moyenne \pm SD

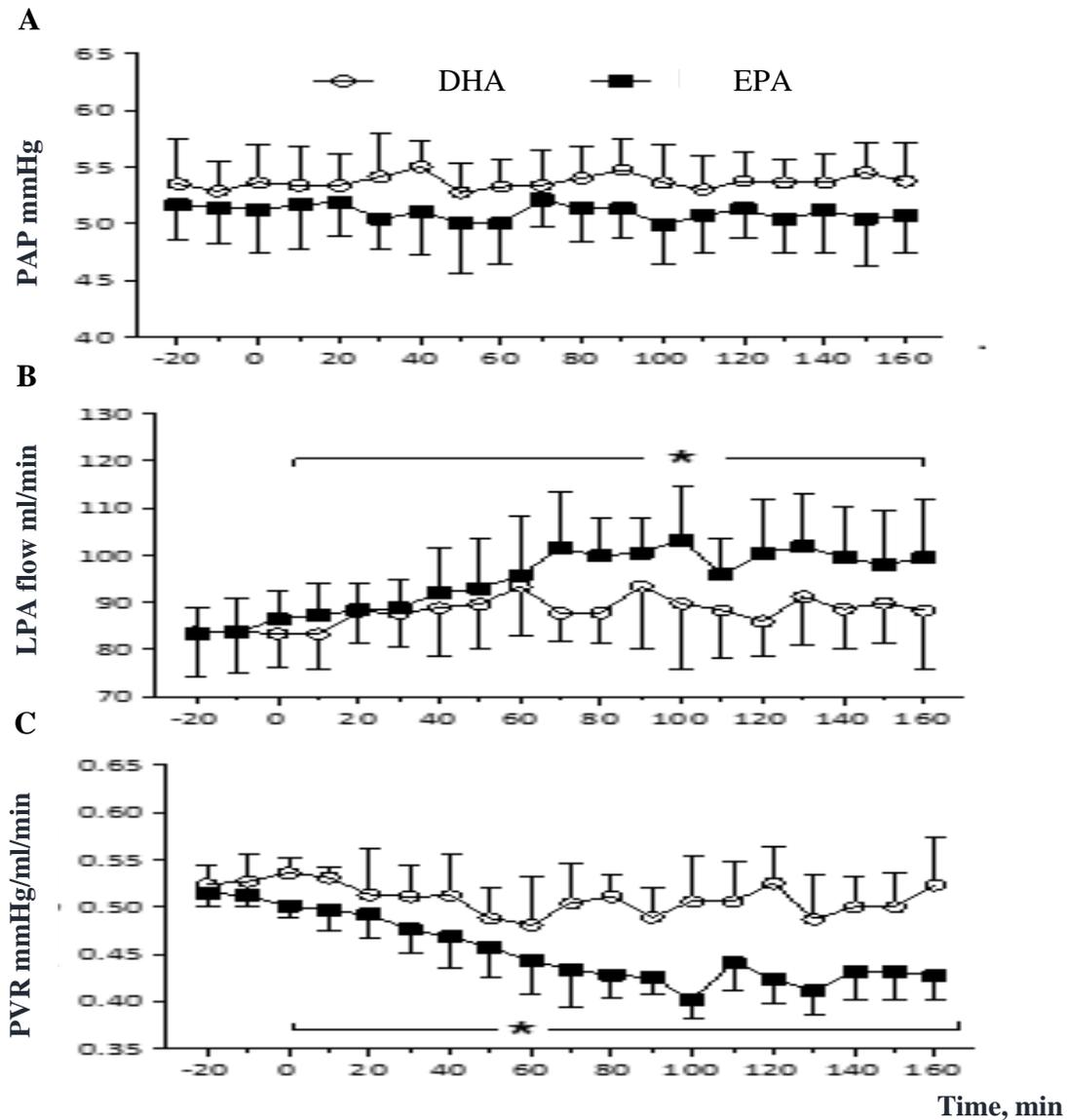


Figure 37: Effets vasculaires lors d'une injection d'EPA et DHA pendant 120 minutes sur (A) la pression artérielle pulmonaire moyenne (PAP), (B) le débit de l'artère pulmonaire gauche (left pulmonary artery, LPA), (C) les résistances vasculaires pulmonaires (PVR). L'EPA provoque une augmentation significative du débit de l'APG de 23,71 % et une réduction significative des PVR de 22 % avec un effet persistant après la fin de l'injection d'EPA ($p < 0,001$). Avec le DHA On observe une élévation non significative du débit de LPA (avec un pourcentage de variation maximale de 12,14 % à T90, $p = 0,157$). Concernant les RVP, l'injection de DHA entraîne une réduction maximale de 10 % à T60 ($p = 0,355$). * = $p < 0,001$ (Courtesy Dr. Sharma)

V.C.6 Protocole éthanol

L'injection de l'éthanol (n=6) dilué ne modifiait pas de façon significative la FC, la PAP moyenne et le débit de l'APG. Les RVP évoluait de $0,52 \pm 0,01$ mmHg/ml/min en base à $0,54 \pm 0,01$ mmHg/ml/min à la fin de l'injection sans que ces variations ne soient statistiquement significatives (Figure 38).

Les gaz du sang artériels, tableau 11, n'étaient pas perturbés durant l'injection d'éthanol.

Tableau 11 : Absence de modifications des gaz du sang artériel lors de l'injection d'éthanol

	Avant éthanol	Après 2h d'éthanol
pH	$7,38 \pm 0,05$	$7,36 \pm 0,06$
PCO₂ torr	$39,8 \pm 5$	$39,6 \pm 4$
PO₂ torr	$15,1 \pm 4$	$15,1 \pm 4$
HCO₃ mmol/l	26 ± 1	$27,3 \pm 1$
SaO₂%	60 ± 18	64 ± 24
Hb g/dl	$11,5 \pm 0,1$	$11,3 \pm 0,2$
Lactate mmol/l	$3,2 \pm 4,7$	$3,6 \pm 5$

SaO₂ = saturation artérielle en oxygène, Hb= concentration en hémoglobine. Moyenne \pm SD

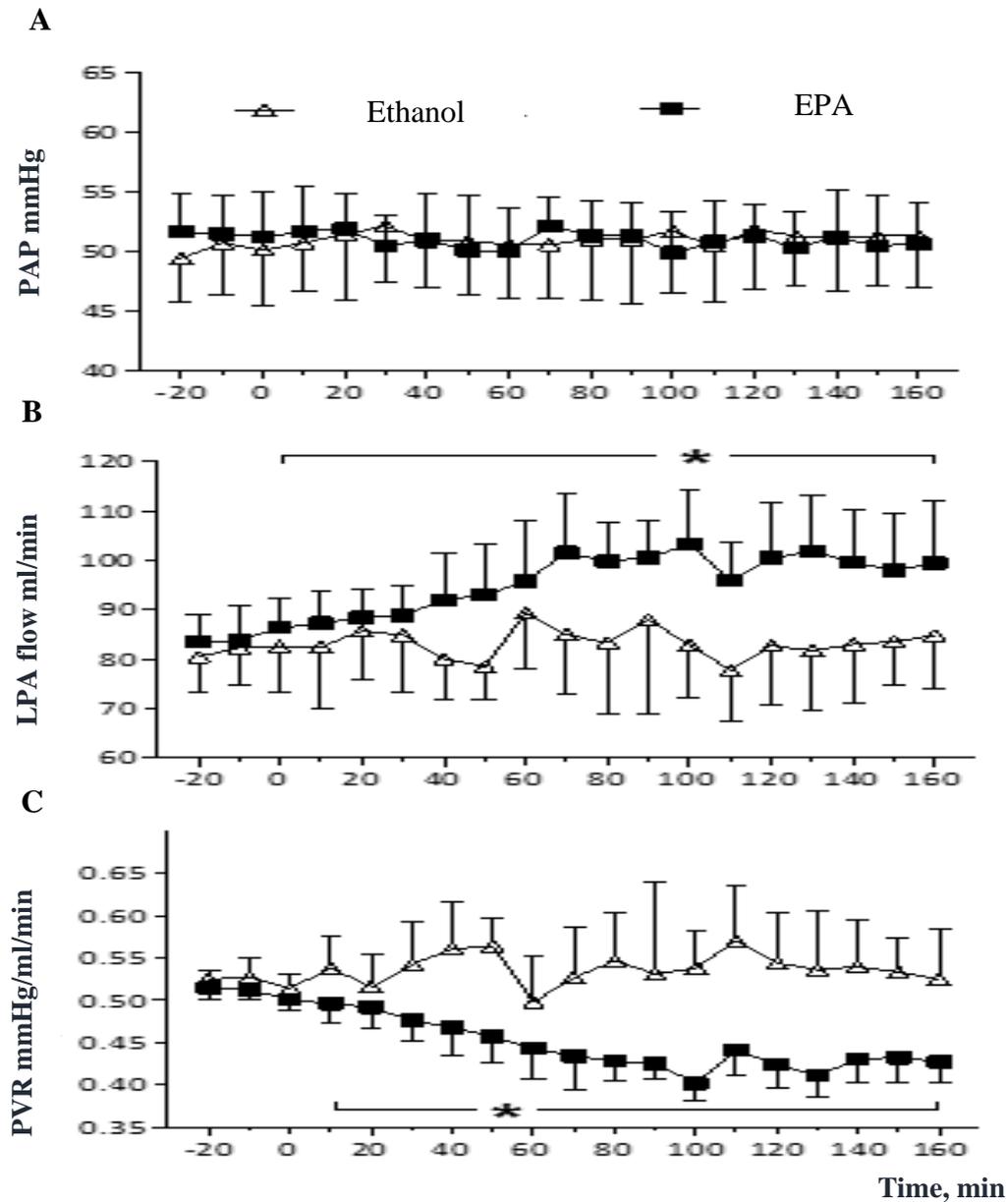


Figure 38: Comparaison entre les effets vasculaires lors d'une injection d'EPA et de l'éthanol sur les résistances vasculaires pulmonaires (PVR) (C), Le débit de l'artère pulmonaire gauche LPA (B) la pression artérielle pulmonaire moyenne (PAP) (A). Les effets vasculaires observés lors de l'injection de 0,25 ml d'éthanol montraient une augmentation non significatives de la PAP en moyenne de 2% par rapport à la base ($p= 0,534$), du débit de l'APG de 2,47 % par rapport au débit de base ($p= 0,612$) et des RVP de 2,62 % en moyenne par rapport à la base ($p= 0,752$). * $p<0.05$ avant et après l'injection de l'EPA. (Courtesy Dr. Sharma)

V.D Le rôle des AGPI n3 dans la prévention des lésions pulmonaires induites par une hyperoxie prolongée

V.D.1 Effets de l'hyperoxie sur la survie

La survie était de 100% dans tous les groupes. Par contre, le poids moyen des rats exposés à l'hyperoxie (à partir du J7 de l'exposition pour le groupe nourri par AGPI n3 et j9 pour le groupe nourri par AGPI n6) était significativement inférieur à celui des groupes air ambiant. Nous n'avons pas observé une différence du poids entre les mères nourrices indépendamment de l'exposition ou non à l'oxygène, ni le type de nourriture (Figure 39).

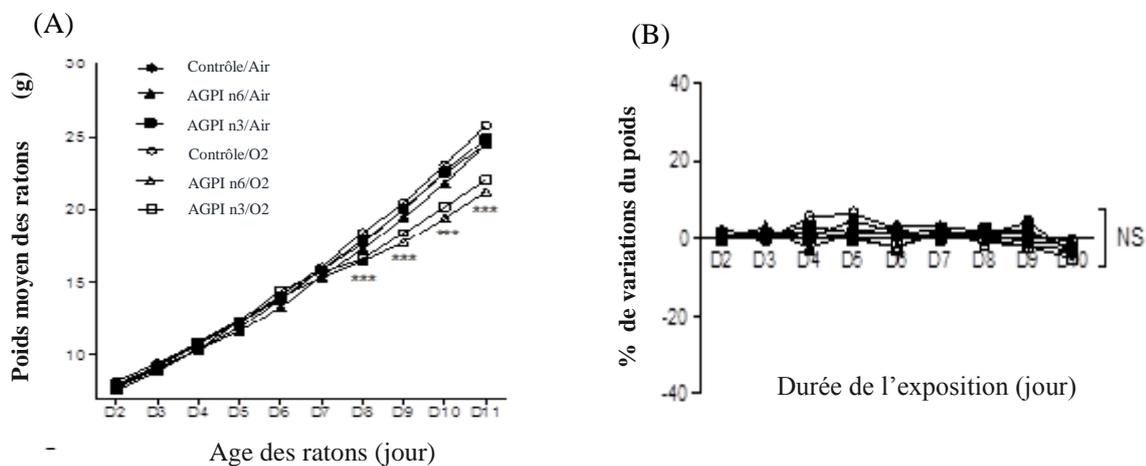


Figure 39 : (A) Evolution du poids des rats (B) variation du poids des rates nourrices en fonction de l'exposition à l'hyperoxie et le type de supplémentation alimentaire. ($n = 30$ dans les groupes AGPI n6/Air, AGPI n3/Air, AGPI n6/O2 and AGPI n3/O2, et $n = 10$ dans les groupes Contrôle/Air et Contrôle/O2). *** $p < 0.05$ entre les groupe AGPI n6/O2 et les groupes Contrôle/Air et AGPI n3/Air, et entre le groupe AGPI n3/O2 et les groupes Contrôle/Air et AGPI n3/Air. NS, non significative. Résultats exprimés en moyenne \pm SEM

V.D.2 Effets des AGPI n3 sur le développement pulmonaire

Le poids des deux poumons (en gramme) des rats exposés à l'hyperoxie était (Contrôle/O₂: 0.49 ± 0.06, AGPI n6/O₂: 0.37 ± 0.01, AGPI n3/O₂: 0.38 ± 0.01). Ce poids était inférieur au poids pulmonaire des rats exposés à l'air (Contrôle/air: 0.49 ± 0.08, AGPI n6/air: 0.43 ± 0.01, AGPI n3/air: 0.45 ± 0.01, $p < 0.001$) (Figure 18). Mais, il n'y avait pas de différence significative quand le poids pulmonaire était indexé au poids du raton (Figure 40).

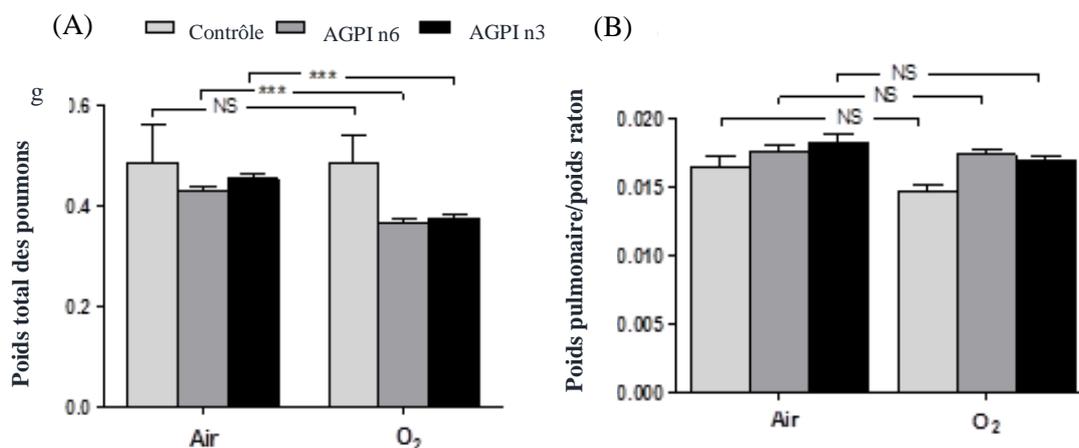


Figure 40: Morphométrie pulmonaire. (A) Le poids des 2 poumons en gramme. Le poids pulmonaire était plus faible dans les groupes nourris avec AGPI et exposés à l'oxygène par rapport aux groupes exposés à l'air. (B) Le poids des 2 poumons indexé au poids du raton. Le poids pulmonaire indexé était similaire dans les groupes indépendamment de l'exposition ou non à l'hyperoxie. Résultats exprimés en moyenne ± SEM, *** $p < 0.05$. NS, non significative

Il n'y avait pas de lésion pulmonaire dans les groupes exposés à l'air ambiant. L'examen histologique des poumons des rats exposés à l'hyperoxie avec FiO₂ 80-85%, montrait les stigmates de la dysplasie bronchopulmonaire. L'hyperoxie induisait dans les groupes Contrôle et AGPI n6 une altération de l'alvéolisation, une baisse du nombre des alvéoles, une diminution de la septation secondaires, et un élargissement des espaces aériens distales avec diminution de la taille des alvéoles (Figure 41).

Tandis que dans le groupe AGPI n3/O2 le nombre des alvéoles par champs a augmenté mais il faudrait noter que la taille des alvéoles a diminué (Figure 41).

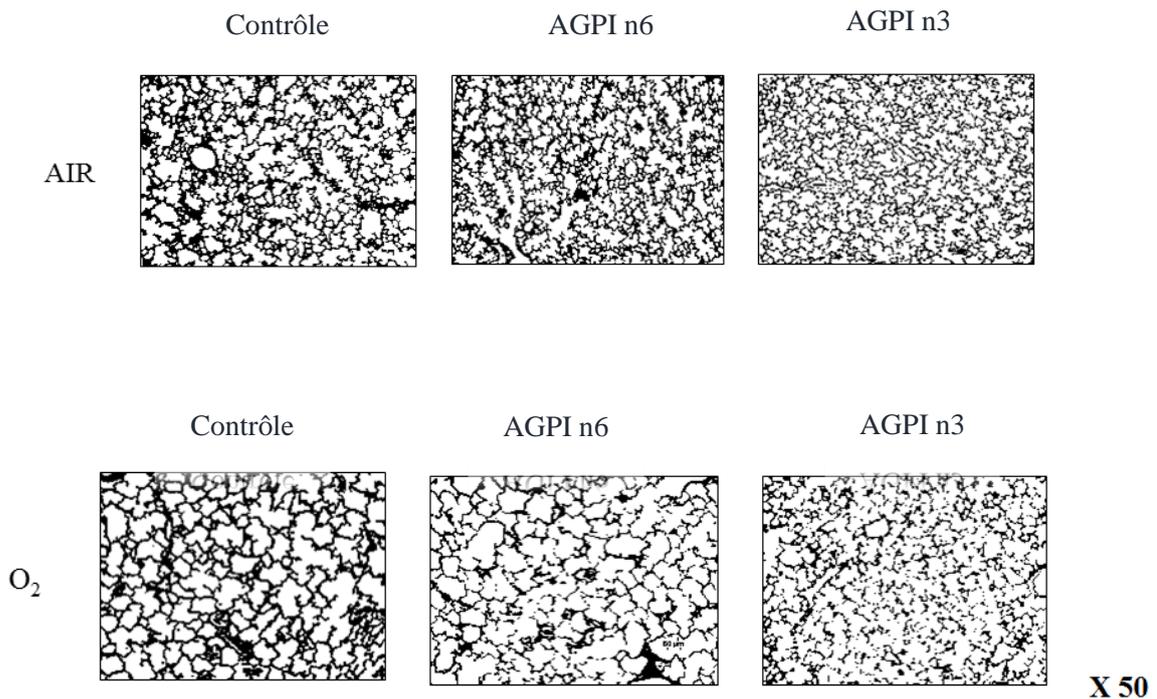


Figure 41: Examens histologiques pulmonaires montrant l'altération de l'alvéolisation dans les groupes AGPI n6/O2 et Contrôle/O2; on note la diminution des nombres des alvéoles et l'élargissement des espaces aériennes distales. Dans le groupe AGPI n3/O2 le nombre des alvéoles par champs est plus élevé par rapport aux groupes précédents mais les alvéoles sont plus petits.

De même, l'hyperoxie altérait la septation alvéolaire. Le nombre des crêtes alvéolaires secondaires diminuait d'environ 50% dans les groupes AGPI n6/O2 (5.2 ± 0.2) et dans le groupe Contrôle/O2 (4.8 ± 0.4), par rapport aux mêmes groupes exposés à l'air ; 9.4 ± 0.4 et 9.7 ± 0.7 pour les groupes Contrôle/air et AGPI n6/air respectivement ($p < 0.001$). D'une façon similaire, La distance moyenne (en μm) entre les alvéoles qui reflète la taille des espaces aériennes distales était 50% plus élevée

dans les groupes AGPI n6/O2 (62.2 ± 1.9) et Contrôle/O2 (60.9 ± 3.9) versus les groupes AGPI n6/Air (41.5 ± 1.9) et Contrôle/Air (40 ± 2) ($p < 0.01$). Enfin, L'épaisseur de l'espace interstitiel en μm était plus élevé dans les groupes en hyperoxie : AGPI n6/O2 6.8 ± 0.4 vs AGPI n6/Air 4.5 ± 0.3 , Contrôle/O2 7.1 ± 0.4 vs Contrôle/Air 4.8 ± 0.3 ($p < 0.05$).

Les AGPI n3 réduisait la toxicité de l'hyperoxie sur les poumons en comparaison avec les deux autres groupes en hyperoxie. Il n'y avait pas de différence significative entre le groupe APGI n3/O2 et AGPI n3/Air en ce qui concerne la septation alvéolaire (8.5 ± 0.4 vs 10.1 ± 0.5 respectivement), mais le nombre des crêtes alvéolaires secondaires était significativement plus élevé que les deux autres groupes en hyperoxie ($p < 0.05$). La distance interalvéolaire était également comparable entre les groupes AGPI n3/O2 et AGPI n3/Air (46 ± 2.6 vs $40.8 \pm 2.6 \mu\text{m}$, respectivement), tandis que cette distance était plus élevée dans les autres groupes exposés à l'O2 ($p < 0.05$). Finalement l'épaisseur de l'espace interstitielle dans le groupe AGPI n3/O2 était proche du groupe AGPI n3/Air (5.8 ± 0.5 vs 4.6 ± 0.4 respectivement), et largement inférieur à cet épaisseur dans les autres groupes d'hyperoxie ($p < 0.05$) (Figure 42).

V.D.3 Effets des AGPI n 3 sur le développement cardiovasculaire

Malgré l'altération du développement pulmonaire, il n'avait pas d'hypertrophie ventriculaire droite dans tous les groupes d'hyperoxie par rapport aux groupes air ambiant. Le rapport (poids ventricule gauche + septum interventriculaire/poids ventricule droit) était similaire dans les différents groupes. Concernant le lit vasculaire pulmonaire, il y avait une augmentation de l'épaisseur de la couche musculaire dans les trois groupes d'hyperoxie par rapport aux groupes air ambiant ($p < 0.05$), mais la supplémentation maternelle en AGPI n3 n'a pas modifié cet épaisseur d'une façon significative par rapport aux groupes AGPI n6/O2 et Contrôle/O2 (Figure 43).

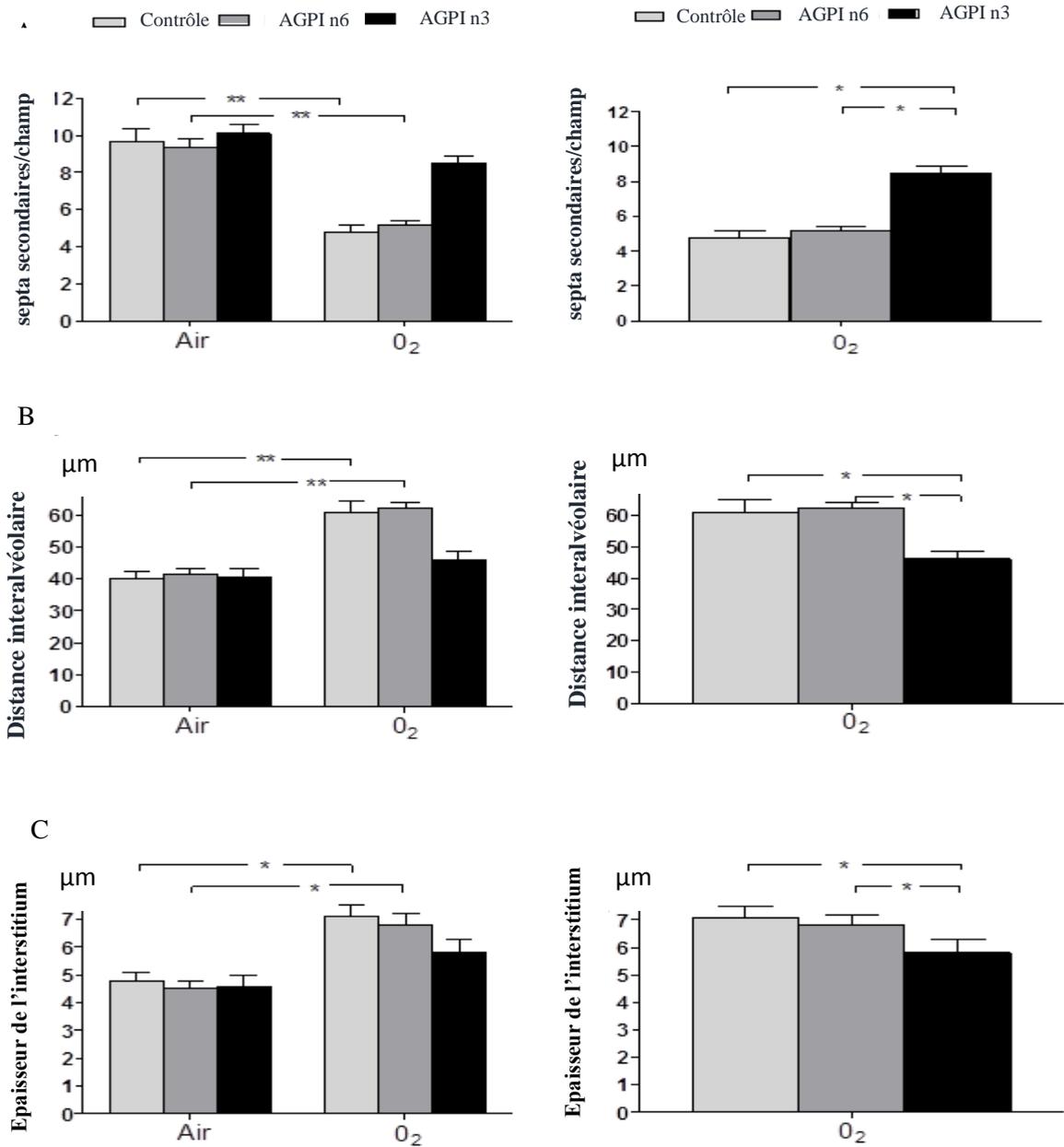


Figure 42 : Etude histologique des poumons (A) le nombre des septa secondaires/champs était diminué dans les groupes AGPI n6/O₂ et Contrôle/O₂ mais pas dans le groupe AGPI n3/O₂. (B) La distance interalvéolaire était plus faible dans le groupe AGPI n3/O₂ par rapport aux autres groupes d'hyperoxie, sans différence significative avec le groupe AGPI n3/Air. (C) L'épaisseur de l'interstitium était plus élevée dans les groupes AGPI n6/O₂ et Contrôle/O₂, mais pas dans le groupe AGPI n3/O₂ par rapport aux groupes exposés à l'air. Résultats exprimés en moyenne \pm SEM. μm , micromètre. * $p < 0.05$

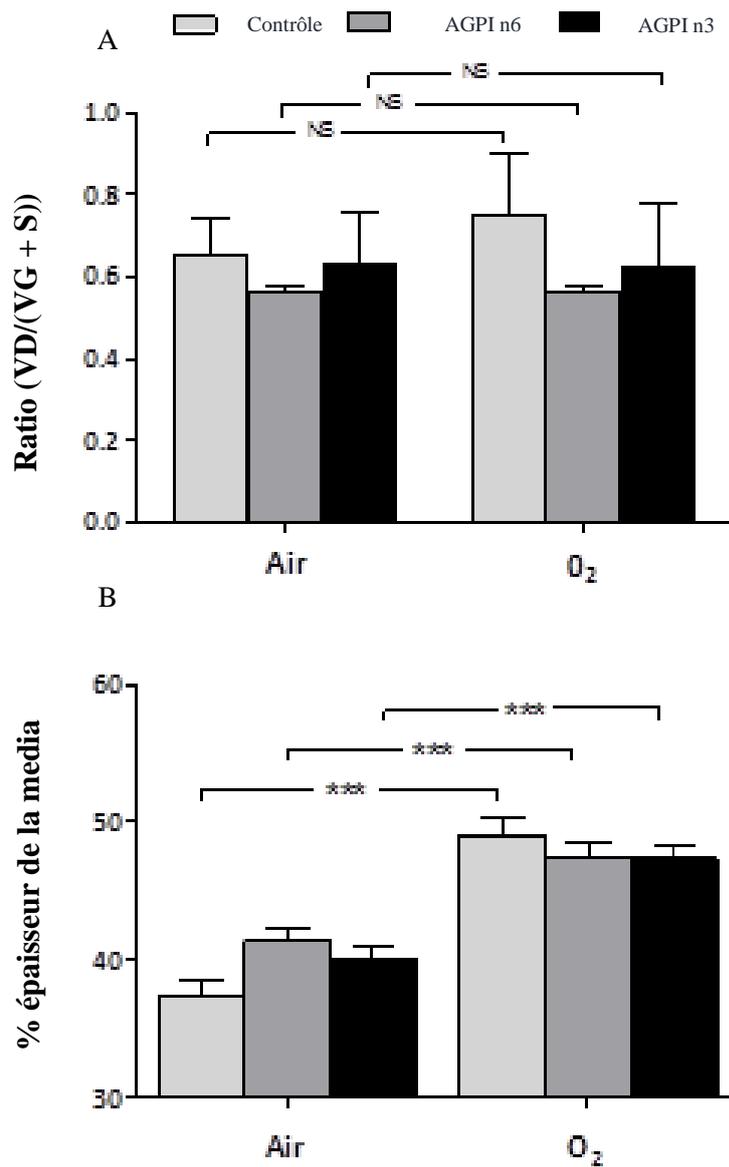


Figure 43 : Analyses morphologiques du cœur et du lit vasculaire pulmonaire. Le rapport $(VD/(VG + S))$ chez les rats était rapproché dans tous les groupes. (B) L'épaisseur du media était plus importante dans les 3 groupes d'hyperoxie mais sans différence significative entre ces trois groupes. VD: Ventricule droit, VG : ventricule gauche, S septum interventriculaire. Valeurs exprimées en moyenne \pm SEM. *** $p < 0.05$. NS, non significative

VI. Discussion

La période périnatale comporte des changements physiologiques majeurs pendant une très courte durée. Ces processus commencent pendant la période anténatale et se superposent. Ces phénomènes physiologiques doivent compenser la disparition de la circulation placentaire qui assurait les échanges gazeux, ainsi que le débit cardiaque. Par conséquent, l'adaptation à la vie extra-utérine requiert une résorption rapide du liquide qui remplit le poumon en période anténatale, l'aération des poumons et la création de la capacité fonctionnelle résiduelle (FRC), ainsi que la multiplication par dix du débit pulmonaire qui devient la seule source du débit systémique. Ces phénomènes ont été étudiés largement. Néanmoins, La cinétique de l'adaptation respiratoire à la naissance, dont l'échec est la principale cause de mortalité et de morbidité chez l'enfant prématuré, est mal connue. La compréhension de cette cinétique permettrait d'adopter les meilleures mesures pour améliorer la formation de la FRC comme la mode de ventilation à la naissance, le clampage tardif du cordon, et l'optimisation de la nutrition parentérale. Nous avons étudié cette cinétique par l'IRM puis nous avons testé l'hypothèse qu'une supplémentation en AGPI n3 permettrait d'accélérer cette adaptation à la naissance.

L'étude de transition périnatale par l'IRM montrait une altération de la résorption du liquide pulmonaire chez les prématurés même dans le groupe proche de terme, et que la création de la FRC était dépendante essentiellement de l'augmentation du volume pulmonaire. Curieusement, le liquide pulmonaire a augmenté d'environ 30 % chez les animaux grands prématurés, tandis que le liquide pulmonaire restait quasiment stable dans le groupe proche du terme. Le traitement par corticoïde induisait une baisse importante du liquide pulmonaire d'environ 50 % dans le groupe proche du terme. La quantité de liquide pulmonaire et la FRC ont impacté de façon significative les fonctions respiratoires chez les animaux prématurés.

Les acides gras polyinsaturés oméga 3 n'ont pas eu un effet positif sur la clairance du liquide pulmonaire chez les animaux prématurés. Par ailleurs, la supplémentation des rats exposés à l'hyperoxie par des acides gras polyinsaturés oméga 3 diminuait les lésions de la dysplasie bronchopulmonaire en comparaison avec les rats supplémentés par des acides gras polyinsaturés oméga 6 ou de sérum physiologique. Finalement, les acides gras polyinsaturés oméga 3 ont montré un effet vasodilatateur pulmonaire chez les fœtus d'animaux prématurés qui présentent de façon naturelle des résistances vasculaires pulmonaires élevées. Nous avons montré que, à la différence des AGPI n6, les AGPI n3 induisent une réponse pulmonaire vasodilatatrice. Cette réponse vasculaire pulmonaire n'est pas modifiée par l'inhibition de la NO synthase, est réduite par l'inhibition de la CYP450 mono-oxygénase, et est abolie par les inhibiteurs des canaux potassiques. Ces résultats suggèrent que les AGPI n3 améliorent la circulation pulmonaire, ils n'ont pas d'effet sur la clearance du liquide pulmonaire. Par contre, ils réduisent les lésions pulmonaires induites par l'oxygène.

Les données principales de notre étude de la transition respiratoire étaient les mesures simultanées et répétées de la quantité totale du liquide pulmonaire et de la FRC avec les mesures de la fonction respiratoire. Ces mesures ont varié de façon importante avec l'évolution du terme. Chez les agneaux grands prématurés dont le terme correspond à un terme de 26 à 28 SA chez l'être humain (Alcorn, Adamson et al. 1981), le liquide pulmonaire a augmenté d'environ 30 % par rapport à sa quantité à la naissance. Ces données sont étonnantes vu que les poumons sont remplis d'eau à la naissance, et comme la création de la FRC est secondaire à la résorption du liquide pulmonaire et l'augmentation du volume pulmonaire, le volume de la FRC était diminué chez les animaux grands prématurés. L'augmentation de la quantité du liquide pulmonaire est probablement due à une diminution de la résorption du liquide pulmonaire mais aussi à une accumulation du liquide secondaire à l'œdème pulmonaire. La prématurité pulmonaire est connue comme facteur important du retard de la clairance du liquide pulmonaire, en raison de la diminution de l'expression des canaux ioniques, plus particulièrement, les canaux sodiques et les pompes NA/K ATPase, ainsi le déficit de surfactant (Bland and Boyd 1986, Wilson, Olver et al. 2007). L'absence de travail altère également la résorption du liquide (Chapman, Carlton et al. 1994).

Plusieurs facteurs participent à l'apparition de l'œdème pulmonaire dans ce groupe comme la maladie des membranes hyalines, et l'hypoxémie sévère qui augmentent la perméabilité vasculaire pulmonaire. Des études précédentes montraient la multiplication par deux du flux lymphatique pulmonaire en cas de maladie des membranes hyalines (Sundell, Harris et al. 1987). Secondairement, l'hypoxémie nécessitait l'application des pressions de ventilation et une FIO₂ plus élevées, ce qui génère un barotraumatisme et un stress oxydatif, qui augmentent l'infiltration du liquide vasculaire vers l'interstitium pulmonaire (Bland 1987, Bland, Carlton et al. 1989). Finalement, l'insuffisance respiratoire empêche la diminution des résistances vasculaires pulmonaires, qui augmente l'infiltration et l'œdème pulmonaire (Humphreys, Normand et al. 1967). Il est important de noter que les études précédentes montraient l'altération de la clairance du liquide pulmonaire mais toutefois une baisse de la quantité totale du liquide pulmonaire (Bland 1987, Sundell, Harris et al. 1987). Cette discordance montre que l'œdème pulmonaire est plus sévère dans notre groupe, à cause d'une prématurité plus importante qui n'a pas eu de traitement par Surfactant, et les conditions non physiologiques (accouchement par césarienne, ventilation mécanique, et la curarisation). Finalement, l'IRM pourrait surestimer la quantité du liquide pulmonaire en raison de l'atélectasie et la présence d'un flux sanguin à vitesse basse, ce qui peut être confondu par du liquide pulmonaire. Ceci montre l'importance de l'œdème pulmonaire dans les pathologies respiratoires des prématurés.

Chez les animaux proches du terme dont le terme correspond à un terme de 36 SA chez l'être humain (Alcorn, Adamson et al. 1981), les quantités du liquide pulmonaire restaient stables et la création de la FRC résultait principalement de l'augmentation du volume pulmonaire. Ces résultats sont compatibles avec les études plus récentes qui montrent que les mouvements respiratoires et l'augmentation du volume pulmonaire sont les moteurs principaux de la résorption du liquide pulmonaire par l'augmentation de la pression transpulmonaire (Siew, Wallace et al. 2009, Hooper, Te Pas et al. 2016). Ces résultats montraient également que la résorption du liquide pulmonaire est altérée chez les animaux proches du terme. L'augmentation de la morbidité respiratoire chez les nouveau-nés proche de terme est déjà connue. Cela est probablement secondaire à un déficit relatif de Surfactant et de l'expression des

canaux sodique, ainsi que les conditions non physiologiques comme l'absence du travail, et l'œdème provoqué par la ventilation mécanique (Bland 1987, Chapman, Carlton et al. 1994, Wilson, Olver et al. 2007). Le traitement anténatal par corticoïdes a accéléré la clairance du liquide pulmonaire avec une augmentation concomitante de la création de la FRC, ce qui témoigne également de la présence d'une prématurité pulmonaire. Les effets des corticoïdes en faveur de l'accélération de la maturation pulmonaire sont déjà décrits. Ils freinent la prolifération cellulaire pulmonaire au profit de l'accélération de la différenciation cellulaire (Jaskoll et al, 1996). D'une façon complémentaire, ils accélèrent la maturité pulmonaire fœtale en augmentant la synthèse du surfactant (Bolt RJ, 2001). De même, les corticoïdes accroissent l'expression et l'activité des canaux sodiques et des pompes Na/K ATPase (Otulakowski et al, 2006, Nakamura et al, 2002). Enfin, Plusieurs études ont indiqué que les traitements corticoïdes pourraient être bénéfiques chez les enfants nés proches du terme surtout en cas d'accouchement par césarienne programmée (Roberts and Dalziel 2006, Sotiriadis, Makrydimas et al. 2009, Gyamfi-Bannerman and Thom 2016).

Les modifications de la résorption du liquide pulmonaire et l'expansion des poumons ont influencé les mécanismes respiratoires. La compliance du système respiratoire est dépendante de la quantité totale du liquide pulmonaire et le volume de la FRC. Cela n'est pas surprenant et compatible avec les rapports précédents (Storme, Riou et al. 1999). L'élévation de la quantité du liquide pulmonaire augmente la résistance visqueuse des voies respiratoires, parce que la viscosité du liquide est beaucoup plus élevée que celle de l'air. Cette résistance visqueuse compte pour environ 40 % de la résistance des voies respiratoires, et par conséquent, l'augmentation du liquide pulmonaire a augmenté de façon significative la résistance du système respiratoire (Rebello, Ikegami et al. 1997, Riou, Leclerc et al. 2002). Ces modifications des fonctions respiratoires influençaient de façon directe également la fonction d'oxygénation et la décarboxylation du sang, nécessitant l'application des pressions de ventilation plus élevées, entraînant un cercle vicieux de majoration de l'œdème pulmonaire comme nous avons observé.

D'autre part, nos résultats de la résorption de l'évolution du volume pulmonaire et de la résorption du liquide pulmonaire sont comparables avec plusieurs études antérieures et cela confirme la haute

précision de l'IRM dans l'évaluation des fonctions pulmonaires. Nous l'avons déjà montré dans nos travaux précédents dans notre laboratoire (Viart et al, 2008). Par ailleurs, l'IRM a un autre avantage, qui est la possibilité de faire des mesures répétées des volumes pulmonaires. Plusieurs travaux précédents ont été menés pour évaluer la capacité de l'IRM à quantifier le liquide pulmonaire, et ils ont trouvé une corrélation très importante entre les mesures faites par IRM par rapport aux méthodes de référence. Cutillo montrait un facteur de corrélation de 0,99 (entre la méthode gravimétrique et les mesures du liquide pulmonaire par IRM) dans leurs études in-vitro (Shioya, Christman et al. 1993). Ce facteur de corrélation était de 0,91 % dans les études in-vivo avec une marge d'erreur d'environ 10 % (Cutillo, Morris et al. 1984, Cutillo, Morris et al. 1986). L'IRM était également utilisée à plusieurs reprises pour quantifier l'œdème pulmonaire avec une très bonne précision (Caruthers, Paschal et al. 1998, Kuethe, Filipczak et al. 2016). Enfin, les études chez les êtres humains confirmaient la précision de l'IRM pour les mesures de l'œdème pulmonaire et la quantité totale du liquide pulmonaire comme c'est le cas chez les nouveau-nés avec dysplasie bronchopulmonaire ou les patients atteints de mucoviscidose (Walkup, Tkach et al. 2015, Theilmann, Darquenne et al. 2016).

La nutrition parentérale est indispensable pour la prise en charge des enfants prématurés. L'optimisation des apports alimentaires est primordiale pour éviter les complications de la prématurité sur le plan cardiaque, respiratoire et neurologique (Bott, Beghin et al. 2006). Pour cette raison nous avons voulu étudier les effets de plusieurs types de supplémentation lipidique sur les fonctions cardiorespiratoires des nouveau-nés, et plus spécifiquement les effets des AGPI n3 qui ont déjà démontrés un effet cardiovasculaire bénéfique chez les patients adultes avec un syndrome de détresse respiratoire aigüe (Mayer, Grimm et al. 2002, Mayer, Gokorsch et al. 2003). La supplémentation par les acides gras polyinsaturés omégas 3 chez le groupe grand prématuré n'a pas modifié la clairance du liquide pulmonaire ni la création de la FRC. Le liquide pulmonaire a augmenté d'environ 20 % chez les animaux nés à un terme de 126 jours qui ont reçu une supplémentation par AGPI n3, cette augmentation était identique dans les groupes témoins. Ce résultat est en faveur que les acides gras polyinsaturés ne modifient pas les principaux facteurs responsables de la clairance du liquide pulmonaire (les canaux

ioniques, le Surfactant, les mouvements respiratoires). Peu d'études ont montré que les AGPI n3 augmentent l'activité des canaux ENaC (Mies et al. 2004). Mais, il faut noter que ces travaux ont été effectués *in vitro* et dans les tissus rénales. Par ailleurs, nous avons étudiés une population de grande prématurité où l'expression des canaux ioniques est logiquement faible (Bland et al, 1999). Il est intéressant de noter que la supplémentation en AGPI n3 n'a pas empêché l'augmentation du liquide pulmonaire d'environ 20% suite à un probable œdème d'origine inflammatoire. D'autres travaux ont montré l'intérêt des AGPI n3 dans la diminution de l'inflammation dans les maladies respiratoires comme le syndrome de détresse respiratoire aigüe (Pontes-Arruda, et al. 2008). Des effets identiques ont été observés en cas d'infection à *Pseudomonas aeruginosa* avec une nette baisse de l'inflammation (Caron, Desseyn et al. 2015). Nous expliquons l'absence de l'effet anti-inflammatoire par la courte durée de supplémentation (4 j) contre 5 semaines dans l'étude de Caron et al. De plus, on a peu d'informations sur le métabolisme placentaire et fœtal des AGPI n3, et par conséquent la biodisponibilité des AGPI n3 dans les tissus pulmonaires du fœtus d'agneau (Kabaran, 2015).

Comme les effets respiratoires, des effets bénéfiques cardiovasculaires des AGPI n3 ont été décrits chez l'adulte. De nombreux travaux ont montré que les AGPI n3 ont un effet protecteur cardiaque et vasculaire. La consommation d'AGPI n3 est en effet associée à une diminution significative de la mortalité et de la morbidité par pathologies cardiovasculaires: diminution de la pression artérielle systolique et diastolique, diminution de la concentration plasmatique de triglycérides, réduction de l'athérosclérose, réduction des accidents cardio-vasculaires (Calder 2004, Abdukeyum, Owen et al. 2008, Massaro, Scoditti et al. 2008). Les effets vasculaires pulmonaires sont moins bien documentés. Un effet vasodilatateur des métabolites des AGPI n3 a été montré *in vitro* sur des artères pulmonaires humaines (Morin, Sirois et al. 2009). Les métabolites produits indirectement par des AGPI n3 comme la PGI₂ sont utilisés en clinique humaine pour traiter l'hypertension artérielle pulmonaire (McLaughlin, Archer et al. 2009). Dans l'étude actuelle, nous montrons que les AGPI n3 induisent une augmentation des débits pulmonaires et une réduction des résistances vasculaires pulmonaires en période périnatale. Il s'agit bien d'une réponse spécifique de la série 3 des AGPI puisque l'Intralipide ne modifie pas le

tonus vasculaire pulmonaire. D'une façon intéressante, la réponse vasodilatatrice pulmonaire persiste pendant toute la durée de la perfusion d'AGPI n3 et se poursuit à l'arrêt de la perfusion pendant une durée d'au moins une heure. Cette réponse vasodilatatrice pulmonaire est particulièrement originale parce qu'à ce jour, tous les vasodilatateurs pulmonaires connus n'entraînent qu'une réponse transitoire et brève d'environ 1 heure malgré la poursuite du traitement chez le fœtus. C'est le cas par exemple pour l'effet de l'oxygène, de l'acétylcholine, du sildénafil, de la bradykinine, ou de l'effet des contraintes de cisaillement (Storme, Rairigh et al. 1999, Storme, Rairigh et al. 1999, Storme, Rairigh et al. 1999). Nous montrons par ailleurs, que l'administration d'AGPI n3 n'a pas altéré les paramètres de l'hémodynamique systémique. La fréquence cardiaque, et la pression artérielle systémique n'ont pas été modifiées par la perfusion d'AGPI n3. Le fait que la pression de l'oreillette gauche soit aussi restée stable indique par ailleurs que la pré-charge du ventricule gauche ainsi que la fonction ventriculaire gauche n'a pas été altéré par les AGPI n3. Il peut paraître surprenant que les pressions artérielles pulmonaires n'aient pas diminué malgré la vasodilatation pulmonaire. Cette absence de modification des pressions artérielles pulmonaires est attendue en période fœtale, puisque l'artère pulmonaire et l'aorte communique par le canal artériel : les pressions pulmonaires et systémiques sont donc toujours similaires pendant la vie tant que le canal artériel est largement perméable (Storme, Rairigh et al. 1999, Storme, Rairigh et al. 1999, Storme, Rairigh et al. 1999). Dans notre étude, l'évolution parallèle des pressions pulmonaires et systémiques indique donc que les AGPI n3 n'ont pas modifiés la perméabilité du canal artériel. Enfin, les AGPI n3 n'ont pas modifié les gaz du sang. Cette donnée indique que les AGPI n3 n'ont pas altéré la perfusion placentaire. De même, la stabilité de la concentration plasmatique des lactates indique que les AGPI n3 n'ont pas modifié l'oxygénation tissulaire. Au total, les AGPI n3 induisent une réponse vasodilatatrice prolongée chez le fœtus d'agneau sans effet délétère ni sur la circulation systémique ni sur l'oxygénation tissulaire.

La circulation pulmonaire fœtale se caractérise par un faible débit sanguin pulmonaire, inférieur à 10% du débit cardiaque. Les résistances vasculaires pulmonaires (RVP) élevées entraînent un shunt du débit cardiaque droit vers l'aorte à travers le canal artériel. A la naissance, les RVP diminuent rapidement

entraînant une augmentation importante du débit sanguin pulmonaire. Cette chute rapide des RVP est la conséquence d'une vasodilatation (Storme, Rairigh et al. 1999). De multiples mécanismes contribuent à cette adaptation circulatoire à la vie extra-utérine, comme la ventilation alvéolaire, l'augmentation des pressions partielles en O₂, les contraintes vasculaires de cisaillement « shear stress » et la libération de médiateurs vasodilatateurs (Storme, Rairigh et al. 1999, Storme, Rairigh et al. 1999, Storme, Rairigh et al. 1999). Les pathologies respiratoires de la période néonatale tels que l'inhalation méconiale, la maladie des membranes hyalines, l'infection materno-fœtale ont en commun d'être associées à un échec de l'adaptation cardio-respiratoire à la naissance. L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) qui en résulte est associée à un shunt droit-gauche par le canal artériel et le foramen ovale, responsable d'une hypoxémie. Cette complication est associée à une mortalité et une morbidité élevée. Actuellement, l'alimentation parentérale de ces enfants en détresse vitale inclut des lipides. Nos résultats montrent que les AGPI n6 n'améliorent pas la circulation pulmonaire. Par contre, ils suggèrent que l'administration d'AGPI n3 pourrait améliorer l'adaptation circulatoire à la naissance, notamment dans les situations à hauts risques (prématurité, hypoplasie pulmonaire).

Le mécanisme d'action des AGPI n3 sur la circulation pulmonaire périnatale est encore incertain. Notre étude apporte néanmoins des informations complémentaires :

- Nos résultats montrent que la réponse vasodilatatrice aux AGPI n3 n'est pas modifiée par l'inhibition de la NO synthase. Des études préliminaires ont montré que la dose de 30 mg de LNA est suffisante pour bloquer la NO synthase du fœtus d'agneau pendant une période de 3 heures (Storme, Rairigh et al. 1999, Rairigh, Storme et al. 2000). Cette dose inhibe totalement la réponse vasodilatatrice à l'acétylcholine médiée par la libération endothéliale de NO (Storme, Rairigh et al. 1999, Rairigh, Storme et al. 2000). Par ailleurs, nos résultats actuels montrent que cette dose de L-nitro-arginine induit une réponse vasoconstrictrice pulmonaire d'une durée supérieure à 3 heures, indiquant une inhibition prolongée de la NO synthase. Ainsi, nos résultats montrent que la réponse vasodilatatrice pulmonaire aux AGPI n3 n'est pas dépendante de la libération de NO.

- Nos résultats montrent que la réponse vasodilatatrice aux AGPI n3 est totalement abolie par le

tétraethylammonium. A la dose utilisée dans cette étude, le tétraethylammonium est un inhibiteur des canaux potassiques à la fois calcium- et voltage-dépendants chez le fœtus d'agneau (Storme, Rairigh et al. 1999). Les canaux potassiques sont impliqués dans la vasodilatation pulmonaire à la naissance. Leur ouverture est induite par l'oxygène ou le NO (Archer, Huang et al. 1994, Cornfield, Reeve et al. 1996, Storme, Rairigh et al. 1999). L'abolition de la réponse vasodilatatrice pulmonaire aux AGPI n3 n'est pas liée à une hypoxie tissulaire, puisque les gaz du sang et la concentration plasmatique de lactate n'ont pas été modifiés par le tétraethylammonium. Ainsi, nos résultats indiquent que la réponse vasodilatatrice pulmonaire aux AGPI n3 est médiée par l'activation de canaux potassiques.

- Enfin, nos résultats montrent que la réponse vasodilatatrice aux AGPI n3 est partiellement inhibée après administration de N-(méthylsulfonyl)-2-(2-propynyloxy)-benzènehexanamide (MS-PPOH). Le MS-PPOH est un inhibiteur sélectif des CYT P450 monooxygénase (Capdevila, Karara et al. 1990). Sous l'action des CYT P450 monooxygénase, les AGPI n3 et plus particulièrement l'EPA produisent des métabolites « époxy », dont le plus important est l'acide 17,18 epoxy-eicosatétraénoïque (17,18 EPETE) (Ghatta, Nimmagadda et al. 2006, Morin, Sirois et al. 2009). Ce métabolite est connu pour activer directement les canaux potassiques calcium-dépendants. Il a été montré par ailleurs, que in vitro, le 17,18 EPETE induit une relaxation de vaisseaux pulmonaires isolés chez l'homme (Ghatta, Nimmagadda et al. 2006, Morin, Sirois et al. 2009). Le délai de 20 min entre le début de la perfusion d'AGPI n3 et la réponse vasodilatatrice suggère qu'elle n'est pas induite directement par un composant de l'Omegaven, mais plutôt par un (des) métabolite(s). La persistance d'un effet vasodilatateur malgré l'inhibition de CYT P450 suggère trois éventualités : 1) l'inhibition de CYT P450 n'est que partielle du fait d'une dose insuffisante. La dose de MS-PPOH utilisée dans cette étude a été extrapolée d'expérimentations réalisées chez le rat et le lapin ; 2) MS-PPOH n'a pas bloqué tous les sous-types de CytP450 comme le suggèrent des travaux récents ((Lauterbach, Barbosa-Sicard et al. 2002, Kulas, Schmidt et al. 2008) ; 3) Il existe d'autres voies métaboliques impliquées dans la vasodilatation induite par les AGPI n3. On note spécialement la voie des prostaglandines puisqu'il a été montré que les AGPI n3 augmentent la production totale des prostacyclines vasodilatrices et réduisent la production de médiateurs vasconstricteurs (leucotriènes) (Burr, Fehily et al. 1989, Dubois, Abramson et al. 1998).

Si les AGPI n3 n'ont pas modifié l'altération de la clairance du liquide pulmonaire, Ils ont amélioré significativement les lésions de la dysplasie bronchopulmonaire. La dysplasie bronchopulmonaire est une maladie sévère dont l'incidence augmente avec l'amélioration de la survie néonatale. Précédemment, la ventilation agressive provoquait des lésions parenchymateuses et une fibrose pulmonaire (Silva et al 2015). Avec l'évolution des techniques et des pratiques, la physiopathologie de cette maladie a changé avec le temps, et actuellement l'inflammation due à la toxicité de l'oxygène et au barotraumatisme est la causes majeure de l'émergence d'une nouvelle pathologie avec principalement une altération et un arrêt du développement pulmonaire (Jobe 2011). Les cytokines pro-inflammatoires comme TFN gamme alpha, interleukine 1, interleukine 6 et interleukine 8 sont impliquées dans la pathogénèse de la dysplasie bronchopulmonaire (Kallapur and Jobe 2006). Ces cytokines inflammatoires qui augmentent en raison de la toxicité de l'oxygène, la ventilation, et les infections altèrent l'alvéolisation et la septation secondaire (Jobe and Ikegami 1998). Les AGPI n3 sont connus pour augmenter les interleukines et facteurs anti-inflammatoires, en même temps ils diminuent la production des facteurs pro-inflammatoires (Katz, Manner et al. 1996, Ranieri, Suter et al. 1999). Nous avons montré que les AGPI n3 amélioreraient le processus de l'alvéolisation avec l'augmentation de nombre des crêtes septales secondaires et des alvéoles. Cet effet est probablement lié à une modulation de la réaction inflammatoire et à une amélioration de la fonction endothéliale (Caron, 2015). Il a été montré chez des adultes présentant un syndrome de détresse respiratoire aiguë et chez des patients porteurs de mucoviscidose hospitalisés en réanimation que la supplémentation AGPI n3 par voie parentérale ou entérale induisait une réduction significative de la durée de ventilation mécanique, du risque de survenue d'une défaillance multi viscérale, et de la durée de séjour en réanimation (Katz, Manner et al. 1996, Ranieri, Suter et al. 1999). Des effets bénéfiques la fonction pulmonaire ont été observés lors d'un choc septique ou d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë (Mayer, Grimm et al. 2002, Mayer, Gokorsch et al. 2003). La supplémentation en AGPI n3 baissait les cytokines inflammatoires dans différentes pathologies pulmonaires (Pierre, Husson et al. 2007, Fasano, Serini et al. 2010). Les études récentes chez les nouveau-nés montraient les effets bénéfiques des AGPI n3 pour la réduction du risque de dysplasie bronchopulmonaire (Beghin, Storme et al. 2015)

Nos études comportent quelques limitations. Concernant l'étude de l'adaptation respiratoire, La réalisation des acquisitions d'IRM de bonne qualité nécessite l'application des mesures non physiologiques comme la naissance par césarienne, l'intubation, la curarisation, des temps d'apnées longs. Tous ces facteurs influencent la résorption du liquide pulmonaire. Par ailleurs, la technique d'acquisition utilisée supprime le signal du sang circulant. Par contre, il est impossible de supprimer complètement le signal de flux sanguin en cas de flux de faible vitesse ou d'une HTAP qui ralentit le flux pulmonaire comme c'est le cas dans les maladies pulmonaires sévères. Par conséquence, l'IRM pourrait surévaluer les liquides pulmonaires d'environ 10 à 15 % comme cela a été montré dans plusieurs études. Cette surévaluation est tout à fait acceptable par rapport aux autres méthodes comme le positron émission tomographique et le scanner thoracique en sachant que ces derniers sont très irradiants comme examen complémentaire.

Dans notre étude hémodynamique est que nous n'avons pas dosé ni les AGPI n3 dans les globules rouges, ni les métabolites des AGPI n3 produits par la Cyt P450 monooxygénase, notamment les dérivés « époxydes ». Ils nous auraient permis de confirmer (ou non) l'augmentation de ces métabolites au cours de l'administration des AGPI n3, et de vérifier leur diminution après inhibition de la CYP450 monooxygénase.

VII. Conclusion et Perspectives

Nous avons montré que l'IRM est une méthode fiable et reproductible pour l'évaluation de la transition périnatale in vivo. Les avancées techniques permettront de l'appliquer dans des conditions physiologiques en pratique clinique. Il montre que la formation de la FRC est principalement liée à l'augmentation du volume pulmonaire totale, et que la clairance du liquide pulmonaire est altérée chez les prématurés même les animaux proches de terme. L'IRM démontre que les corticoïdes mais pas les AGPI n3 ont accéléré la transition périnatale. Alors que les AGPI n3 améliorent la circulation pulmonaire. De plus, ils réduisent les lésions pulmonaires induites par l'oxygène. Ces résultats expérimentaux suggèrent que les AGPI n3 pourraient prévenir les échecs d'adaptation cardiorespiratoire à la naissance et ses conséquences à long terme.

Les effets bénéfiques des AGPI n3 pour la prévention de la DBP chez les prématurés justifient des travaux supplémentaires pour documenter les mécanismes d'action. Au même temps, les effets vasodilatateurs pulmonaires observés en anténatal méritent d'être confirmés en période post natale. Nous envisagerons de reproduire le modèle de la BDP chez les rats avec une supplémentation prolongée avec des AGPI n3 ainsi que des groupes contrôles. Puis, on observe les effets cardiopulmonaires et vasculaires d'une supplémentation avec des AGPI n3 pendant 1 ou 3 semaines, en étudiant les paramètres suivants : croissance, études histologiques morphologiques pulmonaires, paramètres échocardiographiques cardiaques, poids du ventricule droit, pressions pulmonaires, dosage des cytokines dans le parenchyme pulmonaire, dosage des AGPI n3 dans les globules rouges et le foie.

Nos travaux montrent d'une autre façon les effets bénéfiques des substances anti-inflammatoires sur les fonctions cardiorespiratoires des nouveau-nés. L'inflammation est impliquée d'une façon croissante dans les diverses pathologies néonatales (Silva et al, 2016). Les marqueurs sérologiques largement utilisés chez les adultes ont un intérêt clinique faible. Nous souhaitons étudier les cytokines pro-inflammatoires chez les nouveau-nés avec des maladies cardiorespiratoires comme l'inhalation

méconiale, la hernie diaphragmatique congénitale, et la dysplasie bronchopulmonaire. Ces travaux permettront de trouver :

- Des marqueurs sériques qui permettent de prévoir la sévérité de ces maladies, et par conséquence, d'adopter le traitement approprié.
- De trouver des nouveaux médicaments qui traitent la cause et non pas les conséquences de ces pathologies comme les antagonistes de l'IL1 β .

VIII. Références

- Abdukeyum, G. G., A. J. Owen and P. L. McLennan (2008). "Dietary (n-3) long-chain polyunsaturated fatty acids inhibit ischemia and reperfusion arrhythmias and infarction in rat heart not enhanced by ischemic preconditioning." J Nutr **138**(10): 1902-1909.
- Adams, E. W., S. J. Counsell, J. V. Hajnal, P. N. Cox, N. L. Kennea, A. S. Thornton, A. C. Bryan and A. D. Edwards (2002). "Magnetic resonance imaging of lung water content and distribution in term and preterm infants." Am J Respir Crit Care Med **166**(3): 397-402.
- Alcorn, D. G., T. M. Adamson, J. E. Maloney and P. M. Robinson (1981). "A morphologic and morphometric analysis of fetal lung development in the sheep." Anat Rec **201**(4): 655-667.
- Alshihabi, S. N., Y. S. Chang, J. A. Frangos and J. M. Tarbell (1996). "Shear stress-induced release of PGE2 and PGI2 by vascular smooth muscle cells." Biochem Biophys Res Commun **224**(3): 808-814.
- Archer, S. L., J. M. Huang, V. Hampl, D. P. Nelson, P. J. Shultz and E. K. Weir (1994). "Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(16): 7583-7587.
- Barker, P. M. and R. E. Olver (2002). "Invited review: Clearance of lung liquid during the perinatal period." J Appl Physiol (1985) **93**(4): 1542-1548.
- Barton, S. K., T. J. Moss, S. B. Hooper, K. J. Crossley, A. W. Gill, M. Kluckow, V. Zahra, F. Y. Wong, G. Pichler, R. Galinsky, S. L. Miller, M. Tolcos and G. R. Polglase (2014). "Protective ventilation of preterm lambs exposed to acute chorioamnionitis does not reduce ventilation-induced lung or brain injury." PLoS One **9**(11): e112402.
- Beghin, L., L. Storme, S. Coopman, T. Rakza and F. Gottrand (2015). "Parenteral nutrition with fish oil supplements is safe and seems to be effective in severe preterm neonates with respiratory distress syndrome." Acta Paediatr **104**(11): e534-536.
- Bender, N., M. Portmann, Z. Heg, K. Hofmann, M. Zwahlen and M. Egger (2014). "Fish or n3-PUFA intake and body composition: a systematic review and meta-analysis." Obes Rev **15**(8): 657-665.
- Bhatt, S., G. R. Polglase, E. M. Wallace, A. B. Te Pas and S. B. Hooper (2014). "Ventilation before Umbilical Cord Clamping Improves the Physiological Transition at Birth." Front Pediatr **2**: 113.
- Bird, A. D., A. R. McDougall, B. Seow, S. B. Hooper and T. J. Cole (2015). "Glucocorticoid regulation of lung development: lessons learned from conditional GR knockout mice." Mol Endocrinol **29**(2): 158-171.
- Bland, R. D. (1983). "Dynamics of pulmonary water before and after birth." Acta Paediatr Scand Suppl **305**: 12-20.
- Bland, R. D. (1987). "Pathogenesis of pulmonary edema after premature birth." Adv Pediatr **34**: 175-221.
- Bland, R. D. (2001). "Loss of liquid from the lung lumen in labor: more than a simple "squeeze"." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **280**(4): L602-605.
- Bland, R. D. and C. A. Boyd (1986). "Cation transport in lung epithelial cells derived from fetal, newborn, and adult rabbits." J Appl Physiol (1985) **61**(2): 507-515.

- Bland, R. D., M. A. Bressack and D. D. McMillan (1979). "Labor decreases the lung water content of newborn rabbits." Am J Obstet Gynecol **135**(3): 364-367.
- Bland, R. D., D. P. Carlton, R. G. Scheerer, J. J. Cummings and D. L. Chapman (1989). "Lung fluid balance in lambs before and after premature birth." J Clin Invest **84**(2): 568-576.
- Bland, R. D., D. D. McMillan, M. A. Bressack and L. Dong (1980). "Clearance of liquid from lungs of newborn rabbits." J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol **49**(2): 171-177.
- Boland, R., B. J. Joyce, M. J. Wallace, H. Stanton, A. J. Fosang, R. A. Pierce, R. Harding and S. B. Hooper (2004). "Cortisol enhances structural maturation of the hypoplastic fetal lung in sheep." J Physiol **554**(Pt 2): 505-517.
- Bott, L., L. Beghin, P. Devos, V. Pierrat, R. Matran and F. Gottrand (2006). "Nutritional status at 2 years in former infants with bronchopulmonary dysplasia influences nutrition and pulmonary outcomes during childhood." Pediatr Res **60**(3): 340-344.
- Brannon, T. S., A. J. North, L. B. Wells and P. W. Shaul (1994). "Prostacyclin synthesis in ovine pulmonary artery is developmentally regulated by changes in cyclooxygenase-1 gene expression." J Clin Invest **93**(5): 2230-2235.
- Brown, M. J., R. E. Olver, C. A. Ramsden, L. B. Strang and D. V. Walters (1983). "Effects of adrenaline and of spontaneous labour on the secretion and absorption of lung liquid in the fetal lamb." J Physiol **344**: 137-152.
- Burr, M. L., A. M. Fehily, J. F. Gilbert, S. Rogers, R. M. Holliday, P. M. Sweetnam, P. C. Elwood and N. M. Deadman (1989). "Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART)." Lancet **2**(8666): 757-761.
- Calder, P. C. (2004). "n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored." Clin Sci (Lond) **107**(1): 1-11.
- Canessa, C. M., J. D. Horisberger and B. C. Rossier (1993). "Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration." Nature **361**(6411): 467-470.
- Capdevila, J. H., A. Karara, D. J. Waxman, M. V. Martin, J. R. Falck and F. P. Guengerich (1990). "Cytochrome P-450 enzyme-specific control of the regio- and enantiofacial selectivity of the microsomal arachidonic acid epoxygenase." J Biol Chem **265**(19): 10865-10871.
- Caron E, Desseyn JL, Sergent L, Bartke N, Husson MO, Duhamel A, Gottrand F (2015). Impact of fish oils on the outcomes of a mouse model of acute *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. Br J Nutr. **28**;113(2):191-9.
- Carroll, F. E., Jr., J. E. Loyd, K. B. Nolop and J. C. Collins (1985). "MR imaging parameters in the study of lung water. A preliminary study." Invest Radiol **20**(4): 381-387.
- Caruthers, S. D., C. B. Paschal, N. A. Pou, R. J. Roselli and T. R. Harris (1998). "Regional measurements of pulmonary edema by using magnetic resonance imaging." J Appl Physiol (1985) **84**(6): 2143-2153.
- Cassin, S. (1993). "The role of eicosanoids and endothelium-dependent factors in regulation of the fetal pulmonary circulation." J Lipid Mediat **6**(1-3): 477-485.

- Chapman, D. L., D. P. Carlton, D. W. Nielson, J. J. Cummings, F. R. Poulain and R. D. Bland (1994). "Changes in lung lipid during spontaneous labor in fetal sheep." J Appl Physiol (1985) **76**(2): 523-530.
- Chowdhury, R., S. Stevens, D. Gorman, A. Pan, S. Warnakula, S. Chowdhury, H. Ward, L. Johnson, F. Crowe, F. B. Hu and O. H. Franco (2012). "Association between fish consumption, long chain omega 3 fatty acids, and risk of cerebrovascular disease: systematic review and meta-analysis." BMJ **345**: e6698.
- Cooney, T. P. and W. M. Thurlbeck (1982). "The radial alveolar count method of Emery and Mithal: a reappraisal 2--intrauterine and early postnatal lung growth." Thorax **37**(8): 580-583.
- Cornfield, D. N., B. A. Chatfield, J. A. McQueston, I. F. McMurtry and S. H. Abman (1992). "Effects of birth-related stimuli on L-arginine-dependent pulmonary vasodilation in ovine fetus." Am J Physiol **262**(5 Pt 2): H1474-1481.
- Cornfield, D. N., H. L. Reeve, S. Tolarova, E. K. Weir and S. Archer (1996). "Oxygen causes fetal pulmonary vasodilation through activation of a calcium-dependent potassium channel." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(15): 8089-8094.
- Crawshaw, J. R., S. B. Hooper, A. B. Te Pas, B. A. Allison, M. J. Wallace, L. T. Kerr, R. A. Lewis, C. J. Morley, A. F. Leong and M. J. Kitchen (2016). "Effect of betamethasone, surfactant, and positive end-expiratory pressures on lung aeration at birth in preterm rabbits." J Appl Physiol (1985) **121**(3): 750-759.
- Cutillo, A. G. (1985). "Regulation of lung water content and distribution: theoretical concepts, experimental data and methods of determination." Cardiologia **30**(10): 935-940.
- Cutillo, A. G., A. H. Morris, D. C. Ailion, C. H. Durney and T. A. Case (1986). "Determination of lung water content and distribution by nuclear magnetic resonance imaging." J Thorac Imaging **1**(3): 39-51.
- Cutillo, A. G., A. H. Morris, D. D. Blatter, T. A. Case, D. C. Ailion, C. H. Durney and S. A. Johnson (1984). "Determination of lung water content and distribution by nuclear magnetic resonance." J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol **57**(2): 583-588.
- Cutillo, A. G., A. H. Morris, K. Ganesan, D. C. Ailion, T. A. Case, C. H. Durney and F. Watanabe (1989). "Regional effects of repetition time on NMR quantitation of water in normal and edematous lungs." Magn Reson Med **12**(1): 137-144.
- Deruelle, P., V. Balasubramaniam, A. M. Kunig, G. J. Seedorf, N. E. Markham and S. H. Abman (2006). "BAY 41-2272, a direct activator of soluble guanylate cyclase, reduces right ventricular hypertrophy and prevents pulmonary vascular remodeling during chronic hypoxia in neonatal rats." Biol Neonate **90**(2): 135-144.
- Deruelle, P., V. Houfflin-Debarge, E. Magnenant, S. Jaillard, Y. Riou, F. Puech and L. Storme (2003). "Effects of antenatal glucocorticoids on pulmonary vascular reactivity in the ovine fetus." Am J Obstet Gynecol **189**(1): 208-215.
- Dubois, R. N., S. B. Abramson, L. Crofford, R. A. Gupta, L. S. Simon, L. B. Van De Putte and P. E. Lipsky (1998). "Cyclooxygenase in biology and disease." FASEB J **12**(12): 1063-1073.
- Eisenberg, P. R., J. R. Hansbrough, D. Anderson and D. P. Schuster (1987). "A prospective study of lung water measurements during patient management in an intensive care unit." Am Rev Respir Dis **136**(3): 662-668.

- Elgellab, A., Y. Riou, A. Abbazine, P. Truffert, R. Matran, P. Lequien and L. Storme (2001). "Effects of nasal continuous positive airway pressure (NCPAP) on breathing pattern in spontaneously breathing premature newborn infants." Intensive Care Med **27**(11): 1782-1787.
- Failo, R., P. A. Wielopolski, H. A. Tiddens, W. C. Hop, R. P. Mucelli and M. H. Lequin (2009). "Lung morphology assessment using MRI: a robust ultra-short TR/TE 2D steady state free precession sequence used in cystic fibrosis patients." Magn Reson Med **61**(2): 299-306.
- Fasano, E., S. Serini, E. Piccioni, I. Innocenti and G. Calviello (2010). "Chemoprevention of lung pathologies by dietary n-3 polyunsaturated fatty acids." Curr Med Chem **17**(29): 3358-3376.
- Fer, M., Y. Dreano, D. Lucas, L. Corcos, J. P. Salaun, F. Berthou and Y. Amet (2008). "Metabolism of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids by recombinant human cytochromes P450." Arch Biochem Biophys **471**(2): 116-125.
- Gao, Y. and J. U. Raj (2010). "Regulation of the pulmonary circulation in the fetus and newborn." Physiol Rev **90**(4): 1291-1335.
- Ghanayem, N. S. and J. B. Gordon (2001). "Modulation of pulmonary vasomotor tone in the fetus and neonate." Respir Res **2**(3): 139-144.
- Ghatta, S., D. Nimmagadda, X. Xu and S. T. O'Rourke (2006). "Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications." Pharmacol Ther **110**(1): 103-116.
- Gyamfi-Bannerman, C. and E. A. Thom (2016). "Antenatal Betamethasone for Women at Risk for Late Preterm Delivery." N Engl J Med **375**(5): 486-487.
- Hansen, T. N., T. A. Hazinski and R. D. Bland (1984). "Effects of asphyxia on lung fluid balance in baby lambs." J Clin Invest **74**(2): 370-376.
- Hanukoglu, I. and A. Hanukoglu (2016). "Epithelial sodium channel (ENaC) family: Phylogeny, structure-function, tissue distribution, and associated inherited diseases." Gene **579**(2): 95-132.
- Helve, O., O. M. Pitkanen, S. Andersson, H. O'Brodovich, T. Kirjavainen and G. Otulakowski (2004). "Low expression of human epithelial sodium channel in airway epithelium of preterm infants with respiratory distress." Pediatrics **113**(5): 1267-1272.
- Hercule, H. C., B. Salanova, K. Essin, H. Honeck, J. R. Falck, M. Sausbier, P. Ruth, W. H. Schunck, F. C. Luft and M. Gollasch (2007). "The vasodilator 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid targets the pore-forming BK alpha channel subunit in rodents." Exp Physiol **92**(6): 1067-1076.
- Holverda, S., R. J. Theilmann, R. C. Sa, T. J. Arai, E. T. Hall, D. J. Dubowitz, G. K. Prisk and S. R. Hopkins (2011). "Measuring lung water: ex vivo validation of multi-image gradient echo MRI." J Magn Reson Imaging **34**(1): 220-224.
- Hooper, E., D. M. Hawkins, R. J. Kowalski, D. R. Post, J. A. Britz, K. C. Brooks and M. A. Turman (2005). "Establishing pediatric immune response zones using the Cylex Immuknow assay." Clin Transplant **19**(6): 834-839.
- Hooper, S. B., C. Binder-Heschl, G. R. Polglase, A. W. Gill, M. Kluckow, E. M. Wallace, D. Blank and A. B. Te Pas (2016). "The timing of umbilical cord clamping at birth: physiological considerations." Matern Health Neonatol Perinatol **2**: 4.

- Hooper, S. B., K. A. Dickson and R. Harding (1988). "Lung liquid secretion, flow and volume in response to moderate asphyxia in fetal sheep." J Dev Physiol **10**(5): 473-485.
- Hooper, S. B. and R. Harding (1990). "Changes in lung liquid dynamics induced by prolonged fetal hypoxemia." J Appl Physiol (1985) **69**(1): 127-135.
- Hooper, S. B., M. J. Kitchen, M. L. Siew, R. A. Lewis, A. Fouras, A. B. te Pas, K. K. Siu, N. Yagi, K. Uesugi and M. J. Wallace (2009). "Imaging lung aeration and lung liquid clearance at birth using phase contrast X-ray imaging." Clin Exp Pharmacol Physiol **36**(1): 117-125.
- Hooper, S. B., M. J. Kitchen, M. J. Wallace, N. Yagi, K. Uesugi, M. J. Morgan, C. Hall, K. K. Siu, I. M. Williams, M. Siew, S. C. Irvine, K. Pavlov and R. A. Lewis (2007). "Imaging lung aeration and lung liquid clearance at birth." FASEB J **21**(12): 3329-3337.
- Hooper, S. B., M. L. Siew, M. J. Kitchen and A. B. te Pas (2013). "Establishing functional residual capacity in the non-breathing infant." Semin Fetal Neonatal Med **18**(6): 336-343.
- Hooper, S. B., A. B. Te Pas and M. J. Kitchen (2016). "Respiratory transition in the newborn: a three-phase process." Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed **101**(3): F266-271.
- Hooper, S. B., A. B. Te Pas, J. Lang, J. J. van Vonderen, C. C. Roehr, M. Kluckow, A. W. Gill, E. M. Wallace and G. R. Polglase (2015). "Cardiovascular transition at birth: a physiological sequence." Pediatr Res **77**(5): 608-614.
- Hooper, S. B. and M. J. Wallace (2006). "Role of the physicochemical environment in lung development." Clin Exp Pharmacol Physiol **33**(3): 273-279.
- Houejjeh, A., E. Aubry, H. Coridon, K. Montaigne, R. Sfeir, P. Deruelle and L. Storme (2011). "Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in the fetal pulmonary circulation." Crit Care Med **39**(6): 1431-1438.
- Hummler, E., P. Barker, J. Gatzky, F. Beermann, C. Verdumo, A. Schmidt, R. Boucher and B. C. Rossier (1996). "Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice." Nat Genet **12**(3): 325-328.
- Hummler, E. and C. Planes (2010). "Importance of ENaC-mediated sodium transport in alveolar fluid clearance using genetically-engineered mice." Cell Physiol Biochem **25**(1): 63-70.
- Humphreys, P. W., I. C. Normand, E. O. Reynolds and L. B. Strang (1967). "Pulmonary lymph flow and the uptake of liquid from the lungs of the lamb at the start of breathing." J Physiol **193**(1): 1-29.
- Ibe, B. O., R. M. Hillyard and J. U. Raj (1996). "Heterogeneity in prostacyclin and thromboxane synthesis in ovine pulmonary vascular tree: effect of age and oxygen tension." Exp Lung Res **22**(3): 351-374.
- Jaillard, S., Y. Riou, S. Klosowski, F. Cneude, P. Fialdes, X. Codaccioni, P. Lequien and L. Storme (2000). "Effects of inhaled nitric oxide on gas exchange and acute lung injury in premature lambs with moderate hyaline membrane disease." Eur J Cardiothorac Surg **18**(3): 334-341.
- Jain, L. and D. C. Eaton (2006). "Physiology of fetal lung fluid clearance and the effect of labor." Semin Perinatol **30**(1): 34-43.

- Janer, C., O. M. Pitkanen, L. Suvari, U. Turpeinen, A. Palojarvi, S. Andersson and O. Helve (2015). "Duration of gestation and mode of delivery affect the genes of transepithelial sodium transport in pulmonary adaptation." Neonatology **107**(1): 27-33.
- Jobe, A. H. (2011). "The new bronchopulmonary dysplasia." Curr Opin Pediatr **23**(2): 167-172.
- Jobe, A. H. and M. Ikegami (1998). "Mechanisms initiating lung injury in the preterm." Early Hum Dev **53**(1): 81-94.
- Kallapur, S. G. and A. H. Jobe (2006). "Contribution of inflammation to lung injury and development." Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed **91**(2): F132-135.
- Kabaran S, Besler HT (2015). Do fatty acids affect fetal programming?. J Health Popul Nutr. 13;33:14
- Katz, C., L. Bentur and N. Elias (2011). "Clinical implication of lung fluid balance in the perinatal period." J Perinatol **31**(4): 230-235.
- Katz, D. P., T. Manner, P. Furst and J. Askanazi (1996). "The use of an intravenous fish oil emulsion enriched with omega-3 fatty acids in patients with cystic fibrosis." Nutrition **12**(5): 334-339.
- Kitchen, M. J., R. A. Lewis, N. Yagi, K. Uesugi, D. Paganin, S. B. Hooper, G. Adams, S. Jureczek, J. Singh, C. R. Christensen, A. P. Hufton, C. J. Hall, K. C. Cheung and K. M. Pavlov (2005). "Phase contrast X-ray imaging of mice and rabbit lungs: a comparative study." Br J Radiol **78**(935): 1018-1027.
- Kueth, D. O., P. T. Filipczak, J. M. Hix, A. P. Gigliotti, R. S. Estepar, G. R. Washko, R. M. Baron and L. E. Fredenburgh (2016). "Magnetic resonance imaging provides sensitive in vivo assessment of experimental ventilator-induced lung injury." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **311**(2): L208-218.
- Kulas, J., C. Schmidt, M. Rothe, W. H. Schunck and R. Menzel (2008). "Cytochrome P450-dependent metabolism of eicosapentaenoic acid in the nematode *Caenorhabditis elegans*." Arch Biochem Biophys **472**(1): 65-75.
- Lang, J. A., J. T. Pearson, C. Binder-Heschl, M. J. Wallace, M. L. Siew, M. J. Kitchen, A. B. te Pas, A. Fouras, R. A. Lewis, G. R. Polglase, M. Shirai and S. B. Hooper (2016). "Increase in pulmonary blood flow at birth: role of oxygen and lung aeration." J Physiol **594**(5): 1389-1398.
- Lange, N. R. and D. P. Schuster (1999). "The measurement of lung water." Crit Care **3**(2): R19-R24.
- Lauterbach, B., E. Barbosa-Sicard, M. H. Wang, H. Honeck, E. Kargel, J. Theuer, M. L. Schwartzman, H. Haller, F. C. Luft, M. Gollasch and W. H. Schunck (2002). "Cytochrome P450-dependent eicosapentaenoic acid metabolites are novel BK channel activators." Hypertension **39**(2 Pt 2): 609-613.
- Leclerc, F., Y. Riou, A. Martinot, L. Storme, V. Hue, V. Flurin, A. Deschildre and A. Sadik (1994). "Inhaled nitric oxide for a severe respiratory syncytial virus infection in an infant with bronchopulmonary dysplasia." Intensive Care Med **20**(7): 511-512.
- Lewis, R. A., N. Yagi, M. J. Kitchen, M. J. Morgan, D. Paganin, K. K. Siu, K. Pavlov, I. Williams, K. Uesugi, M. J. Wallace, C. J. Hall, J. Whitley and S. B. Hooper (2005). "Dynamic imaging of the lungs using x-ray phase contrast." Phys Med Biol **50**(21): 5031-5040.
- Lin, Y. J., N. E. Markham, V. Balasubramaniam, J. R. Tang, A. Maxey, J. P. Kinsella and S. H. Abman (2005). "Inhaled nitric oxide enhances distal lung growth after exposure to hyperoxia in neonatal rats." Pediatr Res **58**(1): 22-29.

- Lines, A. L., M. G. Davey, R. Harding and S. B. Hooper (2001). "Effect of increased lung expansion on surfactant protein mRNA levels in lambs." *Pediatr Res* **50**(6): 720-725.
- Massaro, M., E. Scoditti, M. A. Carluccio and R. De Caterina (2008). "Basic mechanisms behind the effects of n-3 fatty acids on cardiovascular disease." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **79**(3-5): 109-115.
- Mayer, K., S. Gokorsch, C. Fegbeutel, K. Hattar, S. Rosseau, D. Walmrath, W. Seeger and F. Grimminger (2003). "Parenteral nutrition with fish oil modulates cytokine response in patients with sepsis." *Am J Respir Crit Care Med* **167**(10): 1321-1328.
- Mayer, K., H. Grimm, F. Grimminger and W. Seeger (2002). "Parenteral nutrition with n-3 lipids in sepsis." *Br J Nutr* **87 Suppl 1**: S69-75.
- McLaughlin, V. V., S. L. Archer, D. B. Badesch, R. J. Barst, H. W. Farber, J. R. Lindner, M. A. Mathier, M. D. McGoon, M. H. Park, R. S. Rosenson, L. J. Rubin, V. F. Tapson and J. Varga (2009). "ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association developed in collaboration with the American College of Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc.; and the Pulmonary Hypertension Association." *J Am Coll Cardiol* **53**(17): 1573-1619.
- Mescher, E. J., A. C. Platzker, P. L. Ballard, J. A. Kitterman, J. A. Clements and W. H. Tooley (1975). "Ontogeny of tracheal fluid, pulmonary surfactant, and plasma corticoids in the fetal lamb." *J Appl Physiol* **39**(6): 1017-1021.
- Milner, A. D. and R. A. Sauders (1977). "Pressure and volume changes during the first breath of human neonates." *Arch Dis Child* **52**(12): 918-924.
- Miserocchi, G., B. H. Poskurica and M. Del Fabbro (1994). "Pulmonary interstitial pressure in anesthetized paralyzed newborn rabbits." *J Appl Physiol* (1985) **77**(5): 2260-2268.
- Morin, C., C. Guibert, M. Sirois, V. Echave, M. M. Gomes and E. Rousseau (2008). "Effects of omega-hydroxylase product on distal human pulmonary arteries." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**(3): H1435-1443.
- Morin, C., M. Sirois, V. Echave, E. Rizcallah and E. Rousseau (2009). "Relaxing effects of 17(18)-EpETE on arterial and airway smooth muscles in human lung." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **296**(1): L130-139.
- Mozaffarian, D. and J. H. Wu (2011). "Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events." *J Am Coll Cardiol* **58**(20): 2047-2067.
- Nakamura, K., H. Kariyazono, T. Komokata, N. Hamada, R. Sakata and K. Yamada (2005). "Influence of preoperative administration of omega-3 fatty acid-enriched supplement on inflammatory and immune responses in patients undergoing major surgery for cancer." *Nutrition* **21**(6): 639-649.
- Nielsen, G., C. Wandall-Frostholm, V. Satta, A. Olivan-Viguera, E. E. Lloyd, R. M. Bryan, Jr., U. Simonsen and R. Kohler (2013). "Alterations of N-3 polyunsaturated fatty acid-activated K2P channels in hypoxia-induced pulmonary hypertension." *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **113**(4): 250-258.

- North, A. J., T. S. Brannon, L. B. Wells, W. B. Campbell and P. W. Shaul (1994). "Hypoxia stimulates prostacyclin synthesis in newborn pulmonary artery endothelium by increasing cyclooxygenase-1 protein." Circ Res **75**(1): 33-40.
- North, A. J., K. S. Lau, T. S. Brannon, L. C. Wu, L. B. Wells, Z. German and P. W. Shaul (1996). "Oxygen upregulates nitric oxide synthase gene expression in ovine fetal pulmonary artery endothelial cells." Am J Physiol **270**(4 Pt 1): L643-649.
- O'Brodovich, H., V. Hannam, M. Seear and J. B. Mullen (1990). "Amiloride impairs lung water clearance in newborn guinea pigs." J Appl Physiol (1985) **68**(4): 1758-1762.
- Okuda, Y., K. Kawashima, T. Sawada, K. Tsurumaru, M. Asano, S. Suzuki, M. Soma, T. Nakajima and K. Yamashita (1997). "Eicosapentaenoic acid enhances nitric oxide production by cultured human endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **232**(2): 487-491.
- Olver, R. E., C. A. Ramsden, L. B. Strang and D. V. Walters (1986). "The role of amiloride-blockable sodium transport in adrenaline-induced lung liquid reabsorption in the fetal lamb." J Physiol **376**: 321-340.
- Olver, R. E., E. E. Schneeberger and D. V. Walters (1981). "Epithelial solute permeability, ion transport and tight junction morphology in the developing lung of the fetal lamb." J Physiol **315**: 395-412.
- Olver, R. E. and L. B. Strang (1974). "Ion fluxes across the pulmonary epithelium and the secretion of lung liquid in the foetal lamb." J Physiol **241**(2): 327-357.
- Otulakowski, G. and H. O'Brodovich (2007). "Thyroid hormone and Na⁺-K⁺-ATPase: more than simple transcription." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **292**(1): L4-5.
- Pierre, M., M. O. Husson, R. Le Berre, J. L. Desseyn, C. Galabert, L. Beghin, C. Beermann, A. Dagenais, Y. Berthiaume, B. Cardinaud, P. Barbry, F. Gottrand and B. P. Guery (2007). "Omega-3 polyunsaturated fatty acids improve host response in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **292**(6): L1422-1431.
- Polglase, G. R., M. J. Wallace, D. L. Morgan and S. B. Hooper (2006). "Increases in lung expansion alter pulmonary hemodynamics in fetal sheep." J Appl Physiol (1985) **101**(1): 273-282.
- Rafikova, O., M. L. Meadows, J. M. Kinchen, R. P. Mohny, E. Maltepe, A. A. Desai, J. X. Yuan, J. G. Garcia, J. R. Fineman, R. Rafikov and S. M. Black (2016). "Metabolic Changes Precede the Development of Pulmonary Hypertension in the Monocrotaline Exposed Rat Lung." PLoS One **11**(3): e0150480.
- Rairigh, R. L., L. Storme, T. A. Parker, T. D. le Cras, J. P. Kinsella, M. Jakkula and S. H. Abman (1999). "Inducible NO synthase inhibition attenuates shear stress-induced pulmonary vasodilation in the ovine fetus." Am J Physiol **276**(3 Pt 1): L513-521.
- Rairigh, R. L., L. Storme, T. A. Parker, T. D. Le Cras, N. Markham, M. Jakkula and S. H. Abman (2000). "Role of neuronal nitric oxide synthase in regulation of vascular and ductus arteriosus tone in the ovine fetus." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **278**(1): L105-110.
- Ranieri, V. M., P. M. Suter, C. Tortorella, R. De Tullio, J. M. Dayer, A. Brienza, F. Bruno and A. S. Slutsky (1999). "Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial." JAMA **282**(1): 54-61.

- Rebello, C. M., M. Ikegami, M. G. Ervin, D. H. Polk and A. H. Jobe (1997). "Postnatal lung function and protein permeability after fetal or maternal corticosteroids in preterm lambs." J Appl Physiol (1985) **83**(1): 213-218.
- Richard, K., S. J. Ramminger, L. Forsyth, A. Burchell and S. M. Wilson (2004). "Thyroid hormone potentiates glucocorticoid-evoked airway Na⁺ transport without affecting alpha-ENaC transcription." FEBS Lett **576**(3): 339-342.
- Riou, Y., F. Leclerc, P. Scalfaro, A. Abazine, V. Neve and L. Storme (2002). "Effect of increasing inspiratory time on respiratory mechanics in mechanically ventilated neonates." Pediatr Crit Care Med **3**(1): 45-51.
- Risse, F., T. A. Kuder, H. U. Kauczor, W. Semmler and C. Fink (2009). "Suppression of pulmonary vasculature in lung perfusion MRI using correlation analysis." Eur Radiol **19**(11): 2569-2575.
- Roberts, D. and S. Dalziel (2006). "Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth." Cochrane Database Syst Rev(3): CD004454.
- Rudolph, A. M. (1979). "Fetal and neonatal pulmonary circulation." Annu Rev Physiol **41**: 383-395.
- Rudolph, A. M. (2007). "Aortopulmonary transposition in the fetus: speculation on pathophysiology and therapy." Pediatr Res **61**(3): 375-380.
- Russo, G. L. (2009). "Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention." Biochem Pharmacol **77**(6): 937-946.
- Saunders, R. A. and A. D. Milner (1978). "Pulmonary pressure/volume relationships during the last phase of delivery and the first postnatal breaths in human subjects." J Pediatr **93**(4): 667-673.
- Sayegh, R., S. D. Auerbach, X. Li, R. W. Loftus, R. F. Husted, J. B. Stokes and C. P. Thomas (1999). "Glucocorticoid induction of epithelial sodium channel expression in lung and renal epithelia occurs via trans-activation of a hormone response element in the 5'-flanking region of the human epithelial sodium channel alpha subunit gene." J Biol Chem **274**(18): 12431-12437.
- Sharma, D., A. S. Nkembi, E. Aubry, A. Houeijeh, L. Butruille, V. Houfflin-Debarge, R. Besson, P. Deruelle and L. Storme (2015). "Maternal PUFA omega-3 Supplementation Prevents Neonatal Lung Injuries Induced by Hyperoxia in Newborn Rats." Int J Mol Sci **16**(9): 22081-22093.
- Shaul, P. W., W. B. Campbell, M. A. Farrar and R. R. Magness (1992). "Oxygen modulates prostacyclin synthesis in ovine fetal pulmonary arteries by an effect on cyclooxygenase." J Clin Invest **90**(6): 2147-2155.
- Shaul, P. W., M. C. Pace, Z. Chen and T. S. Brannon (1999). "Developmental changes in prostacyclin synthesis are conserved in cultured pulmonary endothelium and vascular smooth muscle." Am J Respir Cell Mol Biol **20**(1): 113-121.
- Shioya, S., R. Christman, D. C. Ailion, A. G. Cuttillo and K. C. Goodrich (1993). "Nuclear magnetic resonance Hahn spin-echo decay (T2) in live rats with endotoxin lung injury." Magn Reson Med **29**(4): 441-445.
- Siew, M. L., M. J. Wallace, B. J. Allison, M. J. Kitchen, A. B. te Pas, M. S. Islam, R. A. Lewis, A. Fouras, N. Yagi, K. Uesugi and S. B. Hooper (2013). "The role of lung inflation and sodium transport in airway liquid clearance during lung aeration in newborn rabbits." Pediatr Res **73**(4 Pt 1): 443-449.

Siew, M. L., M. J. Wallace, M. J. Kitchen, R. A. Lewis, A. Fouras, A. B. Te Pas, N. Yagi, K. Uesugi, K. K. Siu and S. B. Hooper (2009). "Inspiration regulates the rate and temporal pattern of lung liquid clearance and lung aeration at birth." J Appl Physiol (1985) **106**(6): 1888-1895.

Singh, T. U., K. Kathirvel, S. Choudhury, S. K. Garg and S. K. Mishra (2010). "Eicosapentaenoic acid-induced endothelium-dependent and -independent relaxation of sheep pulmonary artery." Eur J Pharmacol **636**(1-3): 108-113.

Sobotka, K. S., S. B. Hooper, B. J. Allison, A. B. Te Pas, P. G. Davis, C. J. Morley and T. J. Moss (2011). "An initial sustained inflation improves the respiratory and cardiovascular transition at birth in preterm lambs." Pediatr Res **70**(1): 56-60.

Sotiriadis, A., G. Makrydimas, S. Papatheodorou and J. P. Ioannidis (2009). "Corticosteroids for preventing neonatal respiratory morbidity after elective caesarean section at term." Cochrane Database Syst Rev(4): CD006614.

Staub, N. C. (1986). "Clinical use of lung water measurements. Report of a workshop." Chest **90**(4): 588-594.

Storme, L., E. Aubry, T. Rakza, A. Houeijeh, V. Debarge, P. Tourneux, P. Deruelle, T. Pennaforte and G. French Congenital Diaphragmatic Hernia Study (2013). "Pathophysiology of persistent pulmonary hypertension of the newborn: impact of the perinatal environment." Arch Cardiovasc Dis **106**(3): 169-177.

Storme, L., R. L. Rairigh, T. A. Parker, D. N. Cornfield, J. P. Kinsella and S. H. Abman (1999). "K⁺-channel blockade inhibits shear stress-induced pulmonary vasodilation in the ovine fetus." Am J Physiol **276**(2 Pt 1): L220-228.

Storme, L., R. L. Rairigh, T. A. Parker, J. P. Kinsella and S. H. Abman (1999). "Acute intrauterine pulmonary hypertension impairs endothelium-dependent vasodilation in the ovine fetus." Pediatr Res **45**(4 Pt 1): 575-581.

Storme, L., R. L. Rairigh, T. A. Parker, J. P. Kinsella and S. H. Abman (1999). "In vivo evidence for a myogenic response in the fetal pulmonary circulation." Pediatr Res **45**(3): 425-431.

Storme, L., Y. Riou, A. Dubois, P. Fialdes, S. Jaillard, S. Klosowski, B. Dupuis and P. Lequien (1999). "Combined effects of inhaled nitric oxide and hyperoxia on pulmonary vascular permeability and lung mechanics." Crit Care Med **27**(6): 1168-1174.

Sundell, H. W., T. R. Harris, J. R. Cannon, D. P. Lindstrom, R. Green, J. Rojas and K. L. Brigham (1987). "Lung water and vascular permeability-surface area in premature newborn lambs with hyaline membrane disease." Circ Res **60**(6): 923-932.

te Pas, A. B., P. G. Davis, S. B. Hooper and C. J. Morley (2008). "From liquid to air: breathing after birth." J Pediatr **152**(5): 607-611.

te Pas, A. B., M. Siew, M. J. Wallace, M. J. Kitchen, A. Fouras, R. A. Lewis, N. Yagi, K. Uesugi, S. Donath, P. G. Davis, C. J. Morley and S. B. Hooper (2009). "Effect of sustained inflation length on establishing functional residual capacity at birth in ventilated premature rabbits." Pediatr Res **66**(3): 295-300.

te Pas, A. B., M. Siew, M. J. Wallace, M. J. Kitchen, A. Fouras, R. A. Lewis, N. Yagi, K. Uesugi, S. Donath, P. G. Davis, C. J. Morley and S. B. Hooper (2009). "Establishing functional residual capacity

at birth: the effect of sustained inflation and positive end-expiratory pressure in a preterm rabbit model." Pediatr Res **65**(5): 537-541.

Tenorio-Lopes, L., C. Baldy, A. Jochmans-Lemoine, O. Mercier, O. Pothier-Piccinin, T. Seaborn, V. Joseph, I. Marc and R. Kinkead (2016). "Consequences of Maternal omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on respiratory function in rat pups." J Physiol.

Theilmann, R. J., T. J. Arai, A. Samiee, D. J. Dubowitz, S. R. Hopkins, R. B. Buxton and G. K. Prisk (2009). "Quantitative MRI measurement of lung density must account for the change in T(2) (*) with lung inflation." J Magn Reson Imaging **30**(3): 527-534.

Theilmann, R. J., C. Darquenne, A. R. Elliott, B. A. Bailey and D. J. Conrad (2016). "Characterizing Lung Disease in Cystic Fibrosis with Magnetic Resonance Imaging and Airway Physiology." PLoS One **11**(6): e0157177.

Velazquez, M., J. Haller, T. Amundsen and D. P. Schuster (1991). "Regional lung water measurements with PET: accuracy, reproducibility, and linearity." J Nucl Med **32**(4): 719-725.

Viard, R., P. Tourneux, L. Storme, J. M. Girard, N. Betrouni and J. Rousseau (2008). "Magnetic resonance imaging spatial and time study of lung water content in newborn lamb: methods and preliminary results." Invest Radiol **43**(6): 470-480.

Viard, R., M. Vermandel, P. Tourneux, L. Storme and J. Rousseau (2007). "Lung liquid clearance in newborn lamb: MRI methods and preliminary results." Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc **2007**: 2891-2894.

Walkup, L. L., J. A. Tkach, N. S. Higano, R. P. Thomen, S. B. Fain, S. L. Merhar, R. J. Fleck, R. S. Amin and J. C. Woods (2015). "Quantitative Magnetic Resonance Imaging of Bronchopulmonary Dysplasia in the Neonatal Intensive Care Unit Environment." Am J Respir Crit Care Med **192**(10): 1215-1222.

Walters, D. V., C. A. Ramsden and R. E. Olver (1990). "Dibutyryl cAMP induces a gestation-dependent absorption of fetal lung liquid." J Appl Physiol (1985) **68**(5): 2054-2059.

Wexler, H. R., R. L. Nicholson, F. S. Prato, L. S. Carey, S. Vinitski and L. Reese (1985). "Quantitation of lung water by nuclear magnetic resonance imaging. A preliminary study." Invest Radiol **20**(6): 583-590.

Wilson, S. M., R. E. Olver and D. V. Walters (2007). "Developmental regulation of luminal lung fluid and electrolyte transport." Respir Physiol Neurobiol **159**(3): 247-255.

IX. Annexes

- Abdukeyum, G. G., A. J. Owen and P. L. McLennan (2008). "Dietary (n-3) long-chain polyunsaturated fatty acids inhibit ischemia and reperfusion arrhythmias and infarction in rat heart not enhanced by ischemic preconditioning." J Nutr **138**(10): 1902-1909.
- Adams, E. W., S. J. Counsell, J. V. Hajnal, P. N. Cox, N. L. Kennea, A. S. Thornton, A. C. Bryan and A. D. Edwards (2002). "Magnetic resonance imaging of lung water content and distribution in term and preterm infants." Am J Respir Crit Care Med **166**(3): 397-402.
- Alcorn, D. G., T. M. Adamson, J. E. Maloney and P. M. Robinson (1981). "A morphologic and morphometric analysis of fetal lung development in the sheep." Anat Rec **201**(4): 655-667.
- Alshihabi, S. N., Y. S. Chang, J. A. Frangos and J. M. Tarbell (1996). "Shear stress-induced release of PGE2 and PGI2 by vascular smooth muscle cells." Biochem Biophys Res Commun **224**(3): 808-814.
- Ancel P, Goffinet F, EPIPAGE-2 Writing Group. (2015). 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. 169(3):230-8.
- Archer, S. L., J. M. Huang, V. Hampl, D. P. Nelson, P. J. Shultz and E. K. Weir (1994). "Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(16): 7583-7587.
- Barker, P. M. and R. E. Olver (2002). "Invited review: Clearance of lung liquid during the perinatal period." J Appl Physiol (1985) **93**(4): 1542-1548.
- Barton, S. K., T. J. Moss, S. B. Hooper, K. J. Crossley, A. W. Gill, M. Kluckow, V. Zahra, F. Y. Wong, G. Pichler, R. Galinsky, S. L. Miller, M. Tolcos and G. R. Polglase (2014). "Protective ventilation of preterm lambs exposed to acute chorioamnionitis does not reduce ventilation-induced lung or brain injury." PLoS One **9**(11): e112402.
- Beghin, L., L. Storme, S. Coopman, T. Rakza and F. Gottrand (2015). "Parenteral nutrition with fish oil supplements is safe and seems to be effective in severe preterm neonates with respiratory distress syndrome." Acta Paediatr **104**(11): e534-536.
- Bender, N., M. Portmann, Z. Heg, K. Hofmann, M. Zwahlen and M. Egger (2014). "Fish or n3-PUFA intake and body composition: a systematic review and meta-analysis." Obes Rev **15**(8): 657-665.
- Bhatt, S., G. R. Polglase, E. M. Wallace, A. B. Te Pas and S. B. Hooper (2014). "Ventilation before Umbilical Cord Clamping Improves the Physiological Transition at Birth." Front Pediatr **2**: 113.
- Bird, A. D., A. R. McDougall, B. Seow, S. B. Hooper and T. J. Cole (2015). "Glucocorticoid regulation of lung development: lessons learned from conditional GR knockout mice." Mol Endocrinol **29**(2): 158-171.
- Bland, R. D. (1983). "Dynamics of pulmonary water before and after birth." Acta Paediatr Scand Suppl **305**: 12-20.
- Bland, R. D. (1987). "Pathogenesis of pulmonary edema after premature birth." Adv Pediatr **34**: 175-221.

- Bland, R. D. (2001). "Loss of liquid from the lung lumen in labor: more than a simple "squeeze"." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **280**(4): L602-605.
- Bland, R. D. and C. A. Boyd (1986). "Cation transport in lung epithelial cells derived from fetal, newborn, and adult rabbits." J Appl Physiol (1985) **61**(2): 507-515.
- Bland, R. D., M. A. Bressack and D. D. McMillan (1979). "Labor decreases the lung water content of newborn rabbits." Am J Obstet Gynecol **135**(3): 364-367.
- Bland, R. D., D. P. Carlton, R. G. Scheerer, J. J. Cummings and D. L. Chapman (1989). "Lung fluid balance in lambs before and after premature birth." J Clin Invest **84**(2): 568-576.
- Bland, R. D., D. D. McMillan, M. A. Bressack and L. Dong (1980). "Clearance of liquid from lungs of newborn rabbits." J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol **49**(2): 171-177.
- Boland, R., B. J. Joyce, M. J. Wallace, H. Stanton, A. J. Fosang, R. A. Pierce, R. Harding and S. B. Hooper (2004). "Cortisol enhances structural maturation of the hypoplastic fetal lung in sheep." J Physiol **554**(Pt 2): 505-517.
- Bolt RJ, van Weissenbruch MM, Lafeber HN, Delemarre-van de Waal HA. Glucocorticoids and lung development in the fetus and preterm infant. Pediatr Pulmonol. 2001 Jul;**32**(1):76-91
- Bott, L., L. Beghin, P. Devos, V. Pierrat, R. Matran and F. Gottrand (2006). "Nutritional status at 2 years in former infants with bronchopulmonary dysplasia influences nutrition and pulmonary outcomes during childhood." Pediatr Res **60**(3): 340-344.
- Brannon, T. S., A. J. North, L. B. Wells and P. W. Shaul (1994). "Prostacyclin synthesis in ovine pulmonary artery is developmentally regulated by changes in cyclooxygenase-1 gene expression." J Clin Invest **93**(5): 2230-2235.
- Brown, M. J., R. E. Olver, C. A. Ramsden, L. B. Strang and D. V. Walters (1983). "Effects of adrenaline and of spontaneous labour on the secretion and absorption of lung liquid in the fetal lamb." J Physiol **344**: 137-152.
- Burr, M. L., A. M. Fehily, J. F. Gilbert, S. Rogers, R. M. Holliday, P. M. Sweetnam, P. C. Elwood and N. M. Deadman (1989). "Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART)." Lancet **2**(8666): 757-761.
- Calder, P. C. (2004). "n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored." Clin Sci (Lond) **107**(1): 1-11.
- Canessa, C. M., J. D. Horisberger and B. C. Rossier (1993). "Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration." Nature **361**(6411): 467-470.
- Capdevila, J. H., A. Karara, D. J. Waxman, M. V. Martin, J. R. Falck and F. P. Guengerich (1990). "Cytochrome P-450 enzyme-specific control of the regio- and enantiofacial selectivity of the microsomal arachidonic acid epoxygenase." J Biol Chem **265**(19): 10865-10871.
- Carroll, F. E., Jr., J. E. Loyd, K. B. Nolop and J. C. Collins (1985). "MR imaging parameters in the study of lung water. A preliminary study." Invest Radiol **20**(4): 381-387.

- Caruthers, S. D., C. B. Paschal, N. A. Pou, R. J. Roselli and T. R. Harris (1998). "Regional measurements of pulmonary edema by using magnetic resonance imaging." J Appl Physiol (1985) **84**(6): 2143-2153.
- Cassin, S. (1993). "The role of eicosanoids and endothelium-dependent factors in regulation of the fetal pulmonary circulation." J Lipid Mediat **6**(1-3): 477-485.
- Chapman, D. L., D. P. Carlton, D. W. Nielson, J. J. Cummings, F. R. Poulain and R. D. Bland (1994). "Changes in lung lipid during spontaneous labor in fetal sheep." J Appl Physiol (1985) **76**(2): 523-530.
- Chowdhury, R., S. Stevens, D. Gorman, A. Pan, S. Warnakula, S. Chowdhury, H. Ward, L. Johnson, F. Crowe, F. B. Hu and O. H. Franco (2012). "Association between fish consumption, long chain omega 3 fatty acids, and risk of cerebrovascular disease: systematic review and meta-analysis." BMJ **345**: e6698.
- Cooney, T. P. and W. M. Thurlbeck (1982). "The radial alveolar count method of Emery and Mithal: a reappraisal 2--intrauterine and early postnatal lung growth." Thorax **37**(8): 580-583.
- Cornfield, D. N., B. A. Chatfield, J. A. McQueston, I. F. McMurtry and S. H. Abman (1992). "Effects of birth-related stimuli on L-arginine-dependent pulmonary vasodilation in ovine fetus." Am J Physiol **262**(5 Pt 2): H1474-1481.
- Cornfield, D. N., H. L. Reeve, S. Tolarova, E. K. Weir and S. Archer (1996). "Oxygen causes fetal pulmonary vasodilation through activation of a calcium-dependent potassium channel." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(15): 8089-8094.
- Crawshaw, J. R., S. B. Hooper, A. B. Te Pas, B. A. Allison, M. J. Wallace, L. T. Kerr, R. A. Lewis, C. J. Morley, A. F. Leong and M. J. Kitchen (2016). "Effect of betamethasone, surfactant, and positive end-expiratory pressures on lung aeration at birth in preterm rabbits." J Appl Physiol (1985) **121**(3): 750-759.
- Cutillo, A. G. (1985). "Regulation of lung water content and distribution: theoretical concepts, experimental data and methods of determination." Cardiologia **30**(10): 935-940.
- Cutillo, A. G., A. H. Morris, D. C. Ailion, C. H. Durney and T. A. Case (1986). "Determination of lung water content and distribution by nuclear magnetic resonance imaging." J Thorac Imaging **1**(3): 39-51.
- Cutillo, A. G., A. H. Morris, D. D. Blatter, T. A. Case, D. C. Ailion, C. H. Durney and S. A. Johnson (1984). "Determination of lung water content and distribution by nuclear magnetic resonance." J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol **57**(2): 583-588.
- Cutillo, A. G., A. H. Morris, K. Ganesan, D. C. Ailion, T. A. Case, C. H. Durney and F. Watanabe (1989). "Regional effects of repetition time on NMR quantitation of water in normal and edematous lungs." Magn Reson Med **12**(1): 137-144.
- Deruelle, P., V. Balasubramaniam, A. M. Kunig, G. J. Seedorf, N. E. Markham and S. H. Abman (2006). "BAY 41-2272, a direct activator of soluble guanylate cyclase, reduces right ventricular hypertrophy and prevents pulmonary vascular remodeling during chronic hypoxia in neonatal rats." Biol Neonate **90**(2): 135-144.
- Deruelle, P., V. Houfflin-Debarge, E. Magnenant, S. Jaillard, Y. Riou, F. Puech and L. Storme (2003). "Effects of antenatal glucocorticoids on pulmonary vascular reactivity in the ovine fetus." Am J Obstet Gynecol **189**(1): 208-215.

- Dubois, R. N., S. B. Abramson, L. Crofford, R. A. Gupta, L. S. Simon, L. B. Van De Putte and P. E. Lipsky (1998). "Cyclooxygenase in biology and disease." FASEB J **12**(12): 1063-1073.
- Eisenberg, P. R., J. R. Hansbrough, D. Anderson and D. P. Schuster (1987). "A prospective study of lung water measurements during patient management in an intensive care unit." Am Rev Respir Dis **136**(3): 662-668.
- Elgellab, A., Y. Riou, A. Abbazine, P. Truffert, R. Matran, P. Lequien and L. Storme (2001). "Effects of nasal continuous positive airway pressure (NCPAP) on breathing pattern in spontaneously breathing premature newborn infants." Intensive Care Med **27**(11): 1782-1787.
- Failo, R., P. A. Wielopolski, H. A. Tiddens, W. C. Hop, R. P. Mucelli and M. H. Lequin (2009). "Lung morphology assessment using MRI: a robust ultra-short TR/TE 2D steady state free precession sequence used in cystic fibrosis patients." Magn Reson Med **61**(2): 299-306.
- Fasano, E., S. Serini, E. Piccioni, I. Innocenti and G. Calviello (2010). "Chemoprevention of lung pathologies by dietary n-3 polyunsaturated fatty acids." Curr Med Chem **17**(29): 3358-3376.
- Fer, M., Y. Dreano, D. Lucas, L. Corcos, J. P. Salaun, F. Berthou and Y. Amet (2008). "Metabolism of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids by recombinant human cytochromes P450." Arch Biochem Biophys **471**(2): 116-125.
- Gao, Y. and J. U. Raj (2010). "Regulation of the pulmonary circulation in the fetus and newborn." Physiol Rev **90**(4): 1291-1335.
- García de Acilu, Leal S, Caralt B, Roca O, Sabater J, Masclans JR (2015). The Role of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in the Treatment of Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome: A Clinical Review. Biomed Res Int.2015:653750
- Ghanayem, N. S. and J. B. Gordon (2001). "Modulation of pulmonary vasomotor tone in the fetus and neonate." Respir Res **2**(3): 139-144.
- Ghatta, S., D. Nimmagadda, X. Xu and S. T. O'Rourke (2006). "Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications." Pharmacol Ther **110**(1): 103-116.
- Gyamfi-Bannerman, C. and E. A. Thom (2016). "Antenatal Betamethasone for Women at Risk for Late Preterm Delivery." N Engl J Med **375**(5): 486-487.
- Hansen, T. N., T. A. Hazinski and R. D. Bland (1984). "Effects of asphyxia on lung fluid balance in baby lambs." J Clin Invest **74**(2): 370-376.
- Hanukoglu, I. and A. Hanukoglu (2016). "Epithelial sodium channel (ENaC) family: Phylogeny, structure-function, tissue distribution, and associated inherited diseases." Gene **579**(2): 95-132.
- Helve, O., O. M. Pitkanen, S. Andersson, H. O'Brodovich, T. Kirjavainen and G. Otulakowski (2004). "Low expression of human epithelial sodium channel in airway epithelium of preterm infants with respiratory distress." Pediatrics **113**(5): 1267-1272.
- Hercule, H. C., B. Salanova, K. Essin, H. Honeck, J. R. Falck, M. Sausbier, P. Ruth, W. H. Schunck, F. C. Luft and M. Gollasch (2007). "The vasodilator 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid targets the pore-forming BK alpha channel subunit in rodents." Exp Physiol **92**(6): 1067-1076.

- Holverda, S., R. J. Theilmann, R. C. Sa, T. J. Arai, E. T. Hall, D. J. Dubowitz, G. K. Prisk and S. R. Hopkins (2011). "Measuring lung water: ex vivo validation of multi-image gradient echo MRI." J Magn Reson Imaging **34**(1): 220-224.
- Hooper, E., D. M. Hawkins, R. J. Kowalski, D. R. Post, J. A. Britz, K. C. Brooks and M. A. Turman (2005). "Establishing pediatric immune response zones using the Cylex ImmuKnow assay." Clin Transplant **19**(6): 834-839.
- Hooper, S. B., C. Binder-Heschl, G. R. Polglase, A. W. Gill, M. Kluckow, E. M. Wallace, D. Blank and A. B. Te Pas (2016). "The timing of umbilical cord clamping at birth: physiological considerations." Matern Health Neonatol Perinatol **2**: 4.
- Hooper, S. B., K. A. Dickson and R. Harding (1988). "Lung liquid secretion, flow and volume in response to moderate asphyxia in fetal sheep." J Dev Physiol **10**(5): 473-485.
- Hooper, S. B. and R. Harding (1990). "Changes in lung liquid dynamics induced by prolonged fetal hypoxemia." J Appl Physiol (1985) **69**(1): 127-135.
- Hooper, S. B., M. J. Kitchen, M. L. Siew, R. A. Lewis, A. Fouras, A. B. te Pas, K. K. Siu, N. Yagi, K. Uesugi and M. J. Wallace (2009). "Imaging lung aeration and lung liquid clearance at birth using phase contrast X-ray imaging." Clin Exp Pharmacol Physiol **36**(1): 117-125.
- Hooper, S. B., M. J. Kitchen, M. J. Wallace, N. Yagi, K. Uesugi, M. J. Morgan, C. Hall, K. K. Siu, I. M. Williams, M. Siew, S. C. Irvine, K. Pavlov and R. A. Lewis (2007). "Imaging lung aeration and lung liquid clearance at birth." FASEB J **21**(12): 3329-3337.
- Hooper, S. B., M. L. Siew, M. J. Kitchen and A. B. te Pas (2013). "Establishing functional residual capacity in the non-breathing infant." Semin Fetal Neonatal Med **18**(6): 336-343.
- Hooper, S. B., A. B. Te Pas and M. J. Kitchen (2016). "Respiratory transition in the newborn: a three-phase process." Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed **101**(3): F266-271.
- Hooper, S. B., A. B. Te Pas, J. Lang, J. J. van Vonderen, C. C. Roehr, M. Kluckow, A. W. Gill, E. M. Wallace and G. R. Polglase (2015). "Cardiovascular transition at birth: a physiological sequence." Pediatr Res **77**(5): 608-614.
- Hooper, S. B. and M. J. Wallace (2006). "Role of the physicochemical environment in lung development." Clin Exp Pharmacol Physiol **33**(3): 273-279.
- Houeijeh, A., E. Aubry, H. Coridon, K. Montaigne, R. Sfeir, P. Deruelle and L. Storme (2011). "Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in the fetal pulmonary circulation." Crit Care Med **39**(6): 1431-1438.
- Hummler, E., P. Barker, J. Gatzky, F. Beermann, C. Verdumo, A. Schmidt, R. Boucher and B. C. Rossier (1996). "Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice." Nat Genet **12**(3): 325-328.
- Hummler, E. and C. Planes (2010). "Importance of ENaC-mediated sodium transport in alveolar fluid clearance using genetically-engineered mice." Cell Physiol Biochem **25**(1): 63-70.
- Humphreys, P. W., I. C. Normand, E. O. Reynolds and L. B. Strang (1967). "Pulmonary lymph flow and the uptake of liquid from the lungs of the lamb at the start of breathing." J Physiol **193**(1): 1-29.

- Ibe, B. O., R. M. Hillyard and J. U. Raj (1996). "Heterogeneity in prostacyclin and thromboxane synthesis in ovine pulmonary vascular tree: effect of age and oxygen tension." Exp Lung Res **22**(3): 351-374.
- Jaillard, S., Y. Riou, S. Klosowski, F. Cneude, P. Fialdes, X. Codaccioni, P. Lequien and L. Storme (2000). "Effects of inhaled nitric oxide on gas exchange and acute lung injury in premature lambs with moderate hyaline membrane disease." Eur J Cardiothorac Surg **18**(3): 334-341.
- Jaskoll T, Choy HA, Melnick M. The glucocorticoid-glucocorticoid receptor signal transduction pathway, transforming growth factor-beta, and embryonic mouse lung development. Pediatr Res 1996;39:749±759.
- Jain, L. and D. C. Eaton (2006). "Physiology of fetal lung fluid clearance and the effect of labor." Semin Perinatol **30**(1): 34-43.
- Janer, C., O. M. Pitkanen, L. Suvari, U. Turpeinen, A. Palojarvi, S. Andersson and O. Helve (2015). "Duration of gestation and mode of delivery affect the genes of transepithelial sodium transport in pulmonary adaptation." Neonatology **107**(1): 27-33.
- Jobe, A. H. (2011). "The new bronchopulmonary dysplasia." Curr Opin Pediatr **23**(2): 167-172.
- Jobe A.H. (2012). "What is BPD in 2012 and what will BPD become?" Early Hum Dev. 88 Suppl 2:S27-8.
- Jobe, A. H. and M. Ikegami (1998). "Mechanisms initiating lung injury in the preterm." Early Hum Dev **53**(1): 81-94.
- Kallapur, S. G. and A. H. Jobe (2006). "Contribution of inflammation to lung injury and development." Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed **91**(2): F132-135.
- Katz, C., L. Bentur and N. Elias (2011). "Clinical implication of lung fluid balance in the perinatal period." J Perinatol **31**(4): 230-235.
- Katz, D. P., T. Manner, P. Furst and J. Askanazi (1996). "The use of an intravenous fish oil emulsion enriched with omega-3 fatty acids in patients with cystic fibrosis." Nutrition **12**(5): 334-339.
- Kitchen, M. J., R. A. Lewis, N. Yagi, K. Uesugi, D. Paganin, S. B. Hooper, G. Adams, S. Jureczek, J. Singh, C. R. Christensen, A. P. Hufton, C. J. Hall, K. C. Cheung and K. M. Pavlov (2005). "Phase contrast X-ray imaging of mice and rabbit lungs: a comparative study." Br J Radiol **78**(935): 1018-1027.
- Kueth, D. O., P. T. Filipczak, J. M. Hix, A. P. Gigliotti, R. S. Estepar, G. R. Washko, R. M. Baron and L. E. Fredenburgh (2016). "Magnetic resonance imaging provides sensitive in vivo assessment of experimental ventilator-induced lung injury." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **311**(2): L208-218.
- Kulas, J., C. Schmidt, M. Rothe, W. H. Schunck and R. Menzel (2008). "Cytochrome P450-dependent metabolism of eicosapentaenoic acid in the nematode *Caenorhabditis elegans*." Arch Biochem Biophys **472**(1): 65-75.
- Lang, J. A., J. T. Pearson, C. Binder-Heschl, M. J. Wallace, M. L. Siew, M. J. Kitchen, A. B. te Pas, A. Fouras, R. A. Lewis, G. R. Polglase, M. Shirai and S. B. Hooper (2016). "Increase in pulmonary blood flow at birth: role of oxygen and lung aeration." J Physiol **594**(5): 1389-1398.
- Lange, N. R. and D. P. Schuster (1999). "The measurement of lung water." Crit Care **3**(2): R19-R24.

- Lauterbach, B., E. Barbosa-Sicard, M. H. Wang, H. Honeck, E. Kargel, J. Theuer, M. L. Schwartzman, H. Haller, F. C. Luft, M. Gollasch and W. H. Schunck (2002). "Cytochrome P450-dependent eicosapentaenoic acid metabolites are novel BK channel activators." Hypertension **39**(2 Pt 2): 609-613.
- Leclerc, F., Y. Riou, A. Martinot, L. Storme, V. Hue, V. Flurin, A. Deschildre and A. Sadik (1994). "Inhaled nitric oxide for a severe respiratory syncytial virus infection in an infant with bronchopulmonary dysplasia." Intensive Care Med **20**(7): 511-512.
- Lewis, R. A., N. Yagi, M. J. Kitchen, M. J. Morgan, D. Paganin, K. K. Siu, K. Pavlov, I. Williams, K. Uesugi, M. J. Wallace, C. J. Hall, J. Whitley and S. B. Hooper (2005). "Dynamic imaging of the lungs using x-ray phase contrast." Phys Med Biol **50**(21): 5031-5040.
- Lin, Y. J., N. E. Markham, V. Balasubramaniam, J. R. Tang, A. Maxey, J. P. Kinsella and S. H. Abman (2005). "Inhaled nitric oxide enhances distal lung growth after exposure to hyperoxia in neonatal rats." Pediatr Res **58**(1): 22-29.
- Lines, A. L., M. G. Davey, R. Harding and S. B. Hooper (2001). "Effect of increased lung expansion on surfactant protein mRNA levels in lambs." Pediatr Res **50**(6): 720-725.
- Lynette K, Christina J, Michael P et al. (2010). Maternal Docosahexaenoic Acid Supplementation Decreases Lung Inflammation in Hyperoxia-Exposed Newborn Mice. J Nutr. **141**(2):214-22.
- Massaro, M., E. Scoditti, M. A. Carluccio and R. De Caterina (2008). "Basic mechanisms behind the effects of n-3 fatty acids on cardiovascular disease." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **79**(3-5): 109-115.
- Mayer, K., S. Gokorsch, C. Fegbeutel, K. Hattar, S. Rosseau, D. Walmrath, W. Seeger and F. Grimminger (2003). "Parenteral nutrition with fish oil modulates cytokine response in patients with sepsis." Am J Respir Crit Care Med **167**(10): 1321-1328.
- Mayer, K., H. Grimm, F. Grimminger and W. Seeger (2002). "Parenteral nutrition with n-3 lipids in sepsis." Br J Nutr **87 Suppl 1**: S69-75.
- McLaughlin, V. V., S. L. Archer, D. B. Badesch, R. J. Barst, H. W. Farber, J. R. Lindner, M. A. Mathier, M. D. McGoon, M. H. Park, R. S. Rosenson, L. J. Rubin, V. F. Tapson and J. Varga (2009). "ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association developed in collaboration with the American College of Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc.; and the Pulmonary Hypertension Association." J Am Coll Cardiol **53**(17): 1573-1619.
- Mescher, E. J., A. C. Platzker, P. L. Ballard, J. A. Kitterman, J. A. Clements and W. H. Tooley (1975). "Ontogeny of tracheal fluid, pulmonary surfactant, and plasma corticoids in the fetal lamb." J Appl Physiol **39**(6): 1017-1021.
- Mies F., Shlyonsky V., Goolaerts A., Sariban-Sohraby S (2004) Modulation of epithelial Na⁺ channel activity by long chain n-3 fatty acids, Am J Physiol Renal Physiol. **287**, F850-F855.
- Mies F., Spriet C., Heliot L., Sariban-Sohraby S. (2007) Epithelial Na⁺ Channel Stimulation by n-3 Fatty Acids Requires Proximity to a Membrane-bound A-kinase-anchoring Protein Complexed with Protein Kinase A and Phosphodiesterase, J Biol Chem. **282**, 18339-18347.

- Milner, A. D. and R. A. Sauders (1977). "Pressure and volume changes during the first breath of human neonates." Arch Dis Child **52**(12): 918-924.
- Miserocchi, G., B. H. Poskurica and M. Del Fabbro (1994). "Pulmonary interstitial pressure in anesthetized paralyzed newborn rabbits." J Appl Physiol (1985) **77**(5): 2260-2268.
- Morin, C., C. Guibert, M. Sirois, V. Echave, M. M. Gomes and E. Rousseau (2008). "Effects of omega-hydroxylase product on distal human pulmonary arteries." Am J Physiol Heart Circ Physiol **294**(3): H1435-1443.
- Morin, C., M. Sirois, V. Echave, E. Rizcallah and E. Rousseau (2009). "Relaxing effects of 17(18)-EpETE on arterial and airway smooth muscles in human lung." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **296**(1): L130-139.
- Mozaffarian, D. and J. H. Wu (2011). "Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events." J Am Coll Cardiol **58**(20): 2047-2067.
- Nakamura K, Stokes JB, McCray PB Jr. Endogenous and exogenous glucocorticoid regulation of ENaC mRNA expression in developing kidney and lung. Am J Physiol Cell Physiol. 2002 Sep;283(3):C762-72.
- Nakamura, K., H. Kariyazono, T. Komokata, N. Hamada, R. Sakata and K. Yamada (2005). "Influence of preoperative administration of omega-3 fatty acid-enriched supplement on inflammatory and immune responses in patients undergoing major surgery for cancer." Nutrition **21**(6): 639-649.
- Nielsen, G., C. Wandall-Frostholm, V. Satta, A. Olivan-Viguera, E. E. Lloyd, R. M. Bryan, Jr., U. Simonsen and R. Kohler (2013). "Alterations of N-3 polyunsaturated fatty acid-activated K2P channels in hypoxia-induced pulmonary hypertension." Basic Clin Pharmacol Toxicol **113**(4): 250-258.
- North, A. J., T. S. Brannon, L. B. Wells, W. B. Campbell and P. W. Shaul (1994). "Hypoxia stimulates prostacyclin synthesis in newborn pulmonary artery endothelium by increasing cyclooxygenase-1 protein." Circ Res **75**(1): 33-40.
- North, A. J., K. S. Lau, T. S. Brannon, L. C. Wu, L. B. Wells, Z. German and P. W. Shaul (1996). "Oxygen upregulates nitric oxide synthase gene expression in ovine fetal pulmonary artery endothelial cells." Am J Physiol **270**(4 Pt 1): L643-649.
- O'Brodovich, H., V. Hannam, M. Seear and J. B. Mullen (1990). "Amiloride impairs lung water clearance in newborn guinea pigs." J Appl Physiol (1985) **68**(4): 1758-1762.
- Okuda, Y., K. Kawashima, T. Sawada, K. Tsurumaru, M. Asano, S. Suzuki, M. Soma, T. Nakajima and K. Yamashita (1997). "Eicosapentaenoic acid enhances nitric oxide production by cultured human endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **232**(2): 487-491.
- Oliver C1, Watson H (2016). Omega-3 fatty acids for cystic fibrosis. Cochrane Database Syst Rev. 5;(1):CD002201
- Olver, R. E., C. A. Ramsden, L. B. Strang and D. V. Walters (1986). "The role of amiloride-blockable sodium transport in adrenaline-induced lung liquid reabsorption in the fetal lamb." J Physiol **376**: 321-340.

Olver, R. E., E. E. Schneeberger and D. V. Walters (1981). "Epithelial solute permeability, ion transport and tight junction morphology in the developing lung of the fetal lamb." J Physiol **315**: 395-412.

Olver, R. E. and L. B. Strang (1974). "Ion fluxes across the pulmonary epithelium and the secretion of lung liquid in the foetal lamb." J Physiol **241**(2): 327-357.

Otulakowski G, Rafii B, Harris M, O'Brodovich H. Oxygen and glucocorticoids modulate alphaENaC mRNA translation in fetal distal lung epithelium. Am J Respir Cell Mol Biol. 2006 Feb;34(2):204-12.

Otulakowski, G. and H. O'Brodovich (2007). "Thyroid hormone and Na⁺-K⁺-ATPase: more than simple transcription." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **292**(1): L4-5.

Pierre, M., M. O. Husson, R. Le Berre, J. L. Desseyne, C. Galabert, L. Beghin, C. Beermann, A. Dagenais, Y. Berthiaume, B. Cardinaud, P. Barbry, F. Gottrand and B. P. Guery (2007). "Omega-3 polyunsaturated fatty acids improve host response in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **292**(6): L1422-1431.

Polglase, G. R., M. J. Wallace, D. L. Morgan and S. B. Hooper (2006). "Increases in lung expansion alter pulmonary hemodynamics in fetal sheep." J Appl Physiol (1985) **101**(1): 273-282.

Rafikova, O., M. L. Meadows, J. M. Kinchen, R. P. Mohney, E. Maltepe, A. A. Desai, J. X. Yuan, J. G. Garcia, J. R. Fineman, R. Rafikov and S. M. Black (2016). "Metabolic Changes Precede the Development of Pulmonary Hypertension in the Monocrotaline Exposed Rat Lung." PLoS One **11**(3): e0150480.

Rairigh, R. L., L. Storme, T. A. Parker, T. D. le Cras, J. P. Kinsella, M. Jakkula and S. H. Abman (1999). "Inducible NO synthase inhibition attenuates shear stress-induced pulmonary vasodilation in the ovine fetus." Am J Physiol **276**(3 Pt 1): L513-521.

Rairigh, R. L., L. Storme, T. A. Parker, T. D. Le Cras, N. Markham, M. Jakkula and S. H. Abman (2000). "Role of neuronal nitric oxide synthase in regulation of vascular and ductus arteriosus tone in the ovine fetus." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **278**(1): L105-110.

Ranieri, V. M., P. M. Suter, C. Tortorella, R. De Tullio, J. M. Dayer, A. Brienza, F. Bruno and A. S. Slutsky (1999). "Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial." JAMA **282**(1): 54-61.

Rebello, C. M., M. Ikegami, M. G. Ervin, D. H. Polk and A. H. Jobe (1997). "Postnatal lung function and protein permeability after fetal or maternal corticosteroids in preterm lambs." J Appl Physiol (1985) **83**(1): 213-218.

Richard, K., S. J. Ramminger, L. Forsyth, A. Burchell and S. M. Wilson (2004). "Thyroid hormone potentiates glucocorticoid-evoked airway Na⁺ transport without affecting alpha-ENaC transcription." FEBS Lett **576**(3): 339-342.

Riou, Y., F. Leclerc, P. Scalfaro, A. Abazine, V. Neve and L. Storme (2002). "Effect of increasing inspiratory time on respiratory mechanics in mechanically ventilated neonates." Pediatr Crit Care Med **3**(1): 45-51.

Risse, F., T. A. Kuder, H. U. Kauczor, W. Semmler and C. Fink (2009). "Suppression of pulmonary vasculature in lung perfusion MRI using correlation analysis." Eur Radiol **19**(11): 2569-2575.

- Roberts, D. and S. Dalziel (2006). "Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth." Cochrane Database Syst Rev(3): CD004454.
- Rudolph, A. M. (1979). "Fetal and neonatal pulmonary circulation." Annu Rev Physiol **41**: 383-395.
- Rudolph, A. M. (2007). "Aortopulmonary transposition in the fetus: speculation on pathophysiology and therapy." Pediatr Res **61**(3): 375-380.
- Russo, G. L. (2009). "Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention." Biochem Pharmacol **77**(6): 937-946.
- Saunders, R. A. and A. D. Milner (1978). "Pulmonary pressure/volume relationships during the last phase of delivery and the first postnatal breaths in human subjects." J Pediatr **93**(4): 667-673.
- Sayegh, R., S. D. Auerbach, X. Li, R. W. Loftus, R. F. Husted, J. B. Stokes and C. P. Thomas (1999). "Glucocorticoid induction of epithelial sodium channel expression in lung and renal epithelia occurs via trans-activation of a hormone response element in the 5'-flanking region of the human epithelial sodium channel alpha subunit gene." J Biol Chem **274**(18): 12431-12437.
- Sharma, D., A. S. Nkembi, E. Aubry, A. Houeijeh, L. Butruille, V. Houfflin-Debarge, R. Besson, P. Deruelle and L. Storme (2015). "Maternal PUFA omega-3 Supplementation Prevents Neonatal Lung Injuries Induced by Hyperoxia in Newborn Rats." Int J Mol Sci **16**(9): 22081-22093.
- Shaul, P. W., W. B. Campbell, M. A. Farrar and R. R. Magness (1992). "Oxygen modulates prostacyclin synthesis in ovine fetal pulmonary arteries by an effect on cyclooxygenase." J Clin Invest **90**(6): 2147-2155.
- Shaul, P. W., M. C. Pace, Z. Chen and T. S. Brannon (1999). "Developmental changes in prostacyclin synthesis are conserved in cultured pulmonary endothelium and vascular smooth muscle." Am J Respir Cell Mol Biol **20**(1): 113-121.
- Shioya, S., R. Christman, D. C. Ailion, A. G. Cuttillo and K. C. Goodrich (1993). "Nuclear magnetic resonance Hahn spin-echo decay (T2) in live rats with endotoxin lung injury." Magn Reson Med **29**(4): 441-445.
- Siew, M. L., M. J. Wallace, B. J. Allison, M. J. Kitchen, A. B. te Pas, M. S. Islam, R. A. Lewis, A. Fouras, N. Yagi, K. Uesugi and S. B. Hooper (2013). "The role of lung inflation and sodium transport in airway liquid clearance during lung aeration in newborn rabbits." Pediatr Res **73**(4 Pt 1): 443-449.
- Siew, M. L., M. J. Wallace, M. J. Kitchen, R. A. Lewis, A. Fouras, A. B. Te Pas, N. Yagi, K. Uesugi, K. K. Siu and S. B. Hooper (2009). "Inspiration regulates the rate and temporal pattern of lung liquid clearance and lung aeration at birth." J Appl Physiol (1985) **106**(6): 1888-1895.
- Silva D, Nardiello C, Pozarska A, Rory E. (2015). "Recent advances in the mechanisms of lung alveolarization and the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia". Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **309**:1239-1272.
- Singh, T. U., K. Kathirvel, S. Choudhury, S. K. Garg and S. K. Mishra (2010). "Eicosapentaenoic acid-induced endothelium-dependent and -independent relaxation of sheep pulmonary artery." Eur J Pharmacol **636**(1-3): 108-113.
- Sobotka, K. S., S. B. Hooper, B. J. Allison, A. B. Te Pas, P. G. Davis, C. J. Morley and T. J. Moss (2011). "An initial sustained inflation improves the respiratory and cardiovascular transition at birth in preterm lambs." Pediatr Res **70**(1): 56-60.

Sotiriadis, A., G. Makrydimas, S. Papatheodorou and J. P. Ioannidis (2009). "Corticosteroids for preventing neonatal respiratory morbidity after elective caesarean section at term." Cochrane Database Syst Rev(4): CD006614.

Staub, N. C. (1986). "Clinical use of lung water measurements. Report of a workshop." Chest **90**(4): 588-594.

Storme, L., E. Aubry, T. Rakza, A. Houeijeh, V. Debarge, P. Tourneux, P. Deruelle, T. Pennaforte and G. French Congenital Diaphragmatic Hernia Study (2013). "Pathophysiology of persistent pulmonary hypertension of the newborn: impact of the perinatal environment." Arch Cardiovasc Dis **106**(3): 169-177.

Storme, L., R. L. Rairigh, T. A. Parker, D. N. Cornfield, J. P. Kinsella and S. H. Abman (1999). "K⁺-channel blockade inhibits shear stress-induced pulmonary vasodilation in the ovine fetus." Am J Physiol **276**(2 Pt 1): L220-228.

Storme, L., R. L. Rairigh, T. A. Parker, J. P. Kinsella and S. H. Abman (1999). "Acute intrauterine pulmonary hypertension impairs endothelium-dependent vasodilation in the ovine fetus." Pediatr Res **45**(4 Pt 1): 575-581.

Storme, L., R. L. Rairigh, T. A. Parker, J. P. Kinsella and S. H. Abman (1999). "In vivo evidence for a myogenic response in the fetal pulmonary circulation." Pediatr Res **45**(3): 425-431.

Storme, L., Y. Riou, A. Dubois, P. Fialdes, S. Jaillard, S. Klosowski, B. Dupuis and P. Lequien (1999). "Combined effects of inhaled nitric oxide and hyperoxia on pulmonary vascular permeability and lung mechanics." Crit Care Med **27**(6): 1168-1174.

Sundell, H. W., T. R. Harris, J. R. Cannon, D. P. Lindstrom, R. Green, J. Rojas and K. L. Brigham (1987). "Lung water and vascular permeability-surface area in premature newborn lambs with hyaline membrane disease." Circ Res **60**(6): 923-932.

te Pas, A. B., P. G. Davis, S. B. Hooper and C. J. Morley (2008). "From liquid to air: breathing after birth." J Pediatr **152**(5): 607-611.

te Pas, A. B., M. Siew, M. J. Wallace, M. J. Kitchen, A. Fouras, R. A. Lewis, N. Yagi, K. Uesugi, S. Donath, P. G. Davis, C. J. Morley and S. B. Hooper (2009). "Effect of sustained inflation length on establishing functional residual capacity at birth in ventilated premature rabbits." Pediatr Res **66**(3): 295-300.

te Pas, A. B., M. Siew, M. J. Wallace, M. J. Kitchen, A. Fouras, R. A. Lewis, N. Yagi, K. Uesugi, S. Donath, P. G. Davis, C. J. Morley and S. B. Hooper (2009). "Establishing functional residual capacity at birth: the effect of sustained inflation and positive end-expiratory pressure in a preterm rabbit model." Pediatr Res **65**(5): 537-541.

Tenorio-Lopes, L., C. Baldy, A. Jochmans-Lemoine, O. Mercier, O. Pothier-Piccinin, T. Seaborn, V. Joseph, I. Marc and R. Kinkead (2016). "Consequences of Maternal omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on respiratory function in rat pups." J Physiol.

Theilmann, R. J., T. J. Arai, A. Samiee, D. J. Dubowitz, S. R. Hopkins, R. B. Buxton and G. K. Prisk (2009). "Quantitative MRI measurement of lung density must account for the change in T(2) (*) with lung inflation." J Magn Reson Imaging **30**(3): 527-534.

- Theilmann, R. J., C. Darquenne, A. R. Elliott, B. A. Bailey and D. J. Conrad (2016). "Characterizing Lung Disease in Cystic Fibrosis with Magnetic Resonance Imaging and Airway Physiology." PLoS One **11**(6): e0157177.
- Velazquez, M., J. Haller, T. Amundsen and D. P. Schuster (1991). "Regional lung water measurements with PET: accuracy, reproducibility, and linearity." J Nucl Med **32**(4): 719-725.
- Viard, R., P. Tourneux, L. Storme, J. M. Girard, N. Betrouni and J. Rousseau (2008). "Magnetic resonance imaging spatial and time study of lung water content in newborn lamb: methods and preliminary results." Invest Radiol **43**(6): 470-480.
- Viard, R., M. Vermandel, P. Tourneux, L. Storme and J. Rousseau (2007). "Lung liquid clearance in newborn lamb: MRI methods and preliminary results." Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc **2007**: 2891-2894.
- Walkup, L. L., J. A. Tkach, N. S. Higano, R. P. Thomen, S. B. Fain, S. L. Merhar, R. J. Fleck, R. S. Amin and J. C. Woods (2015). "Quantitative Magnetic Resonance Imaging of Bronchopulmonary Dysplasia in the Neonatal Intensive Care Unit Environment." Am J Respir Crit Care Med **192**(10): 1215-1222.
- Walters, D. V., C. A. Ramsden and R. E. Olver (1990). "Dibutyryl cAMP induces a gestation-dependent absorption of fetal lung liquid." J Appl Physiol (1985) **68**(5): 2054-2059.
- Wexler, H. R., R. L. Nicholson, F. S. Prato, L. S. Carey, S. Vinitzki and L. Reese (1985). "Quantitation of lung water by nuclear magnetic resonance imaging. A preliminary study." Invest Radiol **20**(6): 583-590.
- Wilson, S. M., R. E. Olver and D. V. Walters (2007). "Developmental regulation of luminal lung fluid and electrolyte transport." Respir Physiol Neurobiol **159**(3): 247-255.

IX. Annexes

Annexe 1 : Composition de l'Omegaven10% et de l'Intralipide 10%

	Omegaven 10%	Intralipide 10%
Acides gras saturées %	15-30	10-20
Acides gras Monosaturées %	10-20	20-30
Acides gras polyunsaturées %	40-70	50-70
AGPI n6 %	2-10	40-60
AA %	1-4	0
AGPI n3 %	30-60	5-10
EPA %	15-30	0
DHA %	15-30	0

AGPI, acides gras polyunsaturées ; AA, acide arachidonique ; DHA, acide docosahexaenoic; EPA, acide eicosapentaenoic

Annexe 2 : L'article sur l'évaluation du liquide pulmonaire par la méthode de l'IRM. Cet article a été accepté pour une publication dans Pediatric Research Journal.

Lung liquid clearance in preterm lambs assessed by magnetic resonance imaging.

Running title: Fluid clearance in the immature lung.

Ali Houeijeh^{1,2}, Pierre Tourneux^{1,3}, Sébastien Mur⁴, Estelle Aubry^{1,5}, Romain Viard⁶,

Dyuti Sharma^{1,5}, Laurent Storme*^{1,4}

¹EA4489 "Perinatal Environment and Health", FHU "1000 days 4 Health », University of Lille - Nord de France, Lille, France

²Department of Pediatric Cardiology, Department of Pediatrics, Lille University Hospital, Lille, France

³Department of Neonatology, Maternity, Amiens University Hospital, Amiens, France

⁴Department of Neonatology and Maternity, Jeanne de Flandre Hospital, Lille University Hospital, Lille, France

⁵Department of Pediatric Surgery, Department of Pediatrics, Lille University Hospital, Lille, France

⁶ Plateforme Imagerie du Vivant, University of Lille, Nord de France, Lille, France

Corresponding author:

Laurent STORME, MD, PhD

Clinique de Néonatalogie, Pôle Femme, Mère et Nouveau-Né

Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU Lille

Avenue Eugène Avinée, 59037 Lille cedex

Mail to: laurent.storme@chru-lille.fr

Fax: 0033320446236

Phone: 003320446199

Statement of financial support: Financial support from Lille University

Conflicts of interest: Authors have no conflicts of interest to declare

Category of study: Basic science

Abstract

Background: Postnatal adaptation requires liquid clearance and lung aeration. However, their relative contribution to the expansion of functional residual capacity (FRC) has not been fully investigated. We studied evolution of lung liquid removal and lung aeration after birth in preterm lambs.

Methods: Lung liquid content and lung volume were assessed at birth and every 30 minutes over 2 hours using MRI in 3 groups of lambs delivered by cesarean: preterm, late preterm, and late preterm with antenatal steroids. Lung function and mechanics of the respiratory system were also measured.

Results: Lung liquid content increased by approximately 30% in the preterm group ($p < 0.05$), whereas it did not change significantly in the late preterm lambs. Antenatal steroids induced a 50% drop in the lung liquid content ($p < 0.05$). Total lung volume increased in all groups ($p < 0.05$) but was higher in the late preterm + steroids group relative to other groups ($p < 0.05$). Compliance and resistances of the respiratory system were significantly correlated with lung liquid content ($p < 0.05$).

Conclusion: FRC expansion results mainly from an increase in lung volume rather than a decrease in lung liquid in preterm and late preterm lambs. Antenatal steroids promote FRC expansion through increases in lung volume and liquid clearance.

Introduction

Fetal airways are filled with liquid produced by the epithelial cells of the distal airways. The transition to extrauterine life at birth requires rapid aeration of the lungs for initiating gas exchange (1). The airways and airspaces are rapidly cleared of liquid to allow the onset of air-breathing. Many studies have focused on the role of epithelial sodium channels in lung liquid reabsorption (2). Coupled with Na,K-ATPase (Na pump), Na channels facilitate trans-epithelial Na flux, thereby drawing water from the lung lumen into the interstitium, a process that normally begins during labor, and continues after birth. Ventilation and oxygenation promote lung liquid clearance through the epithelial cells towards the interstitium (3,4). Recent studies have asserted that the transpulmonary pressure generated by inspiratory efforts also plays a critical role in airway liquid clearance (5,6). During the first hours after the birth, lung liquid within the interstitium is transferred to the circulation via lymphatic and blood vessels (7).

Delayed lung liquid clearance is associated with impaired lung function. Preterm birth and elective cesarean section are associated with an increased risk for neonatal respiratory failure, resulting at least in part from the impaired clearance of lung liquid. Antenatal steroids are known to reduce the risk by promoting lung maturation and surfactant release (8).

Although lung aeration and liquid clearance are sequential but overlapping processes, their relative contributions to normal functional residual capacity (FRC) have not been fully investigated. The aim of this study was to assess the kinetics of lung liquid clearance and lung expansion in experimental models of preterm and late-preterm lambs. The effects of antenatal steroids were also investigated. Magnetic resonance imaging (MRI) was used to estimate serial changes in lung liquid content and lung volume.

Materials and Methods

Experimental model

All animal procedures and protocols used in this study were approved by the French “Ministère de l’Agriculture, de la Pêche et de l’Alimentation” before the studies were conducted and were carried out in the Department of Experimental Research of our Hospital centre (animal facility agreement n°59286). Pregnant ewes of the Colombia-Rambouillet breed were housed in individual pens starting a week before (at 110 days of gestational age) and throughout the procedure.

Sixteen pregnant ewes were randomly assigned to 3 groups: preterm (n=5), late preterm (n=5), and late preterm with antenatal steroids (n=6). Forty-eight hours before the surgery, the ewes received normal saline or 0.5 mg/kg of Dexamethasone (Qualimed, Puteaux, France) twice daily via an intramuscular injection. The fetal sheep underwent in utero surgery at a gestational age of 122 to 124 days (preterm, n=5), or 134 to 136 days (late preterm, n=11) after fasting for 24 hours (full term: 146 days). The ewes were sedated with intravenous sodium pentobarbital (total dose, 2-4 g) and anesthetized with 0.25% bupivacaine hydrochloride (4 ml) by a lumbar injection. The ewes were kept sedated but breathed spontaneously throughout the surgery and the experiment. Under sterile conditions, the fetal lambs’ necks were delivered through a uterine incision. The fetus heads were placed immediately into a tight sterile pouch to prevent pulmonary ventilation. A median skin incision was made after a local infiltration with lidocaine (2 mL, 1% solution) and analgesia by Nubain (Mylan, Canonsburg, Pennsylvania) 10 mg by subcutaneous injection. A polyvinyl catheter (20 G) was advanced into the superior vena cava through the jugular vein. Anesthesia of the fetal lamb was then performed through this catheter with sufentanyl (infusion rate = 2µg/min) and pancuronium (infusion rate = 400 µg/h). A polyurethane orotracheal cuffed tube (3.5 mm diameter) was introduced by oral intubation. Air leaks were carefully controlled and prevented by adapting the pressure of the cuff. The tracheal

tube was occluded until the mechanical ventilation began. Special care was taken to maintain the body temperature of the lambs between 38 and 39°C along the study period. The lambs were dried carefully before placing them in the head coil of the MRI. Warm and dry blankets were placed inside the head coil and covered the lambs. The blankets were changed regularly during the experiments

Protocol

The ewe was placed on the examination table of the MRI system. The fetal lamb was extracted and placed in the head coil (quadrature coil, 250 mm diameter, 270 mm length) in a head-first prone position. The umbilical cord was not clamped to maintain feto-placental circulation during the period of installation in the head coil. The ewe lay in a supine position near the head coil to prevent any stretching of the umbilical cord. MR images were obtained with an open magnet 0.2 Tesla MR scanner (Hitachi Medical Systems, Airis, Tokyo, Japan; maximum gradient strength 15 mT/m, slew rate 30 mT/m/ms gradients). The tracheal tube was connected to a servo 900C respirator suitable for MRI (Siemens-Elcoma, Solna, Sweden). Ventilation was started for 120 minutes. The umbilical cord was clamped at 30 minutes after starting mechanical ventilation. MRI acquisition was then performed every 30 minutes.

Fast Spin Echo T₂-weighted sequences (repetition time/echo time = 2938/100 milliseconds, flip angle = 90 degree, echo train length = 18, NEX = 1, acquisition duration = 35 seconds, bandwidth = 34 kHz, field of view = 320x320 mm², acquisition matrix = 128x256, twelve contiguous slices with 10 mm thickness) were used. This Fast Spin Echo sequence has 2 main characteristics: 1) it provides a signal proportional to the proton density. Hence, it facilitates a high visualization of both the amount of pulmonary liquid (high signal intensity) and of the lack of liquid when the lung fills up with air (low signal intensity) in a short time; and 2) it is a relative black blood sequence, thus avoiding blood flow-related signal (9.10).

Concerning the MRI acquisition, images were obtained along three orthogonal directions (transaxial, coronal and sagittal) at the beginning of experiments. Unfortunately, three orthogonal acquisition time is 3.5 minutes which is physiologically incompatible with an apnea every 30 minutes. Therefore, interval measurements were obtained in the sole coronal direction during 35 sec apnea. Then, we calculated a correcting factor taken into account the ratio of pulmonary volume assessed by three orthogonal directions / pulmonary volume assessed by coronal direction only. Pulmonary volumes obtained by coronal direction were adjusted using this correcting factor which increase the accuracy of the lung volume measurement as previously described (11) (Figure 1). While unclamping the tracheal tube (T_0), initial respirator settings were set in a pressure controlled mode as follows: peak inspiratory pressure: 22 cm H₂O; positive end expiratory pressure: 4 cm H₂O; inspiratory time: 0.5 sec; and ventilatory rate: 40/min. The ventilatory rate and peak inspiratory pressure were adjusted as necessary according to the protocol in (Table 1). FiO₂ was set to maintain SpO₂ between 92 and 98%. At 30 minutes from the onset of mechanical ventilation (T_{30}), and then every 30 minutes until T_{120} , successive acquisitions were obtained during an expiratory apnea of 35 seconds by pushing the expiratory pause button on the ventilator. Thus, positive end expiratory pressure was maintained along the period of apnea in order to prevent lung derecruitment during expiratory pause. The MR sequences were configured in a dynamic mode. In that manner, the radio frequency gains, as well the emitter for the receiver amplifiers, remained unchanged during the whole 2 hours experiment, and the image grey levels were comparable from one acquisition to another. The umbilical cord was clamped at T_{30} . At the end of the experiment (t_{120}), images were acquired along three orthogonal directions (figure 1).

Additional physiological parameters were recorded. Tidal volume (V_t) and ventilatory pressures were continuously monitored with a flow and pressure transducer placed between the

tracheal tube and the breathing circuit (pneumotachograph monitor 2100 Eurocare, West Yorkshire, UK) and stored in a computer (PhysioTrace software, CIC-IT 807, Lille, France). Static compliance of the respiratory system expressed per kg was calculated as the tidal volume divided by the difference between inspiratory plateau pressure obtained by pushing the inspiratory pause button on the ventilator for 5 sec and the expiratory pressure obtained by pushing the expiratory plateau pressure for 5 sec (12.13). Blood samples were drawn for blood gas analysis every 60 minutes (iSTAT system, ABBOTT, Chicago, Illinois).

Change in lung liquid content was assessed from Magnetic Resonance Imaging analyses as previously described (11). Briefly, image processing was performed by using specific imaging software (ArtiMED, University Lille2, Lille, France). Total pulmonary volumes representing gas + liquid volumes, were free-form contoured by a blinded investigator, while analyzing slices sequentially according to the successive acquisition times. The different regions of interest obtained at a given time on individual consecutive sections have been merged by a fuzzy logic data fusion algorithm to minimize the partial volume effects. Slices had a distance of 10 mm to avoid signal artifacts from the blood perfusion. From these contours and volumes, the following parameters were studied as a function of time: lung volume, lung liquid content and functional residual capacity, and lung liquid clearance. Pulmonary liquid content change was assessed by computing the change in the gray intensity of the signal in the contoured zones. Assuming that the content of the lungs is either liquid or air and that the lung is filled of liquid with no air at T0, pulmonary liquid density was considered as the ratio of the pulmonary liquid to lung volume. This method was previously found to be accurate at assessing change in lung volume and lung liquid content after birth (11).

Statistics

The statistical analysis was performed by an independent statistician using SPSS 2012 software (SPSS Inc. Chicago, Illinois). Quantitative measurements were expressed as the mean \pm standard deviation. Data were analyzed using the Friedman test (Applied Nonparametric Statistics, 2nd ed, Boston) when significant, subgroups were analyzed with the Wilcoxon test. Linear relationships were studied by the Spearman bidirectional test. Qualitative data are expressed as percentages. A p value < 0.05 was considered significant.

Results

Birth weights were 2450 ± 230 g, 3450 ± 800 g, and 3200 ± 650 g in the preterm, late preterm, and late preterm + steroids groups ($p < 0.05$), respectively.

Total Lung volume and lung liquid

Total lung volumes measured by MRI were considered the lung liquid volume content at that time point (T0) and were 38 ± 4 ml/kg, 42 ± 4 ml/kg, and 45 ± 5 ml/kg in the preterm, late preterm, and late preterm + steroids groups, respectively ($p = 0.15$). Total lung volume measured by MRI increased similarly from T0 to T120 by 45% in each group ($p < 0.05$) (Figure 2). However, the lung volume expressed in kg was higher in the late preterm + steroids group than in the preterm group at T30, T60, T90 and T120 ($p < 0.05$) (Figure 2). The lung liquid content did not change during the study period in the late preterm group, decreased by 55% in the late preterm + steroids group, and increased by 28% in the preterm group ($p < 0.05$) (Figure 2). FRC rose sharply in the late preterm + steroids group, reaching a level more than 5-fold that of the FRC in the preterm group at the 30th minute and at all subsequent time points ($p < 0.001$). Similarly, FRC creation was less important in the late preterm compared to the late preterm + steroids group after 30 minutes of ventilation $p < 0.05$ (Figure 3).

Lung function

After positioning the fetal lambs in the MRI head coil (intact cord), and just before starting mechanical ventilation, blood gases, lactate concentrations, SpO₂ and heart rate were similar in the 3 groups (Table 2). FiO₂, respiratory rate and peak inspiratory pressure were higher in the preterm group than in the 2 other groups ($p < 0.05$) (Table 2). PaO₂/FiO₂ was higher in the group late-preterm + steroids than in the 2 other groups (Table 2). Despite the increase in ventilator settings, the arterial pH and PaO₂ were lower, and the PaCO₂ and lactate concentrations were higher in the preterm group than in the 2 other groups after starting mechanical ventilation ($p < 0.05$) (Table 2).

Respiratory mechanics

Tidal volume increased during the study period in the late preterm group ($p < 0.05$), but did not change in the preterm and late preterm + GC groups (Figure 4). Static compliance of the respiratory system was higher in the late preterm + GC group than in the 2 other groups at all-time points ($p < 0.05$) (Figure 5). Static compliance of the respiratory system was lower in the preterm group than in the 2 other groups at all time points ($p < 0.05$) (Figure 5). Resistances of the respiratory system decreased steadily in the late preterm groups ($p < 0.05$) (Figure 5). The resistances were lower in the late preterm groups than in the preterm group ($p < 0.05$) (Figure 5). Static compliance of the respiratory system was correlated with the gas volume of the lung and inversely correlated with the lung liquid content ($p < 0.05$) (Figure 6). Resistances of the respiratory system were correlated with lung liquid content and inversely correlated with the gas volume of the lung ($p < 0.05$) (Figure 6).

Discussion

Postnatal adaptation at birth requires the simultaneous liquid clearance and aeration of the lungs (6). Mechanisms of liquid shifts between lung lumen, interstitial space, lymphatic and blood vessels have been previously studied (4). Lung liquid clearance is triggered during labor by the surge in fetal catecholamines and glucocorticoids which increase sodium channels expression and Na-K-ATPase activity. After birth, respiratory movements become the driver force of liquid clearance (1,6). Thus alveolar liquid is cleared quickly after birth to the interstitium, before its resorption over the next hours through the lymphatic system and the pulmonary vessels. The increase in the pulmonary interstitial pressure after birth supports this phenomenon (14). During this time of transition at birth, the lungs and the chest wall have to expand to accommodate the increase in FRC and the interstitial liquid (6). The relative contribution of liquid clearance and increase in lung volume to the development of the FRC has not been fully studied. Immaturity and surfactant deficiency in the premature infant is associated with delayed lung liquid clearance and poor aeration of the lungs (15). We compared the changes in total lung volume and lung liquid content in very preterm and late-preterm lambs treated or not treated with antenatal steroids. We found that the FRC expansion mainly results from an increase in total lung volume rather than a decrease in lung liquid content in late preterm lambs within the first hours after birth. In the immature preterm lambs, lung liquid content increased markedly during early life. Antenatal steroids promote both early liquid clearance from the lungs and FRC elevation. Respiratory mechanics are highly correlated with lung liquid content. The main findings in our study are the simultaneous and serial measurements of both lung liquid content and FRC using MRI and lung function measurements. Our results highlight the major differences in the progression of liquid clearance and FRC development according to gestational age and treatment with antenatal steroids. The newborn lambs have been investigated at 2 different lung maturational ages, corresponding to 26-28 weeks and 34-36

weeks of gestation in human beings (16). Surprisingly, in the more immature lambs, total lung liquid content rose rapidly after birth. As FRC creation results from postnatal lung expansion and liquid clearance, liquid accumulation impedes FRC expansion. This phenomenon explains at least in part the impaired lung function and respiratory mechanics. Pulmonary liquid rise could be explained mainly by the pulmonary edema secondary to respiratory failure. Severe hypoxia may increase lung vascular filtration pressure and thereby promote trans-vascular fluid filtration. Furthermore, impaired lung function and respiratory mechanics required high ventilator pressures and FiO_2 . The resulting parenchymal barotrauma and oxidative stress-induced lung injury may have in turn enhanced the vascular leak and promoted lung liquid accumulation. Previous study reported that the extravascular lung liquid content measured by the labeled indicator dilution method was two-fold higher in preterm than late preterm lambs mechanically ventilated for 3 hours (15). Similarly, the pulmonary lymph flow is twice as high in preterm compared to term lambs, suggesting an increase in lung vascular permeability (17). Our findings are in accordance with these studies, and provide additional information on the kinetics of the events. Several other mechanisms may contribute to the early rise in lung liquid content in preterm lambs. Mainly the decrease of the expression of sodium channels, Na,K-ATPase activity, as well as surfactant synthesis in immature lung (18,19,20). Moreover, these mechanisms are more deficient in case of cesarean prior labor (4,21). In addition, the severe hypoxic respiratory failure may elevate pulmonary vascular resistances, increasing filtration pressure, interstitial fluid content and lymph flow (22). However, previous studies reported a reduction of the extravascular lung liquid content in some experimental preterm models (15,20). It is noteworthy that the degree of prematurity as evidenced by the severity of the hypoxic respiratory failure was far much greater in our experimental model of preterm lambs (122-124 days gestation) than the previous studies. Otherwise, this apparent discrepancy might reflect species differences (rabbits vs lambs), differences in experimental design (spontaneous

breathing vs mechanical ventilation while anesthetized and paralyzed), or methodological differences (gravimetric assay vs MRI). Respiratory failure, atelectasis, lung edema and pulmonary vasoconstriction may increase the MRI signal in area with low blood flow velocities, that may contribute to a slight overestimation of lung fluid content. Besides, MRI cannot differentiate intraluminal liquid from interstitial and pleural fluid.

In late preterm lambs, the amount of lung liquid did not change during the first 2 hours after birth, although the total lung volume increased steadily during this period. These findings indicate that FRC results mainly from progressive lung expansion rather than liquid clearance. Previous studies using phase-contrast X-ray imaging in newborn rabbits determined that respiratory movements change transpulmonary pressure, which moves the alveolar lung liquid to the interstitial tissue (4,5,6.). Antenatal steroids significantly modified the evolution of lung liquid clearance in the late preterm lambs. The total amount of lung liquid decreased as early as 30 min after starting ventilation and dropped by 50% at 120 min. Thus, antenatal steroids accelerate FRC expansion through both an increase in lung volume and liquid removal. These results suggest that the lungs are still immature in the late preterm lambs with a relative deficiency of surfactant and sodium channels protein expression. Recent clinical trial in human being highlighted the higher risk of respiratory morbidities in late preterm newborn not treated prenatally by steroids comparing to the treated group (23). Elective cesarean section before labor may have further delayed lung liquid clearance and impaired respiratory mechanics. The incidence of respiratory failure is increased by 10-fold in cases of elective caesarian section before 38 weeks compared to vaginal delivery after 39 weeks (24), supporting the role of labor in lung liquid clearance and lung function at birth. Antenatal steroids reduce the risk of respiratory failure in this condition (25). Our results provide additional information about this mechanism by showing that elective cesarean section before labor alters the kinetics of lung

liquid clearance, respiratory mechanics and FRC creation, which can be prevented at least in part by antenatal steroids.

Our results show that both lung liquid content and FRC play a major role in respiratory functions and mechanics. In particular, compliance of the respiratory system increases with FRC. A similar association has been reported previously in preterm lambs (26). We further show that compliance of the respiratory system is also dependent on the total amount of liquid remaining within the lung. A similar relationship was found between lung liquid content and FRC and resistances of the respiratory system. Resistances are related to the diameter of the airways (airway resistance) and to the tissue resistance, which account for about 40% of total resistance in newborns owing to higher parenchymal density. Tissue resistances depend on the friction forces that occur between the gas stream and the respiratory system and on the viscosity of the lung parenchyma (27). As the viscosity of the liquid is considerably higher than air, tissue resistance is related to lung liquid content (5). Our findings provide additional evidence that lung liquid clearance play a role in the change in resistance of the respiratory system after birth. Although the lung liquid content influences gas exchange, oxygenation and carbon dioxide exchange can be sustained even when the lung liquid content is still elevated, as we observed in late preterm group, and in previous reports (26). It is likely that effective gas exchange starts as soon as part of the airspaces is cleared, even though the liquid is stored within the lung interstitium.

Several methods were used to study lung liquid clearance. MRI has the advantage to be able to perform simultaneous and serial assessment of both of liquid content and gas volume. In vitro studies found MRI accurate to assess lung liquid content. An excellent agreement between MRI assessment of lung liquid and gravimetric wet/dry ratio has been found in piglet lungs, with correlation factor of 0.99, and an average mean error of 1.8% (28,29,30,31). In vivo studies confirmed the accuracy

of MRI measurement of lung fluid (32). A correlation coefficient of 0.91 between the MRI and gravimetric measurements was found in a rat model, the average mean error being around 10% (32). This good correlation was confirmed in numerous other experimental studies. In a model of oleic acid-induced lung injury in dogs, MRI was found sensitive enough to measure slight changes in lung liquid and to assess the time course of the edema formation (33). In rats with experimental ventilator-induced lung injury, the degree of liquid accumulation could be quantified by MRI (34). Furthermore, in human being, MRI has been used also to estimate lung water content in preterm infants with or without bronchopulmonary dysplasia (35, 36) or in patients with cystic fibrosis (37). It is noteworthy to outline that most other methods showed equivalent or less significant correlation. For instance, indicator dilution method overestimates lung fluid content by 10-15%, whereas Positron Emission Tomography underestimates lung fluid content by 10-15% (38).

Our study has some limitations. MRI requires cesarean section and paralysis of the lambs to ensure careful positioning in the head coil before the first breath. The umbilical cord was kept intact during this procedure and the first 30 min of ventilation to prevent hypoxia. Moreover, prolonged apnea is needed during the imaging acquisition. These technical limitations may impact liquid clearance as previously reported (18,39,40). They preclude exploration of lung liquid clearance at birth in more physiological conditions such as vaginal delivery and spontaneous breathing. Otherwise, MRI technique might slightly overestimate lung liquid content because of a possible residual signal of the dry lungs and the blood in small vessels. Although the MRI signal used in the present study is roughly proportional to the proton density and therefore water content, the lung parenchyma which contains few concentrations of fat and other hydrogen-bound complexes may not be completely “black” on MRI leading to a slight overestimation of the lung water content. Besides, its effectiveness in suppressing blood signal has been assessed in large vessels where blood flow velocity is elevated. We cannot exclude that this velocity-sensitive sequence might fail to remove the residual slow-flow blood signal

induced within the smaller vessels. However, in a previous study (11), as well as in the present study, the lung signal intensity can decrease by a factor 10, indicating that the eventual residual blood flow signal contributes to less than 10% of the lung signal. Similar results were reported in normal human lung. In this study, the lung signal intensity was similar to the background noise when the echo time was greater than 2.5 ms, which is the case in our MRI sequence (9). In another experimental study in dogs, the signal intensity was not correlated to pulmonary blood flow measured by microsphere technique (33). Additionally, MRI cannot differentiate delayed liquid clearance from lung injury-induced water accumulation through atelectasis or inflammation. Indeed, the size of the voxel is too large to determine the location of liquid within the lung parenchyma, i.e. intra or extra-luminal. In the same way, the signal of an area of atelectasis is related to its water content and not to the atelectasis itself. Finally, additional experiments should be done to understand the mechanisms by which MRI signal intensity increased with time in the preterm lambs.

Conclusion and perspectives

Transition at birth requires rapid FRC creation. FRC expansion results from the simultaneous expansion of the lung and lung liquid clearance. In the case of delayed liquid clearance, lung aeration depends mainly on an increase in lung volume. In the most immature lung, surfactant deficiency and lung injury are associated with liquid accumulation within the lung, limiting FRC creation. This phenomenon clearly contributes to poor lung function and respiratory mechanics. Alternatively, antenatal steroids can promote FRC creation at birth through a combination of accelerated lung liquid removal and lung expansion. The MRI technique still limited actually requiring non physiological conditions. Nevertheless, it seems very promising for the repeated evaluation of lung functions in the future.

References

1. Olver RE, Walters DV, Wilson MS. Developmental regulation of lung liquid transport. *Annu Rev Physiol* 2004;66:77-101.
2. Siew ML, Wallace MJ, Allison BJ et al. The role of lung inflation and sodium transport in airway liquid clearance during lung aeration in newborn rabbits. *Pediatr Res* 2013;73:443–9.
3. Bland RD. Loss of liquid from the lung lumen in labor: more than a simple "squeeze". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280:602-5.
4. Bland RD, Nielson DW. Developmental changes in lung epithelial ion transport and liquid movement. *Annu Rev Physiol* 1992;54:373-94.
5. Wallace MJ, Kitchen MJ, Lewis RA, et al. Inspiration regulates the rate and temporal pattern of lung liquid clearance and lung aeration at birth. *J Appl Physiol* (1985) 2009;106(6):1888-95.
6. Hooper SB, Te Pas AB, Kitchen MJ. Respiratory transition in the newborn: a three-phase process. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2015 doi:10.1136/archdischild-2013-305704
7. Hooper SB, Te Pas AB, Kitchen MJ. Cardiovascular transition at birth: a physiological sequence. *Pediatr Res* 2015;77: 608–14.
8. Roberts D, Dalziel S. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;3:CD004454.
9. Stock KW, Chen Q, Hatabu H, Edelman RR. Magnetic resonance T2* measurements of the normal human lung in vivo with ultra-short echo times. *Magn Reson Imaging* 1999;17:997-1000.

10. Viard R, Vermandel M, Tourneux P, et al. Lung liquid clearance in newborn lamb: MRI methods and preliminary results. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2007;2891-4.
11. Viard R, Tourneux P, Storme L, et al. Magnetic resonance imaging spatial and time study of lung liquid content in newborn lamb: methods and preliminary results. *Invest Radiol* 2008;43:470–80.
12. Storme L, Riou Y, Leclerc F, et al. Respiratory mechanics in mechanically ventilated newborns: a comparison between passive inflation and occlusion methods. *Pediatr Pulmonol* 1992;12:203–12.
13. Riou Y, Storme L, Leclerc F, et al. Comparison of four methods for measuring elevation of FRC in mechanically ventilated infants. *Intensive Care Med* 1999;25:1118-25.
14. Miserocchi G, Poskurica BH, Del FM. Pulmonary interstitial pressure in anesthetized paralyzed newborn rabbits. *J Appl Physiol* (1985) 1994;77:2260–8
15. Sundell HW, Harris TR, Cannon JR, et al. Lung liquid and vascular permeability-surface area in premature newborn lambs with hyaline membrane disease. *Circ Res* 1987;60:923–32.
16. Alcorn DG, Adamson TM, Maloney JE, et al. A morphologic and morphometric analysis of fetal lung development in the sheep. *Anat Rec* 1981;201:655–67.
17. Bland RD, Carlton DP, Scheerer RG et al. Lung fluid balance in lambs before and after premature birth. *J Clin Invest* 1989;8:568–76.
18. Chapman DL, Carlton DP, Nielson DW, Cummings JJ, Poulain FR, Bland RD. Changes in lung lipid during spontaneous labor in fetal sheep. *J Appl Physiol* (1985) 1994;76:523-30.

19. Wilson SM, Olver RE, Walters DV. Developmental regulation of luminal lung fluid and electrolyte transport. *Respir Physiol Neurobiol* 2007;159:247-55.
20. Bland RD. Pathogenesis of pulmonary edema after premature birth. *Adv Pediatr* 1987;34:175-221.
21. Bland RD, Boyd CA. Cation transport in lung epithelial cells derived from fetal, newborn, and adult rabbits. *J Appl Physiol*(1985) 1986;61:507-15.
22. Humphreys PW, Normand IC, Reynolds EO, Strang LB. Pulmonary lymph flow and the uptake of liquid from the lungs of the lamb at the start of breathing. *J Physiol* 1967;193:1-29.
23. Gyamfi-Bannerman C, Thom EA, Blackwell SC, et al. Antenatal Betamethasone for Women at Risk for Late Preterm Delivery. *N Engl J Med* 2016;374:1311-20.
24. Sotiriadis A., Makrydimas G., Papatheodorou S. et al. Corticosteroids for preventing neonatal respiratory morbidity after elective caesarean section at term. *Cochrane Database Syst Rev* 2009;CD006614
25. Stutchfield P, Whitaker R, Russell I. Antenatal Steroids for Term Elective Caesarean Section (ASTECS) Research Team. Antenatal betamethasone and incidence of neonatal respiratory distress after elective caesarean section: pragmatic randomised trial. *BMJ* 2005;331:662-7.
26. Rebello CM, Ikegami M, Ervin MG, et al. Postnatal lung function and protein permeability after fetal or maternal corticosteroids in preterm lambs. *J Appl Physiol* 1997;83:213–8.
27. Riou Y, Leclerc F, Scalfaro P et al. Effect of increasing inspiratory time on respiratory mechanics in mechanically ventilated neonates. *Pediatr Crit Care Med* 2002;3:45-51.

28. Estilaei M1, MacKay A, Roberts C, Mayo J. 1H NMR measurements of wet/dry ratio and T1, T2 distributions in lung. *J Magn Reson* 1997;124:410-9.
29. Estilaei M, MacKay A, Whittall K, Mayo J. In vitro measurements of water content and T2 relaxation times in lung using a clinical MRI scanner. *J Magn Reson Imaging* 1999;9:699-703.
30. Holverda S, Theilmann RJ, Sá RC, Arai TJ, Hall ET, Dubowitz DJ, Prisk GK, Hopkins SR. Measuring lung water: ex vivo validation of multi-image gradient echo MRI. *J Magn Reson Imaging* 2011;34:220-4.
31. Mayo JR, MacKay AL, Whittall KP, Baile EM, Paré PD. Measurement of lung water content and pleural pressure gradient with magnetic resonance imaging. *J Thorac Imaging* 1995;10:73-81.
32. Cutillo AG, Morris AH, Blatter DD, et al. Determination of lung water content and distribution by nuclear magnetic resonance. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 1984;57:583-8.
33. Caruthers SD, Paschal CB, Pou NA, Roselli RJ, Harris TR. Regional measurements of pulmonary edema by using magnetic resonance imaging. *J Appl Physiol*(1985) 1998 ;84:2143-53.
34. Kuethe DO, Filipczak PT, Hix JM et al. Magnetic resonance imaging provide sensitive in vivo assessment of experimental ventilator-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2016;31:208-18.

35. Walkup LL, Tkach JA, Higano NS, et al. Quantitative Magnetic Resonance Imaging of Bronchopulmonary Dysplasia in the Neonatal Intensive Care Unit Environment. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;192:1215-22.
36. Adams EW, Counsell SJ, Hajnal JV, Cox PN, Kennea NL, Thornton AS, Bryan AC, Edwards AD. Magnetic resonance imaging of lung water content and distribution in term and preterm infants. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:397-402.
37. Theilmann RJ, Darquenne C, Elliott AR, Bailey BA, Conrad DJ. Characterizing lung disease in cystic fibrosis with with Magnetic Resonance Imaging and Airway Physiology. *PLoS One*. 2016;23:1133.
38. Lange NR, Schuster DP. The measurement of lung water. *Crit Care* 1999;3:19-24.
39. Bland RD, Bressack MA, McMillan DD. Labor decreases the lung water content of newborn rabbits. *Am J Obstet Gynecol* 1979;135:364-7.
40. Bland RD, McMillan DD, Bressack MA, Dong L. Clearance of liquid from lungs of newborn rabbits. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 1980;49:171-7.

Figures Legends

Figure 1: An example of sequential MR images on a coronal slice. Images (a) before the first breath; (b) 1 hour; and (c) 2 hours after starting ventilation. Liquid content within the lungs appears with a high signal before the first breath and decreases during ventilation throughout the study period.

Figure 2: (a) Total lung volume increased in the 3 groups ($p < 0.05$). The upward trend was markedly higher in late preterm + steroids group (dotted line) than in preterm group (black solid line) and late preterm group (gray line). (b) Total lung fluid content did not change significantly in late preterm group (gray line) (§§ $p = 0.17$). Total lung fluid content increased gradually by approximately 30% in preterm group (black solid line) and decreased in the late preterm + steroids group (dotted line). Results are expressed as mean \pm SD. * $p < 0.05$ between preterm and late preterm + steroids groups. ** $p < 0.05$ between late preterm and preterm groups. † $p < 0.05$ between late preterm and late preterm + steroids groups. § $p < 0.05$ changes in total lung fluid or total lung volume between the beginning of experiments and the end at 120 minutes.

Figure 3: (a) Estimation of FRC in preterm group. (b) Estimation of FRC in late preterm group. (c) Estimation of FRC in late preterm + steroids lambs. Dotted area represents FRC. Shaded area represents total lung liquid measured by MRI. FRC expansion is impaired in preterm lambs and to a lesser extent in late preterm lambs compared to late preterm group + steroids lambs. Volumes are expressed as ml/kg.

Figure 4: Tidal volume (V_t , ml/kg) changes after starting ventilation in Preterm group (black solid line), late preterm group (gray line), and late preterm + steroids group (dotted line). V_t was higher in late preterm lambs + steroids than in preterm and late preterm lambs. Results are

expressed as mean \pm SD. *: $p < 0.05$ between the preterm and late preterm lambs + steroids groups.

Figure 5: (a) Changes in the static compliance of the respiratory system. Static compliance was significantly higher in late preterm+ steroids group (dotted line) than in preterm (black solid line) and late preterm (gray line) groups at all times. (b) Changes in the resistance of the pulmonary system. Resistance was higher in preterm group (black solid line) at any time point than in late preterm (gray line), and late preterm + steroids (dotted line) lambs. Results are expressed as mean \pm SD. * $p < 0.05$ between preterm and late preterm + steroids groups. ** $p < 0.05$ between late preterm and preterm groups.

Figure 6: Correlation between total lung volume and total lung fluid content and both compliance and resistance of the respiratory system. (a) Static compliance was inversely correlated to the total lung fluid ($p = 0.024$, $r = 0.226$). (b) Static compliance was directly correlated to lung gas volume ($p = 0.023$, $r = 0.288$). Inversely, (c) the resistance of the respiratory system was directly correlated to the total lung fluid ($p < 0.001$, $r = 0.47$), (d) whereas the relation with the lung gas volume was negative ($p < 0.001$, $r = 0.61$)

Table 1: Protocol for modifying the ventilator settings according to PaCO₂ values

PaCO ₂ (mmHg)	Ventilator settings
--------------------------	---------------------

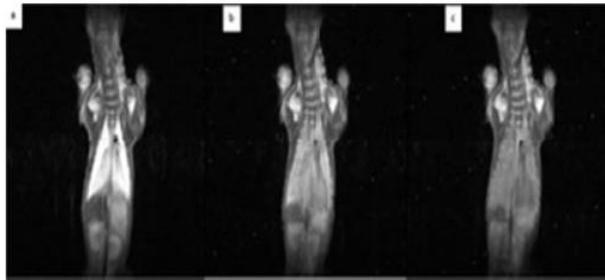
< 25	Decrease RR by 10 and PIP by 5 cmH ₂ O
25-35	Decrease PIP by 5 cmH ₂ O or decrease RR by 10 if PIP=20 cmH ₂ O
35-50	No modification
50-70	Increase RR by 20 or increase PIP by 5 cmH ₂ O if RR=80
>70	Increase RR by 20 and PIP by 5 cmH ₂ O

PIP, peak inspiratory pressure; RR, respiratory rate, breath/min

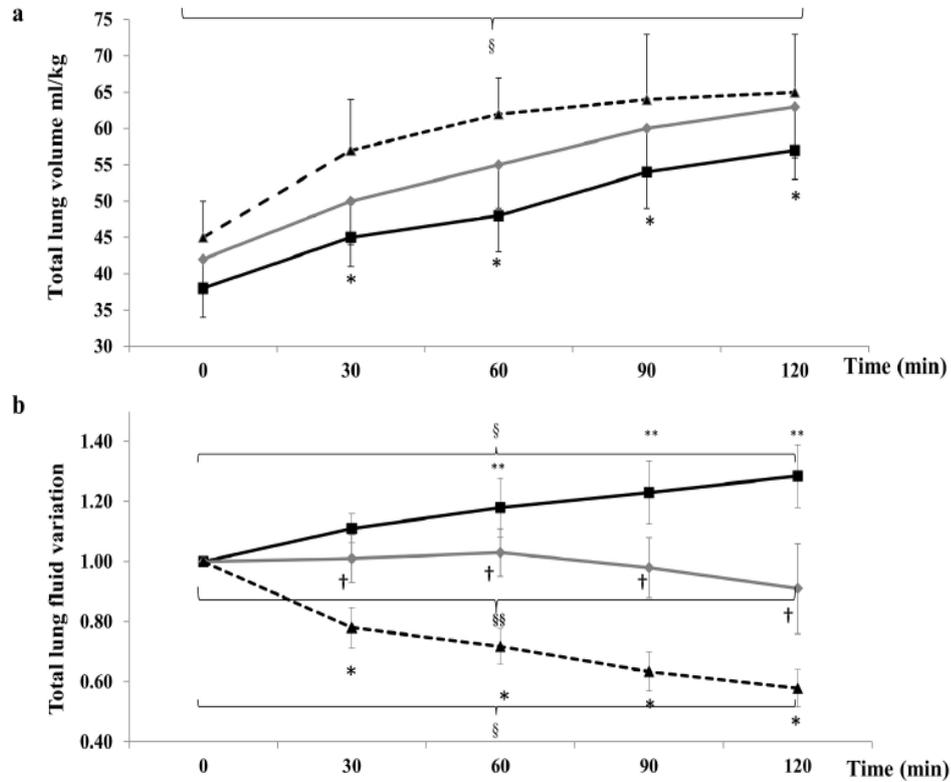
Table 2: Serial blood gases in preterm (n=5), late preterm (n=5), and late preterm + steroids (n=6) newborn lambs before (T0) and 60 and 120 minutes after starting mechanical ventilation (T60 and T120).

	T0			T60			T120		
	Preterm	Late preterm	Late preterm + steroids	Preterm	Late preterm	Late preterm + steroids	Preterm	Late preterm	Late preterm + steroids
HR	175±16	165±17	161±12	185±22*	164±15	160±11	187±18*	154±14	149±9
SpO₂	48±12	55±9	53±12	85±17*	94±5	95±3	78±19*	94±3	94±2
FiO₂	-	-	-	100±0*	36±8	25±4	100±0*	26±3	21±0
RR	-	-	-	60±5*	40±4	40±3	80±5*	40±3	30±5
PIP	-	-	-	28±5*	24±3	25±4	32±5*	22±3	20±3
Vt	-	-	-	4±1*	7±2	11±4	6±2*	11±3	12±4
PH	7.32±0.1	7.35±0.02	7.36±0.03	7.11±0.1*	7.35±0.06	7.43±0.08	7.15±0.2*	7.32±0.06	7.39±0.06
PaO₂	20±7	23±4	21±3	35±20	46±6	44±5	29±17	42±8	44±5
PaCO₂	51±7	52±6	51±6	89±25*	45±6	39±10	75±33*	47±9	47±12
Bicarb	21±4	24±6	25±5	25±9	22±4	23±4	24±8	24±4	25±5
PO₂/FiO₂	-	-	-	0.3±0.2*	1.3±0.4*	1.8±0.3	0.3±0.2*	1.6±0.3*	2.1±0.2
Lactate	2.2±0.8	1.8±0.5	1.9±0.7	4.2±2.1*	2.1±0.9	1.8±0.7	6.4±3.4*	1.7±0.6	1.9±0.5

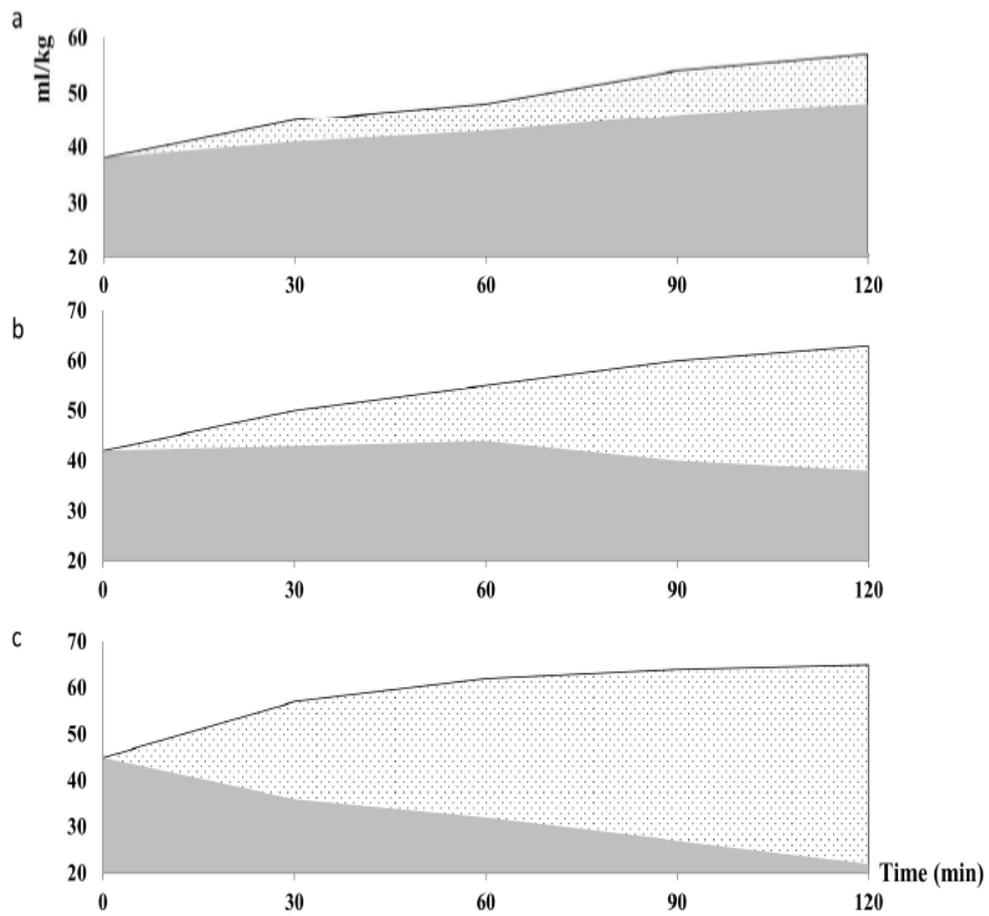
*HR, heart rate in beats/min; SpO₂, transcutaneous O₂ saturation in %; FiO₂, fraction of inspiratory O₂ in %; RR, Respiratory Rate in breath/min; PIP, Peak Inspiratory Pressure in cmH₂O; Vt, tidal volume in ml/kg; PaO₂ and PaCO₂ expressed in mmHg; Bicarb, bicarbonate concentration in mmol/l; lactate, blood lactate concentration in mmol/l. Values are the means ± SD. * = p<0.05 compared to the other groups at each time point.*



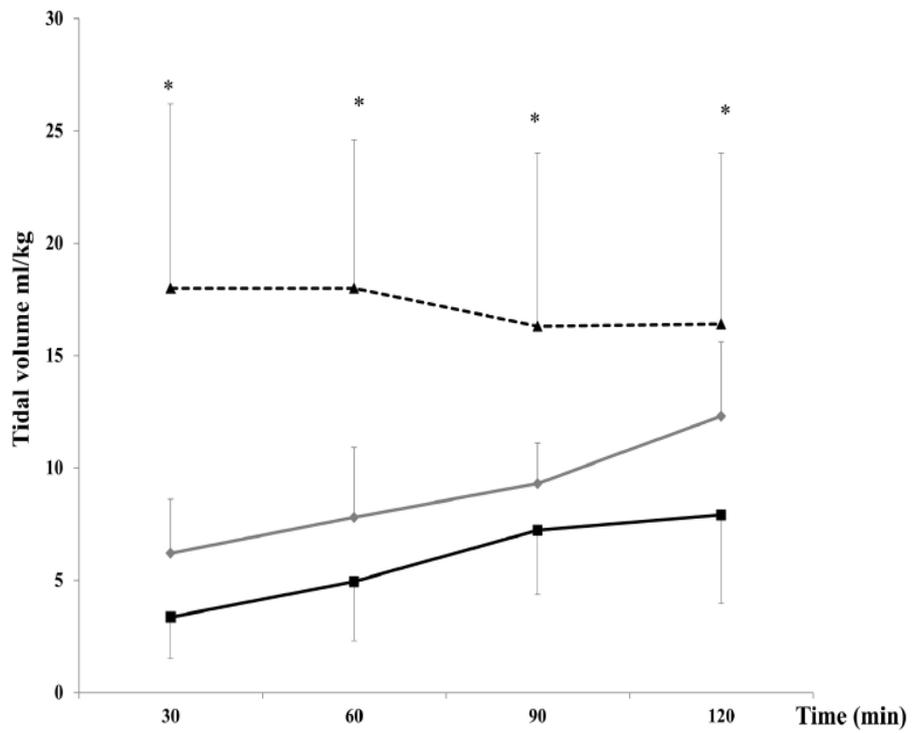
An example of sequential MR images on a coronal slice. Images (a) before the first breath; (b) 1 hour; and (c) 2 hours after starting ventilation. Liquid content within the lungs appears with a high signal before the first breath and decreases during ventilation throughout the study period.



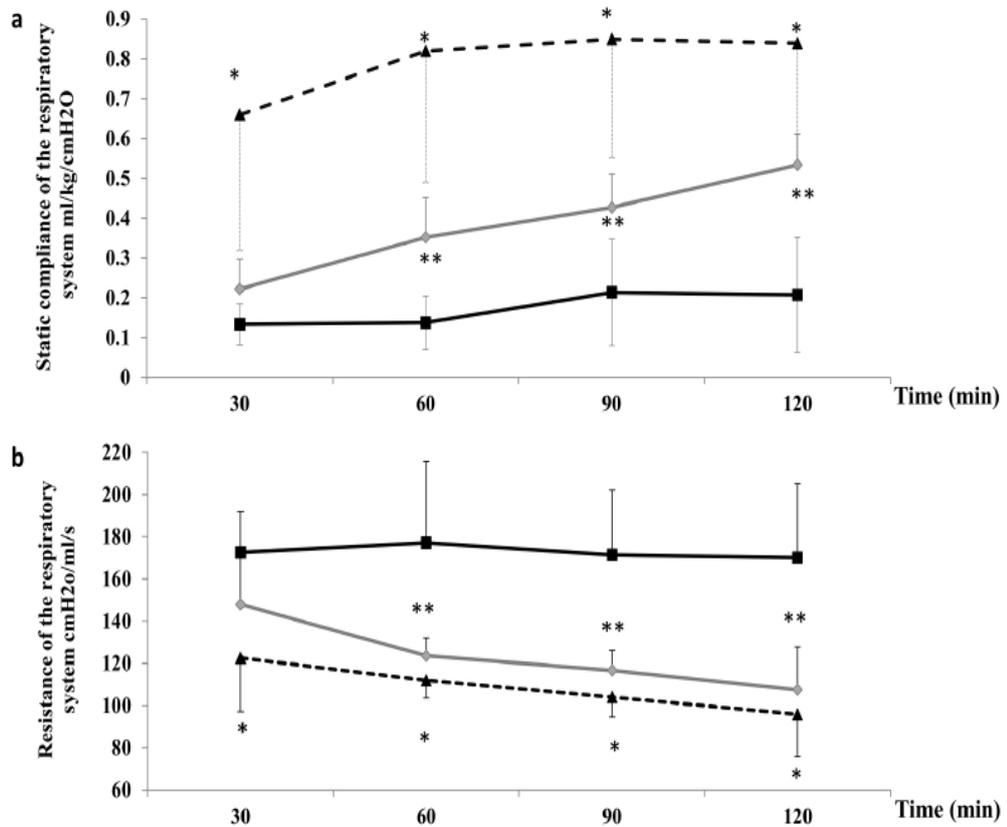
(a) Total lung volume increased in the 3 groups ($p < 0.05$). The upward trend was markedly higher in late preterm + steroids group (dotted line) than in preterm group (black solid line) and late preterm group (gray line). (b) Total lung fluid content did not change significantly in late preterm group (gray line) (§§ $p = 0.17$). Total lung fluid content increased gradually by approximately 30% in preterm group (black solid line) and decreased in the late preterm + steroids group (dotted line). Results are expressed as mean \pm SD. * $p < 0.05$ between preterm and late preterm + steroids groups. ** $p < 0.05$ between late preterm and preterm groups. † $p < 0.05$ between late preterm and late preterm + steroids groups. § $p < 0.05$ changes in total lung fluid or total lung volume between the beginning of experiments and the end at 120 minutes.



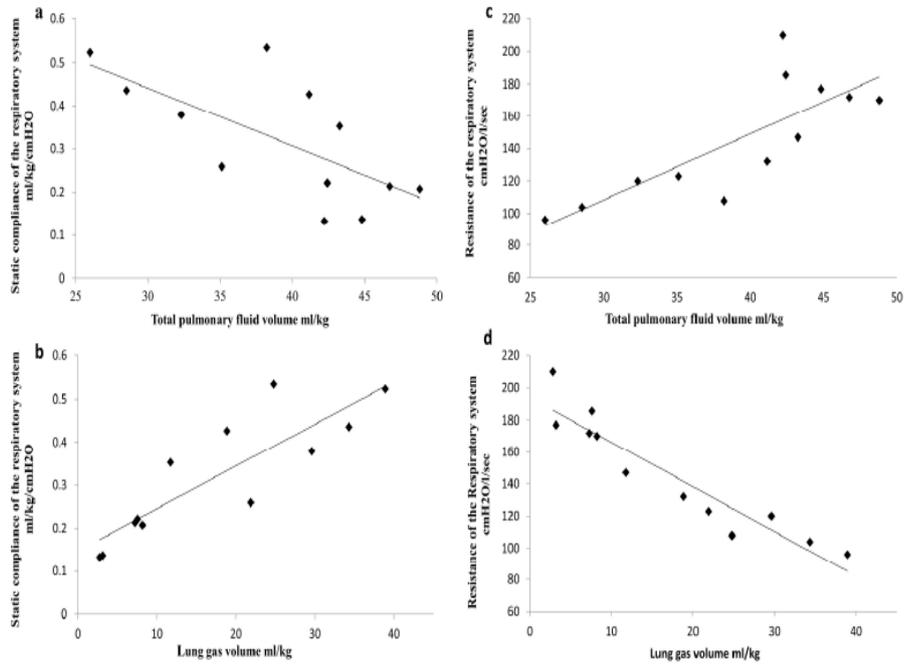
(a) Estimation of FRC in preterm group. (b) Estimation of FRC in late preterm group. (c) Estimation of FRC in late preterm + steroids lambs. Dotted area represents FRC. Shaded area represents total lung liquid measured by MRI. FRC expansion is impaired in preterm lambs and to a lesser extent in late preterm lambs compared to late preterm group + steroids lambs. Volumes are expressed as ml/kg.



Tidal volume (V_t , ml/kg) changes after starting ventilation in Preterm group (black solid line), late preterm group (gray line), and late preterm + steroids group (dotted line). V_t was higher in late preterm lambs + steroids than in preterm and late preterm lambs. Results are expressed as mean \pm SD. *: $p < 0.05$ between the preterm and late preterm lambs + steroids groups.



(a) Changes in the static compliance of the respiratory system. Static compliance was significantly higher in late preterm+ steroids group (dotted line) than in preterm (black solid line) and late preterm (gray line) groups at all times. (b) Changes in the resistance of the pulmonary system. Resistance was higher in preterm group (black solid line) at any time point than in late preterm (gray line), and late preterm + steroids (dotted line) lambs. Results are expressed as mean \pm SD. * $p < 0.05$ between preterm and late preterm + steroids groups. ** $p < 0.05$ between late preterm and preterm groups.



Correlation between total lung volume and total lung fluid content and both compliance and resistance of the respiratory system. (a) Static compliance was inversely correlated to the total lung fluid ($p < 0.024$, $r = 0.226$). (b) Static compliance was directly correlated to lung gas volume ($p < 0.023$, $r = 0.288$). Inversely, (c) the resistance of the respiratory system was directly correlated to the total lung fluid ($p < 0.001$, $r = 0.47$), (d) whereas the relation with the lung gas volume was negative ($p < 0.001$, $r = 0.61$)