

Marc Cloutier

**ÉTUDES DES MÉCANISMES BIOMOLÉCULAIRES DE LA  
CROISSANCE PULMONAIRE INDUITE PAR L'OCCLUSION  
TRACHÉALE : EMPHASE SUR LES ASPECTS VASCULAIRES**

Mémoire présenté  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de maîtrise en biologie cellulaire et moléculaire  
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE  
FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2005



Library and  
Archives Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Published Heritage  
Branch

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*

*ISBN: 0-494-04744-5*

*Our file* *Notre référence*

*ISBN: 0-494-04744-5*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**

## RÉSUMÉ

Les enfants prématurés ne pourront compléter un développement alvéolaire normal et auront à gérer des déficits respiratoires tout au long de leur vie. Il a été démontré que l'occlusion trachéale (OT) *in utero* permet de rattraper le développement normal. Nous avons développé un modèle *in vivo* murin d'occlusion trachéale permettant de faire des études moléculaires sur le développement pulmonaire induit par l'OT. L'objectif principal était de caractériser le développement vasculaire pulmonaire accéléré induit par l'OT. Les objectifs spécifiques étaient l'étude de l'expression des gènes du système endothéline dans un modèle ovin de hernie diaphragmatique congénitale (HDC) et d'OT, l'étude morphologique du développement vasculaire induit par l'OT chez la souris à l'aide d'un marqueur des cellules endothéliales et finalement, l'étude de la réponse à l'OT des gènes impliqués dans la formation des vaisseaux à l'aide du modèle de souris. Nos résultats suggèrent que l'expression des gènes du système endothéline est modulée à travers le développement pulmonaire mais que le système ne possède qu'un rôle limité dans l'hypertension pulmonaire liée à la HDC. De plus, nous avons démontré une maturation accélérée du réseau de capillaires suite à 24 heures d'OT. Finalement, nous avons démontré que l'OT induisait une croissance vasculaire coordonnée en augmentant l'expression d'ARNm des gènes impliqués dans l'angiogenèse, la vasculogenèse et ceux impliqués dans le maintien des vaisseaux matures.

## AVANT-PROPOS

Cet ouvrage n'aurait pu voir le jour sans l'appui et les encouragements de nombreuses personnes. Il me fait donc plaisir de prendre quelques lignes pour les remercier. Ces remerciements, bien que sincères, ne sont qu'un pâle reflet de ce que je vous dois.

Je dois réserver les premiers remerciements à mon directeur de recherche, Bruno Piedboeuf qui, outre le fait de m'avoir donné une chance de me faire valoir, m'a donné un projet des plus stimulants. Malgré ses nombreuses obligations, il a toujours pris le temps de m'écouter lorsque j'en avais besoin et de discuter avec moi pour partager ses connaissances et son expérience. En bout de ligne, les acquis d'une maîtrise dépendent grandement de l'encadrement assuré par le directeur. Durant ma formation, la supervision assurée par le D<sup>r</sup> Piedboeuf a été caractérisée par un dosage parfait de liberté et de direction permettant à l'étudiant de progresser en pensant et en s'impliquant. Son ardeur au travail et l'importance qu'il met à l'aspect pédagogique et à la rigueur scientifique ont fait naître en mon esprit une passion pour ce travail que je n'aurais cru capable d'exister au départ.

Merci à toute l'équipe de pédiatrie pour avoir rendu cette expérience des plus stimulantes et enrichissantes. Parmi ceux-ci, un merci spécial à Tommy Seaborn avec qui j'ai eu un plaisir énorme à travailler et à partager des idées. Je lui souhaite également bonne chance dans ses nouveaux projets ; je suis certain que tu seras un père extraordinaire. Merci aussi à Paul Khan, Marc-André Dugas, Claire Pelletier et à Mélanie Kavanagh.

Je tiens également à remercier les étudiants et chercheurs des unités de pédiatrie et de neurosciences qui ont tous contribué à leur façon à rendre notre environnement de travail si agréable. Certains sont devenus beaucoup plus que des coéquipiers de travail. Merci à François, Nicolas Lapointe, Brigitte, Michel, Mario, Jean-François et à tous les autres. Ce fût un plaisir de travailler avec vous. Merci également à Michel Labbé, Suzanne et Sylvie qui sont toujours d'un support technique inestimable.

Je dois réserver un espace spécial pour France Maltais avec qui j'ai passé le plus clair de mon temps au laboratoire et qui a bien voulu partager avec moi tous ses secrets techniques et m'enseigner si patiemment la chirurgie fœtale chez les souris. Je suis content de te voir heureuse dans ta nouvelle vocation, mais ta présence au laboratoire me manque énormément.

Merci aussi à mes parents, à mon frère, à ma sœur et à mes amis, particulièrement Samuel et François, que j'ai négligés mais qui êtes toujours là. Je l'apprécie beaucoup.

Je veux remercier Nathalie d'être toujours là, patiente et attentive. Je n'y serais pas arrivé sans toi. Merci d'être toi, tout simplement, à tous les jours.

Finalement, ce projet n'aurait pu être possible sans la participation de la Fondation de la Recherche sur les Maladies Infantiles et de la Chaire de Recherche en Périnatalogie Jeanne et Jean-Louis Lévesque.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ</b> .....	II
<b>AVANT-PROPOS</b> .....	III
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	V
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	VIII
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	IX
<b>ABRÉVIATIONS</b> .....	X
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	1
1.1. Introduction générale.....	1
1.2. Développement pulmonaire normal.....	2
1.2.1. Stades du développement pulmonaire.....	2
1.2.1.1. Caractéristiques des différents stades du développement pulmonaire .....	4
1.2.2. Développement alvéolaire .....	5
1.2.2.1. Facteurs régulant le développement alvéolaire .....	6
1.2.3. Développement vasculaire.....	8
1.2.3.1. Formation de vaisseaux sanguins .....	8
1.2.3.1.1. Vasculogenèse .....	8
1.2.3.1.2. Angiogenèse (par bourgeonnement).....	9
1.2.3.1.3. Angiogenèse (croissance microvasculaire par intussusception) .....	9
1.2.3.1.4. Angiogenèse (expansion) .....	10
1.2.3.2. Cellules de soutien des vaisseaux.....	11
1.2.3.3. Signalisation et interactions cellules-cellules impliquées dans le développement vasculaire .....	11
1.2.3.4. Développement vasculaire embryonnaire et fœtal .....	12
1.2.4. Interactions mésenchyme-épithélium.....	13
1.2.5. Facteurs de croissance .....	16
1.2.6. Rôles et effets des forces mécaniques sur le développement pulmonaire.....	20
1.3. Hypoplasie pulmonaire.....	23
1.3.1. Hernie diaphragmatique congénitale.....	24
1.3.1.1. Description générale .....	24
1.3.1.2. Pathophysiologie .....	24
1.3.1.3. Diagnostic .....	25
1.3.1.4. Traitement .....	26
1.3.1.5. Modèles expérimentaux de HDC .....	28
1.4. Occlusion trachéale .....	29
1.4.1. Effet de l'occlusion sur le développement pulmonaire .....	29
1.4.2. Effets adverses de l'occlusion trachéale.....	31
1.4.3. Modèles d'étude .....	31

1.4.4. Moment et durée de la chirurgie .....	33
1.4.5. Occlusion réversible .....	34
1.5. Les endothélines.....	35
1.5.1. Biosynthèse .....	35
1.5.2. Récepteurs des endothélines .....	36
1.5.3. Distribution .....	37
1.5.4. Régulation.....	38
1.5.5. Transduction des signaux .....	38
1.5.6. Activités biologiques.....	39
1.5.7. Rôle du système endothéline dans la HDC.....	40
1.6. Hypothèses de travail .....	41
1.7. Objectifs .....	41
<b>2. MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS .....</b>	<b>43</b>
2.1. Méthodologie et résultats de la première partie.....	43
2.2. présentation d'un article soumis sous le titre de «Effect of temporary tracheal occlusion on the endothelin system in experimental cases of diaphragmatic hernia.».	43
2.2.1. Avant-propos de l'article .....	43
2.2.2. Résumé de l'article.....	44
2.2.3. Titre .....	45
2.2.4. Auteurs.....	45
2.2.5. Abstract.....	45
2.2.6. Introduction.....	46
2.2.7. Materials and Methods .....	47
2.2.8. Results .....	51
2.2.9. Discussion .....	52
2.2.10. Figures Legend.....	56
2.3. Méthodologie de la deuxième partie.....	62
2.3.1. Protocole de chirurgie de l'occlusion trachéale <i>in vivo</i> murine.....	62
2.3.1.1. Subtilités inhérentes à la chirurgie.....	64
2.3.2. Lignée murine Tie2-lacZ.....	66
2.3.3. Préparation des tissus .....	67
2.3.4. Coloration des tissus.....	68
2.3.5. Immunohistochimie pour CD-31 (Pecam-1) .....	69
2.3.5.1. Analyses statistiques pour l'immunohistochimie Pecam-1 .....	69
2.4. Résultats de la deuxième partie .....	70
2.4.1. Résultat de la coloration .....	70
2.4.2. Résultats de l'immunohistochimie pour CD-31.....	71
2.5. Méthodologie de la troisième partie.....	77
2.5.1. Extraction d'ARN .....	78
2.5.2. Dosage de l'ARN .....	79
2.5.3. Réaction de transcriptase réverse avec hexamères aléatoires pour faire cDNA .....	79
2.5.4. Dilution des échantillons .....	80
2.5.5. Courbe standard .....	80
2.5.6. Choix des oligomères servant d'amorce.....	81

2.5.6.1. Choix des oligomères pour les isoformes de VEGF.....	81
2.5.6.2. Choix des oligomères pour les autres gènes .....	82
2.5.7. PCR quantitatif.....	83
2.5.8. Analyse statistique.....	85
2.6. Résultats de la troisième partie .....	86
2.6.1. PCR quantitatif pour les isoformes de VEGF.....	86
2.6.2. PCR quantitatif pour les récepteurs de VEGF .....	87
2.6.3. PCR quantitatif pour les angiopoïétines .....	88
2.6.4. PCR quantitatif pour Tie2.....	89
<b>3. Discussion</b> .....	91
3.1. Discussion sur la deuxième partie.....	91
3.2. Discussion sur la troisième partie .....	99
3.3. Discussion générale.....	103
3.3.1. Prochaines étapes du projet.....	104
3.3.2. But à long terme du laboratoire.....	105
<b>4. Références</b> .....	106



**LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau 1.1 :Tableau des stades du développement pulmonaire et leur correspondance gestationnelle chez l'humain, la souris et le mouton.....</b>	<b>3</b>
<b>Tableau 2.1 : Primer sequences and northern blot probe sizes .....</b>	<b>55</b>
<b>Tableau 2.2 : Séquence des amorces pour l'amplification au PCR quantitatif des récepteurs de VEGF (FLT-1, FLK-1, les angiopoïétines 1 et 2 et TIE 2).....</b>	<b>83</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Formation des cloisons inter alvéolaires par septation.....	6
Figure 1.2 : Formation de nouveaux vaisseaux.....	10
Figure 1.3 : Réseau vasculaire pulmonaire.....	13
Figure 1.4 : Interactions entre le mésenchyme et l'épithélium dans le bourgeonnement des voies aériennes.....	16
Figure 1.5 : Modèle de la régulation du développement vasculaire par les facteurs de croissance et leurs récepteurs. ....	20
Figure 1.6 : Mouvements de liquides à l'intérieur du poumon et pression intraluminaire pendant les périodes d'apnée et de mouvements respiratoires fœtaux .....	22
Figure 1.7 : Schématisation graphique d'une hernie diaphragmatique congénitale.....	25
Figure 1.8 : Effet de l'occlusion trachéale sur le développement pulmonaire.....	30
Figure 1.9 : Structure des endothélines et de sarafotoxine 6e .....	36
Figure 2.1 : Effect of temporary tracheal occlusion on the endothelin system mRNA expression in experimental congenital diaphragmatic hernia. ....	56
Figure 2.2 : Immunolocalization of ETs peptides in the four experimental groups.....	56
Figure 2.3 : Immunolocalization of ET <sub>A</sub> receptor in the four experimental groups.....	56
Figure 2.4 : Les principales étapes du protocole de chirurgie <sup>132</sup> .....	66
Figure 2.5 : coloration de poumons fœtaux (17,5 jours) de souris de la lignée transgénique Tie2-lacZ .....	71
Figure 2.6 : Immunohistochimie contre Pecam-1 pour les poumons 1 heure.....	73
Figure 2.7 : Immunohistochimie contre Pecam-1 pour les poumons 3 heures ....	74
Figure 2.8 : Immunohistochimie contre Pecam-1 pour les poumons 6 heures ....	75
Figure 2.9 : Immunohistochimie contre Pecam-1 pour les poumons 24 heures ..	77
Figure 2.10 : Représentation schématique des isoformes majeurs de VEGF et l'emplacement des amorces pour le PCR quantitatif ainsi que leur séquence .....	82
Figure 2.11 : Évolution de la fluorescence du SYBR <sup>®</sup> Green lors de la réaction de polymérisation.....	84
Figure 2.12 : Effet de l'OT sur l'expression d'ARNm des isoformes de VEGF ..	87
Figure 2.13 : Effet de l'OT sur l'expression d'ARNm des récepteurs de VEGF.	88
Figure 2.14 : Effet de l'OT sur l'expression d'ARNm des angiopoïétines 1 et 2.	89
Figure 2.15 : Effet de l'OT sur l'expression d'ARNm de Tie 2.....	90

## **ABRÉVIATIONS**

**Ang** : Angiopoïétine  
**C** : Contrôles non-opérés (non-operated controls)  
**CDH** : Congenital diaphragmatic hernia (hernie diaphragmatique congénitale)  
**ECE** : Enzyme de conversion des endothélines (endothelin converting enzyme)  
**ECMO** : Circulation extra-corporelle  
**ET** : Endothélines  
**ET<sub>A</sub>** : Récepteur A des endothélines (endothelin A receptor)  
**ET<sub>B</sub>** : Récepteur B des endothélines (endothelin B receptor)  
**ETs** : Endothelins  
**ET-R** : Récepteur des endothélines  
**FGF** : Facteur de croissance des fibroblastes  
**Flt1** : Récepteur de VEGF 1  
**Flk1** : Récepteur de VEGF 2  
**Gd** : Jours de gestation  
**HDC** : Hernie diaphragmatique congénitale  
**HS** : Héparans sulfates  
**MMP** : Métalloprotéases de la matrice extracellulaire  
**OT** : Occlusion trachéale  
**PDGF** : Facteur de croissance dérivé des plaquettes sanguines  
**PH** : Hypertension pulmonaire  
**Ptc1** : Patched-1  
**RTK** : Récepteur tyrosine kinase  
**Shh** : Sonic Hedgehog  
**TGF** : Facteur de croissance des tumeurs  
**TR** : Relâchement de l'occlusion trachéale (tracheal occlusion release)  
**VEGF** : Facteur de croissance vasculaire endothélial

## 1. INTRODUCTION

### **1.1. Introduction générale**

La vie, sous toutes ses formes, est fortement dépendante de la respiration cellulaire et donc de l'oxygène. L'oxygène est utilisé par les cellules pour l'oxydation des métabolites dans le but de produire de l'énergie. L'énergie issue de la respiration est convertie sous la forme d'adénosine triphosphate (ATP) lors de la phosphorylation oxydative. Les êtres vivants, des plus simples aux plus complexes, ont dû évoluer selon divers facteurs comme l'environnement et leur taille, vers un système leur permettant de distribuer l'oxygène à chacune de leurs cellules. Chez les mammifères adaptés au milieu aérien exclusivement comme l'humain, les poumons assurent la diffusion de l'oxygène dans le sang. La trachée se divise en bronches, bronchioles, saccules et finalement en alvéoles. Les 300 millions d'alvéoles contenues par le poumon adulte représentent une surface d'échange gazeux incomparable. L'alvéole, afin de remplir son rôle le plus efficacement possible, est principalement constitué de deux types cellulaires différents : les pneumocytes de type I qui sont très minces afin de favoriser les échanges respiratoires et les pneumocytes de type II qui sécrètent le surfactant. Le surfactant permet de maintenir un film humide à la surface des alvéoles. Les alvéoles sont ceinturés par un imposant système de capillaires en forte apposition avec les cellules alvéolaires. Ceci permet de fournir du sang fraîchement oxygéné à tous les tissus. Suite à l'inspiration, la pression partielle en oxygène dans l'alvéole devient supérieure à celle du sang. Ainsi, la mince couche de pneumocytes de type I et de cellules endothéliales permettra la diffusion de l'oxygène vers le sang contenu par le capillaire. Le même phénomène mais dans le sens inverse pousse le dioxyde de carbone du sang vers les alvéoles où il pourra être expulsé lors de l'expiration. À cause des mouvements d'air dans l'alvéole, la pression intra-alvéolaire varie grandement. Ces jeux de pressions pourraient faire en sorte que l'alvéole s'affaisse sur elle-même, ce qui l'empêcherait de faire les échanges de façon efficace. Cependant, le surfactant a une composition telle qu'il diminue grandement la tension de surface et maintient l'alvéole ouvert. Le développement d'un organe aussi complexe et ayant une

fonction aussi spécifique que le poumon doit être parfaitement synchronisé par de fines interactions cellulaires et moléculaires.

L'organogenèse pulmonaire normale est donc le résultat d'expression de gènes impliqués dans la manifestation des caractères spécifiques du poumon. Les cellules du mésenchyme par exemple, par l'intermédiaire de facteurs diffusibles comme des facteurs de croissance et certains constituants de la matrice extracellulaire contrôlent la croissance et la différenciation des cellules épithéliales. De plus, le développement pulmonaire est influencé par des facteurs de nature mécanique qui affecteront les cellules effectrices (épithéliales, mésenchymateuses) qui, à travers des sentiers de signalisation, induiront ou inhiberont l'expression de gènes régulateurs clés dans la programmation du développement.

Pour que le poumon puisse assurer sa fonction à la naissance, il devra avoir atteint durant la vie foetale un niveau de maturité adéquat. Il devra y avoir un nombre suffisant d'alvéoles avec un lit vasculaire suffisant pour une hématoxe efficace. De plus, il devra être prêt à se défendre contre de nombreuses attaques de micro-organismes et contre le stress oxydatif. Le poumon en développement est très sensible et toute perturbation pourrait mener à des conséquences pouvant être létales pour le fœtus ou pour le nouveau-né. Par exemple, l'hypoplasie pulmonaire, qui est la conséquence de multiples facteurs, est toujours très dangereuse pour le nouveau-né et représente un défi clinique important pour les cliniciens. Il est cependant nécessaire de faire un survol du développement pulmonaire normal afin de mieux comprendre les causes et les conséquences d'un développement anormal.

## **1.2. Développement pulmonaire normal**

### **1.2.1. Stades du développement pulmonaire**

Le développement pulmonaire est par convention divisé en cinq stades : embryonnaire, pseudoglandulaire, canaliculaire, sacculaire et alvéolaire. Ce classement est basé sur des observations histologiques. Il est important de noter que cette classification est en

quelque sorte arbitraire car les développements parallèles des différents composants du poumon (voies aériennes, acini, vasculature, matrice extracellulaire, différenciation cellulaire et maturation biochimique) formant l'ensemble du développement, est un processus continu se poursuivant deux ans après la naissance. Cependant, ces processus coordonnés se produisent de telle façon qu'à tout moment durant le développement, il existe des relations caractéristiques entre les composants définissant chacun des stades du développement. Le tableau suivant résume les principales étapes du développement avec les âges gestationnels pour l'humain, la souris et le mouton.

**Tableau 1.1 : Tableau des stades du développement pulmonaire et leur correspondance gestationnelle chez l'humain, la souris et le mouton.**

Stades	Humain <sup>79</sup> (semaines)	Souris <sup>182</sup> (jours)	Mouton <sup>79</sup> (jours)	Principaux évènements <sup>140</sup>
Embryonnaire	0-6	<9,5	0-40	Évagination du bourgeon primaire
Pseudoglandulaire	~6-16	9,5-16,6	~40-80	Début de différenciation cellulaire
Canaliculaire	~16-26	16,6-17,4	~80-120	Début vascularisation et développement des acini
Sacculaire	~26-terme	17,4-jour 5 postnatal	~120-terme	Subdivision des saccules
Alvéolaire	32-2 ans après naissance	Jour 5 postnatal- jour 30 postnatal	~120-après la naissance	Apparition des alvéoles, expansion et maturation micro-vasculaire

Il existe une différence importante entre les développements pulmonaires humain et murin. En effet, alors que le stade alvéolaire humain débute dès la 32<sup>e</sup> semaine de gestation, la maturation alvéolaire murine ne débute que cinq jours après la naissance. De plus, il existe également une variation biologique en plus d'un chevauchement de ces périodes chez un même individu. Par exemple, dépendant des auteurs, la période alvéolaire est décrite à partir de la 32<sup>e</sup> jusqu'à la 36<sup>e</sup> semaine et elle se termine entre la première année et la deuxième année. On peut penser que ces variations sont encore plus grande pour des animaux comme la souris, ayant un temps de gestation plus court, où une heure de gestation représente un très long moment.

### 1.2.1.1. Caractéristiques des différents stades du développement pulmonaire

Autour du 22<sup>e</sup> jour chez l'humain, pendant le stade *embryonnaire*, apparaît un bourgeon s'évaginant à partir de la partie antérieure de l'intestin primitif. Ce bourgeon se divise immédiatement en deux bourgeons bronchiques qui continuent à se subdiviser en bronches lobaires, segmentaires et subsegmentaires jusqu'à la 6<sup>e</sup> semaine<sup>19</sup>.

De la 6<sup>e</sup> à la 16<sup>e</sup> semaine, pendant la période pseudoglandulaire, il y a croissance rapide des voies aériennes primitives apparues pendant la période précédente. Les structures sont remplies de liquides et sont formées de grandes cellules épithéliales en forme cuboïdale donnant au poumon l'apparence d'une glande; d'où le nom du stade de développement. Par ailleurs, les cellules épithéliales commencent à se différencier en cellules en gobelet, en cellules de Clara et en cellules épithéliales ciliées en commençant par le centre de l'arbre bronchique vers les extrémités. Au terme de cette période, l'arbre aérien de conduction est formé jusqu'aux bronchioles terminales.

Par la suite, pendant la période canaliculaire, les voies aériennes s'élargissent. Les voies aériennes terminales se subdivisent et deviennent progressivement des saccules terminales. Le tissu mésenchymateux s'amincit et se vascularise afin de diminuer le plus possible la future distance de diffusion des gaz. Dans les voies aériennes, se différencient les deux types de pneumocytes typiques de l'épithélium distal. Malgré son immaturité, le poumon possède déjà des régions fonctionnelles pour les échanges gazeux car il apparaît à ce stade les premières unités respiratoires ayant une barrière air-sang. Parallèlement à l'augmentation rapide de la surface des voies aériennes, débute la sécrétion du surfactant par les pneumocytes de type II.

Pendant le stade sacculaire, les deux principaux événements sont la production de saccules, ou alvéoles primitives, par la division des bronchioles terminales et l'amincissement des septa. Le potentiel respiratoire augmente de façon très rapide car l'interstitium s'amincit, le lit vasculaire s'étend et la surface de diffusion s'agrandit de façon exponentielle.

La dernière étape est habituellement celle où la plupart des humains naissent. Le développement alvéolaire est tout de même un phénomène essentiellement postnatal. Le tissu interstitiel s'amincit considérablement. Apparaissent les septa secondaires, le lit vasculaire continue de s'agrandir et les capillaires, qui étaient doubles entre les lumières alvéolaires, deviennent simples. Certains auteurs divisent le développement pulmonaire en six étapes au lieu de cinq. Ils distinguent tout simplement le développement microvasculaire du développement alvéolaire. Le stade alvéolaire, étant données son importance et sa complexité, est vu plus en détail dans la prochaine section.

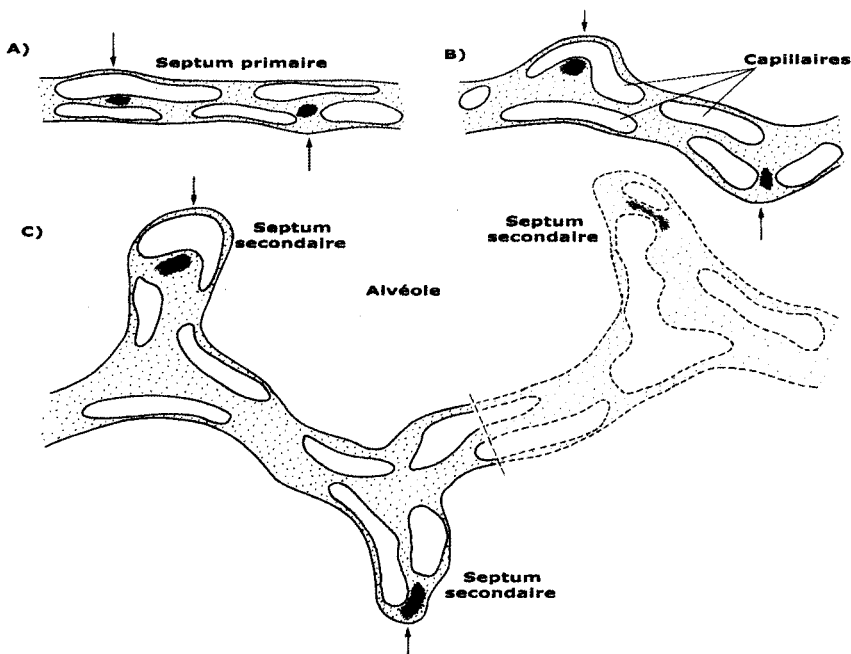
### **1.2.2. Développement alvéolaire**

C'est lors de l'alvéolisation que s'effectue la plus grande augmentation de la surface d'échange gazeux. La formation des alvéoles est précédée par une courte période d'expansion des saccules. Il y a par la suite apparition de nombreux bourgeons apparaissant le long des septa primaires, ce sont les septa secondaires. Ces bourgeons augmentent de taille très rapidement et se dressent perpendiculairement aux septa primaires et par le fait même, divisent les espaces aériens primitifs en plus petites unités que l'on appelle alvéoles. Tout comme les septa primaires, les septa secondaires contiennent un système de capillaires doubles. Les nouvelles alvéoles peuvent par la suite augmenter de volume et être divisées par de nouveaux septa. Les septations suivantes sont possibles tant que le réseau de capillaires contenus par le septum à partir duquel se forme le bourgeon est double <sup>27, 29, 168</sup>. En effet, les septa séparant les lumières alvéolaires vont graduellement s'amincir et le double réseau de capillaires devient, par fusion des capillaires, un réseau unique faisant face aux deux lumières alvéolaires à la fois, donnant leur aspect mature aux septa interalvéolaires. Il semble que la réduction du tissu interstitiel et la restructuration des capillaires soient étroitement liées.

La septation est accompagnée de nombreux évènements (prolifération cellulaire, réduction du tissu interstitiel, renouvellement de la matrice extracellulaire et dépôts d'élastine au sommet des septa secondaires) sous la dépendance de différents facteurs de



régulation : métalloprotéases, facteurs de croissance, acide rétinolique, hormones, adéquation aux besoins en oxygène.



**Figure 1.1 : Formation des cloisons inter alvéolaires par septation**

Les septa primaires sont formés d'un système de capillaires doubles. Les petites crêtes (flèches) sont formées par la protrusion d'une des couches de capillaires du septum primaire. Les crêtes croissent en hauteur et deviennent des septa secondaires. Les fibres d'élastines (points noirs) ont clairement un rôle à jouer dans la septation secondaire (Figure adaptée de Gaultier C., Lung development, 1999<sup>60</sup>).

### 1.2.2.1. Facteurs régulant le développement alvéolaire

Un pic de prolifération cellulaire chez les fibroblastes, les cellules endothéliales et les pneumocytes de type II a été observé au moment le plus intense de la multiplication alvéolaire<sup>75, 92, 194</sup>, suggérant leur importance pendant cette période. En plus de jouer un rôle important comme support du parenchyme, la matrice extracellulaire joue aussi un rôle primordial dans la régulation de la différenciation, l'organisation et les fonctions de nombreux types cellulaires. Le processus du développement pulmonaire est dépendant des interactions existantes entre la matrice et les cellules pulmonaires<sup>139</sup>. La matrice extracellulaire, pendant le développement alvéolaire est constamment synthétisée et renouvelée afin, entre autre, de créer et fermer des discontinuités de la membrane basale.

Les discontinuités dans la membrane basale permettent des contacts entre cellules épithéliales alvéolaires et cellules interstitielles, ces derniers étant essentiels pour la différenciation des cellules épithéliales <sup>3</sup>.

Un rôle des fibres d'élastine dans la formation des septa secondaires est suggéré par l'apparition de fibres élastiques immédiatement avant le développement alvéolaire et par la présence constante d'élastine au sommet des septa secondaires <sup>134, 197</sup>. La source majeure d'élastine au cours de la septation est les myofibroblastes alvéolaires qui se retrouvent dans le septum primaire à l'endroit où se forme le bourgeon septal. De plus, les métalloprotéases de la matrice extracellulaire (MMPs), une classe de protéines ayant la capacité de dégrader l'ensemble des composants macromoléculaires de la matrice extracellulaire, semblent participer au renouvellement physiologique de la matrice. L'expression de plusieurs membres de la famille des MMPs, plus particulièrement MMP-2, augmente précisément au moment de la septation <sup>24</sup>. Récemment, il a été démontré que de nombreux facteurs de croissance induisent des signaux modulant les interactions épithélium-mésenchyme et régulant la morphogenèse du développement alvéolaire. En effet, des facteurs de croissance tels que le facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF : vascular endothelial growth factor), le facteur de croissance dérivé des plaquettes sanguines-A (PDGF-A : platelet derived growth factor-A) et le facteur de croissance des fibroblastes (FGF : fibroblast growth factor) jouent des rôles primordiaux dans le bourgeonnement lors de la septation, de la maturation des capillaires et de la communication entre les fibroblastes, l'épithélium alvéolaire et les cellules endothéliales <sup>18, 36, 59, 88, 120, 195, 208</sup>. L'implication des facteurs de croissance et plus particulièrement de VEGF dans le cadre du développement pulmonaire sera vue plus en détail dans une section subséquente. Il a été démontré que l'acide rétinoïque peut stimuler la synthèse d'élastine par les fibroblastes <sup>125</sup>, que pendant la septation, il y a augmentation à l'intérieur des poumons des protéines liant le rétinol et des récepteurs RAR <sup>76</sup> et qu'un déficit postnatal en vitamine A mène à un fort retard d'alvéolisation <sup>35</sup>. L'acide rétinoïque semble donc être un facteur important de l'alvéolisation. Le développement des alvéoles est également sous contrôle hormonal. Il semble que la septation soit sous contrôle négatif par les glucocorticoïdes <sup>73</sup> et sous un contrôle positif par les hormones

thyroïdiennes <sup>137</sup>. Finalement, une hypothèse a récemment été formulée disant que la formation alvéolaire et la surface totale atteinte par les alvéoles soient directement proportionnelles aux besoins et/ou à la disponibilité en oxygène <sup>136</sup>. Par exemple, il a été démontré, chez les populations vivant en altitude, une augmentation de la surface alvéolaire.

### **1.2.3. Développement vasculaire**

Les alvéoles et les voies aériennes se développent en forte coordination avec le système vasculaire. Les alvéoles ne sont une région efficace d'échanges gazeux que s'il y a un flot sanguin adéquat dans la région. Il est donc logique de penser que des mécanismes de communication existent entre les cellules des voies aériennes et celles des vaisseaux sanguins. Par ailleurs, il est important de réaliser que la vascularisation n'est pas strictement des vaisseaux composés de cellules endothéliales. Les cellules de soutien ainsi qu'un développement spatial et temporel coordonné avec celui du reste du poumon sont aussi nécessaires. Cependant, avant de regarder plus en détail les différentes phases du développement vasculaire, nous devons conceptualiser les deux principaux modes de croissance des vaisseaux sanguins : la vasculogenèse et l'angiogenèse.

#### **1.2.3.1. Formation de vaisseaux sanguins**

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins doit nécessairement se faire soit *de novo* à partir de cellules progénitrices (vasculogenèse) ou à partir de vaisseaux déjà existants (angiogenèse).

##### **1.2.3.1.1. Vasculogenèse**

La vasculogenèse se produit tôt dans le développement pulmonaire. Des cellules progénitrices du mésenchyme s'engagent dans une lignée endothéliale (angioblastes) ou dans une lignée de cellules sanguines primitives (hémangioblastes). Ces deux types cellulaires vont respectivement former un réseau cellulaire sinusoïdal et des îlots sanguins. Puis, les angioblastes formant les tubes sinusoïdaux continuent de s'assembler

et de s'organiser en canaux, formant ainsi des capillaires primitifs contenant les globules rouges <sup>89</sup>. Le fait que les nouveaux vaisseaux sanguins se forment toujours à une distance constante des bourgeons terminaux laisse croire qu'il y a un facteur provenant des futures voies aériennes menant à leur formation <sup>77</sup>. Cette forme de développement des vaisseaux est observée jusqu'à 17 semaines du développement chez l'humain <sup>77</sup>.

#### **1.2.3.1.2. Angiogenèse (par bourgeonnement)**

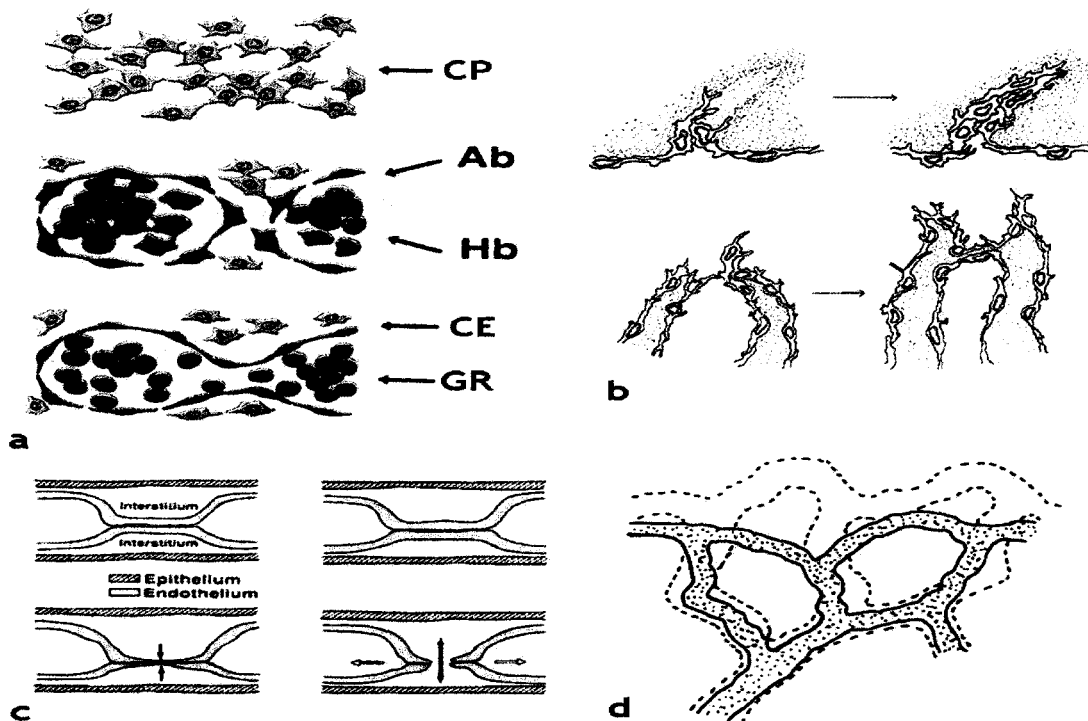
Dans l'angiogenèse par bourgeonnement, les capillaires et les petits vaisseaux forment des bourgeons ressemblant à de nouveaux capillaires. La formation du bourgeon commence avec la déstabilisation de la membrane basale par des protéases. Il y a par la suite extension d'un pseudopode de cellules endothéliales à travers l'ouverture nouvellement formée, puis migration de cellules endothéliales vers l'excroissance et formation d'un bourgeon. À ce moment, il doit y avoir prolifération des cellules endothéliales pour une croissance soutenue. Le bourgeon continue de s'allonger jusqu'à ce qu'il puisse fusionner avec un autre bourgeon ou un autre vaisseau afin de former un nouveau circuit et ainsi contribuer à rendre plus mature le réseau.

#### **1.2.3.1.3. Angiogenèse (croissance microvasculaire par intussusception) <sup>30</sup>**

Dans de très petits vaisseaux comme les capillaires, il peut se former des zones de contact entre deux membranes de cellules endothéliales opposées d'un même capillaire, menant à la formation de ponts inter-endothéliaux. L'endothélium s'amincit au centre de la zone de contact jusqu'à ce qu'il soit perforé et envahi par du tissu conjonctif. L'ouverture ainsi créée est ensuite stabilisée par l'inclusion de myofibroblastes et de péricytes et la formation de fibres de collagène. Le capillaire est ainsi divisé en deux parties qui peuvent ensuite croître et rejoindre un autre vaisseau afin de rendre plus mature le réseau de capillaires.

#### 1.2.3.1.4. Angiogenèse (expansion)

La lente expansion du réseau vasculaire déjà existant est faite par l'augmentation du diamètre ou de la longueur des vaisseaux déjà existants grâce à la prolifération des cellules endothéliales et des cellules appelées cellules murales (péricytes, fibroblastes, cellules de muscles lisses) <sup>169</sup>. Cette expansion résulte en l'augmentation du diamètre du lumen et de la longueur des segments.



**Figure 1.2 : Formation de nouveaux vaisseaux.**

(a) vasculogenèse : cellules progénitrices (CP); angioblastes (Ab); hémangioblastes (Hb; cellules endothéliales (CE); globules rouges (GR). (b) angiogenèse par bourgeonnement (c) croissance microvasculaire par intussusception (d) angiogenèse par expansion. (Figure adaptée de *The Lung : Development, Aging and the Environment*, Harding, R., Pinkerton K.E. et Plopper C.G., 2004)<sup>89</sup>

### **1.2.3.2. Cellules de soutien des vaisseaux**

Les cellules formant une paroi autour de l'endothélium sont essentielles pour le développement vasculaire. Elles stabilisent les nouvelles structures et régulent la réponse aux vaso-médiateurs. Les principaux types cellulaires de la membrane basale sont les péricytes, les cellules de muscles lisses et les fibroblastes.

Les péricytes sont surtout présents autour des capillaires et des petits vaisseaux <sup>173</sup>. Contrairement aux cellules de muscles lisses, ils partagent la membrane basale endothéliale et n'ont pas un réseau étendu de filaments ou de plaques d'attachement <sup>173</sup>. Pendant la formation de bourgeons lors de l'angiogenèse, ils empêchent le plasma de s'échapper dans le tissu interstitiel. Ils ont aussi la capacité de se contracter en réponse aux vaso-médiateurs. Les muscles lisses ont une forte capacité à se contracter. Ils sont surtout présents autour des plus grands vaisseaux. Plus les vaisseaux sont petits, moins il y a de muscles lisses; il n'y a plus aucune cellule de muscles lisses autour des capillaires <sup>89</sup>. Les différentes formes de fibroblastes sont présentes autour de la plupart des vaisseaux. Ils stabilisent les vaisseaux lors de l'angiogenèse et sont les précurseurs des péricytes autour des capillaires <sup>89</sup>.

### **1.2.3.3. Signalisation et interactions cellules-cellules impliquées dans le développement vasculaire**

La formation et la croissance des vaisseaux est le résultat de l'interaction entre les cellules endothéliales et les cellules péri-endothéliales. En effet, le développement vasculaire est régulé par des signaux paracrines entre les récepteurs tyrosine kinases sur les deux types cellulaires et leurs ligands (facteurs de croissance). Les ligands principalement impliqués sont VEGF, PDGF, FGF et les angiopoïétines (Ang) 1 et 2 (Ang1 et Ang2). L'implication des facteurs de croissance sera discutée ultérieurement.

#### 1.2.3.4. Développement vasculaire embryonnaire et fœtal

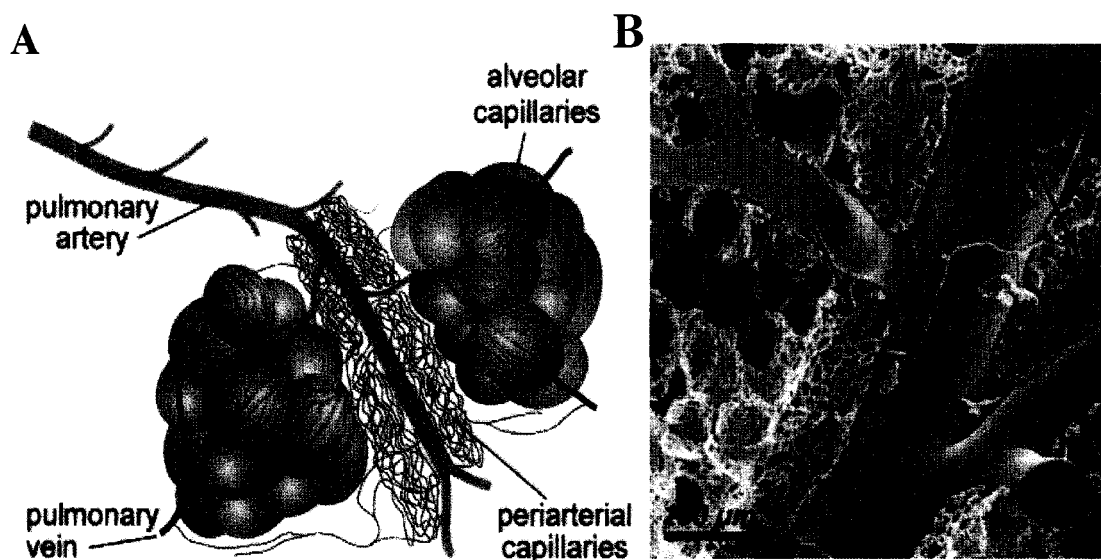
Les débuts du développement vasculaire sont très importants car les anomalies fonctionnelles et structurelles surviennent lors des tous premiers stades du développement. Afin de comprendre la pathogenèse de ces troubles, il est important de comprendre les différentes phases du développement vasculaire fœtal.

Le développement vasculaire des poumons débute en même temps que l'organogénèse pulmonaire, c'est-à-dire vers la quatrième semaine de gestation. L'artère pulmonaire principale se développe à partir d'angioblastes provenant du cœur. Vers la sixième semaine de gestation, le patron de vascularisation autour des premières voies aériennes est présent. Les vaisseaux préacinaires se développent en conjonction avec les voies aériennes alors que les plus petits vaisseaux intra-acinaires se développeront plus tard lors de l'alvéolisation. Progressivement, les artères deviennent entourées de cellules de muscles lisses. Vers la vingtième semaine, le nombre final d'artères préacinaires est atteint. Les vaisseaux continueront à grandir, s'allonger et à augmenter leur diamètre.

Alors que les artères préacinaires se développent par angiogenèse à partir de l'artère centrale, les capillaires et les vaisseaux distaux se développent par vasculogénèse, puis par angiogenèse jusqu'à ce qu'ils fusionnent avec les réseaux plus proximaux<sup>46, 67, 167</sup>. En effet, il y a tout d'abord en périphérie du poumon, formation d'îlots sanguins qui seront progressivement entourés d'un tube de cellules endothéliales. Puis, la vasculature distale se développera par angiogenèse<sup>46</sup>. Vers la douzième semaine, un réseau de capillaire élaboré entoure déjà les voies aériennes distales. Vers les semaines 22-23 de gestation, les capillaires sont très près des cellules épithéliales alvéolaires et au moins une artère accompagne chacune des voies aériennes.

À la naissance, le poumon et sa vasculature sont prêts à supporter la vie extra-utérine. Cependant, ils ne sont pas encore complètement matures et de nombreux changements apparaîtront à la naissance. La réponse à la transition est marquée par une forte augmentation du rythme auquel les vaisseaux se développent en diamètre et en longueur

et par l'apparition de nouveaux embranchements intra-acinaires et intra-alvéolaires par angiogenèse<sup>28,31</sup>. La densité de capillaires augmente par le mécanisme d'angiogenèse en utilisant des processus de bourgeonnement et d'intussusception concomitamment à la formation des alvéoles. Progressivement, le système de capillaires doubles fusionne et devient simple, caractéristique d'un système mature. Vers 18 mois, la formation de nouveaux vaisseaux ralentit tout comme la formation des alvéoles. Cependant, les vaisseaux continuent à prendre de l'expansion, tout comme le reste du corps qui continue à grandir. Chez l'humain, de la naissance jusqu'à l'âge de 19 ans, le volume total des capillaires augmente 35 fois<sup>32,191</sup>.



**Figure 1.3 : Réseau vasculaire pulmonaire.**

A) Représentation schématique représentant le réseau de capillaires alvéolaires et les capillaires entourant une artère pulmonaire. B) Photos prise en microscopie électronique du réseau vasculaire pulmonaire montrant une artère (PA) et les capillaires l'entourant (flèches) et le réseau de capillaires alvéolaires (Figure adaptée de Pabst et coll. , 2001<sup>154</sup>).

#### 1.2.4. Interactions mésenchyme-épithélium

Pendant le développement pulmonaire, l'épithélium se développe en association avec la génération progressive de voies aériennes, c'est-à-dire par la division de celles déjà existantes, un mécanisme dans lequel le mésenchyme joue un rôle déterminant. Le rôle des interactions entre cellules épithéliales et mésenchymateuses dans la régulation de la



morphogénèse pulmonaire précoce a été démontré par les expériences classiques et plus récentes de recombinaison du mésenchyme. Ces expériences ont permis de remarquer que l'épithélium du poumon a la capacité de modifier son patron de croissance lorsque recombinaison avec du mésenchyme de différentes origines <sup>7, 45, 171</sup>. L'épithélium pulmonaire possède donc une certaine plasticité dans son phénotype éventuel et dans sa capacité à proliférer et à migrer dépendant des messages inductifs reçus du mésenchyme. Les interactions entre le mésenchyme et l'épithélium activent ou inhibent les mécanismes médiés par les facteurs de transcription, la signalisation via les facteurs de croissance, les mécanismes de contrôle du cycle cellulaire et l'expression et la signalisation de la matrice extracellulaire de façon spécifique selon le compartiment tissulaire <sup>193</sup>.

La transmission des signaux morphogénétiques du mésenchyme, vers l'épithélium et vice-versa, se fait de différentes façons. Plus précisément, les signaux peuvent être transmis par des interactions des cellules avec la matrice extracellulaire, par des facteurs solubles comme les facteurs de croissance, ou directement par des contacts cellule-cellule

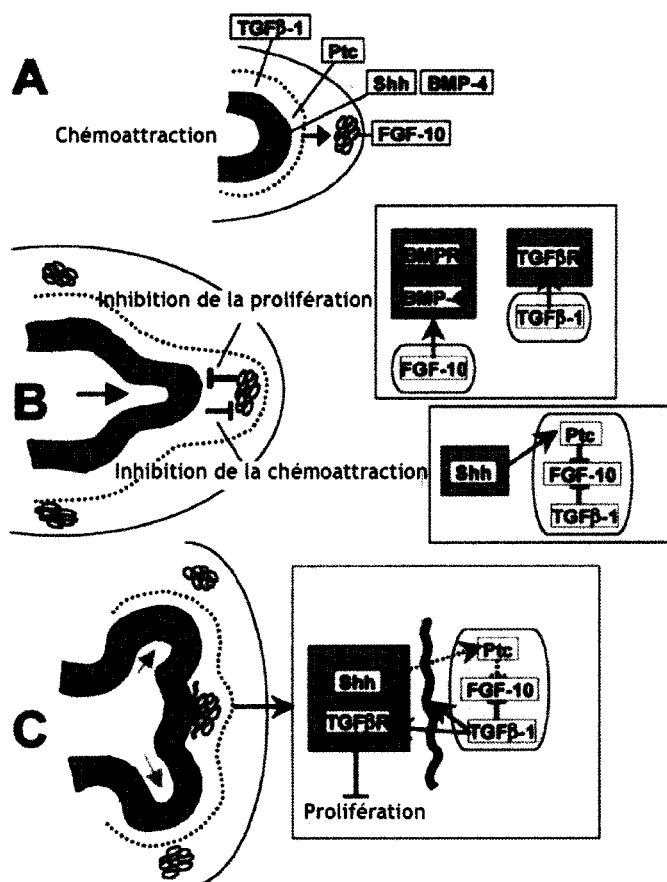
Les interactions sont de type inductif (induction de l'expression d'un groupe de gènes) ou permissif (pas de changement dans le répertoire des gènes exprimés, mais changement des niveaux d'expression) <sup>159</sup>. Les réponses aux interactions sont l'engagement ou la progression dans une lignée. Le premier type de réponse arrive surtout au début du développement pulmonaire alors que le second est important surtout vers la fin, lors des fins ajustements comme lors de l'alvéolisation. Les échanges de signaux entre les couches cellulaires de l'épithélium et du mésenchyme des bourgeons naissant établissent des boucles de rétroactions contrôlant la grosseur des voies aériennes, les patrons d'embranchement et le sort de chaque cellule. Les molécules de signalisation sont exprimées le long du bourgeon selon un gradient dépendant de l'emplacement de la cellule dans le bourgeon.

Les mécanismes inductifs et permissifs doivent être balancés de telle façon que la division des voies aériennes se fait de façon coordonnée dans le temps et dans l'espace. Il existe un modèle expliquant les interactions entre l'épithélium et le mésenchyme par une

zone organisationnelle se formant directement autour des bourgeons en impliquant des interactions entre FGF-10 et certains de ses inhibiteurs. FGF-10 est exprimé dans le mésenchyme dans des domaines restreints, au bout des bourgeons croissants, et possède un fort effet chémoattractif sur l'épithélium par l'activation du récepteur FGFR. En l'absence d'épithélium, le mésenchyme exprime cette molécule en de très fortes concentrations <sup>116</sup>. Il doit donc y avoir un mécanisme de rétroaction contrôlant l'expression de FGF-10. En effet, le mésenchyme est à son tour stimulé par sonic hedgehog (shh) qui est exprimé par l'épithélium. Shh active le récepteur patched-1 (ptc1), ce qui mènera à la régulation négative de l'expression de FGF-10 <sup>11, 116</sup>. BMP4 régule également de façon négative l'expression de FGF-10 par l'activation des facteurs de transcription Smads <sup>192</sup>. BMP4 semble restreindre la prolifération cellulaire épithéliale distale <sup>11, 116</sup> et conférer à l'épithélium un caractère distal. BMP4 est à son tour contrôlé par des antagonistes tels que Noggin et Chordin <sup>1, 135</sup>. Noggin est une molécule se liant avec haute affinité à Bmp4, l'empêchant de se lier au récepteur Bmp. Le facteur de croissance des tumeurs  $\beta$ -1 (TGF $\beta$ -1 : tumor growth factor  $\beta$ -1) inhibe l'expression de FGF-10 et est donc un régulateur négatif de la prolifération et de la différenciation cellulaire épithéliale <sup>170</sup>. De plus, TGF $\beta$ -1 induit la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire, qui, lorsque déposées entre le mésenchyme et l'épithélium, inhibe la septation <sup>72</sup>.

Les interactions entre le mésenchyme et l'épithélium et la boucle de rétroaction impliquées mènent à un cycle de chémoattraction, d'inhibition de la chémoattraction et de la prolifération puis de formation de nouveaux bourgeons. Ce cycle est résumé schématiquement à la figure 1.4. Tout d'abord, l'expression de FGF-10 par le mésenchyme induit une croissance directionnelle des voies aériennes. Le rapprochement de l'épithélium des voies aériennes et du mésenchyme amorce la boucle de rétroaction décrite plus haut. La boucle de rétroaction entraîne une diminution de la prolifération des cellules épithéliales et un arrêt de la chémoattraction, ce qui résulte en la formation de deux nouveaux bourgeons ayant chacun leur point focal d'expression de FGF-10.

Les interactions entre l'épithélium et le mésenchyme sont également essentielles pour l'établissement de l'asymétrie gauche-droite et pour la régulation de la différenciation proximale-distale. Cependant, les mécanismes et les facteurs impliqués sont encore mal connus. Certaines molécules telles que Lefty-1, Lefty-2, nodal, Shh et Gli semblent impliquées dans l'établissement de l'asymétrie gauche-droite <sup>143 187</sup>.



**Figure 1.4 : Interactions entre le mésenchyme et l'épithélium dans le bourgeonnement des voies aériennes.**

- A) FGF-10 induit une croissance directionnelle de l'épithélium. B) Boucle de rétroaction menant à une période d'arrêt de la prolifération et de la chémoattraction. C) Formation d'une fissure menant à la formation de nouveaux bourgeons (Figure adaptée de Lebeche et coll. , 2001<sup>116</sup>).

### 1.2.5. Facteurs de croissance

Il est reconnu que les facteurs de croissance sont d'importants stimuli dans l'induction de la prolifération cellulaire. Cependant, les rôles exacts des facteurs de croissance dans le

développement pulmonaire induits par l'expansion du tissu, du moins *in vivo*, sont encore méconnus. Même si les forces mécaniques sont d'importants stimuli en elles-mêmes, leurs applications se manifestent en une variété de stimuli sur une variété de types cellulaires dépendants de leur location dans la structure tridimensionnelle du poumon. Les cellules épithéliales alvéolaires ou les cellules endothéliales des capillaires, par exemple, sont exposées à l'étirement lors de l'expansion pulmonaire. Il est intéressant de noter que l'expansion pulmonaire induit la prolifération de la plupart des types cellulaires majeurs et coordonne la réponse à travers toute la portion pulmonaire étirée pendant le stade du développement alvéolaire bien que seulement une portion des cellules soit soumise à l'étirement mécanique. Par conséquent, on peut penser que les cellules subissant un stress relâchent des facteurs de croissance ou des molécules induisant le relâchement de facteurs de croissance par d'autres types cellulaires, potentialisant la réponse chez les cellules adjacentes non activées par l'étirement mécanique.

La section précédente a couvert le rôle des facteurs de croissance pendant la morphogenèse du poumon. Cette section-ci couvrira plutôt le rôle de certains facteurs de croissance et de leur récepteur ayant un rôle à jouer sur le développement vasculaire, lors des stades plus tardifs du développement.

Les vaisseaux sanguins sont formés par les interactions entre les récepteurs tyrosine kinase (RTK) et leur ligand sécrété par les cellules péri-endothéliales comme les cellules épithéliales<sup>58, 10, 68</sup>. Les RTKs sont pour la plupart couplés de façon similaire à l'intérieur des cellules et sont capables d'induire la prolifération cellulaire<sup>68</sup>. Les ligands impliqués sont VEGF, PDGF, Ang1 et Ang2. L'effet de ces ligands est régulé par le nombre, les sous-types et la distribution des récepteurs dans la population cellulaire cible et par la disponibilité des ligands.

FGF est nécessaire à l'induction de la formation des angioblastes et des hémangioblastes. Cependant, les angioblastes ont par la suite besoin de facteurs comme VEGF pour leur différenciation et pour leur survie. Le clonage de l'ADN complémentaire du gène humain pour VEGF a montré qu'il existe au moins cinq isoformes (121, 145, 165, 189, 206),

provenants de l'épissage alternatif d'un même gène. Le gène est organisé en 8 exons s'étendant sur plus de 14 000 paires de bases. Les isoformes 145 et 206 sont plus rares et ne semblent exprimés que par les cellules d'origine placentaire<sup>37</sup>. La protéine native est une glycoprotéine basique liant les héparans sulfates (HS) et s'homodimérisant. Ces propriétés sont celles de VEGF<sub>165</sub>, l'isoforme le plus abondant<sup>81</sup>. L'isoforme 121 est faiblement acide et ne lie pas les HS alors que les isoformes 189 et 206 sont plus basiques et lient fortement les HS<sup>81</sup>. Ces différences de propriétés sont très importantes dans la biodisponibilité de chaque isoforme. VEGF<sub>121</sub> est complètement libre alors qu'une partie des protéines VEGF<sub>165</sub> est liée à la matrice<sup>81</sup>. Par contre, les isoformes 189 et 206 sont presque complètement séquestrés dans la matrice à cause des fortes concentrations de HS dans celle-ci<sup>81</sup>. La matrice extracellulaire est donc un réservoir de facteurs de croissance pouvant être relâchés sous l'effet d'héparine, d'héparinase ou de protéases. Pour pouvoir stimuler leurs récepteurs, VEGF<sub>189</sub> et VEGF<sub>206</sub> doivent subir des maturations enzymatiques car le repliement de ces protéines cache les régions responsables de la liaison<sup>158</sup>. De plus, les interactions avec les HS sont nécessaires à la liaison avec les récepteurs de VEGF sur les cellules endothéliales<sup>99</sup>. VEGF<sub>165</sub> est donc l'isoforme possédant le plus fort potentiel mitogène sur les cellules endothéliales. Ainsi, VEGF, grâce à son hétérogénéité structurelle, a le potentiel de mener une réponse biologique graduelle et contrôlée. Bien que son expression soit presque ubiquitaire, les cellules épithéliales, surtout distales, sont le type cellulaire exprimant le plus fortement VEGF<sup>2</sup>.

Il existe deux récepteurs de VEGF : VEGFR-1 (Flt-1) et VEGFR-2 (Flk-1/KDR). L'organisation des angioblastes en canaux nécessite l'expression de Flt-1 et suite à leur différenciation en cellules endothéliales, les cellules expriment Flk-1<sup>89</sup>. La liaison de VEGF à Flk-1 résulte en la prolifération des cellules endothéliales alors que la liaison à Flt-1 facilite les interactions entre les cellules endothéliales et mène à la formation de tubules et à l'angiogenèse par bourgeonnement. Par ailleurs, VEGF favorise la stabilisation des vaisseaux par l'accélération de la prolifération des cellules péri-endothéliales<sup>87, 185</sup>. En effet, les vaisseaux immatures ont besoin des cellules péri-endothéliales pour éviter que les cellules endothéliales ne se détachent. De plus, il a été

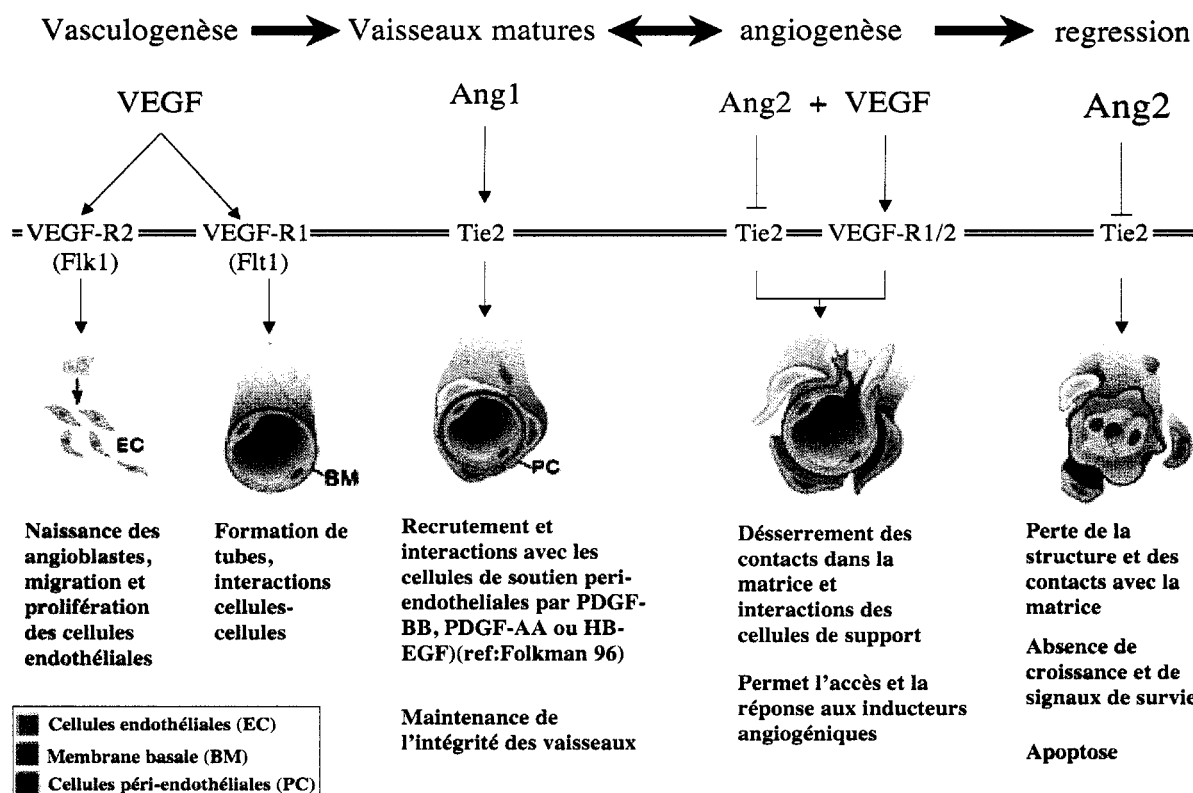
démontré que l'expression de VEGF est augmentée lors de périodes d'étirement sur des cellules pulmonaires <sup>144</sup>. Il a donc été suggéré que VEGF est responsable de la prolifération des cellules endothéliales induite par l'expansion pulmonaire. Donc, en résumé, l'association de VEGF à ses récepteurs est essentielle à la vasculogénèse et à l'angiogénèse lors du développement vasculaire du poumon.

Cependant, afin d'avoir un développement vasculaire complet, le système VEGF doit fonctionner en concert avec d'autres facteurs. En effet, les angiopoïétines sont d'importants partenaires de VEGF. Ang1 et Ang2 sont deux ligands du récepteur tyrosine kinase spécifique aux cellules endothéliales, Tie2. Ang1 est exprimé par les cellules entourant les vaisseaux en formation <sup>23</sup>. Les mutants nuls pour Ang1 ou Tie2 présentent des phénotypes très semblables, c'est-à-dire un développement vasculaire inadéquat suivi par la mort embryonnaire. Cependant, chez ces souris, le développement plus précoce, dépendant de VEGF, semble se passer de façon normale et résulter en la formation d'une vasculature primitive indiquant que leur rôle est plus tardif dans le développement vasculaire <sup>166, 178</sup>. *In vitro*, Ang1 en coopération avec VEGF stimule le bourgeonnement des cellules endothéliales <sup>108</sup>. Il a été suggéré à partir de ces études qu'Ang1 stabilise et solidifie les vaisseaux nouvellement formés en recrutant et en maintenant l'association avec les cellules péri-endothéliales de support (péricytes, cellules de muscles lisses) <sup>178, 184</sup>. Puisque Ang1 est un agoniste de Tie2 et que Ang2 en est un antagoniste, il semble que la déstabilisation du récepteur soit aussi importante que son activation.

En effet, alors qu'Ang1 est exprimé de façon constante à travers les vaisseaux, Ang2 est surtout exprimé aux sites de remodelage vasculaire <sup>131</sup>. Par ailleurs, il a été démontré qu'Ang2 est coexprimé avec VEGF aux sites de bourgeonnement vasculaire alors qu'il est exprimé sans VEGF aux sites de régression vasculaire <sup>131</sup>. Il semble que le rôle d'Ang2, contrairement à Ang1, soit plutôt la déstabilisation des vaisseaux déjà existants. De cette façon, Ang2 rend l'endothélium plus sensible à la stimulation par les facteurs de croissance. Une telle déstabilisation des vaisseaux par Ang2 en présence de VEGF prépare les vaisseaux à monter une forte réponse angiogénique alors que la déstabilisation par Ang2 en l'absence de VEGF mène à la régression des vaisseaux. Il a été suggéré que

les angiopoïétines aient une action plus permissive qu'inductive en permettant ou pas les interactions entre les cellules endothéliales et les cellules de support <sup>178</sup>.

En résumé, les données actuelles suggèrent que VEGF et les angiopoïétines n'ont pas seulement des rôles différents, mais ils ont aussi des rôles complémentaires et coordonnés dans le développement vasculaire. La Figure 4 résume l'implication des RTKs et de leurs ligands dans la morphogénèse vasculaire.



**Figure 1.5 : Modèle de la régulation du développement vasculaire par les facteurs de croissance et leurs récepteurs.**

(Figure adaptée de Hanahan D., Signaling vascular morphogenesis and maintenance, Science, 1997 <sup>68</sup>).

### 1.2.6. Rôles et effets des forces mécaniques sur le développement pulmonaire

Dès la moitié de la gestation, le poumon se remplit de liquide; il ne sera éliminé qu'à la naissance afin de permettre l'entrée d'air et les échanges gazeux. Ce liquide est produit et

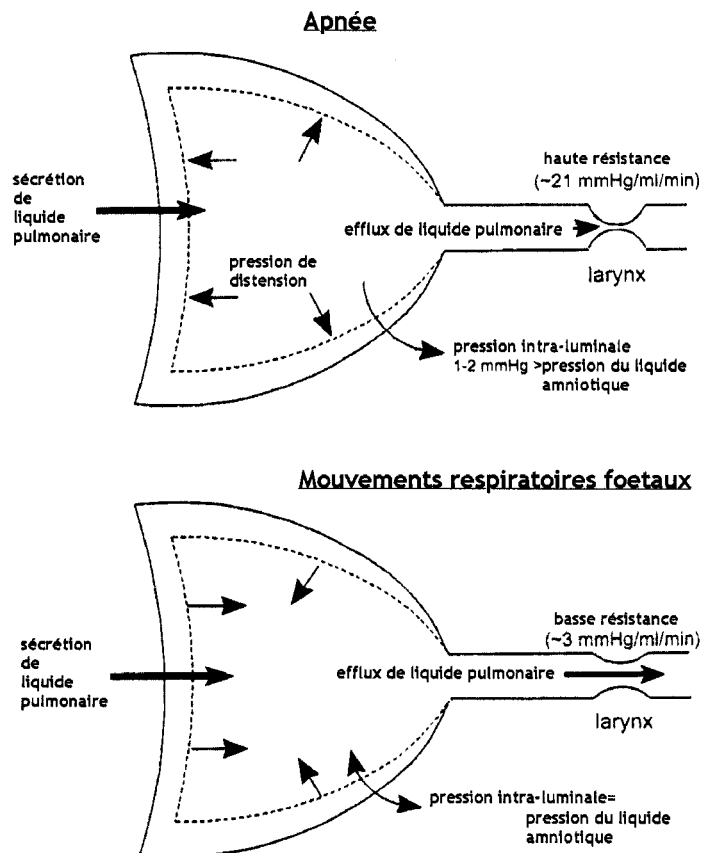
sécrété de façon continue par les cellules épithéliales dans les futures voies aériennes <sup>69</sup>. Le volume de liquide contenu par le poumon fœtal augmente graduellement de 3,0 ml/kg au milieu de la gestation jusqu'à 45 ml/kg à terme chez le mouton <sup>79</sup>. Cette valeur excède de beaucoup la capacité résiduelle du poumon (20 ml/kg), ce qui suggère fortement qu'en fin de gestation, le poumon est continuellement dans un état distendu. Le volume de liquide est déterminé par la balance entre la vitesse à laquelle le liquide est sécrété et celle à laquelle il quitte le poumon par la trachée. La sécrétion du liquide est le résultat d'un mouvement net d'ions  $\text{Cl}^-$  vers le lumen, créant un gradient osmotique permettant à l'eau de bouger dans la même direction <sup>78</sup>.

Le contrôle du volume de liquide à l'intérieur des espaces « aériens » du poumon fœtal se fait principalement par l'action de facteurs physiques affectant le passage du liquide dans la trachée. En résistant à l'efflux de liquide, le larynx est responsable du maintien du gradient de pression (1-2 mm Hg) entre la lumière pulmonaire et le liquide amniotique. Le larynx agit en quelque sorte comme un clapet laissant lentement sortir le liquide du poumon mais n'en laissant pas entrer. Pendant les périodes d'apnée, la résistance offerte par le larynx est grande. Cependant, périodiquement, le larynx se dilate et réduit sa résistance à l'efflux de liquide. À ce moment, les mouvements respiratoires fœtaux sont essentiels car c'est de cette façon que le poumon réduit la perte de liquide. Lors des mouvements respiratoires fœtaux, le diaphragme se contracte sans distension du tissu pulmonaire, s'opposant à l'échappement de liquide via la trachée <sup>60</sup>. De nombreuses expériences ont démontré que l'abolition des mouvements respiratoires fœtaux diminue la croissance pulmonaire. Par exemple, la section du nerf phrénique, empêchant les contractions du diaphragme, retarde fortement la maturation pulmonaire <sup>6</sup>.

Le rôle de ce liquide est d'empêcher la pénétration du liquide amniotique à l'intérieur du poumon et de maintenir le poumon dans un état distendu. La croissance et la maturation structurale est grandement dépendante du degré d'expansion causé par le liquide. Il a été démontré expérimentalement que des changements de pressions à l'intérieur ou à l'extérieur des poumons les empêchant de prendre de l'expansion de façon adéquate influencent la croissance et la maturation des poumons. En effet, empêcher le poumon de



prendre de l'expansion, par exemple comme dans le cas de la hernie diaphragmatique congénitale, mène à une hypoplasie pulmonaire. Au contraire, si l'on facilite ou force l'expansion de poumon, comme lors de l'occlusion trachéale fœtale *in vivo* (OT), où il y a une accumulation rapide de liquide dans les futures voies aériennes, nous observons une forte croissance pulmonaire. L'expansion pulmonaire est donc grandement influencée par son environnement et par le volume de liquide pulmonaire.



**Figure 1.6 : Mouvements de liquides à l'intérieur du poumon et pression intraluminaire pendant les périodes d'apnée et de mouvements respiratoires fœtaux**  
 Les mouvements respiratoires fœtaux permettent de limiter la perte de liquide pulmonaire et de conserver le poumon dans un état distendu malgré l'ouverture du larynx (figure adaptée de *The Lung : Development, Aging and the Environment*, Harding, R., Pinkerton K.E. et Plopper C.G., 2004).<sup>80</sup>

L'étirement des cellules pulmonaires se traduit à l'intérieur des cellules en un stimulus chimique entraînant des changements au niveau des interactions intercellulaires, de l'expression de gènes, de la forme des cellules et de la composition et l'alignement des

fibres structurales. Ces changements résultent en la différenciation et la prolifération de certains types cellulaires, l'expression de cytokines et de facteurs de croissance. La somme de ces modifications mène au développement normal du poumon<sup>78, 199</sup>. Les forces mécaniques sont donc un sentier important par lequel les cellules répondent et interagissent avec leur environnement. Il existe à la surface des cellules, bon nombre de récepteurs interagissant avec la matrice extracellulaire ou avec d'autres cellules et ayant une partie cytoplasmique interagissant avec des protéines du cytosquelette et étant associés à des protéines kinases. Ainsi, l'environnement peut influencer directement le cytosquelette ou induire l'activation ou l'inactivation de sentiers via des protéines de signalisation; dans ce cas, nous parlons de méchanotransduction. Il est par ailleurs important de comprendre que les forces mécaniques *in vivo*, entraînant des modifications de l'expansion pulmonaire, se manifestent comme une variété de stimuli sur une variété de type cellulaire, dépendant du type cellulaire et de leur localisation à l'intérieur de la structure tridimensionnelle pulmonaire. Il est possible de modifier expérimentalement l'expansion pulmonaire, par exemple en effectuant l'occlusion trachéale *in vivo*. Nous verrons le résultat de l'OT dans une section subséquente.

### 1.3. Hypoplasie pulmonaire

L'hypoplasie d'un organe donné est souvent décrite comme étant le développement incomplet de cet organe. L'hypoplasie pulmonaire est considérée comme étant une réduction significative de tissu à l'autopsie et est quantifiée par une réduction du ratio poids pulmonaire sur poids corporel<sup>60</sup>. Les poumons hypoplasiques ne sont pas seulement anormaux au niveau de leur taille mais aussi au niveau structural de sorte que leur capacité à échanger les gaz respiratoires est dangereusement réduite. Ces anomalies structurales et fonctionnelles sont possiblement le résultat de longues périodes de sous-expansion pulmonaire durant la vie fœtale. Ces poumons démontrent une réduction du nombre de générations des voies aériennes et du nombre d'alvéoles, une interface air sang trop épaisse, une réduction de la formation de l'élastine altérant les propriétés mécaniques du poumon et le développement alvéolaire, une immaturité des cellules

épithéliales et de la machinerie du surfactant et un développement vasculaire très retardé<sup>60</sup>.

Les causes de l'hypoplasie pulmonaire sont nombreuses, mais à ce jour aucun mécanisme n'a été proposé. Les causes peuvent être regroupées en différentes catégories : les malformations adénomatoïdes kystiques congénitales (arrêt du développement des structures bronchiolaires dû à la conglomération de plusieurs zones kystiques dans le tissu pulmonaire), les hydrothorax, les *hydrops fetalis*, la réduction du volume du fluide amniotique, les anomalies du système nerveux central et la hernie diaphragmatique congénitale (HDC)<sup>60</sup>. Cette dernière malformation est celle intéressant notre laboratoire.

### **1.3.1. Hernie diaphragmatique congénitale**

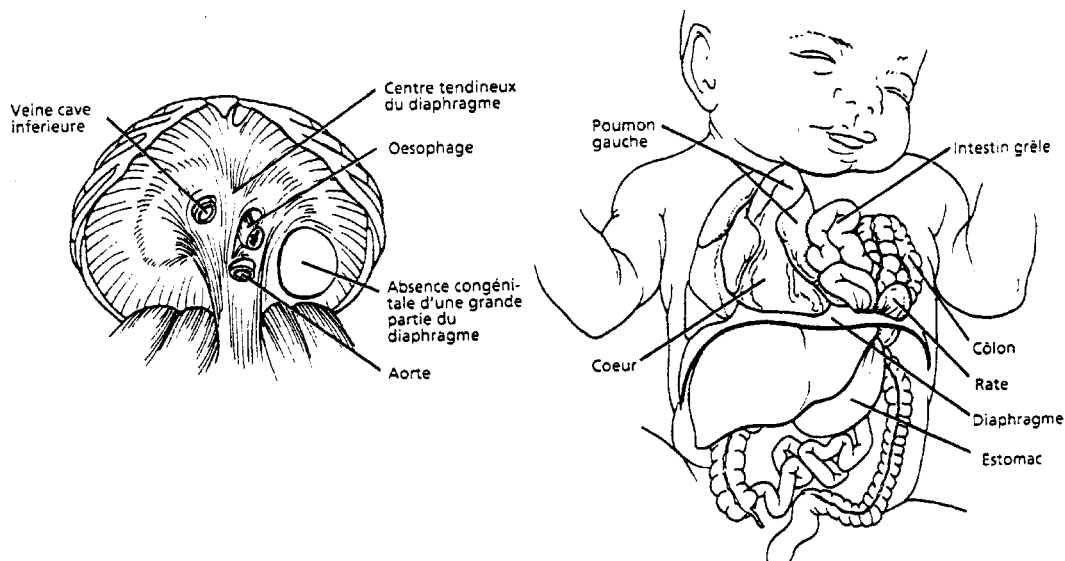
#### **1.3.1.1. Description générale**

La HDC est rapportée environ à toutes les 3000 naissances<sup>16</sup>. Les médecins possèdent dorénavant une meilleure compréhension de la physiopathologie de la HDC et les améliorations des techniques de diagnostics et de soins postnataux contribuent à l'amélioration du taux de survie. Cependant, le traitement postnatal est encore laborieux dû à la sévérité de certains cas et le taux de mortalité est encore trop élevé. De plus, il existe toujours des controverses à travers les centres au sujet des traitements à utiliser. Il semble que les recherches cliniques et fondamentales soient des avenues remplies d'espoir pour les médecins. Un des défis des chercheurs est de travailler au développement de nouvelles approches thérapeutiques chirurgicales ou pharmacologiques afin d'augmenter le taux de survie des enfants atteints et d'améliorer leur qualité de vie à long terme.

#### **1.3.1.2. Pathophysiologie**

La mortalité associée à la HDC est le résultat d'un simple problème menant à de terribles conséquences. Un défaut dans la formation du diaphragme, à gauche dans 90% des cas, permet l'herniation du contenu abdominal dans la cavité thoracique<sup>90</sup>. Le poumon est de ce fait, réduit dans sa capacité d'expansion au moment même où cette capacité lui est la

plus importante. Cette malformation diaphragmatique mènera ultimement à l'hypoplasie pulmonaire et à une détresse respiratoire sévère à la naissance. Les poumons de ces enfants sont petits, sous-développés, ont une fonctionnalité réduite, une ventilation inadéquate et une hypertension pulmonaire intense. Le poumon du nouveau-né a donc subi de nombreuses altérations anatomiques pendant son développement : diminution de la surface alvéolaire, augmentation relative de l'espace mort, épaissement de la membrane alvéolo-capillaire, hétérogénéité de la taille des alvéoles, asynchronisme entre la ventilation et la perfusion dû au fait que les grandes alvéoles représentent des zones de moindre résistance par rapport aux petites, diminution du volume du lit vasculaire et augmentation de la musculation des vaisseaux. Le poumon présente également certaines altérations physiologiques reliées aux altérations anatomiques : diminution de la capacité fonctionnelle résiduelle et du volume courant, diminution de la compliance pulmonaire et diminution de la quantité de surfactant <sup>26</sup>.



**Figure 1.7 : Schématisation graphique d'une hernie diaphragmatique congénitale**  
 À gauche, vue ventrale de l'anomalie diaphragmatique. À droite, vue des viscères abdominaux herniés à l'intérieur de la cavité thoracique comprimant le poumon et le cœur (Figure adaptée de Larsen W.J., *embryologie humaine*, 1993).

### 1.3.1.3. Diagnostic

Le risque potentiel d'une intervention *in utero* met en relief l'importance d'un diagnostic prénatal précis de la maladie. Les améliorations dans le domaine de l'ultrasonographie permettent maintenant la détection de la maladie pour environ la moitié des cas entre la

16<sup>e</sup> et la 24<sup>e</sup> semaine <sup>16</sup>. La présence de structures anormalement situées dans la cavité thoracique (estomac, intestins, foie, rate et reins), une incapacité à voir le diaphragme, le déplacement du cœur et du médiastin, un hydramnios et parfois un hydrops foetalis permettent l'identification d'une HDC chez un fœtus. Le taux de faux-négatifs est assez élevé et peut atteindre 55% <sup>26</sup>. Par ailleurs, les anomalies du côté droit sont plus difficiles à diagnostiquer. La présence d'une HDC est indicatrice d'autres malformations dans 37 à 57 % des cas <sup>113, 142, 186</sup>. Les systèmes atteints sont le plus souvent les systèmes nerveux central, cardiovasculaire et génito-urinaire.

Le diagnostic prénatal donne une chance à l'équipe de clinicien de consulter les parents et de préparer un plan d'accouchement en fonction de la sévérité de la maladie. Certains facteurs pronostiques sont reliés à la sévérité de la maladie. En échographie, si le rapport surface du poumon droit sur le périmètre crânien est inférieur à 1,0, le taux de mortalité est très élevé alors que si le rapport est supérieur à 1,4, le taux de survie est de 100%. Par ailleurs, bien qu'elle soit difficile à détecter, la présence du foie dans la cavité thoracique est un signe hautement défavorable.

Le diagnostic postnatal est fait dans les premières minutes de vie <sup>174</sup>. Des signes de détresse respiratoire, un abdomen scaphoïde et un déplacement médiastinal du côté opposé à la lésion suggèrent le diagnostic. Celui-ci pourra être confirmé aux rayons X par l'absence d'une partie du diaphragme et la présence de boucles intestinales dans la poitrine.

#### **1.3.1.4. Traitement**

Dépendant du moment du diagnostic et de la sévérité de la maladie, certaines stratégies thérapeutiques seront envisagées. L'administration anténatale de corticostéroïdes dans des modèles expérimentaux de HDC, améliore la maturation pulmonaire, c'est-à-dire une réduction de l'hypermuscularisation des vaisseaux et de l'expression des récepteurs d'endothélines dans les artères pulmonaires et elle favorise la production de surfactant par le fœtus <sup>126, 146, 151</sup>. Cependant, aucune étude chez l'homme n'a encore été publiée pour appuyer ces résultats. Deux facteurs sur lesquels le médecin a un certain contrôle avant la

naissance est le moment et le mode d'accouchement. Puisqu'un accouchement prématuré représente un danger pour le fœtus, il est préférable de favoriser un accouchement le plus près possible du terme. Un mode d'accouchement vaginal est favorisé lorsque possible car il semble que la voie ne change pas le pronostic <sup>26</sup>. Une dernière stratégie anténatale est envisagée par certains centres, mais est encore fortement discutée. Elle consiste à bloquer de façon mécanique la trachée du fœtus. L'OT sera vue plus en détails plus loin. Mentionnons seulement pour l'instant qu'en bloquant la trachée, on emprisonne le liquide pulmonaire à l'intérieur du poumon, augmentant les forces de distension et par le fait même, on induit un développement et une maturation pulmonaire accélérée. Il existe différents modèles animaux d'occlusion trachéale ayant permis de démontrer les bienfaits de la chirurgie et d'améliorer la technique. En effet, les développements récents de la fœtoscopie et l'utilisation d'un ballon gonflable et dégonflable ont permis d'améliorer le taux de succès de l'intervention. Cependant, l'OT peut causer certaines complications comme une diminution du nombre et de la fonction des pneumocytes de type II <sup>157</sup>, un hydrops fœtal et des paralysies des cordes vocales <sup>101</sup>. Plus important encore, les études ne démontrent pas un taux de survie supérieur à celui des fœtus sans OT pris en charge à la naissance <sup>71</sup>. Donc l'OT est encore une technique dite expérimentale car pour qu'elle soit acceptable sur le plan éthique, elle doit diminuer la morbidité et la mortalité de façon significative <sup>26</sup>.

À la naissance, le nouveau-né atteint de HDC sera réanimé en salle d'accouchement puis stabilisé. La réanimation consiste à aspirer le liquide de l'estomac, éviter le barotrauma, normaliser le rythme cardiaque, la perfusion et l'état général du bébé. Il pourra ensuite être stabilisé par sédation, analgésie, curarisation, évitement du barotrauma, maintien d'une bonne hémodynamique et la prévention de l'hypertension pulmonaire. D'autres thérapies sont également utilisées dépendants des centres <sup>26</sup>: vasodilatation pulmonaire (oxyde nitrique), la circulation extra-corporelle (ECMO) et la ventilation liquide. Cependant, prise isolément, aucune de ces thérapies n'a été démontrée efficace afin de réduire la mortalité dans la hernie diaphragmatique congénitale <sup>16</sup>. Finalement le nouveau-né sera opéré chirurgicalement afin de réduire la hernie.

Les nouveau-nés sont traités cas par cas. Le taux global de survie, tous traitements confondus, se situe entre 50 et 70%, mais certains centres rapportent maintenant des taux de survie frôlant les 90%<sup>16</sup>. Cependant, les enfants qui survivent ne sont pas au bout de leur peine car certaines complications sont possibles : obstruction intestinale, récurrence, reflux gastro-œsophagien, hypertension pulmonaire persistante, dysplasie bronchopulmonaire, déformations de la paroi thoracique antérieure, retards de croissance et des troubles cognitifs<sup>26</sup>. Cependant, dans l'ensemble, la santé à long terme ne sera pas influencé par la HDC pour la grande majorité des bébés survivants<sup>26</sup>.

### **1.3.1.5. Modèles expérimentaux de HDC**

Il existe deux différentes méthodes d'induction de la maladie dans des modèles expérimentaux : la méthode chirurgicale et la méthode chimique. Le nitrofen est le principal agent chimique utilisé pour l'induction de l'anomalie diaphragmatique. L'administration de nitrofen pendant le stade pseudoglandulaire du développement pulmonaire induit la HDC chez 40% des rats nouveau-nés<sup>106</sup>. Le nitrofen a l'avantage d'affecter le développement du diaphragme dès sa formation, ce qui semble être un reflet fidèle de la pathologie humaine. Par contre, les expériences chez le rat et la souris suggèrent que le nitrofen affecte le développement pulmonaire indépendamment de son effet sur le diaphragme. Par ailleurs, il est possible d'induire la HDC chirurgicalement chez le mouton où chez le lapin. Dans ce cas, il est possible pour l'expérimentateur d'induire l'anomalie au temps et du côté voulu. Cette technique a comme avantages de n'affecter que le diaphragme tout en mimant de façon adéquate la présentation clinique chez l'humain et de permettre de recueillir des données physiologiques et cliniques. Cependant, ce modèle est techniquement difficile et nécessite un technicien expérimenté. De plus, ce modèle est plus dispendieux que le modèle de rat induit au nitrofen, surtout pour le mouton. Finalement, chez le mouton, techniquement, il est difficile d'intervenir avant 70 à 80 jours de gestation, donc après la formation complète du diaphragme.

## 1.4. Occlusion trachéale

À l'origine, l'idée de l'occlusion trachéale provient d'une anomalie congénitale appelée atrésie laryngée congénitale. Cette rare malformation où la trachée du fœtus est occluse, est associée à des poumons hyperplasiques et plus matures<sup>196</sup>. Tranquillement, l'idée s'est développée et a mené à l'hypothèse qu'il serait possible d'accélérer le développement pulmonaire d'un fœtus atteint d'une maladie comme la HDC en lui occluant la trachée pendant la gestation.

Plus précisément, l'occlusion trachéale est une intervention chirurgicale *in utero* consistant en un blocage mécanique complet de la trachée. Elle résulte en l'accumulation rapide de liquide pulmonaire fœtal et, donc, en l'amplification des forces de distension. Ces forces de distension induisent une accélération du développement pulmonaire et lorsque appliquées à un cas de HDC, contribuent à replacer les viscères à leur place respective. De nombreux laboratoires travaillent à la compréhension des mécanismes menant au développement pulmonaire accéléré induit par l'OT et au développement de la technique en jouant sur chacun des paramètres (moment de l'occlusion, occlusion temporaire, modèles d'étude, technique d'occlusion).

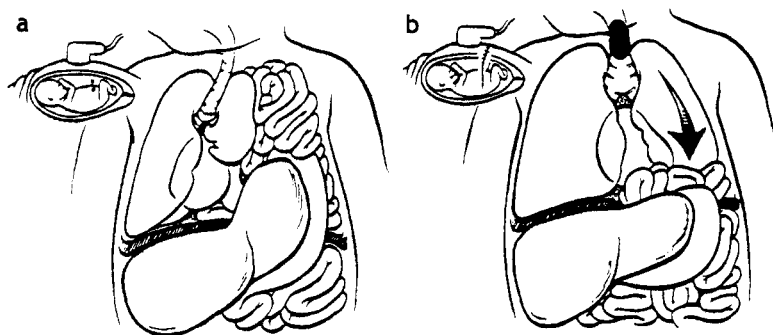
### 1.4.1. Effet de l'occlusion sur le développement pulmonaire

L'effet de l'OT sur le développement pulmonaire est le résultat de l'expression différentielle de gènes en fonction du degré de distension « senti » par les cellules pulmonaires. En effet, comme il a été mentionné précédemment, l'augmentation de pression intraluminale normale pendant le développement, accélérée suite à l'OT, résulte en l'activation de certains sentiers de signalisation. Cette méchanotransduction mènera littéralement en une transformation structurale et fonctionnelle du poumon en développement. L'OT représente donc une opportunité unique d'examiner le rôle des forces de distension dans le développement pulmonaire.



Les résultats de l'OT sont extrêmement étonnants. La taille du poumon est augmentée <sup>5, 198</sup>, il possède une vascularisation plus développée <sup>13, 20, 128</sup>, une surface alvéolaire plus grande <sup>198</sup>. Il y a une forte augmentation de la prolifération cellulaire <sup>25, 43, 147</sup> et de l'apoptose <sup>44</sup>. L'apoptose, au même titre que la prolifération cellulaire, fait partie intégrante du développement pulmonaire. En effet, le poumon au tout début, est une petite masse cellulaire en forte période de prolifération. Cependant, l'apoptose est essentielle à la morphogénèse pulmonaire, c'est-à-dire pour que se forment de larges voies aériennes, une plus grande surface alvéolaire et un espace alvéolo-capillaire plus mince. En somme, le poumon issu d'une OT est structuralement et fonctionnellement plus mature.

L'OT a été tentée chez des modèles animaux de HDC et aussi chez l'humain <sup>71</sup>. Les données obtenues chez le mouton et le lapin montrent que l'OT provoque chez le poumon des animaux ayant une HDC induite chirurgicalement, une accélération du développement pulmonaire permettant de rattraper et même de devancer le développement pulmonaire normal. Les résultats obtenus à l'aide de modèles de rongeurs où la HDC est créée à l'aide du nitrofen montrent également que l'OT provoque une maturation rapide des poumons. Cependant, ces résultats sont encore discutés car on sait que le nitrofen en soit a un effet sur le développement pulmonaire indépendant de son effet sur le diaphragme <sup>9, 66, 97</sup>.



**Figure 1.8 :Effet de l'occlusion trachéale sur le développement pulmonaire**

- (a) Hypoplasie pulmonaire dû à la HDC. (b) L'OT (ballon en noir dans la trachée) induit le développement pulmonaire et contribue à replacer au moins partiellement les viscères dans l'abdomen (Figure adaptée de Larsen W.J., *embryologie humaine*, 2003 <sup>114</sup>).

### 1.4.2. Effets adverses de l'occlusion trachéale

La réponse à l'occlusion a aussi ses mauvais côtés. En effet, il a été démontré que l'OT pouvait entraîner une diminution du nombre et de la fonction des pneumocytes de type II <sup>25, 102, 121, 157</sup>. Cependant, il a également été démontré que l'effet délétère de l'occlusion sur les pneumocytes de type II était dépendant de l'âge gestationnel et de la durée de l'occlusion. L'effet pervers de l'OT est annulé si elle est effectuée plus tard, c'est-à-dire au début du stade sacculaire <sup>42</sup>. De plus, une occlusion plus brève semble préserver la fonction et le nombre de pneumocytes de type II <sup>14</sup>. Les pneumocytes de type II sont très importants car ce sont eux qui sécrètent le surfactant. Les déficits en surfactant pulmonaire sont à l'origine de la détresse respiratoire observée chez les enfants prématurés.

### 1.4.3. Modèles d'étude

Bien que l'OT ait déjà été effectuée chez des fœtus humains atteint de HDC, elle doit encore être développée à l'aide de modèles animaux. En effet, de nombreuses questions éthiques attendent encore une réponse et pour cause : le diagnostic *in utero* n'est pas encore assez précis, il n'existe pas encore de marqueur pronostique précis, l'OT n'a pas encore prouvée qu'elle était plus bénéfique que détrimentale aux fœtus humains. Les modèles les plus couramment utilisés sont le mouton, le lapin, le rat et la souris.

Le mouton est largement utilisé car contrairement aux autres modèles, il permet de faire des études physiologiques et de recueillir des données cliniques <sup>33, 49, 54, 95, 104, 124, 128</sup>. Leur taille permet par ailleurs à la mère et au fœtus de relativement bien tolérer la chirurgie. Un autre avantage est qu'il est possible d'induire une HDC chirurgicalement. Cependant, il présente aussi certains désavantages de taille. Il est très cher, surtout étant donné que la technique requiert des brebis gestantes à un temps précis et que leur temps de gestation est long. L'utilisation de ce modèle est par ailleurs rendu compliqué par la possibilité que la brebis soit porteuse de la fièvre Q ou la fièvre aphteuse. Finalement, les études

génétiqes et biomoléculaires sont difficiles car il n'existe que peu d'anticorps et le code génétique n'est que partiellement connu.

Le modèle de lapins semble à certains égards plus avantageux que celui du mouton<sup>42, 48, 181</sup>. Il est encore possible d'induire la HDC avant l'OT, il est moins dispendieux et la durée de gestation est plus courte. Cependant, le foetus est plus petit que l'agneau et la chirurgie s'en retrouve plus compliquée qu'avec le mouton. De plus, les études biomoléculaires sont aussi limitées par la disponibilité limitée d'anticorps et de séquences géniques.

Bien qu'il ne soit pas utilisé par un grand nombre de laboratoires, le modèle d'OT chez le rat possède certains avantages<sup>91, 103, 205</sup>. Ce modèle est très économique et le temps de gestation est court. De plus, il peut être combiné au modèle de HDC induite par le nitrofen. Cependant, les études génétiques sont aussi limitées par le fait que le génome du rat n'est connu que partiellement. De plus, il existe des différences structurales importantes entre le développement pulmonaire du rat et celui de l'humain.

Le modèle murin d'OT *in vivo* présente de nombreux avantages : il est le plus économique, les études génétiques et biomoléculaires sont possibles, la reproduction est rapide et il permet l'utilisation de souris transgéniques ou mutantes nulles. Comme il permet de faire des chirurgies à temps courts (1h, 3h, 6h), le modèle murin est le modèle le plus puissant et versatile pour l'étude de la réponse transcriptomique et protéomique à l'OT. Cependant, le modèle présente certains désavantages de taille. Comme chez le rat, il existe des différences structurales importantes entre les développements pulmonaires murin et humain dont il faut tenir compte dans l'extrapolation des données. De plus, le travail est limité par la petite taille du foetus et du poumon. Nous sommes présentement le seul laboratoire à avoir développé un modèle *in vivo* murin d'OT. Avec l'expérience, on s'est rendu compte que le modèle présente certains désavantages supplémentaires. La chirurgie est extrêmement difficile et une intervention de plus de 60 minutes est associée à une augmentation marquée des cas d'interruption de grossesses. De plus, la taille de l'échantillon empêche la fixation par instillation sous pression constante. Il est donc

important de prévoir chacune des chirurgies en fonction de l'utilisation que l'on va faire du tissu. Cependant, un scientifique expérimenté aura un taux de succès de ses chirurgies encore plus élevé que pour les moutons, les lapins ou les rats car il a l'occasion de faire un nombre élevé de chirurgies et donc de se pratiquer à un coût acceptable, ce qui est impossible avec les autres modèles. De plus, nous n'observons pas l'effet délétère de l'OT sur les pneumocytes de type II avec notre modèle de souris. Bien qu'il présente certains désavantages, nous croyons que la communauté scientifique bénéficiera de l'utilisation de ce modèle pour l'étude des mécanismes biomoléculaires du développement pulmonaire tardif (stades canaliculaire et suivants).

#### **1.4.4. Moment et durée de la chirurgie**

Il a été démontré que l'effet de l'occlusion variait selon le moment de la gestation chez le mouton et chez le lapin <sup>42, 160</sup>. Par conséquent, il est pertinent de se demander à quel moment nous allons effectuer l'OT en fonction de l'hypothèse et des objectifs de départ. Par exemple, une chirurgie trop précoce aura un effet délétère sur les pneumocytes de type II beaucoup plus prononcé qu'une OT plus tardive <sup>201</sup>. Par ailleurs, il a été démontré que la réponse à l'OT, au niveau du développement proprement dit, est meilleure lorsqu'elle est effectuée aux stades canaliculaire ou sacculaire en comparaison à une chirurgie plus précoce (stade pseudoglandulaire) <sup>98, 160</sup>. Finalement, les groupes effectuant des OT chez des fœtus humains ont choisi de faire leur intervention entre la 22<sup>e</sup> et la 30<sup>e</sup> semaine de gestation car ils ont établi qu'ils obtenaient la meilleure réponse à ce moment et aussi parce qu'ils ne peuvent se permettre d'attendre trop tard au cas où le fœtus serait prématuré <sup>56, 65, 71</sup>. Une OT précoce peut mener à une croissance importante, cependant l'architecture du poumon risque d'être complètement anormale et de mener à l'hydrops chez le fœtus <sup>160</sup>.

La durée de l'occlusion est aussi un paramètre dont il faut tenir compte. Les études chez le mouton ont surtout porté sur les effets prolongés de l'occlusion <sup>14, 43, 50, 157</sup>. Cependant, on s'est vite rendu compte que l'accélération de la croissance induite par l'OT était transitoire, c'est-à-dire qu'il y a ensuite un retour à une croissance normale entre 7 à 10

jours). Les études sur le modèle de lapin se sont plutôt concentrées sur l'effet précoce à l'occlusion <sup>44</sup>. Les premières études chez le lapin laissaient supposer qu'il y avait un temps mort de trois jours de récupération suite à la chirurgie, puis une accélération rapide du développement aux jours 4 et 5 suivant l'OT. Cependant, ces chirurgies furent effectuées au stade pseudoglandulaire du développement pulmonaire. Dans les études subséquentes, où la chirurgie a été effectuée plus tardivement, ce temps mort ne semble plus se produire. Il reste toujours à déterminer si cette différence représente un effet de la technique chirurgicale, des médicaments utilisés pendant la chirurgie ou du moment de la chirurgie. Avec notre modèle murin d'occlusion trachéale, il a été possible de démontrer une distension plus importante, une expression plus élevée de c-FOS et l'expression différentielle d'ARNm de nombreux gènes dès la première heure suite à l'occlusion trachéale (résultats non publiés). Il semble donc y avoir un changement de pression très rapide sur les cellules pulmonaires, un phénomène semblant activer rapidement certains sentiers de signalisations, induisant la transcription de nombreux gènes. Bien qu'il faille tenir compte du fait que le développement murin est beaucoup plus rapide que chez le mouton par exemple, il est évident que la réponse à l'occlusion est extrêmement rapide.

#### **1.4.5. Occlusion réversible**

Comme on sait que l'effet de l'OT se fait sentir très rapidement et que l'effet délétère sur les pneumocytes de type II survient suite à l'occlusion prolongée de la trachée, une technique d'OT temporaire a été développée. Cette méthodologie a été développée afin de limiter les effets pervers de l'occlusion sur les pneumocytes de type II et de conserver les effets positifs de l'OT sur le développement pulmonaire. La première méthode consistait littéralement à ligaturer la trachée, ce qui complique la réanimation en salle d'accouchement. Le développement des techniques de fœtoscopie endotrachéale et d'un ballon qu'il serait possible de gonfler à l'intérieur de la trachée puis de le retirer tout simplement en le perforant a rendu la chose possible <sup>38</sup>. Le principal avantage de cette technique est qu'elle est moins invasive; elle permet de renverser facilement la chirurgie à la naissance avec des dommages minimum à la trachée. Cette approche combine tous les avantages de l'occlusion trachéale temporaire tout en éliminant les difficultés reliées à

la dissection du cou et à la pose et au retrait de l'agrafe. Elle fournit d'ailleurs des résultats très intéressants et elle est même utilisée présentement en clinique avec des résultats très prometteurs <sup>47</sup>. Certaines équipes sont parvenues à des résultats très intéressants sur le modèle de mouton <sup>54, 156</sup>. Il semble même que l'OT temporaire renverse les anomalies vasculaires associées à la HDC <sup>127</sup>. Cependant, il a également été démontré que le relâchement de l'OT dans les cas de HDC avait des effets négatifs sur la réponse à l'occlusion sans permettre une récupération complète du surfactant <sup>20, 22</sup>. De plus, il a été démontré que cela avait un effet extrêmement négatif sur la réponse à la réanimation à la naissance; en fait, après relâchement, ils vont presque aussi mal que les fœtus ayant la HDC sans OT <sup>22</sup>.

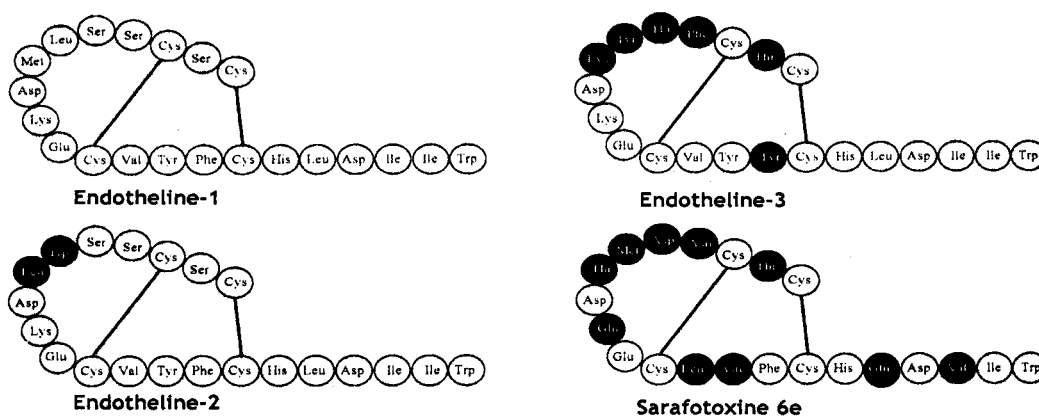
## 1.5. Les endothélines

Les endothélines (ETs) furent isolées et identifiées par Yanagisawa et coll. en 1988 <sup>204</sup>. La famille des ETs consiste en trois isopeptides structurellement semblables : endothéline-1 (ET-1), endothéline-2 (ET-2) et endothéline-3 (ET-3). Les 3 isopeptides sont codés par trois gènes indépendants <sup>83</sup>. Les peptides ont 21 acides aminés et possèdent tous deux ponts disulfures intramoléculaires aux positions cys1-cys15 et cys3-cys11, leur conférant la structure caractéristique aux ETs <sup>203, 204</sup>. Les trois peptides partagent une forte homologie de séquence entre eux et aussi avec les sarafotoxines, des peptides cardiotoxiques isolés à partir du venim du serpent *atractaspis engaddensis* <sup>8, 105, 165</sup>. L'homologie de séquence parmi les endothélines et avec les sarafotoxines implique que les gènes des endothélines ont évolué sous une forte pression pour pouvoir conserver leur structure et leur fonction. Ce haut degré de conservation génomique est observé habituellement chez des gènes remplissant des rôles essentiels pour l'hôte.

### 1.5.1. Biosynthèse

Les trois isoformes proviennent d'une transformation post-traductionnelle de préprohormones. La synthèse de ET-1 est la plus étudiée et sert de patron pour la

synthèse des autres isopeptides. Le premier produit de la traduction du gène de ET-1 est une protéine de 212 acides aminés appelée préproET-1 (ppET-1)<sup>83</sup>. Par la suite, ppET-1 doit être clivé à trois reprises avant de devenir ET-1 et d'avoir son activité complète. Tout d'abord, ppET-1 est clivé par une endopeptidase spécifique aux paires d'acides aminés à l'extrémité C-terminale pour produire big ET-1. Finalement, une enzyme de conversion des ETs (ECE), de la famille des métallo-endopeptidases, coupe big ET-1 au site Trp<sup>73</sup>-Val<sup>74</sup> pour produire ET-1. Des mécanismes similaires mènent à la production des peptides matures ET-2 et ET-3. La conversion de big ET-1 en ET-1 amplifie de façon significative (au moins 140 fois) l'activité du peptide<sup>100</sup>.



**Figure 1.9 : Structure des endothélines et de sarafotoxine 6e**

Les différences en acides aminés en comparaison avec ET-1 sont montrées en noir (Figure adaptée de Michael J.R., Endothelins and the Lung, Am j Respir Crit Care Med, Vol. 154, 1996).<sup>141</sup>

### 1.5.2. Récepteurs des endothélines

L'effet des endothélines a lieu suite à leur association à des récepteurs spécifiques. Deux récepteurs des endothélines (ET-Rs) ont été identifiés jusqu'à maintenant chez les mammifères, ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>. Ces deux récepteurs diffèrent au niveau de leur distribution et de leur affinité aux ligands (pour ET<sub>A</sub> : ET-1=ET-2<ET-3 et pour ET<sub>B</sub> : ET-1=ET-2=ET-3). Les ET-Rs font partie de la famille des récepteurs heptahéliques couplés aux protéines G. Ils sont présents dans la majorité des tissus. Cependant, il existe une certaine

confusion pour l'extrapolation des données car la distribution des récepteurs n'est pas la même pour toutes les espèces et pour tous les tissus.

### 1.5.3. Distribution

Les divers patrons d'expression des composants du système endothéline dans les divers tissus chez différents organismes sont de bons exemples de la complexité physiologique de ce système. ET-1 est produit entre autre par les cellules endothéliales, les cellules épithéliales des voies aériennes, les macrophages, les fibroblastes, les cardiomyocytes et certains neurones<sup>52, 62, 109, 130, 163, 164, 179</sup>. ET-2 est exprimé par les cellules endothéliales intestinales et ET-3 surtout par les neurones, les cellules épithéliales rénales tubulaires et les cellules épithéliales intestinales<sup>96, 138</sup>. Par ailleurs, il a été démontré que plus de 80% d'ET-1 est sécrété de façon directionnelle vers l'interstitium et les muscles lisses et non vers les surfaces luminales des voies aériennes et des vaisseaux. Donc, les concentrations plasmatiques d'ET-1 sont environ 100 fois moins élevées que celles de l'interstitium. ET<sub>A</sub> se retrouve à la surface des cellules des vaisseaux sanguins, muscles lisses, cardiomyocytes, hépatocytes, neurones, ostéoblastes, mélanocytes, kératinocytes et adipocytes. ET<sub>B</sub> se retrouve sur les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, muscles lisses, hépatocytes, neurones des systèmes nerveux central et périphérique. Cette grande diversité de distribution démontre une grande variété de fonctions pour le système ET dans les divers tissus chez les différents organismes.

Parmi les trois isopeptides, ET-1 est le plus exprimé dans le tissu pulmonaire<sup>64</sup>. Il est surtout exprimé par les cellules endothéliales, épithéliales, endocrines et par les macrophages<sup>17, 64</sup>. ET-3 est également exprimé en plus faible proportion par les cellules épithéliales de la trachée et par les macrophages alvéolaires de certaines espèces<sup>15, 52</sup>. Les ET-Rs sont fortement exprimés dans le poumon et ce tant au niveau des voies aériennes que des vaisseaux. Cependant, le ratio d'expression ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> dépend fortement de l'espèce étudiée<sup>64</sup>. Les cellules de muscles lisses des voies aériennes expriment fortement les ET-Rs. Chez l'humain, ET<sub>B</sub> est le récepteur prédominant (90%) alors que chez le



mouton, ET<sub>B</sub> est complètement absent de ce type cellulaire. Les ET-Rs sont également exprimés par les cellules de muscles lisses des vaisseaux sanguins. La présence de récepteurs a également été détectée en périphérie du poumon, notamment dans les parois alvéolaires. Cependant, dans ce cas, aucun type cellulaire précis n'a été identifié <sup>64</sup>.

#### 1.5.4. Régulation

La régulation d'ET-1 se fait principalement au niveau de la transcription. Des stimuli aussi variés que les forces de cisaillement, l'hypoxie, cytokines (IL-2, IL-1 $\beta$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ , IFN- $\beta$ ), lipopolysaccharides et de nombreux facteurs de croissance (transforming growth factor  $\beta$ , platelet derived growth factor, epidermal growth factor) induisent la transcription de l'ARNm de ppET-1 et la sécrétion de la protéine. De plus, ET-1, de façon autocrine, peut lui-même induire sa propre expression <sup>86</sup>. En contraste, l'expression est inhibée par la présence d'oxyde nitrique (NO) <sup>111</sup>. Notons que les forces de cisaillement peuvent également stimuler la production de NO par les cellules endothéliales. Les forces de cisaillement sont donc d'importants régulateurs de l'expression d'ET-1. Par ailleurs, certains stimuli augmentent la stabilité de l'ARNm de ppET-1 menant à une expression accrue et soutenue de ET-1 <sup>53</sup>. La concentration des ET-Rs est dépendante du type cellulaire mais aussi de la présence de certains facteurs de croissance. Étant donnée la variété des mécanismes physiques et biochimiques influençant l'expression d'ET-1 et de ses récepteurs, le rôle du système endothéline dans les états pathologiques est difficile à définir.

#### 1.5.5. Transduction des signaux

La liaison des ETs à leurs récepteurs engendre l'activation de nombreux sentiers de signalisation et de nombreux seconds messagers intracellulaires pour ultimement mener à une réponse biologique. Parmi les sentiers et les seconds messagers, se retrouvent l'hydrolyse de PIP<sub>2</sub> par la phospholipase C  $\beta$  pour produire l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) et le 1,2-diacylglycérol (DAG), la génération de AMP<sub>cyclique</sub>, l'augmentation des concentrations cytosoliques des ions calciums provenant des dépôts intracellulaires et

extracellulaires, la modulation des concentrations des ions  $H^+$ ,  $K^+$  et  $Cl^-$  par la modulation de l'activité des canaux ioniques, stimulation de la phospholipase  $A_2$  et l'activation de la protéine kinase C. Ces sentiers ne seront pas décrits ici de façon exhaustive, le lecteur est invité à se référer à la revue par Rubanyi et Polokoff <sup>163</sup>.

### 1.5.6. Activités biologiques

L'activation d'un si grand nombre de sentiers de signalisation sur autant de types cellulaires et de tissus différents a pour effet de provoquer une variété d'activités biologiques. Nous nous concentrerons ici sur les activités biologiques des ETs sur le poumon seulement, plus particulièrement sur les muscles lisses des voies aériennes et des vaisseaux, l'épithélium, les cellules inflammatoires et sur les cellules situées en périphérie du poumon.

*In vivo*, ET-1 possède un fort potentiel de constriction sur les muscles lisses des voies aériennes via  $ET_A$  et  $ET_B$  chez plusieurs espèces (cochon d'Inde, rat, chat, chien, mouton) <sup>64</sup>. Par ailleurs, des essais *in vitro* ont démontré que ET-1 possède également un fort pouvoir relaxant sur les cellules de muscles lisses des voies aériennes. De plus, l'interaction entre ET-1 et  $ET_A$  semble promouvoir la prolifération des muscles lisses des voies aériennes <sup>63, 149, 176</sup>. Cependant, comme il est un faible facteur de croissance, il agit plutôt comme comitogène <sup>155</sup>.

L'effet le plus grand des ETs est sur les muscles lisses des vaisseaux. *In vivo*, ET-1 provoque la vasoconstriction de façon vive et soutenue principalement via  $ET_A$  mais aussi via  $ET_B$  chez certaines espèces animales <sup>34, 85, 122, 123, 161, 200</sup>. Cependant, la vasoconstriction médiée par ET-1 n'est observée, en condition normale, que tard en gestation et chez l'adulte <sup>200</sup>. De plus, ET-1 provoque la vasodilatation des vaisseaux via son association à  $ET_B$  et implique la génération de NO et l'activation de canaux  $K^+$  ATP-dépendants.

Comme il a déjà été mentionné, l'épithélium est une source majeure de ET-1. En plus de sécréter le peptide et d'activer les cellules adjacentes, comme les muscles lisses des voies

aériennes et des vaisseaux, il semble que certaines fonctions des cellules épithéliales peuvent être modulées par ET-1 qui agirait donc de façon autocrine autant que paracrine à l'intérieur des voies aériennes. En effet, il a été démontré que ET-1 provoque une augmentation de la fréquence des battements des cils et l'accélération de la sécrétion du mucus à l'intérieur du poumon.

### 1.5.7. Rôle du système endothéline dans la HDC

Pour le moment, encore peu de travaux ont été publiés au sujet du rôle que pourrait avoir les ETs sur la HDC. La première étude sur le sujet fût publiée en 1993. Les auteurs ont mesuré les concentrations plasmatiques de ET-1 chez des nouveau-nés souffrant d'hypertension pulmonaire de différentes étiologies, dont un souffrant de HDC <sup>162</sup>. Dans une autre étude, encore une fois chez l'humain, il a été démontré que chez des nouveau-nés souffrant de HDC, les niveaux plasmatiques d'ET-1 sont plus élevés que chez des patients du même âge <sup>107</sup>. Il a également été démontré dans cette étude une forte immunoréactivité pulmonaire pour ET-1 dans l'endothélium et les muscles lisses des nouveau-nés ayant perdu la vie avant chirurgie.

Des études ont également été effectuées chez des modèles animaux de HDC (rat et mouton). Des taux élevés d'ARNm et de protéines pour ET-1, ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> ont été détectés dans les poumons de rat où la HDC a été induite au nitrofen <sup>150, 172</sup>. Chez le mouton, il a été démontré que la perfusion d'un antagoniste du récepteur ET<sub>A</sub> (BQ-123) pendant quatre jours, du jour 128 au jour 132 (stade sacculaire) entraîne une vasodilatation pulmonaire plus importante dans le groupe HDC que dans le groupe témoin <sup>183</sup>. Avec le modèle de HDC induite par le nitrofen chez le rat, il a été démontré que l'utilisation d'un inhibiteur non-sélectif des ECE administré à partir du jour 12 de la gestation jusqu'à la naissance augmentait la survie à la naissance et réduisait la sévérité de l'hypoplasie pulmonaire <sup>94</sup>. En résumé, il a été démontré que l'expression des gènes du système endothéline semble être modulée par la HDC. Cependant, encore peu d'information est disponible au sujet de l'implication des endothélines sur le développement pulmonaire, la physiopathologie de la HDC ou de l'hypertension pulmonaire reliée à la HDC.

## **1.6. Hypothèses de travail**

L'hypothèse générale est que la réponse de la microvasculature est essentielle dans la croissance pulmonaire induite par l'OT.

Le travail fait au cours de cette maîtrise répond à trois hypothèses spécifiques. La première hypothèse spécifique est que l'effet bénéfique de l'OT sur la musculation des petites artères dans le modèle ovin de HDC est en relation avec une baisse d'expression du système endothéline en comparaison avec une HDC seule ou une HDC avec une occlusion trachéale relâchée 1 semaine avant l'accouchement.

La deuxième hypothèse spécifique est que la croissance accélérée de la microvasculature associée à l'OT procède par angiogénèse et est perceptible dans les 24h suivant l'OT chez le modèle murin.

Finalement, la troisième hypothèse spécifique est que la croissance accélérée de la microvasculature induite par l'OT est associée à une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans l'angiogénèse.

## **1.7. Objectifs**

L'objectif principal est de caractériser le développement vasculaire pulmonaire accéléré induit par l'OT.

Le premier objectif spécifique est l'étude de l'implication du système endothéline dans un modèle expérimental de HDC où il est possible de faire des observations physiologiques et cliniques et de faire l'OT temporaire.

Les objectifs suivants sont dépendants de la réussite d'un objectif plus général. C'est-à-dire qu'ils nécessitent la maîtrise de la technique d'OT chez le modèle murin. Cette

technique est extrêmement ardue et nécessite beaucoup d'entraînement. D'ailleurs, à notre connaissance, nous sommes toujours la seule équipe maîtrisant cette technique.

Le second objectif spécifique est l'étude des changements morphologiques au niveau de la micro-vascularisation suite à l'OT dans un modèle murin.

Finalement, le troisième objectif consiste en l'étude de l'expression de l'ARNm des acteurs importants de l'angiogenèse dans notre modèle murin d'OT.

## **2. MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS**

Cette section est divisée en trois parties correspondant aux trois objectifs énoncés à la section 1.7.objectifs.

### **2.1. Méthodologie et résultats de la première partie**

Cette partie répond au premier objectif qui est l'étude de l'implication du système endothéline dans un modèle expérimental de HDC où il est possible de faire des observations physiologiques et cliniques et de faire l'OT temporaire.

Cette partie est présentée sous forme d'article. Par conséquent, la méthodologie ne sera pas répétée car les échantillons et les techniques utilisés ne le seront pas pour les parties subséquentes.

### **2.2. Présentation d'un article soumis sous le titre de «Effect of temporary tracheal occlusion on the endothelin system in experimental cases of diaphragmatic hernia.»**

Cet article a été soumis dans la revue *Experimental Lung Research* en septembre 2004 et accepté pour publication en janvier 2005.

#### **2.2.1. Avant-propos de l'article.**

En préambule, je dois présenter les co-auteurs et décrire le rôle qu'ils ont eu à jouer à travers le processus. Tout d'abord, Bruno Piedboeuf est mon directeur de recherche. Il a supervisé toutes les phases du projet allant du design de l'expérimentation, en passant par les chirurgies et les expériences de biologie moléculaire, jusqu'à l'étape finale, la rédaction de l'article. Ioana Bratu, Hélène Flageole et Jean-Martin Laberge sont médecins et chercheurs à l'Université McGill. Ils ont procédé aux chirurgies sur les animaux, récolté les données physiologiques et cliniques et récolté les tissus. Tommy Seaborn est étudiant au doctorat au sein du laboratoire de Bruno Piedboeuf à l'Université Laval. Il a participé à la mise au point des immunohistochimies, à la méthode de quantification et à la méthode d'analyse statistique. Pour ma part, j'ai effectué les expériences de biologie

moléculaire, procédé à la quantification des immunohistochimies, à l'analyse des données et à la rédaction de l'article sous la supervision de mon directeur de recherche.

Cette étude a été rendue possible grâce à la participation des Instituts de Recherche en Santé du Canada, la Fondation de la recherche sur les maladies infantiles et la chaire de recherche en périnatalogie Jeanne et Jean-Louis Lévesque. Finalement, je tiens à remercier Paul A. Khan pour avoir révisé l'article.

### **2.2.2. Résumé de l'article**

La HDC est souvent associée à un développement vasculaire déficient et à une sévère hypertension pulmonaire à la naissance. Il a déjà été démontré que l'occlusion trachéale pouvait renverser l'hypertension pulmonaire résultant de la HDC alors qu'un relâchement précoce de l'OT (RT) semble abolir ces bénéfices cliniques. Étant donné leur fort potentiel mitogène et vasoactif, nous avançons l'hypothèse que l'expression de ET-1 et ET<sub>A</sub> est accrue dans les poumons des moutons du groupe HDC et que cette augmentation est prévenue par l'OT mais pas lorsqu'elle est relâchée. Une HDC du côté gauche a été créée chirurgicalement chez des agneaux fœtaux au jour 80 de gestation, suivi de l'OT à 108 jours et du relâchement à 129 jours. À la naissance, après huit heures de ventilation, les animaux furent sacrifiés. Quatre groupes expérimentaux furent donc comparés : HDC, HDC+OT, HDC+OT+RT et les contrôles non-opérés. Les niveaux d'expression d'ARNm de ET-1, ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub> et ECE furent analysés par transfert northern. Des immunohistochimies furent réalisées pour l'étude de l'expression des protéines ETs et ET<sub>A</sub>. L'expression d'ARNm de ET-1 et ET<sub>A</sub> étaient significativement plus bas dans le groupe HDC en comparaison aux groupes HDC+OT±RT ( $p < 0,05$ ). Par ailleurs, les niveaux d'expression d'ETs dans les groupes HDC±OT±RT, étaient diminués lorsque comparés aux contrôles pour les voies aériennes et les vaisseaux ( $p < 0,05$ ), sauf pour les cellules endothéliales. Cependant, les niveaux d'expression de ET<sub>A</sub> étaient plus élevés dans les groupes HDC±OT±RT en comparaison aux contrôles pour les voies aériennes et la fine musculature des vaisseaux ( $p < 0,05$ ). En conclusion, nos résultats suggèrent que l'implication du système endothéline dans l'hypertension pulmonaire associée à la HDC est limitée. Cependant, il semble que les gènes du système endothéline soient modulés à travers le développement.

### **2.2.3. Titre**

Effect of temporary tracheal occlusion on the endothelin system in experimental cases of diaphragmatic hernia.

### **2.2.4. Auteurs**

Marc Cloutier, Tommy Seaborn, Ioana Bratu, H el ene Flageole, Jean-Martin Laberge, et Bruno Piedboeuf.

### **2.2.5. Abstract**

Previously, we have shown that tracheal occlusion (TO) partially reverses the onset of congenital diaphragmatic hernia (CDH)-induced pulmonary hypertension (PH) and abnormal pulmonary vascular development while release of the occlusion (TR) abolishes these clinical benefits. As a consequence of their mitogenic and vasoactive properties, we hypothesize that the expression of ET-1 and ET<sub>A</sub> genes is increased in lungs of CDH lambs, and that this increase is abolished partially in CDH+TO but not in CDH+TO+TR. A surgical left-sided CDH was created in fetal lambs at 80 days of gestation (gd), followed by TO at 108 gd, and by TR at 129 gd. Four groups were compared: CDH, CDH+TO, CDH+TO+TR, and non-operated controls (C). Assessment of mRNA expression by northern blot showed significantly lower ET-1 and ET<sub>A</sub> levels in the CDH group than in the CDH+TO±TR groups ( $p<0,05$ ). Endothelins protein expression levels were lower in CDH±TO±TR groups when compared with controls for airways and vessels ( $p<0.05$ ) with the exception of endothelial cells. In contrast, ET<sub>A</sub> protein expression levels were higher in CDH±TO±TR groups compared with controls for airways and blood vessels smooth muscles ( $p<0.05$ ). Our results suggest that involvement of the endothelin system in the pulmonary hypertension associated with CDH is limited. However, the endothelin system appears to be modulated during development.



### 2.2.6. Introduction

Despite advances in prenatal diagnosis and neonatal treatment of congenital diaphragmatic hernia (CDH), pulmonary hypertension (PH) and the lung hypoplasia associated with CDH still lead to a mortality rate of 20% for babies born alive <sup>16</sup>. The causes of PH associated with CDH are still unclear. Structural alterations in the pulmonary vessels likely contribute to an increase in pulmonary vascular resistance. Among these structural alterations are a decrease in total volume of the pulmonary vascular bed combined with an increase in muscularization of small pulmonary arteries <sup>61, 117, 145</sup>. Therefore, the pulmonary vasculature of neonates with CDH does not appear supportive of extra-uterine life.

Experimental *in vivo* fetal tracheal occlusion (TO) has been shown to significantly increase lung growth in animal models of CDH <sup>12, 20, 129, 156</sup>, as well as in human fetuses with CDH <sup>190</sup>. Lung growth associated with TO is also accompanied by a thinning of the media lining small pulmonary arteries, thus minimizing the excess pulmonary artery muscularization seen in CDH <sup>22, 51</sup>. Such structural remodelings result in reduced PH with improvements in gas exchange, ventilation and compliance <sup>21, 112</sup>. However, long-term TO also results in a serious deficiency in both pulmonary surfactant and in the quantity of type II pneumocytes <sup>57, 121, 157</sup>. On the other hand, release of the occlusion before delivery (TR) leads to a significant recovery of the number of type II pneumocytes <sup>14</sup>, but prevents the beneficial effect of pulmonary artery remodeling obtained under conditions of continuous TO <sup>20</sup>. Thus, occlusion release is detrimental to short-term resuscitation when compared with TO without release <sup>21, 41, 112</sup>.

The endothelin (ET) system is suspected to play an important role in CDH-associated PH <sup>40, 183</sup>. The system is composed of three peptide ligands (ETs: ET-1, ET-2 and ET-3) whose biological activities are mediated by two receptors (ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub>). ET-1, which is the most potent and abundant endothelin ligand in the lung, has a strong vasoactive and pro-mitogenic potential <sup>203, 206</sup>. All three endothelin peptides precursors (ppETs) are produced from three distinct genes that are cleaved at two sites by two different

activating peptidases. Final proteolytic processing which leads to the formation of functional peptides is made by a family of metalloproteases named endothelin-converting enzymes (ECEs) <sup>202</sup>.

The complexity of the endothelin system is enhanced by the diverse patterns of expression of its components, by the tissue context as well as by various physiological conditions. In the lung, several cell types, including endothelial cells, airway epithelial cells, fibroblasts and smooth muscle cells, secrete ET-1 <sup>130</sup>. ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors are expressed predominantly in smooth muscle cells and epithelium of the airways <sup>74</sup>. The main effects of ET<sub>A</sub> receptor activation are vasoconstriction and smooth muscle cell proliferation <sup>203, 206</sup> while vessels relax when ET<sub>B</sub> is activated <sup>180</sup>. Although early observations pointed out that ET-1 was a potent vasoconstrictor <sup>204</sup>, subsequent results showed that it also exerts a wide variety of biological activity on vascular as well as non-vascular tissues. Furthermore, ET-1 contributes to various pathophysiological as well as physiological processes in different systems <sup>96, 118, 175, 177, 207</sup>. Moreover, the endothelin system seems to be implicated in the incidence of PH that is observed in cases with CDH. In support of this, high levels of both ET-1 mRNA and protein have been observed in the lungs of neonates with CDH and PH <sup>107, 150</sup>. Additionally, an exaggerated vasoconstrictory response to ET-1 combined with an endothelin receptor imbalance favoring PH in CDH lungs has been described <sup>40, 93, 183</sup>.

The goal of the present study is to assess both the expression of endothelin system mRNAs and proteins in an experimental *in vivo* lamb model of CDH subjected to temporary TO. We hypothesize that ET-1 and ET<sub>A</sub> are implicated in PH associated with CDH. More specifically, we speculate that the expression levels of endothelin system genes are increased in lungs of lambs with CDH. Moreover, we suggest that this increase is reversed partially by fetal TO but not when the occlusion is released prior to birthing.

### **2.2.7. Materials and Methods**

Animal protocols were approved by the McGill University Animal Care Committee. Four groups of lambs were studied: CDH (n=4), CDH+TO (n=5), CDH+TO+TR (n=5) and

non-operated controls (n=3). Surgical and resuscitation protocols were performed as described previously<sup>20,22</sup>. Briefly, at 80 days gestation (gd), a left-sided CDH was created surgically in a fetal lamb. At 108 gd, experimental *in vivo* TO was performed by fetal tracheoscopy (2.7 mm Semi Flexible Mini-Endoscope, Karl Storz, Germany) in combination with a detachable balloon system (GVB12 Latex Goldvalve Balloon, diameter 14 mm, length 22.5 mm, volume 2.5 ml; CCOXLS co-axial catheters)<sup>55</sup>. At 129 gd, one week prior to delivery, TR was achieved by ultrasound-guided percutaneous deflation of the balloon<sup>20</sup>. In order to decrease the risk of preterm labor, all ewes, including non-operated controls, received 250 mg medroxyprogesterone intramuscularly at 129 gd. At 135 gd, they received 0.5 mg/kg betamethasone intramuscularly to accelerate lung maturation and development. Data on lung growth, lung development, surfactant content and vascular remodeling in lambs sacrificed at birth following a similar antenatal protocol were published previously<sup>20,22</sup>.

#### *Eight hours ventilation*

Sedation was achieved with ketamine 2 mg/kg/hr (i.v.), paralysis with pancuronium 0.1 mg/kg/hr (i.v.), and alkalosis with sodium bicarbonate 0.5 mmol/kg/hr (i.v.). We used the following initial ventilatory settings (Sechrist Infant Ventilator Model IV-100B) with permitted range in parenthesis: peak inspiratory pressure (PIP) 25 cm H<sub>2</sub>O (15-30); peak end-expiratory pressure (PEEP) 5 cm H<sub>2</sub>O (3-7); FiO<sub>2</sub> 1.0 (0.21-1.0); respiratory rate (RR) 120 breathes per minute (10-120); minimum inspiratory time 0.25 sec; inspiratory time to expiratory time ratio (I:E) 1:1. Ventilatory settings were changed accordingly if PaCO<sub>2</sub> > 65 mm Hg or PaCO<sub>2</sub> < 40 mm Hg; if PaO<sub>2</sub> < 40 mm Hg or PaO<sub>2</sub> > 100 mm Hg; and if pH < 7.4 or pH > 7.5. We calculated the correction necessary to bring the pH up to 7.4, and gave boluses of 2 mmol/kg of NaHCO<sub>3</sub> (i.v.) to increase the pH by 0.1 unit. Tension pneumothoraces were treated with chest tubes, and sub-xyphoid incisions. Pre-ductal arterial blood gas was analyzed using a portable clinical analyzer and EG7+ cartridges (i-STAT, Sensor Devices Inc., Waukesha, WI, USA). Short-term outcomes during the 8h resuscitation period were recently published<sup>21, 112</sup>. At sacrifice, the right middle lobe and lingula were then tied off and snap frozen in liquid nitrogen. The right and left lungs were separately perfused via cannulation of the trachea or left main stem

bronchus, with 10% formaldehyde at a constant pressure of 25 cm H<sub>2</sub>O for 48 hours. Subsequently, 2- to 3-mm thick random transverse 2-cm long slices were taken off both upper and lower lobes and then embedded in paraffin.

#### *Northern blot hybridization*

Isolation and purification of total RNA from the right middle lobe of each lamb was performed using the cesium chloride gradient method. Ten micrograms of right middle lobe total RNA was separated on a 1.5% agarose/formaldehyde gel. This was then transferred onto a nylon membrane and hybridized with cDNA probes for sheep: ppET-1 (550bp), ET<sub>A</sub> (711bp), ET<sub>B</sub> (597bp), ECE-1 (576bp) - all labeled with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP using T7 DNA Polymerase (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway NJ, USA). Primer sequences used to generate the cDNA by PCR are listed in Table 1. The specificity of each cDNA probe was confirmed by sequencing. To standardize the amount of total RNA loaded onto each lane, blots were re-probed with a [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP-labeled cDNA probe for S18 rRNA. Imaging and quantification of the mRNA levels were performed using a Storm 860 phosphorimager (Molecular Dynamics) and are expressed as a ratio of the levels of S18 rRNA.

#### *Immunohistochemistry studies*

Sections, 4-5  $\mu$ m thick, of the paraffin embedded lungs were used for immunolocalization of ETs peptides and ET<sub>A</sub> receptor. The slides were deparaffinized in xylene, and then rehydrated in a decreasing ethanol gradient. Endogenous peroxidase activity was blocked with 0.6% hydrogen peroxide/ 100% methanol. After blocking (TBS, 0.5% BSA, 1.5% normal goat serum), sections were incubated with either a rabbit polyclonal ETs antibody (immunoreacts with all three ET isoforms; Chemicon International, Temecula, CA, USA) diluted 1:100 or with a sheep polyclonal ET<sub>A</sub> antibody (Maine Technologies; Portland, ME) diluted 1:200. The sections were then incubated with biotinylated secondary antibodies and revealed with a Vectastain ABC Standard Kit<sup>®</sup> (Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA). Following incubation in a streptavidin-peroxidase solution, the slides were developed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma Chemical Co., St-Louis, MO, USA). For ET<sub>A</sub> immunolocalization, antibody binding generated signal was

amplified with a TSA™ biotin system kit (PerkinElmer Life Sciences; Boston, MA, USA). Immunolocalization of ETs was enhanced by unmasking antigen determinants by immersion in a hot 0.01M sodium citrate buffer solution immediately following rehydration<sup>82</sup>. For each antibody, two control sections were treated identically except that blocking serum replaced primary antibody in one and a secondary antibody was used in the other. Counterstaining was performed with hematoxylin (Gill's Formulation #2, Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA).

A semi-quantitative assessment of positively stained cells in each tissue sub-compartment considered (airway and terminal airway epithelia, muscular cells underlying airways and terminal airways, alveoli, endothelium and muscular cells of blood vessels) was carried out for both primary antibodies used. The proportion of positively stained cells was assessed on a scale of Ø to ++++. The slides were mixed randomly and analyses were performed in duplicates by an investigator blinded to sample grouping and treatment allocation. For each lung, four sections, one for each lobe except for the right middle lobe, were used. At least ten fields per sections were studied.

#### *Statistical analysis*

For Northern blot hybridizations, data was analyzed by a one way ANOVA using a factorial test with a *post-hoc* Fisher test ( $\alpha = 0.05$ ). All values are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.).

Differences in immunostaining were tested with the non-parametric Kruskal-Wallis test for each sub-compartment considered ( $\alpha = 0.05$ ). In tissue sub-compartments with significantly different data, multiple non-parametric comparisons were tested among experimental groups using the Mann-Whitney U test ( $\alpha = 0.05$ ). Comparisons in immunohistochemical staining among pulmonary lobes were also tested in each tissue sub-compartment of all experimental groups with the Kruskal-Wallis non-parametric test ( $\alpha = 0.05$ ).

## 2.2.8. Results

Complete studies looking at lung growth, lung development, surfactant content and vascular remodeling in lambs sacrificed at birth following a similar antenatal protocol have been published previously<sup>20, 22</sup>. Study looking at physiological responses to eight hours of resuscitation in the same group of animals has been recently published<sup>21, 112</sup>.

### *Northern blot analysis*

We compared ppET-1, ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub> and ECE-1 mRNA abundance (normalized to S18) in the CDH, CDH+TO, CDH+TO+TR and C lungs. The ratio of mRNA to S18 for the C group was considered as the reference value (100%) for each mRNA level measured. ET-1 mRNA expression level is significantly down regulated in the CDH lungs when compared with C (p=0.007) and CDH+TO+TR (p=0.022) but not when compared with TO while ET<sub>A</sub> mRNA is significantly down regulated in the CDH lungs when compared to all three other groups (p<0.0002). On the other hand, changes in the expression levels of both ET<sub>B</sub> and ECE-1 among the four groups remained non-significant. Results are shown in figure 2.1.

### *ETs Immunohistochemistry studies*

We next carried out immunohistochemistry analyses to obtain a more precise pattern of the expression of ETs and ET<sub>A</sub>. No statistical difference in ETs and ET<sub>A</sub> protein expression was found among the lobes in each sub-compartment of each group examined. Thus, for each individual, we were able to pool the results of the four lobes for the statistical analyses. In all four groups, the maximal expression of ETs proteins was in the proximal airway epithelium. In contrast, the weakest signal was observed in the tissue surrounding terminal airways. Staining in the vascular endothelium was also relatively low. Examples of immunohistochemistry are shown in figure 2. Expression of ETs proteins was significantly lower in the CDH±TO±TR groups when compared with C lungs in every sub-compartment considered with two exceptions (p<0.05). In the vascular compartment, the expression in the endothelial cells was not different among the four

groups. Similarly, in the airway compartment, staining of the alveoli of CDH+TO+TR lungs was not different than that of the C group. Results are summarized in figure 2.2.

#### *ET<sub>A</sub> Immunohistochemistry studies*

As for the immunohistochemistry of the ETs examined, there is no significant difference between the lobes in ET<sub>A</sub> protein expression. Also, we observed the strongest staining in the airway epithelium whereas the weakest staining appeared in the tissue surrounding terminal airways. However, in contrast with the ETs results, significantly stronger staining was observed in the CDH±TO±TR groups when compared with controls ( $p < 0.05$ ) except for the perivascular muscles and for the muscles surrounding airways. Furthermore, ET<sub>A</sub> staining was significantly stronger in the CDH+TO+TR group when compared with CDH lungs in the tissue surrounding proximal airways ( $p = 0.021$ ) and terminal airways ( $p = 0.049$ ). Examples of immunohistochemistry as well as a summary of the results are shown in figure 2.3.

#### **2.2.9. Discussion**

In the current study, we report an increase in ET-1 and ET<sub>A</sub> mRNA levels in lungs of C, CDH+TO and CDH+TO+TR neonatal lambs when compared with CDH lungs while the expression of ETs peptides in lungs of the three CDH groups was decreased when compared with C. In contrast, levels of ET<sub>A</sub> protein expression were significantly higher in the three CDH groups examined when compared with the C group. The highest levels of expression of both ETs and ET<sub>A</sub> protein were observed in airway epithelium and perivascular muscles.

Previous studies have reported elevated levels of ET-1 in blood plasma of newborns with CDH<sup>107, 162</sup>. These results seem to contradict our data, which show a decrease in both mRNA levels of ETs and protein immunoreactivity in lambs with CDH when compared with controls. This apparent discrepancy may be accounted for by species-dependant endothelin system expression. Furthermore, previously published results concerning the

expression of ETs have concentrated on the immunoreactivity of venous plasma. However, release of the peptide by vascular endothelial cells occurs predominantly in the underlying vascular wall. Therefore, circulating levels may not represent accurately the local peptide production. Although levels in blood plasma may be relevant in some pathophysiological states, a local, paracrine or autocrine role in most tissues has been strongly suggested for ET-1<sup>163</sup>. The eight hours of ventilation that the newborns underwent may also, in part, explain the discrepant results of ET-1 expression. Mechanical ventilation may modulate the expression of ETs by activating stretch-dependant genes. Therefore, the expression of ETs may itself be stretch-regulated<sup>115, 153, 189</sup>.

Recent studies suggest that an imbalance in ET-1 receptor activation in CDH is likely to contribute to an exaggerated vasoconstrictive response to ET-1, thereby contributing to PH<sup>40, 150, 183</sup>. A prior study has already shown an increase in the expression level of ET<sub>A</sub> receptor mRNA in a rat nitrofen-induced model of CDH<sup>150</sup>. Another study using an ET<sub>A</sub> antagonist suggests a higher pulmonary vasoconstrictive activity of this receptor in CDH fetal lambs<sup>183</sup>. In accordance with these studies, we report an increased expression of ET<sub>A</sub> receptor protein in lungs of CDH newborn lambs when compared with the C group; thus supporting the hypothesis of ET<sub>A</sub> receptor involvement in PH associated with CDH. However, this increase is sustained with TO, suggesting only a limited involvement of the ET system in mediating the beneficial effects of TO.

Clinical data on the same animals used in the present study have been recently published<sup>21, 112</sup>. Marked clinical improvements to short-term reanimation procedures were observed in the animals treated with TO used in this study. In such cases, a significant decrease in the alveolar-arterial oxygen gradient was observed<sup>21, 112</sup> suggesting an improvement in the ventilation perfusion index. In contrast, when the occlusion was released prior to delivery, a poor clinical outcome was observed with a persistent elevated alveolar-arterial oxygen gradient<sup>21</sup> suggesting persistent pulmonary hypertension since the lung growth induced by TO was preserved. The significant increase of ET<sub>A</sub> immunostaining observed here in the CDH+TO+TR group when compared with the CDH group may be indicative



of the participation of the endothelin system in the clinically detrimental effect of occlusion release. However, the differences were observed in the airway sub-compartment. Moreover, the absence of difference among the CDH and CDH+TO groups suggests that the endothelin system has a limited role in maintaining high pulmonary vascular resistance after birth in this model of CDH.

Expression of genes encoding ET ligands and receptors is modulated during lung development. Recently, an increase in gene expression and production of ET-1 and both ET receptors immediately after birth in mice has been documented <sup>4</sup>. It appears that expression of ET system genes is up-regulated in late gestation and immediately after birth. Such regulation is possibly implicated in the emergence and maintenance of vital functions after birth in the lung as well as in other organs <sup>4,188</sup>. The increased lung growth induced by TO may explain the higher expression of ETs and ET<sub>A</sub> observed in this group when compared with CDH. The counterpart is that the defect in airway and vascular development observed in CDH <sup>70</sup> could explain the lower levels observed in the CDH group when compared with the C group. CDH lungs are actually immature in terms of surfactant and histological structure and this anomaly is only partially corrected by TO. Thus, our results support the hypothesis that expression of ET system genes is dependent on the stage of lung development.

In conclusion, our findings demonstrate that expression of the endothelin system components is modulated throughout lung development. We report evidence suggesting that the ET<sub>A</sub> receptor is involved in the pulmonary hypertension observed in the lamb model of CDH. However, the study does not provide evidence which supports a role for the ET system in mediating the known beneficial effects of TO on pulmonary hypertension. Therefore, the involvement of the endothelin in CDH-induced PH seems limited.

**Tableau 2.1 : Primer sequences and northern blot probe sizes**

<b>mRNA</b>	<b>Forward Primers</b>	<b>Reverse Primers</b>	<b>Product size (nt)</b>
<b>ppET-1</b>	CTGCTGTTTGTGGCT TTCCAAGG	TTTCTCCATGGAGTCTTG GTCCTTG	387
<b>ET<sub>A</sub></b>	GAGGTGTCATCAGT GATAACCCTGA	AGGCAACTGCTCTGTAC CTGTCA	496
<b>ET<sub>B</sub></b>	CAAGACAGCTAAAG ACTGGTGGCTA	GGCACCAGCAGCATAAA CATGAC	387
<b>ECE-1</b>	TGCCTGCTGAACAA CTACATGATC	GTCCAGCTCCTTGGGGT CCA	370

### 2.2.10. Figures Legend

**Figure 2.1 : Effect of temporary tracheal occlusion on the endothelin system mRNA expression in experimental congenital diaphragmatic hernia.**

(A) Electronic image of the northern blots. (B) Bar graph represents mRNA expression normalized with S18 rRNA. Expression is reported as a percent of controls. \*  $p < 0,05$  versus CDH lungs.

**Figure 2.2 : Immunolocalization of ETs peptides in the four experimental groups.**

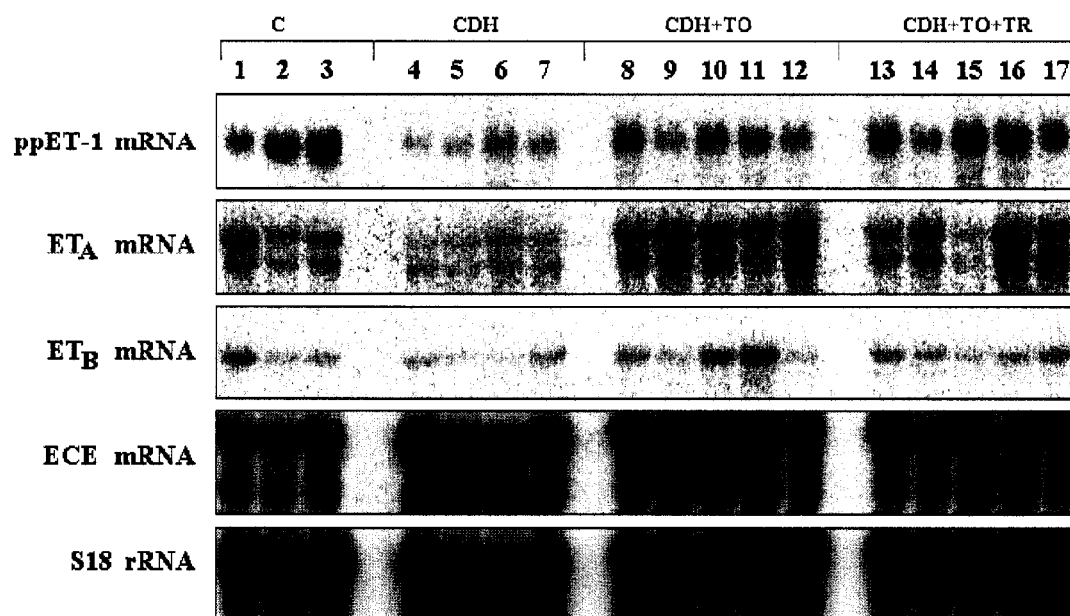
(A) Representative micrograph of ETs peptide immunostaining (40X). Positive signal appears brown. Bar, 40  $\mu\text{m}$ . (B) Semi-quantitative (proportional) assessment of positively stained cells. \*  $p < 0,05$  versus C lungs.

**Figure 2.3 : Immunolocalization of ET<sub>A</sub> receptor in the four experimental groups.**

(A) Representative micrograph of ET<sub>A</sub> receptor immunostaining (40X). Positive signal appears brown. Bar, 40  $\mu\text{m}$ . (B) Semi-quantitative (proportional) assessment of positively stained cells. \*  $p < 0,05$  versus C lungs. §  $p < 0,05$  versus CDH lungs.

Figure 2.1

A)



B)

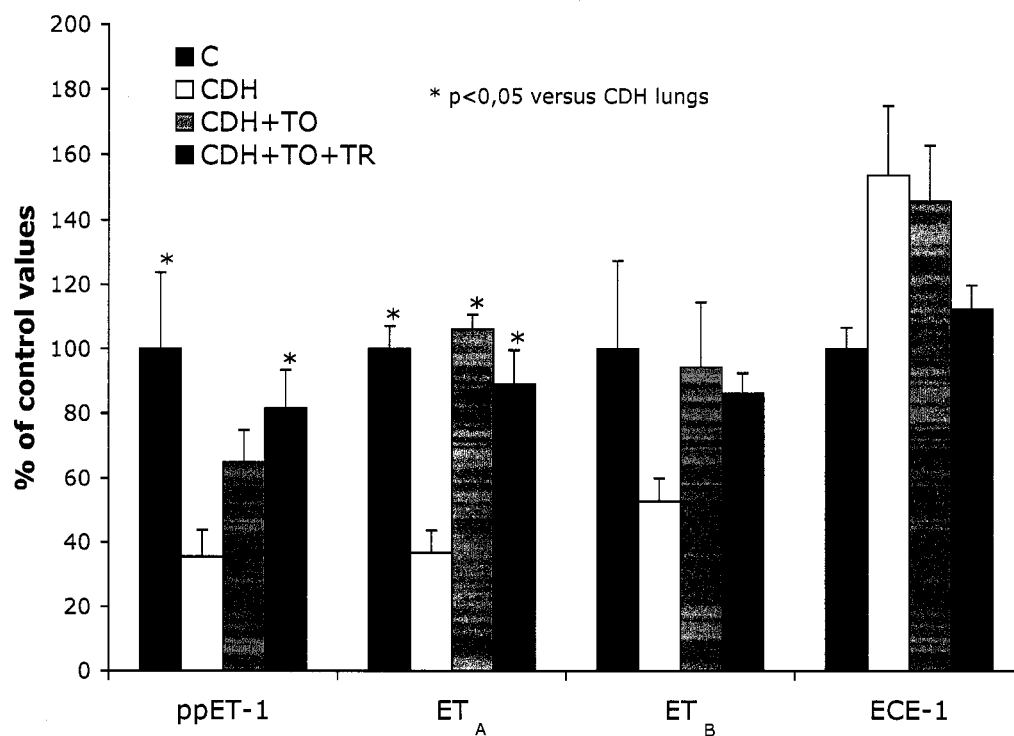
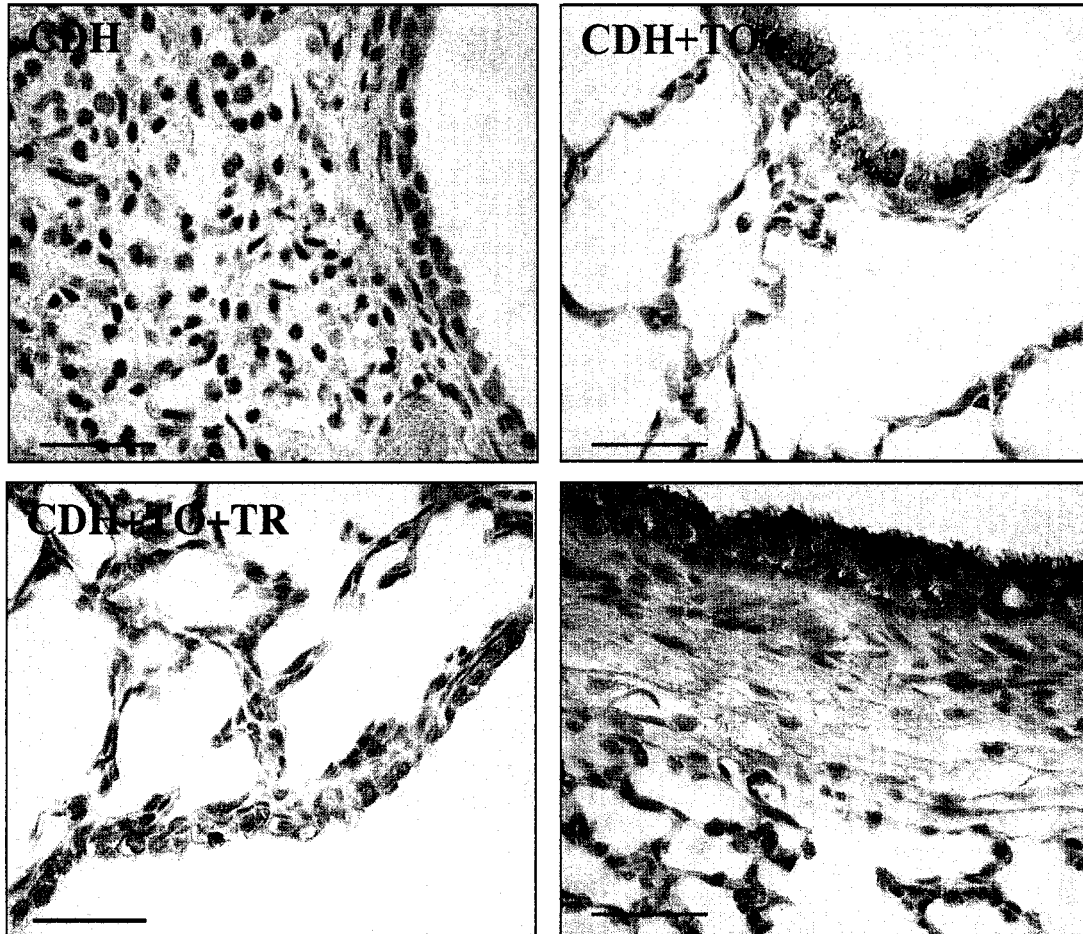


Figure 2.2  
A)



B)

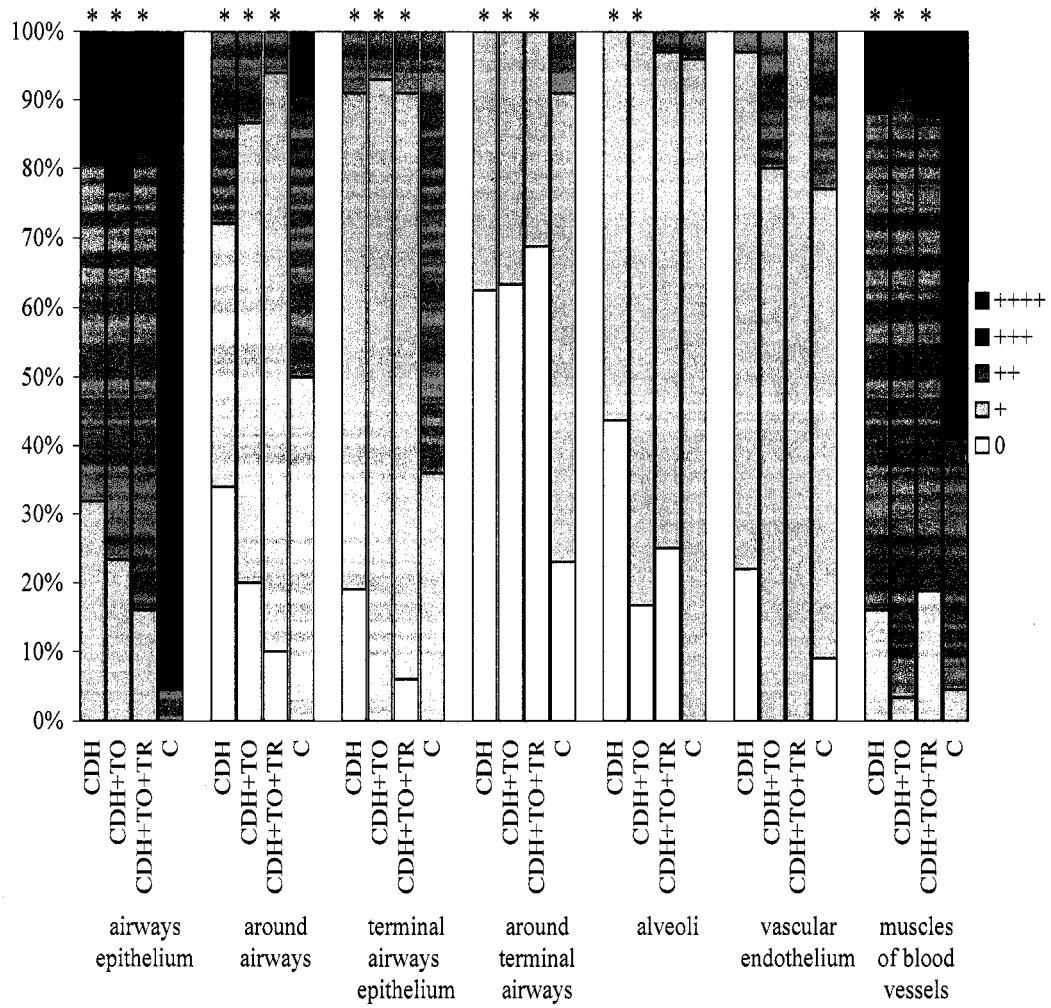
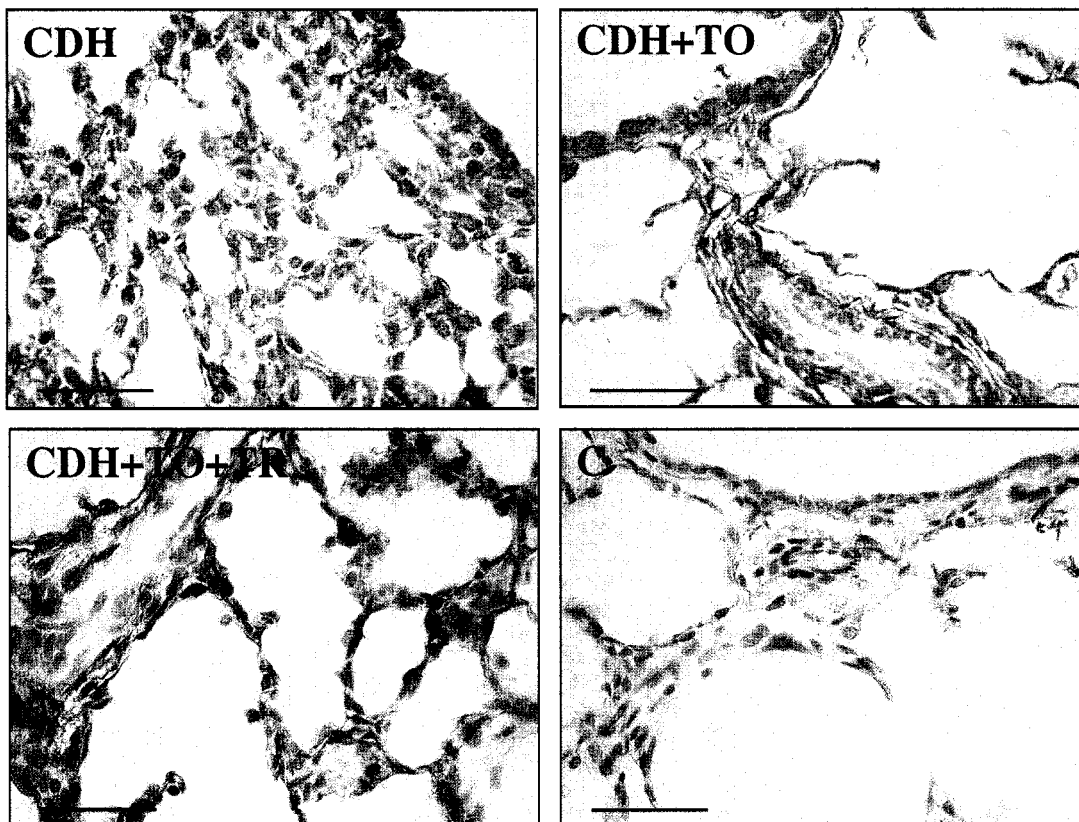
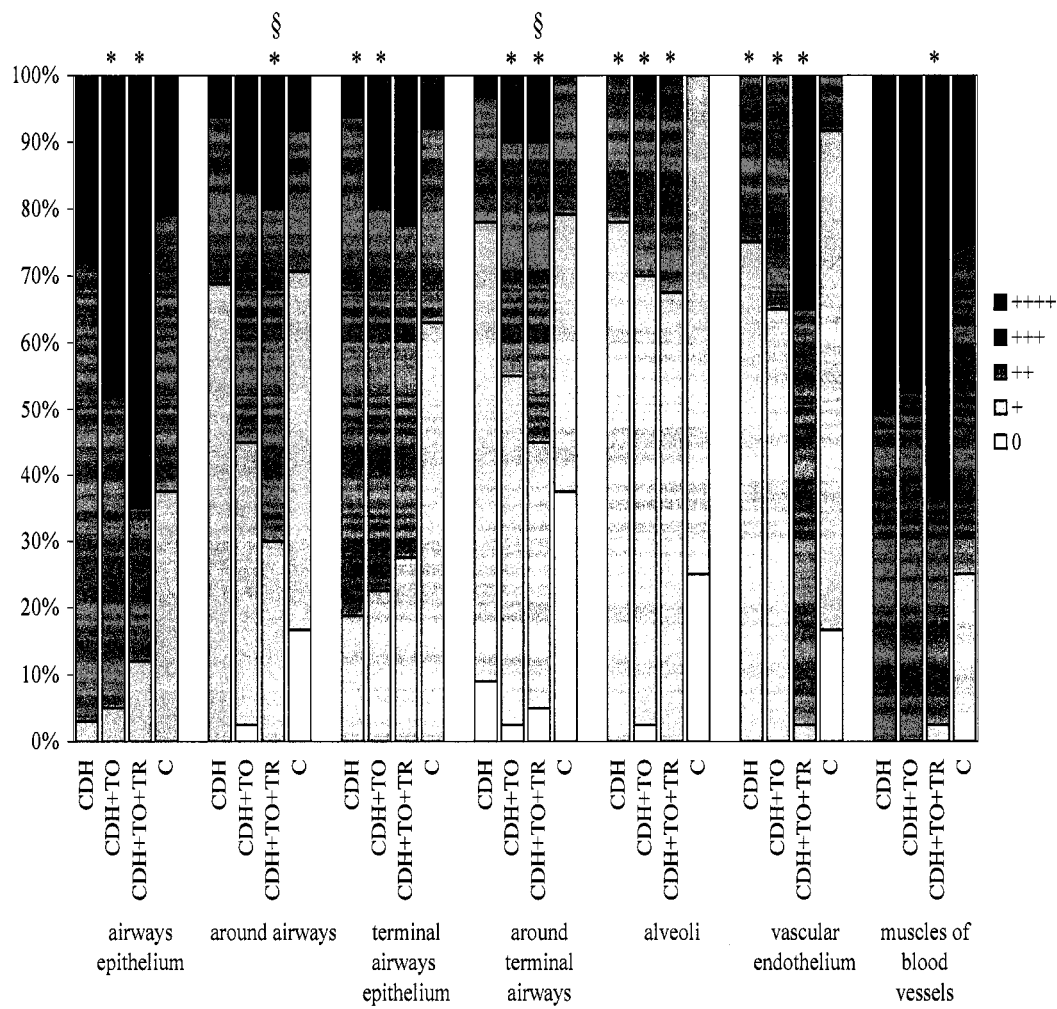


Figure 2.3  
A)



B)





### **2.3. Méthodologie de la deuxième partie**

Cette partie a pour but de répondre au deuxième objectif qui était l'étude des changements morphologiques au niveau de la micro-vascularisation dans un modèle murin d'OT. La réussite de cet objectif dépendait d'un objectif plus général. C'est-à-dire qu'il nécessite la maîtrise de la technique d'OT chez le modèle murin. Cette technique est extrêmement ardue et nécessite beaucoup d'entraînement.

#### **2.3.1. Protocole de chirurgie de l'occlusion trachéale *in vivo* murine**

Ce protocole a été élaboré dans notre laboratoire et il a récemment été décrit dans un article rédigé par France Maltais <sup>132</sup>. Je vais cependant prendre quelques lignes pour le décrire étant donnée son importance dans mes projets.

Des souris transgénique Tie2-lacZ gestantes de 16,5 jours sont utilisées. Cette lignée a été utilisée parce qu'elle est maintenue dans un fondement génétique de souris CD1 qui est une lignée bien caractérisée, stable génétiquement et facilement disponible. La lignée transgénique sera décrite dans la prochaine section. On a choisi de faire la chirurgie à 16,5 jours de gestation puisque les fœtus plus jeunes présentaient une trop grande fragilité de la trachée et les fœtus plus âgés, bien que leur trachée était plus robuste, se mettaient souvent à respirer, ce qui causait leurs décès une fois replacés dans l'utérus. Suite à l'injection intrapéritonéale de 3 µg de buprénorphine en guise d'analgésique, la souris est anesthésiée sous débit constant d'isoflurane. Afin de réduire les pertes de chaleur de l'animal pendant la chirurgie, la femelle est placée sur un coussin chauffant pendant tout le temps de l'opération. Puis, l'abdomen de la souris est rasé et aseptisé à l'aide d'iode et d'alcool 70%. Une laparotomie est effectuée, un champ stérile est installé autour de la coupure et une corne utérine est isolée et placée sur le champ stérile. Un fil de soie 6.0 est délicatement passé à travers l'utérus et les membranes amniotiques de façon à entourer la tête du fœtus. Cette opération est très importante car elle remplit diverses fonctions. La boucle formée limite la perte de liquide amniotique pendant la chirurgie, elle empêche le fœtus de sortir complètement de l'utérus et, comme nous allons le voir, elle est essentielle lors du retour du fœtus dans l'utérus pour refermer l'utérus. La tête et le cou du fœtus sont extériorisés suite à une petite hystérectomie et la bouche et le nez sont

immédiatement couverts par une gaze humidifiée dans du salin afin de prévenir le réflexe de respiration chez le fœtus et pour aider à garder la tête dans un état d'hyper extension. Le corps du fœtus est maintenu à l'intérieur de l'utérus en ajustant la boucle de fil de soie autour du cou. La trachée est exposée suite à une délicate dissection du cou du fœtus à l'aide d'un microscope stéréoscopique à un grossissement de 10X. Un fil de soie 6.0 est très délicatement glissé sous la trachée. À l'aide du fil de soie, la trachée est doucement soulevée puis occlue en utilisant une mini agrafe vasculaire (Horizon, Weck Closure System, RTP, NC). Le cou est soigneusement observé afin de s'assurer de la position correcte de l'agrafe et également qu'il n'y ait pas eu trop de dommage à la trachée ou aux vaisseaux du cou. Le fil sous la trachée est doucement retiré, la tête et le cou sont replacés dans l'utérus et à l'aide de la boucle qui avait été "cousu" autour de la tête, l'hystérectomie est refermée. Il est essentiel à cette étape d'éviter d'appuyer trop fortement sur la tête du fœtus. Le péritoine et la peau sont refermés séparément à l'aide d'un fil de vicryl 4.0. Du lactate de Ringer (0,5 mL) est injecté sous-cutané afin de réhydrater la femelle. Celle-ci est étroitement surveillée suite à l'opération. Un seul fœtus est opéré par portée. Il a déjà été tenté d'opérer plus d'un fœtus par portée, malheureusement cela augmente le temps de chirurgie et par le fait même le taux de mortalité. Les contrôles, aussi appelés placebo (sham), subissent exactement le même traitement chirurgical, exception faite de l'étape où la trachée est occlue.

Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale sous anesthésie par isoflurane après le temps voulu du traitement (de une heure à 24 heures) et les fœtus opérés sont sortis suite à une césarienne. À ce moment, trois critères sont utilisés pour vérifier si le fœtus est vivant: présence d'un battement cardiaque, la peau doit être d'une couleur rose et il doit y avoir présence de mouvements spontanés. Les trois critères doivent être positifs pour retenir l'échantillon pour de futures expériences. Les fœtus sont anesthésiés par hypothermie en les plaçant sur de la glace. Sous le stéréomicroscope, le fœtus subit ensuite une sternectomie médiane et les poumons sont excisés et préparés en fonction de l'expérience prévue pour celui-ci. Le sexe de chaque fœtus est déterminé par observations des gonades facilement identifiable sous stéréo-microscope.

### 2.3.1.1. Subtilités inhérentes à la chirurgie

Bien que le protocole ait été monté par essais et erreurs et qu'il fonctionne bien (taux de succès autour de 75%), nous travaillons avec un modèle *in vivo* alors chaque chirurgie est différente et certaines difficultés imprévues peuvent survenir. Cependant, il y a certaines difficultés qui reviennent régulièrement. En le sachant, on peut les prévoir et tenter de les contourner ou de les éviter.

La première difficulté est la position du fœtus. Il est très important d'en choisir un qui est placé face à l'expérimentateur. Cependant, il arrive régulièrement qu'il y en ait aucun qui soit placé convenablement. Dans ce cas, il est quand même possible de retourner délicatement le fœtus dans son enveloppe utérine. Cependant, il arrive que le fœtus qui ait été retourné reprenne sa position initiale pendant la chirurgie; si la tête a déjà été placée sous la gaze humide, le cou s'en trouvera contorsionné et la chirurgie sera impossible. Il est possible d'éviter tout cela en plaçant une pince hémostatique afin de stabiliser la position du fœtus.

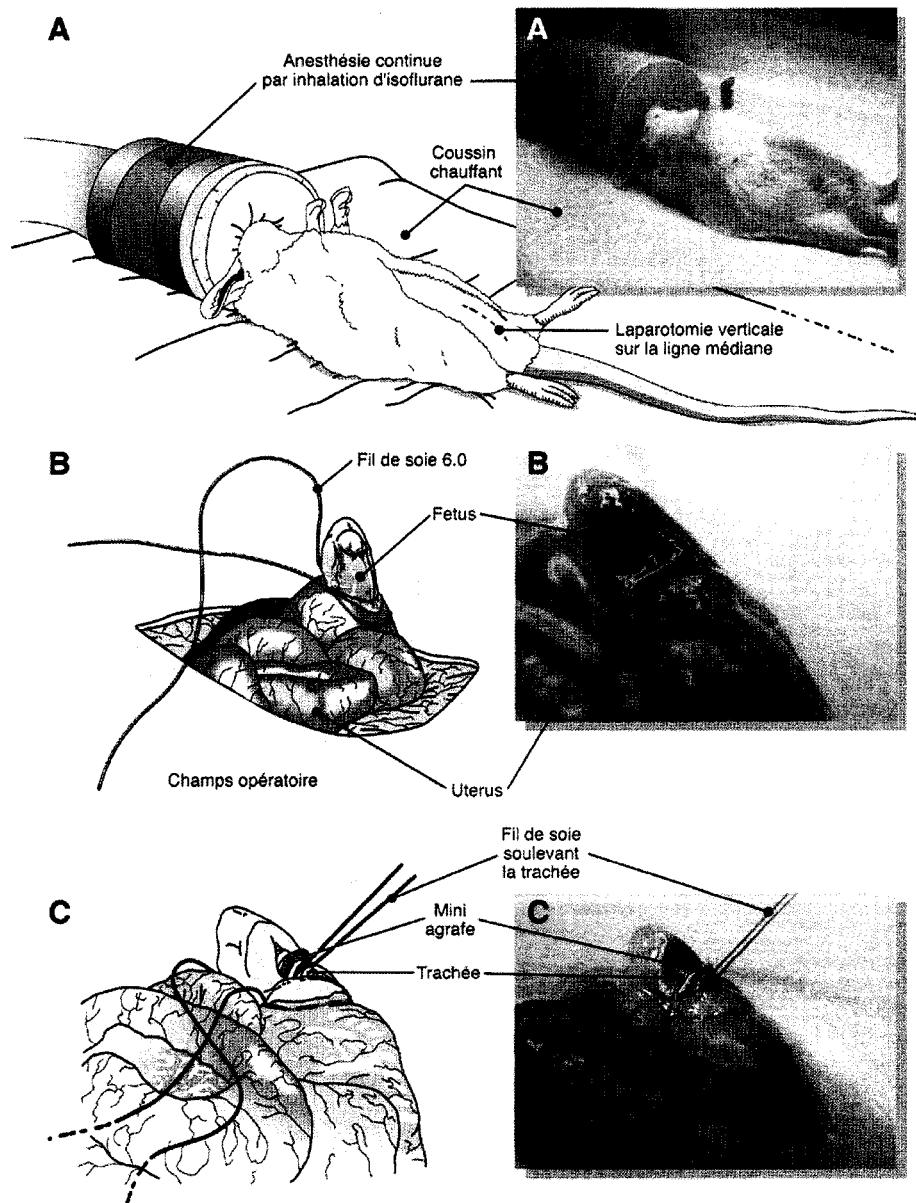
Ensuite, il est important de faire la boucle autour de la tête du fœtus ni trop grande ni trop petite. Si l'ouverture est trop grande, le fœtus aura tendance à sortir très rapidement de l'utérus, il sera ensuite impossible de le ramener à l'intérieur. Si l'ouverture est trop petite, la tête sera très difficile à ramener à l'intérieur; ceci peut faire en sorte qu'on doive appuyer trop fort sur la tête du fœtus et qu'on endommage des vaisseaux ou que l'utérus se déchire et qu'il soit impossible ensuite à fermer convenablement.

Les moments où l'expérimentateur se doit d'être concentré au maximum sont ceux où il dissecte le cou et où il occlut la trachée. Il faut être très précautionneux et patient afin de ne pas briser les vaisseaux lors du passage du fil sous la trachée. De plus, la pince utilisée pour la ligature est très grosse en comparaison à la trachée. Comme il faut tenir le fil d'une main et la pince de l'autre, il n'y a que peu de jeu, donc les tremblements doivent être complètement contrôlés. Si un vaisseau important ou trop de petits vaisseaux sont brisés lors de l'opération, il est fort probable que le fœtus ne survive pas. Dans ce cas, il

est préférable de ne pas perdre de temps et de retirer le fœtus et de refermer l'utérus afin d'opérer un autre fœtus dans la portée.

De plus, par expérience, on s'est rendu compte que lorsque l'on opère un fœtus prêt du col utérin (le premier sur le bord), il est fréquent que la mère avorte prématurément. Malheureusement, ce sont souvent ces fœtus qui sont les mieux placés pour la chirurgie. L'expérimentateur ne doit se laisser tenter par cette option qu'en dernier recours. De plus, si la chirurgie est trop longue, c'est-à-dire plus d'une heure, les probabilités que la femelle avorte prématurément sont plus grandes.

Finalement, lors des sacrifices, il est important de vérifier si l'occlusion est bien faite car il est plus aisé à ce moment de le vérifier que pendant la chirurgie alors que le fœtus est toujours vivant. Il faut aussi vérifier si la trachée n'est pas brisée en haut ou en bas de l'occlusion. Dans les cas où l'occlusion n'est pas convenable (l'agrafe n'est pas complètement fermée) ou que la trachée est brisée, il ne faut pas garder le poumon pour les études ultérieures.



**Figure 2.4 : Les principales étapes du protocole de chirurgie <sup>132</sup>.**

A) L'animal est sous analgésie, sous anesthésie continue et sur un coussin chauffant lorsqu'il subit une laparotomie verticale sur la ligne médiane. B) Un fil de soie est passé en boucle autour de la tête du fœtus. La tête est délicatement sortie de l'utérus C) La trachée est soulevée grâce à un fil de soie afin de ligaturer celle-ci à l'aide d'une agrafe.

### 2.3.2. Lignée murine Tie2-lacZ

L'utilisation d'un gène rapporteur peut permettre l'observation de patrons spatiaux d'expression de gènes en particulier dans un tissu, un embryon ou chez une souris adulte.

Le gène lac Z de *Escherichia coli*, lorsqu'intégré dans le génome de souris, peut être utilisé comme gène rapporteur lorsqu'inséré dans une cassette d'expression de transgène placée sous le contrôle d'un promoteur ou enhanceur donné. Le gène lac Z code pour la protéine  $\beta$ -galactosidase qui catalyse le clivage du lactose afin de former le galactose et le glucose. Cette activité catalytique peut être vérifiée *in vitro* et *in situ* lorsqu'on incube le tissu contenant les cellules porteuse du transgène avec le substrat X-gal. En effet, le clivage du substrat chromogène X-gal par la  $\beta$ -galactosidase mène à la production d'un colorant bleu insoluble, permettant l'identification des cellules possédant l'activité lac Z. Ces animaux transgénique peuvent être utilisés dans le but d'identifier des facteurs ou des conditions modulant le profile d'expression du promoteur ou de l'enhanceur.

Les souris transgéniques Tie2-lacZ ont été données par le docteur Martin Post du Hospital for Sick Children à Toronto, mais peuvent aussi être obtenues commercialement chez Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA, [www.jax.org](http://www.jax.org)). Chez ces souris transgéniques, la combinaison du promoteur de Tie2 avec un fragment intronique contenant un enhanceur spécifique aux cellules endothéliales permet de cibler l'expression du gène rapporteur spécifiquement et uniformément à toutes les cellules endothéliales vasculaires pendant l'embryogénèse et la vie adulte de la souris. Donc, la construction introduite dans le génome des cellules de souris, plus précisément sur le gène de Tie2, contient dans l'ordre 2.1 kilobases du promoteur murin Tie2, le gène rapporteur lac Z et finalement un fragment génomique allant jusqu'à 10 kilobases dans l'intron 1. Ces souris sont maintenues dans un contexte génétique de souris CD1. Ce modèle est le premier système d'expression génique *in vivo* permettant de cibler exclusivement les cellules endothéliales de l'entière vasculature. Donc, c'est pour le moment le moyen le plus efficace de vérifier l'effet de certaines conditions ou de certains gènes pendant des processus physiologiques ou pathologiques sur les cellules endothéliales *in vivo*.

### 2.3.3. Préparation des tissus

Les poumons doivent être préparés de telle sorte qu'ils soient fixés suffisamment pour obtenir un signal mais pas trop pour ne pas supprimer l'activité de l'enzyme. Vue leur

petite taille, les poumons de fœtus sont fixés pendant une heure à 4°C dans une solution de fixation (paraformaldéhyde 0,5%, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM EGTA et 0,1M Pipes pH 6,9). Les poumons sont ensuite déposés sur une couche d'O.C.T. (Tissue Tek) contenue par un moule cylindrique, qui est lui même placé sur de la glace sèche. Le poumon est ensuite recouvert d'O.C.T. et conservé à -80°C jusqu'à la coupe. Il faut faire attention lors du dépôt du poumon sur l'O.C.T. pour qu'il soit bien à plat afin d'éviter les repliements. Les poumons sont ensuite coupés de façon sériée (4 coupes consécutives) à 6 µm.

#### **2.3.4. Coloration des tissus**

Les sections congelés doivent d'abord être rapidement dégelées à l'aide d'un séchoir (air froid). Les lames sont ensuite plongées dans la solution de fixation pour 15 minutes sur la glace (solution de fixation : paraformaldéhyde 2%, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EGTA et 0,1 M Pipes pH 7,4). Pendant la fixation, il faut faire réchauffer la solution de coloration à 37°C (0,1 M tampon phosphate pH 7,4, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% sodium déoxycholate, 0,02% IGEPAL, 5 mM potassium ferricyanide, 5 mM potassium ferrocyanide, 1 mg/ml X-gal). Suite à la fixation nous procédons à deux lavages de dix minutes dans un tampon PBS 1X contenant 2 mM MgCl<sub>2</sub> sur la glace. Puis, nous effectuons trois trempages dans la solution détergente sur la glace (0,1 M tampon phosphate pH 7,4, 0,2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% sodium déoxycholate, 0,2 % IGEPAL). Les lames sont incubées à 37°C dans la solution de coloration au X-gal dans le noir (dans le four à incubation) pendant la nuit. Certains échantillons peuvent demander jusqu'à 20 heures mais d'autres un peu moins alors il est préférable de commencer la coloration en fin de journée pour pouvoir suivre la progression le lendemain. Suite à la coloration au X-gal, les lames sont trempées dans deux bains d'eau, puis trempées dans une solution d'orange G pour 1 minutes. Les lames sont trempées dans trois bains consécutifs d'eau pour 5 minutes chacun. Les lames sont ensuite déshydratées dans un gradient d'éthanol, puis dans 2 bains de xylènes. Des lamelles sont montées sur les lames à l'aide de permount (Fisher Scientific, Fairlawn, NJ, USA). Des poumons de souris CD1 non-transgéniques peuvent servir de contrôle négatif.

### **2.3.5. Immunohistochimie pour CD-31 (Pecam-1)**

Suite aux problèmes encourus par la coloration des poumons de souris transgéniques Tie2-lacZ, une immunohistochimie contre la protéine CD-31 (Pecam-1) a été effectuée afin d'évaluer le développement des vaisseaux sanguins des poumons ligaturés et placebos aux temps 1h, 3h, 6h et 24h. Pecam-1 est une protéine de surface largement utilisée comme marqueur spécifique de cellules endothéliales<sup>133</sup>.

La technique utilisée est semblable à celle présentée dans la première partie (voir section 2.2.7). La dilution de l'anticorps primaire anti-Pecam-1 utilisée est de 1:100 (BD PharMingen, rat polyclonal anti-mouse antibody, Mississauga, ON, Canada) et celle de l'anticorps secondaire anti-rat IgG est de 1:200 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Ca, USA). Cependant, l'immunohistochimie a été effectuée sur des coupes de poumons congelées enrobées dans l'O.C.T. et aucune technique d'amplification du signal n'a été utilisée (TSA™ biotin system kit ou citrate de sodium chaud), ce qui a entraîné certaines modifications au protocole. Il n'y a eu aucune étape de déparaffinisation et réhydratation d'effectuée. Les coupes ont plutôt été dégelées et séchées au séchoir à l'air frais puis fixées par immersion dans une solution de 4 % paraformaldéhyde. Les étapes subséquentes sont les mêmes (mis à part celles d'amplification).

Une analyse semi-quantitative semblable à celle décrite à l'étape 2.2.7 a été effectuée dans le but d'évaluer le développement du réseau vasculaire, plus particulièrement du réseau de capillaires. Les quantités de segments sous-épithéliaux, de capillaires isolés, de connections inter-capillaires et la présence de capillaires dans les septa étaient évaluées sur une échelle allant de Ø à ++++. L'investigateur ignorait le numéro et le groupe de l'échantillon. De plus, les analyses ont été faites en duplicata.

#### **2.3.5.1. Analyses statistiques pour l'immunohistochimie Pecam-1**

Les différences au niveau du marquage immunohistochimique ont d'abord été vérifiées à l'aide du test non-paramétrique Kruskal-Wallis pour chaque facteur considéré ( $\alpha = 0.05$ ).

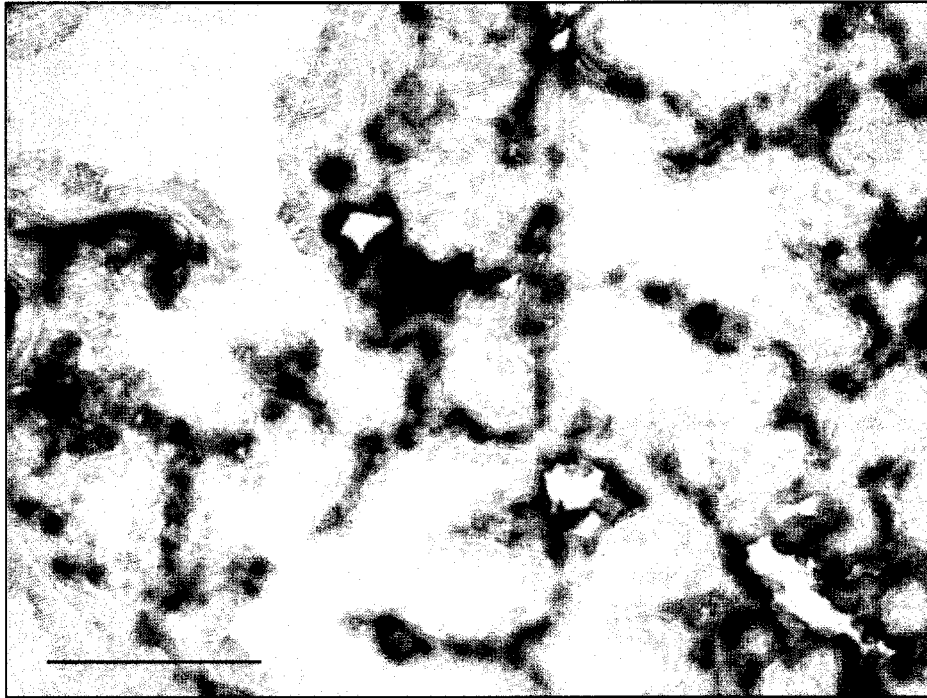


Pour les facteurs présentant des données significativement différentes, les données des deux groupes expérimentaux à chaque temps (ligaturé 1 heure comparé à placebo 1 heure, et ainsi de suite), ont été comparées à l'aide du test non-paramétrique Mann-Whitney U. Les résultats de ces tests sont des tied p-values, c'est-à-dire que la valeur significative acceptée est  $\alpha < 0,1$ .

## **2.4. Résultats de la deuxième partie**

### **2.4.1. Résultat de la coloration**

Cette étude repose principalement sur des observations qualitatives. La coloration des poumons de souris Tie2-lacZ donne un signal bleu foncé spécifique aux cellules endothéliales. Il est possible de voir les grandes artères qui sont d'une teinte bleu foncé. Il est également possible de distinguer les plus petits vaisseaux comme les capillaires en juxtaposition avec les cellules épithéliales alvéolaires. Il est très intéressant de remarquer que tout espace aérien est accompagné de vaisseaux (voir figure 2.5). Le protocole de coloration des poumons de souris lac Z est donc au point et peut servir de marqueur des cellules endothéliales. Cependant, certaines difficultés nous ont empêchées d'exploiter cet outil à fond. Ces difficultés seront discutées plus tard.



**Figure 2.5 : coloration de poumons fœtaux (17,5 jours) de souris de la lignée transgénique Tie2-lacZ**

#### **2.4.2. Résultats de l'immunohistochimie pour CD-31**

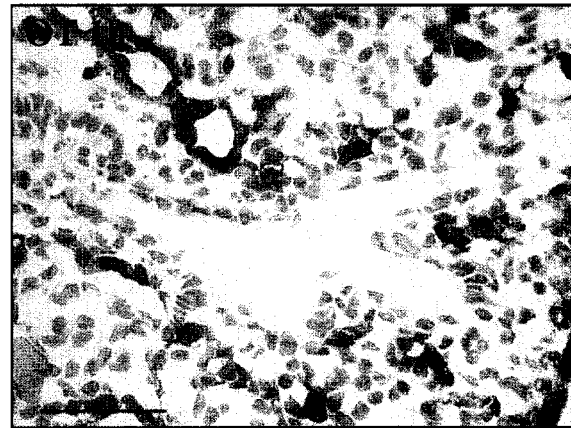
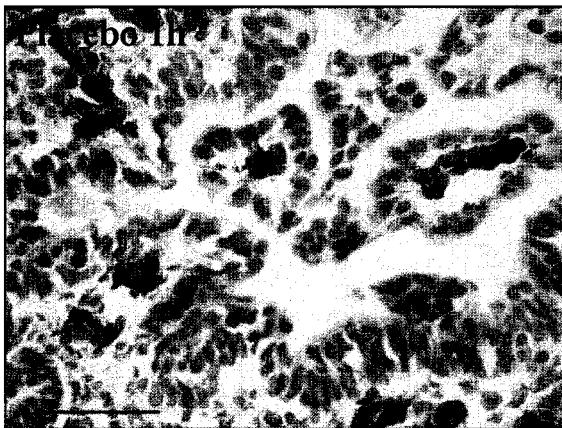
Bien qu'une analyse semi-quantitative ne puisse être aussi précise que l'analyse d'une hybridation *in situ* par exemple, elle permet malgré tout de faire des comparaisons du signal pour les différentes structures étudiées. L'analyse semi-quantitative peut être un outil d'autant plus intéressant lorsque couplée à une méthode statistique aussi stringente que celle utilisée ici.

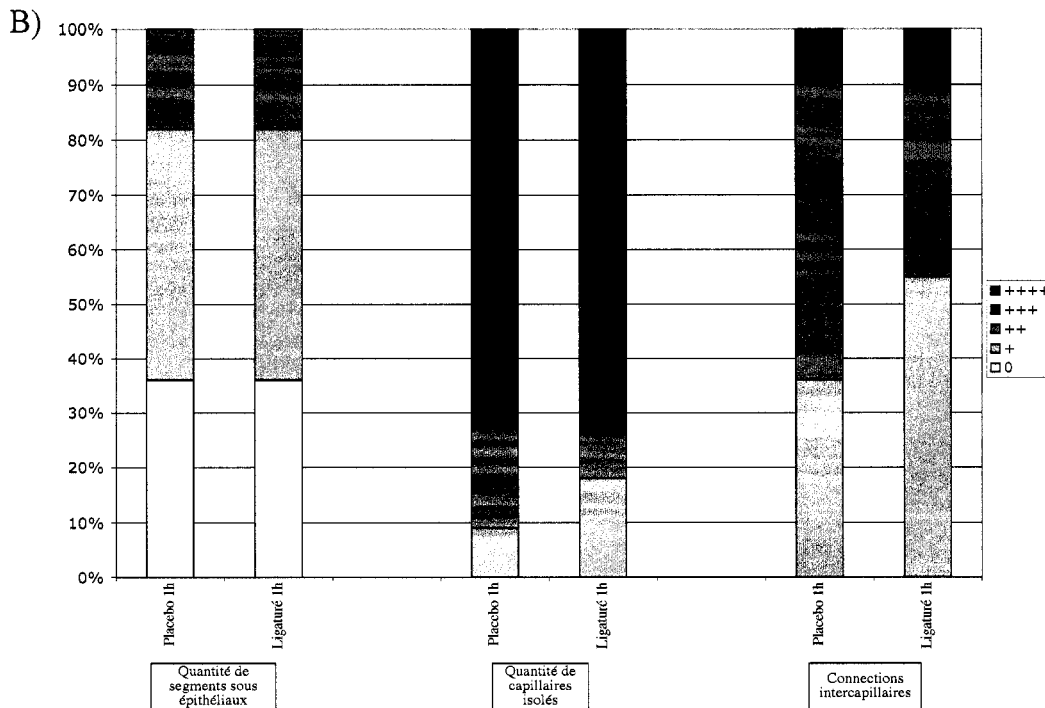
En général, le marquage ressemble à celui obtenu par la coloration des poumons de souris transgéniques Tie2-lacZ, mais il semble plus constant, plus spécifique et il y a moins de bruit de fond. La technique peut donc bien être utilisée pour marquer les cellules endothéliales.

Les figures 2.6, 2.7, 2.8 et 2.9 montrent les résultats de l'analyse semi-quantitative de l'immunohistochimie contre la protéine Pecam-1 à une heure, trois heures, six heures et 24 heures de traitements (ligation ou placebo).

Les poumons à 1, 3 et 6 heures de traitement ne possèdent pas ou peu d'alvéoles. Par conséquent, la micro-vasculature associée aux alvéoles n'est pas très développée chez ces poumons. La quantification a quand même été faite pour ces échantillons. À une heure de traitement, il n'existe aucune différence significative pour chacun des sous-compartiments étudiés. Pour ces poumons, Pecam-1 (coloration brune) est détecté principalement autour des voies aériennes principales où les cellules endothéliales sont impliquées dans la formation des veines et des artères. Le marquage est également présent chez les rares capillaires isolés. Peu de capillaires sont juxtaposés aux cellules épithéliales, les segments de capillaires sont courts et ont peu d'interconnections.

A)



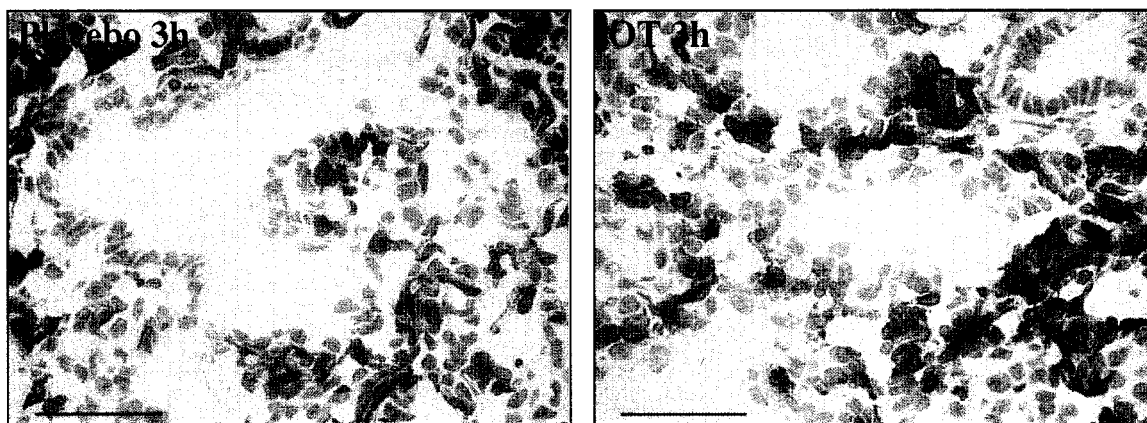


**Figure 2.6 : Immunohistochimie contre Pecam-1 pour les poumons 1 heure**

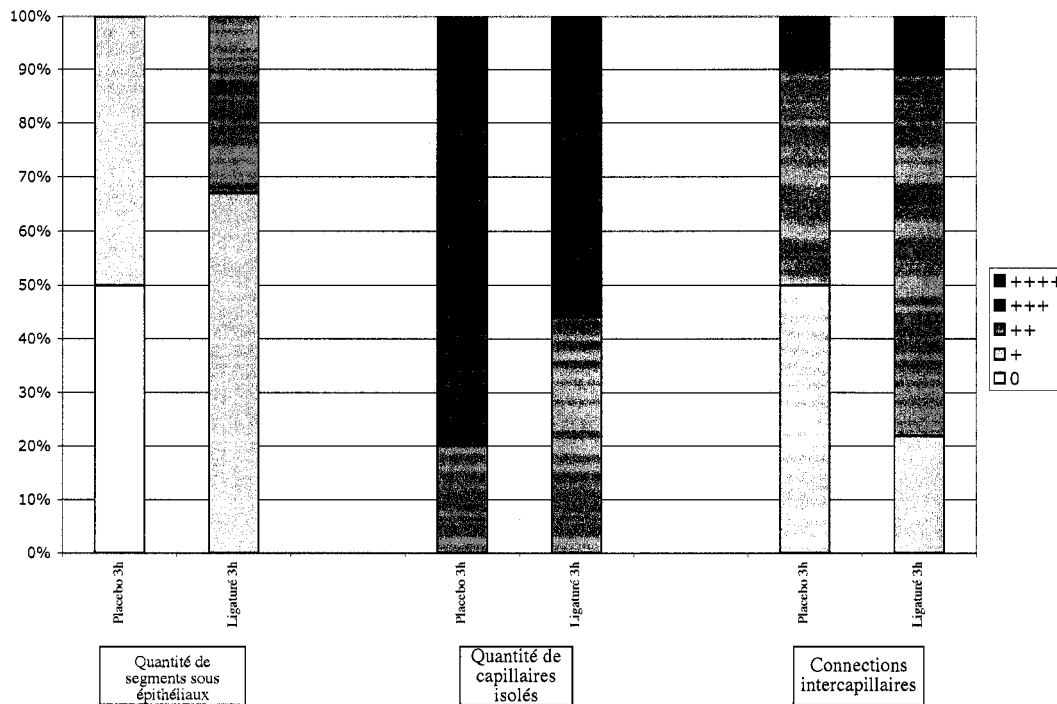
A) Photomicrographie du marquage de Pecam-1 sur les poumons placebo et OT 1 heure (400 X). Le signal positif apparaît brun. Échelle, 40  $\mu\text{m}$ . B) Évaluation semi-quantitative du signal positif. Les résultats sont présentés comme le pointage moyen obtenu pour chaque groupe pour chaque sous-compartiment évalué.

À 3 heures de traitement, il n'y a toujours pas de septation secondaire. Par conséquent, le développement des capillaires est toujours sommaire. Les segments de capillaires sont encore relativement courts et manquent d'interconnexions.

A)



B)

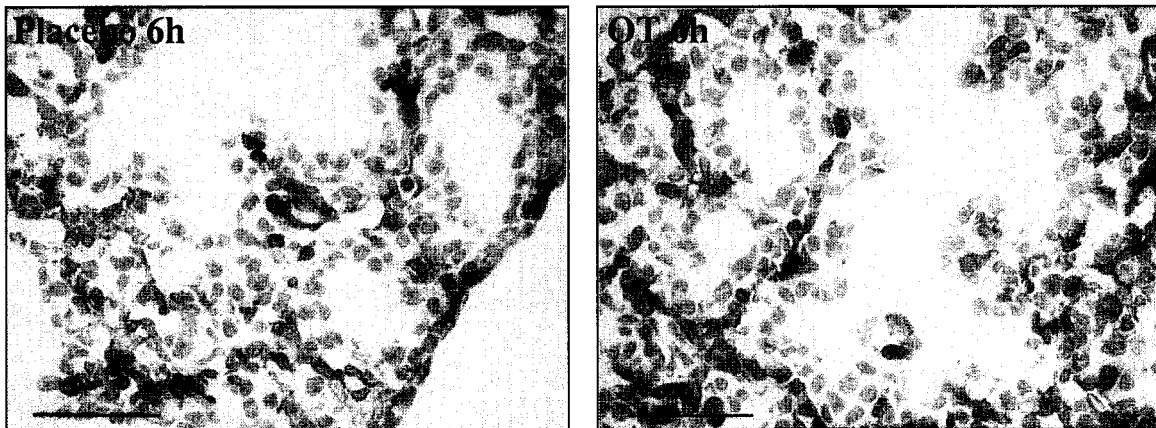


**Figure 2.7 : Immunohistochimie contre Pecam-1 pour les poumons 3 heures**

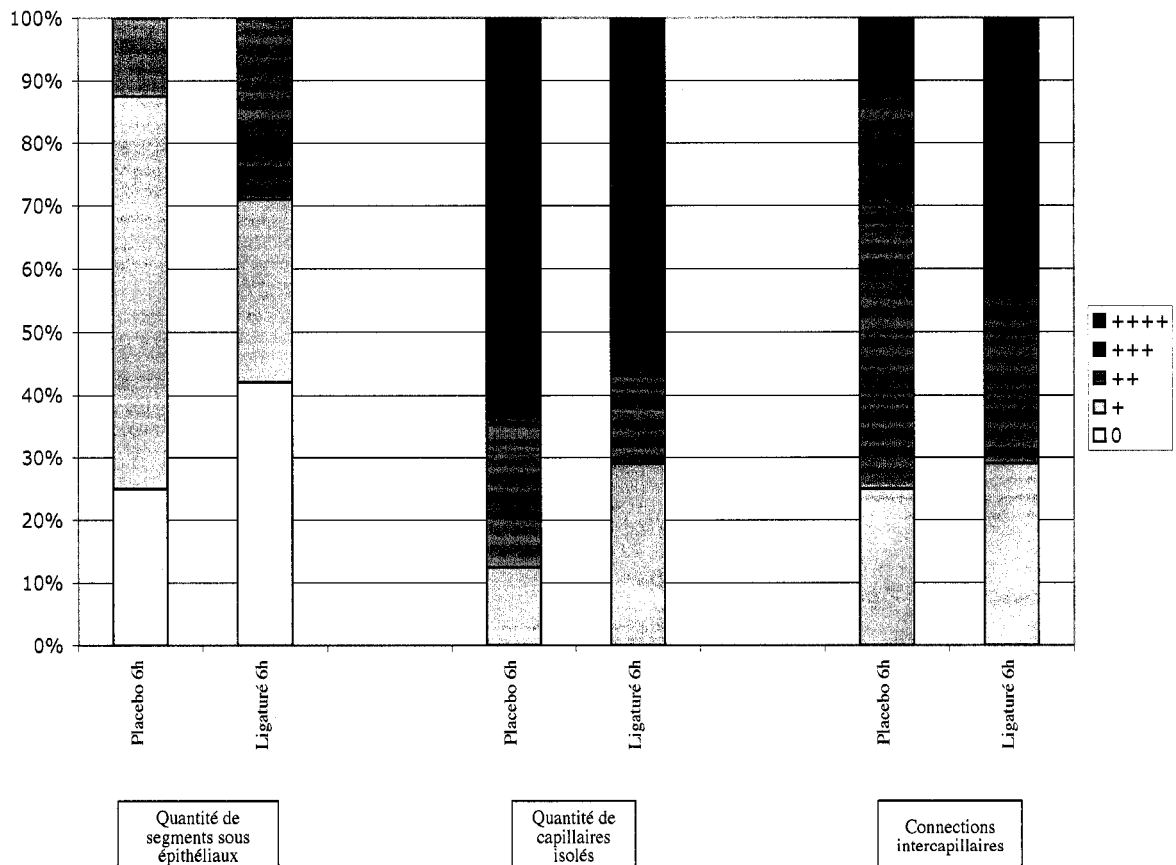
A) Photomicrographie du marquage de Pecam-1 sur les poumons placebo et OT 3 heures (400 X). Le signal positif apparaît brun. Échelle, 40  $\mu\text{m}$ . B) Évaluation semi-quantitative du signal positif. Les résultats sont présentés comme le pointage moyen obtenu pour chaque groupe pour chaque sous-compartiment évalué.

À 6 heures de traitement, bien qu'il n'y ait toujours pas d'alvéoles, le développement des capillaires est plus développé. Il y a beaucoup moins de capillaires isolés, les segments sont plus longs et il existe de nombreuses connexions. Ces observations impliquent la formation d'un réseau de capillaires.

A)



B)

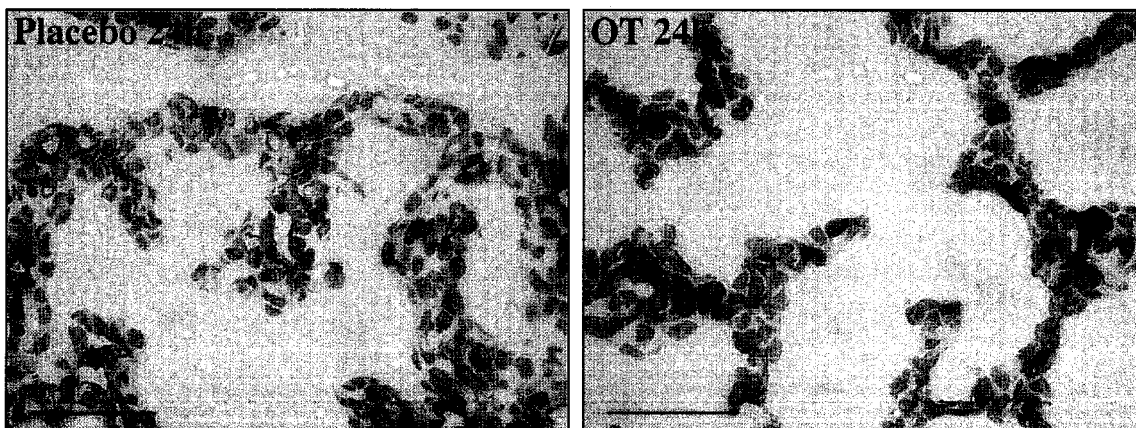


**Figure 2.8 : Immunohistochimie contre Pecam-1 pour les poumons 6 heures**

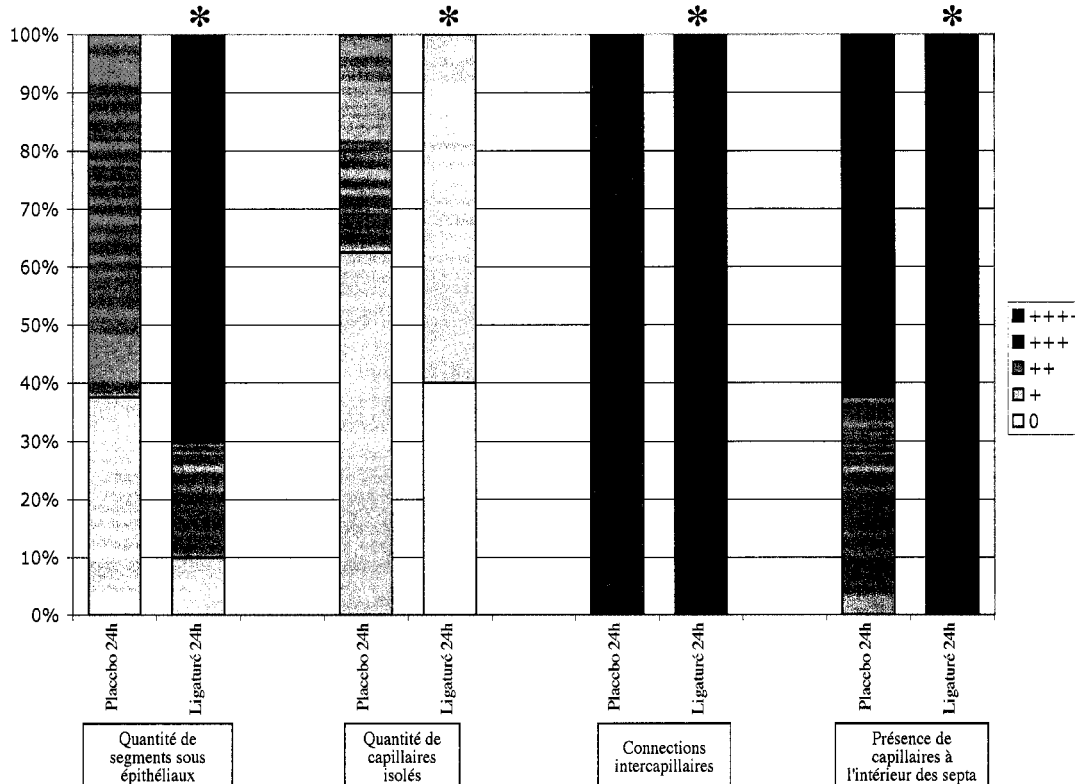
A) Photomicrographie du marquage de Pecam-1 sur les poumons placebo et OT 6 heures (400 X). Le signal positif apparaît brun. Échelle, 40  $\mu$ m. B) Évaluation semi-quantitative du signal positif. Les résultats sont présentés comme le pointage moyen obtenu pour chaque groupe pour chaque sous-compartiment évalué.

À 24 heures de traitement (sacrifice à 17 jours et demi), le poumon est beaucoup plus développé, particulièrement chez les poumons ligaturés. Le marquage des cellules endothéliales par l'immunohistochimie contre Pecam-1 permet de voir que le développement du réseau de capillaires suit celui des alvéoles. Un marquage étendu est noté à l'intérieur des septa primaires et secondaires. Les interconnexions sont multiples et les capillaires à l'intérieur des septa et des alvéoles sont fréquemment juxtaposés aux cellules épithéliales. Des différences significatives ( $p < 0,1$ ) ont été détectées dans tous les sous-compartiments étudiés. En effet, les poumons ligaturés possèdent plus de segments sous-épithéliaux, moins de capillaires isolés, plus de connections inter-capillaires et le réseaux de capillaires à l'intérieur des septa est mieux étendu. De plus, chez les poumons du groupe OT, les septa semblent être matures et contenir un réseau de capillaire simple contrairement aux poumons du groupe placebo. Par contre, les bourgeons primitifs des deux groupes semblent encore contenir un réseau de capillaires double. Ce qui distingue les bourgeons des poumons ligaturés, c'est que le bout du septum semble toujours être constitué de cellules endothéliales; comme si le capillaire avait en quelque sorte percé l'épithélium pour forcer le bourgeon à prendre de l'expansion.

A)



B)



**Figure 2.9 : Immunohistochimie contre Pecam-1 pour les poumons 24 heures**  
 A) Photomicrographie du marquage de Pecam-1 sur les poumons placebo et OT 24 heures (400 X). Le signal positif apparaît brun. Échelle, 40  $\mu$ m. B) Évaluation semi-quantitative du signal positif. Les résultats sont présentés comme le pointage moyen obtenu pour chaque groupe pour chaque sous-compartiment évalué. \*  $p < 0,1$  versus poumons placebo.

## 2.5. Méthodologie de la troisième partie

Cette partie a pour but de répondre au troisième objectif qui était l'étude de l'expression de l'ARNm des acteurs importants de l'angiogenèse dans notre modèle murin d'OT. Ces acteurs ont été décrits dans l'introduction du présent ouvrage à la section 1.2.5. Cette étude permet de compléter les résultats de la deuxième partie et d'obtenir un portrait de la réponse angiogénique à l'OT. Cette étape consiste principalement à faire du PCR quantitatif pour des échantillons de poumons de souris ayant subi une OT ou un traitement placebo (sham). Cependant, avant de pouvoir faire les amplifications, certaines étapes doivent être effectuées.



### 2.5.1. Extraction d'ARN

Pour l'extraction d'ARN, nous avons choisi d'utiliser la méthode de chomczynski<sup>39</sup> car par expérience, nous croyons obtenir moins de contamination d'ADN avec cette technique. Nous avons combiné trois poumons par échantillons afin de s'assurer d'obtenir une quantité suffisante d'ARN. Aux trois poumons sont ajoutés 500 µl de guanidine isothiocyanate + β-mercaptoéthanol + sarkosyl. Au départ, une solution est faite fraîche où l'on ajoute 35 µl de β-mercaptoéthanol et 250 µl de sarkosyl 10% à 5 ml de guanidine 4M. Les poumons sont ensuite homogénéisés à l'aide d'un homogénéisateur de type douce (verre). À l'homogénat sont ajoutés 50 µl d'acétate de sodium 2 molaire à pH 4 et le tout est mélangé par inversion. Dans le but de séparer les protéines du mélange, 500 µl de phénol à pH 4,2 est ajouté et le tout est mélangé par inversion. Le pH acide assure la stabilité de l'ARN. Puis, 220 µl de chloroforme isoamyl alcool (24:1) sont ajoutés, le tout est vortexé, laissé 15 minutes sur la glace puis centrifugé 15 minutes à 4°C. À cette étape, l'ARN se retrouve dans la phase aqueuse (la phase supérieure) qui est prélevée et à laquelle est ajouté un volume d'isopropanol afin de faire précipiter l'ARN. Le mélange est déposé 30 minutes à -20 °C puis centrifugé 15 minutes à 4 °C à 12000 tours par minute. Le culot est resuspendu dans 300 µl de la solution de guanidine isothiocyanate + β-mercaptoéthanol + sarkosyl. L'ARN est de nouveau précipité avec un volume égal d'isopropanol (300 µl). Encore une fois, les échantillons sont incubés à -20 °C pendant 30 minutes puis centrifugés 15 minutes à 4 °C à 12000 tours par minute. Le culot est lavé à l'aide d'éthanol 75% afin d'enlever tout résidu d'isothiocyanate et centrifugé à 4 °C pendant 15 minutes à 12000 tours par minutes. Le culot est séché puis resuspendu dans 20 µl d'eau traitée au diéthylpyrocarbonate. Ce traitement de l'eau contribue à éliminer les ribonucléases, des enzymes dégradant l'ARN. L'ARN doit être conservé à -80 °C. Les échantillons sont déposés sur gel d'agarose afin de vérifier l'intégrité de l'ARN.

### **2.5.2. Dosage de l'ARN**

Le dosage de l'ARN est une étape très simple mais très importante car nous devons avoir exactement les mêmes concentrations d'ARN car nous devons affirmer que l'efficacité de la réaction de reverse transcriptase est la même pour chaque échantillon. Cette étape est donc la première étape de normalisation. Elle consiste tout simplement à mesurer la densité optique de nos échantillons à 260 nm. Donc, on ajoute un volume de 2  $\mu\text{l}$  d'ARN ayant été extrait à 500  $\mu\text{l}$  d'eau. On utilise un facteur de correction pour ramener la valeur de densité optique à une concentrations d'ARN par  $\mu\text{l}$ . Finalement, les échantillons sont tous dilués afin d'obtenir une concentration finale d'ARN de 1  $\mu\text{g}$  par  $\mu\text{l}$ .

### **2.5.3. Réaction de transcriptase réverse avec hexamères aléatoires pour faire cDNA**

Cette étape a pour but de synthétiser de l'ADN complémentaire à partir de l'ARN extrait, purifié et dosé. La méthode choisie est celle où l'amorce est un mélange aléatoire d'hexamères, l'autre option étant celle où les amorces sont des oligomères de désoxythymidine, ou oligos dT. La raison de ce choix est que nous voulions obtenir l'ADN complémentaire le plus long possible, ou à tout le moins, nous voulions nous assurer que chaque section de chaque gène soit représenté dans la population d'ADN complémentaire. En utilisant les oligos dT, nous aurions obtenu des fragments d'ADN complémentaires ayant toujours la partie 3' de l'ARNm et dont la longueur dépend de la processivité de l'enzyme polymérase, c'est-à-dire en général autour de 700 bases. De cette façon, les séquences complètes des gènes n'auraient pas été représentées, en particulier pour les gènes présentant de longues séquences. Dans le but d'obtenir de grandes quantité d'ADN complémentaire, en vue de faire un grand nombre de réaction de PCR quantitatif, nous avons quadruplé la recette de base. Ainsi, pour chaque échantillon, la réaction contenait 6,4  $\mu\text{l}$  du mélange aléatoire d'hexamères, 4  $\mu\text{l}$  de désoxynucléotides à une concentration de 10 mM (comprenant des dATP, dGTP, dCTP et des dTTP), 33,6  $\mu\text{l}$  d'eau stérile et 4  $\mu\text{l}$  de l'ARN extrait et dilué à une concentration de 1  $\mu\text{g}$  par  $\mu\text{l}$ . Les échantillons sont dénaturés à 65 °C pendant 5 minutes, puis rapidement replacés sur la glace. Puis on ajoute à chacun des échantillons le tampon d'enzyme 5X de la superscript

(16  $\mu$ l), du dithiothréitol (DTT) à une concentration de 0,1 molaire (8  $\mu$ l) et un inhibiteur de ribonucléase (4  $\mu$ l). Dans une machine servant à faire des amplifications par des réactions de polymérisation en chaîne, les échantillons sont incubés à 25 °C pendant 10 minutes puis à 42°C pendant 2 minutes. Pendant cette incubation à 42 °C, on ajoute à chacun des échantillons 4  $\mu$ l (800 unités) de l'enzyme faisant la réaction de polymérisation, la Superscript™ II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA). Puis, la polymérisation se poursuit à 42 °C pendant 50 minutes. Suit une dernière étape de dénaturation à 70 °C pendant 15 minutes. Par la suite les échantillons peuvent être conservés à -20 °C.

#### **2.5.4. Dilution des échantillons**

Cette étape est très simple mais doit être effectuée avec beaucoup de précision. En effet, de la précision de ces dilutions dépend la reproductibilité des résultats et la comparaison des échantillons, et donc, de la qualité des résultats. Ainsi, les échantillons sont dilués en différentes concentrations : 1:2, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:1000, 1:5000. La concentration de l'ADN gabarit utilisée pour une ronde d'amplification en temps réel est dépendante des oligos choisis et de l'expression du gène. Certains tests doivent donc être effectués avant de faire une amplification complète avec une paire d'oligos.

#### **2.5.5. Courbe standard**

La première étape pour tester l'amplification d'un gène est de faire une amplification avec une courbe standard comme gabarit. En effet, une courbe standard a été préparée à partir d'ARN extrait de poumons de souris contrôles. Les souris contrôles sont en fait des souris n'ayant pas subi de chirurgie mais provenant des mêmes portées que les souris ayant subi les chirurgies. La courbe standard provient donc de poumons contrôles ayant été récoltés à tous les temps expérimentaux. Donc, à partir de cet ARN, des réactions de transcriptases réverses ont été effectuées comme décrit à la section 2.5.3. Puis, des dilutions ont été effectuées : 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500 et 1:1000.

Comme nous avons choisi d'utiliser une quantification relative, nous ramèneront les résultats obtenus en fonction de l'amplification de la courbe standard.

Ainsi, le meilleur moyen de tester une paire d'oligomères pour l'amplification d'un gène est de faire l'amplification avec la courbe standard comme ADN gabarit. D'abord, cela nous permet de vérifier si l'amplification est constante, puis de voir quel dilution de l'ADN gabarit devra être utilisée pour l'amplification. En effet, nous privilégions la dilution du gabarit où la courbe d'amplification croise le seuil (threshold) pendant sa phase linéaire.

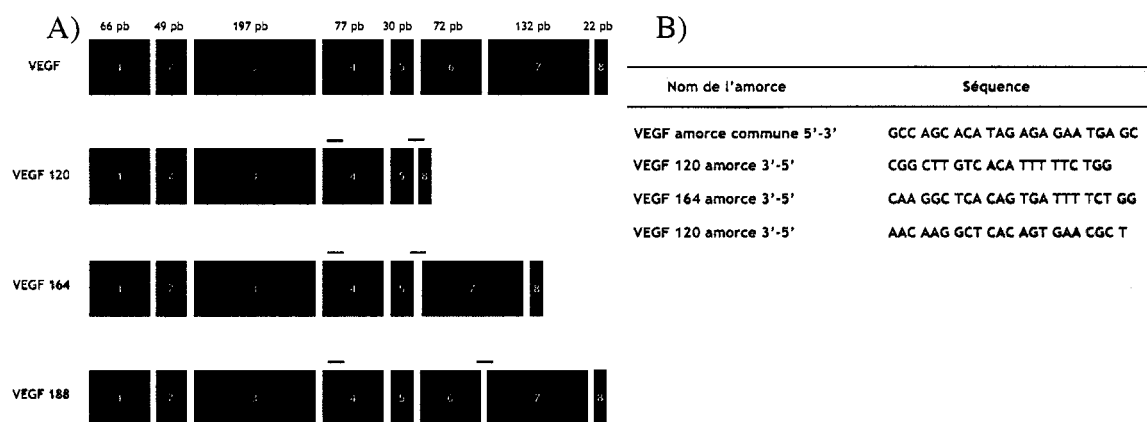
### **2.5.6. Choix des oligomères servant d'amorce**

La séquence du gène est préalablement obtenue sur les bases de données disponibles gratuitement sur l'internet. Certaines règles de base doivent être suivies pour le choix des oligomères pour des amplifications PCR en temps réel. Les oligomères qui serviront d'amorces doivent avoir idéalement entre 17 et 21 paires de bases. De plus, le contenu en guanine et en cytosine (au total) doit se trouver entre 30 et 80 %. Il est préférable d'éviter les suites de nucléotides identiques, surtout pour les guanines. Les suites de 4 guanines ou plus sont à proscrire. Les cinq nucléotides au bout 3' de l'oligomère ne devrait pas contenir plus de deux guanines et ou cytosine. De plus, il est important de choisir un amplicon dont la température de dénaturation se situe entre 58 et 60 °C. Finalement, en respectant ces paramètres, on choisi une région à amplifier de 125 à 175 bases.

#### **2.5.6.1. Choix des oligomères pour les isoformes de VEGF**

Nous avons vu plus tôt que les différents isoformes de VEGF sont produits par épissage alternatif d'un transcrit primaire provenant d'un seul gène de VEGF et que ces différents isoformes (120, 164 et 188 chez la souris) ont des activités biologiques et des niveaux d'expression distincts dans différents tissus ou dans un même tissu à différents stades du développement, allant de l'embryon jusqu'à l'adulte. Ainsi, nous avons dû choisir des oligomères permettant de distinguer les différents isoformes de VEGF. Heureusement, le

code génétique murin du gène de VEGF est très bien connu et nous connaissons les sites d'épissages et les jonctions exons-exons. Tout d'abord, une amorce commune a été choisie en se basant sur le fait que tous les isoformes de VEGF partagent les exons 1 à 5 (sur 8). Ainsi, l'amorce commune direction 5'-3' a été placée sur l'exon 4. Puis, les différentes amorces 3'-5' ont été conçues afin d'amplifier chacun des variants de façon spécifique (Figure 2.10). Malheureusement, comme on peut le voir avec la séquence des amorces choisies, les règles à suivre dans le choix des oligomères n'ont pu être suivies. Cependant, les amplifications ont quand même bien fonctionné.



**Figure 2.10 : Représentation schématique des isoformes majeurs de VEGF et l'emplacement des amorces pour le PCR quantitatif ainsi que leur séquence**

- A) Le gène de mammifère de VEGF est composé de 8 exons et l'épissage alternatif de ces exons donne lieu à au moins 3 isoformes d'ARNm. Les courtes lignes noires indiquent la localisation des amorces permettant l'amplification spécifique des isoformes par PCR quantitatif B) La séquence de chacune des amorces utilisées pour le PCR quantitatif.

### 2.5.6.2. Choix des oligomères pour les autres gènes

Pour la sélection des amorces des autres gènes (FLK-1, FLT-1, angiopoïétines 1 et 2, TIE2), nous avons utilisé un outil informatique spécialement conçu à cette fin : Primer Express™ (Applied Biosystems, Foster city, Ca, USA). Donc en suivant les règles énoncées plus haut, et à partir de la séquence du gène que nous lui fournissons, le logiciel propose une liste de combinaison d'amorces pour l'amplification du gène en question. Les oligomères sélectionnés (tableau 2.2) sont synthétisés grâce à un service offert par le

centre de recherche du CHUL. Les oligomères sont resuspendus, dosés puis dilués à 10  $\mu\text{M}$ .

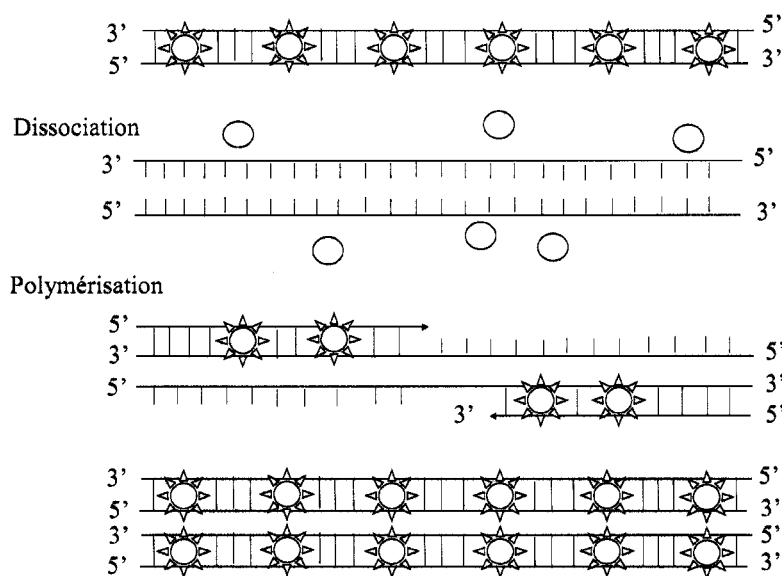
**Tableau 2.2 : Séquence des amorces pour l'amplification au PCR quantitatif des récepteurs de VEGF (FLT-1, FLK-1, les angiopoïétines1 et 2 et TIE 2)**

Nom de l'amorce	Séquence
FLK-1 5'-3'	GCC AAC TGA GCA GGA GAG TGT
FLK-1 3'-5'	GGA CCG ATG TTG CCT GTG A
FLT-1 5'-3'	CAA CAC CTC CGT GCA TGT G
FLT-1 3'-5'	GAC AGC CGA TAG GAC CGT CTT
Angiopoïétine 1 5'-3'	GGA TTC AAC ATG GGC AAT GTG
Angiopoïétine 1 3'-5'	TTG CAG AGC GTT GGT GTT GT
Angiopoïétine 2 5'-3'	TTT AGC ACA AAG GAT TCG GAC AA
Angiopoïétine 2 3'-5'	TTC AAG TTG GAA GGA CCA CAT G
TIE 2 5'-3'	TCA GGT GCC ACT GTA CCA ATG
TIE 2 3'-5'	TGG CCT GCC TTC TTT CTC A

### 2.5.7. PCR quantitatif

Ainsi, la méthode que nous avons choisie pour évaluer les niveaux d'ARNm des gènes nous intéressant, est le PCR quantitatif. Les principaux avantages de cette technique sont sa sensibilité et qu'elle permet la détection automatique des produits PCR à travers le processus d'amplification. Étant donné le grand nombre de gènes à évaluer, nous avons choisi d'utiliser le SYBR<sup>®</sup> Green pour la détection du produit. Le SYBR<sup>®</sup> Green est un colorant se liant à l'ADN double-brin de façon hautement spécifique (Figure 2.11). Cependant, cette qualité du SYBR<sup>®</sup> Green peut être considérée comme un défaut. En effet, ce produit détecte tous l'ADN double-brin, incluant les produits non-spécifique. Le SYBR<sup>®</sup> Green possède l'avantage d'être vendu dans un mélange comprenant tous les produits nécessaires à l'élongation, exceptés les amorces et l'ADN gabarit. La méthode de quantification choisie est l'utilisation d'une courbe standard relative. Dans ce cas, les quantités des échantillons sont exprimées à partir de la courbe standard et divisées par les quantités obtenues pour un gène calibrateur (ARN ribosomal 18s). Ainsi, tout ce qui est nécessaire de savoir pour les standards est leur dilution. Ce qui veut dire que n'importe

quel ADN stock contenant la séquence cible peut être utilisé pour préparer les standards. Cependant les dilutions des standards doit être effectuées de façon exactes. Des valeurs relatives sont données à chaque dilutions : 0,5 pour la dilution 1:1, 0,2 pour la dilution 1:4, et ainsi de suite. En utilisant le même stock d'ADN pour la courbe standard, les différentes amplifications peuvent être comparées entre elles. Cependant, comme il a déjà été mentionné plus haut, nous devons assumer que l'efficacité de la réaction de transcriptase inverse est la même pour chaque échantillon lors de la synthèse de l'ADN complémentaire à partir de l'ARN. Pour la normalisation avec le calibrateur, une courbe standard est préparée pour chacune des amplification. Ainsi, pour chaque échantillon, la quantité relative de la cible est déterminée à partir de la courbe appropriée. Finalement, la quantité relative du gène cible pour un échantillon est divisée par la quantité obtenue pour le même échantillon pour le gène calibrateur.



### Figure 2.11 : Évolution de la fluorescence du SYBR<sup>®</sup> Green lors de la réaction de polymérisation

Le SYBR<sup>®</sup> Green est un colorant très spécifique se liant au petit sillon de l'ADN permettant de détecter tout ADN double-brin dans la réaction.

Pour les expériences effectuées, nous avons 12 groupes d'échantillons : 2 traitements (ligaturé et placebo), 2 sexes et 3 temps expérimentaux (1, 3 et 24 heures). Pour l'extraction d'ARN, 3 poumons ont été groupés pour chaque groupe expérimental et la méthode de Chomczynski a été utilisée<sup>39</sup>. Les concentrations obtenues se sont situées

entre 1,5 à 5 µg par µL dans un total de 50 µL (75 à 250 µg au total). Les échantillons ont été dilués le plus précisément possible pour avoir une concentration finale de 1 µg par µL. Pour la réaction de transcriptase inverse, nous sommes partis de 4 µg d'ARN total, l'enzyme utilisée est la Superscript™ II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA), les amorces utilisées sont les hexamères aléatoires et nous assumons à cette étape que l'efficacité de la réaction est la même pour chaque échantillon. Le choix des amorces se fait en tenant compte si possible des règles énoncées plus haut et en fonction d'obtenir des amplicons de 125 à 175 paires de bases. Dans cette étude, les gènes dont l'expression fût évaluée sont : VEGF 120, VEGF 164, VEGF 188, FLK-1, FLT-1, angiopoïétine 1, angiopoïétine 2 et TIE2. Nous avons décidé d'utiliser le SYBR® Green, une quantification relative et nous gardons les résultats d'une amplification que si le R<sup>2</sup> de la courbe standard est supérieur à 0,98.

Le mélange utilisé pour la réaction de PCR est 1 µL de l'ADN gabarit à la dilution déterminée par les tests où l'amplification est la meilleure, 0,5 µL de chacune des amorces (5'-3' et 3'-5') à 10 µM pour avoir une concentration finale de 200 nM, 10,5 µL d'eau autoclavée, et 12,5 µL de SYBR® Green pour un total de 25 µL dans la réaction.

### **2.5.8. Analyse statistique**

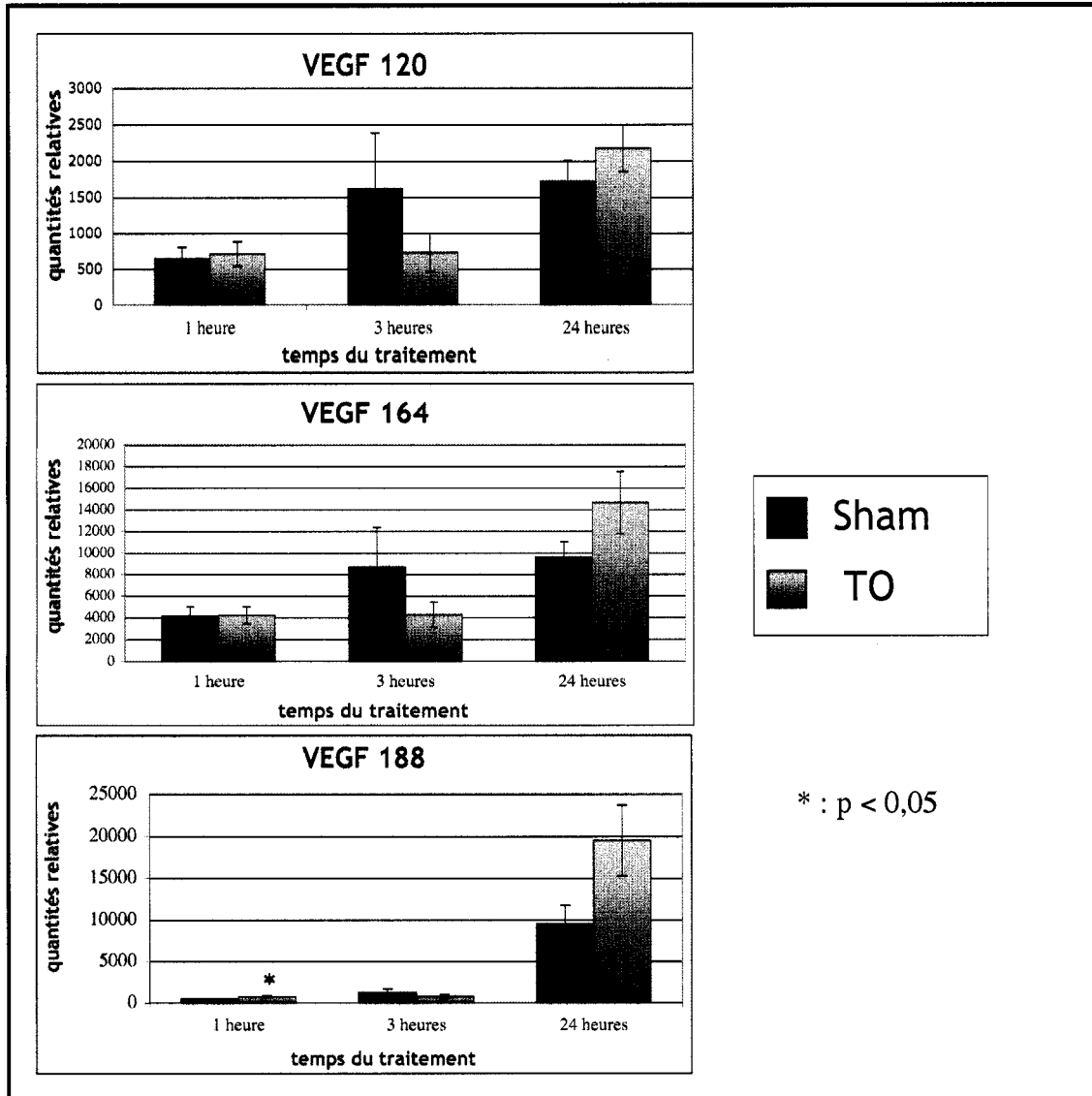
Les analyses statistiques furent effectuées en deux étapes. Tout d'abord, afin de vérifier s'il y a une modulation de l'expression des gènes étudiées par le sexe, une analyse de variance factorielle a été effectuée. Puis, comme il n'existe aucune interaction entre le sexe des échantillon et les quantités relatives, une analyse de variance factorielle a été effectuée pour chacun des temps expérimentaux avec comme variable dépendante les quantités normalisées et comme facteur le traitement expérimental. Ces analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel Statview® (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA).



## **2.6. Résultats de la troisième partie**

### **2.6.1. PCR quantitatif pour les isoformes de VEGF**

L'influence du temps et de l'OT sur l'expression de l'ARNm des différents isoformes de VEGF fût analysée par PCR quantitatif. L'isoforme 188 est le seul à montrer une différence d'expression significative aux temps courts. En effet, l'expression de cette isoforme est modulé à la hausse par l'OT dès la première heure. Bien qu'il n'existe aucune différence significative à 24 heures, pour les trois isoformes, il existe une forte tendance vers une augmentation de l'expression des isoformes de VEGF suite à l'OT en comparaison aux poumons placebos. Ces résultats sont résumés dans la figure 2.12.



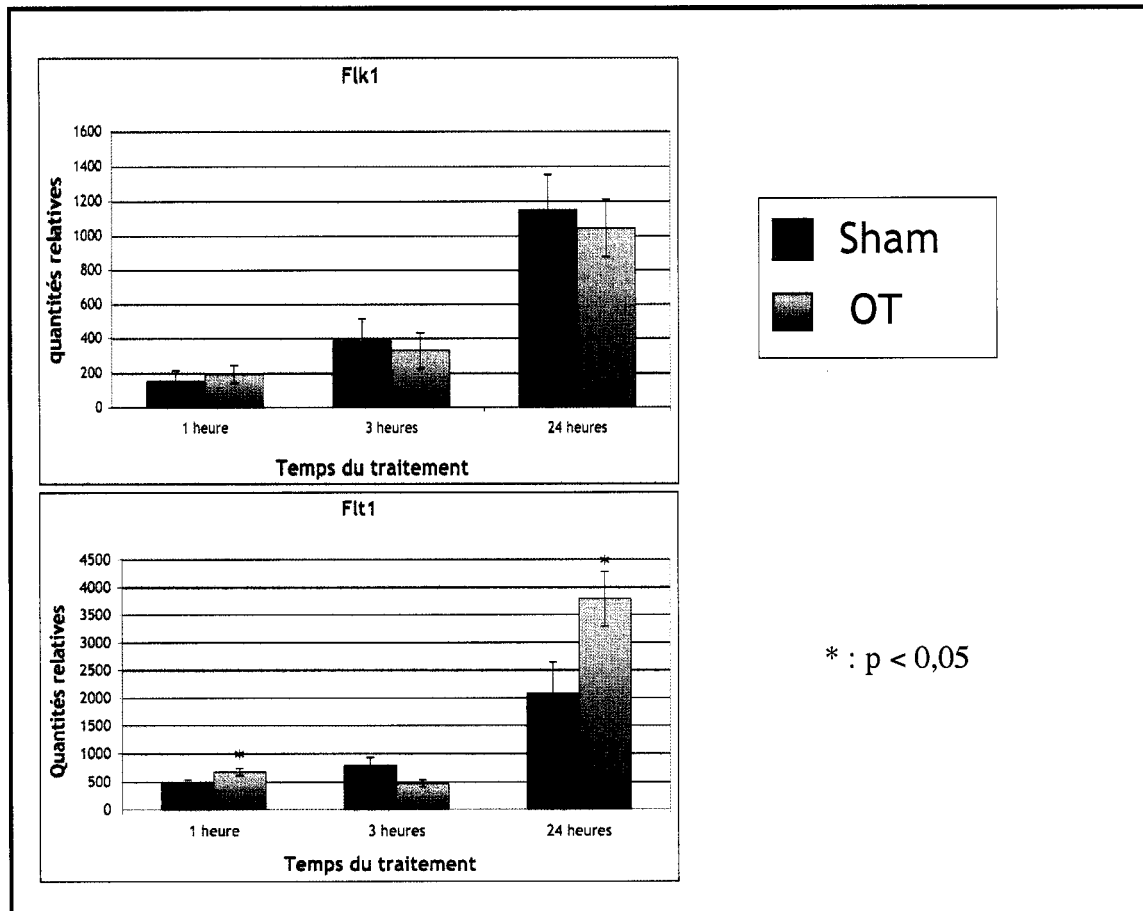
**Figure 2.12 : Effet de l'OT sur l'expression d'ARNm des isoformes de VEGF**

L'expression de VEGF 188 est significativement régulée positivement par 1h d'OT. À 24 heures, bien qu'il n'y ait pas de différence statistique, il y a une forte tendance montrant que l'OT module de façon positive l'expression de ces gènes.

### 2.6.2. PCR quantitatif pour les récepteurs de VEGF

L'influence du temps et de l'OT sur l'expression de l'ARNm des deux récepteurs de VEGF, Flk-1 et Flt-1, fût analysée par PCR quantitatif. Pour les deux récepteurs, on remarque une hausse significative de leur expression à 24 heures comparativement aux

temps courts. L'OT n'induit aucun changement dans l'expression d'ARNm de Flk-1. En contraste, l'expression de Flt-1 est modulée positivement dès la première heure d'OT, et cette hausse est soutenue jusqu'à 24 heures d'OT. Ces résultats sont résumés dans la figure 2.13.



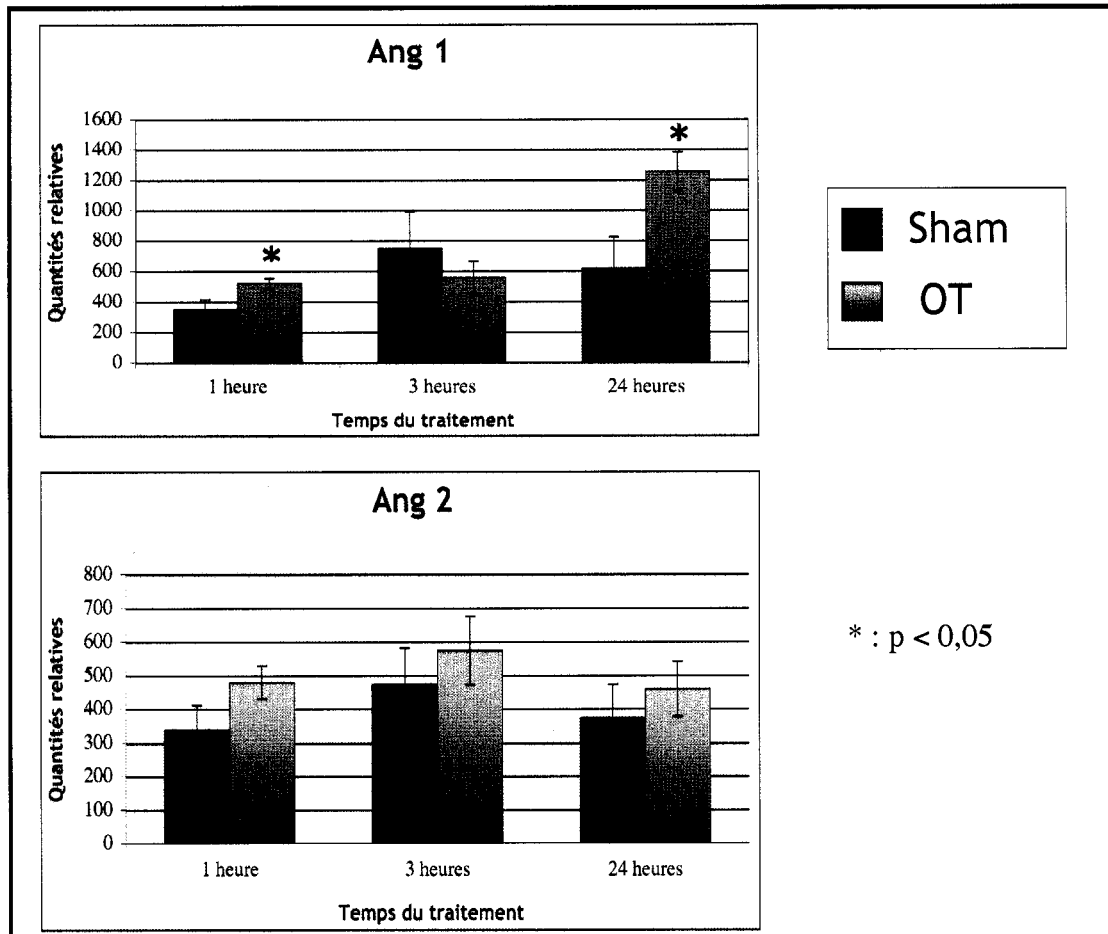
**Figure 2.13 : Effet de l'OT sur l'expression d'ARNm des récepteurs de VEGF**

L'expression des deux récepteurs est significativement plus élevée à 24 heures en comparaison aux temps courts. L'OT module positivement l'expression de Flt-1 très rapidement, à 1 heure d'OT, et aussi plus tardivement, à 24 heures d'OT. L'expression de Flk-1 n'est pas modulée par l'OT.

### 2.6.3. PCR quantitatif pour les angiopoïétines

L'influence du temps et de l'OT sur l'expression de l'ARNm des angiopoïétines 1 et 2 fût analysée par PCR quantitatif. Contrairement aux gènes présentés précédemment, l'expression de ces deux gènes n'augmente pas de façon significative en fonction du temps. Cependant, l'OT induit une augmentation significative d'Ang1 dès la première

heure, augmentation qui est soutenue à 24 heures d'OT. Bien qu'il existe à chaque temps expérimental une tendance vers une hausse de l'expression d'Ang 2, l'OT n'induit aucune différence d'expression significative pour ce gène. Ces résultats sont résumés dans la figure 2.14.

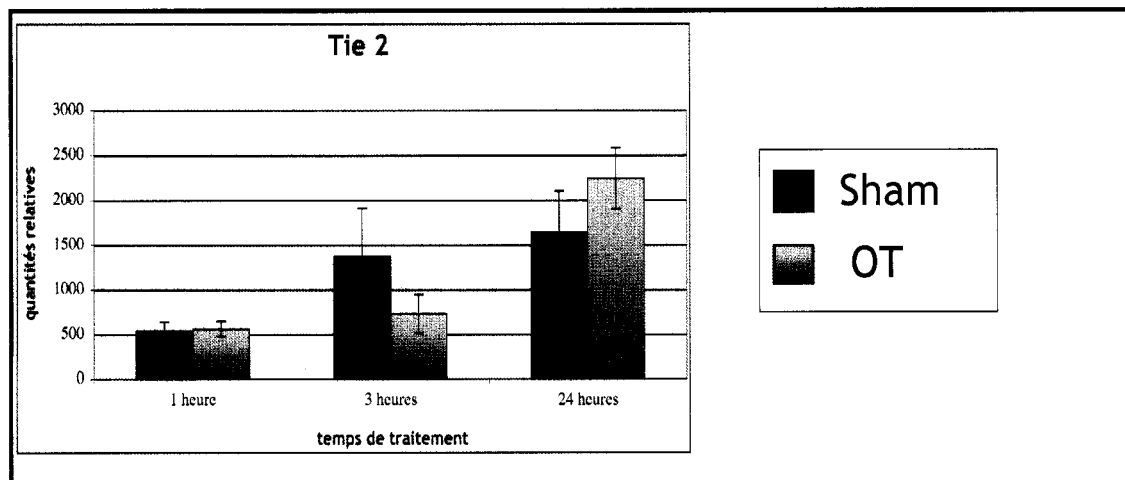


**Figure 2.14 : Effet de l'OT sur l'expression d'ARNm des angiopoïétines 1 et 2.** L'OT module positivement l'expression d'ARNm d'Ang 1 après une 1 heure et 24 heures de traitement. L'expression d'Ang 2 n'est pas significativement modulée par l'OT.

#### 2.6.4. PCR quantitatif pour Tie2

L'influence du temps et de l'OT sur l'expression de l'ARNm de Tie 2 fût analysée par PCR quantitatif. L'expression de l'ARNm du récepteur tyrosine kinase Tie 2 n'est pas significativement modulée par l'OT. Cependant, nous avons décelé une progression significative de l'expression du récepteur en fonction du temps. C'est-à-dire que son

expression à 1 heure et à 3 heures est significativement moins élevée qu'à 24 heures. Ces résultats sont résumés dans la figure 2.15.



**Figure 2.15 : Effet de l'OT sur l'expression d'ARNm de Tie 2.**

L'expression de Tie 2 n'est pas modulée par l'OT. L'expression de Tie 2 est significativement plus élevée à 24 heures qu'aux deux autres temps expérimentaux.

### **3.Discussion**

#### **3.1. Discussion sur la deuxième partie**

Le développement des capillaires dans les régions distales du poumon est une étape charnière pendant le stade alvéolaire du développement pulmonaire. Le second objectif spécifique était l'étude des changements morphologiques au niveau de la microvascularisation suite à l'OT dans un modèle murin. Comme il a déjà été mentionné, l'OT induit une accélération du développement pulmonaire. Cependant, il n'a pas encore été démontré que cette maturation générale du poumon induite par l'OT est également caractérisée par un développement du réseau de capillaires dans les régions distales. Notre hypothèse est que la croissance accélérée de la microvasculature associée à l'OT procède par angiogenèse et est perceptible dans les 24h suivant l'OT.

Le modèle choisi pour atteindre l'objectif était une souris transgénique où une enzyme permettant de faire une réaction colorimétrique est exprimée spécifiquement par toutes les cellules endothéliales car son gène est placé sous la direction du promoteur de Tie 2. Comme notre intérêt principal se portait sur la microvasculature, nous avons dû monter un protocole permettant la coloration enzymatique directement sur des coupes de tissus afin d'avoir une coloration uniforme. La mise au point du protocole fût ardue mais couronnée d'un succès tangible. En effet, nous avons pu obtenir une coloration relativement uniforme; c'est-à-dire que les cellules étaient marquées jusqu'au centre de la coupe. Cependant, les plus grands vaisseaux étaient colorés de façon plus foncée que les plus petits vaisseaux comme les capillaires. Cependant, le marquage était quand même très spécifique et permettait de voir la microvasculature du poumon et son association et son organisation avec les autres cellules pulmonaires. La mise au point de ce protocole constitue en soi des données totalement originales. Malheureusement, certains problèmes et certaines constatations nous ont obligés à changer de stratégie.

Tout d'abord, étant donné le but fixé au départ, il était important de mettre au point une coloration efficace pour pouvoir visionner le marquage directement sur des coupes de

poumons et non sur des embryons ou des organes complets comme il a été publié par le passé <sup>110</sup>. Au départ, il existait deux options, c'est-à-dire de faire la coloration sur le poumon complet puis de couper le poumon ou de faire les coupes puis de colorer les coupes. La seconde option nous semblait être la plus logique étant donné qu'elle donnait l'opportunité d'obtenir une coloration plus uniforme sur le tissu. La difficulté était donc de fixer suffisamment mais pas trop pour pouvoir conserver l'activité de l'enzyme  $\beta$ -galactosidase. De plus, une fixation trop forte rend la coupe des échantillons impossible. Nous avons trouvé la bonne combinaison en fixant peu avant la coupe et modérément juste avant la réaction enzymatique menant à la coloration.

Par ailleurs, la reproduction des souris de la lignée fût extrêmement difficile. À cause de problèmes à l'animalerie, un temps excessif a été nécessaire afin d'établir une colonie suffisamment volumineuse à partir de la femelle et du mâle de départ. En effet, étant donné que les techniciens en animaleries mettaient les animaux en accouplement vers 15h00, c'est-à-dire vers la fin de leur quart de travail et que les souris sont des animaux principalement nocturnes, nous n'avons eu que de très rares portées au début de la reproduction. Si bien que les rares portées obtenues durant cette période ne servaient qu'à entretenir la colonie et aucunement à augmenter la population. Heureusement, nous avons pu obtenir l'autorisation de mettre nous-mêmes les souris en accouplement plus tard en soirée. De cette façon, nous sommes parvenus à obtenir de bons résultats au niveau de la reproduction. Cependant, à ce point, nous nous sommes retrouvés avec une population de vieilles femelles qui ne tombaient que très rarement gestantes et qui étaient exagérément grasses et avec une population de jeunes femelles qui en étaient à leurs premières portées et qui, par conséquent, n'avaient en moyenne que 2 ou 3 fœtus dans l'utérus, ce qui rend les chirurgies presque impossible à effectuer. Finalement, malgré le fait que la lignée transgénique soit issue de la lignée CD1, il nous a semblé que les fœtus à 16,5 jours étaient très petits par rapport aux fœtus CD1 sur lesquels nous sommes habitués à faire la chirurgie. Il a donc fallu nous ajuster, ce qui a été quand même assez problématique étant donné que nous avons conclu que le meilleur temps pour faire les chirurgies était tard en soirée. Vu la difficulté des chirurgies, le taux de succès des chirurgies s'en est donc ressenti.

Pour ajouter au problème, nous nous sommes rendus compte qu'il était très facile de trop fixer un poumon avec la paraformaldéhyde, et ainsi inactiver l'activité de la  $\beta$ -galactosidase, particulièrement dans les capillaires; phénomène qui avait déjà été observé<sup>84</sup>. Ainsi, de simples variations à l'étape de fixation peuvent changer l'uniformité de la coloration. Comme le volume des poumons est variable, les différences étant encore plus grandes entre les poumons ligaturés et les poumons contrôles, nous risquons d'avoir un signal qui n'est pas constant entre les échantillons et qui pourrait nous induire en erreurs. Par conséquent, bien que toutes les précautions soient prises pour être constant dans les conditions de fixation (pourcentage de paraformaldéhyde, temps de fixation, température de fixation), il est possible d'avoir des résultats non-représentatifs de la réalité. De plus, la coloration doit se faire sur des coupes congelées. Celles-ci peuvent être problématique à plusieurs égards : elles contiennent souvent des artéfacts dus à la congélation de l'eau, sont plus difficiles à couper, sont souvent d'épaisseurs irrégulières, ne se conservent pas longtemps et par conséquent vont produire au total beaucoup moins de coupes. Comme nos échantillons sont déjà très petits, cette méthode demande le maintien de la colonie de souris Tie-2/lacZ. En face de ces difficultés, nous avons décidé de recourir à un différent marqueur de cellules endothéliales largement utilisé, CD-31, ou Pecam-1.

Pecam-1 est une protéine de 130 kDa, membre de la superfamille des immunoglobulines exprimée à la surface des plaquettes, monocytes et neutrophiles en circulation. C'est aussi une protéine transmembranaire majeure des cellules endothéliales située principalement aux jonctions intercellulaires, où un nombre extraordinairement élevé de cette molécule peut être retrouvé ( $10^6$ ). Pecam-1 n'est pas exprimé par les fibroblastes, l'épithélium, les cellules musculaires ou tout autre cellule non-vasculaire<sup>152</sup>. Cette protéine est donc fréquemment utilisée comme marqueur des cellules endothéliales.

La maturation des capillaires est étroitement liée au phénomène de septation et par conséquent au développement des alvéoles<sup>30</sup>. En effet, la septation est possible seulement lorsque le système de capillaire qu'il contient est double. Un système de capillaire simple à l'intérieur des septa est indicatif d'une paroi alvéolaire mature. De plus, le lit micro-



vasculaire doit nécessairement mûrir en étroite collaboration avec les alvéoles car les capillaires doivent se placer en parfaite juxtaposition avec les cellules épithéliales de type I afin de former une surface d'échanges gazeux efficace. C'est donc dans cette optique que nous nous sommes donné comme objectif d'étudier des changements morphologiques au niveau de la micro-vascularisation suite au développement pulmonaire accéléré induit par l'OT dans notre modèle murin.

Nos résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative au niveau du développement des capillaires aux temps courts de l'OT. Rappelons que l'OT est effectuée sur des fœtus à 16 jours et demi de gestation. Ceci correspond approximativement à 16 semaines de gestation chez l'humain ; c'est-à-dire que le poumon est à la fin du stade pseudoglandulaire ou début du stade canaliculaire du développement pulmonaire. Le poumon est très immature, la vascularisation et les acini commencent à se développer. Il est donc logique de ne pas voir de différence au niveau du développement des capillaires qui arrive plus tard.

Cependant, à 24 heures, que ce soit pour le groupe placebo ou pour le groupe TO, le poumon se trouve dans la période sacculaire du développement pulmonaire. C'est donc dire qu'il y a apparition de septa secondaires, d'alvéoles et que le développement des capillaires est en plein essor. En effet, comme on peut le voir dans la figure 2.9, le poumon est significativement plus développé qu'aux temps plus courts étudiés. Il y a présence d'alvéoles et de septa secondaires, il y a moins de tissus mésenchymateux et les cellules épithéliales distales commencent à se différencier.

De plus, à 24 heures de traitement, nous avons détecté des différences significatives entre les groupes placebo et ligaturé au niveau de la maturité du système de capillaires. En effet, les poumons de fœtus ayant subi l'occlusion trachéale ont les capillaires significativement mieux juxtaposés aux cellules épithéliales, ont plus de connections intercapillaires, ont moins de capillaires isolés et le réseau de capillaires est plus étendu à l'intérieur des septa. Ces résultats démontrent clairement une augmentation substantielle du réseau de capillaire suite à l'OT. De plus, les résultats concernant la juxtaposition des

capillaires aux cellules épithéliales suggèrent que l'on observe pas seulement une croissance du volume occupé par les capillaires, mais que nous assistons également à une maturation organisationnelle du réseau de capillaire en vue d'échanges gazeux efficaces suite à la transition néonatale.

D'autres observations très importantes ont pu être tirées de ces résultats. En effet, Une étude approfondie des tissus des deux groupes à 24h a permis de constater que pour les poumons occlus, les septa les plus matures possédaient un système de capillaires simple et que les bouts des bourgeons primitifs contenaient la plupart du temps des cellules endothéliales qui semblaient avoir percé la couche de cellules épithéliales. Ces deux observations soulèvent des hypothèses complètement nouvelles au niveau des modèles de développement vasculaire pulmonaire. En effet, comme il a été mentionné dans l'introduction, le système de capillaires à l'intérieur des septa est double au moins jusqu'à la période alvéolaire. Notons que la période alvéolaire chez la souris ne débute qu'au jour 5 postnatal. C'est donc dire que : soit que le développement pulmonaire induit par l'OT est tellement rapide qu'il a rattrapé au moins 6 jours et demi de développement ou que le développement vasculaire induit par l'étirement du poumon causé par l'OT devance le reste du développement pour en quelque sorte entraîner le reste du poumon à maturer. Par ailleurs, il n'a jamais été avancé que lors du processus de septation, les cellules endothéliales percent les cellules épithéliales et soient à la tête du bourgeon. Ceci impliquerait que le cellules endothéliales soient à la tête du processus de septation et que par conséquent, les signaux menant à l'angiogenèse des capillaires soient essentiels au développement normal du poumon. Il reste encore à vérifier si ces résultats sont dus à des artefacts de fixation et de congélation. Cependant, il serait quand même intéressant de voir quels sont les types cellulaires adjacents aux cellules endothéliales au sommet du bourgeon. Il est fort possible que le cette avancée des cellules endothéliales soit soutenue par une cellule comme le péricyte ou le myofibroblaste. Finalement, il serait très intéressant de vérifier si les processus observés ici dans un contexte d'étirement exagéré, soient des processus ayant lieu également lors du développement normal.

Il est donc clair que l'étirement provoqué par l'occlusion de la trachée induit une réaction menant à la maturation du réseau de capillaires. Outre, l'effet observé ici il a été démontré que l'étirement stimule entre autre la croissance et la différenciation des cellules épithéliales et des cellules du mésenchyme des alvéoles et des septa. En effet, les forces d'étirement dans le développement normal et aussi celles causées par l'OT sont des déterminants essentiels des proportions et de la localisation des pneumocytes de type I et II. Par exemple, un étirement continu *in vivo* causé par l'OT favorise la différenciation des pneumocytes en pneumocytes de type I<sup>57, 157</sup>. Les changements occasionnés par cet étirement semblent mener le poumon vers un état de maturité plus avancé. Il est fort probable que les trois importants types cellulaires (cellules épithéliales, endothéliales et mésenchymateuses) soient impliqués dans une réponse globale directement reliée au niveau de distension pulmonaire. Malheureusement, le mécanisme exact n'est pas encore connu, mais l'OT est une occasion unique d'étudier le développement du réseau de capillaire dans le cadre du développement pulmonaire fœtal.

Selon les connaissances actuelles, le développement des vaisseaux, c'est-à-dire leur croissance et leur motilité, est dépendante de facteurs de croissance tels que VEGF. Cependant, des travaux récents effectués au sein de notre laboratoire laissent supposer que les facteurs de croissance ne sont pas des déterminants essentiels au développement pulmonaire induite par l'OT. En effet, nous avons entrepris par l'intermédiaire de la technique SAGE (serial analysis of gene expression) l'analyse globale du transcriptome de poumons fœtaux ayant subit l'OT ou de poumons fœtaux placebo aux temps équivalents (Seaborn *et al.*, 2005 manuscrit en processus de révision par FASEB J. - MS# 2005-038174 faisant partie de la thèse de Tommy Seaborn à l'université). Les résultats de cette étude furent des plus étonnants étant donné l'absence de différence d'expression entre les groupes pour les facteurs de croissance. Cependant, cette étude a permis de constater que la distension mécanique des poumons induisait l'expression d'un grand nombre d'ARNm du cytosquelette et une transition rapide d'un métabolisme lipogénique vers un métabolisme principalement glycolitique. Ces résultats nous ont amené à tirer comme conclusion qu'il y avait une modification du phénotype d'un groupe de cellules important durant le développement pulmonaire : les fibroblastes. Nous croyons que suite

à l'étirement du poumon causé par l'OT, il y a une baisse rapide du nombre de lipofibroblastes et une hausse rapide de myofibroblastes. Ces sous-populations de fibroblastes ont chacun d'importantes fonctions à assumer pendant le développement pulmonaire à des moments précis et à des zones précises. Les lipofibroblastes emmagasinent les triglycérides qu'ils larguent suite à des interactions avec les pneumocytes de type II afin de permettre à ces derniers de synthétiser le surfactant. Cependant, suite à l'étirement du poumon pendant la gestation, les pneumocytes à l'intérieur des alvéoles se différencient en pneumocytes de type I. Du coup, il est probable que le poumon se retrouve avec des pneumocytes de type I aux endroits où il y a le plus d'étirement et des pneumocytes de type II aux zones d'ancrage entre les alvéoles avec des lipofibroblastes à proximité. Pendant les stades sacculaires et alvéolaires, les myofibroblastes sont importants car ils participent activement à la septation, principalement en fournissant de l'élastine.

Il existe un type cellulaire, les péricytes, qui sont en relation avec les capillaires et qui expriment un grand nombre de protéines du cytosquelette en commun avec les myofibroblastes : desmine, vimentine, gelsoline et l'isoforme  $\alpha$  de l'actine des muscles lisses ( $\alpha$ -smooth muscle actin). En fait, leur phénotype est tellement semblable qu'il est proposé depuis le milieu des années 1980 que le précurseur des péricytes soient les myofibroblastes. Cependant, aucune démonstration efficace n'a encore été avancée en faveur de cette supposition <sup>148, 173</sup>. Il a longtemps été cru que les péricytes jouaient pour les artérioles et les vénules à peu près le rôle que jouent les muscles lisses pour les vaisseaux plus volumineux. Cette fonction tient toujours. Cependant, les recherches se sont intensifiées et de nouvelles données et surtout de nouvelles fonctions ont été proposées pour ce type cellulaire. En effet, autour des capillaires, les péricytes sont plutôt formés de long processus s'étendant sur la longueur des capillaires <sup>173</sup>. À cet endroit, les péricytes auraient un rôle important à jouer du bourgeonnement des capillaires pendant la période angiogénique observée durant les deux derniers stades du développement pulmonaire <sup>148</sup>. La démonstration de Nehls en 1992 concernant l'implication des péricytes durant l'angiogenèse était suggestive mais n'était pas complètement convaincante. Les auteurs avaient conclu à cette époque que les péricytes servaient de guide aidant au

bourgeoisement des capillaires et à la prolifération des cellules endothéliales car ils avaient observé ces cellules directement au bout des bourgeons de cellules épithéliales où ils semblaient former un « pont » entre les extrémités des bourgeons se faisant face. Cependant, en 1997 Lindahl et son équipe ont publié un article venant solidifier cette hypothèse <sup>119</sup>. Les auteurs ont observé chez des souris mutantes nulles pour le gène PDGF-B, un manque de péricytes autour des capillaires. Ils ont aussi observé chez ces souris de nombreux micro-anévrisme au niveau des capillaires qui se sont rompus en fin de gestation. Il semble que les cellules endothéliales des bourgeons de capillaires étaient incapables d'attirer les péricytes PDGF-R $\beta$ -positives. Les auteurs conclurent à partir de ces résultats que les péricytes contribuent à l'angiogenèse des capillaires en stabilisant les parois de ces derniers.

Cependant, encore aucune démonstration n'a été faite concernant la réaction des péricytes suite à l'étirement mécanique du poumon. Les résultats de cette section montrent que le développement des capillaires est grandement accéléré suite à l'OT. De plus, nous avons observé une modification du phénotype des fibroblastes des poumons suite à l'OT d'un caractère lipofibroblastique vers un phénotype myofibroblastique. On sait que les péricytes possèdent un phénotype se rapprochant des myofibroblastes qui seraient peut-être même leurs précurseurs. Ainsi, en combinant les résultats de la présente section, ceux de notre équipe et ceux publiés par le passé, nous sommes en mesure d'avancer l'hypothèse que l'étirement des poumons suite à l'OT induit une augmentation du nombre de péricytes, ce qui favoriserait la stabilisation des parois des capillaires et par le fait même l'angiogenèse. Cependant, afin de vérifier cette hypothèse, de nombreux travaux doivent être fait. Tout d'abord, je proposerais d'utiliser notre modèle murin d'OT afin d'étudier la réaction des populations de péricytes suite à la distension causée par l'OT. Ensuite, je m'assurerais que le développement des capillaires est conservé dans notre modèle d'explant pulmonaire (mémoire Tommy Seaborn, Université Laval, 2001). Puis, je proposerais d'utiliser la technologie d'ARN antisens afin de bloquer certains gènes importants des myofibroblastes et des péricytes. Les premières cibles seraient : desmine, vimentine, gelsoline et l'isoforme  $\alpha$  de l'actine des muscles lisses. Je crois qu'il serait également d'intérêt de bloquer l'expression des différents isoformes de PDGF car

ces gènes semblent importants dans l'ontogénie des différents types de myofibroblastes<sup>119, 120</sup>. Finalement, étant donné les ressemblances des patrons d'expression de protéines du cytosquelette de ces deux types cellulaires et qu'il n'existe pas de marqueur spécifique pour les péricytes, ces derniers devront être distingués des myofibroblastes selon leur distribution et selon la forme des cellules. Par exemple, comme les péricytes sont associés aux vaisseaux sanguins, un double marquage pour l'isoforme  $\alpha$  de l'actine des muscles lisses et pour Pecam-1 pourrait donner de bons indices sur la distribution des péricytes. Cependant, il est important de noter que les péricytes associés aux capillaires n'expriment pas l'isoforme  $\alpha$  de l'actine des muscles lisses ; dans ce cas il faudrait utiliser la desmine comme marqueur.

### **3.2. Discussion sur la troisième partie**

Le développement de la vasculature pulmonaire n'est pas encore bien compris malgré le fait que les cellules endothéliales représentent le type cellulaire le plus abondant dans le poumon différencié. Une coordination sans faille est requise aux mécanismes de formation des vaisseaux lors du développement de toute région embryonnaire vascularisée. La différenciation des précurseurs de cellules endothéliales, suivie par la migration et la formation de tube, crée un réseau hautement organisé de vaisseaux. La formation de ce réseau a été décrite comme s'effectuant suite à deux mécanismes : la vasculogénèse et l'angiogénèse. Ces mécanismes sont le résultat de l'interaction entre les cellules endothéliales et les cellules péri-endothéliales et de la régulation par ces cellules de signaux paracrines entre les récepteurs tyrosine kinases sur les deux types cellulaires et leurs ligands (facteurs de croissance). Les ligands principalement impliqués et étant le sujet de la présente étude sont VEGF et les angiopoïétines 1 et 2.

Si on revient sur les résultats des PCR quantitatifs effectués pour les gènes impliqués dans l'angiogénèse et la vasculogénèse, on remarque en général, une augmentation de l'expression des gènes, tôt suite à l'occlusion, puis plus tard à 24 heures d'occlusion. Si on tente d'incorporer ces résultats au schéma de la figure 4 présentée dans l'introduction et que l'on décortique les étapes du processus de formation du réseau de vaisseaux

sanguins, il est possible de se faire une représentation de la réaction des acteurs angiogéniques et vasculogéniques suite à l'OT.

La première étape est la vasculogénèse dont les principaux acteurs sont les isoformes de VEGF et leurs deux récepteurs, Flk-1 et Flt-1. Les interactions entre VEGF et Flk-1 mèneront à la naissance des angioblastes, la migration et la prolifération des cellules endothéliales (vasculogénèse) alors que les interactions avec Flt-1 mèneront à la formation de tubes, et favoriseront les interactions entre les cellules endothéliales et les cellules péri-endothéliales (angiogénèse). Le fait que nous n'observons pas de changement aux niveaux de l'expression des isoformes de VEGF aux temps courts et de l'expression de Flk-1 aux trois temps suite à l'occlusion semble logique. En effet, étant donné que nos échantillons sont à 16,5 jours de gestation, la formation des vaisseaux par vasculogénèse est avancée, c'est-à-dire que la naissance des angioblastes et la prolifération des cellules endothéliales est en principe un phénomène plus précoce. Cependant, nous avons détecté une hausse significative de l'expression de Flt-1 à 1 heure et à 24 heures d'OT. Ces résultats sont aussi très logiques car bien que la période de naissance des angioblastes et de prolifération des cellules endothéliales soit presque terminée, il doit encore y avoir une forte activité de formation des vaisseaux et d'interactions cellules-cellules. En effet, suite à 24 heures d'OT, le poumon entre dans la période sacculaire de son développement. Par conséquent, il doit y avoir recrudescence de l'activité de formation des capillaires car leur formation doit nécessairement suivre la formation des septa et des alvéoles. Ce résultat est très important car en quelque sorte, ils valident les résultats présentés précédemment. En effet, la formation des vaisseaux est plus grande à 17,5 jours de gestation qu'à 16,5 peu importe le traitement.

De plus, la hausse significative de l'expression de Ang1 suggère la santé et le maintien des vaisseaux matures. En effet, les interactions entre Ang1 et Tie2 promouvoient le recrutement des cellules de soutien péri-endothéliales et les interactions entre-elles par l'intermédiaire de PDGF-BB, PDGF-AA et EGF. Ces interactions contribuent

ultimement à la maintenance et à l'intégrité des vaisseaux.

Certains seraient portés à croire à première vue que les résultats des deux angiopoïétines ne sont pas compatibles. En effet, Ang2 inhibe Ang1 en compétitionnant pour le même récepteur. Ang1 en se liant à Tie 2 induit la phosphorylation du récepteur alors qu'Ang2 ne l'induit pas. Ceci a pour résultat, comme déjà mentionné, le ressèment des liens dans la matrice pour Ang1 et le desserrement pour Ang2. L'augmentation de l'expression des deux ligands suite à l'OT ne semble donc pas logique à première vue. Cependant, il faut se rappeler que ces résultats découlent d'une réaction de PCR quantitatif et donc d'un homogénat de tissu. Je crois que ces résultats peuvent être expliqués selon une optique d'organisation tissulaire tridimensionnelle. L'expression d'Ang2 en des points focaux bloquera le signal Ang1/Tie2, résultant en le desserrement des structures vasculaires serrées et par conséquent, expose les cellules endothéliales aux signaux activateurs des inducteurs angiogéniques, dont VEGF. Si un inducteur angiogénique est présent, les cellules endothéliales à l'intérieur du point focal deviendront activées et prêtes à la migration et à la prolifération, produisant le bourgeonnement de nouveaux capillaires. De plus, dans un même ordre d'idées, il est possible qu'un changement significatif de la distribution d'Ang2 puisse avoir un effet marqué sur la septation. En effet, les nouveaux septa sont localisés à des points précis de l'alvéole, suggérant un effet très localisé des médiateurs physico-chimiques. Une présence plus uniforme de Ang1 est suggérée <sup>68</sup>, ce qui permettrait une balance de Ang1/Ang2 en faveur d'Ang1 sur l'ensemble du tissu, résultant en la stabilisation et la maturation des nouveaux vaisseaux. Ainsi, nos résultats suggèrent une collaboration entre VEGF, Ang1 et Ang2 afin de provoquer l'angiogenèse.

En résumé, les résultats de nos études sur l'expression d'ARNm des gènes impliqués dans le développement vasculaire démontrent que l'OT induit l'expression d'un patron d'ARNm représentatif d'une croissance coordonnée des vaisseaux. La réponse est très rapide et est soutenue jusqu'à 24 heures d'OT. Il est fort probable que la réponse soit soutenue pour encore un certain temps car la période d'alvéolisation suit la période sacculaire. Cet aspect reste à être développé et constitue une des prochaines étapes du projet.



Je crois qu'il est important de clarifier la situation concernant les différences entre les résultats du SAGE et ceux du PCR quantitatif dont il est question dans la présente section. En effet, l'étude du transcriptome par le SAGE suggère que les facteurs de croissance ne sont pas modulés par l'OT. C'est-à-dire qu'aucune des différences significatives rapportées dans cette section n'ont été observées dans les résultats du SAGE. La nature des deux techniques peut en partie expliquer les variations. Tout d'abord, les résultats obtenus par la technique du SAGE sont dépendants du nombre de tags séquencés, car l'analyse statistique utilisée tient en compte le nombre total de tags séquencés. Donc, plus il y a de séquençage d'effectué, plus les différences impliquant les ARNm exprimés à faibles niveaux seront statistiquement significatives. Pour le PCR quantitatif, tous les cDNA amplifiés sont pris en compte dans les statistiques. De plus, étant donné le design expérimental du SAGE, il n'est pas possible de reconnaître les différents isoformes d'un gène si les sites d'épissages de celui-ci ne sont pas compris entre le dernier site de restriction NlaIII et la queue poly-A. Pour le PCR quantitatif, nous préparons les amorces de sorte qu'il est possible de distinguer les différents isoformes d'un gène comme il fût le cas pour les isoformes de VEGF dans cette étude. En contrepartie, dans la technique du SAGE, 10 poumons sont rassemblés pour l'extraction d'ARN alors que pour le PCR quantitatif, le cDNA est synthétisé à partir de l'ARN de seulement 3 poumons. Ainsi, la variabilité inter-individuelle est possiblement mieux diluée dans la technique du SAGE. Par contre, au PCR quantitatif, en comparant de multiples individus, nous pouvons apprécier la variance à travers les individus et analyser l'homogénéité de sa distribution. Par conséquent, si l'échantillon était de taille suffisante, les études statistiques nous permettraient de cibler et d'écarter un individu anormal. Donc, le principal problème pour ces deux techniques, et pour la plupart des techniques que nous utilisons, est la collecte des échantillons.

### 3.3. Discussion générale

La présente étude a tenté de répondre à certaines questions concernant le développement vasculaire pulmonaire en réponse à l'OT, et ce dans deux modèles expérimentaux différents.

Le premier modèle nous a permis de faire des études dans un contexte où une maladie peut être induite, maladie que l'on a pu tenter de traiter ou non, et où il a été possible de recueillir certaines données physiologiques et cliniques. L'autre modèle nous a permis de faire des études sur le développement pulmonaire proprement dit, en mettant l'emphase sur les aspects vasculaires, en utilisant de nombreux outils biomoléculaires et génétiques.

Le premier objectif était l'étude de l'implication du système endothéline dans un modèle expérimental de HDC où il est possible de faire des observations physiologiques et cliniques et de faire l'OT temporaire. Notre hypothèse de départ était que l'effet bénéfique de l'OT sur la muscularisation des petites artères dans le modèle ovin de HDC est en relation avec une baisse d'expression du système endothéline en comparaison avec une HDC seule ou une HDC avec une occlusion trachéale relachée une semaine avant l'accouchement. Nous avons effectivement démontré que le récepteur  $ET_A$  est possiblement impliqué dans l'hypertension pulmonaire observée dans notre modèle ovin de HDC. Cependant, nous avons également démontré que l'OT ne diminuait pas les niveaux d'expression du système endothéline, ce qui suggère un rôle limité du système dans l'hypertension pulmonaire associée à la HDC.

Le second objectif spécifique était l'étude des changements morphologiques au niveau de la vascularisation suite à l'OT dans un modèle murin et nous avons émis l'hypothèse que la croissance accélérée de la microvasculature associée à l'OT procède par angiogénèse et est perceptible dans les 24 heures suivant l'OT chez le modèle murin. L'atteinte de cet objectif et du suivant dépendait fortement de ma capacité à réussir la chirurgie fœtale en question décrite plus tôt. La réussite de ces chirurgies a été un défi imposant qui a été relevé et l'OT *in vivo* chez la souris est devenue une part importante de mes projets car

nous travaillons pour l'instant exclusivement sur les tissus issus de ces chirurgies. Nous avons été en mesure de démontrer une croissance accélérée de la microvasculature pulmonaire suite à la distension provoquée par 24 heures d'OT en utilisant PECAM-1 comme marqueur de cellules endothéliales. Les mécanismes de cette maturation du réseau de capillaires n'ont pas été élucidés au cours de cette étude. Cependant, l'OT constitue un outil de choix afin d'explorer le développement pulmonaire fœtal.

Enfin, le troisième objectif consistait en l'étude de l'expression de l'ARNm des acteurs importants de l'angiogenèse dans notre modèle murin d'OT et l'hypothèse était que la croissance accélérée de la microvasculature induite par l'OT est associée à une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans l'angiogenèse. Nous avons pu vérifier cette hypothèse en mesurant les niveaux d'ARNm des gènes nous intéressant par PCR quantitatif. Nous avons démontré que l'OT induisait une croissance vasculaire coordonnée en augmentant l'expression d'ARNm des gènes impliqués dans l'angiogenèse, la vasculogenèse et ceux impliqués dans le maintien des vaisseaux matures.

### **3.3.1. Prochaines étapes du projet**

Le projet endothéliales a mené à la publication d'un article mais la suite a été complètement abandonnée car une autre étude faite au sein de notre équipe soutient les résultats présentés ici. Ces études ont également été effectuées sur le mouton mais aucune OT n'a été effectuée. Sur ces animaux, une HDC a été créée chirurgicalement et on leur a administré un antagoniste de  $ET_A$ . L'expression des gènes du système endothéline a été mesurée par immunohistochimie. Cette étude fait partie de la thèse déposée à l'Université Laval par Mélanie Kavanagh en 2004.

La poursuite de notre deuxième objectif nous a permis de mettre au point un outil qui, dans le futur, sera utilisé par notre équipe sur une base régulière. En effet, le marquage

des cellules endothéliales grâce à un anticorps anti-CD-31 en immunohistochimie sera utilisé en double marquage pour suivre l'expression de certains gènes en relation avec les cellules endothéliales. De plus, de très intéressants projets se dessinent concernant les péricytes et sont expliqués plus en détails à la toute fin de la section 3.1.

Notre enthousiasme face aux résultats sur les gènes impliqués dans l'angiogenèse a été refroidi par la prise de connaissance d'une étude semblable, pour lequel notre équipe a été sollicitée comme arbitre cet automne. Le manuscrit sera vraisemblablement publié. En effet, l'équipe du docteur Kitterman a mesuré les niveaux d'expression des isoformes de VEGF et de ses récepteurs chez des poumons fœtaux de rat contrôles, de rat souffrant de HDC et de rat souffrant de HDC mais traités à l'aide de l'OT. Les résultats concordent avec les nôtres. Cependant, nous avons été plus loin dans l'étude en mesurant aussi l'expression des gènes des angiopoïétines et de leur récepteurs impliqués dans le recrutement des cellules de soutien des vaisseaux, de leur recrutement et dans les interactions intercellulaires.

### **3.3.2. But à long terme du laboratoire**

Le premier but à long terme de notre laboratoire est, en utilisant notre modèle d'occlusion trachéale *in vivo*, d'éclaircir les mécanismes d'alvéolisation; plus particulièrement les évènements biomoléculaires précoces induits par méchanotransduction. Par ailleurs, nous croyons que les mécanismes de réparation postnataux récapitulent le développement pulmonaire normal. Par conséquent, une meilleure compréhension des évènements contrôlant le développement pulmonaire se traduirait par des interventions thérapeutiques plus efficaces. Ainsi, l'objectif ultime du laboratoire est le développement de traitements pharmacologiques plus efficaces dans le traitement de déficiences du développement pulmonaire.

#### 4. Références

1. **Abman SH.** Bronchopulmonary dysplasia: "a vascular hypothesis". *Am J Respir Crit Care Med* 164: 1755-1756, 2001.
2. **Acarregui MJ, Penisten ST, Goss KL, Ramirez K, and Snyder JM.** Vascular endothelial growth factor gene expression in human fetal lung in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 14-23, 1999.
3. **Adamson IY and King GM.** Epithelial-mesenchymal interactions in postnatal rat lung growth. *Exp Lung Res* 8: 261-274, 1985.
4. **Adur J, Takizawa S, Quan J, Uchide T, and Saida K.** Increased gene expression and production of murine endothelin receptors after birth. *Biochem Biophys Res Commun* 305: 700-706, 2003.
5. **Alcorn D, Adamson TM, Lambert TF, Maloney JE, Ritchie BC, and Robinson PM.** Morphological effects of chronic tracheal ligation and drainage in the fetal lamb lung. *J Anat* 123: 649-660, 1977.
6. **Alcorn D, Adamson TM, Maloney JE, and Robinson PM.** Morphological effects of chronic bilateral phrenectomy or vagotomy in the fetal lamb lung. *J Anat* 130: 683-695, 1980.
7. **Alescio T and Cassini A.** Induction in vitro of tracheal buds by pulmonary mesenchyme grafted on tracheal epithelium. *J Exp Zool* 150: 83-94, 1962.
8. **Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, and Nakanishi S.** Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 348: 730-732, 1990.
9. **Baglaj SM and Czernik J.** Nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in rat embryo: what model? *J Pediatr Surg* 39: 24-30, 2004.
10. **Beck L, Jr. and D'Amore PA.** Vascular development: cellular and molecular regulation. *Faseb J* 11: 365-373, 1997.
11. **Bellusci S, Grindley J, Emoto H, Itoh N, and Hogan BL.** Fibroblast growth factor 10 (FGF10) and branching morphogenesis in the embryonic mouse lung. *Development* 124: 4867-4878, 1997.
12. **Benachi A, Chailley-Heu B, Delezoide AL, Dommergues M, Brunelle F, Dumez Y, and Bourbon JR.** Lung growth and maturation after tracheal occlusion in diaphragmatic hernia. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 921-927, 1998.
13. **Benachi A, Delezoide AL, Chailley-Heu B, Preece M, Bourbon JR, and Ryder T.** Ultrastructural evaluation of lung maturation in a sheep model of diaphragmatic hernia and tracheal occlusion. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 805-812, 1999.
14. **Bin Saddiq W, Piedboeuf B, Laberge JM, Gamache M, Petrov P, Hashim E, Manika A, Chen MF, Belanger S, and Piuze G.** The effects of tracheal occlusion and release on type II pneumocytes in fetal lambs. *J Pediatr Surg* 32: 834-838, 1997.
15. **Black PN, Ghatel MA, Takahashi K, Bretherton-Watt D, Krausz T, Dollery CT, and Bloom SR.** Formation of endothelin by cultured airway epithelial cells. *FEBS Lett* 255: 129-132, 1989.
16. **Bohn D.** Congenital diaphragmatic hernia. *Am J Respir Crit Care Med* 166: 911-915, 2002.

17. **Boscoe MJ, Goodwin AT, Amrani M, and Yacoub MH.** Endothelins and the lung. *Int J Biochem Cell Biol* 32: 41-62, 2000.
18. **Bostrom H, Willetts K, Pekny M, Leveen P, Lindahl P, Hedstrand H, Pekna M, Hellstrom M, Gebre-Medhin S, Schalling M, Nilsson M, Kurland S, Tornell J, Heath JK, and Betsholtz C.** PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis. *Cell* 85: 863-873, 1996.
19. **Bourbon J.** Le développement pulmonaire. In: *Le poumon du nouveau-né*, edited by Éditeurs D. Paris: Groupe Liaisons SA, 2000, p. 1-13.
20. **Bratu I, Flageole H, Laberge JM, Chen MF, and Piedboeuf B.** Pulmonary structural maturation and pulmonary artery remodeling after reversible fetal ovine tracheal occlusion in diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 36: 739-744, 2001.
21. **Bratu I, Flageole H, Laberge JM, Kovacs L, Faucher D, and Piedboeuf B.** Lung function in lambs with diaphragmatic hernia after reversible fetal tracheal occlusion. *J Pediatr Surg* 39: 1524-1531, 2004.
22. **Bratu I, Flageole H, Laberge JM, Possmayer F, Harbottle R, Kay S, Khalife S, and Piedboeuf B.** Surfactant levels after reversible tracheal occlusion and prenatal steroids in experimental diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 36: 122-127, 2001.
23. **Breier G.** Angiogenesis in embryonic development--a review. *Placenta* 21 Suppl A: S11-15, 2000.
24. **Buckley S and Warburton D.** Dynamics of metalloproteinase-2 and -9, TGF-beta, and uPA activities during normoxic vs. hyperoxic alveolarization. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L747-754, 2002.
25. **Bullard KM, Sonne J, Hawgood S, Harrison MR, and Adzick NS.** Tracheal ligation increases cell proliferation but decreases surfactant protein in fetal murine lungs in vitro. *J Pediatr Surg* 32: 207-211; discussion 211-203, 1997.
26. **Bureau M, Cloutier R, and Piedboeuf B.** Hernie diaphragmatique. In: *Le poumon du nouveau-né*, edited by Doin. Paris, 2000, p. 179-190.
27. **Burri PH.** Fetal and postnatal development of the lung. *Annu Rev Physiol* 46: 617-628, 1984.
28. **Burri PH.** Postnatal Development and Growth. In: *THE LUNG: Scientific Foundations Second Edition*, edited by R. G. Crystal JBW, et al. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997, p. 1013-1026.
29. **Burri PH.** The postnatal growth of the rat lung. 3. Morphology. *Anat Rec* 180: 77-98, 1974.
30. **Burri PH and Djonov V.** Intussusceptive angiogenesis--the alternative to capillary sprouting. *Mol Aspects Med* 23: 1-27, 2002.
31. **Burri PH and Moschopoulos M.** Structural analysis of fetal rat lung development. *Anat Rec* 234: 399-418, 1992.
32. **Burri PH and Tarek MR.** A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *Anat Rec* 228: 35-45, 1990.
33. **Butter A, Bratu I, Flageole H, Kovacs L, Faucher D, Piedboeuf B, and Laberge JM.** The effects of fetal tracheal occlusion and release on lung growth and function in the sheep CDH model. *Saudi Med J* 24: S31, 2003.
34. **Cassin S, Kristova V, Davis T, Kadowitz P, and Gause G.** Tone-dependent responses to endothelin in the isolated perfused fetal sheep pulmonary circulation in situ. *J Appl Physiol* 70: 1228-1234, 1991.

35. **Chailley-Heu B, Chelly N, Lelievre-Pegorier M, Barlier-Mur AM, Merlet-Benichou C, and Bourbon JR.** Mild vitamin A deficiency delays fetal lung maturation in the rat. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21: 89-96, 1999.
36. **Chelly N, Mouhieddine-Gueddiche OB, Barlier-Mur AM, Chailley-Heu B, and Bourbon JR.** Keratinocyte growth factor enhances maturation of fetal rat lung type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 423-432, 1999.
37. **Cheung CY.** Vascular endothelial growth factor: possible role in fetal development and placental function. *J Soc Gynecol Investig* 4: 169-177, 1997.
38. **Chiba T, Albanese CT, Farmer DL, Dowd CF, Filly RA, Machin GA, and Harrison M.** Balloon tracheal occlusion for congenital diaphragmatic hernia: experimental studies. *J Pediatr Surg* 35: 1566-1570, 2000.
39. **Chomczynski P and Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987.
40. **Coppola CP, Au-Fliegner M, and Gosche JR.** Endothelin-1 pulmonary vasoconstriction in rats with diaphragmatic hernia. *J Surg Res* 76: 74-78, 1998.
41. **Davey MG, Hedrick HL, Bouchard S, Mendoza JM, Schwarz U, Adzick NS, and Flake AW.** Temporary tracheal occlusion in fetal sheep with lung hypoplasia does not improve postnatal lung function. *J Appl Physiol* 94: 1054-1062, 2003.
42. **De Paepe ME, Johnson BD, Papadakis K, and Luks FI.** Lung growth response after tracheal occlusion in fetal rabbits is gestational age-dependent. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21: 65-76, 1999.
43. **De Paepe ME, Johnson BD, Papadakis K, Sueishi K, and Luks FI.** Temporal pattern of accelerated lung growth after tracheal occlusion in the fetal rabbit. *Am J Pathol* 152: 179-190, 1998.
44. **De Paepe ME, Sardesai MP, Johnson BD, Lesieur-Brooks AM, Papadakis K, and Luks FI.** The role of apoptosis in normal and accelerated lung development in fetal rabbits. *J Pediatr Surg* 34: 863-870; discussion 870-861, 1999.
45. **Demayo F, Minoo P, Plopper CG, Schuger L, Shannon J, and Torday JS.** Mesenchymal-epithelial interactions in lung development and repair: are modeling and remodeling the same process? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L510-517, 2002.
46. **deMello DE, Sawyer D, Galvin N, and Reid LM.** Early fetal development of lung vasculature. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16: 568-581, 1997.
47. **Deprest J.** In utero therapy for congenital diaphragmatic hernia. *The Third International Workshop on Developmental Biology of the Lung*, Québec, Québec, Canada, 2004.
48. **Deprest J.** Towards an endoscopic intra-uterine treatment for congenital diaphragmatic hernia. *Verh K Acad Geneeskd Belg* 64: 55-70, 2002.
49. **Deprest JA, Evrard VA, Verbeken EK, Perales AJ, Delaere PR, Lerut TE, and Flageole H.** Tracheal side effects of endoscopic balloon tracheal occlusion in the fetal lamb model. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 92: 119-126, 2000.
50. **DiFiore JW, Fauza DO, Slavin R, Peters CA, Fackler JC, and Wilson JM.** Experimental fetal tracheal ligation reverses the structural and physiological effects of pulmonary hypoplasia in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 29: 248-256; discussion 256-247, 1994.

51. **DiFiore JW, Fauza DO, Slavin R, and Wilson JM.** Experimental fetal tracheal ligation and congenital diaphragmatic hernia: a pulmonary vascular morphometric analysis. *J Pediatr Surg* 30: 917-923; discussion 923-914, 1995.
52. **Ehrenreich H, Anderson RW, Fox CH, Rieckmann P, Hoffman GS, Travis WD, Coligan JE, Kehrl JH, and Fauci AS.** Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. *J Exp Med* 172: 1741-1748, 1990.
53. **Fagan KA, McMurtry IF, and Rodman DM.** Role of endothelin-1 in lung disease. *Respir Res* 2: 90-101, 2001.
54. **Flageole H, Evrard VA, Piedboeuf B, Laberge JM, Lerut TE, and Deprest JA.** The plug-unplug sequence: an important step to achieve type II pneumocyte maturation in the fetal lamb model. *J Pediatr Surg* 33: 299-303, 1998.
55. **Flageole H, Evrard VA, Vandenberghe K, Lerut TE, and Deprest JA.** Tracheoscopic endotracheal occlusion in the ovine model: technique and pulmonary effects. *J Pediatr Surg* 32: 1328-1331, 1997.
56. **Flake AW, Crombleholme TM, Johnson MP, Howell LJ, and Adzick NS.** Treatment of severe congenital diaphragmatic hernia by fetal tracheal occlusion: clinical experience with fifteen cases. *Am J Obstet Gynecol* 183: 1059-1066, 2000.
57. **Flecknoe S, Harding R, Maritz G, and Hooper SB.** Increased lung expansion alters the proportions of type I and type II alveolar epithelial cells in fetal sheep. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L1180-1185, 2000.
58. **Folkman J and D'Amore PA.** Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell* 87: 1153-1155, 1996.
59. **Galambos C, Ng YS, Ali A, Noguchi A, Lovejoy S, D'Amore PA, and DeMello DE.** Defective pulmonary development in the absence of heparin-binding vascular endothelial growth factor isoforms. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27: 194-203, 2002.
60. **Gaultier C, Bourbon JR, and Post M.** *Lung Development*. New-York: Oxford University Press, 1999.
61. **Geggel RL, Murphy JD, Langleben D, Crone RK, Vacanti JP, and Reid LM.** Congenital diaphragmatic hernia: arterial structural changes and persistent pulmonary hypertension after surgical repair. *J Pediatr* 107: 457-464, 1985.
62. **Giaid A, Polak JM, Gaitonde V, Hamid QA, Moscoso G, Legon S, Uwanogho D, Roncalli M, Shinmi O, Sawamura T, and et al.** Distribution of endothelin-like immunoreactivity and mRNA in the developing and adult human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 4: 50-58, 1991.
63. **Glassberg MK, Ergul A, Wanner A, and Puett D.** Endothelin-1 promotes mitogenesis in airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10: 316-321, 1994.
64. **Goldie RG, Knott PG, Carr MJ, Hay DW, and Henry PJ.** The endothelins in the pulmonary system. *Pulm Pharmacol* 9: 69-93, 1996.
65. **Graf JL, Gibbs DL, Adzick NS, and Harrison MR.** Fetal hydrops after in utero tracheal occlusion. *J Pediatr Surg* 32: 214-215; discussion 216, 1997.
66. **Guilbert TW, Gebb SA, and Shannon JM.** Lung hypoplasia in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia occurs early in development. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L1159-1171, 2000.



67. **Hall SM, Hislop AA, Pierce CM, and Haworth SG.** Prenatal origins of human intrapulmonary arteries: formation and smooth muscle maturation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23: 194-203, 2000.
68. **Hanahan D.** Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 277: 48-50, 1997.
69. **Harding R and Hooper SB.** Regulation of lung expansion and lung growth before birth. *J Appl Physiol* 81: 209-224, 1996.
70. **Harrison MR, Adzick NS, Nakayama DK, and deLorimier AA.** Fetal diaphragmatic hernia: pathophysiology, natural history, and outcome. *Clin Obstet Gynecol* 29: 490-501, 1986.
71. **Harrison MR, Keller RL, Hawgood SB, Kitterman JA, Sandberg PL, Farmer DL, Lee H, Filly RA, Farrell JA, and Albanese CT.** A randomized trial of fetal endoscopic tracheal occlusion for severe fetal congenital diaphragmatic hernia. *N Engl J Med* 349: 1916-1924, 2003.
72. **Heine UI, Munoz EF, Flanders KC, Roberts AB, and Sporn MB.** Colocalization of TGF-beta 1 and collagen I and III, fibronectin and glycosaminoglycans during lung branching morphogenesis. *Development* 109: 29-36, 1990.
73. **Henning SJ.** Plasma concentrations of total and free corticosterone during development in the rat. *Am J Physiol* 235: E451-456, 1978.
74. **Henry PJ.** Endothelin receptor distribution and function in the airways. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26: 162-167, 1999.
75. **Hind M, Corcoran J, and Maden M.** Alveolar proliferation, retinoid synthesizing enzymes, and endogenous retinoids in the postnatal mouse lung. Different roles for Aldh-1 and Raldh-2. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26: 67-73, 2002.
76. **Hind M, Corcoran J, and Maden M.** Temporal/spatial expression of retinoid binding proteins and RAR isoforms in the postnatal lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L468-476, 2002.
77. **Hislop AA.** Airway and blood vessel interaction during lung development. *J Anat* 201: 325-334, 2002.
78. **Hooper SB and Harding R.** Fetal lung liquid: a major determinant of the growth and functional development of the fetal lung. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 22: 235-247, 1995.
79. **Hooper SB and Harding R.** Respiratory system. In: *Fetal growth and development*, edited by Bocking RHaAD. Cambridge: Press syndicate of the University of Cambridge, 2001, p. 284.
80. **Hooper SB and Wallace MJ.** Physical, Endocrine and Growth Factors in Lung Development. In: *The Lung: Development, Aging and the Environment*, edited by Richard Harding KEPaCGP: Elsevier Academic Press, 2004, p. 131-148.
81. **Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, and Ferrara N.** Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 267: 26031-26037, 1992.
82. **Imam SA, Young L, Chaiwun B, and Taylor CR.** Comparison of two microwave based antigen-retrieval solutions in unmasking epitopes in formalin-fixed tissue for immunostaining. *Anticancer Res* 15: 1153-1158, 1995.
83. **Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, and Masaki T.** The human endothelin family: three structurally and pharmacologically

- distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 2863-2867, 1989.
84. **Ismail JA, Poppa V, Kemper LE, Scatena M, Giachelli CM, Coffin JD, and Murry CE.** Immunohistologic labeling of murine endothelium. *Cardiovasc Pathol* 12: 82-90, 2003.
85. **Ivy DD, Kinsella JP, and Abman SH.** Physiologic characterization of endothelin A and B receptor activity in the ovine fetal pulmonary circulation. *J Clin Invest* 93: 2141-2148, 1994.
86. **Iwasaki S, Homma T, Matsuda Y, and Kon V.** Endothelin receptor subtype B mediates autoinduction of endothelin-1 in rat mesangial cells. *J Biol Chem* 270: 6997-7003, 1995.
87. **Jakeman LB, Winer J, Bennett GL, Altar CA, and Ferrara N.** Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J Clin Invest* 89: 244-253, 1992.
88. **Jakkula M, Le Cras TD, Gebb S, Hirth KP, Tudor RM, Voelkel NF, and Abman SH.** Inhibition of angiogenesis decreases alveolarization in the developing rat lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L600-607, 2000.
89. **Jones R and Reid LM.** Development of the pulmonary vasculature. In: *The Lung: Development, Aging and the Environment*, edited by Richard Harding KEPaCGP: Elsevier Academic Press, 2004, p. 81-103.
90. **Juretschke LJ.** Congenital diaphragmatic hernia: update and review. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 30: 259-268, 2001.
91. **Kanai M, Kitano Y, von Allmen D, Davies P, Adzick NS, and Flake AW.** Fetal tracheal occlusion in the rat model of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia: tracheal occlusion reverses the arterial structural abnormality. *J Pediatr Surg* 36: 839-845, 2001.
92. **Kauffman SL, Burri PH, and Weibel ER.** The postnatal growth of the rat lung. II. Autoradiography. *Anat Rec* 180: 63-76, 1974.
93. **Kavanagh M, Battistini B, Jean S, Crochetiere J, Fournier L, Wessale J, Opgenorth TJ, Cloutier R, and Major D.** Effect of ABT-627 (A-147627), a potent selective ET(A) receptor antagonist, on the cardiopulmonary profile of newborn lambs with surgically-induced diaphragmatic hernia. *Br J Pharmacol* 134: 1679-1688, 2001.
94. **Kavanagh M, Battistini B, Kluth D, Jean S, Fournier L, Jeng AY, Major D, and Cloutier R.** Effect of CGS 26303, an endothelin-converting enzyme-neutral endopeptidase inhibitor, on nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in the rat. *J Pediatr Surg* 35: 780-784, 2000.
95. **Kay S, Laberge JM, Flageole H, Richardson S, Belanger S, and Piedboeuf B.** Use of antenatal steroids to counteract the negative effects of tracheal occlusion in the fetal lamb model. *Pediatr Res* 50: 495-501, 2001.
96. **Kedzierski RM and Yanagisawa M.** Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 851-876, 2001.
97. **Keijzer R, Liu J, Deimling J, Tibboel D, and Post M.** Dual-hit hypothesis explains pulmonary hypoplasia in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia. *Am J Pathol* 156: 1299-1306, 2000.

98. **Keramidas E, Hooper SB, and Harding R.** Effect of gestational age on the increase in fetal lung growth following tracheal obstruction. *Exp Lung Res* 22: 283-298, 1996.
99. **Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV, Chen H, Heinsohn H, Vandlen R, and Ferrara N.** The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem* 271: 7788-7795, 1996.
100. **Kimura S, Kasuya Y, Sawamura T, Shinimi O, Sugita Y, Yanagisawa M, Goto K, and Masaki T.** Conversion of big endothelin-1 to 21-residue endothelin-1 is essential for expression of full vasoconstrictor activity: structure-activity relationships of big endothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol* 13 Suppl 5: S5-7; discussion S18, 1989.
101. **Kitano Y and Adzick NS.** New developments in fetal lung surgery. *Curr Opin Pediatr* 11: 193-199, 1999.
102. **Kitano Y, Davies P, von Allmen D, Adzick NS, and Flake AW.** Fetal tracheal occlusion in the rat model of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *J Appl Physiol* 87: 769-775, 1999.
103. **Kitano Y, Kanai M, Davies P, von Allmen D, Yang EY, Radu A, Adzick NS, and Flake AW.** BAPS prize-1999: Lung growth induced by prenatal tracheal occlusion and its modifying factors: a study in the rat model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 36: 251-259, 2001.
104. **Kitano Y, von Allmen D, Kanai M, Adzick NS, and Flake AW.** Epinephrine inhibits tracheal occlusion induced lung growth in fetal sheep. *Fetal Diagn Ther* 18: 333-337, 2003.
105. **Kloog Y, Ambar I, Sokolovsky M, Kochva E, Wollberg Z, and Bdolah A.** Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain. *Science* 242: 268-270, 1988.
106. **Kluth D, Kangah R, Reich P, Tenbrinck R, Tibboel D, and Lambrecht W.** Nitrofen-induced diaphragmatic hernias in rats: an animal model. *J Pediatr Surg* 25: 850-854, 1990.
107. **Kobayashi H and Puri P.** Plasma endothelin levels in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 29: 1258-1261, 1994.
108. **Koblizek TI, Weiss C, Yancopoulos GD, Deutsch U, and Risau W.** Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro. *Curr Biol* 8: 529-532, 1998.
109. **Kohan DE.** Endothelin synthesis by rabbit renal tubule cells. *Am J Physiol* 261: F221-226, 1991.
110. **Koop EA, Lopes SM, Feiken E, Bluysen HA, van der Valk M, Voest EE, Mummery CL, Moolenaar WH, and Gebbink MF.** Receptor protein tyrosine phosphatase mu expression as a marker for endothelial cell heterogeneity; analysis of RPTPmu gene expression using LacZ knock-in mice. *Int J Dev Biol* 47: 345-354, 2003.
111. **Kourembanas S, McQuillan LP, Leung GK, and Faller DV.** Nitric oxide regulates the expression of vasoconstrictors and growth factors by vascular endothelium under both normoxia and hypoxia. *J Clin Invest* 92: 99-104, 1993.
112. **Laberge JM, Bratu I, and Flageole H.** The management of asymptomatic congenital lung malformations. *Paediatr Respir Rev* 5 Suppl A: S305-312, 2004.
113. **Langham MR, Jr., Kays DW, Ledbetter DJ, Frentzen B, Sanford LL, and Richards DS.** Congenital diaphragmatic hernia. Epidemiology and outcome. *Clin Perinatol* 23: 671-688, 1996.

114. **Larsen WJ.** *Embryologie humaine*. Bruxelles, 2003.
115. **Lauth M, Wagner AH, Cattaruzza M, Orzechowski HD, Paul M, and Hecker M.** Transcriptional control of deformation-induced preproendothelin-1 gene expression in endothelial cells. *J Mol Med* 78: 441-450, 2000.
116. **Lebeche D, Malpel S, and Cardoso WV.** Fibroblast growth factor interactions in the developing lung. *Mech Dev* 86: 125-136, 1999.
117. **Levin DL.** Morphologic analysis of the pulmonary vascular bed in congenital left-sided diaphragmatic hernia. *J Pediatr* 92: 805-809, 1978.
118. **Li H, Chen SJ, Chen YF, Meng QC, Durand J, Oparil S, and Elton TS.** Enhanced endothelin-1 and endothelin receptor gene expression in chronic hypoxia. *J Appl Physiol* 77: 1451-1459, 1994.
119. **Lindahl P, Johansson BR, Leveen P, and Betsholtz C.** Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* 277: 242-245, 1997.
120. **Lindahl P, Karlsson L, Hellstrom M, Gebre-Medhin S, Willetts K, Heath JK, and Betsholtz C.** Alveogenesis failure in PDGF-A-deficient mice is coupled to lack of distal spreading of alveolar smooth muscle cell progenitors during lung development. *Development* 124: 3943-3953, 1997.
121. **Lines A, Nardo L, Phillips ID, Possmayer F, and Hooper SB.** Alterations in lung expansion affect surfactant protein A, B, and C mRNA levels in fetal sheep. *Am J Physiol* 276: L239-245, 1999.
122. **Lippton HL, Hauth TA, Cohen GA, and Hyman AL.** Functional evidence for different endothelin receptors in the lung. *J Appl Physiol* 75: 38-48, 1993.
123. **Lippton HL, Hauth TA, Summer WR, and Hyman AL.** Endothelin produces pulmonary vasoconstriction and systemic vasodilation. *J Appl Physiol* 66: 1008-1012, 1989.
124. **Lipsett J, Cool JC, Runciman SI, Ford WD, Kennedy JD, and Martin AJ.** Effect of antenatal tracheal occlusion on lung development in the sheep model of congenital diaphragmatic hernia: a morphometric analysis of pulmonary structure and maturity. *Pediatr Pulmonol* 25: 257-269, 1998.
125. **Liu B, Harvey CS, and McGowan SE.** Retinoic acid increases elastin in neonatal rat lung fibroblast cultures. *Am J Physiol* 265: L430-437, 1993.
126. **Losty PD, Suen HC, Manganaro TF, Donahoe PK, and Schnitzer JJ.** Prenatal hormonal therapy improves pulmonary compliance in the nitrofen-induced CDH rat model. *J Pediatr Surg* 30: 420-426, 1995.
127. **Luks FI.** Requirements for fetal surgery: the diaphragmatic hernia model. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 92: 115-118, 2000.
128. **Luks FI, Roggin KK, Wild YK, Piasecki GJ, Rubin LP, Lesieur-Brooks AM, and De Paepe ME.** Effect of lung fluid composition on type II cellular activity after tracheal occlusion in the fetal lamb. *J Pediatr Surg* 36: 196-201, 2001.
129. **Luks FI, Wild YK, Piasecki GJ, and De Paepe ME.** Short-term tracheal occlusion corrects pulmonary vascular anomalies in the fetal lamb with diaphragmatic hernia. *Surgery* 128: 266-272, 2000.
130. **MacCumber MW, Ross CA, Glaser BM, and Snyder SH.** Endothelin: visualization of mRNAs by in situ hybridization provides evidence for local action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 7285-7289, 1989.

131. **Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, and Yancopoulos GD.** Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277: 55-60, 1997.
132. **Maltais F, Seaborn T, Guay S, and Piedboeuf B.** In vivo tracheal occlusion in fetal mice induces rapid lung development without affecting surfactant protein C expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L622-632, 2003.
133. **Maniscalco WM, Watkins RH, Pryhuber GS, Bhatt A, Shea C, and Huyck H.** Angiogenic factors and alveolar vasculature: development and alterations by injury in very premature baboons. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L811-823, 2002.
134. **Mariani TJ, Sandefur S, and Pierce RA.** Elastin in lung development. *Exp Lung Res* 23: 131-145, 1997.
135. **Massague J and Chen YG.** Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* 14: 627-644, 2000.
136. **Massaro D and Massaro GD.** Invited Review: pulmonary alveoli: formation, the "call for oxygen," and other regulators. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L345-358, 2002.
137. **Massaro D, Teich N, and Massaro GD.** Postnatal development of pulmonary alveoli: modulation in rats by thyroid hormones. *Am J Physiol* 250: R51-55, 1986.
138. **Matsumoto H, Suzuki N, Onda H, and Fujino M.** Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem Biophys Res Commun* 164: 74-80, 1989.
139. **McGowan SE.** Extracellular matrix and the regulation of lung development and repair. *Faseb J* 6: 2895-2904, 1992.
140. **Merkus PJ, ten Have-Opbroek AA, and Quanjer PH.** Human lung growth: a review. *Pediatr Pulmonol* 21: 383-397, 1996.
141. **Michael JR and Markewitz BA.** Endothelins and the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 154: 555-581, 1996.
142. **Mishalany H and Gordo J.** Congenital diaphragmatic hernia in monozygotic twins. *J Pediatr Surg* 21: 372-374, 1986.
143. **Motoyama J, Liu J, Mo R, Ding Q, Post M, and Hui CC.** Essential function of Gli2 and Gli3 in the formation of lung, trachea and oesophagus. *Nat Genet* 20: 54-57, 1998.
144. **Muratore CS, Nguyen HT, Ziegler MM, and Wilson JM.** Stretch-induced upregulation of VEGF gene expression in murine pulmonary culture: a role for angiogenesis in lung development. *J Pediatr Surg* 35: 906-912; discussion 912-903, 2000.
145. **Naeye RL, Shochat SJ, Whitman V, and Maisels MJ.** Unsuspected pulmonary vascular abnormalities associated with diaphragmatic hernia. *Pediatrics* 58: 902-906, 1976.
146. **Nambi P, Pullen M, Wu HL, Nuthulaganti P, Elshourbagy N, and Kumar C.** Dexamethasone down-regulates the expression of endothelin receptors in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 267: 19555-19559, 1992.
147. **Nardo L, Maritz G, Harding R, and Hooper SB.** Changes in lung structure and cellular division induced by tracheal obstruction in fetal sheep. *Exp Lung Res* 26: 105-119, 2000.

148. **Nehls V, Denzer K, and Drenckhahn D.** Pericyte involvement in capillary sprouting during angiogenesis in situ. *Cell Tissue Res* 270: 469-474, 1992.
149. **Noveral JP, Rosenberg SM, Anbar RA, Pawlowski NA, and Grunstein MM.** Role of endothelin-1 in regulating proliferation of cultured rabbit airway smooth muscle cells. *Am J Physiol* 263: L317-324, 1992.
150. **Okazaki T, Sharma HS, McCune SK, and Tibboel D.** Pulmonary vascular balance in congenital diaphragmatic hernia: enhanced endothelin-1 gene expression as a possible cause of pulmonary vasoconstriction. *J Pediatr Surg* 33: 81-84, 1998.
151. **Okoye BO, Losty PD, Lloyd DA, and Gosney JR.** Effect of prenatal glucocorticoids on pulmonary vascular muscularisation in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 33: 76-80, 1998.
152. **Olsen SL, Thibeault DW, Mabry SM, Norberg M, and Truog WE.** Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and capillary loading in premature infants with and without chronic lung disease. *Pediatr Pulmonol* 33: 255-262, 2002.
153. **Ostrow LW, Langan TJ, and Sachs F.** Stretch-induced endothelin-1 production by astrocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 36: S274-277, 2000.
154. **Pabst R and Tschernig T.** Perivascular capillaries in the lung: an important but neglected vascular bed in immune reactions? *J Allergy Clin Immunol* 110: 209-214, 2002.
155. **Panettieri RA, Jr., Goldie RG, Rigby PJ, Eszterhas AJ, and Hay DW.** Endothelin-1-induced potentiation of human airway smooth muscle proliferation: an ETA receptor-mediated phenomenon. *Br J Pharmacol* 118: 191-197, 1996.
156. **Papadakis K, De Paepe ME, Tackett LD, Piasecki GJ, and Luks FI.** Temporary tracheal occlusion causes catch-up lung maturation in a fetal model of diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 33: 1030-1037, 1998.
157. **Piedboeuf B, Laberge JM, Ghitulescu G, Gamache M, Petrov P, Belanger S, Chen MF, Hashim E, and Possmayer F.** Deleterious effect of tracheal obstruction on type II pneumocytes in fetal sheep. *Pediatr Res* 41: 473-479, 1997.
158. **Plouet J, Moro F, Bertagnoli S, Coldeboeuf N, Mazarguil H, Clamens S, and Bayard F.** Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor 189-amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect. *J Biol Chem* 272: 13390-13396, 1997.
159. **Post M.** Tissue interactions. In: *THE LUNG: Scientific Foundations Second Edition*, edited by R. G. Crystal JBW, et al. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997, p. 1003-1026.
160. **Probyn ME, Wallace MJ, and Hooper SB.** Effect of increased lung expansion on lung growth and development near midgestation in fetal sheep. *Pediatr Res* 47: 806-812, 2000.
161. **Raffestin B, Adnot S, Eddahibi S, Macquin-Mavier I, Braquet P, and Chabrier PE.** Pulmonary vascular response to endothelin in rats. *J Appl Physiol* 70: 567-574, 1991.
162. **Rosenberg AA, Kennaugh J, Koppenhafer SL, Loomis M, Chatfield BA, and Abman SH.** Elevated immunoreactive endothelin-1 levels in newborn infants with persistent pulmonary hypertension. *J Pediatr* 123: 109-114, 1993.
163. **Rubanyi GM and Polokoff MA.** Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev* 46: 325-415, 1994.

164. Sakai S, Miyauchi T, Kobayashi M, Yamaguchi I, Goto K, and Sugishita Y. Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. *Nature* 384: 353-355, 1996.
165. Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, and Masaki T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 348: 732-735, 1990.
166. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W, and Qin Y. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 376: 70-74, 1995.
167. Schachtner SK, Wang Y, and Scott Baldwin H. Qualitative and quantitative analysis of embryonic pulmonary vessel formation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22: 157-165, 2000.
168. Schittny JC, Djonov V, Fine A, and Burri PH. Programmed cell death contributes to postnatal lung development. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18: 786-793, 1998.
169. Schoefl GI. Electron Microscopic Observations on the Regeneration of Blood Vessels after Injury. *Ann N Y Acad Sci* 116: 789-802, 1964.
170. Serra R and Moses HL. pRb is necessary for inhibition of N-myc expression by TGF-beta 1 in embryonic lung organ cultures. *Development* 121: 3057-3066, 1995.
171. Shannon JM. Induction of alveolar type II cell differentiation in fetal tracheal epithelium by grafted distal lung mesenchyme. *Dev Biol* 166: 600-614, 1994.
172. Shima DT, Kuroki M, Deutsch U, Ng YS, Adamis AP, and D'Amore PA. The mouse gene for vascular endothelial growth factor. Genomic structure, definition of the transcriptional unit, and characterization of transcriptional and post-transcriptional regulatory sequences. *J Biol Chem* 271: 3877-3883, 1996.
173. Sims DE. The pericyte--a review. *Tissue Cell* 18: 153-174, 1986.
174. Smith NP, Jesudadson EC, and Losty PD. Congenital diaphragmatic hernia. *Paediatr Respir Rev* 3: 339-348, 2002.
175. Stelzner TJ, O'Brien RF, Yanagisawa M, Sakurai T, Sato K, Webb S, Zamora M, McMurtry IF, and Fisher JH. Increased lung endothelin-1 production in rats with idiopathic pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 262: L614-620, 1992.
176. Stewart AG, Grigoriadis G, and Harris T. Mitogenic actions of endothelin-1 and epidermal growth factor in cultured airway smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 21: 277-285, 1994.
177. Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, and Langleben D. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Intern Med* 114: 464-469, 1991.
178. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, and Yancopoulos GD. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 87: 1171-1180, 1996.
179. Takahashi K, Ghatei MA, Jones PM, Murphy JK, Lam HC, O'Halloran DJ, and Bloom SR. Endothelin in human brain and pituitary gland: comparison with rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 17 Suppl 7: S101-103, 1991.
180. Takayanagi R, Kitazumi K, Takasaki C, Ohnaka K, Aimoto S, Tasaka K, Ohashi M, and Nawata H. Presence of non-selective type of endothelin receptor on vascular endothelium and its linkage to vasodilation. *FEBS Lett* 282: 103-106, 1991.

181. **Tannuri U, Maksoud-Filho JG, Santos MM, Tannuri AC, Rodrigues CJ, and Rodrigues AJ, Jr.** The effects of prenatal intraamniotic surfactant or dexamethasone administration on lung development are comparable to changes induced by tracheal ligation in an animal model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 33: 1198-1205, 1998.
182. **Ten Have-Opbroek AA.** Lung development in the mouse embryo. *Exp Lung Res* 17: 111-130, 1991.
183. **Thebaud B, de Lagausie P, Forgues D, Aigrain Y, Mercier JC, and Dinh-Xuan AT.** ET(A)-receptor blockade and ET(B)-receptor stimulation in experimental congenital diaphragmatic hernia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L923-932, 2000.
184. **Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, and McDonald DM.** Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* 286: 2511-2514, 1999.
185. **Tischer E, Gospodarowicz D, Mitchell R, Silva M, Schilling J, Lau K, Crisp T, Fiddes JC, and Abraham JA.** Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-derived growth factor gene family. *Biochem Biophys Res Commun* 165: 1198-1206, 1989.
186. **Torfs CP, Curry CJ, Bateson TF, and Honore LH.** A population-based study of congenital diaphragmatic hernia. *Teratology* 46: 555-565, 1992.
187. **Tsukui T, Capdevila J, Tamura K, Ruiz-Lozano P, Rodriguez-Esteban C, Yonei-Tamura S, Magallon J, Chandraratna RA, Chien K, Blumberg B, Evans RM, and Belmonte JC.** Multiple left-right asymmetry defects in Shh(-/-) mutant mice unveil a convergence of the shh and retinoic acid pathways in the control of Lefty-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 11376-11381, 1999.
188. **Uchide T, Adur J, and Saida K.** Rapid quantification of murine endothelin-1 and vasoactive intestinal contractor gene expression levels by a real-time PCR system. *J Biotechnol* 84: 187-192, 2001.
189. **van Wamel AJ, Ruwhof C, van der Valk-Kokshoom LE, Schrier PI, and van der Laarse A.** The role of angiotensin II, endothelin-1 and transforming growth factor-beta as autocrine/paracrine mediators of stretch-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Mol Cell Biochem* 218: 113-124, 2001.
190. **VanderWall KJ, Skarsgard ED, Filly RA, Eckert J, and Harrison MR.** Fetendo-clip: a fetal endoscopic tracheal clip procedure in a human fetus. *J Pediatr Surg* 32: 970-972, 1997.
191. **Warburton D and Lee MK.** Current concepts on lung development. *Curr Opin Pediatr* 11: 188-192, 1999.
192. **Warburton D, Schwarz M, Tefft D, Flores-Delgado G, Anderson KD, and Cardoso WV.** The molecular basis of lung morphogenesis. *Mech Dev* 92: 55-81, 2000.
193. **Warburton D, Wuenschell C, Flores-Delgado G, and Anderson K.** Commitment and differentiation of lung cell lineages. *Biochem Cell Biol* 76: 971-995, 1998.
194. **Warner BB, Stuart LA, Papes RA, and Wispe JR.** Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice. *Am J Physiol* 275: L110-117, 1998.



195. **Weinstein M, Xu X, Ohyama K, and Deng CX.** FGFR-3 and FGFR-4 function cooperatively to direct alveogenesis in the murine lung. *Development* 125: 3615-3623, 1998.
196. **Wigglesworth JS, Desai R, and Hislop AA.** Fetal lung growth in congenital laryngeal atresia. *Pediatr Pathol* 7: 515-525, 1987.
197. **Willet KE, McMenamin P, Pinkerton KE, Ikegami M, Jobe AH, Gurrin L, and Sly PD.** Lung morphometry and collagen and elastin content: changes during normal development and after prenatal hormone exposure in sheep. *Pediatr Res* 45: 615-625, 1999.
198. **Wilson JM, DiFiore JW, and Peters CA.** Experimental fetal tracheal ligation prevents the pulmonary hypoplasia associated with fetal nephrectomy: possible application for congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 28: 1433-1439; discussion 1439-1440, 1993.
199. **Wirtz HR and Dobbs LG.** The effects of mechanical forces on lung functions. *Respir Physiol* 119: 1-17, 2000.
200. **Wong J, Fineman JR, and Heymann MA.** The role of endothelin and endothelin receptor subtypes in regulation of fetal pulmonary vascular tone. *Pediatr Res* 35: 664-670, 1994.
201. **Wu J, Ge X, Verbeken EK, Gratacos E, Yesildaglar N, and Deprest JA.** Pulmonary effects of in utero tracheal occlusion are dependent on gestational age in a rabbit model of diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 37: 11-17, 2002.
202. **Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw S, deWit D, and Yanagisawa M.** ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* 78: 473-485, 1994.
203. **Yanagisawa M, Inoue A, Ishikawa T, Kasuya Y, Kimura S, Kumagaye S, Nakajima K, Watanabe TX, Sakakibara S, Goto K, and et al.** Primary structure, synthesis, and biological activity of rat endothelin, an endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 6964-6967, 1988.
204. **Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, and Masaki T.** A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411-415, 1988.
205. **Yoshizawa J, Chapin CJ, Sbragia L, Ertsey R, Gutierrez JA, Albanese CT, and Kitterman JA.** Tracheal Occlusion Stimulates Cell Cycle Progression and Type I Cell Differentiation in Lungs of Fetal Rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003.
206. **Zamora MA, Dempsey EC, Walchak SJ, and Stelzner TJ.** BQ123, an ETA receptor antagonist, inhibits endothelin-1-mediated proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9: 429-433, 1993.
207. **Zamora MR, Stelzner TJ, Webb S, Panos RJ, Ruff LJ, and Dempsey EC.** Overexpression of endothelin-1 and enhanced growth of pulmonary artery smooth muscle cells from fawn-hooded rats. *Am J Physiol* 270: L101-109, 1996.
208. **Zeng X, Wert SE, Federici R, Peters KG, and Whitsett JA.** VEGF enhances pulmonary vasculogenesis and disrupts lung morphogenesis in vivo. *Dev Dyn* 211: 215-227, 1998.