



Disponible en ligne sur  
 ScienceDirect  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France  
 EM|consulte  
www.em-consulte.com



SÉRIE « ANOMALIES DU DÉVELOPPEMENT PULMONAIRE »  
Coordonnée par *Christophe Delacourt*

## Hernie congénitale du diaphragme : mécanismes de l'hypoplasie pulmonaire

Congenital diaphragmatic hernia – mechanisms of pulmonary hypoplasia

A. Labbé<sup>a,\*</sup>, K. Coste<sup>a,b</sup>, P.-J. Déchelotte<sup>c</sup>

<sup>a</sup> *Unité de réanimation néonatale et pédiatrique, CHU d'Estaing, 1, place Lucie-Aubrac, 63003 Clermont-Ferrand, France*

<sup>b</sup> *GReD CNRS UMR 6247, Inserm U931, faculté de médecine, université de Clermont, BP 38, 28, place Henri-Dunant, 63001 Clermont-Ferrand, France*

<sup>c</sup> *Laboratoire d'anatomie pathologique, CHU d'Estaing, 1, place Lucie-Aubrac, 63003 Clermont-Ferrand, France*

Reçu le 21 septembre 2010 ; accepté le 4 octobre 2010  
Disponible sur Internet le 17 mars 2011

### MOTS CLÉS

Hernie diaphragmatique congénitale ; Hypoplasie pulmonaire ; Physiopathologie

**Résumé** La hernie diaphragmatique congénitale (HDC) est une cause fréquente de détresse respiratoire néonatale. La mortalité et morbidité de cette affection sont en grande partie liée à l'hypoplasie pulmonaire et à l'existence d'une hypertension artérielle pulmonaire résistante au traitement. La pathogénie de la HDC et de ses malformations associées est en grande partie méconnue malgré des recherches importantes. Elle est basée sur la conception que la hernie des viscères abdominaux dans la cavité thoracique perturbe le développement du poumon. L'hypoplasie pulmonaire peut être également la conséquence d'un défaut d'expansion liée à la diminution des mouvements respiratoires. Nos connaissances sur la physiopathologie ont bénéficié de modèles animaux variés (chimiques ou génétiques). Ces études ont démontré que l'hypoplasie pulmonaire résultait de la perturbation de mécanismes moléculaires impliqués dans le développement embryonnaire du poumon. Des données récentes confèrent aux acides rétinoïques un rôle central dans les mécanismes de formation de la HDC. Bien que dans la plupart des cas, la HDC survient de façon sporadique, des résultats conséquents découlent de l'étude des syndromes génétiques et d'anomalies chromosomiques découvertes chez des patients. Des recherches sont encore nécessaires pour approfondir nos connaissances sur le développement pulmonaire normal et anormal dans la HDC. De telles études devraient permettre d'améliorer nos possibilités thérapeutiques et peut-être nos mesures préventives.

© 2011 SPLF. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : [alabbe@chu-clermontferrand.fr](mailto:alabbe@chu-clermontferrand.fr) (A. Labbé).

**KEYWORDS**

Congenital diaphragmatic hernia;  
Lung hypoplasia;  
Pathophysiology

**Summary** Congenital diaphragmatic hernia (CDH) is a common cause of severe neonatal respiratory distress. Mortality and morbidity are determined by the amount of pulmonary hypoplasia (PH) that occurs and by the development of therapy-resistant pulmonary hypertension. The pathogenesis and aetiology of CDH and its associated anomalies are still largely unknown despite all research efforts. The pathogenesis of CDH is based on an assumption linking herniation of abdominal viscera into the thorax with compression of the developing lung. PH, however, can also result from reduced distension of the developing lung secondary to impaired fetal breathing movements. Our understanding of CDH has also been aided by basic research with the use of dietary, teratogen-induced, and knockout models of CDH. These studies indicate that lung hypoplasia may involve disturbances of mitogenic signalling pathways fundamental to embryonic lung development. Recent data reveal the role of disruption of a retinoid-signalling pathway in the pathogenesis of CDH. Although multifactorial inheritance may best explain most cases of CDH in humans, much has been learned about the genetic factors that play a role in the development of CDH by studies of patients with CDH caused by specific genetic syndromes and chromosome anomalies. More research is warranted to improve our understanding of normal and abnormal lung development in relation to CDH. Such investigations will help in the design of new treatment strategies to improve the natural course or even to prevent this anomaly.

© 2011 SPLF. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## Introduction

La hernie diaphragmatique congénitale (HDC) est une cause majeure de détresse respiratoire néonatale, non par sa fréquence, qui reste faible par rapport aux autres étiologies, mais surtout par les implications éthiques, diagnostiques et thérapeutiques qu'elle soulève. En dehors du problème spécifique de la gestion des malformations associées [1–4] qui font partie intégrante de l'évaluation initiale, c'est l'importance de l'hypoplasie pulmonaire (HP) et de la vasculopathie artérielle pulmonaire (VAP) qui conditionne le pronostic vital [5–8]. La morbidité à court ou très long terme est elle-aussi en grande partie liée à ces deux problèmes très caractéristiques de cette pathologie [9–14]. Comprendre la physiopathologie de l'HP, c'est essayer d'en prévenir la gravité par la thérapie foetale mais c'est aussi progresser dans les connaissances des mécanismes intimes de la croissance pulmonaire. De très nombreux articles sont consacrés à la HDC depuis quelques années [15–22]. Cette revue générale est essentiellement centrée sur les données actuelles concernant les mécanismes moléculaires et physiques de l'HP dans la HDC.

## Le développement diaphragmatique

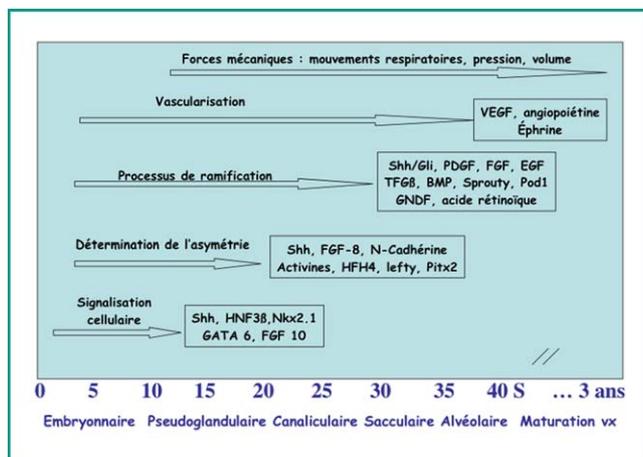
La mise en place du diaphragme se fait, entre la quatrième et la dixième semaine de gestation chez l'homme, grâce à la fusion de trois structures embryonnaires : le *septum transversum*, les membranes pleuropéritonéales et le méso-œsophage. Le *septum transversum* apparaît en regard des somites cervicaux durant la quatrième semaine de développement. Il naît de la partie la plus crâniale du mésenchyme puis descend, s'attache sur les parois ventrales et latérales de l'embryon et en arrière sur l'intestin primitif. Il va séparer la cavité abdominale de la cavité thoracique mais pas entièrement. En effet, il laisse persister une communication de chaque côté au niveau de la région

postérieure. Ces orifices sont appelés canaux pleuropéritonéaux. Ces canaux sont ensuite comblés, entre la cinquième et septième semaine, grâce à l'apparition des membranes pleuropéritonéales qui prennent naissance au niveau des parois thoraciques postérolatérales et fusionnent avec le *septum transversum* et le mésentère dorsal de l'œsophage. L'ensemble de ces événements est finement régulé [23,24]. Les phénomènes de musculation sont sous la dépendance de Pax3, Lbx1, scatter factor/hepatocyte growth factor (SC/HGF) et son récepteur c-met, Fog2, Gab1 ainsi que les *myogenic regulatory factors* (MRF) tels que MyoD, Myf-5, Mfr-4, *myogenin*.

## Le développement pulmonaire

L'ébauche pulmonaire apparaît à trois semaines révolues (26<sup>e</sup> jour). Il s'agit d'un diverticule ventral de l'intestin antérieur qui apparaît à l'extrémité caudale du sillon laryngotrachéal. Il constitue l'ébauche trachéale. À son extrémité apparaissent des bourgeons bronchiques droits et gauches, puis les bourgeons lobaires qui subissent une série de divisions dichotomiques permettant l'apparition des conduits de conduction aériennes et d'échanges jusqu'aux canaux alvéolaires.

Parallèlement à l'organogenèse, le parenchyme pulmonaire se différencie progressivement. Quatre phases peuvent être distinguées : la phase pseudoglandulaire (sixième à 16<sup>e</sup> semaine), qui constitue la mise en place des conduits aériens de conduction ; la phase canaliculaire (17<sup>e</sup>–24<sup>e</sup> semaine) qui correspond au développement des conduits aériens distaux d'échanges, bronchioles respiratoires et au-delà ; la phase sacculaire (25<sup>e</sup>–36<sup>e</sup> semaine) durant laquelle les structures alvéolaires se développent et la membrane alvéolaire s'amincit. Les cellules alvéolaires se différencient en pneumocytes de type I et II dans les secteurs aériens distaux, cellules ciliées et cellules de Clara dans les conduits bronchiolaires. La phase alvéolaire



**Figure 1.** Schéma simplifié montrant quelques facteurs physiques et biologiques impliqués dans le développement pulmonaire.

(37<sup>e</sup> semaine, deux à trois ans), durant laquelle des alvéoles primitives sont individualisés dans la paroi sacculaire. L'alvéolisation représente l'essentiel des phénomènes post-nataux. Le nombre des sacs terminaux permettant les échanges gazeux augmentent de 20 millions chez le nouveau-né jusqu'à 300 millions à deux ans, puis ne s'accroît plus jusqu'à l'âge adulte. Ensuite, les alvéoles augmentent en taille jusqu'à la fin du développement de la cage thoracique, réalisant l'adaptation du contenu au contenant.

Le développement pulmonaire est un phénomène progressif obéissant à de nombreux facteurs physiques et biologiques (Fig. 1).

Les facteurs mécaniques sont essentiels et interviennent à différents niveaux : espace d'expansion disponible dans le thorax, sécrétion de liquide pulmonaire et mouvements respiratoires fœtaux [25]. Le rôle de cette composante physique de la croissance alvéolaire a été parfaitement démontré par l'expérimentation animale. L'importance de la circulation du liquide pulmonaire dans les futurs espaces aériens est prouvée depuis de nombreuses années. L'accumulation, durant la vie fœtale, du liquide pulmonaire crée une discrète hyperpression (2–3 mmHg) qui maintient le tissu pulmonaire dans un état d'étirement relatif [26–29]. La création d'une fuite du liquide pulmonaire par trachéostomie in utero conduit à l'apparition d'un poumon hypoplasique [26,27,30]. À l'inverse, l'occlusion de la trachée génère une hyperpression par blocage de l'écoulement du liquide pulmonaire et provoque une hyperplasie pulmonaire avec une réduction du nombre de pneumocytes de type II [31–34]. Durant la gestation, le volume du liquide pulmonaire est retenu dans les voies aériennes grâce au tonus des muscles laryngés et du diaphragme. À chaque mouvement respiratoire fœtal, le tonus laryngé diminue, favorisant la sortie du liquide pulmonaire tandis que les mouvements inspiratoires du diaphragme s'opposent à cette fuite [26,27].

Les interactions entre l'épithélium et le mésenchyme sont à la base des phénomènes développementaux pulmonaires. Ces deux feuillettes sont séparés par une membrane basale qui est une matrice extracellulaire comportant différentes macromolécules (comme des collagènes, des

laminines, du nidogène, de la fibromoduline, de la fibronectine ou des protéoglycannes...) capables de moduler leur interaction. À titre d'exemple, la suppression du site de liaison du nidogène dans une laminine entraîne des anomalies du développement pulmonaire [35]. La transition entre un épithélium proximal et distal (au cours du stade canaliculaire) coïncide avec un amincissement et une « perforation » de la membrane rendant plus facile ces communications [36]. Physiologiquement, la membrane basale est dégradée par des métalloprotéases ou *matrix metalloproteinase* (MMP). Tout déséquilibre de la balance MMP et de leurs inhibiteurs (*tissue inhibitors of MMP* [TIMP]) peut compromettre le développement pulmonaire. Ainsi, Gill et al. [37] démontrent que les souris mutantes homozygotes pour le gène TIMP-3 présentent une diminution des phénomènes de ramifications bronchiques avec des bourgeons distaux dilatés.

Plusieurs gènes ont été identifiés comme régulateurs de la ramification bronchique. Les gènes *GLI2* et *3* codant des facteurs de transcription sont déterminants pour la mise en place du bourgeon trachéal. Les souris homozygotes nulles pour les gènes *GLI2* ou *3* ont une agénésie de la trachée [38]. Plus tardivement, les divisions bronchiques sont sous la dépendance de *fibroblast growth factor 10* (FGF10) et de son récepteur FGFR2. L'inactivation de FGFR2 par excision d'un exon entraîne une agénésie pulmonaire (tubes non ramifiés) tout comme l'inactivation du gène *FGF10* chez la souris [38]. FGF10 est exprimé par le mésenchyme et FGFR2 par l'épithélium. L'expression de FGF10 doit être inhibée en des points précis du mésenchyme pour créer une nouvelle ramification. Ces inhibiteurs épithéliaux de FGF10 sont Sonic hedgehog (Shh) et son récepteur Ptc1, dont les souris mutantes présentent des défauts de ramifications bronchiques. Les inhibiteurs mésenchymateux de FGF10, comme le Transforming Growth Factor<sup>®</sup> 1 (TGFβ1), sont également capables de réguler la prolifération épithéliale et d'induire la synthèse de matrice extracellulaire. L'implication d'autres molécules comme *Bone morphogenetic protein 4* (BMP4), *Sprouty2* et *4* est maintenant bien établie [39–41].

## Des souris et des hommes... ou l'apport de la recherche expérimentale à la compréhension de la physiopathologie de la hernie diaphragmatique congénitale

De nombreux modèles tirés de l'expérimentation animale ont été utilisés depuis de nombreuses années pour percer le mécanisme intime de cette affection [42]. Aucun n'est parfait mais beaucoup sont complémentaires dans l'approche physiopathologique qu'elle facilite. On doit aux modèles chirurgicaux, qu'il s'agisse de primate, de brebis [43,44] ou de lapins [45,46], l'appréciation fine de l'importance de l'HP et sa prédominance du côté atteint. Ce sont eux qui ont permis de valider les techniques de thérapies fœtales [47], notamment celle qui est employée de nos jours dans des centres spécialisés (occlusion trachéale). Le reproche essentiel fait à ces modèles concerne le caractère tardif de la création du défaut (souvent au stade pseudoglandulaire)

- Dans la HDC, le pronostic vital dépend de l'importance de l'HP et de la VAP.
- La mise en place du diaphragme se fait entre la quatrième et la dixième semaine de gestation chez l'homme, grâce à la fusion de trois structures embryonnaires: le *septum transversum*, les membranes pleuropéritonéales et le mésocœsophage.
- On distingue quatre phases du développement alvéolaire: la phase pseudoglandulaire, la phase canaliculaire, la phase sacculaire et la phase alvéolaire.
- Les interactions entre l'épithélium et le mésenchyme sont à la base des phénomènes développementaux pulmonaires.

- L'HP serait liée à une double atteinte, embryonnaire par un agent environnemental, aggravée durant la vie fœtale par les contraintes mécaniques liées à la présence intrathoracique des viscères abdominaux.
- Les mécanismes cellulaires expliquant les anomalies malformatives font intervenir différents facteurs de croissance et de différenciation dont l'acide rétinolique apparaît l'élément régulateur.

durant la période fœtale et bien sûr l'absence d'anomalies associées si fréquentes dans cette pathologie.

C'est ce qui a conduit de nombreuses équipes à utiliser des modèles « chimiques » intervenant à un stade précoce du développement embryonnaire et plus à même de mimer la situation envisagée chez l'homme. Le plus employé est le nitrofène (2, 4-dichlorophényl-p-nitrophényl éther), dont la tératogénicité chez l'animal a été démontrée il y a plus de 40 ans. La survenue de malformations variées touchant le diaphragme mais aussi les poumons, le cœur et le système nerveux central en ont fait le candidat idéal pour reproduire cette affection chez le rat [48]. C'est à ce modèle que l'on doit la découverte de l'existence d'une HP avant la formation de la brèche diaphragmatique, ouvrant ainsi la théorie de la double atteinte, embryonnaire par un agent environnemental, aggravée durant la vie fœtale par les contraintes mécaniques liées à la présence intrathoracique des viscères abdominaux. Il est, bien sûr, impossible d'extrapoler complètement ce schéma physiopathologique à l'homme car les modifications induites peuvent être dues à l'effet du nitrofène. Les mécanismes cellulaires expliquant les anomalies malformatives font intervenir différents facteurs de croissance et de différenciation dont l'acide rétinolique apparaît l'élément régulateur [49].

Grace au développement de la biologie moléculaire, il est possible également d'avoir recours à des modèles génétiques, le plus souvent des souris dont on a invalidé un gène (souris *Knock out*). L'idée est d'étudier le rôle de gène candidat soit à la HDC ou à l'HP. Plusieurs revues exhaustives sont consacrées à ce sujet [41,50,51]. Les modèles les plus souvent cités sont ceux des souris double mutantes pour les gènes *wt1* (*wilms tumor 1*); *Sonic Hedhog* (*shh*), *Gli2,3*, *fg2*, *Slit1*, *gata4,6*, *Coup-TFII*, *PDGF* et bien d'autres...

## La formation de la brèche diaphragmatique reste encore discutée

La HDC se définit par la persistance d'un orifice au niveau du diaphragme situé dans 84% des cas au niveau postéro-latéral gauche, dans 12% au niveau postéro-latéral droit et dans 2% des deux côtés. La taille de cet orifice est variable allant de quelques millimètres à une agénésie complète de

couple. Sa formation est très précoce au cours de la grossesse puisqu'elle a lieu à la mise en place du diaphragme primitif (avant dix semaines de gestation). Les mécanismes sont encore mal connus et de nombreuses hypothèses sont émises [15]. La première repose sur l'interposition d'une anse intestinale lors de la fermeture du diaphragme gênant l'obturation des canaux pleuropéritonéaux. Mais celle-ci semble improbable. En effet, la réintroduction de l'intestin primitif a lieu plus tardivement que la mise en place du diaphragme. De par sa localisation, les hernies se situent plus médialement que les canaux pleuropéritonéaux. Une seconde hypothèse suggère que l'anomalie pulmonaire précède la formation du défaut diaphragmatique. On constate, en effet, des anomalies pulmonaires bilatérales et pas uniquement du côté où se trouve la brèche diaphragmatique. Le poumon présente donc un développement anormal avant que le diaphragme ne soit formé [52]. Mais cette hypothèse semble peut réaliste. En effet, la hernie de viscère dans la cage thoracique entraîne une déviation médiastinale controlatérale qui est aussi responsable d'un phénomène de compression sur le poumon controlatéral à la HDC, d'où des anomalies pulmonaires diffuses. Enfin, les agénésies pulmonaires chez l'homme ou l'animal ne sont que rarement associées à des HCD [53]. Une autre théorie est que la malformation diaphragmatique est secondaire à une anomalie d'innervation par les nerfs phréniques. Elle a été évoquée sur la constatation d'une diminution de taille et du nombre d'axones au niveau du nerf phrénique homolatéral à la HCD [54]. Mais la taille d'un nerf et le nombre est connue pour être proportionnelle à la quantité de masse musculaire à innover. Cette même équipe a retrouvé une apoptose majorée au niveau des motoneurons après l'apparition de la HDC. Cette donnée place l'hypotrophie du nerf phrénique homolatéral comme une conséquence de la hernie et non comme une cause. Une insuffisance de colonisation du diaphragme par les cellules musculaires le rendant fragile a aussi été évoquée [55]. Toutefois, cette théorie est peu convaincante du fait de l'absence d'anomalies des myotubes dans le modèle nitrofène de HDC. Une hypothèse séduisante est celle d'une anomalie au niveau des membranes pleuropéritonéales. En effet, Allan et Greer [54] ont retrouvé des membranes pleuropéritonéales anormales très tôt dans le développement lors de la création de HDC avec le nitrofène. Une augmentation de la mort cellulaire au niveau des somites cervicaux qui participent à la formation de ces membranes a également été notée [56]. Il semble que l'anomalie initiale provienne de la partie mésenchymateuse amusculaire des futures membranes pleuropéritonéales plutôt qu'une migration anormale des précurseurs musculaires [57]. Le *primum movens* des défauts diaphragmatiques

semble plus précoce que ce que l'on pensait. Le défaut de comblement des canaux pleuropéritonéaux par les membranes pleuropéritonéales serait dû à une anomalie au niveau de leur précurseur : le mésenchyme amusculaire issu des somites cervicaux.

### Hypoplasie pulmonaire et vasculopathie artérielle pulmonaire sont étroitement associées

C'est par la création de modèles animaux chirurgicaux de HDC que l'on doit une partie des données sur l'HP et la VAP. Lipsett et al. [58] sur des fœtus de brebis retrouvent une diminution conséquente des rapports poids pulmonaire sur poids corporel total, une diminution très importante du poids pulmonaire (37,7g vs 116,3g) et une réduction nette du volume pulmonaire fixé (33,6ml vs 96,9ml) et des surfaces d'échanges gazeux (4,56m<sup>2</sup> vs 13,70m<sup>2</sup>). Dans ce travail, l'atteinte est plus marquée sur le lobe supérieur gauche. Les travaux sur le fœtus humain sont souvent anciens [59–61]. Ainsi, George et al. [62] ont analysé les poumons de dix nourrissons décédés d'une HDC en période périnatale. Ils concluent à des poumons immatures par rapport à l'âge gestationnel avec un caractère plus marqué de retard maturatif du côté de la hernie. Le compte radial alvéolaire (CRA), élément objectif de la croissance alvéolaire [63], est diminué dans tous les cas, avec une atteinte plus nette du côté ipsilatéral. Ces dernières données sont à rapprocher des conclusions de Wilcox et al. [64] qui, en plus des données quantitatives suscitées, relèvent une diminution de la quantité et de la qualité du surfactant ainsi que des activités antioxydatives. Les travaux plus récents confirment ces travaux initiaux [65]. Bargy et al. [66] ont analysé les poumons de 143 fœtus humains entre 22 et 40 semaines de gestation. Ils ont effectué une étude histologique complète intégrant l'appréciation de la croissance alvéolaire (poids pulmonaire, CRA) mais aussi l'épaississement médial des parois artérielles pulmonaires, confirmant la présence d'anomalies histologiques majeures des deux compartiments alvéolaires et vasculaires. C'est le mérite de Heerema et al. [67] d'avoir procédé à l'autopsie de 16 cas d'HDC traités pendant la vie fœtale (occlusion trachéale) comparée à celle de 19 autres n'ayant pas subi d'intervention in utero. Dans tous les cas d'occlusion trachéale, il existe une distension pulmonaire avec une augmentation du rapport poids pulmonaire sur poids corporel total qui s'accompagne malheureusement d'une diminution du CRA et de la taille des alvéoles. On note chez tous les enfants un épaississement des septums alvéolaires plus marqué toutefois chez les fœtus sans intervention in utero. L'excès de mucus dans les voies aériennes et les alvéoles explique une partie de la distension.

### La perturbation de gènes régulateurs et de facteurs de transcription est un phénomène précoce qui s'étale probablement dans le temps

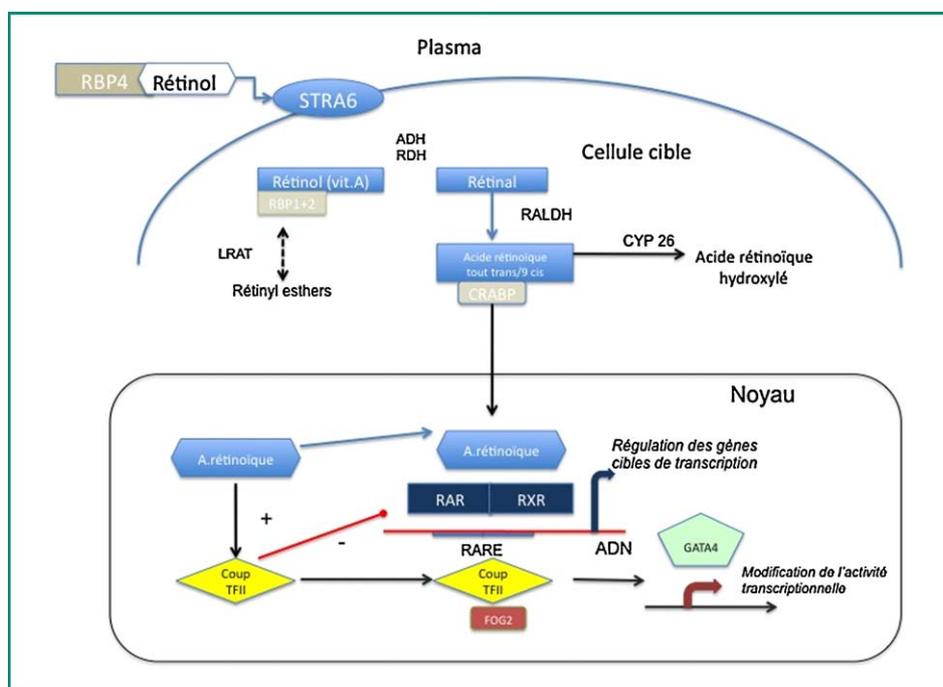
Plusieurs agents environnementaux (radiations ionisantes, médicaments, alcool, pesticides, micro-organismes...) sont

responsables d'avortements spontanés ou de malformations congénitales. Les événements tératogènes surviennent entre la troisième et la huitième semaine de gestation, à une période critique du développement. C'est à ce stade que ces agents peuvent interférer avec les lignées germinatives mésodermiques et endodermiques qui sont alors contiguës. Cela explique les anomalies des organes qui en sont dérivés (poumon, cœur, diaphragme...). Il est désormais établi que la perturbation de gènes et de facteurs de transcription responsables de la formation de ces tissus est en cause dans la physiopathologie de l'HP et de la VAP. De très nombreux gènes candidats sont actuellement étudiés. Les techniques d'analyse génomique et protéomique vont certainement permettre de faire un bond en avant dans cette approche moléculaire de la physiopathologie de cette affection. Dès aujourd'hui, on considère qu'il existe des arguments expérimentaux suffisant pour incriminer certains facteurs comme TTF1, FGF10, Hox, HFN, gata4,6, bFGF, lefty, nodal, COUP-TFII, VEGF et bien d'autres [68–82].

- La formation de la brèche diaphragmatique est très précoce au cours de la grossesse, au cours de la mise en place du diaphragme primitif (avant dix semaines de gestation).
- Il existe de nombreuses théories, encore discutées, sur la formation de la brèche diaphragmatique.
- On sait maintenant que la perturbation de gènes et de facteurs de transcription responsables de la formation du poumon, du cœur et du diaphragme intervient dans la physiopathologie de l'HP et de la VAP.

Les facteurs mécaniques expliquent l'aggravation de l'HP et sa prédominance du côté de la hernie.

La hernie entraîne des contraintes mécaniques : l'activité inspiratoire in utero du diaphragme est diminuée (dépression pleurale moindre due à la présence d'un orifice). Elle provoque une augmentation de la fuite du liquide pulmonaire par le larynx, une distension moindre du tissu pulmonaire. La position thoracique des viscères réduit l'espace d'expansion du poumon en voie de développement et exerce une pression sur celui-ci, interférant avec sa croissance et conduisant à une HP (baisse du rapport poids pulmonaire/poids corporel total). Des séries autopsiques ont constaté une nette diminution du nombre de divisions bronchiques des deux côtés mais plus marquée au niveau homolatéral (12–14 dans le poumon homolatéral contre 16–18 dans le poumon controlatéral au lieu de 25), (Fig. 2) mais aussi une réduction du nombre de bronchioles terminales et de la surface alvéolaire [59,60]. La réduction de la surface alvéolaire appréciée histologiquement par le CRA est aussi associée à des anomalies épithéliales avec la constatation d'un excès de pneumocyte de type II [83] qui crée une altération morphologique (cloisons alvéolaires plus épaisses) mais aussi fonctionnelle de la barrière alvéolocapillaire.



**Figure 2.** Modèle conceptuel décrivant la synthèse de l'acide rétinoïque et le transport du rétinol dans les cellules cibles à partir de sa liaison dans le plasma par la RBP4 (retinol binding protein). STRA6 lie RBP4, extrait le rétinol et permet son passage transmembranaire et son métabolisme. À l'intérieur de la cellule cible, le rétinol se lie à une protéine de liaison (cellular retinol binding protein) qui régule le métabolisme cellulaire du rétinol et le présente à deux enzymes (alcool ou retinyl déshydrogénase) pour sa conversion en rétinol ou en retinyl esthérifié (LRAT). Le rétinol est ensuite oxydé en acide rétinoïque par l'intermédiaire d'une enzyme clé (retinyl alcool deshydrogénase [RALDH]). Les protéines de liaisons (*cellular retinoic acid binding protein* [CRABP]) permettent à l'acide rétinoïque d'entrer dans le nucléus où il peut exercer ses activités biologiques par une liaison avec des récepteurs nucléaires *retinoid acid receptor* (RAR) et RXR. L'excès d'acide rétinoïque est catabolisé dans le cytoplasme par une enzyme (CYP26). Dans le nucléus, l'acide rétinoïque se lie à des récepteurs qui s'hétérodimérisent et se lient à une séquence spécifique d'ADN (*Retinoid acid response element* [Rare]). Cette liaison active la transcription de nombreux gènes cibles. COUP-TFII peut agir comme un antagoniste de cette voie en séquestrant directement RXR et en prévenant l'hétérodimérisation et donc le transport. COUP-TFII interagit avec FOG2 qui module l'activité transcriptionnelle des protéines GATA4 qui sont des facteurs de transcription jouant un rôle essentiel dans l'embryogénèse précoce.

- La hernie exerce des contraintes mécaniques : baisse de l'activité inspiratoire in utero du diaphragme, augmentation de la fuite du liquide pulmonaire par le larynx, distension moindre du tissu pulmonaire par baisse de l'espace d'expansion du poumon par les viscères, entraînant une HP.
- L'augmentation du nombre de pneumocytes de type II crée une altération morphologique (cloisons alvéolaires plus épaisses) mais aussi fonctionnelle de la barrière alvéolocapillaire.

### Petit muscle, petit poumon... ou l'impact de la musculature lisse des voies aériennes sur la croissance pulmonaire

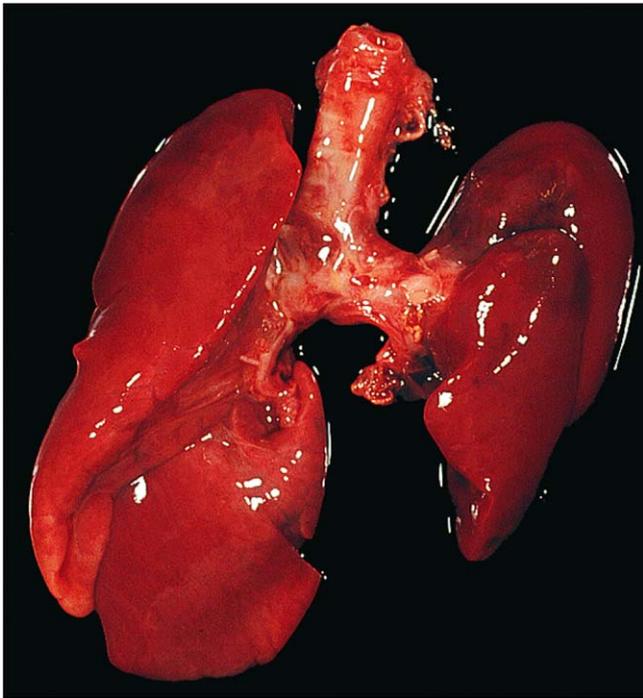
On sait que le péristaltisme des voies aériennes est un des déterminants de la croissance pulmonaire dans le sens où il génère une pression dans les futures voies aériennes. Il est fonctionnel très tôt dans la vie fœtale. L'équipe de Jesudson et al. [84–89] s'intéresse depuis de nombreuses années au rôle du dysfonctionnement de la musculature lisse des voies aériennes. Elle a effectué des travaux particulière-

ment démonstratifs sur le rôle de la contractilité des voies aériennes durant la vie fœtale sur la croissance pulmonaire. Cette contractilité est calcium dépendante. En utilisant des inhibiteurs calciques, on produit une HP plus ou moins importante selon la molécule utilisée. L'hypothèse développée par les auteurs est que le dysfonctionnement de la musculature lisse des voies aériennes précède la formation de la hernie diaphragmatique et que son impact sur la croissance pulmonaire se poursuit durant la période fœtale (Fig. 2).

- Le péristaltisme des voies aériennes intervient dans la croissance pulmonaire.
- Le dysfonctionnement de la musculature lisse des voies aériennes précéderait la formation de la hernie diaphragmatique, puis perturberait la croissance pulmonaire par la suite.

### Vascularisation et régulation de la croissance pulmonaire

Il est clair qu'une grande partie des difficultés que nous rencontrons à la naissance est liée à la stabilisation de l'hypertension artérielle pulmonaire. Elle est la consé-



**Figure 3.** Image macroscopique de la différence de taille des deux poumons chez un nouveau-né décédé d'une hernie diaphragmatique gauche. L'hypoplasie prédomine nettement du côté gauche de la hernie.

quence de la VAP précédemment décrite associant une prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires avec épaississement de la média des artères. Contrairement aux travaux de recherche sur les facteurs de croissance du poumon, les mécanismes du développement artériel pulmonaire sont moins connus, les travaux les plus anciens suggérant que la vascularisation artérielle pulmonaire suivait le développement bronchique. Les études les plus récentes centrées sur les interactions épithélium endothélium démontrent au contraire un rôle initiateur du développement artériel sur les voies aériennes. Ainsi, Awasthi et al. [90] ont mis en évidence des effets antagonistes d'un facteur angiogénique (*endotheline monocyte activating peptide II*) sur la néovascularisation pulmonaire entraînant de façon concomitante une inhibition de la morphogénèse pulmonaire. Cette même équipe, sur des modèles de culture organique cœur-poumon, a démontré que la stimulation de la vascularisation pulmonaire provoquait une croissance des voies aériennes. Nous disposons de peu d'informations sur les acteurs des modulateurs de la régulation de ce développement vasculaire comme le VEGF, le *endothelial nitric oxide synthase* (NOS), l'éphrine, l'*endothelin 1* (ET-1) et les facteurs de croissance mésenchymateux comme les métalloprotéinases de la matrice. Des données expérimentales suggèrent, toutefois, un rôle déterminant du VEGF, du NO et de l'ET-1 [91–94]. Il est certain que ce domaine de recherche ne doit pas être négligé, compte tenu des possibilités thérapeutiques qui lui sont attachées.

- Le développement artériel pulmonaire aurait un rôle initiateur sur celui des voies aériennes.
- Les principaux modulateurs de la régulation de ce développement vasculaire sont le VEGF, le NO et l'ET-1.

### Le rôle central de la vitamine A et des acides rétinoïques dans le développement pulmonaire et la genèse de la hernie diaphragmatique congénitale

L'acide rétinoïque joue un rôle essentiel dans le développement pulmonaire (Fig. 3). Il intervient à tous les stades de l'embryogenèse et de la morphogénèse. Il est fortement impliqué dans le phénomène de ramifications, permettant une prolifération normale du mésoderme et l'induction de l'expression de FGF 10 dans une fenêtre de temps précise (avant le bourgeonnement primaire). Il a une action également à un stade ultérieur, en inhibant le FGF 10 (action directe ou augmentation de l'expression du gène *Sonic Hedgehog*) lors de la ramification bronchique permettant un développement normal des voies aériennes. Une des hypothèses sur la formation des HDC idiopathiques est la « retinoid hypothesis » formulée par Greer et al., en 2003 [95]. Elle est basée sur une série de données animales qui mettent en évidence un lien entre une perturbation du « signal rétinoïde » pendant la gestation et la survenue de HDC chez les fœtus. La diminution des apports en vitamine A chez des rates gestantes entraîne la formation de HDC, la réintroduction de la vitamine A surtout entre les dixième et 11<sup>e</sup> jour de gestation permettait d'en réduire l'incidence [96]. Les souris double mutantes pour les récepteurs RAR  $\alpha\beta 2$  présentent des HDC droites tandis que les doubles mutants RAR $\alpha$ /RAR $\beta$  ou RAR $\alpha$ /RXR $\alpha$  ont des défauts gauches [53]. L'exposition à des agents tératogènes interfère avec la synthèse d'acide rétinoïque. Le nitrofène est capable de réduire de manière significative le taux d'acide rétinoïque par blocage de la fonction (et non de sa synthèse) de la principale enzyme de transformation du rétinol en acide rétinoïque RALDH2. Ce phénomène est totalement réversible si l'on supplémente les rates directement en acide rétinoïque (le taux de HDC passe de 54 à 8%). La supplémentation simple en rétinol permet de réduire l'incidence des HDC mais de manière moins importante. Cette réduction partielle des HDC avec le rétinol permet de conclure que l'effet de blocage enzymatique de RALDH2 peut être partiellement court-circuité par l'augmentation du substrat. L'administration directe d'acide rétinoïque [97] permet de contourner cette cascade enzymatique et donc d'obtenir une diminution nettement supérieure du taux de HDC [98]. D'autres toxiques sont capables d'intervenir plus en aval de la cascade enzymatique et d'interférer directement avec les récepteurs nucléaires spécifiques aux rétinoïdes. Le BMS493 est un pan-antagoniste des RAR, son utilisation pendant la gestation induit un pourcentage élevé de HDC [49]. Plus récemment

**Tableau 1** Syndromes monogéniques dans lesquels la constatation d'une hernie diaphragmatique congénitale est fréquente.

Cornélia de Lange  
Dysplasie cranio-frontonasale  
Denys-Drash  
Donnai-Barrow  
Fryns  
Matthew-Wood  
Dysplasie spondylocostale  
Simpson-Golabi-Behmel

enfin, le récepteur membranaire du rétinol appelé STRA6 a été mis en évidence [99].

Chez l'homme, il existe actuellement très peu d'études cliniques reliant les rétinoïdes à la HDC. Les concentrations de rétinol et de *retinol binding protein* ont été dosées dans le sang du cordon chez 11 nouveau-nés atteints d'une HDC et chez 11 enfants sains. Ces taux étaient abaissés de 50% chez les nouveau-nés avec HDC. Toutefois, ces deux marqueurs étaient en concentration anormalement élevée chez la mère, ce qui a permis d'évoquer une possible détérioration du rétinol lors de son passage placentaire [100]. Une étude récente (communication personnelle) de l'équipe de Dick Tibboel retrouve des conclusions similaires basées sur un effectif plus important (50 HDC contre 50 témoins). Nous avons récemment démontré chez l'animal mais aussi chez l'homme [101] que les principaux acteurs du métabolisme de la vitamine A étaient présents à des étapes clés du développement pulmonaire fœtal rendant, s'il en était besoin, encore plus crédible le concept de la place centrale des rétinoïdes dans la physiopathologie de la HDC. L'ARN de ADH3, RALDH1 et CYP26B21 a été étudié par RT-PCR qualitative et semi-quantitative pour les prélèvements pulmonaires humains à différents stades et pour les cellules pulmonaires humaines (lignées A549). Le transcrite de RAR bêta (gène rapporteur endogène de l'acide rétinoïque) a été quantifié par q-PCR après traitement (24, 48 heures) par rétinol. L'expression de l'ARN de ADH3, RALDH1 et CYP26 B1 a été détectée aux quatre stades étudiés et dans la lignée cellulaire A549. Seul le transcrite de RALDH1 varie en RT-PCR semi-quantitative au cours du développement pulmonaire. Le traitement par rétinol des cellules A549 induit la synthèse de RAR $\beta$  à H24 et H48. La présence d'ADH3, RALDH1 et CYP26B1 au cours du développement pulmonaire et dans les cellules A549 ainsi que la capacité à transformer le rétinol en acide rétinoïque chez celles-ci démontrent que le poumon humain fœtal possède les capacités à réguler un apport en vitamine A dès le stade pseudoglandulaire.

- L'acide rétinoïque intervient dans tous les stades de l'embryogenèse et de la morphogenèse pulmonaire.
- Les rétinoïdes jouent un rôle clé dans la survenue des HDC.

## Malformations associées et formes syndromiques : génétique et épigénétique

La HDC est associée dans 35 à 60% des cas à des malformations d'organes de voisinage, indépendamment des formes syndromiques [102,103]. Les malformations les plus fréquentes sont cardiaques (communication interventriculaire ou auriculaire, troncus arteriosus, anomalies de l'arche, tétralogie de Fallot), trachéales (bronches trachéales), génito-urinaires (cryptorchidisme, pseudohermaphrodisme, ectopie testiculaire, agénésie rénale), squelettiques (polydactylie, syndactylie, phocomélie), cérébrales (hydrocéphalie, dysraphies), oculaires (microphthalmie, anophthalmie). Ces malformations doivent être recherchées de principe à la prise en charge de l'HDC car elles grèvent considérablement le pronostic.

De nombreuses anomalies chromosomiques ont été décrites chez les patients porteurs d'HDC. On estime qu'elles sont retrouvées chez 10 à 20% des cas, ce pourcentage augmentant lorsqu'il existe des malformations associées. Les plus fréquemment individualisées sont la trisomie 18, plus rarement 13,21, la tétrasomie 12p (syndrome de Pallister-Killian). Des anomalies de structure allant de la simple délétion (Del 15q24-26, Del 4p 16, Del 1q 41. q 42, Del 8p 23.1, 6p22-p25, 22q11), à la duplication, translocation, inversion de presque tous les chromosomes, ont également été publiées. Les techniques d'hybridation génomique ont révélé des anomalies variées de petites tailles chez des enfants porteurs d'une HDC ouvrant la voie à la recherche de gènes candidats [104].

Quelques sujets porteurs d'une HDC non isolée ont un ensemble d'anomalies suggérant un syndrome génétique spécifique. Certains syndromes comportent fréquemment une hernie diaphragmatique (Tableau 1) alors que pour d'autres (Tableau 2), la malformation est plus anecdotique. Ainsi, la même mutation rare dans le gène *WT1* (*wilms tumor 1*) a été rapportée dans trois familles présentant un syndrome de Denys-Drash [105]. Ce gène code un facteur de transcription en doigt de zinc exprimé dans le *septum transversum* et dans les tissus mésothéliaux formant le diaphragme. Une mutation de STRA6 [106] a été isolée dans le syndrome de Matthew-Hood qui associe, entre autre, une HDC, une HP, une anophthalmie, une cardiopathie. Des analyses extensives sur presque tous les chromosomes sont actuellement en cours pour tenter d'identifier des gènes candidats.

- La HDC s'accompagne souvent de malformations cardiaques, trachéales, génito-urinaires, squelettiques, cérébrales et oculaires.
- On note aussi des anomalies chromosomiques et génétiques.

## Conclusion

Le développement du poumon est un processus complexe étalé dans le temps et qui fait intervenir de nombreux acteurs biologiques et physiques. Il est probable que la

**Tableau 2** Syndromes monogéniques dans lesquels la constatation d'une hernie diaphragmatique congénitale est plus rare.

Apert
Beckwith-Wiedemann
CHARGE
C (Opitz-trigonocéphalie)
Coffin-Siris
Cutis-Laxa
Czeizel-Losonci
Frasier
Gersoni-Baruch
Goldenhar
Goltz
Kabuki
Marfan
Mathieu
Meacham
<i>Microcephalia with linear skin defect</i>
Noonan
PAGOD
Pentalogie de Cantrell
Perlman
Poland
Swyer
Smith-Lemli-Opits
<i>Thoraco-abdominal</i>
WAGR
Wolf-Hirshhorn

Modifié d'après Pober et al. (<http://www.ncbi.nlm.gov/Bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=cdh-ov>).

HDC est la conséquence d'une agression survenant durant la période critique du développement embryonnaire, dont la nature est à ce jour inconnue. L'HP et VAP sont les conséquences d'une altération des mécanismes moléculaires de contrôle précoce du développement diaphragmatique et pulmonaire, aggravée par des contraintes dynamiques fœtales plus tardives. Des progrès doivent être accomplis pour un diagnostic précoce permettant d'envisager des stratégies thérapeutiques visant à restaurer une croissance pulmonaire et à réduire la vasculopathie artérielle. C'est à prix que l'on peut espérer améliorer la survie et réduire d'autant la morbidité péri- et post-natale.

## Conflit d'intérêt

Les auteurs ont déclaré n'avoir aucun conflit d'intérêt potentiel en rapport avec le thème de l'article.

## Références

- [1] Stoll C, Alembik Y, Dott B, et al. Associated malformations in cases with congenital diaphragmatic hernia. *Genet Couns* 2008;19:331–9.
- [2] Bedoyan JK, Blackwell SC, Treadwell MC, et al. Congenital diaphragmatic hernia: associated anomalies and antenatal

## POINTS ESSENTIELS

- La HDC est la conséquence d'une agression encore inconnue survenant durant la période critique du développement embryonnaire.
- La HDC est une cause fréquente de détresse respiratoire, par HP et hypertension artérielle pulmonaire réfractaire.
- L'HP peut également être due à un défaut d'expansion lié à la diminution des mouvements respiratoires et à la perturbation de mécanismes moléculaires impliqués dans le développement embryonnaire du poumon.
- Un diagnostic précoce permettrait d'envisager des stratégies thérapeutiques visant à restaurer une croissance pulmonaire et à minimiser l'atteinte vasculaire artérielle.

diagnosis. Outcome-related variables at two Detroit hospitals. *Pediatr Surg Int* 2004;20:170–6.

- [3] Seetharamaiah R, Younger JG, Bartlett RH, et al. Factors associated with survival in infants with congenital diaphragmatic hernia requiring extracorporeal membrane oxygenation: a report from the Congenital Diaphragmatic Hernia Study Group. *J Pediatr Surg* 2009;44:1315–21.
- [4] Nose K, Kamata S, Sawai T, et al. Airway anomalies in patients with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2000;35:1562–5.
- [5] Skari H, Bjornland K, Haugen G, et al. Congenital diaphragmatic hernia: a meta-analysis of mortality factors. *J Pediatr Surg* 2000;35:1187–97.
- [6] Taira Y, Yamataka T, Miyazaki E, et al. Adventitial changes in pulmonary vasculature in congenital diaphragmatic hernia complicated by pulmonary hypertension. *J Pediatr Surg* 1998;33:382–7.
- [7] Thibeault DW, Haney B. Lung volume, pulmonary vasculature, and factors affecting survival in congenital diaphragmatic hernia. *Pediatrics* 1998;101:289–95.
- [8] Sokol J, Bohn D, Lacro RV, et al. Fetal pulmonary artery diameters and their association with lung hypoplasia and post-natal outcome in congenital diaphragmatic hernia. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186:1085–90.
- [9] Gischler SJ, van der Cammen-van Zijp MH, Mazer P, et al. A prospective comparative evaluation of persistent respiratory morbidity in esophageal atresia and congenital diaphragmatic hernia survivors. *J Pediatr Surg* 2009;44:1683–90.
- [10] Abdullah F, Yiyi Zhang Y, Sciortino C, et al. Congenital diaphragmatic hernia: outcome review of 2173 surgical repairs in US infants. *Pediatr Surg Int* 2009;25:1059–64.
- [11] Abolmaali N, Koch A, Götzelt K, et al. Lung volumes, ventricular function and pulmonary arterial flow in children operated on for left-sided congenital diaphragmatic hernia: long-term results. *Eur Radiol* 2010;20:1580–9.
- [12] Trachsel D, Selvadurai H, Bohn D, et al. Long-term pulmonary morbidity in survivors of congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Pulmonol* 2005;39:433–9.
- [13] Muratore CS, Kharasch V, Lund DP, et al. Pulmonary morbidity in 100 survivors of congenital diaphragmatic hernia monitored in a multidisciplinary clinic. *J Pediatr Surg* 2001;36:133–40.
- [14] Peetsold MG, Heij HA, Kneepkens MF, et al. The long-term follow-up of patients with a congenital diaphragmatic hernia: a broad spectrum of morbidity. *Pediatr Surg Int* 2009;25:1–17.

- [15] Gosche JR, Islam S, Boulanger SC. Congenital diaphragmatic hernia: searching for answers. *Am J Surg* 2005;190:324–32.
- [16] Smith NP, Jesudason EC, Losty PD. Congenital diaphragmatic hernia. *Paediatr Respir Rev* 2002;3:339–48.
- [17] Lally KP. Congenital diaphragmatic hernia. *Curr Opin Pediatr* 2002;14:486–90.
- [18] van den Hout L, Sluiter I, Gischler S, et al. Can we improve outcome of congenital diaphragmatic hernia? *Pediatr Surg Int* 2009;25:733–43.
- [19] Keijzer R, Puri P. Congenital diaphragmatic hernia. *Semin Pediatr Surg* 2010;19:180–5.
- [20] de Buys Roessingh AS, Dinh-Xuan AT. Congenital diaphragmatic hernia: current status and review of the literature. *Eur J Pediatr* 2009;168:393–406.
- [21] Grisaru-Granovsky S, Rabinowitz R, Ioscovich A, et al. Congenital diaphragmatic hernia: review of the literature in reflection of unresolved dilemmas. *Acta Paediatr* 2009;98:1874–81.
- [22] Mitanchez D. Traitement anténatal de la hernie de coupole diaphragmatique: le point en 2008. *Arch Fr Pediatr* 2008;15:1320–5.
- [23] Ackerman KG, Greer JJ. Development of the diaphragm and genetic mouse models of diaphragmatic defects. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2007;145:109–16.
- [24] Ackerman KG, Pober BR. Congenital diaphragmatic hernia and pulmonary hypoplasia: new insights from developmental biology and genetics. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2007;145:105–8.
- [25] Kotecha S. Lung growth for beginners. *Paediatr Respir Rev* 2000;1:308–13.
- [26] Hooper SB, Harding R. Fetal lung liquid: a major determinant of the growth and functional development of the fetal lung. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995;22:235–47.
- [27] Harding R, Hooper SB. Regulation of lung expansion and lung growth before birth. *J Appl Physiol* 1996;81:209–24.
- [28] Kitterman JA. The effects of mechanical forces on fetal lung growth. *Clin Perinatol* 1996;23:727–40.
- [29] Nardo L, Hooper SB, Harding R. Stimulation of lung growth by tracheal obstruction in fetal sheep: relation to luminal pressure and lung liquid volume. *Pediatr Res* 1998;43:184–90.
- [30] Alcorn D, Adamson TM, Lambert TF, et al. Morphological effects of chronic tracheal ligation and drainage in the fetal lamb lung. *J Anat* 1977;123:649–60.
- [31] Bratu I, Flageole H, Laberge J, et al. Pulmonary structural maturation and pulmonary artery remodeling after reversible fetal ovine tracheal occlusion in diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2001;36:739–44.
- [32] De Paepe M, Papadakis K, Johnson B, et al. Fate of the type II pneumocyte following tracheal occlusion in utero: a time-course study in fetal sheep. *Virchows Arch* 1998;432:7–16.
- [33] Flageole H, Evrard VA, Piedboeuf B, et al. The plug-unplug sequence: an important step to achieve type II pneumocyte maturation in the fetal lamb model. *J Pediatr Surg* 1998;33:299–303.
- [34] Wigglesworth J, Desai R, Hislop A. Fetal lung growth in congenital laryngeal atresia. *Pediatr Pathol* 1987;7:515–25.
- [35] Willem M, Miosge N, Halfter W, et al. Specific ablation of the nidogen-binding site in the laminin gamma 1 chain interferes with kidney and lung development. *Development* 2002;129:2711–22.
- [36] Rolland G, Xu J, Tanswell AK, et al. Ontogeny of extracellular matrix gene expression by rat lung cells at late fetal gestation. *Biol Neonate* 1998;73:112–20.
- [37] Gill S, Pape M, Khokha R, et al. A null mutation for tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (Timp-3) impairs murine bronchiole branching morphogenesis. *Dev Biol* 2003;261:313–23.
- [38] Cardoso WV. Molecular regulation of lung development. *Annu Rev Physiol* 2001;63:471–94.
- [39] Clugston RD, Zhang W, Greer JJ. Gene expression in the developing diaphragm: significance for congenital diaphragmatic hernia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;294:L665–75.
- [40] Holder AM, Klaassens M, Tibboel D, et al. Genetic factors in congenital diaphragmatic hernia. *Am J Hum Genet* 2007;80:825–45.
- [41] Schnitzer JJ. Control and regulation of pulmonary hypoplasia associated with congenital diaphragmatic hernia. *Semin Pediatr Surg* 2004;13:37–43.
- [42] van Loenhout RB, Tibboel D, Posta M, et al. Congenital diaphragmatic hernia: comparison of animal models and relevance to the human situation. *Neonatology* 2009;96:137–49.
- [43] Davey MG, Biard JM, Robinson L, et al. Surfactant protein expression is increased in the ipsilateral but not contralateral lungs of fetal sheep with left-sided diaphragmatic hernia. *Pediatr Pulmonol* 2005;39:359–67.
- [44] Hellmeyer L, Ballast A, Tekesin I, et al. Evaluation of the development of lung hypoplasia in the premature lamb. *Arch Gynecol Obstet* 2005;271:231–4.
- [45] Roubliova XI, Deprest JA, Biard JM, et al. Morphologic changes and methodological issues in the rabbit experimental model for diaphragmatic hernia. *Histol Histopathol* 2010;25:1105–16.
- [46] Gallot D, Marceau G, Coste K, et al. Congenital diaphragmatic hernia: a retinoid-signaling pathway disruption during lung development? *Birth Defects Res* 2005;73:523–31.
- [47] Bratu I, Flageole H, Laberge JM, et al. Lung function in lambs with diaphragmatic hernia after reversible fetal tracheal occlusion. *J Pediatr Surg* 2004;39:1524–31.
- [48] Chinoy MR. Pulmonary hypoplasia and congenital diaphragmatic hernia: advances in the pathogenetics and regulation of lung development. *J Surg Res* 2002;106:209–23.
- [49] Clugston RD, Zhang W, Alvarez S, et al. Understanding abnormal retinoid signaling as a causative mechanism in congenital diaphragmatic hernia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010;42:276–85.
- [50] Lurie IW. Where to look for the genes related to diaphragmatic hernia? *Genet Couns* 2003;14:75–93.
- [51] Burgosa CM, Uggla AR, Fagerström-Billaic F, et al. Gene expression analysis in hypoplastic lungs in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2010;45:1445–54.
- [52] Iritani I. Experimental study on embryogenesis of congenital diaphragmatic hernia. *Anat Embryol (Berl)* 1984;169:133–9.
- [53] Mendelsohn C, Lohnes D, Decimo D, et al. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development* 1994;120:2749–71.
- [54] Allan DW, Greer JJ. Pathogenesis of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in fetal rats. *J Appl Physiol* 1997;83:338–47.
- [55] Scandalakis J, Gray S, Rickette R. The diaphragm. In: Scandalakis J, Gray S, editors. *Embryology for surgeons*. Baltimore, MD: Williams and Wilkins; 1994. p. 491–539.
- [56] Alles AJ, Losty PD, Donahoe PK, et al. Embryonic cell death patterns associated with nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1995;30:353–8.
- [57] Babiuk RP, Greer JJ. Diaphragm defects occur in a CDH hernia model independently of myogenesis and lung formation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283:L1310–4.
- [58] Lipsett J, Cool JC, Runciman SI, et al. Morphometric analysis of preterm fetal pulmonary development in the sheep model of congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Dev Pathol* 2000;3:17–28.

- [59] Areechon W, Eid L. Hypoplasia of lung with congenital diaphragmatic hernia. *Br Med J* 1963;1:230–3.
- [60] Nakamura Y, Yamamoto I, Fukuda S, et al. Pulmonary acinar development in diaphragmatic hernia. *Arch Pathol Lab Med* 1991;115:372–6.
- [61] Taira Y, Yamataka T, Miyazaki E, et al. Comparison of the pulmonary vasculature in newborns and stillborns with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int* 1998;14:30–5.
- [62] George DK, Cooney TP, Chiu BK, et al. Hypoplasia and immaturity of the terminal lung unit (acinus) in congenital diaphragmatic hernia. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:947–50.
- [63] Déchelotte P, Labbé A, Caux O, et al. Défaut de croissance pulmonaire. Étude comparative de trois critères de diagnostic. *Arch Fr Pédiatr* 1987;44:255–61.
- [64] Wilcox DT, Irish MS, Holm BA, et al. Pulmonary parenchymal abnormalities in congenital diaphragmatic hernia. *Clin Perinatol* 1996;23:771–9.
- [65] De Paepe ME, Friedman RM, Gundogan F, et al. Post-mortem lung weight/body weight standards for term and preterm infants. *Pediatr Pulmonol* 2005;40:445–8.
- [66] Bargy F, Beaudoin S, Barbet P. Fetal lung growth in congenital diaphragmatic hernia. *Fetal Diagn Ther* 2006;21:39–44.
- [67] Heerema AE, Rabban JT, Sydorak RM, et al. Lung pathology in patients with congenital diaphragmatic hernia treated with fetal surgical intervention, including tracheal occlusion. *Pediatr Dev Pathol* 2003;6:536–46.
- [68] Goumy C, Marceau G, Coste K, et al. Retinoid pathway and congenital diaphragmatic hernia: hypothesis from the analysis of chromosomal abnormalities. *Fetal Diagn Ther* 2010 (in print).
- [69] Ruttensstock E, Doi T, Dingemann J, et al. Insulinlike growth factor receptor type 1 and type 2 are downregulated in the nitrofen-induced hypoplastic lung. *J Pediatr Surg* 2010;45:1349–53.
- [70] de Rooij JD, Hösgör M, Ijzendoorn Y, et al. Expression of angiogenesis-related factors in lungs of patients with congenital diaphragmatic hernia and pulmonary hypoplasia of other causes. *Pediatr Dev Pathol* 2004;7:468–77.
- [71] Doi T, Puri P. Up-regulation of Wnt5a gene expression in the nitrofen-induced hypoplastic lung. *J Pediatr Surg* 2009;44:2302–6.
- [72] Pulmonary elastin expression is decreased in the nitrofen-induced rat model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2004;39:666–71.
- [73] LopezJimenez N, Gerber S, Popovici V, et al. Examination of FGFR1 as a candidate gene for diaphragmatic defects at chromosome 4p16.3 shows that Fgfr1 null mice have reduced expression of Tpm3, sarcomere genes and Lrtm1 in the diaphragm. *Hum Genet* 2010;127:325–36.
- [74] de Lagausie P, de Buys-Roessingh A, Ferkdadji L, et al. Endothelin receptor expression in human lungs of newborns with congenital diaphragmatic hernia. *J Pathol* 2005;205:112–8.
- [75] Doi T, Hajduk P, Puri P. Upregulation of Slit-2 and Slit-3 gene expressions in the nitrofen-induced hypoplastic lung. *J Pediatr Surg* 2009;44:2092–5.
- [76] Santos M, Bastos P, Gonzaga S, et al. Ghrelin expression in human and rat fetal lungs and the effect of ghrelin administration in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Res* 2006;59:531–7.
- [77] Doi T, Sugimoto K, Ruttensstock E, Dingemann J, Puri P. Prenatal retinoic acid upregulates pulmonary gene expression of PI3K and AKT in nitrofen-induced pulmonary hypoplasia. *Pediatr Surg Int* 2010;26:1001–5.
- [78] Pober BR. Genetic aspects of human congenital diaphragmatic hernia. *Clin Genet* 2008;74:1–15.
- [79] Klaassens M, de Klein A, Tibboel D. The etiology of congenital diaphragmatic hernia: still largely unknown? *Eur J Med Genet* 2009;52:281–6.
- [80] Kantarci S, Donahoe PK. Congenital diaphragmatic hernia (CDH) etiology as revealed by pathway genetics. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2007;145:217–26.
- [81] Bielinska M, Jay PY2, Erlich JM, et al. Molecular genetics of congenital diaphragmatic defects. *Ann Med* 2007;39:261–74.
- [82] Kinane TB. Lung development and implications for hypoplasia found in congenital diaphragmatic hernia. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2007;145 C:117–24.
- [83] Davey MG, Biard JM, Robinson L, et al. Surfactant protein expression is increased in the ipsilateral but not contralateral lungs of fetal sheep with left-sided diaphragmatic hernia. *Pediatr Pulmonol* 2005;39:359–67.
- [84] Jesudason EC. Small lungs and suspect smooth muscle: congenital diaphragmatic hernia and the smooth muscle hypothesis. *J Pediatr Surg* 2006;41:431–5.
- [85] Jesudason EC. Hunterian lecture. Challenging embryological theories on congenital diaphragmatic hernia: future therapeutic implications for paediatric surgery. *Ann R Coll Surg Engl* 2002;84:252–9.
- [86] Jesudason EC. Exploiting mechanical stimuli to rescue growth of the hypoplastic lung. *Pediatr Surg Int* 2007;23:827–36.
- [87] Jesudason EC, Smith NP, Connell MG, et al. Peristalsis of airway smooth muscle is developmentally regulated and uncoupled from hypoplastic lung growth. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291:L559–65.
- [88] Featherstone NC, Connell MG, Fernig DG, et al. Airway smooth muscle dysfunction precedes teratogenic congenital diaphragmatic hernia and may contribute to hypoplastic lung morphogenesis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;35:571–8.
- [89] Jesudason EC, Losty PD, Lloyd DA. Pulmonary hypoplasia: alternative pathogenesis and antenatal therapy in diaphragmatic hernia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2000;82:F172.
- [90] Awasthi N, Schwarz MA, Verma V, et al. Endothelial monocyte activating polypeptide II interferes with VEGF-induced proangiogenic signaling. *Lab Invest* 2009;89:38–46.
- [91] Boucherat O, Franco-Montoya ML, Delacourt C, et al. Defective angiogenesis in hypoplastic human fetal lungs correlates with nitric oxide synthase deficiency that occurs despite enhanced angiotensin-2 and VEGF. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010;298:L849–56.
- [92] Shinkai M, Shinkai T, Montedonico S, et al. Effect of VEGF on the branching morphogenesis of normal and nitrofen-induced hypoplastic fetal rat lung explants. *J Pediatr Surg* 2006;41:781–6.
- [93] Tuder RM, Yun JH. Vascular endothelial growth factor of the lung: friend or foe. *Curr Opin Pharmacol* 2008;8:255–60.
- [94] Keller RL, Tacy TA, Hendricks-Munoz K, et al. Congenital diaphragmatic hernia: endothelin-1, pulmonary hypertension, and disease severity. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:555–61.
- [95] Greer JJ, Babiuk RP, Thebaud B. Etiology of congenital diaphragmatic hernia: the retinoid hypothesis. *Pediatr Res* 2003;53:726–30.
- [96] Wilson JG, Roth CB, Warkany J. An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. *Am J Anat* 1953;92:189–217.
- [97] Gallot D, Coste K, Jani J, et al. Effects of maternal retinoic acid administration in a congenital diaphragmatic hernia rabbit model. *Pediatr Pulmonol* 2008;43:594–603.
- [98] Babiuk RP, Thebaud B, Greer JJ. Reductions in the incidence of nitrofen-induced diaphragmatic hernia by vitamin A and retinoic acid. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;286:L970–3.
- [99] Kawaguchi R, Yu J, Honda J, et al. A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science* 2007;31:820–5.

- [100] Major D, Cadenas M, Fournier L, et al. Retinol status of newborn infants with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int* 1998;13:547–9.
- [101] Coste K, Labbé A. Étude de la voie métabolique de la vitamine A dans le poumon foetal humain. *Rev Mal Respir* 2010: sous presse.
- [102] Gallot D, Boda C, Ughetto S, et al. Prenatal detection and outcome of congenital diaphragmatic hernia: a French registry-based study. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2007;29:276–83.
- [103] Gremeau AS, Coste K, Blanc P, et al. Congenital diaphragmatic hernia and genital anomalies: Emanuel syndrome. *Prenat Diagn* 2009;29:816–8.
- [104] Pober BR. Overview of epidemiology, genetics, birth defects, and chromosome abnormalities associated with CDH. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2007;145C: 158–71.
- [105] Benetti E, Caridi G, Malaventura C, et al. A novel WT1 gene mutation in a three-generation family with progressive isolated focal segmental glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:698–702.
- [106] Segel R, Levy-Lahad E, Pasutto F, et al. Pulmonary hypoplasia-diaphragmatic hernia-anophthalmia-cardiac defect (PDAC) syndrome due to STRA6 mutations – what are the minimal criteria? *Am J Med Genet A* 2009;149A: 2457–63.