



**HAL**  
open science

# Étude du bénéfice d'un patch de cellules stromales mésoenchymateuses pour le traitement anténatal des myéloméningocèles dans le modèle ovin

Coralie Dehan

► **To cite this version:**

Coralie Dehan. Étude du bénéfice d'un patch de cellules stromales mésoenchymateuses pour le traitement anténatal des myéloméningocèles dans le modèle ovin. Médecine vétérinaire et santé animale. 2022. dumas-03975390

**HAL Id: dumas-03975390**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03975390v1>**

Submitted on 6 Feb 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Année 2022

**ÉTUDE DU BÉNÉFICE D'UN PATCH DE CELLULES  
STROMALES MÉSENCHYMATEUSES POUR LE  
TRAITEMENT ANTÉNATAL DE LA MYÉLOMÉNINGOCÈLE  
DANS LE MODÈLE OVIN**

**THÈSE**

pour obtenir le diplôme d'État de

**DOCTEUR VÉTÉRINAIRE**

présentée et soutenue publiquement devant

la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)

le 26 septembre 2022

par

**Coralie, Christiane, Janine DEHAN**

sous la direction de

**Vincent MAUFFRÉ**

**JURY**

<b>Président du jury :</b>	<b>M. Stéphane BLOT</b>	Professeur à l'ENVA
<b>Directeur de thèse :</b>	<b>M. Vincent MAUFFRÉ</b>	Maître de Conférences à l'ENVA
<b>Examinatrice :</b>	<b>Mme Fanny PILOT-STORCK</b>	Professeure à l'ENVA
<b>Membre invité :</b>	<b>Mme Lucie GUILBAUD</b>	Assistante hospitalo-universitaire à l'hôpital Armand Trousseau, service de médecine fœtale, APHP. Sorbonne Université



**Liste des enseignants intervenant dans l'encadrement des thèses de Doctorat vétérinaire**



Version du 8 février 2022

**Liste des Professeurs et Maîtres de conférences titulaires de l'HDR**

M	Adjou	Karim	Professeur	DPASP
M	Audigié	Fabrice	Professeur	DEPEC
M	Bellier	Sylvain	Professeur	DSBP
M	Blaga	Radu	Maître de conférences HDR	DPASP
M	Blot	Stephane	Professeur	DEPEC
M	Boulouis	Henri-Jean	Professeur émérite	DSBP
Mme	Chahory	Sabine	Professeur	DEPEC
M	Chateau	Henry	Professeur	DSBP
Mme	Chetboul	Valerie	Professeur	DEPEC
Mme	Crevier-Denoix	Nathalie	Professeur	DSBP
M	Degueurce	Christophe	Professeur	DSBP
M	Denoix	Jean-Marie	Professeur	DEPEC
M	Desquilbet	Loïc	Professeur	DSBP
Mme	Dufour	Barbara	Professeur émérite	DPASP
M	Eloit	Marc	Professeur	DSBP
M	Fayolle	Pascal	Professeur émérite	DEPEC
M	Fédérighi	Michel	Professeur	DPASP
M	Fontbonne	Alain	Professeur	DEPEC
Mme	Gilbert	Caroline	Professeur	DSBP
M	Grandjean	Dominique	Professeur	DEPEC
Mme	Grimard-Ballif	Bénédicte	Professeur	DPASP
Mme	Haddad-Hoang Xuan	Nadia	Professeur	DPASP
M	Jouvion	Gregory	Professeur	DSBP
M	Kohlhauer	Matthias	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Le Poder	Sophie	Professeur	DSBP
M	Manassero	Mathieu	Professeur	DEPEC
Mme	Maurey-Guénec	Christelle	Maître de conférences HDR	DEPEC
M	Millemann	Yves	Professeur	DPASP
M	Perrot	Sébastien	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Pilot-Storck	Fanny	Professeur	DSBP
M	Ponter	Andrew	Professeur	DPASP
Mme	Rivière	Julie	Maître de conférences HDR	DPASP
Mme	Robert	Céline	Professeur	DSBP
M	Tiret	Laurent	Professeur	DSBP
M	Tissier	Renaud	Professeur	DSBP
M	Verwaerde	Patrick	Professeur	DEPEC
Mme	Viateau	Véronique	Professeur	DEPEC

**Liste des Maîtres de conférences et Ingénieurs de recherche DMV**

M	Arné	Pascal	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barassin	Isabelle	Maître de conférences	DPASP
Mme	Benchekroun	Ghita	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Bertoni	Lelia	Maître de conférences	DEPEC
M	Bolnot	Francois	Maître de conférences	DPASP
Mme	Canonne-Guibert	Morgane	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Chevallier	Lucie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Cochet-Faivre	Noëlle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Constant	Fabienne	Maître de conférences	DPASP
Mme	Cordonnier-Lefort	Nathalie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Crepeaux	Guillemette	Maître de conférences	DSBP
Mme	De Paula Reis	Alline	Maître de conférences	DPASP
Mme	Decambrom	Adeline	Maître de conférences	DEPEC
M	Delsart	Maxime	Maître de conférences associé	DPASP
M	Desbois	Christophe	Maître de conférences	DEPEC
M	Deshuillers	Pierre	Maître de conférences	DSBP
M	Gauthier	Michel	Maître de conférences associé	DPASP
Mme	Guélin-Poirier	Valentine	Maître de conférences	DPASP
Mme	Jacquet	Sandrine	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Lagrée	Anne-Claire	Maître de conférences	DSBP
Mme	Le Roux	Delphine	Maître de conférences	DSBP
Mme	Legrand	Chantal	Maître de conférences associé	DSBP
Mme	Marignac	Genevieve	Maître de conférences	DSBP
M	Mauffré	Vincent	Maître de conférences	DPASP
Mme	Mtimet	Narjès	Maître de conférences	DPASP
Mme	Mespouilhès-Rivière	Céline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Mortier	Jérémy	Maître de conférences associé	DEPEC
M	Nudelmann	Nicolas	Maître de conférences	DEPEC
M	Pignon	Charly	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Polack	Bruno	Maître de conférences	DSBP
Mme	Ravary-Plumioën	Bérandgère	Maître de conférences	DPASP
M	Reyes-Gomez	Edouard	Maître de conférences	DSBP
Mme	Risco-Castillo	Véronica	Maître de conférences	DSBP
Mme	Rose	Hélène	Maître de conférences associé	DSBP



# Remerciements

**À Monsieur le Professeur Stéphane Blot, Président du Jury de cette thèse, Professeur à l'EnvA,**

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse. *Hommages respectueux.*

**À Monsieur le Docteur Vincent Mauffré, Directeur de cette thèse, Maître de conférences à l'EnvA,**

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la direction de cette thèse. Vous m'avez offert une opportunité inespérée et une qualité de travail incomparable. Merci pour votre encadrement, suivi, votre aide et pour m'avoir fait découvrir le monde de la recherche. *Mes remerciements les plus sincères et chaleureux.*

**À Madame la Professeure Fanny Pilot-Storck, Examinatrice de cette thèse, Professeur à l'EnvA,**

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être l'examinatrice de cette thèse. Merci pour vos conseils et corrections. *Mes remerciements les plus sincères.*

**À Madame la Docteure Lucie Guilbaud, Assistante hospitalo-universitaire à l'hôpital Armand Trousseau au service de médecine fœtale,**

Pour m'avoir fait l'honneur de m'intégrer à votre équipe de recherche. Merci pour vos conseils et votre encadrement ainsi que pour m'avoir donné cette incroyable opportunité de travailler avec vous et découvrir le monde de la recherche. *Mes remerciements les plus sincères et chaleureux.*

**À Monsieur le Docteur Yoann Athiel, obstétricien à l'hôpital Armand Trousseau,**

Pour avoir été de si bons conseils et d'une si grande aide. *Mes plus chaleureux remerciements.*

**À Monsieur Benoît Lecuelle et Madame la Docteure Céline Bourzac ainsi que toute l'équipe de la Plateforme pour la Recherche Biomédicale,**

Pour votre bonne humeur et vos nombreux conseils. *Mes chaleureux remerciements.*

**À mes parents, Pascale et Franck,**

Pour votre soutien sans faille durant toutes ces années, pour votre volonté de m'offrir de si belles études et me voir réaliser mon rêve, pour avoir toujours cru en moi, pour tout votre amour. Je vous dois celle que je suis devenue aujourd'hui. Merci.

**À mon frère, Lucas,**

Pour ta présence et ton écoute à chaque instant. Ton soutien et ta bonne humeur constante ont été l'un des piliers de mon parcours. Pourvu que notre complicité dure toujours. Merci.

**À mes grands-parents, Christiane et Dominique,**

Pour avoir été les premiers à m'apprendre que « *la Marguerite était malade* », pour m'avoir élevée et offert une enfance si belle, pour votre amour et votre soutien. Les mots ne seront jamais assez forts. Merci.

**À mon arrière-grand-mère, Hélène,**

Pour nos parties de Scrabble endiablées, nos samedis matin silencieux mais complices. Tu as été mon exemple. Il ne passe pas un jour sans que je ne pense à toi. Merci.

**À mon grand-père et sa compagne, Jean-Claude et Joëlle,**

Pour tous ces moments complices et heureux, pour nos parties de cartes endiablées et ces rires qui jamais ne s'éteignent. Merci.

**À Maxime,**

Pour ton amour et ton soutien inconditionnel. Merci.

**À Oriane,**

Pour avoir été d'une compagnie si douce. Tu as été celle qui m'a donné l'envie de devenir vétérinaire.

# Table des matières

---

<b>Table des matières</b> .....	<b>1</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>3</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>5</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>7</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>9</b>
<b>Première partie : la myéloméningocèle chez l'humain et modèles animaux</b> .....	<b>11</b>
1. La myéloméningocèle : présentation et connaissances actuelles .....	11
1.1. <i>Définition de la myéloméningocèle</i> .....	11
1.1.1. Embryologie physiologique du système nerveux central .....	12
1.1.2. Embryologie pathologique du système nerveux central .....	14
1.1.3. Gestation et conséquences lésionnelles .....	15
1.2. <i>Description de la myéloméningocèle</i> .....	16
1.2.1. Épidémiologie .....	16
1.2.2. Malformations associées et conséquences fonctionnelles .....	17
1.3. <i>Facteurs de risque</i> .....	19
1.4. <i>Diagnostic anténatal</i> .....	20
1.5. <i>Traitements anténataux et pronostics associés</i> .....	21
2. Modélisation de la myéloméningocèle humaine à travers les modèles animaux .....	23
2.1. <i>Le modèle primate</i> .....	24
2.2. <i>Les modèles rongeurs</i> .....	24
2.2.1. Le rat .....	24
2.2.2. La souris .....	25
2.3. <i>Le modèle porc</i> .....	26
2.4. <i>Le modèle gallinacé</i> .....	27
2.5. <i>Modèle ovin et pertinence</i> .....	27
2.5.1. Mise en place du modèle .....	27
2.5.2. Caractérisation du modèle .....	30
2.5.3. Un modèle ovin génétique .....	30
2.5.4. Modèle ovin de l'étude .....	31
2.6. <i>Vers un nouveau modèle ?</i> .....	32
3. Thérapies cellulaires anténatales dans le traitement de la myéloméningocèle .....	32
3.1. <i>Les cellules stromales mésenchymateuses et leurs propriétés</i> .....	33
3.2. <i>Effets des cellules stromales mésenchymateuses dans les modèles animaux de myéloméningocèle</i> .....	34
3.3. <i>Les cellules stromales mésenchymateuses issues de cordons ombilicaux : particularités et avantages</i> .....	35
<b>Deuxième partie : étude expérimentale</b> .....	<b>39</b>
1. Objectif de l'étude .....	39
2. Matériels et méthodes .....	39
2.1. <i>Création et caractérisation du patch cellulaire</i> .....	39
2.1.1. Origines des cellules .....	39
2.1.2. Caractérisation des cellules stromales mésenchymateuses issues de cordons ombilicaux .....	40
2.1.3. Création du patch cellulaire .....	40
2.2. <i>Expériences anténatales</i> .....	41
2.2.1. Animaux et hébergement .....	41
2.2.2. Création de la lésion .....	41
2.2.3. Réparation de la lésion .....	42
2.2.4. Naissance des agneaux .....	43

2.3.	<i>Explorations fonctionnelles et post-mortem</i> .....	44
2.3.1.	Score de locomotion .....	44
2.3.2.	Explorations neurologiques.....	46
2.3.3.	Profil urodynamique .....	49
2.3.4.	Autopsie et analyses histologiques .....	49
2.4.	<i>Analyses statistiques</i> .....	50
2.5.	<i>Contribution personnelle</i> .....	52
3.	<b>Résultats</b> .....	52
3.1.	<i>Caractérisation des cellules stromales mésenchymateuses</i> .....	52
3.2.	<i>Description de l'échantillon</i> .....	52
3.3.	<i>Critères de comparabilité clinique</i> .....	54
3.3.1.	Observations et mesures lors des chirurgies et à la naissance .....	54
3.3.2.	Examen tomodensitométrique .....	54
3.3.3.	Examen histologique.....	55
3.4.	<i>Explorations post-natales</i> .....	55
3.4.1.	Score de locomotion .....	55
3.4.2.	Explorations de la fonction neurologique .....	57
3.4.3.	Autopsie et analyses histologiques.....	59
4.	<b>Discussion</b> .....	63
4.1.	<i>Limites générales de l'étude</i> .....	63
4.2.	<i>Discussion sur le choix des techniques utilisées</i> .....	64
4.2.1.	Discussion sur l'utilisation des cellules stromales mésenchymateuses issues de cordons ombilicaux et apports au modèle .....	64
4.2.2.	Discussion du choix de la technique chirurgicale du modèle de l'étude .....	65
4.3.	<i>Discussion sur l'étude clinique et paraclinique de la myéloméningocèle dans le modèle ovin</i> ...	65
4.3.1.	Discussion sur le score de locomotion.....	65
4.3.2.	Discussion sur les explorations neurologiques .....	66
4.3.3.	Discussion sur l'étude histologique .....	67
4.4.	<i>Prochaines études et perspectives d'avenir</i> .....	68
4.4.1.	Prochaines expérimentations et suite de l'étude.....	68
4.4.2.	Perspectives d'avenir et pistes d'études .....	69
	<b>Conclusion</b> .....	<b>71</b>
	<b>Liste des références bibliographiques</b> .....	<b>73</b>
	<b>Annexe : Définition de différentes anomalies congénitales affectant la moelle épinière</b> .....	<b>89</b>

# Liste des figures

---

Figure 1 : Photographie d'une myéломéningocèle lombaire (flèche blanche) chez un nouveau-né (d'après Zerah et Kulkarni, 2013). .....	11
Figure 2 : Schématisation d'une myéломéningocèle en coupe transversale (modifiée d'après Carlson, 2018).....	11
Figure 3 : Schématisation de la neurulation primaire (modifiée d'après McGeady <i>et al.</i> , 2006). ....	13
Figure 4 : Schématisation de la formation de la partie caudale du tube neural (d'après Larsen, 2003). .....	14
Figure 5 : Sections transversales successives de la partie caudale du tube neural d'un embryon de poulet (modifiée d'après Özek <i>et al.</i> , 2008). .....	14
Figure 6 : Images obtenues après imagerie par résonance magnétique (en pondération T2) d'un nouveau-né atteint de la malformation de Chiari de type II (à droite) et d'un nouveau-né sain (à gauche) (d'après Özek <i>et al.</i> , 2008).....	17
Figure 7 : Images échographiques d'un fœtus humain atteint de myéломéningocèle et de la malformation de Chiari de type II (d'après Özek <i>et al.</i> , 2008). .....	21
Figure 8 : Illustration de la technique chirurgicale standardisée de réparation anténatale « à ciel ouvert » de myéломéningocèle chez l'humain (d'après Joyeux <i>et al.</i> , 2018).....	22
Figure 9 : Schématisation des modes d'action des cellules stromales mésenchymateuses lors d'une inflammation tissulaire (modifiée d'après Wang <i>et al.</i> , 2014). .....	34
Figure 10 : Photographies d'un cordon ombilical de ruminant (d'après Barone, 2001).....	36
Figure 11 : Photographies illustrant la chirurgie de création de la myéломéningocèle chez un fœtus ovin à 75 jours de gestation (photographies personnelles). .....	42
Figure 12 : Photographies de la chirurgie de réparation de la myéломéningocèle chez un fœtus ovin à 89 jours de gestation (photographies personnelles). .....	43
Figure 13 : Photographie du logement des agneaux après leur naissance (photographie personnelle). .....	44
Figure 14 : Photographie d'un agneau au cours de l'évaluation du <i>sheep locomotor rating score</i> à 24 heures de vie (photographie du Dr. Yoann Athiel). .....	46
Figure 15 : Illustration de la mesure de l'angle de déformation rachidienne sur une image d'un examen tomodensitométrie du rachis d'un agneau (service d'imagerie du ChuvA). .....	47
Figure 16 : Représentation schématique du membre pelvien en face médiale d'un bovin (modifié d'après Klaus-Dieter Budras et Robert E. Habel, 2003).....	48
Figure 17 : Photographie d'un agneau anesthésié au cours de l'évaluation de ses potentiels évoqués sensitifs (photographie personnelle). .....	49

Figure 18 : Photographie de dissection du S pénien présent chez les agneaux mâles (photographie personnelle). .....	49
Figure 19 : Diagramme de flux des brebis incluses dans l'étude. ....	53
Figure 20 : Diagramme de flux des agneaux inclus dans l'étude. ....	53
Figure 21 : Comparaison des <i>sheep locomotor rating score</i> des agneaux des groupes « cellules stromales mésenchymateuses » et « acellulaire » à deux heures et 24 heures après la naissance. ....	56
Figure 22 : Évolution des scores <i>sheep locomotor rating score</i> entre deux heures et 24 heures après la naissance des agneaux des groupes « cellules stromales mésenchymateuses » et « acellulaire ». ....	56
Figure 23 : Données de l'électroneurographie des agneaux des groupes « cellules stromales mésenchymateuses » et « acellulaire » réalisée 24 heures après la naissance. ....	58
Figure 24 : Exemple de tracés obtenus lors de l'évaluation des potentiels évoqués sensitifs chez un agneau 24 heures après la naissance. ....	59
Figure 25 : Coupes histologiques des blocs lésionnels des agneaux prélevé 24 heures après la naissance colorées à l'hématoxyline-éosine-safran. ....	60
Figure 26 : Comparaison des données issues des analyses histologiques du bloc lésionnel des agneaux des groupes « cellules stromales mésenchymateuses » et « acellulaire » prélevé 24 heures après la naissance. ....	61
Figure 27 : Coupes histologiques de différents organes des agneaux 24 heures après la naissance colorées à l'hématoxyline-éosine-safran. ....	62

# Liste des tableaux

---

Tableau 1. Classification phénotypique des anomalies congénitales de fermeture du tube neural (d'après Rossi <i>et al.</i> , 2004 ; Gupta <i>et al.</i> , 2013 ; McComb, 2015).....	12
Tableau 2 : Prévalences comparées (pour 10 000 grossesses) des cas de <i>spina bifida</i> chez l'humain en Europe et en France entre 2009 et 2019 (d'après European Commission, 2021).....	16
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des principaux modèles génétiques de souris utilisés en recherche biomédicale sur le <i>spina bifida aperta</i> (d'après Harris et Juriloff, 2010). ....	26
Tableau 4 : Tableau comparatif des techniques chirurgicales de référence dans le modèle ovin de myéloméningocèle (d'après Bouchard <i>et al.</i> , 2003 et Meuli <i>et al.</i> , 1995). ....	29
Tableau 5 : Méthode d'évaluation de la fonction locomotrice des agneaux issus du modèle ovin de la myéloméningocèle (d'après Brown <i>et al.</i> , 2015). ....	45
Tableau 6 : <i>Sheep locomotor rating scale</i> permettant l'évaluation de la fonction locomotrice des agneaux dans le modèle ovin de la myéloméningocèle (d'après Brown <i>et al.</i> , 2015).....	45
Tableau 7 : Données obtenues lors des différents temps chirurgicaux et à la naissance permettant d'étudier la comparabilité clinique des agneaux.....	54
Tableau 8 : Données sur les anomalies rachidiennes des agneaux 24 heures après la naissance, recueillies après examen tomodensitométrique. ....	55
Tableau 9 : Données relevées lors des examens histologiques des blocs lésionnels des agneaux. ....	55
Tableau 10 : <i>Sheep locomotor rating score</i> des agneaux à deux heures et 24 heures après la naissance.....	56
Tableau 11 : Données de l'examen neurologique des agneaux 24 heures après la naissance.....	57
Tableau 12 : Données de l'électroneurographie des agneaux 24 heures après la naissance. ....	58
Tableau 13 : Données issues de la mesure des potentiels évoqués sensitifs des agneaux 24 heures après la naissance. ....	59
Tableau 14 : Données issues des analyses histologiques des blocs lésionnels des agneaux prélevés 24 heures après la naissance.....	61
Tableau 15 : Données des analyses histologiques de divers organes des agneaux prélevés 24 heures après la naissance.....	62



# Liste des abréviations

---

<b>AFTN</b>	Anomalie de fermeture du tube neural
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>BDNF</b>	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
<b>ChuvA</b>	Centre hospitalier universitaire vétérinaire d'Alfort
<b>CS-EH</b>	Cellule stromale embryonnaire humaine
<b>CSM</b>	Cellule stromale mésenchymateuse
<b>CSM-CO</b>	Cellule stromale mésenchymateuse issue du cordon ombilical
<b>CSM-MO</b>	Cellule stromale mésenchymateuse issue de la moelle osseuse
<b>ct</b>	<i>curly tail</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>
<b>EMG</b>	Électromyogramme
<b>ENG</b>	Électroneurogramme
<b>EnvA</b>	École nationale vétérinaire d'Alfort
<b>INRAE</b>	Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement
<b>ISCGT</b>	<i>International society for cell and gene therapy</i>
<b>LCS</b>	Liquide cérébro-spinal
<b>MCII</b>	Malformation de Chiari de type II
<b>MMC</b>	Myéloméningocèle
<b>MOM</b>	<i>Management of myelomeningocele</i>
<b>n/a</b>	<i>No answer</i>
<b>NGF</b>	<i>Nerve growth factor</i>
<b>PEM</b>	Potentiel évoqué moteur
<b>PES</b>	Potentiel évoqué sensitif
<b>PRBM</b>	Plateforme pour la recherche biomédicale
<b>SLR</b>	<i>Sheep locomotor rating</i>
<b>TRASCET</b>	<i>Transamniotic stem cell therapy</i>



# Introduction

---

La mise en place du tube neural est un processus complexe qui peut être affecté par des anomalies au cours du développement embryonnaire. Il en résulte des malformations congénitales multiples, parfois létales ou ayant d'importantes répercussions fonctionnelles sur l'organisme. De nombreuses espèces sont touchées. On peut citer à titre d'exemples : les bovins, les carnivores domestiques, les équidés, les petits mammifères tels que les souris ou les lapins mais également l'humain.

La recherche sur la myéломéningocèle (MMC) est actuellement très active. Bien qu'aujourd'hui, son incidence soit en baisse grâce à la mise en place de mesures de prévention et d'un dépistage précoce, elle reste néanmoins la malformation nerveuse congénitale d'anomalie de fermeture du tube neural (AFTN) la plus répandue chez les nouveau-nés en Europe, comme il est possible de le constater sur le registre européen de surveillance des anomalies congénitales (European Commission, 2021).

Les individus touchés par cette malformation sont atteints de nombreux troubles d'ordre urinaire, cardiaque, locomoteur, sexuel... handicapant lourdement leur quotidien. Il paraît alors nécessaire d'approfondir nos connaissances sur l'étiologie de cette malformation congénitale, mais également de trouver des traitements permettant une diminution significative de la morbidité des troubles qui lui sont associés. Dans cette optique, de nombreux modèles animaux ont été étudiés et utilisés.

Depuis plusieurs années, la recherche s'est accentuée sur les techniques de réparation de la MMC *in utero*. Néanmoins, à ce jour, les résultats restent assez peu satisfaisants considérant le risque maternel encouru au regard des améliorations fonctionnelles obtenues chez les malades.

C'est dans ce contexte que le Dr Lucie Guilbaud et son équipe travaillent sur les techniques de réparation *in utero* de la MMC et plus particulièrement sur les bénéfices d'une fermeture chirurgicale grâce à un patch de cellules stromales mésenchymateuses provenant de cordons ombilicaux. Ces études précliniques ont été réalisées sur le modèle ovin. Lors des essais précédents, l'exploration des agneaux était conduite deux heures après la naissance. Dans ce nouvel essai, il a été décidé de réaliser les explorations de façon différée par rapport aux précédentes analyses réalisées, après 24 heures de vie, afin de déceler une éventuelle amélioration de diverses fonctions, notamment locomotrices et neurologiques.

L'objectif de ce travail était de déterminer, dans le modèle ovin de la MMC, l'effet de la mise en place anténatale d'un patch de cellules stromales mésenchymateuses issues de cordons ombilicaux sur les différentes fonctions de l'organisme affectées par cette malformation.



# Première partie : la myéломéningocèle chez l'humain et modèles animaux

---

## 1. La myéломéningocèle : présentation et connaissances actuelles

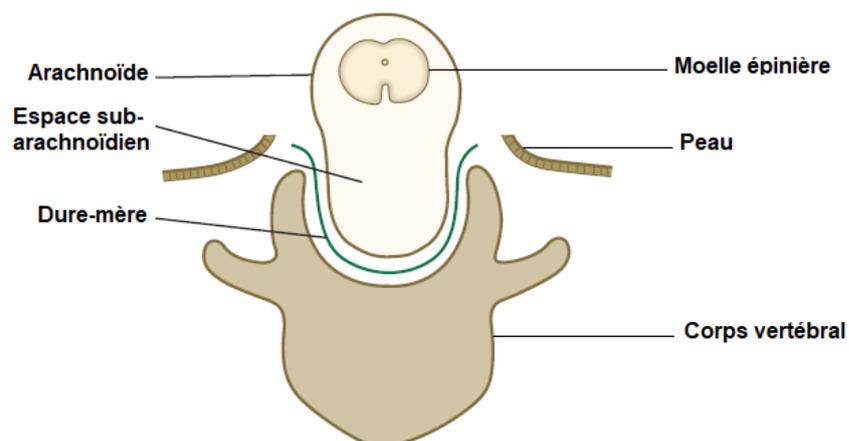
### 1.1. Définition de la myéломéningocèle

Le *spina bifida* est une malformation congénitale se manifestant par une agénésie partielle ou totale d'un ou plusieurs arcs vertébraux du fait d'une absence de fermeture de ces derniers durant le développement embryonnaire. Il se différencie du rachischisis par le plus petit nombre de vertèbres qu'il affecte. Secondairement, d'autres anomalies affectant les méninges et la moelle peuvent survenir. C'est dans ce contexte que se forme une MMC qui se caractérise par la dilatation des méninges en regard du *spina bifida* par accumulation de liquide cérébro-spinal (LCS) formant une poche herniée (Figure 1) dans laquelle vient se loger la moelle épinière sous la forme d'une plaque neurale et faisant protrusion en dehors du canal vertébral (Figure 2) (Carlson, 2018; De Lahunta et Glass, 2009).

Figure 1 : Photographie d'une myéломéningocèle lombaire (flèche blanche) chez un nouveau-né (d'après Zerah et Kulkarni, 2013).



Figure 2 : Schématisation d'une myéломéningocèle en coupe transversale (modifiée d'après Carlson, 2018).



La MMC est donc une AFTN faisant partie des dysraphismes spinaux ouverts, c'est-à-dire une anomalie congénitale affectant la moelle épinière et s'accompagnant d'une brèche cutanée. Il existe cependant d'autres AFTN, ouvertes ou non et pouvant affecter l'encéphale ou chaque segment du rachis. Il est possible de les classer selon leurs caractères phénotypiques (Tableau 1).

**Tableau 1. Classification phénotypique des anomalies congénitales de fermeture du tube neural (d'après Rossi *et al.*, 2004 ; Gupta *et al.*, 2013 ; McComb, 2015).**

La définition de chaque terme utilisé dans ce tableau se trouve en annexe.

Anomalie de fermeture du tube neural			
Ouverte	Fermée		
	Présence de masse sous-cutanée	Absence de masse sous-cutanée	
		Dysraphismes simples	Dysraphismes complexes
Myéломéningocèle Myélocèle Hémimyéломéningocèle Hémimyélocèle	Lipomyéломéningocèle Lipomyélocèle Myélocystocèle terminal Méningocèle	Lipome intraspinal ou intradural Lipome du <i>filum terminal</i> Sinus dermique Persistance du ventricule terminal Tumeurs intra-spinales	Kystes neurentériques Diastématomyélie Diplomyélie Syndrome de régression caudale Dysgénésie spinale segmentaire

### 1.1.1. Embryologie physiologique du système nerveux central

Chez les mammifères, le développement embryonnaire débute par la fusion d'un ovocyte avec un spermatozoïde pour former un zygote. Ce dernier subit d'abord le processus de segmentation qui aboutit à la formation d'une *morula* puis d'une *blastula* composée d'une cavité, le blastocèle, et de deux feuillets : l'endoderme et l'ectoderme.

Chez l'humain, lors de la troisième semaine de gestation, la gastrulation permet l'obtention d'un embryon polarisé et triblastique<sup>1</sup> grâce à la mise en place du mésoderme. Un segment du mésoderme situé sur la ligne médiane de l'embryon sert à la formation de la plaque préchordale et de la notochorde. Ces deux structures permettent, par induction, la différenciation de l'ectoderme sus-jacent en neurectoderme qui va lui-même se différencier en plaque neurale au dix-huitième jour de gestation. L'induction est permise par l'expression des protéines *noggin* et *chordine* qui permettent d'inhiber la *bone morphogenetic protein-4* qui elle-même inhibe la formation de la plaque neurale à partir de l'ectoderme. En parallèle, la protéine *sonic hedgehog* est sécrétée par la notochorde suivant un gradient de concentration selon l'axe antéro-postérieur ce qui permettra la

<sup>1</sup> Chez les métazoaires, un organisme est triblastique lorsqu'il possède trois feuillets (endoderme, mésoderme et ectoderme) lors de la gastrulation durant le développement embryonnaire.

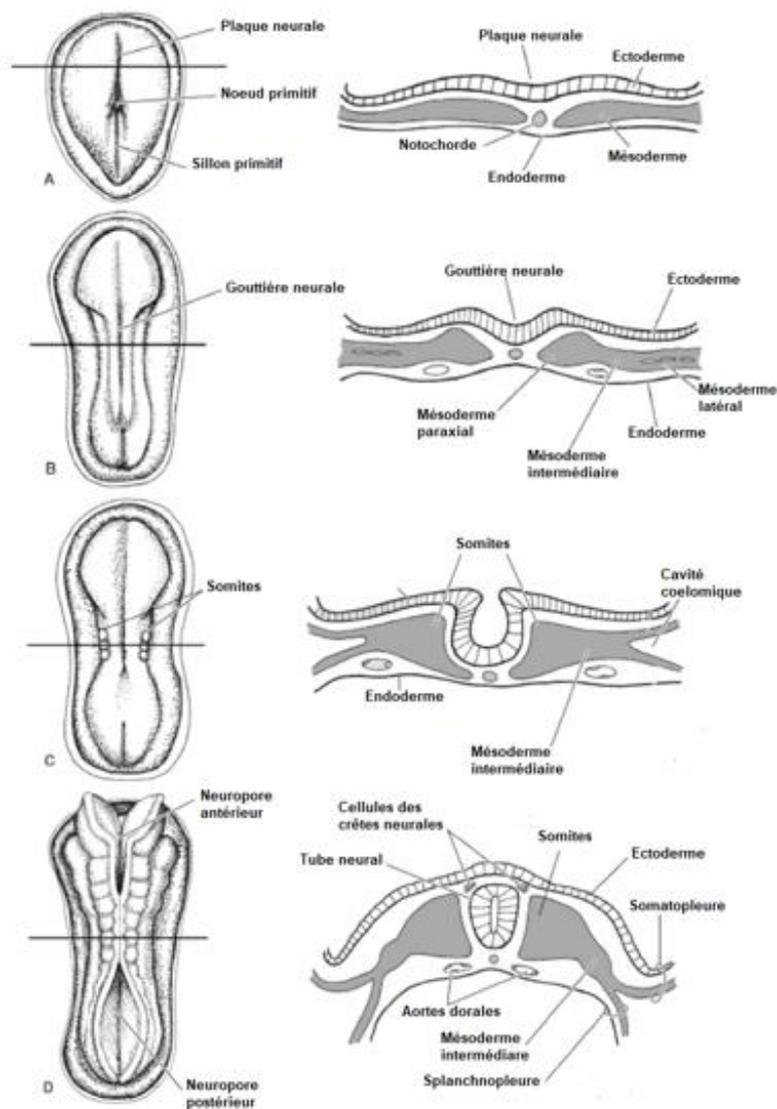
différenciation neuronale et de la partie ventrale de la plaque neurale (Carlson, 2018; Hawryluk *et al.*, 2012).

Le mésoderme se scinde en blocs de part et d'autre de la notochorde et forme les somites. Ces-derniers sont à l'origine du derme, des muscles squelettiques et de la colonne vertébrale. En parallèle, le sillon et le nœud primitifs se forment sur la partie caudale de la ligne médiane de l'embryon puis régressent progressivement pour ne donner plus que l'éminence caudale qui est à l'origine de la partie caudale du corps et du tube neural (Larsen, 2003).

Lors de la quatrième semaine de gestation, le processus de neurulation primaire permet au tube neural de se former par invagination de la plaque neurale (Figure 3). Sa portion crâniale, large, est à l'origine de l'encéphale tandis que la portion caudale est à l'origine de la moelle épinière. La fermeture du tube neural est bidirectionnelle et se finit au niveau des neuropores. À cette occasion, des groupes de cellules issues des lèvres latérales de la plaque neurale s'isolent pour former la crête neurale. À la fin de cette quatrième semaine, les colonnes dorsales et ventrales se forment au sein de la moelle épinière (Carlson, 2018; Larsen, 2003).

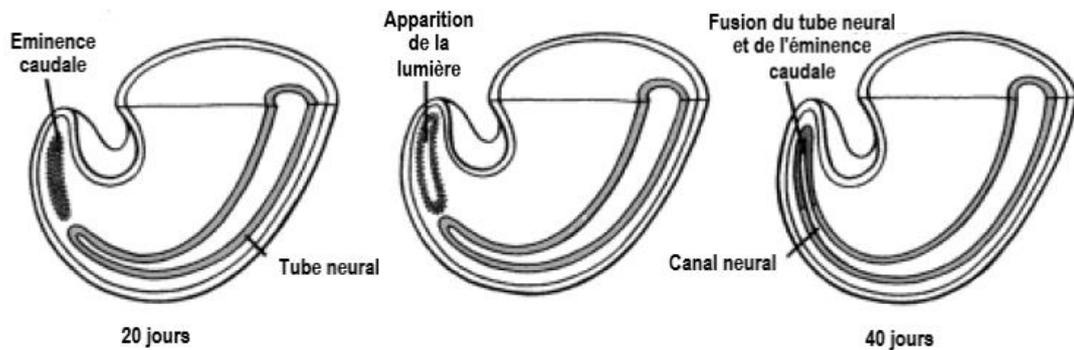
**Figure 3 : Schématisation de la neurulation primaire (modifiée d'après McGeady *et al.*, 2006).**

Les lettres A à D représentent les étapes de la neurulation primaire dans leur ordre chronologique.



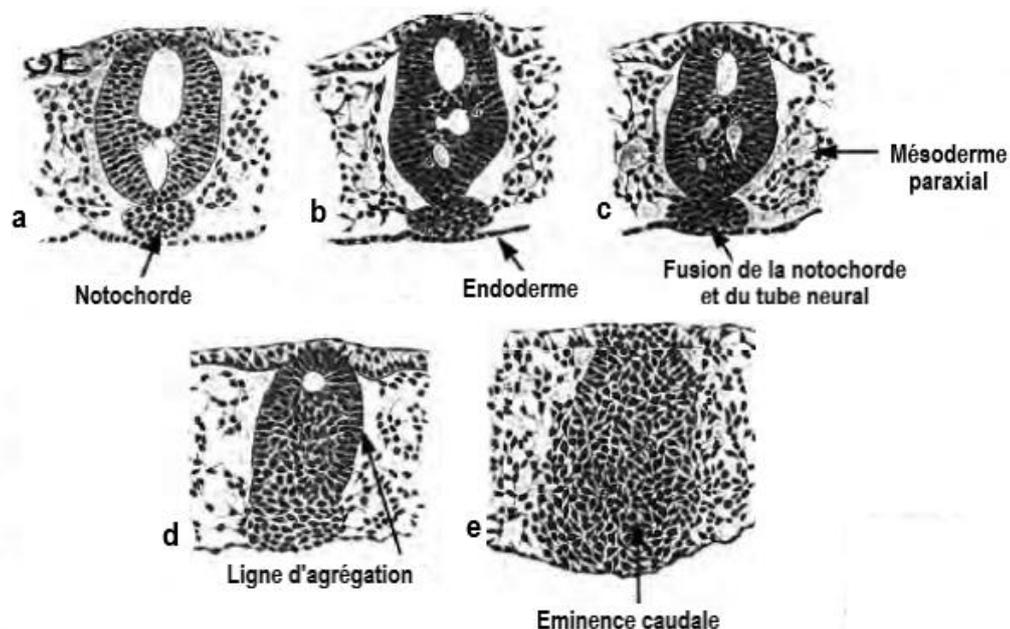
La cinquième semaine de gestation permet la neurulation secondaire qui consiste en la formation de la partie la plus caudale du tube neural. L'éminence caudale, formée de cellules multipotentes, s'allonge en un cordon neural puis se creuse d'une cavité (Figure 4). Elle s'unit ensuite au tube neural sous l'influence de la partie caudale de la notochorde qui a auparavant fusionné avec le tube neural caudal (Figure 5). Cette partie forme le *conus medullaris* et le *filum terminal* de la moelle épinière (Hawryluk *et al.*, 2012; Özek *et al.*, 2008).

**Figure 4 : Schématisation de la formation de la partie caudale du tube neural (d'après Larsen, 2003).**



**Figure 5 : Sections transversales successives de la partie caudale du tube neural d'un embryon de poulet (modifiée d'après Özek *et al.*, 2008).**

La section (a) est la plus rostrale et la section (e), la plus caudale.



### 1.1.2. Embryologie pathologique du système nerveux central

Certaines théories ont été avancées pour expliquer le mécanisme embryologique de formation de la MMC : une non fermeture de la plaque neurale lors de la neurulation primaire, une réouverture tardive du tube neural lors du développement embryonnaire, une distension exubérante de la moelle ou des méninges, *etc.* Une erreur lors de la neurulation primaire a longtemps été évoquée mais le fait que la lésion se situe la plupart du temps en région lombaire suggère une erreur survenue lors de la neurulation secondaire. Néanmoins, il n'existe pas, à ce jour, de preuve permettant la validation d'une des théories précédemment citées chez l'humain (Zerah et Kulkarni, 2013).

### 1.1.3. Gestation et conséquences lésionnelles

Initialement, les lésions observées sur la moelle étaient imputées à la malformation congénitale en elle-même (Emery et Lendon, 1973). Heffez et son équipe ont été les premiers à évoquer l'hypothèse que les malformations observées à la naissance et les déficits qui en découlent seraient dus à deux facteurs : l'AFTN en elle-même, mais aussi le contact immédiat de la moelle épinière avec l'environnement extérieur et en particulier, avec le liquide amniotique. Privée de la protection qu'apporteraient les tissus sus-jacents, la moelle serait exposée, notamment aux chocs (Heffez *et al.*, 1990). Pour étayer leur hypothèse, Heffez *et al.* ont créé chirurgicalement une MMC chez des fœtus de souris. Le groupe expérimental n'a pas subi de réparation et la moelle est restée exposée au liquide amniotique durant le reste de la gestation tandis que pour le groupe témoin, la lésion a aussitôt été réparée par fermeture chirurgicale avant la poursuite de la gestation qui a ensuite été arrêtée à un, deux et trois jours après l'intervention. Ils ont ainsi réussi à montrer que les fœtus exposés au liquide amniotique développaient des déformations graves associées à une paralysie de la queue et des membres pelviens et des anomalies histologiques.

Les travaux de Stiefel *et al.* ont permis d'apporter des précisions quant aux modifications tissulaires que subit la moelle épinière lors de son exposition au liquide amniotique. Chez les modèles murins *loop tail* et *curly tail, (ct)* génétiquement modifiés pour porter une MMC, des analyses histologiques ont permis de mettre en évidence que la moelle épinière possédait un aspect physiologique en début de gestation bien qu'elle ne soit pas recouverte par les méninges ou les tissus situés normalement dorsalement. La seule anomalie notable était la réduction du nombre de neurones impliqués dans les voies de la sensibilité, probablement du fait de leur position aux extrémités latérales de la lésion (Stiefel *et al.*, 2007; Stiefel et Meuli, 2007). La même observation a été faite par d'autres équipes (George et Cummings, 2003; Selçuki *et al.*, 2001).

Puis, progressivement, des lésions d'érosion, d'abrasion, hémorragiques, une avulsion et une dégénérescence tissulaire se mettent en place (Stiefel *et al.*, 2007; Stiefel et Meuli, 2007). Toujours en utilisant le même modèle, Reis *et al.* ont montré une augmentation du nombre de cellules gliales (astrocytes) ainsi qu'une diminution du nombre de neurones en fin de gestation au sein de la plaque neurale par rapport au reste de la moelle. Ces observations ont été confirmées par des observations réalisées chez des fœtus humains (Miled *et al.*, 2020; Reis *et al.*, 2007). Une équipe a avancé l'hypothèse d'une « *third hit hypothesis* » en mettant en évidence la présence d'une astrogliose<sup>2</sup> associée à une forte réaction inflammatoire (présence en quantité augmentée par rapport au groupe témoin de granulocytes, monocytes, cellules gliales et de cytokines pro-inflammatoires) après analyses histologiques et immunohistochimiques de lésions de MMC chez des nouveau-nés humains (Kowitzke *et al.*, 2016). Ceci pourrait être à l'origine de l'aggravation des déficits fonctionnels.

Une évaluation des fonctions sensibles et motrices a été réalisée à différents stades du développement fœtal dans le modèle murin de *spina bifida*. Ainsi, en début de gestation, il existe une continuité fonctionnelle entre les nerfs périphériques des membres pelviens et de la queue et la moelle épinière, qui disparaît progressivement au cours de la gestation (Stiefel *et al.*, 2007).

---

<sup>2</sup> Augmentation anormale du nombre d'astrocytes du fait de la destruction des neurones du système nerveux central.

Ces études permettent de conclure que la moelle, exposée au liquide amniotique, subit des modifications tissulaires inflammatoires et de dégénérescence à l'origine des déficits observés à la naissance. Ces observations sont en corrélation avec celles faites chez des fœtus humains par Korenromp *et al.* qui soulignaient la présence de mouvements considérés comme physiologiques à vingt semaines d'aménorrhée puis se dégradant progressivement au cours de la grossesse (Korenromp *et al.*, 1986). La MMC est donc une malformation congénitale évolutive dont les lésions secondaires apparaissent et s'aggravent au cours de la gestation.

## 1.2. Description de la myéloméningocèle

### 1.2.1. Épidémiologie

Du fait des perturbations induites lors du développement embryonnaire à l'origine d'avortements parfois précoces, il semble illusoire de pouvoir déterminer la prévalence réelle des cas de MMC chez l'humain. Néanmoins, leur prévalence, variable selon les zones géographiques étudiées (Bowman *et al.*, 2009), reste très largement surveillée à travers le monde.

Une étude de 2016 estime que la prévalence mondiale des *spina bifida* chez l'humain est d'environ six cas pour 10 000 naissances (Zaganjor *et al.*, 2016). En Europe, c'est le registre européen de surveillance des maladies rares (EUROCAT Network) qui répertorie la prévalence de différentes anomalies congénitales (dont le *spina bifida*) en se basant sur les registres nationaux. En France, il existe six registres des malformations congénitales réparties entre les zones géographiques suivantes : les Antilles, l'Auvergne, la Bretagne, Paris, la Réunion et Rhône-Alpes. Ils permettent la surveillance de la prévalence des cas de MMC et son évolution en France. Le Tableau 2 illustre la prévalence des *spina bifida* en Europe et en France entre 2009 et 2019 d'après les données du registre de l'EUROCAT (European Commission, 2021).

**Tableau 2 : Prévalences comparées (pour 10 000 grossesses) des cas de *spina bifida* chez l'humain en Europe et en France entre 2009 et 2019 (d'après European Commission, 2021).**

	Europe Moyenne (écart-type)	France Moyenne (écart-type)
<b>Prévalence totale :</b>	4,97 (0,16)	6,07 (0,49)
- <b>Nés vivants</b>	1,65 (0,80)	1,03 (0,19)
- <b>Avortement naturel après 28 semaines de grossesse</b>	0,09 (0,25)	0,07 (0,05)
- <b>Interruption médicale de grossesse</b>	3,23 (0,13)	4,97 (0,37)

L'identification et l'enregistrement des cas de MMC chez les espèces domestiques est peu fréquente et seuls quelques registres existent. En France, l'identification et l'enregistrement des cas de MMC sont assurés par l'observatoire national des anomalies bovines pour l'espèce bovine et l'observatoire des anomalies équinés pour les équidés. Prochainement, un observatoire des anomalies congénitales chez les ovins et les caprins sera mis en place par l'institut de l'élevage en collaboration avec l'institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE) afin de rechercher des mutations ou anomalies génétiques potentiellement impliquées dans les mécanismes à l'origine d'anomalies congénitales dans ces espèces.

La MMC associée à un *spina bifida* est fréquemment retrouvée chez les chats de race Manx et les chiens de races Bouledogue anglais et Braque de Weimar. Des cas sont également rencontrés chez les ruminants et les équidés dans une proportion moindre (De Lahunta et Glass, 2009).

### 1.2.2. Malformations associées et conséquences fonctionnelles

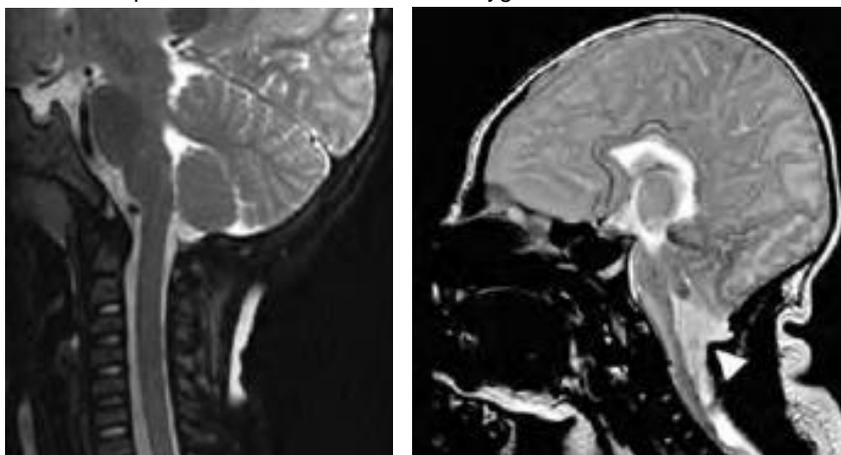
Chez l'humain, la MMC affecte préférentiellement la moelle épinière lombo-sacrée (Tortori-Donati *et al.*, 2000). Néanmoins, une MMC peut survenir sur chacune des portions du rachis (Özek *et al.*, 2008). La présence d'une MMC n'affecte pas uniquement la moelle épinière. Les différents points évoqués ne concernent que les malformations congénitales et anomalies fonctionnelles les plus fréquemment rencontrées lorsqu'un individu est atteint d'une MMC.

#### 1.2.2.1. Anomalies affectant le système nerveux central et le système musculo-squelettique

La malformation de Chiari de type II (MCII) est la malformation congénitale la plus fréquemment associée à la MMC. En effet, on la retrouve chez plus de 90 % des enfants présentant une MMC (Zerah et Kulkarni, 2013). Elle se définit par une fosse postérieure de taille insuffisante combinée à un déplacement postérieur et une élongation du quatrième ventricule ainsi qu'une hernie du vermis et des amygdales cérébelleuses au travers du *foramen magnum* (Figure 6). Très souvent, le tronc cérébral possède également une disposition et une angulation anormales induisant une élongation des nerfs crâniens les plus caudaux par traction ainsi qu'un déficit de myélinisation de ses faisceaux. Chez les nouveau-nés humains, les manifestations cliniques de cette malformation sont celles résultant d'une compression du tronc cérébral : dysphagie, vomissements, réflexe de succion diminué, épisodes de bradycardie, nystagmus, torticolis, hémiparésie faciale, *etc.* Entre 5 et 30 % des individus atteints de la MCII présentent des manifestations cliniques (Özek *et al.*, 2008; Stevenson, 2004; Zerah et Kulkarni, 2013). Concernant les espèces domestiques, un ensemble d'anomalies congénitales pouvant évoquer la MCII a été évoquée chez un veau de race Prim'Holstein atteint d'une myéloméningocèle associée à un *spina bifida*, une arthrogrypose, un opisthotonos, un nystagmus, une paralysie de la queue et de l'anus et une incoordination des membres pelviens. Le vermis était hernié dans le *foramen magnum* et le tronc cérébral était déplacé caudalement (De Lahunta et Glass, 2009).

**Figure 6 : Images obtenues après imagerie par résonance magnétique (en pondération T2) d'un nouveau-né atteint de la malformation de Chiari de type II (à droite) et d'un nouveau-né sain (à gauche) (d'après Özek *et al.*, 2008).**

**À droite :** La flèche blanche indique la hernie du vermis et des amygdales cérébelleuses au travers du *foramen magnum*.



Les fœtus humains atteints de MMC ne possèdent pas une circulation physiologique du LCS. De façon simplifiée, McLone et son équipe expliquent que l'absence de circulation physiologique du LCS induirait un manque de stimulation mécanique sur les tissus de la fosse postérieure ce qui entraînerait un développement insuffisant de celle-ci. Ainsi, certaines parties du cervelet, de taille normale, font protrusion dans le *foramen magnum* et le troisième ventricule ne pourrait pas se distendre physiologiquement. Les diverses malformations qui s'en suivraient (déplacement voire obstruction du quatrième ventricule, obstruction de l'espace subarachnoïdien au niveau du *foramen magnum*, etc.) seraient à l'origine d'une hydrocéphalie par défaut d'évacuation du LCS (McLone et Knepper, 1989). On estime qu'environ 80 % des enfants atteints de MMC développeront, au cours des deux premières semaines de vie, une hydrocéphalie qui nécessitera un traitement chirurgical comme la mise en place d'un shunt ventriculo-péritonéal par exemple, dont les reprises chirurgicales sont nécessaires dans environ 95 % des cas (Chakraborty *et al.*, 2008).

Les différentes anomalies cérébrales présentes peuvent être à l'origine de déficits intellectuels et cognitifs qui peuvent affecter jusqu'à 30 % des individus atteints de MMC (Oakeshott et Hunt, 2003). Il est cependant difficile de déterminer le degré d'implication de chaque anomalie cérébrale du fait de leur fréquente association en cas de MMC. La présence d'anomalies cérébrales associée à un faible niveau socio-économique serait en faveur de déficits cognitifs et intellectuels plus marqués (Pollenus *et al.*, 2020).

La syringomyélie se définit par la cavitation de la moelle épinière sur une longueur équivalente à deux segments spinaux ou plus (Gardner, 1965). Bien que le lien entre la présence d'une MMC et celle d'une syringomyélie ne soit pas clairement établi, cette dernière est présente chez 42 à 77 % d'enfants atteints de MMC selon deux études (Bixenmann *et al.*, 2014; Piatt, 2004). Par ailleurs, d'après Bixenmann *et al.*, il semblerait que la syringomyélie soit une lésion acquise et secondaire à la présence d'une MMC car dans la plupart des cas, la syringomyélie n'est détectée que tardivement lors de la grossesse voire après la naissance (Bixenmann *et al.*, 2014).

Des anomalies du squelette axial et appendiculaire sont également relevées en cas de MMC chez un enfant. Ainsi, des scoliozes sont présentes chez environ 38 % des enfants, tout comme des cyphoses et des lordoses de fréquences plus anecdotiques selon les observations faites par Kumar et son équipe (Kumar *et al.*, 2013). Selon la localisation de la MMC sur la moelle épinière, des atteintes musculaires peuvent être présentes. Les articulations des genoux peuvent être atteintes de contractures en flexion ou en hyperextension ainsi que des valgus ce qui a pour conséquence une difficulté ambulatoire voire la perte de l'ambulation. Les hanches peuvent également subir des déformations secondaires à des atteintes musculaires. Enfin, une grande majorité des enfants présentent des déformations articulaires au niveau des chevilles et des pieds (varus équin pour la moitié des cas) (Kumar *et al.*, 2013; Özek *et al.*, 2008).

#### 1.2.2.2. Anomalies affectant le tractus urinaire et digestif

Concernant la fonction urinaire, la principale anomalie affectant les individus atteints de MMC est l'incontinence. En effet, selon les études, entre 60 et 85 % des malades seraient atteints d'incontinence urinaire (Bowman *et al.*, 2001; Lie *et al.*, 1991; Verhoef *et al.*, 2005). Celle-ci est due à une dyssynergie vésico-sphinctérienne impliquant des hypotonies ou hypertonies au niveau vésical et sphinctérien. Ainsi, les personnes concernées doivent souvent utiliser des protections urinaires et réaliser des sondages vésicaux répétés, réalisés de manière autonome ou accompagnée (Bowman *et al.*, 2001; Verhoef *et al.*, 2005). Selon Verhoef et son équipe, environ

60 % des malades sont traités au moins une fois par an avec une antibiothérapie pour une suspicion d'infection du tractus urinaire (Verhoef *et al.*, 2005). L'insuffisance rénale liée à cette infection ascendante est la cause de décès la plus fréquente chez les individus atteints de MMC (Woodhouse, 2008).

Les anomalies de la fonction digestive se manifestent majoritairement par une incontinence fécale ou une constipation. Entre 35 et 85 % des malades en seraient atteints (Verhoef *et al.*, 2005).

#### 1.2.2.3. Anomalies cognitives

Comme le montrent Hunt et Oakeshott, plus des deux tiers des individus adultes atteints de MMC possèderaient une intelligence jugée comme normale, c'est-à-dire avec un quotient intellectuel supérieur à 80 (Hunt et Oakeshott, 2003). Néanmoins, ceux-ci auraient tout de même des déficits cognitifs, notamment concernant la compréhension des mots et de la syntaxe (Vachha et Adams, 2003) ou la mémoire et les méthodes de mémorisation (Vachha et Adams, 2005). Ces déficits seraient aggravés lors de la présence d'une hydrocéphalie (Lindquist *et al.*, 2009).

### 1.3. Facteurs de risque

Bien que la survenue d'une MMC soit, dans environ 70 % des cas, d'une origine inconnue, certains facteurs de risque ont été identifiés chez l'humain (Agopian *et al.*, 2013). Les différents facteurs de risque présentés sont les principaux évoqués dans la littérature.

La MMC possède très probablement une origine génétique. Bien que les gènes impliqués ne soient pas encore connus, plusieurs observations permettent d'appuyer cette hypothèse. En effet, la MMC serait associée à des anomalies caryotypiques (telles que les trisomies 13 ou 18 par exemple) dans environ 10 % des naissances et plus de 50 % des avortements spontanés (Detrait *et al.*, 2005; Lynch, 2005). De plus, lorsqu'un premier enfant est porteur d'une AFTN, la probabilité qu'un deuxième enfant ayant les mêmes parents soit également touché par une AFTN serait multipliée par dix et par cinquante dans le cas de jumeaux (Lynch, 2005; Manning *et al.*, 2000). Par ailleurs, il existerait des familles au sein desquelles les AFTN sont plus fréquentes que ce qui est normalement observé dans la même aire géographique (Detrait *et al.*, 2005; Manning *et al.*, 2000). L'incidence des AFTN et donc des cas de MMC varie selon l'origine ethnique des populations, les femmes étant plus fréquemment atteintes que les hommes (Bowman *et al.*, 2009). Enfin, il existe plus de 200 modèles murins de modélisation des AFTN dont l'origine génétique a été formellement identifiée (Harris et Juriloff, 2010).

Les carences maternelles pourraient favoriser la survenue d'une MMC chez le fœtus. Czeizel et Dudas montrent qu'une carence en acide folique augmente les risques d'AFTN et qu'une complémentation pré et péri-conceptionnelle permet de diminuer le risque d'AFTN chez le fœtus humain (Czeizel *et al.*, 2013). Le mécanisme d'action de l'acide folique sur la prévention de la formation d'une MMC reste cependant indéterminé à ce jour et peu d'études s'y sont intéressées (Copp *et al.*, 2013). Greene et Copp ont montré qu'une supplémentation péri-conceptionnelle en myo-inositol permettrait de réduire l'incidence des cas de MMC dans le modèle murin *ct*, résistant à l'acide folique (Greene et Copp, 1997). Malgré le faible effectif de leur étude, Cavalli et son équipe ont suggéré qu'une supplémentation péri-conceptionnelle en inositol (en plus de celle en acide folique) permettrait de réduire l'incidence des AFTN chez des femmes ayant déjà eu des grossesses affectées par une telle anomalie (Cavalli *et al.*, 2011).

Certains médicaments connus pour être des antagonistes de l'acide folique seraient à l'origine de l'augmentation de 1 à 2 % des risques de MMC chez le fœtus lors d'une prise de tels médicaments lors de la grossesse. Ainsi, les molécules concernées seraient l'acide valproïque (Bock et Marsh, 2008), la carbamazépine et le phénobarbital (Hernández-Díaz *et al.*, 2001; Matalon *et al.*, 2002), des molécules utilisées pour des traitements antiépileptiques, le triméthoprime (Hernández-Díaz *et al.*, 2001), etc. Par ailleurs, bien que la tératogénicité de l'acide rétinoïque (plus précisément l'acide 13-*cis*-rétinoïque) soit connue chez certains mammifères (Danzer *et al.*, 2005; Hendrickx *et al.*, 2000; Seller *et al.*, 1979), aucun effet tératogène n'a pu être clairement mis en évidence chez l'humain (Miller *et al.*, 1998).

L'état de santé maternel pourrait être un facteur de risque de MMC chez le fœtus humain. Ainsi, Hendricks et son équipe montrent dans une étude réalisée chez les latinos américains que l'hyper-insulinémie durant la grossesse, qu'elle soit liée au diabète ou à l'obésité, est à l'origine d'un risque accrue de survenue d'AFTN (Hendricks *et al.*, 2001). Kerr *et al.* montrent qu'un épisode d'hyperthermie maternelle péri-conceptionnel augmenterait également les risques de MMC chez le fœtus (Kerr *et al.*, 2017).

Enfin, la voie d'accouchement a longtemps été suspectée comme pouvant avoir une influence sur le pronostic moteur des enfants atteints de MMC. Une ancienne étude montre que la naissance par césarienne programmée serait préférable à une naissance par voie vaginale ou par césarienne après un travail avancé (Luthy *et al.*, 1991). Depuis, plusieurs études ont été menées, échouant à démontrer une quelconque différence sur le pronostic fonctionnel des enfants lors d'une naissance par voie vaginale ou par césarienne (Cochrane *et al.*, 1991; Merrill *et al.*, 1998). Il n'existe pas, à ce jour, d'étude permettant de démontrer le bénéfice de l'une des deux voies d'accouchement.

#### **1.4. Diagnostic anténatal**

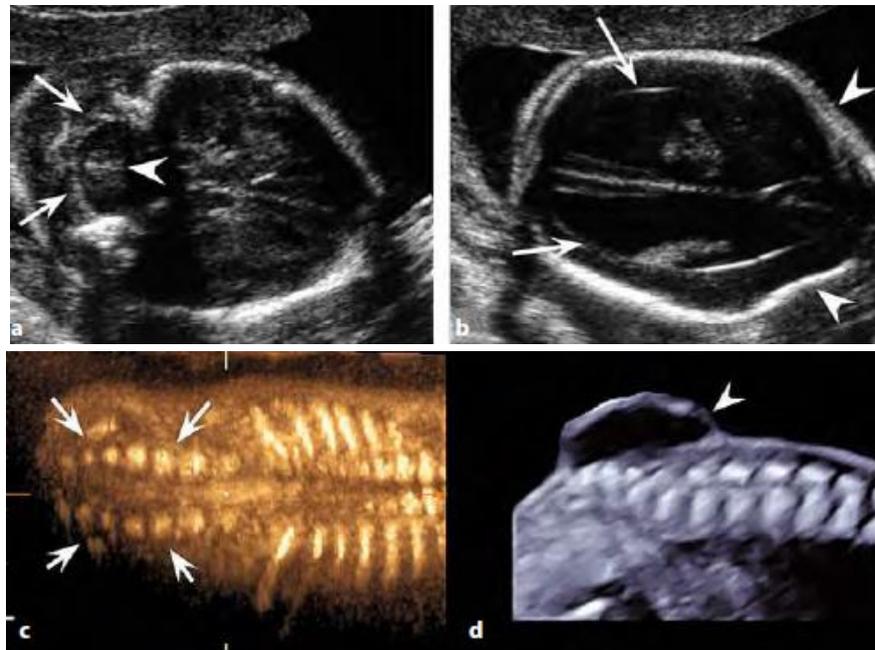
La MMC est dépistée par échographie en deux ou trois dimensions durant les échographies du premier et du deuxième trimestre. On distingue des signes directs et indirects de présence de MMC.

Les signes directs sont objectivables par examen de chaque vertèbre ce qui peut être compliqué voire non réalisable selon la position du fœtus lors de l'examen. L'imageur examine alors la présence de la totalité des arcs vertébraux et la continuité de la peau en zone rachidienne. Dans le cas de MMC, une zone dorsale anéchogène entourée d'une fine membrane échogène peut être visualisée lors de l'échographie du deuxième trimestre (entre 20 et 24 semaines d'aménorrhée) (Özek *et al.*, 2008).

Les signes indirects sont ceux mettant en évidence la présence de la MCII présente chez plus de 90 % des individus atteints de MMC (Zerah et Kulkarni, 2013). Il est possible de visualiser avant 24 semaines d'aménorrhée et dans environ la moitié des cas, un aspect aplati des os frontaux (aussi appelé signe du citron). Lors de l'échographie du second trimestre, il est possible d'observer une oblitération de la grande citerne, une déformation du cervelet qui possède une incurvation plus marquée (signe de la banane) et une ventriculomégalie (Figure 7) (Özek *et al.*, 2008). Il est également possible d'explorer la présence d'une MMC lors de l'observation de malformations des membres inférieurs, notamment une atrophie des muscles jambiers caudaux ou un varus équin.

**Figure 7 : Images échographiques d'un fœtus humain atteint de myéломéningocèle et de la malformation de Chiari de type II (d'après Özek *et al.*, 2008).**

**a** : Coupe trans-cérébelleuse montrant l'effacement de la grande citerne (flèches) et la déformation du cervelet (tête de flèche) ; **b** : Déformations des os frontaux (têtes de flèche) et ventriculomégalie (flèches) ; **c** : Interruptions des arcs vertébraux en région lombaire (flèches) ; **d** : Lésion kystique en région lombaire (tête de flèche).



### 1.5. Traitements anténataux et pronostics associés

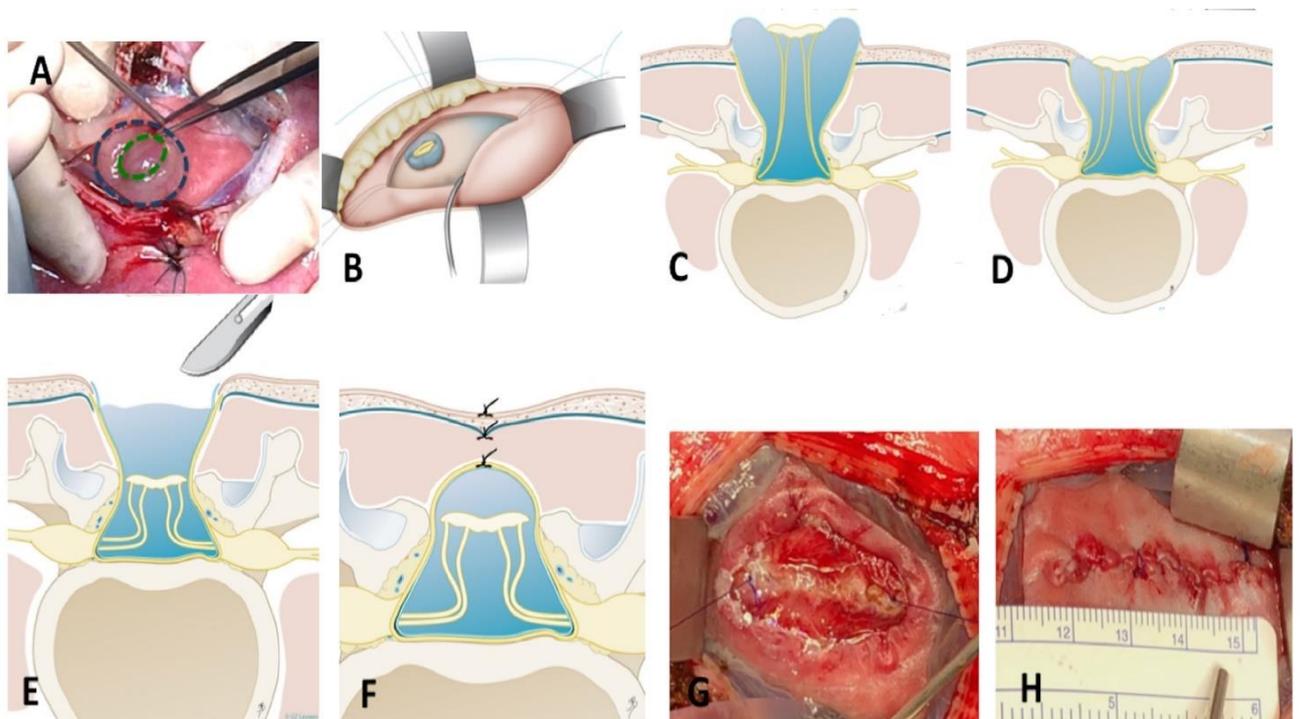
La chirurgie postnatale est le premier type de chirurgie ayant été entrepris pour traiter une MMC. Elle vise à limiter les risques infectieux et traumatiques liés à la présence de la lésion. Elle consiste en la dissection et la remise en place de la moelle épinière et ses méninges au sein du canal vertébral puis à la fermeture de la lésion par suture de la dure-mère, des fascias, des muscles et de la peau en des plans distincts. Elle est généralement réalisée dans les 24 à 48 heures suivant la naissance (Zerah et Kulkarni, 2013) et n'utilise pas de matériel en latex du fait de la forte propension des enfants atteints de MMC à s'y sensibiliser voire même à développer une allergie (Niggemann *et al.*, 1998). Par ailleurs, suite à cette chirurgie, la fibrose cicatricielle serait à l'origine d'un syndrome de la moelle attachée se traduisant par un ensemble de manifestations neurologiques comme la spasticité des membres pelviens ou une incontinence fécale et urinaire dues à une traction constante exercée sur la partie la plus caudale de la moelle fixée anormalement dans le canal rachidien (Agarwalla *et al.*, 2007; Lew et Kothbauer, 2007; Özek *et al.*, 2008). La chirurgie postnatale ne permet donc pas d'améliorer les anomalies fonctionnelles induites par la MMC.

Avec la compréhension du mécanisme de formation de la MMC et notamment l'aggravation des lésions durant la gestation, l'idée d'un traitement chirurgical anténatal s'est développée. Après divers essais sur des modèles animaux, la technique chirurgicale a ensuite été transposée sur les fœtus humains (Figure 8). Elle consiste, chez des fœtus ayant une MMC entre T1 et S1, sans autre anomalie associée et souvent avant 26 semaines d'aménorrhée, en la réparation de la lésion par suture de la dure-mère, des fascias et des muscles et de la peau en des plans séparés après une laparotomie et hystérotomie maternelles (chirurgie à ciel ouvert). Une étude multicentrique randomisée américaine baptisée « *management of myelomeningocele study* » (étude MOM) a été réalisée en 2011. Elle avait pour objectif de démontrer l'intérêt de la chirurgie anténatale en évaluant,

chez des enfants ayant reçu une chirurgie réparatrice anténatale (test) ou postnatale (témoin), les besoins de placement d'un shunt ventriculo-péritonéal à l'âge de 12 mois et le développement mental et moteur à l'âge 30 mois. Chez les individus ayant reçu une chirurgie anténatale, la mise en place d'un shunt était significativement réduite (de l'ordre de 40 %) par rapport aux enfants n'en ayant pas reçu (de l'ordre de 82 %,  $p < 0,001$ ). Les anomalies liées à la MCII étaient également en régression. Enfin, les capacités cognitives et locomotrices étaient également significativement améliorées dans le groupe test par rapport au groupe témoin ( $p = 0,007$ ) même si seulement 42 % des individus du groupe test étaient capables de marcher sans aide orthopédique à l'âge de 30 mois (Adzick *et al.*, 2011; Farmer *et al.*, 2018). Une autre étude soulignait que la fermeture anténatale de la lésion permettait de réduire l'inflammation locale de la peau et de la dure-mère (Pastuszka *et al.*, 2020). Néanmoins, les risques maternels comme le développement d'un œdème pulmonaire, un décollement placentaire, un accouchement prématuré ou la nécessité d'une transfusion sanguine étaient significativement plus importants dans le groupe test. Des risques néonataux accrus comme une bradycardie ou une détresse respiratoire voire des apnées étaient relevés en cas de chirurgie fœtale (Adzick *et al.*, 2011; Farmer *et al.*, 2018). Ainsi, l'étude MOM a mis en évidence les bénéfices de la chirurgie fœtale de réparation d'une MMC par rapport à une prise en charge à la naissance uniquement. Cependant, bien que ces bénéfices soient clairement établis, ils restent limités en comparaison avec les risques maternels et fœtaux encourus durant la chirurgie anténatale et le reste de la grossesse. Il semble donc nécessaire de trouver des thérapies adjuvantes complémentaires de la simple chirurgie fœtale de réparation d'une MMC.

**Figure 8 : Illustration de la technique chirurgicale standardisée de réparation anténatale « à ciel ouvert » de myéloméningocèle chez l'humain (d'après Joyeux *et al.*, 2018).**

**A** : Photographie de la MMC chez un fœtus à 25 semaine d'aménorrhée ; **B** : Schématisation de la MMC lombaire chez un fœtus après hystérotomie maternelle ; **C** : Schématisation de la lésion de MMC ; **D** : Schématisation d'un myéloschisis ; **E** : Schématisation de la réinsertion de la moelle épinière dans le canal vertébral après dissection des tissus adhérents au plan cutané ; **F** : Schématisation des sutures en trois plans de la lésion ; **G** : Photographie de la lésion après suture du plan musculaire ; **H** : Photographie de la lésion après fermeture du plan cutané.



La chirurgie par fœtoscopie a été développée dans l'objectif de réduire la taille des incisions utérines et de limiter les risques d'accouchement prématuré. Actuellement, deux techniques sont utilisées afin d'opérer *in utero* les AFTN et en particulier la MMC. Une première technique consiste à réaliser une laparotomie afin d'extérioriser l'utérus maternel pour ensuite réaliser la chirurgie réparatrice par fœtoscopie. Une suture en trois plans avec un patch de collagène d'origine bovine permettrait d'obtenir des résultats plus proches de ceux de la chirurgie fœtale à ciel ouvert qu'une reconstruction en un plan unique selon Belfort et son équipe (Belfort *et al.*, 2020). Une deuxième technique consiste à réaliser la fœtoscopie par voie percutanée *via* insufflation de dioxyde de carbone dans la cavité amniotique. Lorsque la surface de peau est suffisante pour rapprocher les deux berges de la plaie, un patch de biocellulose est utilisé pour couvrir la plaque neurale puis les muscles et la peau sont suturés en deux plans. Dans le cas où la surface de peau disponible est insuffisante, un second patch composé de silicone et de matrice dermique sera apposé sur le plan musculaire préalablement fermé puis sera suturé aux berges de la plaie (Pedreira *et al.*, 2018, 2016). Une étude américaine a montré qu'il n'existerait pas de différence significative sur la croissance fœtale et postnatale jusqu'à six semaines d'âge entre les enfants ayant reçu une chirurgie de réparation à ciel ouvert et ceux ayant reçu une chirurgie par fœtoscopie (Sanz Cortes *et al.*, 2019). Bien que les résultats soient prometteurs du fait de l'étanchéité de la réparation et de l'aspect esthétique acceptable pour l'enfant, les risques maternels et fœtaux (notamment d'accouchement prématuré et de chorioamniotite) resteraient cependant présents (Adzick *et al.*, 2011; Giné *et al.*, 2018).

Enfin, une équipe s'est intéressée à une hystérotomie mini-invasive afin de réaliser la chirurgie de fermeture de la MMC à ciel ouvert. Elle consiste en la réparation de la MMC telle que décrite précédemment pour la chirurgie à ciel ouvert mais grâce à une hystérotomie comprise entre 2,5 et 3,5 cm de long (contre 6 à 8 cm pour une chirurgie à ciel ouvert classique). Ce type de chirurgie permettrait de réduire les risques d'accouchement prématuré par rupture des membranes tout en conservant l'efficacité de la technique décrite dans l'étude MOM (Peralta *et al.*, 2020).

## **2. Modélisation de la myéloméningocèle humaine à travers les modèles animaux**

Plusieurs modèles animaux ont été utilisés afin de prouver la nécessité et les effets d'une chirurgie anténatale chez les individus atteints de MMC. Afin d'évaluer les effets d'un traitement anténatal dans le cas de MMC, un bon modèle animal doit avoir les caractéristiques suivantes (Stokes *et al.*, 2021) :

- avoir des fonctions locomotrices suffisamment développées à la naissance pour que l'évaluation de l'efficacité du traitement puisse être réalisée rapidement ;
- les mères gestantes ainsi que les fœtus doivent pouvoir tolérer une voire plusieurs interventions chirurgicales anténatales ;
- le temps de gestation de l'espèce doit être suffisamment long afin que les lésions puissent se former (lésions spinales, MCII, *etc.*) et que le traitement puisse faire effet une fois la chirurgie anténatale réalisée.

## 2.1. Le modèle primate

Le *Macaca mulatta* ou macaque rhésus est le premier modèle animal à avoir été utilisé. Dans cette espèce, il est possible d'induire des anomalies du système nerveux central grâce à l'effet tératogène de la triamcinolone, un glucocorticoïde (Hendrickx *et al.*, 1980). Cependant, le type d'anomalies observées (dont une MMC) et leur localisation (sur l'ensemble du système nerveux central) restent trop aléatoires pour qu'une induction médicale puisse être utilisée à des fins de recherche.

Michejda *et al.* ont été les premiers à proposer un modèle chirurgical de MMC chez les macaques rhésus. Entre 110 et 125 jours de gestation, une exérèse des tissus mous en région lombo-sacrée, une laminectomie de L3 à L5 et une durotomie ont été réalisées. Les individus du lot test ont ensuite immédiatement reçu, sur la lésion précédemment créée, un patch d'os fœtaux humains mixés dans de l'agarose, les individus du lot témoin n'ayant rien reçu. Deux jours après une naissance par césarienne entre 160 et 164 jours de gestation, le comportement ainsi que la fonction motrice des membres pelviens des nouveau-nés semblaient normaux. Il avait également été constaté une néoformation osseuse au niveau de la lésion et une moelle épinière paraissant physiologique, encourageant les recherches sur la chirurgie anténatale (Michejda, 1984).

Ce modèle ne permet cependant pas de reproduire l'ensemble des anomalies observées chez les fœtus humains atteints de MMC, notamment celles en lien avec la MCII et les lésions induites par l'exposition de la moelle au liquide amniotique. Il était donc nécessaire de modifier le modèle ou d'en trouver d'autres.

## 2.2. Les modèles rongeurs

### 2.2.1. Le rat

Ce sont Heffez et son équipe qui ont utilisé pour la première fois le modèle animal du rat afin de démontrer l'existence de lésions spinales secondaires à l'exposition de la moelle épinière au liquide amniotique et aux traumatismes, confirmant ainsi la « *two hit hypothesis* » (Heffez *et al.*, 1993, 1990). Pour cela, au dix-huitième jour de gestation chez des ratte Sprague-Dawley, une lésion mimant une MMC a été créée chez les fœtus par exérèse des muscles paraspinaux, une laminectomie sur deux ou trois vertèbres lombaires puis une durotomie à l'aiguille de 26 gauges. La lésion a ensuite été laissée sans réparation chez les fœtus du groupe expérimental ou refermée chez ceux du groupe témoin. Ce modèle chirurgical a donc permis l'exposition de la moelle épinière pendant un, deux ou trois jours jusqu'au déclenchement de la mise bas. En ceci, le modèle mis en place par Heffez *et al.* diffère du modèle primate par l'exposition prolongée de la moelle au liquide amniotique permettant de se rapprocher des conditions humaines. Une deuxième expérimentation a été réalisée selon les mêmes modalités mais en créant un groupe pour lequel la lésion a été couverte par un patch péritonéal issu de la mère. Les auteurs avaient fait la supposition que le patch serait suffisant pour protéger des chocs tout en laissant une perméabilité au liquide amniotique. Il a pu ainsi être mis en évidence, pour ces deux expérimentations, une parésie voire paralysie et déformation des membres pelviens et de la queue chez les fœtus dont la moelle avait été exposée directement au liquide amniotique ou indirectement *via* le patch péritonéal. Ces derniers présentaient également une érosion et nécrose de la moelle épinière plus marquée en région dorsale (celle directement exposée). Ces observations étaient très proches des observations faites chez les nouveau-nés humains.

L'équipe de Danzer a mis au point un modèle non-chirurgical de MMC chez le rat grâce à l'acide rétinoïque. Cette molécule est impliquée dans la signalisation et la différenciation cellulaire pendant le développement embryonnaire et intervient notamment dans la formation de l'axe antéro-postérieur, la neurulation, la maturation de l'encéphale et des vertèbres (Niederreither *et al.*, 1999). Chez des rattes gestantes Sprague-Dawley à dix jours de gestation, de l'acide rétinoïque mélangé à 2 ml d'huile d'olive était administré à différentes doses par gavage (le groupe témoin ne recevant que de l'huile d'olive). Dans le groupe test, environ 84 % des individus présentaient une AFTN dont une majorité présentait une lésion mimant une MMC (plus de 60 % de l'ensemble des individus). Cette étude a permis de démontrer l'effet tératogène de l'acide rétinoïque chez le rat. Par ailleurs, à des doses de 60 mg/kg d'acide rétinoïque, les nouveau-nés présentaient une lésion kystique contenant la moelle épinière et du LCS, une parésie voire paralysie des membres pelviens associée à des déformations de ces derniers et une lésion mimant celle de Chiari de type II. Ceci rend le modèle assez fidèle au tableau clinique observé chez les humains (Danzer *et al.*, 2005).

### 2.2.2. La souris

La souris mutante pour le gène *ct* est un modèle animal très utilisé pour étudier les AFTN des humains. Chez les individus porteurs, il est possible d'observer en moyenne chez 3 % d'entre eux un phénotype d'exencéphalie, chez 10 % d'entre eux un *spina bifida* et chez 50 % d'entre eux une queue incurvée. Selon Embury *et al.*, la mutation *ct* serait récessive (Embury *et al.*, 1979) mais d'autres auteurs suggèrent que la mutation, qui serait située sur le chromosome 4, serait semi-dominant après avoir observé le phénotype *ct* chez certaines souris hétérozygotes (Beier *et al.*, 1995). Bien que n'ayant pas la même physiopathologie que l'humain, le modèle de souris *ct* aurait plusieurs points communs avec le tableau lésionnel humain (Van Straaten et Copp, 2001). En effet, les souris gestantes auraient un taux d' $\alpha$ -fetoprotéine amniotique plus élevé que les souris saines, comme chez l'humain (Adinolfi *et al.*, 1976), les fœtus développeraient secondairement des hydrocéphalies (Embury *et al.*, 1979) et une malformation s'apparentant à la MCII serait observable chez les fœtus développant le phénotype *spina bifida* (Van Straaten et Copp, 2001). C'est ce modèle murin ainsi que celui de la souris *loop tail* (permettant l'obtention de souris atteintes d'un cranio-rachischisis, forme la plus grave d'AFTN) que Stiefel et son équipe ont utilisé pour mettre en évidence l'effet myélotoxique du liquide amniotique (Stiefel *et al.*, 2007; Stiefel et Meuli, 2007). Par ailleurs, ce modèle a également permis de mettre en évidence un possible effet de l'administration d'acide rétinoïque au cours de la gestation. En effet, chez des femelles gestantes, lors d'une administration à huit jours de gestation, l'acide rétinoïque aurait un effet tératogène qui augmenterait la proportion de fœtus atteints d'AFTN (et en particulier d'une MMC) tandis que son administration à neuf jours de gestation induirait au contraire une diminution significative de la proportion de fœtus atteints par cette malformation (Chen *et al.*, 1994; Seller *et al.*, 1979). Il est cependant à noter qu'à la différence des humains, le modèle de souris *ct* est indépendant du cycle de l'acide folique (Greene et Copp, 1997; Van Straaten et Copp, 2001)

Il existe plus de deux cents modèles murins permettant d'étudier les AFTN dont certains permettant l'obtention de phénotypes *spina bifida aperta*, c'est-à-dire des AFTN ouvertes (Harris et Juriloff, 2010). Le Tableau 3 liste les modèles majeurs et leurs principales caractéristiques.

**Tableau 3 : Tableau récapitulatif des principaux modèles génétiques de souris utilisés en recherche biomédicale sur le *spina bifida aperta* (d'après Harris et Juriloff, 2010).**

Mutation	Chromosome concerné	Pénétrance (individus homozygotes)	Sensibilité à une molécule	Référence
<i>ambra1</i>	2	65 % + 20 % associés à une exencéphalie	n/a	Fimia et al., 2007
<i>axd</i>	15	10 %	Méthionine	Essien et Wannberg, 1993
<i>ct</i>	4	10 %	Acide rétinolique, myo-inositol	Beier et al., 1995; Embury et al., 1979; Seller et Adinolfi, 1981
<i>gnaz</i>	10	40 %	n/a	Camerer et al., 2010
<i>rac1</i>	5	85 %	n/a	Camerer et al., 2010
<i>gpr161</i>	1	40 %	n/a	Korstanje et al., 2008; Matteson et al., 2008
<i>itpk1</i>	12	10 %	n/a	Wilson et al., 2009
<i>med12</i>	X	65 % associés à une exencéphalie	n/a	Rocha et al., 2010
<i>ndst1</i>	18	5%	n/a	Pallerla et al., 2007
<i>spint2</i>	7	10 %	n/a	Szabo et al., 2009
<i>sp mutant pax3</i>	1	100 %	Acide rétinolique	Wlodarczyk et al., 2006
<i>tulp3</i>	6	65 %	n/a	Patterson et al., 2009

Récemment, une équipe britannique aurait mis en évidence, chez la souris, l'implication de mutations génétiques ayant lieu après la fécondation (donc non héritée des gènes parentaux). En effet, les souris présentant une délétion du gène *vangl2* dans plus de 16 % des cellules neuro-épithéliales présenteraient des anomalies de la neurulation primaire à l'origine d'AFTN et en particulier de MMC (Galea et al., 2021).

Les modèles rongeurs sont donc pertinents dans l'étude de la physiopathologie de la MMC observées chez l'humain mais ne permettent pas de chercher et tester de potentiels traitements du fait de leur taille et du temps de gestation réduit. Pour cela, un autre modèle animal est nécessaire.

### 2.3. Le modèle porcin

Afin de démontrer, chez une autre espèce que le rat, la myélotoxicité du liquide amniotique pour les fœtus porteurs d'une MMC, Heffez et son équipe ont utilisé des porcs miniatures de race Hanford comme modèle chirurgical. Entre 80 et 85 jours de gestation, une lésion mimant une MMC a été créée chez des fœtus (comme chez le rat, par dissection des tissus paraspinaux au niveau lombaire, réalisation d'une laminectomie sur deux ou trois vertèbres puis réalisation d'une durotomie) puis laissée sans réparation pour les individus du groupe témoin et fermée à l'aide d'un patch de dure-mère humaine pour les individus du groupe test. Une naissance par césarienne a été pratiquée au terme de la gestation. Les auteurs ont pu observer des lésions moins graves de la moelle lorsque la

lésion avait été couverte par un patch de dure-mère humaine (Heffez *et al.*, 1993). Ce modèle chirurgical permet donc d'appuyer l'idée d'une myélotoxicité du liquide amniotique grâce à sa démonstration chez plusieurs espèces. Ce modèle n'a cependant pas été davantage utilisé.

## **2.4. Le modèle gallinacé**

Le modèle gallinacé se centre principalement sur la poule domestique (*Gallus gallus domesticus*). Ce modèle chirurgical, assez peu utilisé, a principalement servi à étudier les propriétés et les effets de cellules stromales embryonnaires. C'est un modèle chirurgical créé par incision de la moelle épinière dans le plan médian sur une longueur d'au moins six somites au niveau de l'insertion des ailes, entre 65 et 72 heures après la fécondation. Les traitements anténataux sont généralement effectués 24 heures après la création de la lésion. Ce modèle a pour inconvénient de ne pas reproduire la lésion en région lombaire du fait du taux de cicatrisation très important lorsque la lésion est créée dans cette zone (Lee *et al.*, 2006, 2004).

## **2.5. Modèle ovin et pertinence**

Bien que les précédents modèles soient proches du tableau clinique humain décrit, un modèle animal présentant un phénotype semblable, un temps de gestation et un gabarit foetal s'approchant de ceux des humains était nécessaire avant une éventuelle transposition à la médecine humaine.

### **2.5.1. Mise en place du modèle**

Ce sont Meuli et son équipe qui, les premiers, ont établi un modèle chirurgical chez le fœtus ovin. Leur objectif était de montrer que le modèle ovin de MMC présentait des similitudes importantes avec le phénotype observé chez l'humain. Pour cela, à 60 ou 75 jours de gestation, ils créaient chirurgicalement la lésion grâce à une exérèse large des tissus mous en zone lombaire, une laminectomie entre L1 et L4 et une durotomie. Certaines gestations ont été arrêtées à 100 jours afin d'observer l'évolution macroscopique et histologique de la lésion. Cette expérimentation a permis de mettre en évidence que la chirurgie à 75 jours de gestation était plus proche du phénotype humain de MMC. En effet, les lésions observées à la naissance étaient macroscopiquement kystiques, impliquant la moelle épinière localisée en dehors du canal vertébral et étaient plus graves qu'à 100 jours de gestation. La cyto-architecture de la moelle à la naissance était également très modifiée avec une perte de tissu nerveux et des zones de nécrose. Les agneaux présentaient une parésie marquée pouvant aller jusqu'à la paraplégie. Lors d'une création de la lésion à 60 jours de gestation, la cicatrisation cutanée était présente dès 100 jours de gestation et les déficits moteurs étaient plus atténués (Meuli *et al.*, 1995). La présence d'une hydrocéphalie ou d'une MCII n'a pas été explorée.

Une deuxième série d'expérimentations a ensuite été menée par la même équipe afin de montrer qu'une fermeture précoce d'une MMC *in utero* permettrait de préserver la moelle épinière et ainsi, d'améliorer l'état clinique du patient à la naissance. De la même façon que précédemment, la lésion était créée chirurgicalement à 75 jours de gestation chez des fœtus ovins. Celle-ci était ensuite fermée chirurgicalement 25 jours plus tard, à 100 jours de gestation. Une naissance par césarienne était ensuite réalisée à terme. Les auteurs ont pu constater que la peau était correctement cicatrisée, une parésie modérée était présente sur les membres pelviens mais leur sensibilité était conservée. Les analyses histologiques avaient mis en évidence que malgré une déformation de la moelle, la cyto-architecture était conservée (Meuli *et al.*, 1996). Cette étude

présente deux inconvénients majeurs : aucun groupe témoin n'a été réalisé et la présence d'une MCII ou d'une hydrocéphalie n'a pas été explorée.

Ce n'est qu'en 2014 que le Dr Guilbaud et son équipe se sont intéressés à la présence d'une MCII dans le modèle chirurgical développé par Meuli et son équipe. La lésion de MMC était créée à 75 jours de gestation chez des fœtus ovins. Un examen échographique était réalisé à 90 jours de gestation afin de détecter la présence d'une lésion mimant la MCII puis une réparation anténatale par fermeture de la lésion était réalisée. Il a ainsi pu être montré qu'une malformation semblable à celle de Chiari de type II était présente dans environ 50 % des cas lors de chirurgie réparatrice postnatale tandis qu'aucun individu ayant reçu une chirurgie anténatale ne montrait de tels signes de cette malformation. Bien que l'effectif de l'étude soit faible, il semblerait qu'une MCII soit présente dans environ la moitié des cas dans le cadre d'un protocole chirurgical de création de MMC sans myélotomie. Enfin, il a également pu être constaté qu'une cicatrisation cutanée spontanée était présente chez plus de 80 % des individus n'ayant pas reçu de chirurgie anténatale (Guilbaud *et al.*, 2014). La cicatrisation spontanée observée dans le modèle chirurgical ovin sans myélotomie de Meuli a été étudiée par Brown et son équipe. Il semblerait que malgré des lésions induites chirurgicalement à 75 jours de gestation restant très semblables, leur aspect macroscopique resterait très variable à 100 jours de gestation (Brown *et al.*, 2015a). La cause de cette variabilité n'a pas pu être mise en évidence. À ces deux différences s'ajouterait une angulation spinale mise en évidence uniquement par Vanover et son équipe dans ce même modèle chirurgical. En effet, l'équipe a pu constater une angulation spinale moyenne d'environ 24° chez les agneaux ayant reçu une chirurgie anténatale (contre 4° chez les agneaux sains témoins) avec une angulation maximale souvent située à la jonction entre L2 et L3. Selon cette même étude, cette angulation serait d'autant plus importante que la laminectomie serait invasive (Vanover *et al.*, 2019a).

Un second modèle ovin chirurgical a été développé suite à la constatation de ces différences avec le phénotype humain. Paek et son équipe ont été les premiers à compléter le protocole de Meuli en ajoutant une myélotomie lors de la création de la lésion à 75 jours de gestation. Le but de cette étude était de prouver le développement d'une malformation semblable à celle de Chiari de type II ainsi que montrer les bénéfices fonctionnels d'une réparation anténatale. Chez les agneaux non réparés, ils observaient un phénotype semblable à celui observé chez les humains atteints de MMC : une malformation kystique impliquant la moelle épinière et une lésion intéressant le cervelet et le tronc cérébral, mimant la MCII mais pas d'hydrocéphalie. Chez les agneaux réparés à 100 jours de gestation (par fermeture conventionnelle ou par patch acellulaire), aucune MCII n'était détectée (Paek *et al.*, 2000). L'étude ne comporte cependant qu'un faible effectif et la présence de la malformation cérébelleuse n'était pas vérifiée au moment du temps de réparation chirurgicale ce qui empêche de faire la distinction entre un potentiel curatif et l'absence de lésion chez ces individus.

C'est l'équipe de Bouchard qui a été la première à démontrer la présence d'une MCII dans le modèle ovin chirurgical avec myélotomie ainsi qu'à montrer l'effet curatif de la fermeture de la lésion sur celle-ci. Toujours avec le même modèle de création d'une lésion à 75 jours de gestation puis de réparation à 102 jours avec une matrice cutanée porcine, ils observaient chez des fœtus autopsiés à différents stades de gestation (allant du moment de la réparation jusqu'au terme), que la MCII était présente lors du temps de réparation et absente pour 89 % des agneaux à la naissance avec une disparition de la lésion au moins trois semaines après la réparation chirurgicale (Bouchard *et al.*, 2003). Von Koch et son équipe, avec un protocole comparable, confirmeraient ces

observations en constatant une MCII chez 43 % des individus ayant reçu une chirurgie anténatale, sans toutefois noter la présence d'hydrocéphalie associée (von Koch *et al.*, 2005).

Joyeux et son équipe ont comparé les deux modèles chirurgicaux afin de déterminer celui qui aurait le plus de similitudes avec le phénotype observé chez l'humain (Tableau 4). Pour cela, ils ont utilisé les protocoles mis en place par Meuli pour le modèle chirurgical sans myélotomie et par Bouchard pour celui avec myélotomie. Des examens fonctionnels postnatals (évaluation de la lésion, de la locomotion, examens d'imagerie, évaluations neurologiques et enfin histologiques) ont été pratiqués afin de déterminer avec précision l'ensemble des lésions observées dans chaque modèle. Un score sur 20 points composés des ressemblances lésionnelles et fonctionnelles avec l'humain avait ensuite été établi. Le modèle sans myélotomie a obtenu un score de 15/20 alors que celui avec myélotomie a obtenu un score de 17/20, la différence résidant principalement dans la présence d'une hernie cérébelleuse et l'amplitude des potentiels évoqués lors de l'évaluation de la fonction motrice des membres pelviens (Joyeux *et al.*, 2019). Ils ont ainsi pu en conclure que le modèle avec myélotomie semblerait plus proche de ce qui est observé chez l'humain que le modèle sans myélotomie. Cependant, les lésions engendrées par le modèle de Bouchard sont bien plus importantes que celles observées chez l'humain.

**Tableau 4 : Tableau comparatif des techniques chirurgicales de référence dans le modèle ovin de myéloméningocèle (d'après Bouchard *et al.*, 2003 et Meuli *et al.*, 1995).**

<b>Caractères étudiés</b>	<b>Protocole chirurgical sans myélotomie (Meuli <i>et al.</i>, 1995)</b>	<b>Protocole chirurgical avec myélotomie (Bouchard <i>et al.</i>, 2003)</b>
Incision cutanée	4x4 cm, circulaire	4x4 cm, circulaire
Laminectomie	L1-L4	L1-L5
Durotomie	L1-L4	L1-L5
Myélotomie	Non	L1-L5
Cicatrisation cutanée	Non	Non
MCII	Non étudiée	85 %
Hydrocéphalie	Non	Non
Aspect lésionnel	Kystique, perte de tissu nerveux et zones de nécrose	Kystique, perte de tissu nerveux et zones de nécrose
Fonction neurologique des membres pelviens	Parésie, perte partielle de sensibilité cutanée	Paraplégie, perte partielle de sensibilité cutanée
Continence urinaire	Non	Non

L'équipe de Joyeux a proposé une méthode standardisée suite à l'étude d'un panel d'articles parus sur la chirurgie anténatale dans le modèle ovin qui permettrait d'obtenir une persistance lésionnelle à la naissance dans la quasi-totalité des cas et une MCII chez plus de 80 % des individus (méthode d'estimation non précisée par les auteurs) (Joyeux *et al.*, 2018b). Ainsi, le protocole chirurgical de création de MMC dans le modèle ovin devrait suivre les recommandations suivantes :

- une surface lésionnelle circulaire d'au moins 4 cm de rayon ;
- un retrait subtotal à total des muscles paraspinaux en regard de la lésion ;
- les laminectomie, durotomie et myélotomie devraient s'étendre sur une longueur équivalente à au moins cinq vertèbres.

### **2.5.2. Caractérisation du modèle**

Afin de réaliser des appréciations objectives en utilisant le modèle ovin de MMC, la mise en place d'outils et de valeurs usuelles lors d'examens postnataux était nécessaire afin de réaliser des mesures et observations quantifiables, répétables et reproductibles.

Une évaluation de la fonction locomotrice des agneaux a été proposée par Joyeux et son équipe. Cette évaluation a lieu en deux temps. Premièrement, la mobilité et les mouvements spontanés de chaque articulation des deux membres pelviens étaient évalués. Deuxièmement, la posture, la mobilité et la coordination des membres pelviens étaient évaluées en exercice, lorsque cela était possible, dans un environnement sans, puis avec obstacle (Brown *et al.*, 2015b). Les observations pouvaient ensuite être reportées dans un tableau ce qui permettait l'obtention d'une note sur 12. Enfin, cette note et l'ensemble des observations faites permettaient de donner un score de locomotion noté sur 15 à l'agneau (score selon la *sheep locomotor rating scale* ou score SLR). L'utilisation de cet outil nécessite la bonne connaissance des capacités locomotrices d'un agneau sain en fonction du temps après la naissance afin de pouvoir déceler une quelconque anomalie. D'après les auteurs, cette échelle SLR permettrait de rendre compte d'un large spectre d'anomalies locomotrices chez l'agneau.

L'évaluation de la fonction sensitive des membres pelviens des agneaux a également été étudiée dans le cadre du modèle ovin de *spina bifida*, notamment à travers la mesure des potentiels évoqués sensitifs (PES). Ces derniers sont mesurés par stimulation électrique d'un nerf et enregistrement d'un signal (en réponse à cette stimulation) sur le système nerveux central (moelle épinière, tronc cérébral ou cerveau). Yingling et son équipe ont montré que, dans le modèle chirurgical sans myélotomie avec une création de la lésion à 75 jours de gestation, lors de la stimulation du nerf tibial, il y avait une absence de détection des PES au niveau du cortex cérébral (Yingling *et al.*, 1999a). Des mesures sur des agneaux sains ont également été menées par cette équipe, permettant de déterminer des valeurs de référence chez des animaux en situation physiologique pour une stimulation donnée (Yingling *et al.*, 1999b). Ces mesures sont cependant peu utilisées actuellement du fait du faible effectif de l'étude, de l'évolution des appareils et des techniques de stimulation ainsi que de l'invasivité de la technique qui nécessite l'ouverture de la boîte crânienne.

Enfin, l'évaluation de la fonction motrice des agneaux à travers la mesure des potentiels évoqués moteurs (PEM) a également été abordée par l'équipe de Joyeux. Ces derniers se mesurent par stimulation électrique du cortex cérébral et enregistrement du signal au sein des muscles des membres pelviens. Joyeux et son équipe ont montré la validité, la reproductibilité et la répétabilité de leur méthode qui permet de rendre compte d'un large spectre d'atteintes neurologiques. Des valeurs de référence ont pu être établies pour les quatre membres des agneaux sains (Joyeux *et al.*, 2017). Le faible effectif de l'étude nécessite néanmoins l'emploi des PEM avec précaution, bien que cette méthode d'évaluation n'ait pas encore été utilisée de façon courante actuellement.

### **2.5.3. Un modèle ovin génétique**

En 2004 aux États-Unis, un élevage a vu son incidence de cas de *spina bifida* augmenter brutalement après l'introduction d'un bélier de race Dorper dans le cheptel reproducteur. Les agneaux atteints présentaient soit un *spina bifida* lombaire, soit une queue déformée (ou les deux). Ce bélier et sa descendance ont donc été étudiés entre 2004 et 2008 afin de déterminer le mode de transmission génétique de l'anomalie congénitale et sa potentielle utilisation à des fins de

recherches. Des lignées F1 (accouplement du bélier en question avec des brebis d'apparence saines) et F2 (par *backcross*, c'est-à-dire par accouplement du bélier avec des individus F1) ont été produites. Les individus femelles et mâles produisant le caractère recherché (le *spina bifida*) ainsi qu'un individu atteint de *spina bifida* ayant survécu jusqu'à l'âge adulte ont été conservés. Il a ainsi pu être constaté qu'environ 25% des individus possédaient le phénotype « queue déformée » et seulement 8 % des individus possédaient un *spina bifida*, le plus souvent en région lombo-sacrée. Une variation de transmission liée au sexe est fortement suspectée mais reste non prouvée actuellement. L'équipe travaillant sur cette lignée suspecte cependant l'implication de plusieurs gènes dans la transmission de ces malformations congénitales (Steele *et al.*, 2020).

L'utilisation de cette lignée présenterait certains avantages par rapport aux modèles chirurgicaux classiquement utilisés. En effet, une forte ressemblance avec le phénotype humain est observée, notamment par l'aspect de la moelle épinière en regard de la lésion, la présence d'une MCII incluant une hernie cérébelleuse, une déformation du cervelet et une hydrocéphalie associée. Par ailleurs, contrairement à la modélisation chirurgicale ne permettant de reproduire que l'effet de l'exposition de la moelle au milieu extérieur, cette lignée permettrait de modéliser l'intégralité de la « *two-hit hypothesis* ». L'inconvénient majeur de ce modèle reste la faible fréquence d'obtention du phénotype recherché au sein de la population sélectionnée (Steele *et al.*, 2020). Actuellement, ce modèle n'est pas utilisé pour la recherche de traitements anténataux.

#### **2.5.4. Modèle ovin de l'étude**

L'équipe du Dr Guilbaud a mis au point et validé un modèle ovin dédié spécifiquement à l'étude du bénéfice d'une réparation anténatale grâce à un patch de cellules stromales de cordons ombilicaux (Guilbaud, 2021; Guilbaud *et al.*, 2014).

Des foetus ovins étaient opérés à 75 jours de gestation afin de créer une lésion visant à mimer une MMC selon le protocole de Meuli. Un agneau avait été euthanasié à 89 jours de gestation, soit 14 jours après la création de la lésion, afin d'objectiver une hernie du vermis cérébelleux au travers du *foramen magnum* et la présence d'une lésion kystique impliquant la moelle en région du site chirurgical, ce qui a pu être confirmé macroscopiquement et histologiquement. Deux groupes ont ensuite été créés : un groupe ne subissant aucune réparation chirurgicale anténatale et un groupe subissant une réparation anténatale classique à 89 jours de gestation. Les agneaux des deux groupes faisaient l'objet d'un examen échographique à 89 jours de gestation (avant la chirurgie de réparation lorsqu'elle avait lieu) afin de mettre en évidence une hernie cérébelleuse. Celle-ci a pu être observée chez l'ensemble des individus. Tous les agneaux sont ensuite nés par césarienne à 135 jours de gestation.

À la naissance, 67 % des agneaux non réparés présentaient une lésion semblable à une MMC humaine avec écoulement de LCS. Ces agneaux présentaient également une hernie cérébelleuse. L'examen histologique de la moelle avait mis en évidence une perte majeure de tissu nerveux. Les 33 % restants ont présenté une cicatrisation spontanée partielle ou totale avec un tissu cicatriciel fibreux voire des néo-muscles et un néo-épiderme dans le cas de cicatrisation spontanée macroscopiquement complète. Les lésions spinales étaient bien moins graves (Guilbaud, 2021).

À la naissance des agneaux ayant reçu une chirurgie anténatale, 83 % des individus avaient une cicatrisation cutanée complète. Les examens histologiques ont mis en évidence une moelle épinière prenant la forme de deux héli-moelles aplaties avec très peu de lésions du tissu nerveux. Pour l'agneau n'ayant pas une cicatrisation cutanée complète, la moelle avait le même aspect mais

les lésions du tissu nerveux étaient bien plus graves. Aucun de ces agneaux ne présentait de hernie cérébelleuse à la naissance (Guilbaud, 2021).

Ce modèle permettant de mimer les lésions spinales d'une MMC humaine tout en permettant l'apparition d'une lésion mimant celle de Chiari de type II, il a été choisi pour démontrer les bénéfices d'un traitement anténatal utilisant des cellules stromales mésenchymateuses issues de cordons ombilicaux (CSM-CO) chez des agneaux.

## **2.6. Vers un nouveau modèle ?**

Bien que le modèle ovin soit considéré comme le modèle animal de référence pour la recherche d'un traitement anténatal sur la MMC, son coût reste conséquent. Cela a mené d'autres équipes à chercher un autre modèle de mammifère ayant des caractéristiques similaires à celles du modèle ovin mais permettant un coût moindre. L'équipe de Stokes s'est penchée sur le cobaye de la race Dunkin-Hartley. En effet, cette espèce a une prolificité plus grande que les ovins, une fonction locomotrice se développant suffisamment rapidement à la naissance et un temps de gestation réduit.

Stokes et son équipe ont donc essayé de déterminer dans un premier temps si l'acide 13-*cis*-rétinoïque permettait l'obtention d'une lésion mimant la MMC humaines et dans un second temps, si les fœtus étaient en mesure de supporter une chirurgie anténatale proche du terme. Pour cela, chez des femelles gestantes, à 12 et 15 jours de gestation, une dose de 60 mg/kg d'acide 13-*cis*-rétinoïque a été administrée dans un premier groupe. Dans un second groupe, des chirurgies anténatales de création de lésion ont été réalisées à 45, 50 ou 55 jours de gestation pour un terme estimé à 68 jours en moyenne. Les auteurs rapportent ainsi que seulement 8 % des individus naissaient avec une lésion mimant une MMC induite par l'acide rétinoïque et qu'aucun des fœtus ayant subi une chirurgie anténatale n'a survécu (Stokes *et al.*, 2021). D'autres essais sont prévus afin de trouver un protocole plus adapté, s'il existe, chez cette espèce.

## **3. Thérapies cellulaires anténatales dans le traitement de la myéloméningocèle**

La fermeture de la lésion de MMC *in utero* permet de limiter les dégâts cellulaires au sein de la moelle épinière et ainsi, limiter les déficits fonctionnels à la naissance. Néanmoins, les lésions tissulaires déjà présentes avant la fermeture anténatale de la MMC induisent des déficits non négligeables à la naissance comme le montre l'étude MOM avec plus de 55 % des enfants restant incapables de marcher malgré une fermeture anténatale de la lésion. Ainsi, tenter de réparer les lésions tissulaires par régénération cellulaire pourrait être un objectif supplémentaire à la chirurgie anténatale.

Les thérapies cellulaires utilisant des cellules stromales sembleraient apporter des résultats prometteurs, notamment dans le cas de maladies neurodégénératives (Gögel *et al.*, 2011; Lindvall *et al.*, 2012) et pour les lésions de la moelle épinière (Teixeira *et al.*, 2013; Xu et Yang, 2019). Plusieurs types cellulaires ont été testés pour la réparation de la MMC au cours des dernières années. Les premières thérapies cellulaires testées lors d'une réparation anténatale de MMC ont été des cellules stromales embryonnaires humaines (CS-EH) utilisées sur le modèle embryonnaire de poule. Lee et son équipe ont montré que la taille de la lésion de MMC était plus petite à la naissance lors d'injection de CS-EH dans la cavité amniotique (Lee *et al.*, 2006). Histologiquement, ces cellules n'étaient pas incluses dans la lésion, introduisant l'idée d'une action à distance de ces

cellules. D'autres équipes ont employé des cellules stromales neurales lors de traitements anténataux *via* des injections intra-amniotiques (modèle murin à l'aide d'acide rétinolique) ou directement au contact de la lésion par injection intra-spinale (modèle ovin) (Fauza *et al.*, 2008; Turner *et al.*, 2013). Ils ont montré que les cellules se trouvaient sous forme indifférenciée en majorité sur la lésion spinale et parfois en profondeur et sécrétaient le *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) connu pour avoir une activité neuro-protectrice et neuro-régénérative (Colucci-D'Amato *et al.*, 2020) sans avoir pu mettre en évidence d'amélioration fonctionnelle à la naissance.

Actuellement, ce sont les cellules stromales mésenchymateuses (CSM) qui font l'objet d'un fort intérêt dans la recherche de thérapies adjuvantes à la réparation anténatale de la MMC.

### 3.1. Les cellules stromales mésenchymateuses et leurs propriétés

Une CSM est une cellule progénitrice (c'est-à-dire issue d'une cellule multipotente) non hématopoïétique capable de se différencier en cartilage, os, tendons, ligaments, tissu conjonctif, ainsi que divers autres tissus structurant l'organisme (Roux *et al.*, 2011). On en trouve, à l'âge adulte, dans la moelle osseuse, la gelée de Wharton, le sang de cordon ombilical, le tissu adipeux, le liquide amniotique, la cornée, la pulpe dentaire, *etc.* (Caplan, 1991; Nancarrow-Lei *et al.*, 2017) et dans le feuillet mésodermique de l'embryon (Salem et Thiernemann, 2010). Elle est également définie par l'*international society for cell and gene therapy* (ISCGT) selon trois critères (Dominici *et al.*, 2006) :

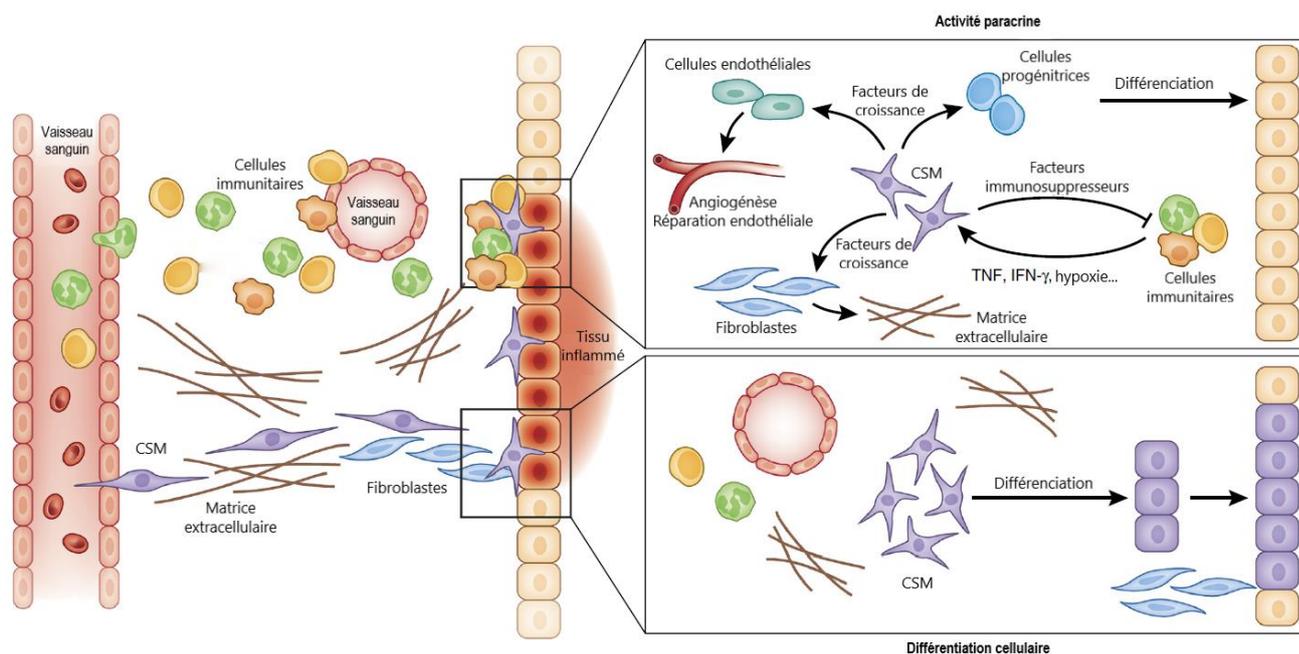
- elle est adhérente au plastique ;
- lors d'une analyse en cytométrie en flux, elle exprime les marqueurs CD73, CD90, CD105 et n'exprime pas les marqueurs CD11b, CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, CD79 $\alpha$  et le *human leukocyte antigen II* ;
- elle est multipotente et capable de se différencier en cellules de la voie mésodermique et plus particulièrement en adipocyte, ostéoblaste et chondrocyte.

Les CSM se retrouvent *in vivo* sur les sites présentant des lésions inflammatoires, notamment les tissus nerveux, grâce à une migration par chimiotactisme (Chen *et al.*, 2001; Qu et Zhang, 2017; Zachar *et al.*, 2016). Elles agissent sur les tissus essentiellement grâce à leur activité paracrine (Figure 9) *via* l'excrétion de diverses molécules et de vésicules extracellulaires (microvésicules, nanovésicules et exosomes), variant suivant la composition du milieu extracellulaire (Baglio *et al.*, 2012; Madrigal *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2020). Ainsi, ces cellules peuvent sécréter des facteurs de croissance, des facteurs neuroprotecteurs, des hormones, des acides ribonucléiques (ARN) et micro-ARN (Baez-Jurado *et al.*, 2019; Maguire, 2013; Vizoso *et al.*, 2017). Cette activité paracrine permet aux CSM d'avoir des propriétés immunomodulatrices (Meisel *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2020), de diminuer l'astrogliose (Kim *et al.*, 2016; Meyerrose *et al.*, 2010) et la fibrose (An *et al.*, 2017; Fouad *et al.*, 2005), d'augmenter l'angiogenèse (Sorrell *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2008) et d'augmenter la régénération axonale et la myélinisation (Hu *et al.*, 2010; Wright *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008).

Les CSM peuvent également agir par différenciation cellulaire puis intégration au tissu endommagé (Figure 9). Plus particulièrement, les CSM ont un pouvoir de différenciation en cellules nerveuses (Bae *et al.*, 2011; Cho *et al.*, 2009; Takeda et Xu, 2015; Ye *et al.*, 2016, 2011). Ces cellules peuvent également se différencier en cellules gliales et en fibroblastes permettant la formation d'une cicatrice, souvent vue comme un obstacle à la récupération nerveuse fonctionnelle (White et Jakeman, 2008). Néanmoins, des équipes ont pu démontrer que la présence de cellules

gliales permettait également de promouvoir la présence et la croissance des neurones et de leurs axones (Anderson *et al.*, 2016; White et Jakeman, 2008).

**Figure 9 : Schématisation des modes d'action des cellules stromales mésenchymateuses lors d'une inflammation tissulaire (modifiée d'après Wang *et al.*, 2014).**



Ainsi, grâce à leurs activités paracrine et de différenciation cellulaire, les CSM sembleraient être une thérapie anténatale adjuvante intéressante pour la réparation des lésions du système nerveux central et en particulier, dans le cas d'une MMC.

### 3.2. Effets des cellules stromales mésenchymateuses dans les modèles animaux de myéloméningocèle

Malgré l'ignorance de la plupart des mécanismes d'action des CSM *in vivo*, leur important potentiel thérapeutique, notamment lors de lésion du système nerveux central, en fait une possibilité thérapeutique non négligeable dans le cas de la prise en charge anténatale d'une MMC (Cofano *et al.*, 2019; Teixeira *et al.*, 2013; Xu et Yang, 2019). Jusqu'à présent, quatre types de CSM ont été testés dans le cadre des thérapies cellulaires anténatales pour la prise en charge de la MMC : les CSM issues de la moelle osseuse (CSM-MO), celles issues du liquide amniotique, celles issues du placenta et les CSM-CO. Plusieurs voies de traitement ont également été entreprises : par injection intra-spinale directe, par dépôt sur la lésion avec un support inerte ou par injection intra-amniotique (la plupart du temps *via* la méthode « *transamniotic stem cell therapy* » ou méthode TRASCET consistant en une injection intra-amniotique des CSM après leur concentration) (Dugas *et al.*, 2020).

Le modèle animal utilisant le rat après induction à l'acide rétinoïque a été très utilisé pour étudier le comportement *in vivo* des CSM et leurs effets tissulaires. Ainsi, il a pu être montré que les CSM, après injection intra-spinale, survivaient au sein du tissu nerveux (Li *et al.*, 2014, 2012) voire se différenciaient en cellules nerveuses (Li *et al.*, 2012). Il a également pu être montré que les CSM diminueraient l'apoptose cellulaire dans la lésion (Li *et al.*, 2014, 2012), augmenteraient l'expression de facteurs de croissance (Li *et al.*, 2014), amélioreraient la cicatrisation de la lésion spinale (Dionigi *et al.*, 2015a; Feng *et al.*, 2016) par la formation d'un néo-épiderme (Dionigi *et al.*, 2015a) et

permettraient de limiter la sévérité de la MCII (Dionigi *et al.*, 2015b). Enfin, après injection intra-amniotique *via* la méthode TRASCET, les CSM étaient retrouvées en grande proportion sur la lésion et à proximité (muscles et os proches de la lésion) sous forme d'amas cellulaires (Dionigi *et al.*, 2015b; Shieh *et al.*, 2018) mais elles étaient également susceptibles d'être retrouvées dans l'ensemble de l'organisme comme, par exemple, l'encéphale, la moelle osseuse, le foie, le placenta, le cordon ombilical, *etc.* (Shieh *et al.*, 2018).

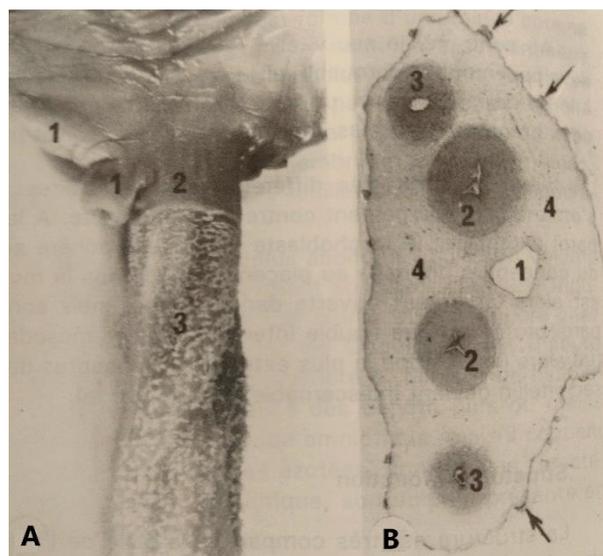
D'autres équipes ont choisi de travailler sur le modèle chirurgical ovin en utilisant les CSM au travers d'un support les contenant, déposé sur la lésion lors de la chirurgie de réparation anténatale. Il a ainsi pu être mis en évidence que l'utilisation de CSM chez le fœtus ovin permettait une amélioration de la cicatrisation de la lésion (Klein *et al.*, 2011). Leur utilisation permet également une amélioration des scores SLR à la naissance (Galganski *et al.*, 2020a; Kabagambe *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2015) et ce dernier ne serait pas corrélé avec la densité cellulaire du support utilisé (à partir de 42 000 cellules/cm<sup>2</sup> d'après Vanover *et al.*, 2019b). L'utilisation de CSM permettrait également d'augmenter la densité neuronale au sein de la moelle épinière (Kabagambe *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2015) et cette densité neuronale serait corrélée positivement avec le score SLR (Galganski *et al.*, 2020a; Vanover *et al.*, 2019b). Enfin, Wang et son équipe ont souligné que les CSM n'étaient pas retrouvées au sein des tissus contrairement à ce qui avait pu être observé dans le modèle murin (Wang *et al.*, 2015).

Ainsi, les CSM pourraient être une thérapie cellulaire adjuvante à la réparation anténatale de la MMC car elles permettraient d'améliorer les fonctions locomotrices à la naissance notamment grâce à l'augmentation de la densité neuronale au sein de la moelle lésée. Le mécanisme reste cependant inconnu même si les propriétés immunomodulatrices et neuroprotectrices des CSM seraient en partie responsable des effets observés. Par ailleurs, deux méta-analyses concernant l'utilisation de CSM en traitement chez l'humain (notamment dans le traitement des lésions spinales) ont conclu à l'innocuité de leur utilisation avec très peu d'effets secondaires de faible gravité rapportés (céphalées, rachialgies, *etc.* probablement dus à la ponction lombaire réalisée lors des traitements) (Lalu *et al.*, 2012; Xu et Yang, 2019).

### **3.3. Les cellules stromales mésenchymateuses issues de cordons ombilicaux : particularités et avantages**

Le cordon est divisé en trois segments : maternel, central et fœtal. Les CSM sont présentes dans diverses parties du cordon ombilical (Figure 10) : la sous-couche endothéliale des veines et artères, la zone périvasculaire et la gelée de Wharton (Conconi, 2011; Wang *et al.*, 2004; Weiss et Troyer, 2006). Il semblerait qu'il n'existe pas de différence entre les différentes populations de CSM des différentes parties du cordon ombilical humain concernant les critères établis par l'ISCGT (Bharti *et al.*, 2018; Hendijani *et al.*, 2014; Ishige *et al.*, 2009). De plus, les CSM-CO sembleraient posséder une grande stabilité en étant capable de garder un temps de doublement cellulaire constant, les mêmes propriétés et le même caryotype après plusieurs passages cellulaires. Un mélange des CSM des différentes parties du cordon ombilical humain permettrait d'obtenir une plus grande vitesse de doublement cellulaire (Mennan *et al.*, 2013). Enfin, les CSM-CO auraient d'importantes propriétés immunomodulatrices (Corsello *et al.*, 2019). Une équipe chinoise a également mis en évidence la présence de CSM dans le cordon ombilical ovin qui auraient la même capacité de préservation des propriétés et du caryotype au cours des différents passages cellulaires (jusqu'à vingt passages) (Zhao *et al.*, 2019).

**Figure 10 : Photographies d'un cordon ombilical de ruminant (d'après Barone, 2001).**



**A** : Photographie du segment proximal d'un cordon ombilical intègre. **1** : Prépuce ; **2** : Revêtement cutané du cordon ; **3** : Revêtement amniotique et ses saillies papilliformes.

**B** : Photographie d'une coupe transversale de cordon ombilical. **1** : Conduit allantoïdien ; **2** : Artères ombilicales ; **3** : Veines ombilicales ; **4** : Tissu conjonctif mucoïde également appelé gelée de Wharton ; **flèches** : Saillies papilliformes du revêtement amniotique.

En matière de CSM, les CSM-MO sont considérées comme étant le « gold standard ». Néanmoins, les CSM-CO humaines et leur sécrétome auraient plusieurs caractéristiques intéressantes pour leur utilisation en médecine régénérative, en particulier dans le cas de lésions de la moelle épinière (Chudickova *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2013; Xu et Yang, 2019; Yang *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2017) :

- une obtention de CSM-CO aisée, non invasive et éthique car un cordon ombilical s'obtient facilement lors de parturition (Li *et al.*, 2015) ;
- la possibilité d'en obtenir rapidement une quantité suffisante pour un traitement anténatal grâce à leur stabilité au cours des différents passages lors de culture cellulaire, leur capacité de doublement cellulaire plus rapide et l'apparition plus tardive d'une sénescence cellulaire que les CSM-MO (Cheng *et al.*, 2011; Mennan *et al.*, 2013) ;
- la possibilité d'obtenir de nombreux types cellulaires (plus que pour les CSM-MO) après différenciation (Conconi, 2011; Hsieh *et al.*, 2010) et notamment, d'obtenir une différenciation en cellules du système nerveux central (Ma *et al.*, 2005) ;
- une capacité plus importante d'angiogenèse que les CSM-MO (Chen *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2018) ;
- un pouvoir immunosuppresseur plus important que les CSM-MO (Batsali *et al.*, 2013; Fong *et al.*, 2011) ;
- la capacité à induire la différenciation cellulaire de cellules embryonnaires humaines en cellules semblables à des cellules nerveuses et améliorer la croissance des neurites *in vitro* (Fu *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2011; Pires *et al.*, 2014) ;
- une absence de formation de tératomes (comme pour les CSM-CO ovines) contrairement aux CSM embryonnaires (Fong *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2019).

Ainsi, les CSM-CO, grâce à leurs propriétés neuroprotectrice et immunomodulatrice, leur facilité d'obtention, leur stabilité lors de culture cellulaire ainsi que leur apparente innocuité et efficacité sur les lésions spinales, semblent être des CSM de choix dans le traitement des lésions spinales et en particulier dans le traitement anténatal de la MMC.

Notre étude, après avoir validé la pertinence du modèle ovin et démontré l'intérêt des CSM-CO dans le cadre de la prise en charge des lésions spinales, visera donc à démontrer les bénéfices de l'utilisation des CSM-CO comme thérapie cellulaire adjuvante à la réparation chirurgicale anténatale de la MMC dans le modèle ovin.



# Deuxième partie : étude expérimentale

---

## 1. Objectif de l'étude

La MMC, du fait de sa prévalence et de ses conséquences lésionnelles et fonctionnelles, est une anomalie congénitale d'importance majeure. Bien que différents traitements existent, il semble nécessaire d'obtenir des résultats plus satisfaisants au regard des risques encourus par la mère et par le fœtus, en particulier lors d'interventions chirurgicales anténatales.

Le Dr Lucie Guilbaud et son équipe travaillent sur le traitement anténatal de la MMC à l'aide de CSM-CO depuis 2016. Des cellules humaines et ovines ont ainsi pu être étudiées *in vitro* et *in vivo* dans le modèle ovin de MMC. Les précédentes études ont pu montrer que l'utilisation de ces cellules permettait une tendance à l'amélioration des fonctions locomotrices des membres pelviens des agneaux deux heures après leur naissance (Guilbaud, 2021). Il n'était néanmoins pas possible de réaliser les explorations plus tardivement après la naissance des agneaux ce qui n'a pas permis de déterminer les effets réels du traitement sur la locomotion des agneaux. En effet, d'après Brown *et al.*, la locomotion des agneaux avec un déficit neurologique estimé comme « moyen » était significativement améliorée après une journée de vie et d'adaptation à leur environnement comparé à une évaluation deux heures après la naissance dans le modèle ovin de MMC (Brown *et al.*, 2015b). Durant l'étude faisant l'objet de cette thèse, il a été possible de réaliser les explorations post-natales après 24 heures de vie ce qui a permis d'obtenir des résultats plus représentatifs que les précédents.

L'objectif de ce projet était ainsi d'étudier les bénéfices d'un patch de CSM-CO dans le traitement anténatal de la MMC et en particulier sur la fonction motrice des membres pelviens. À ces fins, le modèle ovin a été utilisé. Le traitement étudié était un patch de CSM-CO. La lésion a été créée chirurgicalement puis réparée grâce au traitement faisant l'objet de notre étude. Les agneaux sont ensuite nés par césarienne et les explorations post-natales ont été réalisées après 24 heures de vie.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Création et caractérisation du patch cellulaire

L'ensemble des expériences *in vitro* ont été réalisées au sein du laboratoire de thérapie cellulaire de l'hôpital Saint-Louis. L'objectif était de créer un patch de CSM-CO dont les caractéristiques (densité en cellules, activité paracrine...) étaient connues afin de pouvoir l'utiliser au cours de chirurgies fœtales de réparation des cas de MMC humaine. L'ensemble des matériels et méthodes de ces expérimentations ont été décrits précisément par les docteurs Guilbaud et Athiel (Athiel, 2021; Guilbaud, 2021).

#### 2.1.1. Origines des cellules

Au cours des études précédentes, seules des CSM-CO ovines étaient utilisées. Lors des expérimentations faisant l'objet de ce travail, des CSM-CO ovines ont été utilisées mais également des CSM-CO d'origine humaine pour déterminer la faisabilité de la prochaine série

d'expérimentations qui portera sur l'étude des effets d'un patch composé uniquement de CSM-CO humaines, toujours dans le modèle ovin de MMC.

Les CSM-CO ovines étaient issues d'une banque de cellules réalisées grâce aux expérimentations des années précédentes. Elles avaient pour origine trois individus. Elles avaient été prélevées stérilement lors des césariennes permettant la naissance des agneaux. Le cordon avait été rincé à l'aide de tampon phosphate salé puis conservé stérilement avant d'être disséqué. Les tissus avaient ensuite été mis en culture pour récupérer les CSM-CO *via* la méthode des explants. Une fois les cellules d'intérêt obtenues, elles avaient été conservées par congélation dans des cryotubes à - 80°C ou dans de l'azote liquide.

Les CSM-CO humaines provenaient de deux femmes donneuses ayant accouché et donné leur accord pour l'utilisation des CSM-CO recueillies. Le même protocole de recueil et de conservation des CSM-CO que celui décrit pour les cellules ovines a été utilisé.

### **2.1.2. Caractérisation des cellules stromales mésenchymateuses issues de cordons ombilicaux**

Les cellules isolées ont été analysées et caractérisées afin de déterminer si elles remplissaient les critères de cellules stromales mésenchymateuses établis par l'ISCGT.

Une cytométrie de flux a été réalisée afin de déterminer l'immuno-phénotype des cellules recueillies. Cette technique consiste à passer, devant un laser, un échantillon de cellules incubées avec un anticorps spécifique d'un marqueur de surface couplé à un fluorochrome. Le laser du cytomètre active la fluorescence et la machine mesure la longueur d'onde émise ainsi que son intensité. Les témoins étaient des cellules non marquées. Les marqueurs de surface testés étaient les suivants : CD11b, CD14, CD29, CD31, CD44, CD45, CD73, CD79a, CD90, CD105 et CD166.

Des cellules ont été mises en culture sur deux milieux connus comme permettant une différenciation des CSM-CO en ostéocytes et adipocytes respectivement. Une observation en microscopie optique a permis de constater la présence d'une différenciation des cellules après trois semaines de culture.

Enfin, l'activité paracrine et notamment la faculté de sécrétion de facteurs neuroprotecteurs tels que le BDNF et le *nerve growth factor* (NGF) des cellules isolées a été évaluée grâce à la technique *enzyme-linked immunoabsorbent assay* (ELISA) utilisée sur le surnageant des cultures cellulaires.

### **2.1.3. Création du patch cellulaire**

Le traitement testé consistant en l'adjonction de CSM-CO, l'idée de créer un support de type « patch » à apposer sur la lésion de MMC avant sa fermeture chirurgicale s'est imposée. Des patches cellulaires servant dans le groupe test et des patches acellulaires (c'est-à-dire dépourvus de CSM-CO) servant dans le groupe témoin ont été créés.

Dans une boîte de Pétri de six centimètres de diamètre et pourvu d'un socle d'agarose classique, les CSM-CO étaient mélangées à une solution de fibrinogène et de thrombine (Evicel®, Omrix Biopharmaceuticals) de sorte à obtenir une densité cellulaire de 800 000 cellules/cm<sup>2</sup> puis mises dans un incubateur et conservées à 37°C. Les patches acellulaires étaient fabriqués de la même façon mais ne contenaient pas de CSM-CO.

## 2.2. Expériences anténatales

### 2.2.1. Animaux et hébergement

L'ensemble des protocoles réalisés lors de cette étude ont été approuvés par le comité local d'éthique sur l'expérimentation animale (référence du dossier : 20-049 #25588 Myéloméningocèle : évaluation du bénéfice d'un patch de cellules stromales mésenchymateuses dans le traitement anténatal ; date d'évaluation et numéro de l'avis : 2020-06-09-05). Les douze brebis gestantes de race INRA 401 incluses dans l'étude ont été fournies par l'INRAE de Tours. Elles ont été hébergées au sein de la plateforme pour la recherche biomédicale (PRBM) de l'école nationale vétérinaire d'Alfort (EnvA) dans deux box paillés avec un accès illimité à l'eau et au foin. Un complément de granulés (Ténor agneaux, Sanders) était administré à raison de 200 grammes par brebis et par jour. Le délai minimal entre leur arrivée à la PRBM et les premières chirurgies était d'une semaine. Chaque chirurgie était réalisée par un chirurgien et un aide opératoire. Deux chirurgiens sont intervenus au cours des différentes interventions chirurgicales de l'étude.

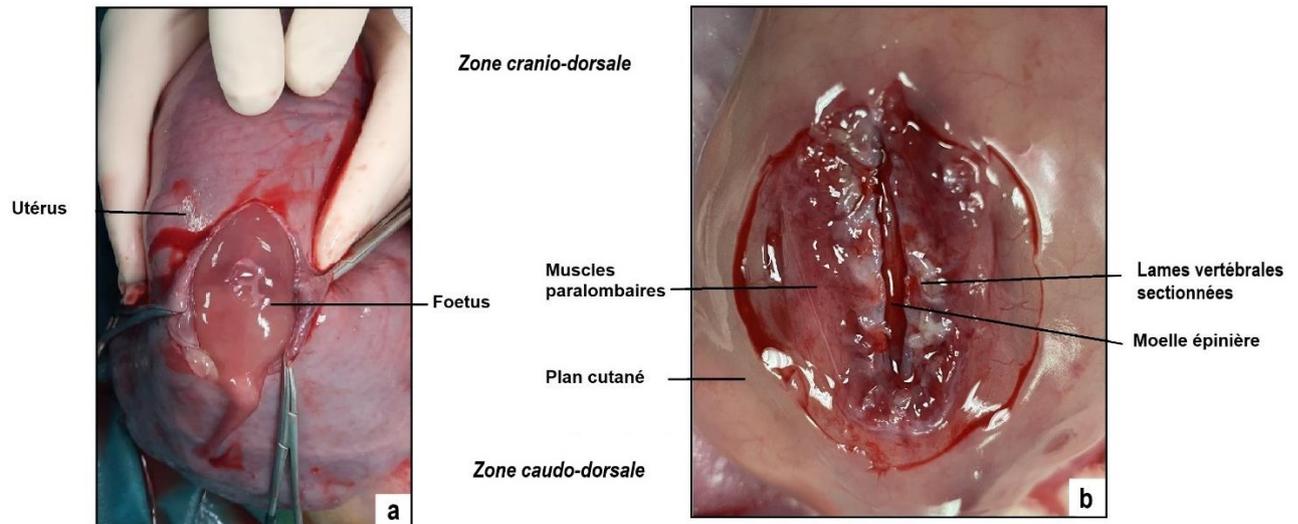
### 2.2.2. Création de la lésion

À 75 jours de gestation, les brebis étaient induites grâce à une injection intra-veineuse en jugulaire d'un mélange de kétamine à la dose de 6 mg/kg (Kétamine 1000®, Virbac) et de diazépam à la dose de 0,5 mg/kg (Diazepam®, TVM). Une intubation orotrachéale était pratiquée et l'anesthésie a été maintenue à l'aide d'une anesthésie gazeuse à l'isoflurane (Isovet®, Osalia) à 3 % dans 0,5 L/min d'oxygène (de telle sorte que  $Et_{iso} = 2,2 \%$ ). Le respirateur était réglé de façon à ce que la pression dans les voies aériennes soit comprise entre 15 et 20 cmH<sub>2</sub>O (et  $Et_{CO_2} = 40$  mmHg). L'analgésie péropératoire était assurée par une injection intra-veineuse de morphine (Morphine® 20 mg/ml, Lavoisier) à la dose de 0,1 mg/kg. Une surveillance des fonctions vitales (notamment cardiaque et respiratoire) était réalisée.

Après une installation en décubitus dorsal, une tonte puis une asepsie (à l'aide de chlorhexidine et d'alcool à 90 degrés) étaient réalisées au niveau de la zone d'intérêt chirurgical. Des champs opératoires stériles étaient ensuite disposés. Une laparotomie par voie paramédiane était pratiquée et la corne utérine gravide extériorisée après apposition de champs humidifiés au NaCl 0,9 % tiédifiés de chaque côté de la zone d'intérêt. Une hystérotomie d'environ 6 cm de longueur, sur la grande courbure de la corne suivie d'une amniotomie étaient ensuite pratiquées et des points simples à visée hémostatique étaient posés sur les berges de la plaie utérine avec du fil monobrin résorbable (Vicryl® 2.0). Le fœtus était ensuite exposé sur sa face dorsale, des vertèbres thoraciques jusqu'à sa queue. En regard des vertèbres lombaires repérées par palpation manuelle, une excision des tissus cutané et musculaire était réalisée selon une ellipse. Une laminectomie sur cinq vertèbres lombaires allant de L1 à L5 était réalisée, suivi d'une incision de la dure mère sur toute la longueur de la lésion créée (Figure 11). Cette dernière était mesurée. Pour compenser la perte en liquide amniotique, 300 ml de Ringer Lactate (Ringer Lactate®, B. Braun) contenant 1 g d'ampicilline (soit 3,33 mg/ml d'ampicilline) et 500 mg de sulbactam (Unacim®, Pfizer) étaient instillés *in utero* avant la réalisation de l'hystérorraphie à l'aide d'un surjet à points passés puis d'un surjet de Cushing avec un fil monobrin résorbable (Vicryl® 2.0). Une aponévrosorraphie était ensuite effectuée par un surjet simple à l'aide d'un fil tressé résorbable (PDS II® 1.0, Ethicon). Enfin, la fermeture cutanée était réalisée grâce à un surjet simple à l'aide d'un fil monobrin irrésorbable (Filapeau® 0).

**Figure 11 : Photographies illustrant la chirurgie de création de la myéломéningocèle chez un fœtus ovin à 75 jours de gestation (photographies personnelles).**

**a** : Positionnement de la zone caudo-dorsale du fœtus en regard de la plaie d'hystérotomie ; **b** : Aspect de la lésion.



En post-opératoire, les brebis ont reçu une antibioprophylaxie à base de céfazoline (Cefazoline® 1 g, Mylan) à la dose de 1 g par brebis par voie intramusculaire, deux fois par jour pendant 3,5 jours. Du salbutamol (Salbumol® 0,5 mg/1 ml, Glaxosmithkline) à la dose de 1 mg par brebis leur était administré deux fois par jour pendant quatre jours afin d'assurer une tocolyse. Enfin, l'analgésie post-opératoire était assurée grâce à une injection sous-cutanée de morphine (Morphine® 20 mg/ml, Lavoisier) toutes les six heures, à la dose de 20 mg par brebis et par jour pendant trois jours.

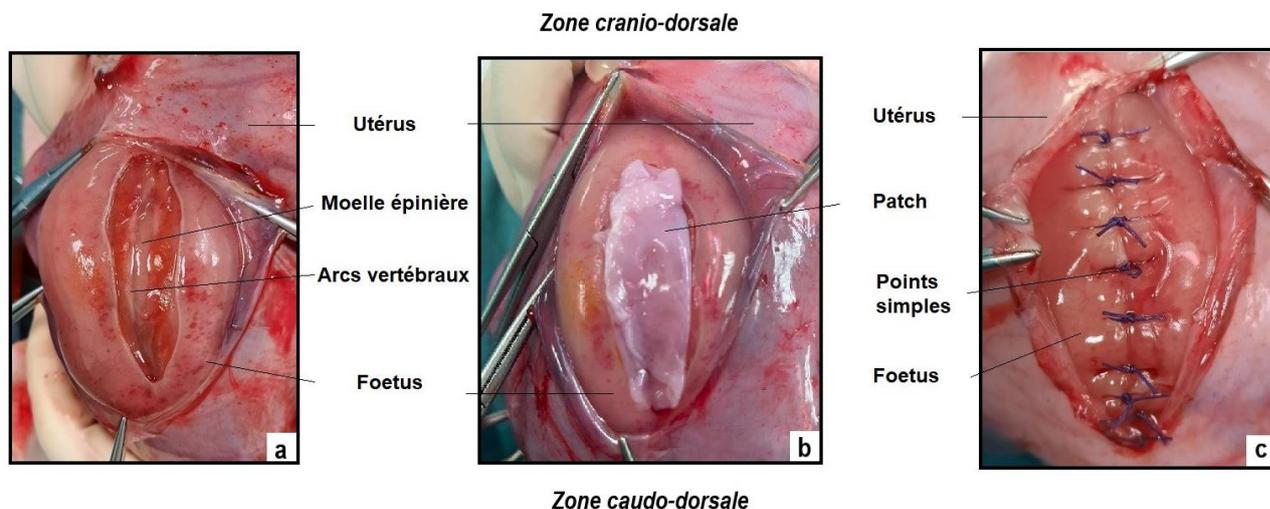
### **2.2.3. Réparation de la lésion**

À 89 jours de gestation, le même protocole anesthésique était réalisé. De la même façon que précédemment, une hystérotomie était pratiquée sur la corne utérine gravide et le fœtus était extériorisé partiellement afin d'exposer la partie caudale de l'organisme. La lésion était mesurée et la membrane cicatricielle ainsi que le tissu sous-cutané adjacent étaient disséqués. Un patch composé de CSM-CO d'origine ovine ou humaine ou un patch acellulaire était disposé sur la lésion puis maintenu en place par suture avec le plan cutané du fœtus à l'aide de points simples de fil tressé résorbable (Vicryl® 2.0) (Figure 12). Le patch n'ayant pas exactement les mêmes dimensions que la plaie fœtale, il a été choisi de replier le patch sur lui-même plutôt que de le couper afin de conserver la même densité cellulaire pour l'ensemble des patchs cellulaires. Les plaies utérine et de laparotomie étaient ensuite refermées de la même façon que précédemment. L'assignation du type de patch pour chaque agneau a été réalisée de manière aléatoire.

En post-opératoire, les brebis recevaient une antibioprophylaxie, un tocolytique et une analgésie identiques au premier temps chirurgical.

**Figure 12 : Photographies de la chirurgie de réparation de la myéloméningocèle chez un fœtus ovin à 89 jours de gestation (photographies personnelles).**

**a** : Photographie après dissection de la membrane cicatricielle présente sur la lésion et du tissu sous-cutané adjacent ; **b** : Photographie après apposition du patch sur la lésion ; **c** : Photographie après fermeture de la lésion par des points simples.



#### **2.2.4. Naissance des agneaux**

Un jour avant la césarienne programmée, une injection intramusculaire de 16 mg de dexaméthasone par brebis (soit 8 ml de Rapidexon® 2 mg/ml, Dechra) était réalisée afin de favoriser la maturation pulmonaire du fœtus (Ballard *et al.*, 1997 ; Tan *et al.*, 1999). Entre 142 et 144 jours de gestation, les brebis étaient induites grâce à une injection intraveineuse jugulaire de propofol (Propovet® multidose, Abbott) à la dose de 5 mg/kg. Une intubation orotrachéale était ensuite réalisée pour assurer la ventilation (avec les mêmes réglages que précédemment mais sans isoflurane). Après la pose d'un cathéter, l'anesthésie était maintenue par une perfusion continue de propofol (Propovet® multidose, Abbott) à la dose de 10 mg/kg/h par voie intraveineuse. L'analgésie locale était assurée par une infiltration intramusculaire et sous-cutanée de lidocaïne (Laocaïne®, MSD Santé Animale) à la concentration de 16,22 mg/ml pour un volume total de 20 ml à injecter le long du site d'incision prévu. Le site opératoire était ensuite tondu et aseptisé comme précédemment. Après l'apposition de champs opératoire stériles, une laparotomie par voie paramédiane d'environ 20 cm de longueur était réalisée. Une hystérotomie suivie d'une amniotomie d'environ 10 cm de longueur sur la grande courbure de la corne gravide étaient ensuite réalisées. L'agneau était extériorisé manuellement et le cordon ombilical était clampé puis coupé. Un échantillon de cordon long d'environ 5 cm était prélevé de façon stérile puis vidangé avant d'être transporté en laboratoire pour dissection et mise en culture. Les brebis étaient euthanasiées immédiatement après extériorisation de l'agneau à l'aide de 25 ml de pentobarbital à 18 % (Doléthal®, Vétoquinol) par voie intraveineuse.

La réanimation de l'agneau était assurée de façon séquentielle. En premier lieu, un dégagement manuel des voies respiratoires (vidange des cavités nasales, buccale, pharyngée) et l'aspiration des glaires (à l'aspirateur chirurgical essentiellement) étaient assurés. L'agneau était ensuite frictionné brièvement afin d'éliminer les liquides fœtaux sur son corps. De l'eau froide était introduite dans une oreille à l'aide d'une seringue de 10 ml afin de provoquer un réflexe vestibulaire et favoriser le déplacement des liquides fœtaux pulmonaires vers l'extérieur (Abrams *et al.*, 1998; Antonelli *et al.*, 1998). Dans un deuxième temps, l'agneau était oxygéné au masque. Une injection de 1 ml de vincamine et papavérine (Candilat veaux®, TVM) par voie intramusculaire et une injection de 0,5 ml de doxapram (Dopram-V® injectable, Vétoquinol) par voie intramusculaire (ou intraveineuse si des signes d'hypoxie tels qu'une cyanose des muqueuses étaient objectivés) étaient

ensuite réalisées. Enfin, les agneaux étaient réchauffés par séchage manuel grâce à des linges puis au sèche-cheveux. Au besoin, le dégagement des voies respiratoires et l'oxygénation pouvaient être renouvelés à tout moment du protocole de réanimation. Si nécessaire, une intubation par voie orotrachéale et une oxygénation pouvaient être pratiquées. Durant la première heure de vie, les agneaux étaient maintenus au chaud grâce à un tapis et une lampe chauffante. Un suivi de température était réalisé afin de détecter une éventuelle hypothermie.

Après une première pesée, la présence d'une fuite de LCS ou d'une cicatrice au niveau de la lésion précédemment créée chirurgicalement était notée. Les agneaux étaient nourris environ une heure après leur naissance par du colostrum ovin (Coloboost agneau®, Bimeda) puis du lait en poudre (Nectagneau®, Sermix). Un repas par biberonnage était réalisé toutes les trois à quatre heures. Les volumes bus, l'heure de la première miction quand observée, la présence d'une continence urinaire et fécale, l'heure des premiers déplacements quand observés étaient relevés et notés. En cas d'incontinence urinaire par rétention, une cystocentèse pouvait être réalisée. Une incontinence urinaire était relevée lorsque l'agneau présentait une vessie non palpable par taxis externe en l'absence de miction ou lorsque la vessie était palpable sans qu'une vidange spontanée ne soit observée. Les agneaux étaient logés dans une large boîte de transport avec des alaises et dans la même pièce que les brebis mais sans contact physique afin de limiter le risque de blessure en cas de difficulté locomotrice marquée (Figure 13).

**Figure 13 : Photographie du logement des agneaux après leur naissance (photographie personnelle).**



## **2.3. Explorations fonctionnelles et post-mortem**

### **2.3.1. Score de locomotion**

Deux heures après leur naissance, le score SLR des agneaux était évalué selon la technique décrite par Brown *et al.* (Brown *et al.*, 2015b) au sein de la PRBM où les agneaux étaient depuis leur naissance (Tableau 5). La mobilité et les mouvements spontanés de chaque articulation des membres pelviens étaient évalués au repos. Une évaluation dynamique était ensuite réalisée afin de déterminer la mobilité, la posture et la coordination des membres pelviens des agneaux qui devaient évoluer dans un environnement sans obstacle dans un premier temps puis avec obstacles dans un second temps (Figure 14). L'exercice était filmé dans son intégralité et répété 24 heures après la naissance des agneaux. Les films étaient ensuite visionnés en aveugle par une spécialiste en médecine physique et réadaptation pédiatrique. À l'issue du visionnage de chaque film, chaque agneau recevait pour chaque évaluation une note comprise entre 0 et 15 (0 correspondant à une paraplégie complète et 15 correspondant à une locomotion physiologique) en accord avec le score SLR établi par Brown *et al.* (Brown *et al.*, 2015b) (Tableau 6).

**Tableau 5 : Méthode d'évaluation de la fonction locomotrice des agneaux issus du modèle ovin de la myéloméningocèle (d'après Brown *et al.*, 2015).**

Mouvement des membres				Locomotion				
				Posture debout avec assistance		Marche	Coordination des membres thoraciques et pelviens	
Membres postérieurs				Oui	Non	Nombre de pas	Jamais Occasionnel (< 50 %) Fréquent (> 50 %)	
Hanche	Grasset	Jarret	Score total	Posture debout sans assistance (et postérieurs impliqués)				
D G	D G	D G	/12	Oui	Non	1 – 4	Passage d'obstacle	
				D G				
0 0	0 0	0 0			Posture debout spontanée		> 5	Échec
S S	S S	S S						
E E	E E	E E						
0 = aucun mouvement S = diminué (< 50 %) E = complet (> 50 %)				Oui	Non			
0 = 0 points S = 1 point E = 2 points								

**Tableau 6 : Sheep locomotor rating scale permettant l'évaluation de la fonction locomotrice des agneaux dans le modèle ovin de la myéloméningocèle (d'après Brown *et al.*, 2015).**

Degré d'atteinte	Score SLR
<b>Grave</b>	Grade 0 Paraplégie complète
	Grade 1 Total de 1 à 3 point(s) pour les mouvements articulaires
	Grade 2 Total de 4 à 6 points pour les mouvements articulaires
	Grade 3 Total de 7 à 9 points pour les mouvements articulaires
	Grade 4 Total de 10 à 12 points pour les mouvements articulaires
<b>Modérée</b>	Grade 5 Posture debout avec assistance, au moins quatre articulations avec mouvements diminués
	Grade 6 Posture debout avec assistance, au moins quatre articulations avec mouvements complets
	Grade 7 Posture debout spontanée, au moins quatre articulations avec mouvements diminués
	Grade 8 Posture debout spontanée, au moins quatre articulations avec mouvements complets
	Grade 9 Posture debout avec assistance, 1 à 4 pas
<b>Faible</b>	Grade 10 Posture debout avec assistance, au moins cinq pas, coordination des membres absente ou occasionnelle
	Grade 11 Posture debout avec assistance, au moins cinq pas, coordination fréquente
	Grade 12 Posture debout spontanée, 1 à 4 pas
	Grade 13 Posture debout spontanée, au moins cinq pas, coordination des membres absente ou occasionnelle
	Grade 14 Posture debout spontanée, au moins cinq pas, coordination des membres fréquente, échec au test de passage d'obstacle
<b>Normale</b>	Grade 15 Posture debout spontanée, au moins cinq pas, coordination des membres fréquente, réussite au test de passage d'obstacle

**Figure 14 : Photographie d'un agneau au cours de l'évaluation du *sheep locomotor rating score* à 24 heures de vie (photographie du Dr. Yoann Athiel).**



### **2.3.2. Explorations neurologiques**

Toutes les explorations neurologiques ont été réalisées en aveugle au sein du service de neurologie du centre hospitalier universitaire vétérinaire d'Alfort (ChuvA) par un spécialiste en neurologie vétérinaire. Après la réalisation de l'examen clinique neurologique, les agneaux étaient anesthésiés grâce à une perfusion continue de propofol (Propovet® multidose, Abbott) par voie intraveineuse jugulaire à la dose de 1 ml/kg/h, ajustée selon les besoins. Un suivi électrocardiographique et oxymétrique était réalisé pendant toute la durée des mesures. L'appareil utilisé était le modèle EMC Nicolet Viking Select (Nicolet Viking Select & Nicolet Viking IV P, Viasys Healthcare, Madison, Wisconsin, États-Unis).

#### **2.3.2.1. Examen clinique neurologique**

À 24 heures de vie, les agneaux subissaient un examen clinique neurologique complet réalisé en aveugle. Les réflexes des membres pelviens (« réflexe des membres pelviens »), la sensibilité cutanée des membres pelviens (« sensibilité pelvienne »), les mouvements volontaires de la queue (« mouvements de la queue ») ainsi que leur intensité (« tonus de la queue ») étaient relevés et classés selon trois grades de notation : « normaux », « diminués » et « absents » en comparaison avec les observations faites chez des agneaux sains, « normaux » correspondant à des observations identiques ou très similaires, « diminués » correspondant à des observations de mouvements diminués en amplitude ou en tonus et « absents » lors d'absence de réponse après un stimulus en provoquant normalement une. Il était également noté la présence d'un lever spontané, c'est-à-dire sans assistance (« lever spontané ») et la présence d'une continence urinaire (« continence urinaire »), évaluée par l'observation d'un agneau se mettant en position pour uriner.

Lorsqu'un agneau semblait avoir une masse musculaire moins importante que celle d'un agneau considéré comme sain, il était considéré comme montrant des signes d'amyotrophie. La mention d'une probable amyotrophie dans le rapport fourni après les examens neurologiques était relevée en tant que signe d'amyotrophie tandis qu'une absence de mention était relevée en tant qu'absence de signes d'amyotrophie.

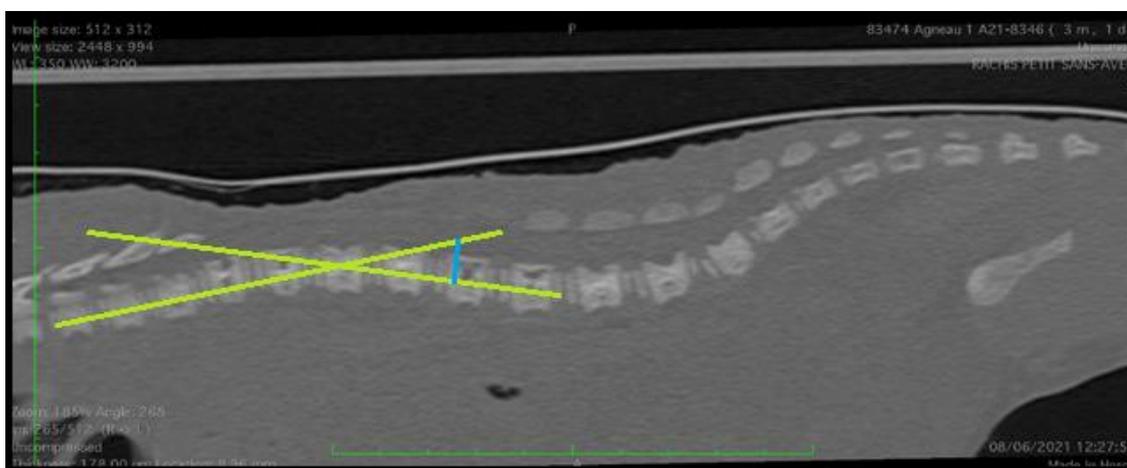
### 2.3.2.2. Examen tomodensitométrique

L'examen tomodensitométrique a été réalisé à 24 heures de vie au sein du service d'imagerie du ChuvA. L'appareil utilisé était un scanner Aquilion Lightning TSX-036A Canon. Les agneaux étaient anesthésiés et placés en décubitus dorsal. Un scanner rachidien était ensuite réalisé avec pour fenêtres de reconstitution : os, parenchyme (pour le thorax uniquement) et tissus mous. Les mêmes acquisitions étaient réalisées une seconde fois après injection d'un produit de contraste par voie intraveineuse. Les images étaient traitées par le logiciel Horos. Le nombre de vertèbres lésées (« nombre de vertèbres ») ainsi que l'angle de déformation rachidienne (« angle rachidien ») tel que décrit par Vanover *et al.* (Vanover *et al.*, 2019a) étaient relevés (en bleu sur la Figure 15).

**Figure 15 : Illustration de la mesure de l'angle de déformation rachidienne sur une image d'un examen tomodensitométrique du rachis d'un agneau (service d'imagerie du ChuvA).**

**Traits verts** : droites tracées pour mesurer l'angle de déformation rachidienne.

**Trait bleu** : angle de déformation rachidienne décrit par Vanover *et al.* (Vanover *et al.*, 2019a).



### 2.3.2.3. Électromyographie

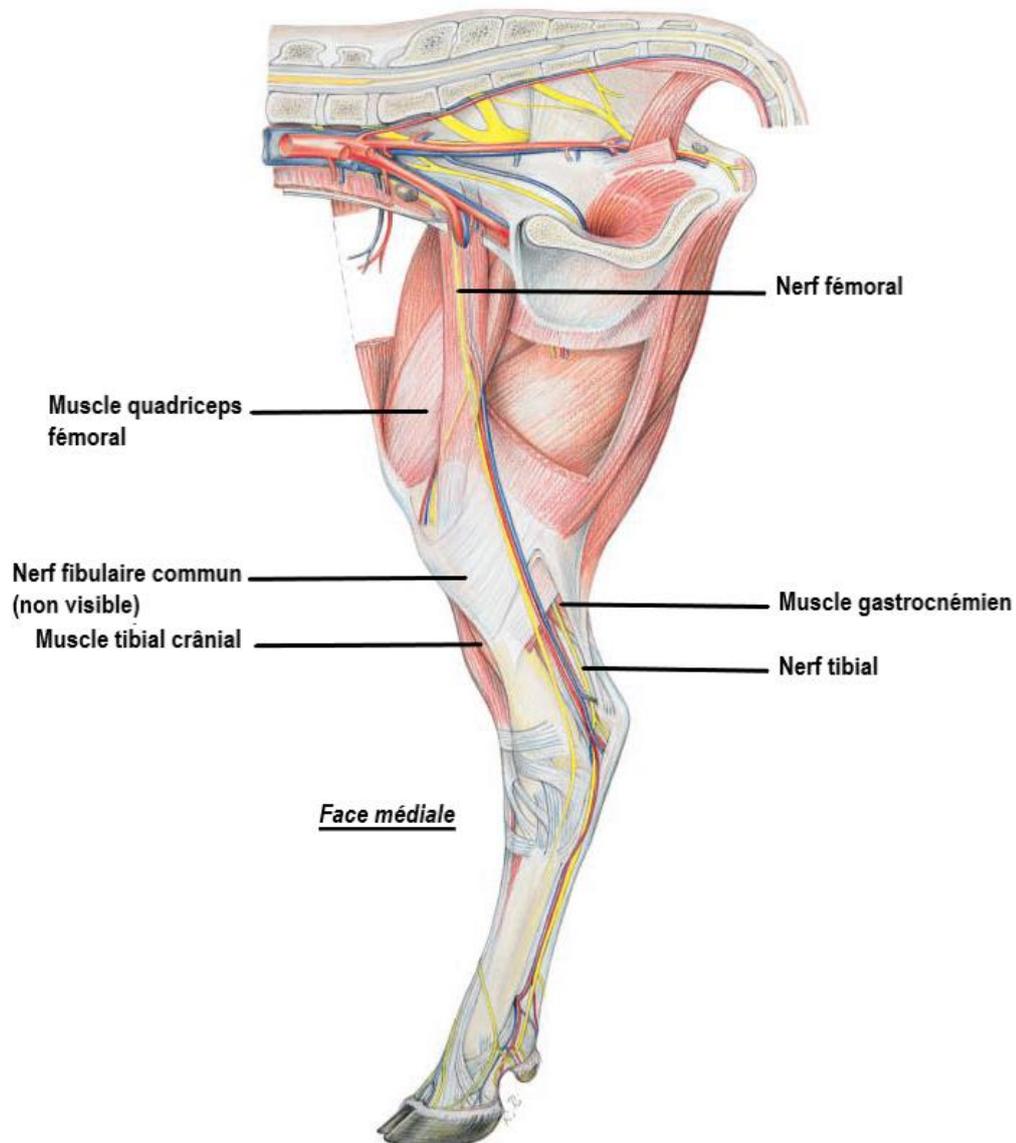
Des électrodes concentriques bipolaires et monofilaires à usage unique (aiguille de 40 mm de longueur, 0,45 mm de diamètre et d'aire d'enregistrement de 0,068 mm<sup>2</sup>) ont été utilisées pour l'enregistrement. Une électrode était placée dans un muscle d'un des membres pelviens. La réponse musculaire et notamment sa durée et son intensité ont été enregistrées. Les signes d'activité électrique spontanée ont été classés en trois catégories : « absence », « présente et de faible intensité ou localisée », « présente et marquée ». Les principaux muscles des membres pelviens ont été testés.

### 2.3.2.4. Électroneurographie

Des électrodes monopolaires en acier inoxydable revêtue de polytétrafluoroéthylène de différentes longueurs ont été utilisées pour la stimulation électrique et l'enregistrement. Les valeurs ont été obtenues pour une stimulation de fréquence 1 Hz et d'une durée de 0,1 ms. Pour les deux membres pelviens, les mesures étaient réalisées au niveau du muscle tibial crânial lors de la stimulation du nerf fibulaire commun, du muscle quadriceps fémoral lors de la stimulation du nerf fémoral et du muscle gastrocnémien lors de la stimulation du nerf tibial (Figure 16). L'allure du signal induit par la contraction musculaire, son amplitude (mesurée entre la valeur minimale et maximale d'une même période) et sa vitesse de conduction (calculée grâce à la durée mesurée entre l'émission de la stimulation électrique par l'électrode émettrice, sa réception par l'électrode réceptrice ainsi que la distance entre les deux électrodes précédentes) ont été enregistrées.

**Figure 16 : Représentation schématique du membre pelvien en face médiale d'un bovin (modifié d'après Klaus-Dieter Budras et Robert E. Habel, 2003).**

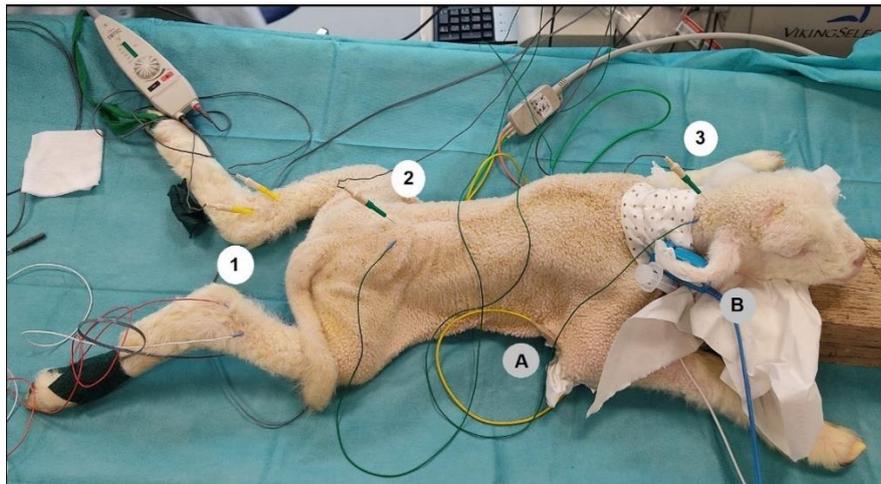
L'anatomie du membre pelvien d'un ovin peut être assimilable à celle d'un bovin pour les points cités précédemment.



#### 2.3.2.5. *Potentiels évoqués sensitifs*

Des électrodes sous-cutanées en acier inoxydable (aiguilles de 13 mm de longueur et 0,38 mm de diamètre) à usage unique ont été utilisées pour la stimulation. Les valeurs ont été obtenues en stimulant simultanément les deux nerfs tibiaux au-dessus du tarse (mesures tests) ou les deux nerfs ulnaires au niveau du carpe ou du coude (mesures témoins). Les mesures ont été obtenues avec une stimulation de fréquence 5 Hz et d'une durée de 0,2 ms avec en moyenne entre cent et mille enregistrements et avec des électrodes réceptrices à différents niveaux du rachis jusqu'en atlanto-occipital. La détection d'un signal en région atlanto-occipitale après stimulation des nerfs ulnaires (membres thoraciques) servait de témoin. L'enregistrement d'un signal en région lombo-sacrée (L6/S1) après stimulation des nerfs tibiaux permettait de vérifier l'intégrité des voies nerveuses entre le nerf tibial et la moelle épinière en aval de la lésion. L'enregistrement d'un signal en région atlanto-occipitale après stimulation des deux nerfs tibiaux permettait de déterminer le fonctionnement effectif ou non des voies sensitives afférentes au travers de la lésion (Figure 17).

**Figure 17 : Photographie d'un agneau anesthésié au cours de l'évaluation de ses potentiels évoqués sensitifs (photographie personnelle).**



**1 : Électrodes sur le trajet du nerf tibial ; 2 : Électrodes en L6/S1 ; 3 : Électrodes en région atlanto-occipitale ; A : Suivi électrocardiographique ; B : Suivi oxymétrique**

### **2.3.3. Profil urodynamique**

Comme précisé précédemment, l'une des principales conséquences de la présence d'une MMC est l'incontinence urinaire avec des hypotonies ou hypertonies vésicales ou sphinctériennes. Il a donc été envisagé de réaliser des profils urodynamiques au sein du service de médecine interne du ChuvA. À cette fin, une profilométrie urétrale ainsi qu'une cystomanométrie de remplissage devaient être réalisées.

Cependant, le sondage urétral, préambule indispensable à la réalisation des examens précédemment cités, était impossible pour les agneaux mâles du fait de la présence d'un S pénien (Figure 18). Par ailleurs, les urètres des agneaux femelles étaient d'un diamètre trop petit par rapport à la taille des sondes disponibles dans le service de médecine interne du ChuvA. La réalisation d'un bilan urodynamique n'a donc pas été possible.

**Figure 18 : Photographie de dissection du S pénien présent chez les agneaux mâles (photographie personnelle).**



### **2.3.4. Autopsie et analyses histologiques**

À l'issue de l'ensemble des explorations post-natales, les agneaux ont été euthanasiés par une injection intraveineuse jugulaire de 7 ml de pentobarbital (Doléthal®, Vétoquinol) et une autopsie était réalisée.

Un examen macroscopique de l'agneau et de l'ensemble des organes était réalisé afin de repérer une quelconque anomalie. Différentes mesures étaient relevées : la distance entre l'extrémité caudale de la cicatrice et la base de la queue (« distance cicatrice-queue ») et la longueur de la cicatrice (« taille cicatrice »).

L'encéphale et le cervelet, le cœur, les poumons, la rate, le foie, le tube digestif, les reins, la vessie, le membre postérieur droit ainsi qu'un bloc allant de T12 à la queue et comprenant le rachis, les muscles paraspinaux et la peau étaient prélevés. L'ensemble des prélèvements étaient conservés dans du formaldéhyde à 10 % pendant 15 jours puis transférés dans de l'éthanol à 70 %. Enfin, ces derniers étaient pris en charge par le laboratoire d'anatomie pathologique du Biopôle situé au sein de l'EnvA. Une analyse macroscopique et une préparation pour analyse histologique étaient réalisées par coloration à l'hématoxyline-éosine-safran ou le trichrome de Masson suite à une décalcification et la réalisation des coupes. Les lames étaient ensuite passées au scanner de lames (Pannoramic Digital Slide Scanner 250 Flash III (3DHistech Ltd)). La lecture de l'ensemble des lames a été faite en aveugle par le Dr Clovis Adam, neuropathologiste, grâce au logiciel QuPath (Quantitative Pathology & Bioimage Analysis, version 0.3.2). Les mesures concernant le bloc lésionnel étaient réalisées uniquement sur la coupe située au centre de la vertèbre L3. Ainsi, ont été relevées et mesurées :

- la présence d'une cicatrisation complète de l'épiderme (« cicatrisation épiderme »), du derme (« cicatrisation derme ») et de la dure-mère (« cicatrisation dure-mère ») ;
- la présence de néo-muscle (« présence néo-muscle ») et de néo-cartilage (« présence néo-cartilage ») ;
- l'épaisseur de la fibrose entre la moelle épinière et le derme, mesurée entre le point le plus dorsal de la moelle épinière et le point le plus ventral du derme sur le plan sagittal (« épaisseur fibrose moelle-derme ») ;
- l'épaisseur de la fibrose péri-spinale mesurée en un point unique, là où la fibrose était visuellement la plus importante (« épaisseur fibrose péri-spinale ») ;
- la surface de la substance grise (« surface substance grise ») ;
- la surface de la moelle épinière (« surface moelle ») ;
- la densité des motoneurones calculée à partir du nombre de motoneurones de diamètre compris entre 30 et 70  $\mu\text{m}$ , divisé par la surface de la matière grise (« densité neuronale ») ;
- le diamètre moyen des fibres musculaires (« diamètre fibres musculaires »), calculé grâce à des mesures réalisées sur deux champs pris au hasard d'une coupe réalisée au niveau du plus fort diamètre du muscle gastrocnémien du membre pelvien droit ;
- l'épaisseur moyenne du sphincter urétral interne (« épaisseur sphincter urinaire ») mesurée en plusieurs points entre le fond des cryptes vésicales et la périphérie externe de la musculature.

## 2.4. Analyses statistiques

Les données ont été reportées sur un fichier Excel. L'ensemble des analyses statistiques et des figures ont été réalisées avec le logiciel GraphPadPrism (version 9.4 pour Windows, GraphPad Software, San Diego, Californie, États-Unis). Les tests ont porté sur le groupe « CSM-CO » composé des agneaux ayant bénéficié du patch contenant des cellules stromales d'origine humaine ou ovine et le groupe « acellulaire » composé des agneaux ayant bénéficié du patch ne contenant aucune cellule stromale. Par la suite,  $n$  désigne l'effectif concerné pour un groupe donné,  $p$  désigne le degré de signification et une différence était considérée comme significative lorsque  $p < 0,05$ . Le critère principal de détermination de la réussite du traitement anténatal était le score SLR à 24 heures.

#### *2.4.1. Critères de comparabilité clinique*

La comparabilité clinique des agneaux a été évaluée à travers les dimensions de la lésion lors des deux temps chirurgicaux ainsi que la longueur de la cicatrice (ou de la lésion) (« taille de la cicatrice ») et sa position par rapport à la base de la queue (« distance cicatrice-queue ») à la naissance. Le poids à la naissance a également été pris en compte. Pour chacune de ces variables quantitatives, une médiane a été calculée pour le groupe « CSM-CO » et le groupe « acellulaire ». De plus, une éventuelle fuite de LCS (« fuite LCS ») a été relevée.

La comparabilité clinique des individus a également été évaluée grâce aux examens tomodensitométriques. Les médianes des variables « nombre de vertèbres » et « angle rachidien » ont été calculées pour comparer les groupes « CSM-CO » et « acellulaire ».

Enfin, l'évaluation histologique de la cicatrisation de la lésion (concernant l'épiderme, le derme et la dure-mère) ainsi que l'observation de néo-muscle et/ou de néo-cartilage au sein du bloc lésionnel prélevé ont complété l'étude de la comparabilité clinique des individus de l'étude.

#### *2.4.2. Score SLR*

Un test de Mann-Whitney a été réalisé pour comparer les groupes « CSM-CO » et « acellulaire » pour les résultats des observations à deux heures puis à 24 heures de vie. Un test de Wilcoxon a été réalisé pour comparer les résultats à deux heures et 24 heures de vie des mêmes groupes. Un test de corrélation de Pearson a été réalisé entre le score SLR à 24 heures de vie des agneaux et la variable « nombre de vertèbres » au sein des groupes « CSM-CO » et « acellulaire ».

#### *2.4.3. Explorations neurologiques*

Pour comparer les groupes « CSM-CO » et « acellulaire », un test exact de Fisher a été réalisé pour les variables « lever spontané », « signes d'amyotrophie », « incontinence urinaire », « réflexe des membres pelviens » et « mouvements de la queue ». Pour la variable « sensibilité pelvienne », un test de Cochran-Armitage a été réalisé pour comparer les mêmes groupes que précédemment.

Pour les électromyogrammes (EMG) et les électroneurogrammes (ENG), les amplitudes et vitesses de conduction des potentiels d'actions de chaque nerf pour chaque agneau ont pu être enregistrées. Les médianes pour chaque individu puis pour chaque groupe ont été calculées ainsi que les intervalles de valeurs minimales et maximales. Un test de Mann-Whitney a ensuite été réalisé afin de comparer les groupes « CSM-CO » et « acellulaire » sur les variables « amplitude » et « vitesse conduction » pour chaque nerf testé.

Pour la mesure des PES, un test exact de Fisher entre les groupes « CSM-CO » et « acellulaire » a été réalisé pour les mesures réalisées en C1 lors de la stimulation du nerf tibial (passage d'un potentiel d'action au travers de la zone d'intérêt chirurgical).

#### *2.4.4. Analyses histologiques*

Une médiane a été calculée pour les variables « épaisseur fibrose moelle-derme », « épaisseur fibrose péri-spinale », « surface substance grise », « surface moelle », « densité neuronale », « diamètre fibres musculaires », « écart diamètre fibres musculaires » et « épaisseur sphincter urinaire » pour l'ensemble des groupes. Un test de Mann-Whitney a ensuite été réalisé pour chaque variable entre les groupes « CSM-CO » et « acellulaire ».

## 2.5. Contribution personnelle

Ma participation à cette étude a consisté en la réalisation d'un protocole de prise en charge des agneaux, de leur naissance à leur euthanasie. J'ai également contribué à leur prise en charge durant leur séjour au sein de la PRBM. Ainsi, j'ai assuré l'ensemble des biberonnages et soins inhérents à la présence et à l'état clinique des agneaux. Enfin, j'ai aussi pu assister de façon ponctuelle aux interventions chirurgicales anténatales ainsi qu'aux explorations postnatales.

## 3. Résultats

### 3.1. Caractérisation des cellules stromales mésenchymateuses

Il a été constaté, la plupart du temps entre neuf et quinze jours de culture cellulaire, que les cellules étudiées étaient adhérentes au plastique contenant le milieu de culture. D'après les observations faites au microscope optique, les cellules étaient de forme allongée et fusiforme. La cytométrie en flux a permis de montrer que les cellules exprimaient les marqueurs de surface CD73, CD90 et CD105 mais pas les marqueurs CD11b, CD14, CD34, CD45 et CD79α. Les différentes cultures cellulaires réalisées ont permis de mettre en évidence que ces cellules pouvaient se différencier en ostéoblastes et adipocytes. La mise en culture pour tester une différenciation en chondrocytes n'a pas été réalisée du fait de la difficulté de mise en œuvre d'une telle culture (Guilbaud *et al.*, 2022). Les cellules étudiées étaient donc des CSM-CO comme définies par l'ISCGT.

Les tests ELISA ont permis de montrer que les CSM-CO sécrétaient le BDNF mais pas le NGF. Par ailleurs, les CSM-CO étaient retrouvées *in vivo* 52 jours après l'intervention (par analyse immunohistochimique) et étaient localisées dans les vestiges du patch lorsqu'ils étaient présents ou dans le néo-épiderme présent en regard de la lésion mais pas dans la moelle (Guilbaud, 2021).

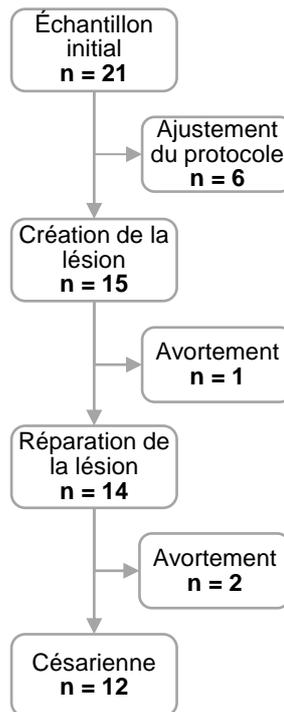
### 3.2. Description de l'échantillon

L'étude prévoyait l'inclusion de 21 brebis. Les six premières ont été exclues de l'étude du fait d'une mort foetale systématique nécessitant l'adaptation du protocole. Suite à l'adjonction d'un tocolytique dans le protocole préopératoire, d'une injection intra-amniotique d'antibiotique en peropératoire et l'arrêt des anti-inflammatoires non stéroïdiens en post-opératoire, 15 brebis ont pu être incluses dans l'étude dont trois avec une gestation gémellaire. Parmi elles, deux agneaux n'ont pas été opérés pour servir de témoin négatif et un agneau a subi une création de la lésion sans réparation de celle-ci pour servir de témoin positif.

Un avortement a été constaté lors d'une chirurgie de réparation de la lésion et un autre au moment d'une césarienne. Deux brebis ont avorté entre la chirurgie de réparation de la lésion et la césarienne, à 115 et 120 jours de gestation (Figure 19 et Figure 20). Ceci a porté le taux de pertes foetales à 22,2 % après réajustement du protocole opératoire.

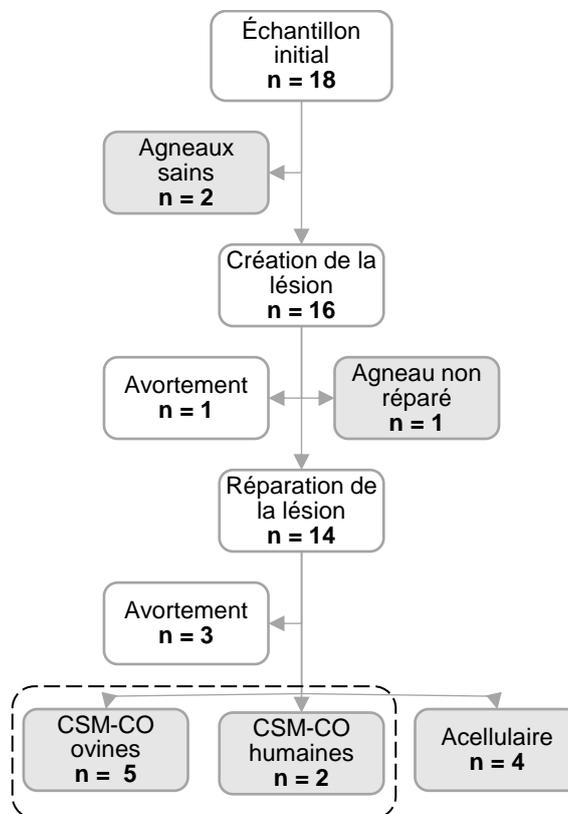
Il existait donc quatre groupes d'agneaux à l'issue des chirurgies : les agneaux servant de témoins négatifs (groupe « sain »), l'agneau servant de témoin positif (groupe « non réparé »), les agneaux ayant reçu un patch acellulaire lors de la chirurgie de réparation de la lésion (groupe « acellulaire ») et les agneaux ayant reçu un patch contenant des CSM-CO lors de la chirurgie de réparation de la lésion (groupe « CSM-CO »). En effet, du fait du faible effectif de l'échantillon, il a été choisi de réunir dans un même groupe les agneaux ayant bénéficié d'un patch contenant des CSM-CO humaines et ceux ayant bénéficié d'un patch contenant des CSM-CO ovines (Figure 20).

**Figure 19 : Diagramme de flux des brebis incluses dans l'étude.**



**Figure 20 : Diagramme de flux des agneaux inclus dans l'étude.**

Les cases grises désignent les différents groupes d'agneaux, le cadre en pointillés représentant le groupe « CSM-CO ».



### 3.3. Critères de comparabilité clinique

#### 3.3.1. Observations et mesures lors des chirurgies et à la naissance

Les médianes concernant la longueur et la largeur de la lésion lors des différents temps chirurgicaux étaient identiques entre les groupes « CSM-CO » et « acellulaire » et valaient 40 mm. Les médianes concernant la taille et la position de la cicatrice à la naissance étaient identiques entre les deux groupes (60 mm de longueur et à 60 mm de la base de la queue). Les poids à la naissance étaient très variables (de 2 525 à 5 495 g) mais la répartition semblait homogène entre les groupes comme le montrent les médianes des groupes « CSM-CO » et « acellulaire » qui étaient proches (4 075 et 3 970 g respectivement). Aucun agneau ne présentait de fuite de LCS à la naissance (Tableau 7).

**Tableau 7 : Données obtenues lors des différents temps chirurgicaux et à la naissance permettant d'étudier la comparabilité clinique des agneaux.**

		<b>CSM-CO</b> n = 7	<b>Acellulaire</b> n = 4	<b>Sain</b> n = 2	<b>Non réparé</b> n = 1
<b>Création de la MMC</b>	<b>Longueur de la lésion</b> (médiane (min-max), mm)	40 (30-40)	40 (35-40)	n/a	45
	<b>Largeur de la lésion</b> (médiane (min-max), mm)	25 (25-40)	25 (25-30)	n/a	25
<b>Réparation de la MMC</b>	<b>Longueur de la lésion</b> (médiane (min-max), mm)	40 (30-45)	40 (35-45)	n/a	n/a
	<b>Largeur de la lésion</b> (médiane (min-max), mm)	25 (10-30)	15 (10-25)	n/a	n/a
<b>Naissance</b>	<b>Taille cicatrice</b> (médiane (min-max), mm)	60 (50-80)	60 (50-70)	n/a	60
	<b>Distance cicatrice-queue</b> (médiane (min-max), mm)	60 (50-90)	60 (40-70)	n/a	60
	<b>Poids</b> (médiane (min-max), g)	4 075 (3 180-5 495)	3 970 (2 525-4 600)	3 390 (3 105-3 675)	3 885
	<b>Fuite LCS (n)</b>	0/7	0/4	n/a	0/1

#### 3.3.2. Examen tomodensitométrique

Le nombre de vertèbres intéressées par la laminectomie variait entre trois et cinq avec une médiane de quatre vertèbres pour les groupes « CSM-CO » et « acellulaire ». Il existait une importante variation de l'angle rachidien mesuré au sein des groupes « CSM-CO » et « acellulaire » (Tableau 8).

**Tableau 8 : Données sur les anomalies rachidiennes des agneaux 24 heures après la naissance, recueillies après examen tomodensitométrique.**

	<b>CSM-CO n = 7</b>	<b>Acellulaire n = 4</b>	<b>Sain n = 2</b>	<b>Non réparé n = 1</b>
<b>Nombre de vertèbres</b> (médiane, min-max)	4 (3-5)	4 (3-5)	0	4
<b>Angle rachidien</b> (médiane (min-max), °)	10 (-4-21)	4,5 (-45-19)	9,5 (9-10)	3

### 3.3.3. Examen histologique

L'ensemble des agneaux des groupes « CSM-CO » et « acellulaire » possédaient une cicatrisation complète de l'épiderme, du derme et de la dure-mère. Aucun agneau de ces mêmes groupes ne présentait de néo-muscles et deux agneaux du groupes « CSM-CO » possédaient du néo-cartilage en regard de la partie dorsale du site chirurgical. L'agneau non réparé ne présentait qu'une cicatrisation complète de la dure-mère, l'épiderme et le derme étant incomplètement cicatrisés (Tableau 9).

**Tableau 9 : Données relevées lors des examens histologiques des blocs lésionnels des agneaux.**

	<b>CSM-CO n = 7</b>	<b>Acellulaire n = 4</b>	<b>Sain n = 2</b>	<b>Non réparé n = 1</b>
<b>Cicatrisation épiderme</b> (n)	7/7	4/4	n/a	0/1
<b>Cicatrisation derme</b> (n)	7/7	4/4	n/a	0/1
<b>Cicatrisation dure-mère</b> (n)	7/7	4/4	n/a	1/1
<b>Présence néo-muscle</b> (n)	0/7	0/4	n/a	0/1
<b>Présence néo-cartilage</b> (n)	2/7	0/4	n/a	0/1

## 3.4. Explorations post-natales

### 3.4.1. Score de locomotion

Pour les groupes « CSM-CO » et « acellulaire », la médiane des scores SLR était de deux, deux heures après la naissance tandis qu'elle était à 15 pour le groupe « CSM-CO » et à 5,5 pour le groupe « acellulaire » 24 heures après la naissance (Tableau 10). Il existait une différence significative pour les scores SLR entre les groupes « CSM-CO » et « acellulaire » ( $p = 0,02$ ) 24 heures après la naissance, les agneaux du groupe « CSM-CO » ayant des scores plus élevés que les agneaux du groupe « acellulaire ». Cette différence n'était pas significative deux heures après la naissance (Figure 21). Enfin, il existait une différence significative sur l'évolution du score SLR entre deux heures et 24 heures après la naissance pour le groupe « CSM-CO » ( $p = 0,02$ ) mais pas pour le groupe « acellulaire » ( $p = 0,13$ ) (Figure 22).

Il n'existait pas de différence significative pour le test de corrélation de Pearson entre le score SLR à 24 heures de vie des agneaux et la variable « nombre de vertèbres » au sein des groupes « CSM-CO » (coefficient de -0,7,  $p = 0,09$ ) et « acellulaire » (coefficient de -0,3,  $p = 0,7$ ).

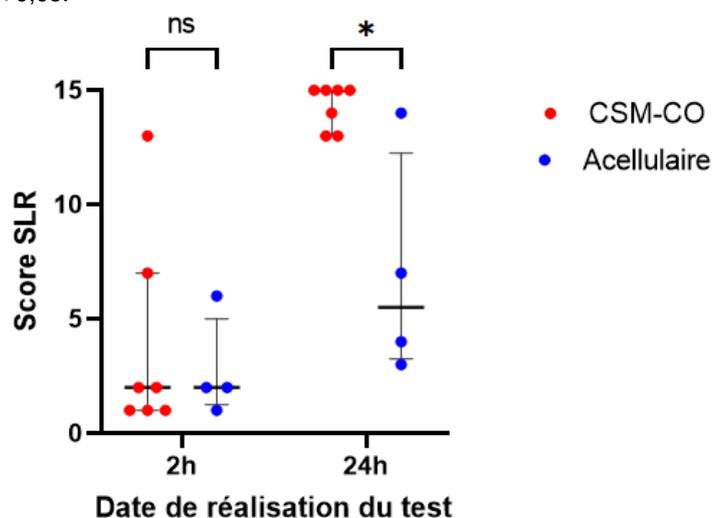
**Tableau 10 : Sheep locomotor rating score des agneaux à deux heures et 24 heures après la naissance.**

	CSM-CO n = 7	Acellulaire n = 4	Sain n = 2	Non réparé n = 1	p*
<b>Score SLR à 2 h</b> (médiane, min-max)	2 (1-13)	2 (1-6)	7 (5-9)	4	> 0,99
<b>Score SLR à 24 h</b> (médiane, min-max)	15 (13-15)	5,5 (3-14)	15	4	<b>0,02</b>

\*Comparaison entre les groupes « CSM-CO » et « acellulaire »

**Figure 21 : Comparaison des sheep locomotor rating score des agneaux des groupes « cellules stromales mésenchymateuses » et « acellulaire » à deux heures et 24 heures après la naissance.**

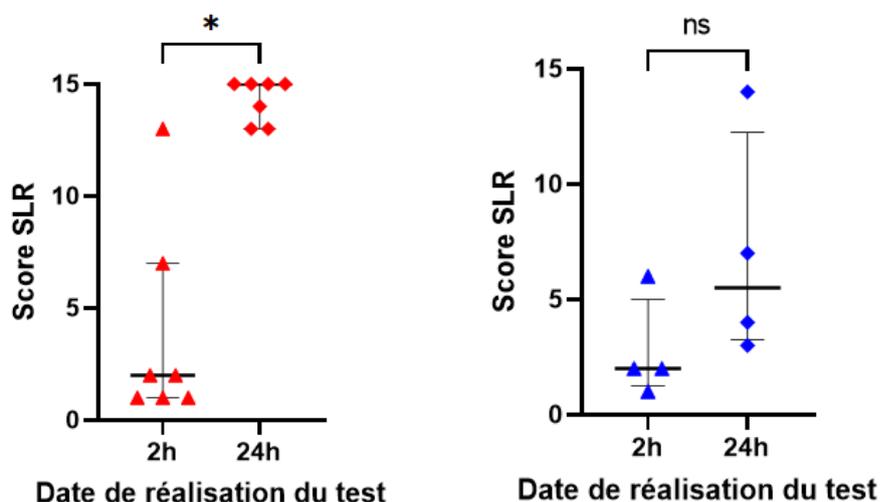
Les données sont représentées avec leurs médianes (lignes noires épaisses) et les rangs interquartiles (lignes noires fines). ns : non significatif ; \* p < 0,05.



**Figure 22 : Évolution des scores sheep locomotor rating score entre deux heures et 24 heures après la naissance des agneaux des groupes « cellules stromales mésenchymateuses » et « acellulaire ».**

À gauche (en rouge) : Évolution des scores SLR pour le groupe « CSM-CO » ; À droite (en bleu) : Évolution des scores SLR pour le groupe « acellulaire ».

Les données sont représentées avec leurs médianes (lignes épaisses) et les rangs interquartiles (lignes fines). ns : non significatif ; \* : p < 0,05.



### 3.4.2. Explorations de la fonction neurologique

#### 3.4.2.1. Examen clinique neurologique

Il existait une différence significative ( $p = 0,02$ ) pour la variable « incontinence urinaire » entre les groupes « CSM-CO » (14 %) et « acellulaire » (100%). Pour les autres variables étudiées, les différences statistiques entre les groupes « CSM-CO » et « acellulaire » n'étaient pas significatives (Tableau 11). Cependant, bien que la différence entre les deux groupes ne soit pas statistiquement significative ( $p = 0,09$ ), les signes d'amyotrophie paraissaient plus fréquents dans le groupe « acellulaire » (trois agneaux sur quatre) que dans le groupe « CSM-CO » (un seul agneau sur sept). Les mêmes proportions étaient observables concernant la diminution des réflexes des membres pelviens.

**Tableau 11 : Données de l'examen neurologique des agneaux 24 heures après la naissance.**

	CSM-CO n = 7	Acellulaire n = 4	Sain n = 2	Non réparé n = 1	p*
<b>Réflexe des membres pelviens (n)</b>					
Normaux	6/7	1/4	2/2	0/1	0,09
Diminués	1/7	3/4	0/2	1/1	
<b>Sensibilité pelvienne (n)</b>					
Normaux	6/7	2/4	2/2	0/1	0,13
Diminués	1/7	1/4	0/2	1/1	
Absents	0/7	1/4	0/2	0/1	
<b>Lever spontané (n)</b>	7/7	2/4	2/2	0/1	0,11
<b>Mouvements de la queue (n)</b>					
Normaux	6/7	2/4	2/2	0/1	0,49
Diminués	1/7	2/4	0/2	1/1	
<b>Signes d'amyotrophie (n)</b>	1/7	3/4	0/2	1/1	0,09
<b>Incontinence urinaire (n)</b>	1/7	4/4	0/2	1/1	<b>0,02</b>

\*Comparaison entre les groupes « CSM-CO » et « acellulaire »

#### 3.4.2.2. Électromyographie et électroneurographie

La présence d'une activité électrique spontanée compatible avec des signes de dénervation musculaire des membres pelviens a été observée chez un agneau du groupe « acellulaire » et deux du groupe « CSM-CO » (l'agneau non réparé présentait également une activité électrique spontanée pouvant évoquer une situation de dénervation). Chacun des deux groupes possédait également un agneau avec une absence totale d'activité électrique spontanée. Enfin, les autres agneaux possédaient une activité électrique spontanée considérée comme sans anomalie.

Il n'existait pas de différence significative entre les groupes « CSM-CO » et « acellulaire » concernant les amplitudes et les vitesses de conduction des différents nerfs testés (nerfs tibial, fibulaire commun et fémoral) (Tableau 12 et Figure 23).

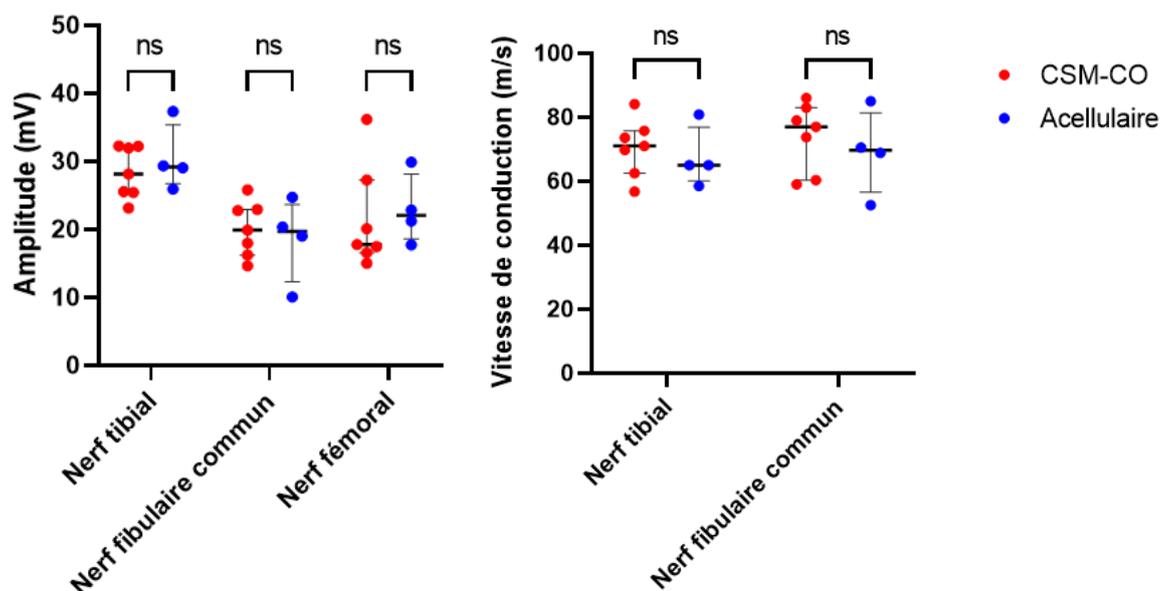
**Tableau 12 : Données de l'électroneurographie des agneaux 24 heures après la naissance.**

	CSM-CO n = 7	Acellulaire n = 4	Sain n = 2	Non réparé n = 1	p*
<b>Amplitudes</b> (médiane (min-max), mV)					
Nerf tibial	28,1 (23,1-32,3)	29,2 (25,9-37,4)	30,9 (30,7-31,1)	24,2	0,53
Nerf fibulaire commun	19,9 (14,7-25,8)	19,7 (10,1-24,7)	20,8 (16,4-25,2)	18,8	0,93
Nerf fémoral	17,8 (15,0-36,2)	22,1 (17,7-29,9)	20,8 (19,5-22,2)	18,0	0,41
<b>Vitesses conduction</b> (médiane (min-max), m/s)					
Nerf tibial	71,0 (56,8-84,2)	65,0 (58,5-80,8)	68,7 (63,5-73,8)	52,0	0,62
Nerf fibulaire commun	77,0 (59,0-86,0)	69,7 (52,5-85,0)	79,8 (78,3-81,3)	51,3	0,53

\*Comparaison entre les groupes « CSM-CO » et « acellulaire »

**Figure 23 : Données de l'électroneurographie des agneaux des groupes « cellules stromales mésenchymateuses » et « acellulaire » réalisée 24 heures après la naissance.**

Les données sont présentées avec leurs médianes (lignes épaisses) et les rangs interquartiles (lignes fines). ns : p > 0,05.



### 3.4.2.3. Potentiels évoqués sensitifs

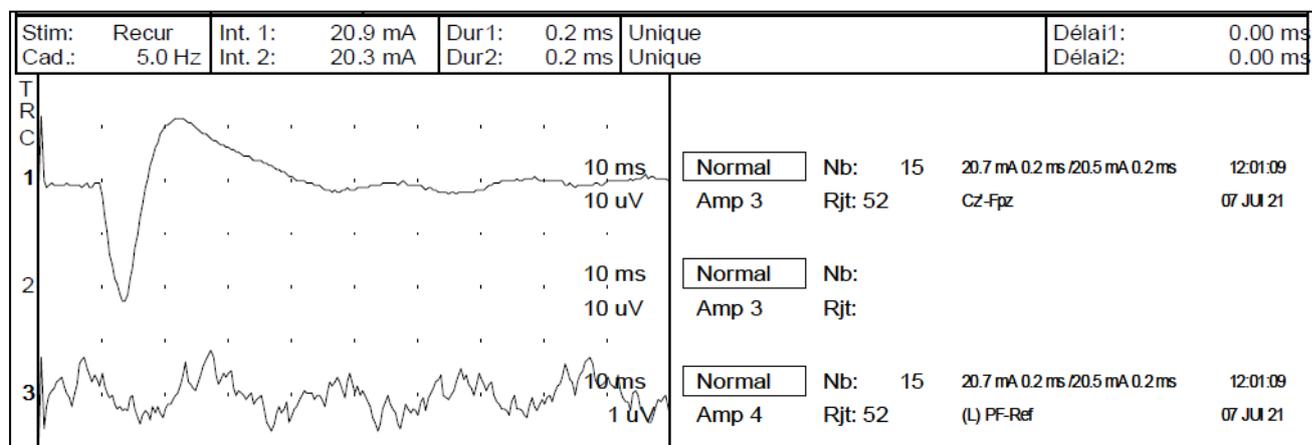
L'ensemble des agneaux de l'étude présentait un signal en L6/S1 lors de la stimulation du nerf tibial et en C1 lors de la stimulation du nerf ulnaire. Aucun signal n'était enregistré en C1 lors de la stimulation du nerf tibial pour deux agneaux du groupe « CSM-CO » et trois agneaux du groupe « acellulaire » (Figure 24). La mesure des PES n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative concernant la transmission du potentiel d'action au travers de la zone d'intérêt chirurgical entre les groupes « CSM-CO » et « acellulaire » (Tableau 13).

**Tableau 13 : Données issues de la mesure des potentiels évoqués sensitifs des agneaux 24 heures après la naissance.**

	CSM-CO n = 6	Acellulaire n = 4	Sain n = 1	Non réparé n = 1	p*
Stimulation du nerf ulnaire et enregistrement en C1 (n)	6/6	4/4	1/1	1/1	n/a
Stimulation du nerf tibial et enregistrement en L6/S1 (n)	6/6	4/4	1/1	1/1	n/a
Stimulation du nerf tibial et enregistrement en C1 (n)	4/6	1/4	1/1	0/1	0,52

\*Comparaison entre les groupes « CSM-CO » et « acellulaire »

**Figure 24 : Exemple de tracés obtenus lors de l'évaluation des potentiels évoqués sensitifs chez un agneau 24 heures après la naissance.**



Le tracé n°1 (TRC 1) représente le signal capté en L6/S1 après stimulation des nerfs tibiaux, on observe un signal net. Le tracé n°3 (TRC 3) représente le signal capté en C1 après stimulation des nerfs tibiaux, on observe de nombreux artéfacts mais pas de signal franc, montrant que la lésion induite chirurgicalement ne permet pas la transmission d'un signal nerveux à la naissance de l'agneau.

### 3.4.3. Autopsie et analyses histologiques

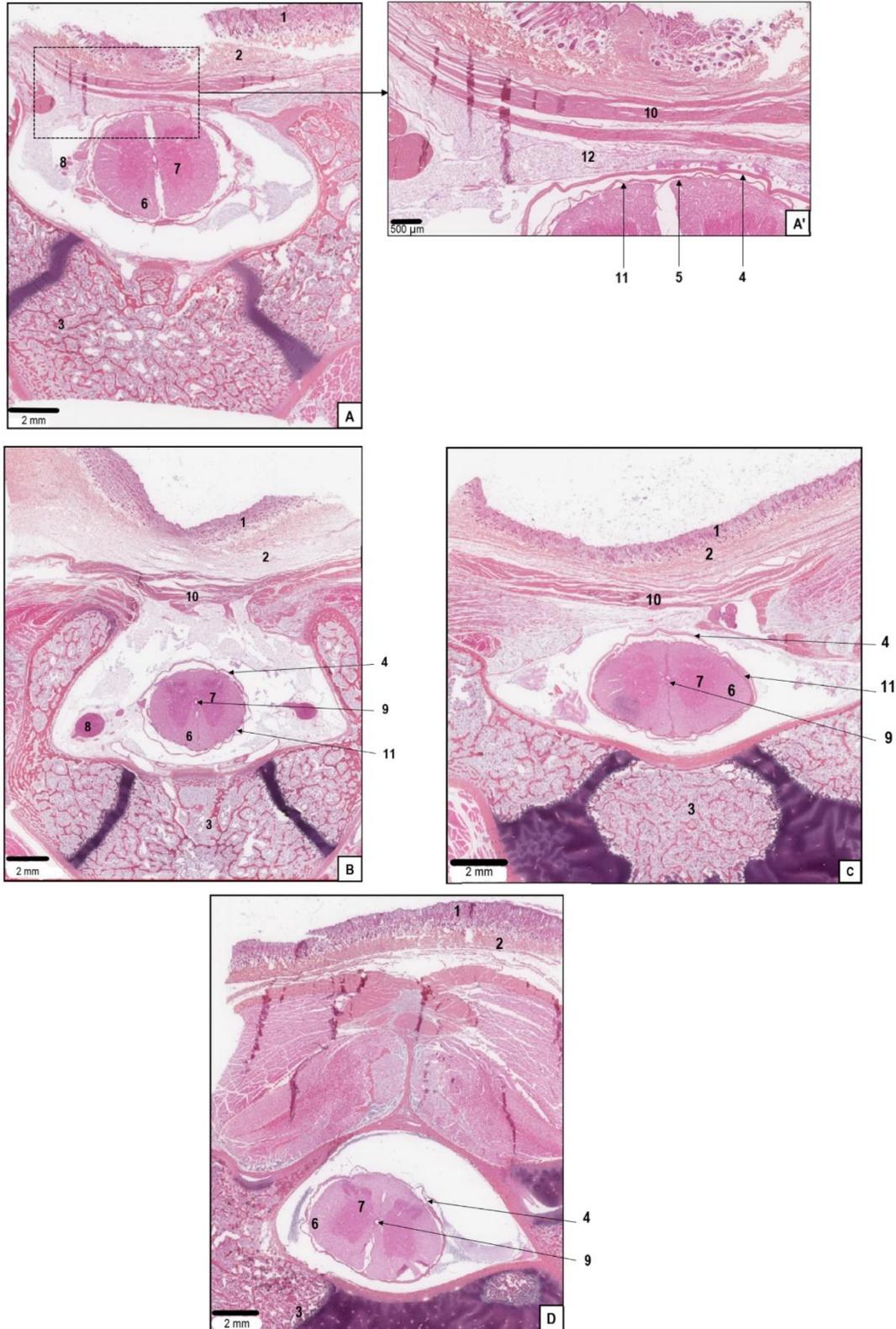
Aucune tumeur ou anomalie notable n'a été observée macroscopiquement lors de l'autopsie de l'ensemble des agneaux.

La moelle épinière présentait un aspect histologique physiologique pour la plupart des agneaux (Figure 25). Un agneau du groupe « CSM-CO » possédait une atrophie des cornes ventrales, un agneau du groupe « acellulaire » possédait des cornes dorsales et ventrales lésées et un autre agneau du même groupe présentait une atrophie des colonnes dorsales de la moelle épinière et une substance grise mal délimitée. La topographie spinale semblait respectée chez tous les individus.

**Figure 25 : Coupes histologiques des blocs lésionnels des agneaux prélevé 24 heures après la naissance colorées à l'hématoxyline-éosine-safran.**

**A** – Agneau du groupe « CSM-CO » ; **A'** – Zoom de la coupe A centré sur le résidu de patch ; **B** – Agneau du groupe « acellulaire » ; **C** – Agneau non réparé ; **D** – Agneau sain

**1** : Épiderme ; **2** : Derme ; **3** : Corps vertébral ; **4** : Dure-mère ; **5** : Pie-mère ; **6** : Substance blanche ; **7** : Substance grise (6 + 7 : moelle épinière) ; **8** : Ganglion spinal ; **9** : Canal central de la moelle épinière ; **10** : Fibrose entre la moelle épinière et le derme ; **11** : Fibrose péri-spinale ; **12** : Résidu de patch.



L'épaisseur de la fibrose située entre la moelle épinière et le derme était significativement moins importante chez les agneaux du groupe « CSM-CO » que chez les agneaux du groupe « acellulaire » ( $p = 0,006$ ), tout comme pour l'épaisseur de la fibrose péri-spinale ( $p = 0,02$ ). Par ailleurs, la densité neuronale de la substance grise de la moelle épinière était significativement plus élevée pour le groupe « CSM-CO » que pour le groupe « acellulaire » ( $p = 0,006$ ) (Tableau 14 et Figure 26).

**Tableau 14 : Données issues des analyses histologiques des blocs lésionnels des agneaux prélevés 24 heures après la naissance.**

	<b>CSM-CO</b> n = 7	<b>Acellulaire</b> n = 4	<b>Sain</b> n = 1	<b>Non réparé</b> n = 1	<b>p*</b>
<b>Épaisseur fibrose moelle-derme</b> (médiane (min-max), $\mu\text{m}$ )	557,7 (0-871,7)	3 920,8 (1 468,7-5 240,7)	0	703,8	<b>0,006</b>
<b>Épaisseur fibrose péri-spinale</b> (médiane (min-max), $\mu\text{m}$ )	47,4 (0-157,5)	157,6 (136,6-175,6)	0	115,7	<b>0,02</b>
<b>Surface substance grise</b> (médiane (min-max), $\text{mm}^2$ )	6,0 (3,4-9,8)	7,12 (3,6-8,9)	7,0	6,7	> 0,99
<b>Surface moelle</b> (médiane (min-max), $\text{mm}^2$ )	17,30 (11,3-24,1)	16,75 (13,5-21,0)	19,8	18,9	0,53
<b>Densité neuronale</b> (médiane (min-max), nombre de neurones/ $\text{mm}^2$ )	14,0 (9,8-17,7)	5,6 (5,2-8,9)	10,5	5,1	<b>0,006</b>

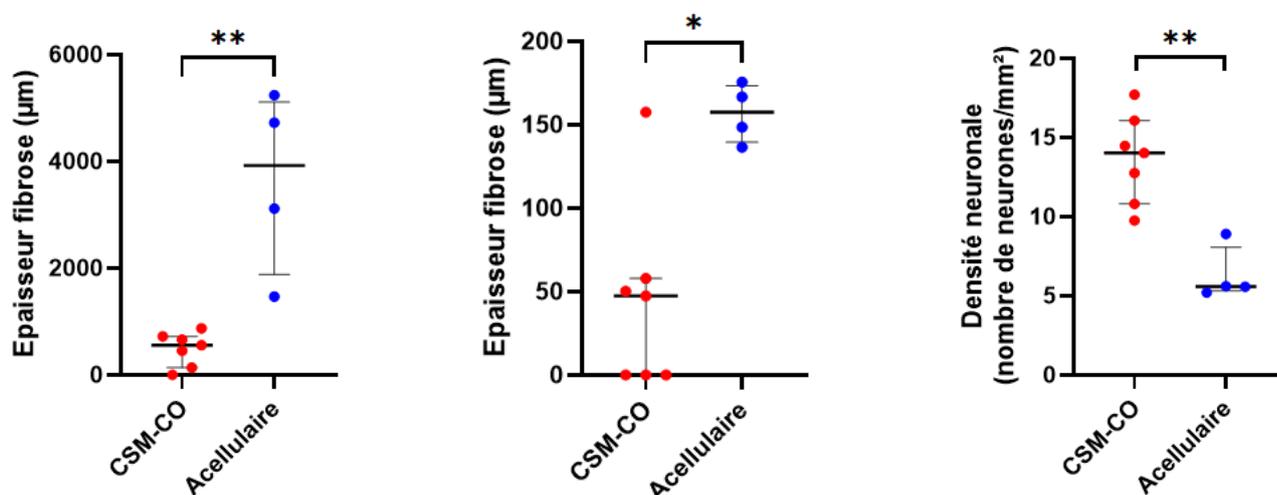
\*Comparaison entre les groupes « CSM-CO » et « acellulaire »

**Figure 26 : Comparaison des données issues des analyses histologiques du bloc lésionnel des agneaux des groupes « cellules stromales mésenchymateuses » et « acellulaire » prélevé 24 heures après la naissance.**

À gauche : Comparaison pour la variable « épaisseur fibrose moelle-derme » ; Au centre : Comparaison pour la variable « épaisseur fibrose péri-spinale » ; À droite : Comparaison pour la variable « densité neuronale »

Les données sont représentées avec leurs médianes (ligne noire épaissie) et les rangs interquartiles (lignes noires fines).

\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$ .



Le diamètre des fibres musculaires des agneaux du groupe « CSM-CO » n'était pas significativement différent de celui des agneaux du groupe « acellulaire » ( $p > 0,05$ ). L'épaisseur du sphincter urétral interne était significativement plus importante pour les agneaux du groupe « CSM-CO » que pour les agneaux du groupe « acellulaire » (1 200  $\mu\text{m}$  et 988  $\mu\text{m}$  respectivement,  $p = 0,05$ ) (Tableau 15 et Figure 27).

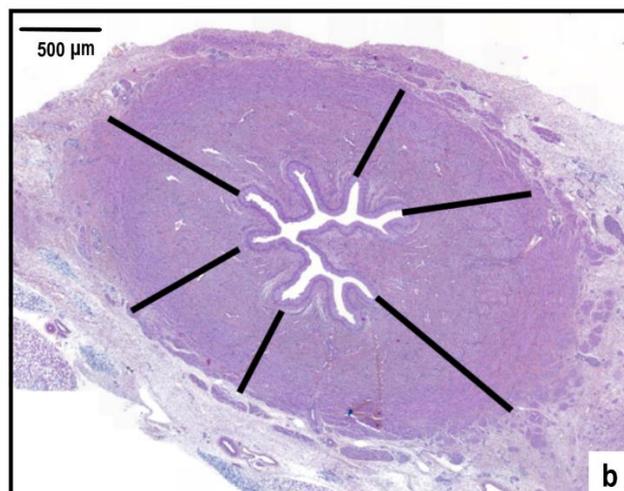
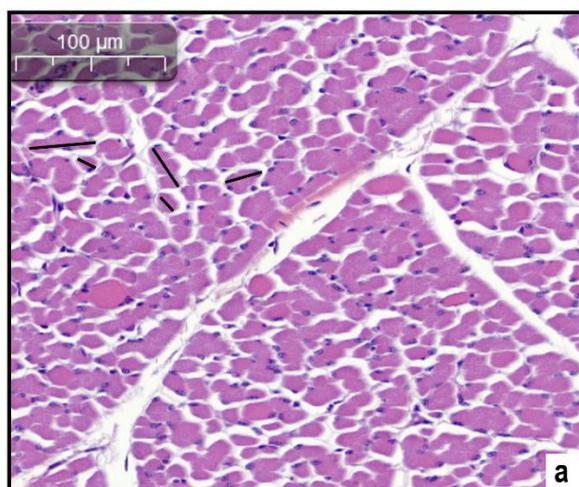
**Tableau 15 : Données des analyses histologiques de divers organes des agneaux prélevés 24 heures après la naissance.**

	CSM-CO n = 7	Acellulaire n = 4	Sain n = 2	Non réparé n = 1	p*
<b>Diamètre fibres musculaires</b> (médiane (min-max), $\mu\text{m}$ )	14,9 (13,9-15,1)	13,7 (13,2-14,4)	14,4 (14,3-14,5)	13,8	0,06
<b>Épaisseur sphincter urinaire</b> (médiane (min-max), $\mu\text{m}$ )	1 200 (950-1390)	988 (920-1 056)	1 092 (950-1234)	986	<b>0,05</b>

\*Comparaison entre les groupes « CSM-CO » et « acellulaire »

**Figure 27 : Coupes histologiques de différents organes des agneaux 24 heures après la naissance colorées à l'hématoxyline-éosine-safran.**

**a** : Coupe transversale du muscle gastrocnémien du membre postérieur droit d'un agneau ; **b** : Coupe transversale du sphincter urétral interne d'un agneau ; **traits noirs** : mesures réalisées pour l'estimation des variables « diamètre fibres musculaires » (**a**) et « épaisseur sphincter urinaire » (**b**).



## 4. Discussion

Cette étude avait pour objectif de démontrer les bénéfices que pouvaient apporter les CSM-CO en tant que thérapie cellulaire adjuvante à la chirurgie réparatrice anténatale de la MMC dans le modèle ovin.

### 4.1. Limites générales de l'étude

Des simulations ont été réalisées avec le site internet *Sealed Enveloppe* (Sealed Envelope, 2022) et les données de deux équipes ayant étudié les effets des CSM comme thérapie cellulaire adjuvante anténatale sur la locomotion à 24 heures après la naissance dans le modèle ovin de MMC (Kabagambe *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2015). Pour une puissance statistique de 90 % et un risque  $\alpha$  fixé à 5 %, les groupes test et témoin auraient dû contenir sept individus au minimum. Le groupe « CSM-CO » en contenait suffisamment mais pas le groupe « acellulaire ». Cela peut s'expliquer par le fait que le taux de mortalité fœtale était important (22,2 %) bien qu'inférieur à d'autres études (Galganski *et al.*, 2020b). Par ailleurs, l'inclusion d'individus supplémentaires au sein de l'étude aurait été rendue difficile du fait du coût important de réalisation de l'expérimentation sur chaque individu. Du fait d'un effectif très faible, la conclusion sur la significativité réelle des résultats doit rester prudente (Desquilbet, 2020) et les observations faites doivent être confirmées par d'autres études menées par la suite.

Aucune correction de Holm n'a été réalisée sur les résultats statistiques de cette étude puisque la littérature disponible sur notre objet d'étude permet de justifier l'exploration de la majorité des variables étudiées. Celles ne trouvant pas de justification multiple dans la littérature scientifique (la mesure de la vitesse de conduction et de l'amplitude des potentiels d'action au sein des différents nerfs des membres pelviens par exemple) ne montrant pas de différences significatives entre les groupes « CSM-CO » et « acellulaire », l'application d'une correction n'a pas été jugée utile.

Bien que de nombreuses mesures aient été mises en place afin de garantir une indépendance et une comparabilité entre l'ensemble des agneaux, certains points pourraient remettre en question cette comparabilité.

Tout d'abord, la dimension des lésions, la taille et la localisation de la cicatrice ainsi que l'absence de fuite de LCS étaient comparables entre les agneaux du groupe ayant reçu les CSM-CO et les agneaux du groupe ayant reçu un patch acellulaire lors des deux temps chirurgicaux et à la naissance.

Le nombre de vertèbres ayant subi une laminectomie était variable entre les agneaux, allant de trois à cinq vertèbres (avec une médiane de 4). Ceci a pu induire plusieurs conséquences sur les résultats obtenus, notamment sur le score SLR à 24 heures. En effet, la moelle était généralement moins exposée que ce qui était prévu initialement, il y avait donc moins de surface en contact avec le liquide amniotique et donc potentiellement moins de lésions spinales (Stiefel *et al.*, 2007; Stiefel et Meuli, 2007). Par ailleurs, le test de corrélation de Pearson a échoué à mettre en évidence une corrélation significative entre le score SLR à 24 heures et le nombre de vertèbres intéressées par la laminectomie au sein des groupes « CSM-CO » et « acellulaire ». Or,  $p = 0,09$  pour le groupe « CSM-CO » ce qui permet d'avancer la supposition d'un manque de puissance statistique de l'étude. Il est donc raisonnable d'émettre l'hypothèse que le score SLR à 24 heures de vie des agneaux ait pu être en corrélation négative avec le nombre de vertèbres modifiées par la laminectomie, sans qu'on puisse pour autant en être persuadé. Les résultats (du groupe « CSM-

CO » en particulier) pourraient être ainsi artificiellement meilleurs. Néanmoins, cette variabilité du nombre de vertèbres lésées était déjà une limite connue du modèle chirurgical (Guilbaud, 2021).

D'autre part, Vanover et son équipe ont montré que plus la surface des lames vertébrales des vertèbres ayant subi la laminectomie était importante, moins le degré d'angulation du rachis était important et meilleur étaient les scores SLR à 24 heures après la naissance (Vanover *et al.*, 2019a). Dans le modèle chirurgical ovin, il n'existe pas de recommandations précises sur la technique de laminectomie à employer et l'étude n'a pas cherché à étudier la comparabilité des différents groupes sur la surface de lames vertébrales exposées après réalisation chirurgicale de la lésion. Cependant, il n'existe pour le moment qu'un seul article décrivant cette association.

Enfin, les observations histologiques n'ont pas permis de mettre en évidence de différence majeure quant à la cicatrisation de la lésion chez les agneaux des groupes « CSM-CO » et « acellulaire », tous ayant une cicatrisation complète de l'épiderme, du derme et de la dure-mère. La présence de néo-cartilage chez certains agneaux ne semblait pas induire de différence majeure entre les individus car le cartilage était situé en région dorsale de la lésion, en dehors du canal rachidien et sans pour autant former une couche continue.

D'autres facteurs pourraient avoir influencé les résultats observés :

- les chirurgies étaient réalisées par deux chirurgiens différents ce qui peut induire des différences dans la réalisation des techniques chirurgicales. Cependant, un des chirurgiens a formé le deuxième ce qui permet de minimiser l'aléa lié à l'opérateur ;
- certaines brebis avaient une gestation gémellaire. À notre connaissance, il n'existe pas d'étude démontrant l'existence de conséquence remettant en question le modèle ovin de MMC. Il existe cependant une étude rétrospective de l'équipe de Farmer recensant les facteurs de risque de décès fœtal montrant que la réduction du nombre d'agneaux en cas de gestation multiple induirait une augmentation du nombre de morts fœtales *in utero* (Galganski *et al.*, 2020b).

Enfin, un biais de sélection est présent dans cette étude puisque les CSM-CO d'origine ovine proviennent de cordons ombilicaux d'agneaux de races INRA 401 élevée à l'INRAE de Tours et les CSM-CO d'origine humaine utilisées sont issues de deux femmes ayant accouché à l'hôpital Armand Trousseau à Paris, ce qui n'est pas représentatif de la population des femmes en France. Une étude utilisant des CSM-CO humaines avec des sources plus diverses pourrait permettre d'avoir une meilleure estimation des potentiels thérapeutiques de ces cellules dans le but d'une transposition future à l'humain.

## **4.2. Discussion sur le choix des techniques utilisées**

### ***4.2.1. Discussion sur l'utilisation des cellules stromales mésenchymateuses issues de cordons ombilicaux et apports au modèle***

Notre équipe est la première à utiliser des CSM-CO en tant que thérapie cellulaire adjuvante dans le modèle chirurgical ovin de MMC. Plusieurs études ont déjà utilisé des CSM dans divers modèles animaux, en particulier les modèles rongeurs (Dionigi *et al.*, 2015a, 2015b; Feng *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2014, 2012; Shieh *et al.*, 2018). Farmer et ses collaborateurs sont la seule autre équipe à avoir étudié la thérapie cellulaire à partir de CSM sur le modèle ovin mais il s'agissait de CSM humaines

d'origine placentaire (Galganski *et al.*, 2020b; Kabagambe *et al.*, 2017; Vanover *et al.*, 2019b; Wang *et al.*, 2015).

Les études *in vitro* ont montré que les cellules sécrétaient le BDNF. Plusieurs études ont montré que le BDNF avait des capacités neuro-protectives et neuro-régénératives (Colucci-D'Amato *et al.*, 2020), notamment en favorisant la remyélinisation des axones lors de lésions spinales (Bamber *et al.*, 2001; Menei *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1995). Les CSM-CO semblent, en théorie et *in vitro*, des cellules intéressantes dans la protection et la régénération spinale dans le cas de MMC. Cependant, le sécrétome des CSM est largement influencé par le milieu extérieur (Fuchs *et al.*, 2004; Konala *et al.*, 2016; Paul et Anisimov, 2013) et des études doivent être menées afin de déterminer avec précision celui des CSM-CO utilisées en tant que thérapie cellulaire dans le cadre de MMC chez l'humain ainsi que leur innocuité sur le long terme (bien que les études de Lalu *et al.*, 2012 et Xu and Yang, 2019 soient favorables sur ce dernier point).

#### **4.2.2. Discussion du choix de la technique chirurgicale du modèle de l'étude**

Joyeux *et al.* auraient démontré que le modèle chirurgical ovin avec myélotomie serait plus représentatif du tableau clinique et lésionnel humain que le modèle chirurgical sans myélotomie (Joyeux *et al.*, 2019). En effet, d'après leur étude, le modèle chirurgical avec myélotomie obtenait un score de validité de 17/20 tandis que celui sans myélotomie obtenait un score de 15/20, la différence entre les deux consistant en l'absence d'observation de la MCII chez les agneaux n'ayant pas eu de myélotomie. Néanmoins, le modèle chirurgical sans myélotomie utilisé dans cette étude permet d'obtenir la MCII 15 jours après la création de la lésion et une parésie marquée des membres pelviens à la naissance en l'absence de réparation ou avec réparation avec un patch cellulaire (Guilbaud, 2021) ce qui est en cohérence avec les résultats rapportés par Joyeux et son équipe (Joyeux *et al.*, 2019).

Une des différences avec la MMC observée chez l'humain est que la lésion obtenue avec ce modèle n'est pas kystique ce qui la rapproche plus du myéloschisis que de la MMC macroscopiquement. Il n'existe cependant pas de modèle animal permettant la création d'une lésion kystique dans le cadre de la recherche sur la MMC humaine. Une autre différence réside dans la présence d'une MCII à la naissance dans uniquement 67 % des cas alors qu'elle était présente pour l'ensemble des fœtus 15 jours après la création de la lésion (Guilbaud, 2021). Cette évolution pourrait s'expliquer par la présence de cicatrisation spontanée de la lésion chez certains agneaux, limite du modèle chirurgical ovin également déjà connue (Brown *et al.*, 2015a; Guilbaud *et al.*, 2014).

Hormis les deux différences précédemment évoquées, le tableau clinique et paraclinique ainsi que les analyses histologiques (Guilbaud, 2021) permettent d'affirmer que ce modèle chirurgical ovin sans myélotomie se rapproche de manière fidèle du phénotype de la MMC observée chez l'humain.

### **4.3. Discussion sur l'étude clinique et paraclinique de la myéломéningocèle dans le modèle ovin**

#### **4.3.1. Discussion sur le score de locomotion**

Une précédente étude utilisant le même modèle chirurgical avait été menée l'année précédente. Le score SLR avait été évalué uniquement deux heures après la naissance chez des agneaux ayant fait l'objet d'une réparation anténatale avec ou sans CSM-CO. Les scores obtenus allaient de 0 à 6

(avec une médiane de 4). Or, Brown et son équipe évoquent que les agneaux sains à la naissance sont très souvent faibles et incapables d'avoir une démarche coordonnée, voire de se lever. La démarche s'améliore significativement après 24 heures de vie (Brown *et al.*, 2015b). Il semblait donc nécessaire, afin de d'estimer l'efficacité réelle du traitement anténatal faisant l'objet de l'étude, d'estimer le score SLR au moins à deux heures et 24 heures de vie des agneaux afin d'observer son évolution et sa potentielle efficacité. Cette étude, grâce à une première collaboration avec l'EnvA, devait permettre de conserver les agneaux dans des conditions adéquates afin d'évaluer leur score SLR 24 heures après leur naissance.

Les scores SLR entre les groupes « CSM-CO » et « acellulaire » n'étaient pas significativement différents à deux heures de vie, comme ce qui avait pu être observé lors de l'étude de l'année précédente (Guilbaud, 2021). A l'inverse, les scores SLR entre les deux groupes étaient significativement différents 24 heures après la naissance ( $p = 0,02$ ). Au regard du faible effectif des deux groupes, il n'est pas possible de conclure avec certitude que les CSM-CO aient permis une amélioration de la locomotion des agneaux. Les CSM-CO auraient donc tendance à améliorer la locomotion à 24 heures de vie chez les agneaux dans le modèle ovin de MMC.

Lorsque l'on s'intéresse à l'évolution des scores SLR de chaque groupe, on remarque également que la différence entre deux heures et 24 heures après la naissance n'est pas significative pour le groupe « acellulaire » alors qu'elle l'était pour le groupe « CSM-CO » ( $p = 0,02$ ). Ainsi, les CSM-CO utilisées en tant que thérapie cellulaire adjuvante à la réparation anténatale de la MMC chez des agneaux auraient tendance à améliorer l'évolution de la locomotion au cours du temps. Cette évolution n'a probablement pas pu être évaluée correctement du fait du faible effectif de l'étude et d'une évaluation assez précoce après la naissance sans possibilité de la réaliser après plusieurs jours ou plusieurs mois de vie. Prévoir une étude permettant de conserver les agneaux durant plusieurs mois permettrait d'avoir une évaluation plus juste des effets des CSM-CO sur l'organisme. Ceci permettrait également d'observer d'éventuels effets indésirables suite à l'utilisation de telles cellules.

#### **4.3.2. Discussion sur les explorations neurologiques**

Comme fréquemment observé chez l'humain (Bowman *et al.*, 2001; Verhoef *et al.*, 2005), le modèle chirurgical ovin de MMC (avec ou sans myélotomie) induit une incontinence urinaire chez les agneaux (Burgos *et al.*, 2014; Joyeux *et al.*, 2019) associée à des vessies hypotoniques ou hypertoniques possédant une fibrose sub-épithéliale anormale (Burgos *et al.*, 2014).

D'après notre étude, une incontinence urinaire était observée chez tous les agneaux réparés avec un patch acellulaire et chez un agneau réparé avec un patch contenant les CSM-CO, les autres agneaux (un réparé avec un patch acellulaire et les sept agneaux réparés avec les CSM-CO) étaient continents. Il semblerait donc que le traitement anténatal aux CSM-CO permette d'améliorer la continence urinaire chez les agneaux traités par rapport à ceux n'ayant pas reçu de CSM-CO ( $p = 0,02$ ). Nos résultats sont en accord avec les observations faites par Theodorou et son équipe qui observaient une continence urinaire et une miction semblable entre les agneaux réparés avec des CSM d'origine placentaire et les agneaux sains (Theodorou *et al.*, 2022). En revanche, nos résultats divergent de ceux obtenus par Burgos et son équipe qui observaient une continence urinaire et une vessie d'aspect histologique physiologique chez l'ensemble des agneaux ayant reçu une simple réparation chirurgicale anténatale (Burgos *et al.*, 2014).

L'examen clinique neurologique n'a pas permis de mettre en évidence d'autre d'anomalie entre les agneaux des groupes « CSM-CO » et « acellulaire ». La question d'un manque de puissance statistique important peut se poser concernant l'observation de signes d'amyotrophie qui seraient plus présents chez les agneaux n'ayant pas reçu le traitement à base de CSM-CO que chez ceux l'ayant reçu ( $p = 0,09$ ). Le même manque de puissance statistique peut être invoqué pour l'examen des réflexes des membres pelviens qui seraient plus diminués chez les agneaux n'ayant pas reçu le traitement à base de CSM-CO que chez ceux l'ayant reçu ( $p = 0,09$ ).

L'électromyographie et l'électroneurographie n'ont pas permis de mettre en évidence de différence entre les agneaux traités avec les CSM-CO et ceux ayant simplement reçu un patch acellulaire concernant les amplitudes et les vitesses de conduction des principaux nerfs pelviens. La présence d'une activité électrique spontanée physiologique (généralement de faible intensité) était objectivable chez les agneaux des deux groupes étudiés du fait de l'insertion de l'électrode dans le muscle. L'observation d'une activité électrique spontanée compatible avec une situation de dénervation était rare (deux agneaux du groupe « CSM-CO » et un du groupe « acellulaire »). La littérature rapporte cependant qu'une dénervation serait présente chez les enfants porteurs de MMC, notamment pour les muscles des membres inférieurs, pouvant être à l'origine des déformations orthopédiques fréquemment observées chez ces enfants (entre 30 et 60 % des cas selon les études d'après Omeroğlu *et al.*, 2004 et Özek *et al.*, 2008). Une dénervation du détrusor (muscle vésical) ainsi que des sphincters urétraux est également responsable des dysfonctions urinaires rencontrées chez de tels patients (Koh *et al.*, 2006; Light *et al.*, 1984; Özek *et al.*, 2008). Cette absence de dénervation des muscles des membres pelviens chez les agneaux opérés peut s'expliquer par le fait que le modèle ne permet pas l'apparition de lésions assez importantes ou précoces pour recréer une situation de dénervation des membres pelviens. Une autre explication résiderait dans le fait qu'à l'inverse, le patch, grâce à son action de protection physique, empêcherait la formation de lésions trop graves sur la moelle épinière.

Bien qu'il y ait une tendance à détecter plus fréquemment des PES en regard de la première vertèbre cervicale chez les agneaux traités aux CSM-CO (par rapport au groupe contrôle), notre étude a échoué à mettre en évidence une différence franche. Il serait pertinent de continuer d'évaluer la fonction neurologique en partie grâce à cette méthode pour des études ultérieures. En effet, les études histologiques de moelles d'individus atteints de MMC montrent que ce sont les colonnes dorsales de la moelle épinière qui sont les premières détruites par les lésions (Reis *et al.*, 2007; Stiefel *et al.*, 2007). Or, le faisceau gracile, qui véhicule les informations sensibles des membres pelviens, est situé dans les colonnes dorsales de la moelle épinière (Barone et Bortolami, 2004; Kiehn, 2016). Évaluer la transmission des informations sensibles des membres pelviens à travers la voie lemniscale grâce aux PES semble donc pertinent pour évaluer les lésions effectivement présentes sur la moelle dans le cas de réparations anténatales de MMC.

#### **4.3.3. Discussion sur l'étude histologique**

Les analyses histologiques ont permis de mettre en évidence que l'utilisation des CSM-CO comme traitement adjuvant à la chirurgie anténatale permettrait d'augmenter la densité neuronale au sein de la substance grise dans le modèle ovin de MMC. Cette observation est en accord avec les résultats obtenus par l'équipe de Farmer (Kabagambe *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2015) qui utilisait des CSM placentaires d'origine humaine.

D'autre part, les CSM-CO auraient tendance à réduire la fibrose au sein de la lésion de manière générale et plus particulièrement, la fibrose entre la moelle épinière et le derme et celle en position péri-spinale. Ceci est à mettre en lien avec les propriétés de diminution de la fibrose des CSM (An *et al.*, 2017; Fouad *et al.*, 2005). Une précédente étude avait souligné que les CSM-CO permettaient une diminution de la fibrose dans ces mêmes zones (Guilbaud, 2021; Guilbaud *et al.*, 2022). Notre étude permettrait donc de confirmer ces observations. Cette propriété des CSM-CO est à explorer car elle pourrait éviter aux individus ayant reçu une réparation anténatale de souffrir du syndrome de la moelle attachée. En effet, lors de la chirurgie de réparation de la MMC, qu'elle soit anténatale ou postnatale, une importante fibrose cicatricielle se met en place à l'origine d'un potentiel syndrome de la moelle attachée. L'ajout de CSM-CO lors de ces interventions chirurgicales pourrait permettre, en plus des précédents potentiels effets observés, de diminuer la fibrose provoquée par les manipulations chirurgicales, et ainsi, améliorer le pronostic fonctionnel chez les patients concernés.

Bien que l'étude ait échoué à mettre en évidence une différence significative sur le diamètre des fibres musculaires des membres pelviens entre les agneaux traités aux CSM-CO et ceux n'ayant reçu qu'un patch acellulaire ( $p = 0,06$ ), il est possible de supposer que le traitement aux CSM-CO permettrait de limiter l'amyotrophie au sein du modèle ovin de MMC.

Enfin, les CSM-CO pourraient permettre de conserver une innervation fonctionnelle du sphincter urétral interne. Cependant, du fait du faible effectif, il n'est pas possible de conclure avec confiance sur ces observations. Néanmoins, si on étudie ces dernières à la lumière des observations faites sur la continence urinaire des agneaux, il existe une cohérence entre les résultats venant apporter du crédit au possible effet des CSM-CO sur la continence urinaire.

#### **4.4. Prochaines études et perspectives d'avenir**

##### **4.4.1. Prochaines expérimentations et suite de l'étude**

Une autre série d'expérimentation est actuellement en cours et porte sur l'étude des effets des CSM-CO d'origine humaine exclusivement sur la fonction locomotrice dans le modèle ovin de MMC. Les résultats sont en cours d'analyse. La prochaine série d'expérimentation portera sur l'étude de la faisabilité de la pose d'un patch par fœtoscopie lors de la fermeture anténatale de la MMC, toujours dans le modèle ovin de MMC.

Bien que la thérapie cellulaire ayant recours aux CSM-CO semble être une possibilité prometteuse pour la récupération fonctionnelle locomotrice et sphinctérienne chez les individus atteints de MMC, le passage à des essais sur l'humain reste encore soumis à de nombreuses vérifications et études. Tout d'abord, une caractérisation précise des CSM-CO humaines *in vitro* doit être réalisée en suivant les recommandations de l'ISCGT sur l'élaboration d'un traitement impliquant des CSM (Sanz-Nogués et O'Brien, 2021). Il semble également nécessaire d'étudier l'innocuité des CSM-CO chez l'humain, notamment leur distribution au sein de l'organisme et leurs potentiels effets secondaires. Pour cela, l'étude doit d'abord être menée à long terme sur les ovins et un suivi des individus ayant bénéficié de cette thérapie devrait être effectué sur plusieurs mois chez les agneaux ou années chez l'humain.

#### 4.4.2. Perspectives d'avenir et pistes d'études

Actuellement, deux équipes travaillent activement sur la mise en évidence des bénéfices des CSM sur la fonction locomotrice des ovins : une équipe américaine utilisant des CSM placentaires d'origine humaine (Galganski *et al.*, 2020a; Kabagambe *et al.*, 2017; Vanover *et al.*, 2019b; Wang *et al.*, 2015) et une équipe française utilisant des CSM-CO d'origine ovine et humaine (Guilbaud, 2021; Guilbaud *et al.*, 2022). Les deux traitements anténataux semblent améliorer la locomotion chez les agneaux à 24 heures de vie. Il pourrait donc être intéressant de comparer l'efficacité de ces deux traitements en les comparant au sein d'une même étude afin de déterminer s'il existe une différence d'efficacité entre les deux types de cellules et lequel serait le plus bénéfique pour une utilisation chez l'humain. D'un point de vue pratique et éthique, l'utilisation de CSM-CO reste plus intéressante que l'utilisation de CSM d'origine placentaire car ces dernières sont issues de placenta dont les grossesses ne sont pas arrivées à terme. Leur obtention semble donc plus délicate que celle des CSM-CO.

Plusieurs auteurs évoquent les potentiels bénéfices d'un pré-conditionnement des CSM afin d'améliorer leur survie, modifier leur sécrétome et ainsi, augmenter les bénéfices de leurs effets. Ainsi, de nombreux auteurs ont montré qu'une culture sous atmosphère appauvrie en oxygène pendant un temps court (jusqu'à 72 heures) permettait aux CSM d'augmenter leur temps de survie ainsi que leur capacité de prolifération (Antebi *et al.*, 2018; Beegle *et al.*, 2015; Hao *et al.*, 2022; Peterson *et al.*, 2011). L'hypoxie permettrait également de diminuer l'apoptose cellulaire (Hao *et al.*, 2022) et augmenterait le pouvoir angiogénique (Bader *et al.*, 2015) de ces cellules. Boyette et son équipe ont amené l'idée que le pré-conditionnement hypoxique pourrait modifier les capacités de différenciation cellulaire des CSM (Boyette *et al.*, 2014). D'autres auteurs suggèrent que la mise en culture des CSM avec des cytokine pro-inflammatoires (telles que l'interféron gamma, le *tumor necrosis factor* beta ou encore l'interleukine un-beta) permettrait d'augmenter leur capacité immunomodulatrice (Ferreira *et al.*, 2018).

Concernant les CSM-CO en particulier, Zhang et son équipe ont montré que l'hypoxie (culture cellulaire sous une atmosphère à 3 % d'oxygène durant 72 heures) permettait d'augmenter la prolifération cellulaire (Zhang *et al.*, 2015). Il n'existe, à notre connaissance, pas d'article discutant spécifiquement de la modification du sécrétome des CSM-CO suite à un quelconque pré-conditionnement. L'équipe de Kilpinen aurait montré que le sécrétome des CSM issues de sang de cordon ombilical chez le rat pourrait voir leur composition modifiée en fonction de leur environnement, en particulier en cas d'inflammation (Kilpinen *et al.*, 2013). Puisque l'intérêt des CSM-CO semble s'imposer en tant que thérapie cellulaire au traitement anténatal de la MMC, il semble donc intéressant de développer l'étude des effets d'un pré-conditionnement sur les CSM-CO et leur sécrétome et d'étudier le potentiel intérêt d'un tel pré-conditionnement dans le cadre du traitement anténatal de la MMC.



# Conclusion

---

La myéломéningocèle est la malformation congénitale du système nerveux central la plus fréquemment rencontrée chez le nouveau-né. Elle induit des déficits fonctionnels graves ayant d'importantes conséquences sur le quotidien des personnes atteintes. Bien qu'une fermeture chirurgicale anténatale soit le traitement de choix pour les fœtus ayant été diagnostiqués précocement durant la grossesse, les risques encourus par la mère pendant et suite à la chirurgie restent trop importants par rapport aux améliorations fonctionnelles pour l'enfant. L'objectif de ce travail était donc de déterminer les bénéfices sur diverses fonctions et notamment sur la fonction locomotrice, pouvant être apportés par une thérapie cellulaire adjuvante à la chirurgie anténatale. Pour cela, des lésions mimant une myéломéningocèle ont été créées chirurgicalement dans le modèle animal ovin puis ont été réparées chirurgicalement *in utero* avec l'ajout d'un patch contenant ou non des cellules stromales mésenchymateuses de cordons ombilicaux. Les gestations avaient ensuite été menées à leur terme et après une naissance par césarienne, des explorations postnatales après 24 heures de vie ont été menées.

Cette étude a ainsi permis de montrer que les agneaux ayant bénéficié du patch contenant les cellules stromales mésenchymateuses de cordons ombilicaux auraient une locomotion améliorée 24 heures après la naissance par rapport à des agneaux n'ayant pas bénéficié que du patch acellulaire (score de locomotion médian à 24 heures de 15 pour les agneaux ayant reçu les cellules stromales mésenchymateuses issues de cordons ombilicaux contre 5,5 pour les agneaux ayant reçu le patch acellulaire,  $p = 0,02$ ). Ce score de locomotion, bien qu'évoluant chez tous les agneaux entre la naissance et un jour plus tard, s'améliorerait de façon plus marquée chez les agneaux ayant reçu le traitement cellulaire anténatal (score de locomotion passant de deux à 15 chez les agneaux ayant reçu les cellules stromales mésenchymateuses issues de cordons ombilicaux contre un score passant de deux à 5,5 chez les agneaux n'ayant reçu que le patch acellulaire,  $p = 0,02$ ).

La continence urinaire pourrait également être améliorée grâce au traitement anténatal intéressant cette étude. En effet, le modèle ovin utilisé permettait d'émettre l'hypothèse d'une meilleure continence urinaire lors de l'utilisation des cellules stromales mésenchymateuses issues de cordons ombilicaux par rapport aux agneaux n'ayant reçu que le patch acellulaire ( $p = 0,02$ ). Ces observations étaient en accord avec les observations histologiques du sphincter urétral interne qui pourraient indiquer une innervation sphinctérienne préservée (l'épaisseur du sphincter urétral interne était de 1 200  $\mu\text{m}$  chez les agneaux ayant reçu les cellules stromales mésenchymateuses issues de cordons ombilicaux contre 988  $\mu\text{m}$  chez les agneaux n'ayant reçu que le patch acellulaire,  $p = 0,05$ ).

Enfin, l'emploi de cellules stromales mésenchymateuses comme traitement adjuvant à la chirurgie anténatale pourrait permettre, grâce aux différentes propriétés des cellules utilisées, de réduire la fibrose au sein de la lésion, en particulier la fibrose péri-spinale (épaisseur de 47,4  $\mu\text{m}$  chez les agneaux ayant reçu les cellules stromales mésenchymateuses issues de cordons ombilicaux contre 157,6  $\mu\text{m}$  chez les agneaux n'ayant reçu que le patch acellulaire,  $p = 0,02$ ) et entre la moelle épinière et le derme (épaisseur de 557,7  $\mu\text{m}$  chez les agneaux ayant reçu les cellules stromales mésenchymateuses issues de cordons ombilicaux contre 3 920,8  $\mu\text{m}$  chez les agneaux n'ayant reçu que le patch acellulaire,  $p = 0,006$ ). La réduction de cette fibrose associée à

l'augmentation de la densité neuronale au sein de la substance grise située en regard de la lésion (14 neurones/mm<sup>2</sup> chez les agneaux ayant reçu les cellules stromales mésenchymateuses issues de cordons ombilicaux contre 5,6 neurones/mm<sup>2</sup> chez les agneaux n'ayant reçu que le patch acellulaire,  $p = 0,006$ ) pourrait expliquer l'amélioration de la locomotion ainsi que de la continence chez les agneaux réparés chirurgicalement *in utero* avec des cellules stromales mésenchymateuses de cordons ombilicaux, en comparaison avec ceux, n'ayant reçu qu'un patch acellulaire.

Cette étude est la première à évaluer les effets à 24 heures après la naissance des cellules stromales mésenchymateuses issues de cordons ombilicaux utilisées en tant que thérapie cellulaire adjuvante à la chirurgie anténatale de réparation de la myéломéningocèle dans le modèle ovin. Les résultats préliminaires prometteurs de cette étude permettent d'envisager une exploration plus complète des bénéfices postnataux (notamment sur la locomotion et la continence urinaire) apportés par une telle thérapie anténatale chez les individus atteints de myéломéningocèle. Ainsi, la prochaine étude visera à utiliser exclusivement des cellules stromales mésenchymateuses issues de cordons ombilicaux d'origine humaine afin de progresser vers une application chez l'humain. D'autres études devront également être menées afin de déterminer les effets à moyen et long termes d'un tel traitement sur les individus (en utilisant le modèle ovin). Pour cela, les agneaux devront être étudiés pendant plusieurs semaines voire plusieurs mois dans le but d'étudier l'évolution de diverses fonctions (telle que la locomotion par exemple) et de détecter la survenue et la nature de potentiels effets secondaires à l'utilisation de telles cellules.

# Liste des références bibliographiques

---

- ABRAMS, R.M., SCHWAB, M., GERHARDT, K.J., *et al.* (1998) Vestibular caloric responses and behavioral state in the fetal sheep. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* vol. 45, n° 1, p. 59-68. [[https://doi.org/10.1016/s0165-5876\(98\)00088-3](https://doi.org/10.1016/s0165-5876(98)00088-3)]
- ADINOLFI, M., BECK, S., EMBURY, S., *et al.* (1976) Levels of alpha-fetoprotein in amniotic fluids of mice (curly-tail) with neural tube defects. *Journal of Medical Genetics* vol. 13, n° 6, p. 511-513. [<https://doi.org/10.1136/jmg.13.6.511>]
- ADZICK, N.S., THOM, E.A., SPONG, C.Y., *et al.* (2011) A Randomized Trial of Prenatal versus Postnatal Repair of Myelomeningocele. *New England Journal of Medicine* vol. 364, n° 11, p. 993-1004. [<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1014379>]
- AGARWALLA, P.K., DUNN, I.F., SCOTT, R.M., *et al.* (2007) Tethered Cord Syndrome. *Neurosurgery Clinics of North America, Pediatric Spine Surgery (Part I)* vol. 18, n° 3, p. 531-547. [<https://doi.org/10.1016/j.nec.2007.04.001>]
- AGOPIAN, A.J., TINKER, S.C., LUPO, P.J., *et al.* (2013) Proportion of neural tube defects attributable to known risk factors. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* vol. 97, n° 1, p. 42-46. [<https://doi.org/10.1002/bdra.23100>]
- AN, S.Y., JANG, Y.J., LIM, H.-J., *et al.* (2017) Milk Fat Globule-EGF Factor 8, Secreted by Mesenchymal Stem Cells, Protects Against Liver Fibrosis in Mice. *Gastroenterology* vol. 152, n° 5, p. 1174-1186. [<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.12.003>]
- ANDERSON, M.A., BURDA, J.E., REN, Y., *et al.* (2016) Astrocyte scar formation aids CNS axon regeneration. *Nature* vol. 532, n° 7598, p. 195-200. [<https://doi.org/10.1038/nature17623>]
- ANTEBI, B., RODRIGUEZ, L.A., WALKER, K.P., *et al.* (2018) Short-term physiological hypoxia potentiates the therapeutic function of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy* vol. 9, n° 1, p. 265. [<https://doi.org/10.1186/s13287-018-1007-x>]
- ANTONELLI, P.J., ABRAMS, R.M., GERHARDT, K.J., *et al.* (1998) Vestibular function in the fetal sheep. *Otolaryngology--Head and Neck Surgery* vol. 118, n° 5, p. 571-575. [<https://doi.org/10.1177/019459989811800502>]
- ATHIEL, Y. (2021) Évaluation du bénéfice d'un patch de cellules stromales mésenchymateuses dans le traitement anténatal des myéloméningocèles. Paris-Saclay.
- BADER, A.M., KLOSE, K., BIEBACK, K., *et al.* (2015) Hypoxic Preconditioning Increases Survival and Pro-Angiogenic Capacity of Human Cord Blood Mesenchymal Stromal Cells In Vitro. *PLoS One* vol. 10, n° 9, p. e0138477. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138477>]
- BAE, K.S., PARK, J.B., KIM, H.S., *et al.* (2011) Neuron-like differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Yonsei Medical Journal* vol. 52, n° 3, p. 401-412. [<https://doi.org/10.3349/ymj.2011.52.3.401>]
- BAEZ-JURADO, E., HIDALGO-LANUSSA, O., BARRERA-BAILÓN, B., *et al.* (2019) Secretome of Mesenchymal Stem Cells and Its Potential Protective Effects on Brain Pathologies. *Molecular Neurobiology* vol. 56, n° 10, p. 6902-6927. [<https://doi.org/10.1007/s12035-019-1570-x>]
- BAGLIO, S.R., PEGTEL, D.M., BALDINI, N. (2012) Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy. *Frontiers in Physiology* vol. 3, p. 359. [<https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00359>]

- BAMBER, N.I., LI, H., LU, X., *et al.* (2001) Neurotrophins BDNF and NT-3 promote axonal re-entry into the distal host spinal cord through Schwann cell-seeded mini-channels. *The European Journal of Neuroscience* vol. 13, n° 2, p. 257-268.
- BARONE, R. (2001) Anatomie comparée des mammifères domestiques : Tome 4, Splanchnologie II, Appareil uro-génital, fœtus et ses annexes, péritoine et topographie abdominale. Lyon, Vigot.
- BARONE, R., BORTOLAMI, R. (2004) Anatomie comparée des mammifères domestiques : Tome 6, Neurologie I, Système nerveux central. Lyon, Vigot.
- BATSALI, A.K., KASTRINAKI, M.-C., PAPADAKI, H.A., *et al.* (2013) Mesenchymal stem cells derived from Wharton's Jelly of the umbilical cord: biological properties and emerging clinical applications. *Current Stem Cell Research & Therapy* vol. 8, n° 2, p. 144-155. [<https://doi.org/10.2174/1574888x11308020005>]
- BEEGLE, J., LAKATOS, K., KALOMOIRIS, S., *et al.* (2015) Hypoxic preconditioning of mesenchymal stromal cells induces metabolic changes, enhances survival, and promotes cell retention in vivo. *Stem Cells* vol. 33, n° 6, p. 1818-1828. [<https://doi.org/10.1002/stem.1976>]
- BEIER, D.R., DUSHKIN, H., TELLE, T. (1995) Haplotype analysis of intra-specific backcross curly-tail mice confirms the localization of ct to Chromosome 4. *Mammalian Genome* vol. 6, n° 4, p. 269-272. [<https://doi.org/10.1007/BF00352414>]
- BELFORT, M.A., WHITEHEAD, W.E., SHAMSHIRSAZ, A.A., *et al.* (2020) Comparison of two fetoscopic open neural tube defect repair techniques: single- vs three-layer closure. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* vol. 56, n° 4, p. 532-540. [<https://doi.org/10.1002/uog.21915>]
- BHARTI, D., SHIVAKUMAR, S.B., PARK, J.-K., *et al.* (2018) Comparative analysis of human Wharton's jelly mesenchymal stem cells derived from different parts of the same umbilical cord. *Cell and Tissue Research* vol. 372, n° 1, p. 51-65. [<https://doi.org/10.1007/s00441-017-2699-4>]
- BIXENMANN, B.J., KLINE-FATH, B.M., BIERBRAUER, K.S., *et al.* (2014) Prenatal and postnatal evaluation for syringomyelia in patients with spinal dysraphism. *Journal of Neurosurgery. Pediatrics* vol. 14, n° 3, p. 316-321. [<https://doi.org/10.3171/2014.5.PEDS13482>]
- BOCK, G.R., MARSH, J. (2008) Neural Tube Defects. Oboken, John Wiley & Sons.
- BOUCHARD, S., DAVEY, M.G., RINTOUL, N.E., *et al.* (2003) Correction of hindbrain herniation and anatomy of the vermis after in utero repair of myelomeningocele in sheep. *Journal of Pediatric Surgery* vol. 38, n° 3, p. 451-458. [<https://doi.org/10.1053/jpsu.2003.50078>]
- BOWMAN, R.M., BOSHNJAKU, V., MCLONE, D.G. (2009) The changing incidence of myelomeningocele and its impact on pediatric neurosurgery: a review from the Children's Memorial Hospital. *Child's Nervous System* vol. 25, n° 7, p. 801-806. [<https://doi.org/10.1007/s00381-009-0865-z>]
- BOWMAN, R.M., MCLONE, D.G., GRANT, J.A., *et al.* (2001) Spina bifida outcome: a 25-year prospective. *Pediatric Neurosurgery* vol. 34, n° 3, p. 114-120. [<https://doi.org/10.1159/000056005>]
- BOYETTE, L.B., CREASEY, O.A., GUZIK, L., *et al.* (2014) Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells display enhanced clonogenicity but impaired differentiation with hypoxic preconditioning. *Stem Cells Translational Medicine* vol. 3, n° 2, p. 241-254. [<https://doi.org/10.5966/sctm.2013-0079>]
- BROWN, E.G., KELLER, B.A., PIVETTI, C.D., *et al.* (2015a) Innate healing in the fetal sheep model of myelomeningocele: A standardized defect grading system. *Journal of Pediatric Surgery* vol. 50, n° 7, p. 1134-1136. [<https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2014.10.021>]

- BROWN, E.G., KELLER, B.A., PIVETTI, C.D., *et al.* (2015b) Development of a locomotor rating scale for testing motor function in sheep. *Journal of Pediatric Surgery* vol. 50, n° 4, p. 617-621. [<https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2015.01.002>]
- BUDRAS, K.-D., HABEL, R.E. (2003) Bovine anatomy: an illustrated text. Hannover, Schlütersche.
- BURGOS, L., ENCINAS, J.L., GARCÍA-CABEZAS, M.Á., *et al.* (2014) Bladder changes after several coverage modalities in the surgically induced model of myelomeningocele in lambs. *Actas Urológicas Españolas* vol. 38, n° 1, p. 55-61. [<https://doi.org/10.1016/j.acuro.2013.02.016>]
- CAMERER, E., BARKER, A., DUONG, D.N., *et al.* (2010) Local Protease Signaling Contributes to Neural Tube Closure in the Mouse Embryo. *Developmental Cell* vol. 18, n° 1, p. 25. [<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.11.014>]
- CAPLAN, A.I. (1991) Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research* vol. 9, n° 5, p. 641-650. [<https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>]
- CARLSON, B. (2018) Human embryology and developmental biology, Six edition. Philadelphia, Elsevier.
- CAVALLI, P., TONNI, G., GROSSO, E., *et al.* (2011) Effects of inositol supplementation in a cohort of mothers at risk of producing an NTD pregnancy. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* vol. 91, n° 11, p. 962-965. [<https://doi.org/10.1002/bdra.22853>]
- CHAKRABORTY, A., CRIMMINS, D., HAYWARD, R., *et al.* (2008) Toward reducing shunt placement rates in patients with myelomeningocele. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics* vol. 1, n° 5, p. 361-365. [<https://doi.org/10.3171/PED/2008/1/5/361>]
- CHEN, J., LI, Y., WANG, L., *et al.* (2001) Therapeutic Benefit of Intravenous Administration of Bone Marrow Stromal Cells After Cerebral Ischemia in Rats. *Stroke* vol. 32, n° 4, p. 1005-1011. [<https://doi.org/10.1161/01.STR.32.4.1005>]
- CHEN, M.-Y., LIE, P.-C., LI, Z.-L., *et al.* (2009) Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology* vol. 37, n° 5, p. 629-640. [<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2009.02.003>]
- CHEN, W.H., MORRISS-KAY, G.M., COPP, A.J. (1994) Prevention of spinal neural tube defects in the curly tail mouse mutant by a specific effect of retinoic acid. *Developmental Dynamics* vol. 199, n° 2, p. 93-102. [<https://doi.org/10.1002/aja.1001990203>]
- CHENG, H., QIU, L., MA, J., *et al.* (2011) Replicative senescence of human bone marrow and umbilical cord derived mesenchymal stem cells and their differentiation to adipocytes and osteoblasts. *Molecular Biology Reports* vol. 38, n° 8, p. 5161-5168. [<https://doi.org/10.1007/s11033-010-0665-2>]
- CHO, S.-R., KIM, Y.R., KANG, H.-S., *et al.* (2009) Functional recovery after the transplantation of neurally differentiated mesenchymal stem cells derived from bone marrow in a rat model of spinal cord injury. *Cell Transplantation* vol. 18, n° 12, p. 1359-1368. [<https://doi.org/10.3727/096368909X475329>]
- CHUDICKOVA, M., VACKOVA, I., MACHOVA URDZIKOVA, L., *et al.* (2019) The Effect of Wharton Jelly-Derived Mesenchymal Stromal Cells and Their Conditioned Media in the Treatment of a Rat Spinal Cord Injury. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 20, n° 18, p. 4516. [<https://doi.org/10.3390/ijms20184516>]
- COCHRANE, D., ARONYK, K., SAWATZKY, B., *et al.* (1991) The effects of labor and delivery on spinal cord function and ambulation in patients with meningocele. *Child's Nervous System* vol. 7, n° 6, p. 312-315. [<https://doi.org/10.1007/BF00304828>]
- COFANO, F., BOIDO, M., MONTICELLI, M., *et al.* (2019) Mesenchymal Stem Cells for Spinal Cord Injury: Current Options, Limitations, and Future of Cell Therapy. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 20, n° 11, p. E2698. [<https://doi.org/10.3390/ijms20112698>]

- COLUCCI-D'AMATO, L., SPERANZA, L., VOLPICELLI, F. (2020) Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 21, n° 20, p. E7777. [https://doi.org/10.3390/ijms21207777]
- CONCONI, M. (2011) Phenotype and Differentiation Potential of Stromal Populations Obtained from Various Zones of Human Umbilical Cord: An Overview. *The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal* vol. 4, p. 6-20. [https://doi.org/10.2174/1875043501104010006]
- COPP, A.J., STANIER, P., GREENE, N.D.E. (2013) Neural tube defects: recent advances, unsolved questions, and controversies. *The Lancet. Neurology* vol. 12, n° 8, p. 799-810. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70110-8]
- CORSELLO, T., AMICO, G., CORRAO, S., *et al.* (2019) Wharton's Jelly Mesenchymal Stromal Cells from Human Umbilical Cord: a Close-up on Immunomodulatory Molecules Featured In Situ and In Vitro. *Stem Cell Reviews and Reports* vol. 15, n° 6, p. 900-918. [https://doi.org/10.1007/s12015-019-09907-1]
- CZEIZEL, A.E., DUDÁS, I., VERECZKEY, A., *et al.* (2013) Folate Deficiency and Folic Acid Supplementation: The Prevention of Neural-Tube Defects and Congenital Heart Defects. *Nutrients* vol. 5, n° 11, p. 4760-4775. [https://doi.org/10.3390/nu5114760]
- DANZER, E., SCHWARZ, U., WEHRLI, S., *et al.* (2005) Retinoic acid induced myelomeningocele in fetal rats: characterization by histopathological analysis and magnetic resonance imaging. *Experimental Neurology* vol. 194, n° 2, p. 467-475. [https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.03.011]
- DE LAHUNTA, A., GLASS, E. (2009) *Veterinary neuroanatomy and clinical neurology*, Third edition. Saint-Louis, Saunders Elsevier.
- DESQUILBET, L. (2020) Enhancing Clinical Decision-Making: Challenges of making decisions on the basis of significant statistical associations. *Journal of the American Veterinary Medical Association* vol. 256, n° 2, p. 187-193. [https://doi.org/10.2460/javma.256.2.187]
- DETRAIT, E.R., GEORGE, T.M., ETCHEVERS, H.C., *et al.* (2005) Human neural tube defects: developmental biology, epidemiology, and genetics. *Neurotoxicology and Teratology* vol. 27, n° 3, p. 515-524. [https://doi.org/10.1016/j.ntt.2004.12.007]
- DIONIGI, B., AHMED, A., BRAZZO, J., *et al.* (2015a) Partial or complete coverage of experimental spina bifida by simple intra-amniotic injection of concentrated amniotic mesenchymal stem cells. *Journal of Pediatric Surgery* vol. 50, n° 1, p. 69-73. [https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2014.10.004]
- DIONIGI, B., BRAZZO, J.A., AHMED, A., *et al.* (2015b) Trans-amniotic stem cell therapy (TRASCET) minimizes Chiari-II malformation in experimental spina bifida. *Journal of Pediatric Surgery* vol. 50, n° 6, p. 1037-1041. [https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2015.03.034]
- DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., *et al.* (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* vol. 8, n° 4, p. 315-317. [https://doi.org/10.1080/14653240600855905]
- DUGAS, A., LARGHERO, J., ZÉRAH, M., *et al.* (2020) Cell therapy for prenatal repair of myelomeningocele: A systematic review. *Current Research in Translational Medicine*. [https://doi.org/10.1016/j.retram.2020.04.004]
- EMBURY, S., SELLER, M.J., ADINOLFI, M., *et al.* (1979) Neural Tube Defects in Curly-Tail Mice. I. Incidence, Expression and Similarity to the Human Condition. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* vol. 206, n° 1162, p. 85-94.

- EMERY, J.L., LENDON, R.G. (1973) The local cord lesion in neurospinal dysraphism (meningomyelocele). *The Journal of Pathology* vol. 110, n° 1, p. 83-96. [https://doi.org/10.1002/path.1711100110]
- ESSIEN, F.B., WANNBERG, S.L. (1993) Methionine but not folinic acid or vitamin B-12 alters the frequency of neural tube defects in Axd mutant mice. *The Journal of Nutrition* vol. 123, n° 1, p. 27-34. [https://doi.org/10.1093/jn/123.1.27]
- EUROPEAN COMMISSION (2021) European Platform on Rare Disease Registration. [https://eu-rd-platform.jrc.ec.europa.eu] (consulté le 30/09/2021).
- FARMER, D.L., THOM, E.A., BROCK, J.W., *et al.* (2018) The Management of Myelomeningocele Study: full cohort 30-month pediatric outcomes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* vol. 218, n° 2, p. 256.e1-256.e13. [https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.12.001]
- FAUZA, D.O., JENNINGS, R.W., TENG, Y.D., *et al.* (2008) Neural stem cell delivery to the spinal cord in an ovine model of fetal surgery for spina bifida. *Surgery* vol. 144, n° 3, p. 367-373. [https://doi.org/10.1016/j.surg.2008.05.009]
- FENG, C., D GRAHAM, C., CONNORS, J.P., *et al.* (2016) A comparison between placental and amniotic mesenchymal stem cells for transamniotic stem cell therapy (TRASCET) in experimental spina bifida. *Journal of Pediatric Surgery* vol. 51, n° 6, p. 1010-1013. [https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2016.02.071]
- FERREIRA, J.R., TEIXEIRA, G.Q., SANTOS, S.G., *et al.* (2018) Mesenchymal Stromal Cell Secretome: Influencing Therapeutic Potential by Cellular Pre-conditioning. *Frontiers in Immunology* vol. 9, p. 2837. [https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02837]
- FIMIA, G.M., STOYKOVA, A., ROMAGNOLI, A., *et al.* (2007) Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* vol. 447, n° 7148, p. 1121-1125. [https://doi.org/10.1038/nature05925]
- FONG, C.-Y., CHAK, L.-L., BISWAS, A., *et al.* (2011) Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells. *Stem Cell Reviews and Reports* vol. 7, n° 1, p. 1-16. [https://doi.org/10.1007/s12015-010-9166-x]
- FONG, C.Y., RICHARDS, M., MANASI, N., *et al.* (2007) Comparative growth behaviour and characterization of stem cells from human Wharton's jelly. *Reproductive Biomedicine Online* vol. 15, n° 6, p. 708-718. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60539-1]
- FOUAD, K., SCHNELL, L., BUNGE, M.B., *et al.* (2005) Combining Schwann cell bridges and olfactory-ensheathing glia grafts with chondroitinase promotes locomotor recovery after complete transection of the spinal cord. *The Journal of Neuroscience* vol. 25, n° 5, p. 1169-1178. [https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3562-04.2005]
- FU, Y.-S., SHIH, Y.-T., CHENG, Y.-C., *et al.* (2004) Transformation of human umbilical mesenchymal cells into neurons in vitro. *Journal of Biomedical Science* vol. 11, n° 5, p. 652-660. [https://doi.org/10.1007/BF02256131]
- FUCHS, E., TUMBAR, T., GUASCH, G. (2004) Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* vol. 116, n° 6, p. 769-778. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00255-7]
- GALEA, G.L., MANIOU, E., EDWARDS, T.J., *et al.* (2021) Cell non-autonomy amplifies disruption of neurulation by mosaic Vangl2 deletion in mice. *Nature Communications* vol. 12, n° 1, p. 1159. [https://doi.org/10.1038/s41467-021-21372-4]
- GALGANSKI, L.A., KUMAR, P., VANOVER, M.A., *et al.* (2020a) In utero treatment of myelomeningocele with placental mesenchymal stromal cells - Selection of an optimal cell line in preparation for clinical trials. *Journal of Pediatric Surgery* vol. 55, n° 9, p. 1941-1946. [https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2019.09.029]

- GALGANSKI, L.A., YAMASHIRO, K.J., PIVETTI, C.D., *et al.* (2020b) A Decade of Experience with the Ovine Model of Myelomeningocele: Risk Factors for Fetal Loss. *Fetal Diagnosis and Therapy* vol. 47, n° 6, p. 507-513. [<https://doi.org/10.1159/000505400>]
- GARDNER, W.J. (1965) Hydrodynamic mechanism of syringomyelia: its relationship to myelocele. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* vol. 28, n° 3, p. 247-259.
- GEORGE, T.M., CUMMINGS, T.J. (2003) The immunohistochemical profile of the myelomeningocele placode: is the placode normal? *Pediatric Neurosurgery* vol. 39, n° 5, p. 234-239. [<https://doi.org/10.1159/000072867>]
- GINÉ, C., ARÉVALO, S., MAÍZ, N., *et al.* (2018) Fetoscopic two-layer closure of open neural tube defects. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* vol. 52, n° 4, p. 452-457. [<https://doi.org/10.1002/uog.19104>]
- GÖGEL, S., GUBERNATOR, M., MINGER, S.L. (2011) Progress and prospects: stem cells and neurological diseases. *Gene Therapy* vol. 18, n° 1, p. 1-6. [<https://doi.org/10.1038/gt.2010.130>]
- GREENE, N.D., COPP, A.J. (1997) Inositol prevents folate-resistant neural tube defects in the mouse. *Nature Medicine* vol. 3, n° 1, p. 60-66. [<https://doi.org/10.1038/nm0197-60>]
- GUILBAUD, L. (2021) Évaluation du bénéfice d'un patch de cellules stromales mésenchymateuses dans le traitement anténatal des myéloméningocèles. Paris, Université de Paris.
- GUILBAUD, L., DUGAS, A., WEBER, M., *et al.* (2022) In utero treatment of myelomeningocele with allogenic umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells in an ovine model. *Current Research in Translational Medicine* vol. 70, n° 1, p. 103314. [<https://doi.org/10.1016/j.retram.2021.103314>]
- GUILBAUD, L., GARABEDIAN, C., ROCCO, F., *et al.* (2014) Limits of the surgically induced model of myelomeningocele in the fetal sheep. *Child's Nervous System* vol. 30. [<https://doi.org/10.1007/s00381-014-2426-3>]
- GUPTA, P., KUMAR, Atin, KUMAR, Avneesh, *et al.* (2013) Congenital spinal cord anomalies: a pictorial review. *Current Problems in Diagnostic Radiology* vol. 42, n° 2, p. 57-66. [<https://doi.org/10.1067/j.cpradiol.2012.06.002>]
- HAO, C., YOU, J., QIU, H., *et al.* (2022) Hypoxic preconditioning improves the survival and pro-angiogenic capacity of transplanted human umbilical cord mesenchymal stem cells via HIF-1 $\alpha$  signaling in a rat model of bronchopulmonary dysplasia. *Biochemical and Biophysical Research Communications* vol. 605, p. 111-118. [<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.03.044>]
- HARRIS, M.J., JURILOFF, D.M. (2010) An update to the list of mouse mutants with neural tube closure defects and advances toward a complete genetic perspective of neural tube closure. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology* vol. 88, n° 8, p. 653-669. [<https://doi.org/10.1002/bdra.20676>]
- HAWRYLUK, G.W.J., RUFF, C.A., FEHLINGS, M.G. (2012) Chapter 1 - Development and maturation of the spinal cord: implications of molecular and genetic defects. In Verhaagen, J., McDonald, J.W. (Éd.), *Handbook of Clinical Neurology*, Third edition. Amsterdam, Elsevier, p. 3-30. [<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52137-8.00001-2>]
- HEFFEZ, D.S., ARYANPUR, J., HUTCHINS, G.M., *et al.* (1990) The Paralysis Associated with Myelomeningocele: Clinical and Experimental Data Implicating a Preventable Spinal Cord Injury. *Neurosurgery* vol. 26, n° 6, p. 987-992. [<https://doi.org/10.1227/00006123-199006000-00011>]
- HEFFEZ, D.S., ARYANPUR, J., ROTELLINI, N.A., *et al.* (1993) Intrauterine repair of experimental surgically created dysraphism. *Neurosurgery* vol. 32, n° 6, p. 1005-1010. [<https://doi.org/10.1227/00006123-199306000-00021>]

- HENDIJANI, F., SADEGHI-ALIABADI, H., HAGHJOOY JAVANMARD, S. (2014) Comparison of human mesenchymal stem cells isolated by explant culture method from entire umbilical cord and Wharton's jelly matrix. *Cell and Tissue Banking* vol. 15, n° 4, p. 555-565. [https://doi.org/10.1007/s10561-014-9425-1]
- HENDRICKS, K.A., NUNO, O.M., SUAREZ, L., *et al.* (2001) Effects of hyperinsulinemia and obesity on risk of neural tube defects among Mexican Americans. *Epidemiology* vol. 12, n° 6, p. 630-635. [https://doi.org/10.1097/00001648-200111000-00009]
- HENDRICKX, A.G., PELLEGRINI, M., TARARA, R., *et al.* (1980) Craniofacial and central nervous system malformations induced by triamcinolone acetonide in nonhuman primates: I. General teratogenicity. *Teratology* vol. 22, n° 1, p. 103-114. [https://doi.org/10.1002/tera.1420220113]
- HENDRICKX, A.G., PETERSON, P., HARTMANN, D., *et al.* (2000) Vitamin A teratogenicity and risk assessment in the macaque retinoid model. *Reproductive Toxicology* vol. 14, n° 4, p. 311-323. [https://doi.org/10.1016/s0890-6238(00)00091-5]
- HERNÁNDEZ-DÍAZ, S., WERLER, M.M., WALKER, A.M., *et al.* (2001) Neural tube defects in relation to use of folic acid antagonists during pregnancy. *American Journal of Epidemiology* vol. 153, n° 10, p. 961-968. [https://doi.org/10.1093/aje/153.10.961]
- HSIEH, J.-Y., FU, Y.-S., CHANG, S.-J., *et al.* (2010) Functional module analysis reveals differential osteogenic and stemness potentials in human mesenchymal stem cells from bone marrow and Wharton's jelly of umbilical cord. *Stem Cells and Development* vol. 19, n° 12, p. 1895-1910. [https://doi.org/10.1089/scd.2009.0485]
- HU, S.-L., LUO, H.-S., LI, J.-T., *et al.* (2010) Functional recovery in acute traumatic spinal cord injury after transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Critical Care Medicine* vol. 38, n° 11, p. 2181-2189. [https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181f17c0e]
- HUNT, G.M., OAKESHOTT, P. (2003) Outcome in people with open spina bifida at age 35: prospective community based cohort study. *BMJ* vol. 326, n° 7403, p. 1365-1366. [https://doi.org/10.1136/bmj.326.7403.1365]
- ISHIGE, I., NAGAMURA-INOUE, T., HONDA, M.J., *et al.* (2009) Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord. *International Journal of Hematology* vol. 90, n° 2, p. 261-269. [https://doi.org/10.1007/s12185-009-0377-3]
- JOYEUX, L., DANZER, E., FLAKE, A.W., *et al.* (2018a) Fetal surgery for spina bifida aperta. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition* vol. 103, n° 6, p. F589-F595. [https://doi.org/10.1136/archdischild-2018-315143]
- JOYEUX, L., DE BIE, F., DANZER, E., *et al.* (2018b) Safety and efficacy of fetal surgery techniques to close a spina bifida defect in the fetal lamb model: A systematic review. *Prenatal Diagnosis* vol. 38, n° 4, p. 231-242. [https://doi.org/10.1002/pd.5222]
- JOYEUX, L., DEPREZ, M., KHATOUN, A., *et al.* (2017) Quantitative analysis of motor evoked potentials in the neonatal lamb. *Scientific reports* vol. 7, n° 1, p. 16095-16095. [https://doi.org/10.1038/s41598-017-16453-8]
- JOYEUX, L., ENGELS, A.C., VAN DER MERWE, J., *et al.* (2019) Validation of the Fetal Lamb Model of Spina Bifida. *Scientific reports* vol. 9, n° 1, p. 9327-9327. [https://doi.org/10.1038/s41598-019-45819-3]
- KABAGAMBE, S., KELLER, B., BECKER, J., *et al.* (2017) Placental mesenchymal stromal cells seeded on clinical grade extracellular matrix improve ambulation in ovine myelomeningocele. *Journal of Pediatric Surgery*. [https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2017.10.032]
- KERR, S.M., PARKER, S.E., MITCHELL, A.A., *et al.* (2017) Periconceptional maternal fever, folic acid intake, and the risk for neural tube defects. *Annals of epidemiology* vol. 27, n° 12, p. 777- 782.e1. [https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2017.10.010]

- KIEHN, O. (2016) Decoding the organization of spinal circuits that control locomotion. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 17, n° 4, p. 224-238. [<https://doi.org/10.1038/nrn.2016.9>]
- KILPINEN, L., IMPOLA, U., SANKKILA, L., *et al.* (2013) Extracellular membrane vesicles from umbilical cord blood-derived MSC protect against ischemic acute kidney injury, a feature that is lost after inflammatory conditioning. *Journal of Extracellular Vesicles* vol. 2. [<https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.21927>]
- KIM, Y., LEE, S.H., KIM, W.H., *et al.* (2016) Transplantation of adipose derived mesenchymal stem cells for acute thoracolumbar disc disease with no deep pain perception in dogs. *Journal of Veterinary Science* vol. 17, n° 1, p. 123-126. [<https://doi.org/10.4142/jvs.2016.17.1.123>]
- KLEIN, J.D., TURNER, C.G.B., STEIGMAN, S.A., *et al.* (2011) Amniotic mesenchymal stem cells enhance normal fetal wound healing. *Stem Cells and Development* vol. 20, n° 6, p. 969-976. [<https://doi.org/10.1089/scd.2010.0379>]
- KOH, C.J., DEFILIPPO, R.E., BORER, J.G., *et al.* (2006) Bladder and external urethral sphincter function after prenatal closure of myelomeningocele. *The Journal of Urology* vol. 176, n° 5, p. 2232-2236. [<https://doi.org/10.1016/j.juro.2006.07.077>]
- KONALA, V.B.R., MAMIDI, M.K., BHONDE, R., *et al.* (2016) The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration. *Cytotherapy* vol. 18, n° 1, p. 13-24. [<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.10.008>]
- KORENROMP, M.J., GOOL, J.D.V., BRUINESE, H.W., *et al.* (1986) Early fetal leg movements in myelomeningocele. *The Lancet* vol. 327, n° 8486, p. 917-918. [[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(86\)91022-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(86)91022-6)]
- KORSTANJE, R., DESAI, J., LAZAR, G., *et al.* (2008) Quantitative trait loci affecting phenotypic variation in the vacuolated lens mouse mutant, a multigenic mouse model of neural tube defects. *Physiological Genomics* vol. 35, n° 3, p. 296-304. [<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.90260.2008>]
- KOWITZKE, B., COHRS, G., LEUSCHNER, I., *et al.* (2016) Cellular Profiles and Molecular Mediators of Lesion Cascades in the Placode in Human Open Spinal Neural Tube Defects. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* vol. 75, n° 9, p. 827-842. [<https://doi.org/10.1093/jnen/nlw057>]
- KUMAR, R., MEHROTRA, A., BANERJEE, S. (2013) Neuro-orthopaedic conditions in spina bifida: natural course and their management and long-term outcomes. *Child's Nervous System* vol. 29, n° 9, p. 1581-1587. [<https://doi.org/10.1007/s00381-013-2146-0>]
- LALU, M.M., MCINTYRE, L., PUGLIESE, C., *et al.* (2012) Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *PloS One* vol. 7, n° 10, p. e47559. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047559>]
- LARSEN, W.J. (2003) Embryologie humaine, Seconde édition. Louvain-la-Neuve, De Boeck.
- LEE, D.-H., KIM, E.Y., PARK, S., *et al.* (2006) Reclosure of surgically induced spinal open neural tube defects by the intraamniotic injection of human embryonic stem cells in chick embryos 24 hours after lesion induction. *Journal of Neurosurgery* vol. 105, n° 2 Suppl, p. 127-133. [<https://doi.org/10.3171/ped.2006.105.2.127>]
- LEE, D.-H., PARK, S., KIM, E.Y., *et al.* (2004) Enhancement of re-closure capacity by the intra-amniotic injection of human embryonic stem cells in surgically induced spinal open neural tube defects in chick embryos. *Neuroscience Letters* vol. 364, n° 2, p. 98-100. [<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.04.033>]
- LEW, S.M., KOTHBAUER, K.F. (2007) Tethered Cord Syndrome: An Updated Review. *Pediatric Neurosurgery* vol. 43, n° 3, p. 236-248. [<https://doi.org/10.1159/000098836>]

- LI, H., GAO, F., MA, L., *et al.* (2012) Therapeutic potential of in utero mesenchymal stem cell (MSCs) transplantation in rat fetuses with spina bifida aperta. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* vol. 16, n° 7, p. 1606-1617. [<https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01470.x>]
- LI, H., MIAO, J., ZHAO, G., *et al.* (2014) Different expression patterns of growth factors in rat fetuses with spina bifida aperta after in utero mesenchymal stromal cell transplantation. *Cytotherapy* vol. 16, n° 3, p. 319-330. [<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.10.005>]
- LI, T., XIA, M., GAO, Y., *et al.* (2015) Human umbilical cord mesenchymal stem cells: an overview of their potential in cell-based therapy. *Expert Opinion on Biological Therapy* vol. 15, n° 9, p. 1293-1306. [<https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1051528>]
- LIE, H.R., LAGERGREN, J., RASMUSSEN, F., *et al.* (1991) Bowel and bladder control of children with myelomeningocele: a Nordic study. *Developmental Medicine and Child Neurology* vol. 33, n° 12, p. 1053-1061. [<https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.1991.tb14827.x>]
- LIGHT, J.K., FAGANEL, J., ROTH, D.R., *et al.* (1984) Meningomyelocele: a clinical, urodynamic and neurophysiological evaluation. *The Journal of Urology* vol. 131, n° 4, p. 717-721. [[https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)50596-0](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)50596-0)]
- LINDQUIST, B., UVEBRANT, P., REHN, E., *et al.* (2009) Cognitive functions in children with myelomeningocele without hydrocephalus. *Child's Nervous System* vol. 25, n° 8, p. 969-975. [<https://doi.org/10.1007/s00381-009-0843-5>]
- LINDVALL, O., BARKER, R.A., BRÜSTLE, O., *et al.* (2012) Clinical translation of stem cells in neurodegenerative disorders. *Cell Stem Cell* vol. 10, n° 2, p. 151-155. [<https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.01.009>]
- LIU, J., HAN, D., WANG, Z., *et al.* (2013) Clinical analysis of the treatment of spinal cord injury with umbilical cord mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* vol. 15, n° 2, p. 185-191. [<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2012.09.005>]
- LUTHY, D.A., WARDINSKY, T., SHURTLEFF, D.B., *et al.* (1991) Cesarean Section before the Onset of Labor and Subsequent Motor Function in Infants with Meningomyelocele Diagnosed Antenatally. *New England Journal of Medicine* vol. 324, n° 10, p. 662-666. [<https://doi.org/10.1056/NEJM199103073241004>]
- LYNCH, S.A. (2005) Non-multifactorial neural tube defects. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* vol. 135C, n° 1, p. 69-76. [<https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30055>]
- MA, L., FENG, X., CUI, B., *et al.* (2005) Human umbilical cord Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells differentiation into nerve-like cells. *Chinese Medical Journal* vol. 118, n° 23, p. 1987-1993.
- MADRIGAL, M., RAO, K.S., RIORDAN, N.H. (2014) A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *Journal of Translational Medicine* vol. 12, p. 260. [<https://doi.org/10.1186/s12967-014-0260-8>]
- MAGUIRE, G. (2013) Stem cell therapy without the cells. *Communicative & Integrative Biology* vol. 6, n° 6, p. e26631. [<https://doi.org/10.4161/cib.26631>]
- MANNING, S.M., JENNINGS, R., MADSEN, J.R. (2000) Pathophysiology, prevention, and potential treatment of neural tube defects. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* vol. 6, n° 1, p. 6-14. [[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2779\(2000\)6:1<6::AID-MRDD2>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2779(2000)6:1<6::AID-MRDD2>3.0.CO;2-B)]
- MATALON, S., SCHECHTMAN, S., GOLDZWEIG, G., *et al.* (2002) The teratogenic effect of carbamazepine: a meta-analysis of 1255 exposures. *Reproductive Toxicology* vol. 16, n° 1, p. 9-17. [[https://doi.org/10.1016/s0890-6238\(01\)00199-x](https://doi.org/10.1016/s0890-6238(01)00199-x)]

- MATTESON, P.G., DESAI, J., KORSTANJE, R., *et al.* (2008) The orphan G protein-coupled receptor, Gpr161, encodes the vacuolated lens locus and controls neurulation and lens development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 105, n° 6, p. 2088-2093. [<https://doi.org/10.1073/pnas.0705657105>]
- MCCOMB, J.G. (2015) A practical clinical classification of spinal neural tube defects. *Child's Nervous System* vol. 31, n° 10, p. 1641-1657. [<https://doi.org/10.1007/s00381-015-2845-9>]
- MCGEADY, T.A., QUINN, P.J., FITZPATRICK, E.S., *et al.* (2006) *Veterinary Embryology*. Ames, Wiley.
- MCLONE, D.G., KNEPPER, P.A. (1989) The cause of Chiari II malformation: a unified theory. *Pediatric Neuroscience* vol. 15, n° 1, p. 1-12. [<https://doi.org/10.1159/000120432>]
- MEISEL, R., ZIBERT, A., LARYEA, M., *et al.* (2004) Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* vol. 103, n° 12, p. 4619-4621. [<https://doi.org/10.1182/blood-2003-11-3909>]
- MENEI, P., MONTERO-MENEI, C., WHITTEMORE, S.R., *et al.* (1998) Schwann cells genetically modified to secrete human BDNF promote enhanced axonal regrowth across transected adult rat spinal cord. *European Journal of Neuroscience* vol. 10, n° 2, p. 607-621. [<https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00071.x>]
- MENNAN, C., WRIGHT, K., BHATTACHARJEE, A., *et al.* (2013) Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from different regions of the human umbilical cord. *BioMed Research International* vol. 2013, p. 916136. [<https://doi.org/10.1155/2013/916136>]
- MERRILL, D.C., GOODWIN, P., BURSON, J.M., *et al.* (1998) The optimal route of delivery for fetal meningomyelocele. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* vol. 179, n° 1, p. 235-240. [[https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(98\)70278-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(98)70278-9)]
- MEULI, M., MEULI-SIMMEN, C., YINGLING, C.D., *et al.* (1996) In utero repair of experimental myelomeningocele saves neurological function at birth. *Journal of Pediatric Surgery* vol. 31, n° 3, p. 397-402. [[https://doi.org/10.1016/s0022-3468\(96\)90746-0](https://doi.org/10.1016/s0022-3468(96)90746-0)]
- MEULI, M., MEULI-SIMMEN, C., YINGLING, C.D., *et al.* (1995) Creation of myelomeningocele in utero: a model of functional damage from spinal cord exposure in fetal sheep. *Journal of Pediatric Surgery* vol. 30, n° 7, p. 1028-1032; discussion 1032-1033. [[https://doi.org/10.1016/0022-3468\(95\)90335-6](https://doi.org/10.1016/0022-3468(95)90335-6)]
- MEYERROSE, T., OLSON, S., PONTOW, S., *et al.* (2010) Mesenchymal stem cells for the sustained in vivo delivery of bioactive factors. *Advanced Drug Delivery Reviews* vol. 62, n° 12, p. 1167-1174. [<https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.09.013>]
- MICHEJDA, M. (1984) Intrauterine treatment of spina bifida: primate model. *Zeitschrift Fur Kinderchirurgie: Organ Der Deutschen, Der Schweizerischen Und Der Osterreichischen Gesellschaft Fur Kinderchirurgie = Surgery in Infancy and Childhood* vol. 39, n° 4, p. 259-261. [<https://doi.org/10.1055/s-2008-1044221>]
- MILED, S.B., LOEUILLET, L., HUYEN, J.-P.D.V., *et al.* (2020) Severe and progressive neuronal loss in myelomeningocele begins before 16 weeks of pregnancy. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* vol. 223, n° 2, p. 256.e1-256.e9. [<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.02.052>]
- MILLER, R.K., HENDRICKX, A.G., MILLS, J.L., *et al.* (1998) Periconceptual vitamin A use: How much is teratogenic? *Reproductive Toxicology* vol. 12, n° 1, p. 75-88. [[https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(97\)00102-0](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(97)00102-0)]
- NANCARROW-LEI, R., MAFI, P., MAFI, R., *et al.* (2017) A Systemic Review of Adult Mesenchymal Stem Cell Sources and their Multilineage Differentiation Potential Relevant to Musculoskeletal Tissue Repair and Regeneration. *Current Stem Cell Research & Therapy* vol. 12, n° 8, p. 601-610. [<https://doi.org/10.2174/1574888X12666170608124303>]

- NIEDERREITHER, K., SUBBARAYAN, V., DOLLÉ, P., *et al.* (1999) Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nature Genetics* vol. 21, n° 4, p. 444-448. [<https://doi.org/10.1038/7788>]
- NIGGEMANN, B., BUCK, D., MICHAEL, T., *et al.* (1998) Latex provocation tests in patients with spina bifida: who is at risk of becoming symptomatic? *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* vol. 102, n° 4 Pt 1, p. 665-670. [[https://doi.org/10.1016/s0091-6749\(98\)70285-4](https://doi.org/10.1016/s0091-6749(98)70285-4)]
- OAKESHOTT, P., HUNT, G.M. (2003) Long-term outcome in open spina bifida. *The British Journal of General Practice* vol. 53, n° 493, p. 632-636.
- OMEROĞLU, S., PEKER, T., OMEROĞLU, H., *et al.* (2004) Intrauterine structure of foot muscles in talipes equinovarus due to high-level myelomeningocele: a light microscopic study in fetal cadavers. *Journal of Pediatric Orthopedics. Part B* vol. 13, n° 4, p. 263-267. [<https://doi.org/10.1097/01.bpb.0000111041.46580.b3>]
- ÖZEK, M.M., CINALLI, G., MAIXNER, W.J. (2008) Spina bifida: management and outcome. Milan, Springer.
- PAEK, B.W., FARMER, D.L., WILKINSON, C.C., *et al.* (2000) Hindbrain herniation develops in surgically created myelomeningocele but is absent after repair in fetal lambs. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* vol. 183, n° 5, p. 1119-1123. [<https://doi.org/10.1067/mob.2000.108867>]
- PALLERLA, S.R., PAN, Y., ZHANG, X., *et al.* (2007) Heparan sulfate Ndst1 gene function variably regulates multiple signaling pathways during mouse development. *Developmental Dynamics* vol. 236, n° 2, p. 556-563. [<https://doi.org/10.1002/dvdy.21038>]
- PASTUSZKA, A., BOHOSIEWICZ, J., OLEJEK, A., *et al.* (2020) In utero myelomeningocele repair reduces intensification of inflammatory changes in the dura mater and the skin. *The Journal of Spinal Cord Medicine* p. 1-6. [<https://doi.org/10.1080/10790268.2020.1736434>]
- PATTERSON, V.L., DAMRAU, C., PAUDYAL, A., *et al.* (2009) Mouse hitchhiker mutants have spina bifida, dorso-ventral patterning defects and polydactyly: identification of Tulp3 as a novel negative regulator of the Sonic hedgehog pathway. *Human Molecular Genetics* vol. 18, n° 10, p. 1719-1739. [<https://doi.org/10.1093/hmg/ddp075>]
- PAUL, G., ANISIMOV, S. (2013) The secretome of mesenchymal stem cells: Potential implications for neuroregeneration. *Biochimie* vol. 95, n° 12, p. 2246-2256. [<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.07.013>]
- PEDREIRA, D.A.L., ACACIO, G.L., GONÇALVES, R.T., *et al.* (2018) Percutaneous fetoscopic closure of large open spina bifida using a bilaminar skin substitute. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* vol. 52, n° 4, p. 458-466. [<https://doi.org/10.1002/uog.19001>]
- PEDREIRA, D.A.L., ZANON, N., NISHIKUNI, K., *et al.* (2016) Endoscopic surgery for the antenatal treatment of myelomeningocele: the CECAM trial. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* vol. 214, n° 1, p. 111.e1-111.e11. [<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.09.065>]
- PENG, J., WANG, Y., ZHANG, L., *et al.* (2011) Human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells differentiate into a Schwann-cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Brain Research Bulletin* vol. 84, n° 3, p. 235-243. [<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2010.12.013>]
- PERALTA, C.F.A., BOTELHO, R.D., ROMANO, E.R., *et al.* (2020) Fetal open spinal dysraphism repair through a mini-hysterotomy: Influence of gestational age at surgery on the perinatal outcomes and postnatal shunt rates. *Prenatal Diagnosis* vol. 40, n° 6, p. 689-697. [<https://doi.org/10.1002/pd.5675>]

- PETERSON, K.M., ALY, A., LERMAN, A., *et al.* (2011) Improved survival of mesenchymal stromal cell after hypoxia preconditioning: Role of oxidative stress. *Life Sciences* vol. 88, n° 1, p. 65-73. [<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.10.023>]
- PIATT, J.H. (2004) Syringomyelia complicating myelomeningocele: review of the evidence. *Journal of Neurosurgery* vol. 100, n° 2 Suppl Pediatrics, p. 101-109. [<https://doi.org/10.3171/ped.2004.100.2.0101>]
- PIRES, A.O., NEVES-CARVALHO, A., SOUSA, N., *et al.* (2014) The Secretome of Bone Marrow and Wharton Jelly Derived Mesenchymal Stem Cells Induces Differentiation and Neurite Outgrowth in SH-SY5Y Cells. *Stem Cells International* vol. 2014, p. 438352. [<https://doi.org/10.1155/2014/438352>]
- POLLENUS, J., LAGAE, L., AERTSEN, M., *et al.* (2020) The impact of cerebral anomalies on cognitive outcome in patients with spina bifida: A systematic review. *European Journal of Paediatric Neurology* vol. 28, p. 16-28. [<https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2020.07.005>]
- QU, J., ZHANG, H. (2017) Roles of Mesenchymal Stem Cells in Spinal Cord Injury. *Stem Cells International* vol. 2017, p. 5251313. [<https://doi.org/10.1155/2017/5251313>]
- REIS, J.L., CORREIA-PINTO, J., MONTEIRO, M.P., *et al.* (2007) In utero topographic analysis of astrocytes and neuronal cells in the spinal cord of mutant mice with myelomeningocele. *Journal of Neurosurgery* vol. 106, n° 6 Suppl, p. 472-479. [<https://doi.org/10.3171/ped.2007.106.6.472>]
- ROCHA, P.P., BLEISS, W., SCHREWE, H. (2010) Mosaic expression of Med12 in female mice leads to exencephaly, spina bifida, and craniorachischisis. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology* vol. 88, n° 8, p. 626-632. [<https://doi.org/10.1002/bdra.20693>]
- ROSSI, A., BIANCHERI, R., CAMA, A., *et al.* (2004) Imaging in spine and spinal cord malformations. *European Journal of Radiology* vol. 50, n° 2, p. 177-200. [<https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2003.10.015>]
- ROUX, S., LEOTOT, J., CHEVALLIER, N., *et al.* (2011) Cellules stromales mésenchymateuses : propriétés biologiques et perspectives thérapeutiques. *Transfusion Clinique et Biologique* vol. 18, n° 1, p. 1-12. [<https://doi.org/10.1016/j.tracli.2011.01.001>]
- SALEM, H.K., THIEMERMANN, C. (2010) Mesenchymal Stromal Cells: Current Understanding and Clinical Status. *Stem Cells* vol. 28, n° 3, p. 585-596. [<https://doi.org/10.1002/stem.269>]
- SANZ CORTES, M., DAVILA, I., TORRES, P., *et al.* (2019) Does fetoscopic or open repair for spina bifida affect fetal and postnatal growth? *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* vol. 53, n° 3, p. 314-323. [<https://doi.org/10.1002/uog.20220>]
- SANZ-NOGUÉS, C., O'BRIEN, T. (2021) Current good manufacturing practice considerations for mesenchymal stromal cells as therapeutic agents. *Biomaterials and Biosystems* vol. 2, p. 100018. [<https://doi.org/10.1016/j.bbiosy.2021.100018>]
- SATO, K., OZAKI, K., OH, I., *et al.* (2007) Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* vol. 109, n° 1, p. 228-234. [<https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-002246>]
- SEALED ENVELOPE (2022) Power calculator for continuous outcome superiority trial. [<https://www.sealedenvelope.com/power/continuous-superiority/>] (consulté le 26/06/2022).
- SELÇUKI, M., MANNING, S., BERNFIELD, M. (2001) The curly tail mouse model of human neural tube defects demonstrates normal spinal cord differentiation at the level of the meningomyelocele: implications for fetal surgery. *Child's Nervous System* vol. 17, n° 1-2, p. 19-23. [<https://doi.org/10.1007/s003810000401>]

- SELLER, M.J., ADINOLFI, M. (1981) The curly-tail mouse: An experimental model for human neural tube defects. *Life Sciences* vol. 29, n° 16, p. 1607-1615. [[https://doi.org/10.1016/0024-3205\(81\)90061-8](https://doi.org/10.1016/0024-3205(81)90061-8)]
- SELLER, M.J., EMBURY, S., POLANI, P.E., *et al.* (1979) Neural Tube Defects in Curly-Tail Mice. II. Effect of Maternal Administration of Vitamin A. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* vol. 206, n° 1162, p. 95-107.
- SHI, Y., WANG, Yu, LI, Q., *et al.* (2018) Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases. *Nature Reviews. Nephrology* vol. 14, n° 8, p. 493-507. [<https://doi.org/10.1038/s41581-018-0023-5>]
- SHIEH, H.F., AHMED, A., ROHRER, L., *et al.* (2018) Donor mesenchymal stem cell kinetics after transamniotic stem cell therapy (TRASCET) for experimental spina bifida. *Journal of Pediatric Surgery* vol. 53, n° 6, p. 1134-1136. [<https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2018.02.067>]
- SORRELL, J.M., BABER, M.A., CAPLAN, A.I. (2009) Influence of adult mesenchymal stem cells on in vitro vascular formation. *Tissue Engineering. Part A* vol. 15, n° 7, p. 1751-1761. [<https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0254>]
- STEELE, J.W., BAYLISS, S., BAYLISS, J., *et al.* (2020) Heritable spina bifida in sheep: A potential model for fetal repair of myelomeningocele. *Journal of Pediatric Surgery* vol. 55, n° 3, p. 475-481. [<https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2019.06.019>]
- STEVENSON, K.L. (2004) Chiari Type II malformation: past, present, and future. *Neurosurgical Focus* vol. 16, n° 2, p. 1-7. [<https://doi.org/10.3171/foc.2004.16.2.6>]
- STIEFEL, D., COPP, A.J., MEULI, M. (2007) Fetal spina bifida in a mouse model: loss of neural function in utero. *Journal of Neurosurgery* vol. 106, n° 3 Suppl, p. 213-221. [<https://doi.org/10.3171/ped.2007.106.3.213>]
- STIEFEL, D., MEULI, M. (2007) Scanning electron microscopy of fetal murine myelomeningocele reveals growth and development of the spinal cord in early gestation and neural tissue destruction around birth. *Journal of Pediatric Surgery* vol. 42, n° 9, p. 1561-1565. [<https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2007.04.019>]
- STOKES, S.C., YAMASHIRO, K.J., VANOVER, M.A., *et al.* (2021) Preliminary Evaluation of a Novel Fetal Guinea Pig Myelomeningocele Model. *BioMed Research International* vol. 2021, p. 2180883. [<https://doi.org/10.1155/2021/2180883>]
- SZABO, R., HOBSON, J.P., CHRISTOPH, K., *et al.* (2009) Regulation of cell surface protease matrilysin by HAI2 is essential for placental development, neural tube closure and embryonic survival in mice. *Development* vol. 136, n° 15, p. 2653-2663. [<https://doi.org/10.1242/dev.038430>]
- TAKEDA, Y.S., XU, Q. (2015) Neuronal Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells Using Exosomes Derived from Differentiating Neuronal Cells. *PLoS One* vol. 10, n° 8, p. e0135111. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135111>]
- TEIXEIRA, F.G., CARVALHO, M.M., SOUSA, N., *et al.* (2013) Mesenchymal stem cells secretome: a new paradigm for central nervous system regeneration? *Cellular and Molecular Life Sciences* vol. 70, n° 20, p. 3871-3882. [<https://doi.org/10.1007/s00018-013-1290-8>]
- THEODOROU, C.M., JACKSON, J.E., STOKES, S.C., *et al.* (2022) Early investigations into improving bowel and bladder function in fetal ovine myelomeningocele repair. *Journal of Pediatric Surgery* vol. 57, n° 5, p. 941-948. [<https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2021.12.046>]
- TORTORI-DONATI, P., ROSSI, A., CAMA, A. (2000) Spinal dysraphism: a review of neuroradiological features with embryological correlations and proposal for a new classification. *Neuroradiology* vol. 42, n° 7, p. 471-491. [<https://doi.org/10.1007/s002340000325>]

- TURNER, C.G., PENNINGTON, E.C., GRAY, F.L., *et al.* (2013) Intra-amniotic delivery of amniotic-derived neural stem cells in a syngeneic model of spina bifida. *Fetal Diagnosis and Therapy* vol. 34, n° 1, p. 38-43. [<https://doi.org/10.1159/000350267>]
- VACHHA, B., ADAMS, R. (2003) Language differences in young children with myelomeningocele and shunted hydrocephalus. *Pediatric Neurosurgery* vol. 39, n° 4, p. 184-189. [<https://doi.org/10.1159/000072469>]
- VACHHA, B., ADAMS, R.C. (2005) Memory and selective learning in children with spina bifida-myelomeningocele and shunted hydrocephalus: A preliminary study. *Cerebrospinal Fluid Research* vol. 2, p. 10. [<https://doi.org/10.1186/1743-8454-2-10>]
- VAN STRAATEN, H.W., COPP, A.J. (2001) Curly tail: a 50-year history of the mouse spina bifida model. *Anatomy and Embryology* vol. 203, n° 4, p. 225-237. [<https://doi.org/10.1007/s004290100169>]
- VANOVER, M., PIVETTI, C., GALGANSKI, L., *et al.* (2019a) Spinal Angulation: A Limitation of the Fetal Lamb Model of Myelomeningocele. *Fetal Diagnosis and Therapy* vol. 46, n° 6, p. 376-384. [<https://doi.org/10.1159/000496201>]
- VANOVER, M., PIVETTI, C., LANKFORD, L., *et al.* (2019b) High Density Placental Mesenchymal Stromal Cells Provide Neuronal Preservation and Improve Motor Function Following In Utero Treatment of Ovine Myelomeningocele. *Journal of Pediatric Surgery* vol. 54, n° 1, p. 75-79. [<https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2018.10.032>]
- VERHOEF, M., LURVINK, M., BARF, H.A., *et al.* (2005) High prevalence of incontinence among young adults with spina bifida: description, prediction and problem perception. *Spinal Cord* vol. 43, n° 6, p. 331-340. [<https://doi.org/10.1038/sj.sc.3101705>]
- VIZOSO, F.J., EIRO, N., CID, S., *et al.* (2017) Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 18, n° 9, p. 1852. [<https://doi.org/10.3390/ijms18091852>]
- VON KOCH, C.S., COMPAGNONE, N., HIROSE, S., *et al.* (2005) Myelomeningocele: characterization of a surgically induced sheep model and its central nervous system similarities and differences to the human disease. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* vol. 193, n° 4, p. 1456-1462. [<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2005.02.110>]
- WANG, A., BROWN, E.G., LANKFORD, L., *et al.* (2015) Placental Mesenchymal Stromal Cells Rescue Ambulation in Ovine Myelomeningocele. *Stem Cells Translational Medicine* vol. 4, n° 6, p. 659-669. [<https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0296>]
- WANG, H.-S., HUNG, S.-C., PENG, S.-T., *et al.* (2004) Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* vol. 22, n° 7, p. 1330-1337. [<https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0013>]
- WANG, S., LU, H., CHENG, L. (2018) Angiogenic ability of 3 different tissues-derived mesenchymal stem cells on endothelial progenitor cells. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban = Journal of Central South University. Medical Sciences* vol. 43, n° 2, p. 184-191. [<https://doi.org/10.11817/j.issn.1672-7347.2018.02.014>]
- WANG, Y., CHEN, X., CAO, W., *et al.* (2014) Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nature Immunology* vol. 15, n° 11, p. 1009-1016. [<https://doi.org/10.1038/ni.3002>]
- WEISS, M.L., TROYER, D.L. (2006) Stem cells in the umbilical cord. *Stem Cell Reviews* vol. 2, n° 2, p. 155-162. [<https://doi.org/10.1007/s12015-006-0022-y>]
- WHITE, R.E., JAKEMAN, L.B. (2008) Don't fence me in: harnessing the beneficial roles of astrocytes for spinal cord repair. *Restorative Neurology and Neuroscience* vol. 26, n° 2-3, p. 197-214.

- WILSON, M.P., HUGGE, C., BIELINSKA, M., *et al.* (2009) Neural tube defects in mice with reduced levels of inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 106, n° 24, p. 9831-9835. [https://doi.org/10.1073/pnas.0904172106]
- WLODARCZYK, B.J., TANG, L.S., TRIPLETT, A., *et al.* (2006) Spontaneous neural tube defects in splotch mice supplemented with selected micronutrients. *Toxicology and Applied Pharmacology* vol. 213, n° 1, p. 55-63. [https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.09.008]
- WOODHOUSE, C.R.J. (2008) Myelomeningocele: neglected aspects. *Pediatric Nephrology* vol. 23, n° 8, p. 1223-1231. [https://doi.org/10.1007/s00467-007-0663-3]
- WRIGHT, K.T., EL MASRI, W., OSMAN, A., *et al.* (2007) Bone marrow stromal cells stimulate neurite outgrowth over neural proteoglycans (CSPG), myelin associated glycoprotein and Nogo-A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* vol. 354, n° 2, p. 559-566. [https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.01.013]
- WU, X., JIANG, J., GU, Z., *et al.* (2020) Mesenchymal stromal cell therapies: immunomodulatory properties and clinical progress. *Stem Cell Research & Therapy* vol. 11, n° 1, p. 345. [https://doi.org/10.1186/s13287-020-01855-9]
- XU, P., YANG, X. (2019) The Efficacy and Safety of Mesenchymal Stem Cell Transplantation for Spinal Cord Injury Patients: A Meta-Analysis and Systematic Review. *Cell Transplantation* vol. 28, n° 1, p. 36-46. [https://doi.org/10.1177/0963689718808471]
- XU, X.M., GUÉNARD, V., KLEITMAN, N., *et al.* (1995) A Combination of BDNF and NT-3 Promotes Supraspinal Axonal Regeneration into Schwann Cell Grafts in Adult Rat Thoracic Spinal Cord. *Experimental Neurology* vol. 134, n° 2, p. 261-272. [https://doi.org/10.1006/exnr.1995.1056]
- YANG, C.-C., SHIH, Y.-H., KO, M.-H., *et al.* (2008) Transplantation of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly after complete transection of the rat spinal cord. *PLoS One* vol. 3, n° 10, p. e3336. [https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003336]
- YE, Y., PENG, Y., HU, S., *et al.* (2016) In Vitro Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Neuron-Like Cells by Cerebrospinal Fluid Improves Motor Function of Middle Cerebral Artery Occlusion Rats. *Frontiers in Neurology* vol. 7, n° 183.
- YE, Y., ZENG, Y.-M., WAN, M.-R., *et al.* (2011) Induction of human bone marrow mesenchymal stem cells differentiation into neural-like cells using cerebrospinal fluid. *Cell Biochemistry and Biophysics* vol. 59, n° 3, p. 179-184. [https://doi.org/10.1007/s12013-010-9130-z]
- YINGLING, C.D., MEULI-SIMMEN, C., MEULI, M., *et al.* (1999a) Experimental fetal neurosurgery: effects of in-utero manipulations on somatosensory evoked potentials. *Pediatric Surgery International* vol. 15, n° 8, p. 535-539. [https://doi.org/10.1007/s003830050664]
- YINGLING, C.D., MEULI-SIMMEN, C., MEULI, M., *et al.* (1999b) Assessment of sensory function in neonatal sheep with somatosensory evoked potentials: methodology and normative data. *Pediatric Surgery International* vol. 15, n° 8, p. 530-534. [https://doi.org/10.1007/s003830050663]
- ZACHAR, L., BAČENKOVÁ, D., ROSOCHA, J. (2016) Activation, homing, and role of the mesenchymal stem cells in the inflammatory environment. *Journal of Inflammation Research* vol. 9, p. 231-240. [https://doi.org/10.2147/JIR.S121994]
- ZAGANJOR, I., SEKKARIE, A., TSANG, B.L., *et al.* (2016) Describing the Prevalence of Neural Tube Defects Worldwide: A Systematic Literature Review. *PLoS One* vol. 11, n° 4, p. e0151586. [https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151586]
- ZERAH, M., KULKARNI, A.V. (2013) Spinal cord malformations. *Handbook of Clinical Neurology* vol. 112, p. 975-991. [https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52910-7.00018-0]

- ZHANG, L., WANG, L., CHEN, W., *et al.* (2017) Neural differentiation of human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells improves the recovery of neurological function after transplantation in ischemic stroke rats. *Neural Regeneration Research* vol. 12, n° 7, p. 1103-1110. [<https://doi.org/10.4103/1673-5374.211189>]
- ZHANG, L., YANG, J., TIAN, Y.-M., *et al.* (2015) Beneficial Effects of Hypoxic Preconditioning on Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells. *The Chinese Journal of Physiology* vol. 58, n° 5, p. 343-353. [<https://doi.org/10.4077/CJP.2015.BAE369>]
- ZHAO, S., TAO, L., TIAN, Y., *et al.* (2019) Isolation and characterization of ovine umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Cytotechnology* vol. 71, n° 1, p. 277-286. [<https://doi.org/10.1007/s10616-018-0284-7>]

# Annexe : Définition de différentes anomalies congénitales affectant la moelle épinière

---

Les définitions suivantes sont issues des articles utilisés pour le Tableau 1 (Rossi *et al.*, 2004 ; Gupta *et al.*, 2013 ; McComb, 2015).

**Diastématomyélie** : Division de la moelle épinière dans un plan sagittal, souvent accompagnée de la présence d'une lame osseuse séparant les deux hémimoelles.

**Diplomyélie** : Duplication de la moelle épinière en deux moelles épinières identiques.

**Dysgénésie spinale segmentaire** : Dysgénésie ou agénésie segmentaire (souvent thoracolumbaire ou lombaire) de la moelle épinière et des vertèbres.

**Kystes neurentériques** : Kyste intra-dural, souvent en position ventrale par rapport à la moelle épinière et dont l'épithélium peut être de nature différente (par exemple, tissu pulmonaire, pancréatique, entérique...).

**Lipome du *filum terminal*** : Lipome présent au niveau du *filum terminal* suite à une anomalie survenue au cours de la neurulation secondaire.

**Lipome intraspinal ou intradural** : Présence d'un lipome dans la moelle épinière ou dans l'espace sous-dural.

**Méningocèle** : Dilatation des méninges en regard d'un *spina bifida* par accumulation de LCS formant une poche herniée, la moelle épinière restant dans le canal vertébral.

**Myélocèle** : Exposition de la moelle épinière en regard d'un *spina bifida*.

**Hémimyélocèle** : Exposition d'un côté (droit ou gauche) de la moelle épinière en regard d'un *spina bifida*.

**Lipomyélocèle** : Exposition de la moelle épinière recouverte de tissu adipeux en regard d'un *spina bifida*.

**Myélocystocèle terminal** : Présence d'un large méningocèle en région sacrée associé à une dilatation marquée du canal central de la moelle épinière en regard de la lésion.

**Myéломéningocèle** : Dilatation des méninges en regard d'un *spina bifida* par accumulation de LCS formant une poche herniée dans laquelle vient se loger la moelle épinière.

**Hémimyéломéningocèle** : Myéломéningocèle n'affectant qu'un côté de la moelle épinière (droit ou gauche).

**Lipomyéломéningocèle** : Dilatation des méninges en regard d'un *spina bifida* par accumulation de LCS formant une poche herniée dans laquelle vient se loger la moelle épinière et du tissu adipeux.

**Persistence du ventricule terminal** : Persistence d'une dilatation discrète à modérée du canal central de la moelle épinière en région caudale.

**Sinus dermique** : Fistule permettant la communication entre la surface de la peau et les méninges du système nerveux central.

**Syndrome de régression caudale** : Ensemble de malformations associant agénésie des vertèbres sacrées et coccygiennes, membres pelviens raccourcis et anomalies génito-urinaires, gastro-intestinales et cardio-vasculaires.

# ÉTUDE DU BÉNÉFICE D'UN PATCH DE CELLULES STROMALES MÉSENCHYMATEUSES POUR LE TRAITEMENT ANTÉNATAL DE LA MYÉLOMÉNINGOCÈLE DANS LE MODÈLE OVIN

---

**AUTEUR : Coralie DEHAN**

## **RÉSUMÉ :**

La myéloméningocèle est une malformation nerveuse congénitale répandue chez l'enfant. Le traitement actuel repose sur une fermeture chirurgicale anténatale. Cependant, les risques, inévitables à la chirurgie, pour la mère et le fœtus restent trop importants au regard des bénéfices fonctionnels apportés. Une thérapie adjuvante semble donc nécessaire. Les cellules stromales mésenchymateuses font l'objet de nombreuses recherches et leurs propriétés immunomodulatrices et neuroprotectrices semblent prometteuses dans ce cadre.

L'objectif de ce travail était d'étudier les bénéfices apportés par une thérapie cellulaire utilisant des cellules stromales mésenchymateuses de cordons ombilicaux (CSM-CO), adjuvante à la chirurgie anténatale de réparation de la lésion. Les effets d'une telle thérapie sur diverses fonctions, en particulier la fonction locomotrice, ont été évalués.

Cet essai préclinique randomisé en simple aveugle a consisté à créer une lésion mimant la myéloméningocèle humaine chez des fœtus ovins puis à réparer cette lésion quatorze jours plus tard grâce à un patch contenant des CSM-CO ou n'en contenant pas. Un jour après la naissance, les fonctions locomotrices et neurologiques des agneaux étaient évaluées avant que des prélèvements pour histologie ne soient réalisés.

Du fait du faible effectif de l'étude, les résultats présentés ci-après ne pourront être interprétés que comme des tendances nécessitant des études de plus grande ampleur. Dans le groupe d'agneaux traités avec un patch de CSM-CO versus les agneaux traités avec un patch acellulaire, le score de locomotion à 24 heures ainsi que son évolution depuis la naissance et la continence urinaire étaient meilleurs. La fibrose lésionnelle (entre le derme et la moelle épinière et péri-spinale) était réduite et la densité neuronale au sein de la moelle lésée ainsi que l'épaisseur du sphincter urétral interne étaient plus élevées.

Cette étude, la première à évaluer les effets d'un patch de CSM-CO après 24 heures de vie des agneaux dans le modèle ovin de myéloméningocèle, a permis de mettre en évidence une tendance à l'amélioration de la fonction de locomotion et de la continence urinaire dans le modèle ovin de myéloméningocèle, déficits majeurs rencontrés au sein du phénotype humain. Des recherches incluant un plus grand nombre d'individus et une évaluation sur le moyen terme seront nécessaires afin de justifier de l'intérêt d'une application chez l'humain.

**MOTS CLÉS :** MYÉLOMÉNINGOCÈLE, MODÈLE OVIN, MALFORMATION CONGÉNITALE, DYSRAPHISME SPINAL, THÉRAPIE CELLULAIRE, CELLULES STROMALES MÉSENCHYMATEUSES, CHIRURGIE FŒTALE

## **JURY :**

Président : Pr Stéphane Blot

Directeur de thèse : Dr Vincent Mauffré

Examinatrice : Pr Fanny Pilot-Storck

Invitée : Dr Lucie Guilbaud

# STUDY OF MESENCHYMAL STROMAL CELL PATCH BENEFIT IN THE PRENATAL TREATMENT OF MYELOMENINGOCELE IN THE OVINE MODEL

---

**AUTHOR:** Coralie DEHAN

## **SUMMARY:**

Myelomeningocele is a common congenital spinal cord malformation in children. Current treatment is based on antenatal surgical closure. However, risks inherent to the surgery remain too important for the mother and the fetus compared to the functional benefits provided. Therefore, an adjuvant therapy seems necessary. Mesenchymal stromal cells are the subject of numerous studies and their immunomodulatory and neuroprotective properties seem promising in this context.

The objective of this work was to study the benefit provided by cell therapy using umbilical cord mesenchymal stromal cells (UC-MSc), in addition to antenatal surgery. The effects of such therapy on various functions, particularly locomotor function, were evaluated.

This randomized single-blind preclinical trial consisted in creating a lesion mimicking human myelomeningocele in ovine fetuses and then repairing the lesion fourteen days later using a patch containing or not UC-MSc. One day after birth, the locomotor and neurological functions of the lambs were assessed and samples for histology were obtained.

Due to the small size of the study, the results presented below can only be interpreted as trends requiring larger studies. In the group of lambs treated with the UC-MSc patch versus the lambs treated with an acellular patch, the locomotion score at 24 hours as well as its evolution since birth, and urinary continence were better. The lesion's fibrosis (between the dermis and the spinal cord and around the spinal cord) was reduced and the neuronal density within the injured cord as well as the thickness of the internal urethral sphincter were higher.

This study, the first to evaluate the effects of a patch of UC-MSc after 24 hours of lamb's life in the ovine model of myelomeningocele, highlighted a trend towards an improvement in locomotion and urinary continence in the ovine model, major deficits faced in the human phenotype. Studies including a larger number of lambs and a medium-term evaluation will be necessary in order to justify the interest of the application in humans.

**KEYWORDS:** MYELOMENINGOCELE, OVINE MODEL, CONGENITAL MALFORMATION, SPINAL DYSRAPHISM, CELL THERAPY, MESENCHYMAL STROMAL CELL, FETAL SURGERY

## **JURY:**

Chairperson: Pr Stéphane Blot  
Thesis Director: Dr Vincent Mauffré  
Reviewer: Pr Fanny Pilot-Storck  
Guest: Dr Lucie Guilbaud