

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	1
INTRODUCTION	5
MATERIEL ET METHODES	9
I. Matériel	9
II. Méthodes	9
II.1. Objectif du travail	9
II.2. Modalités de recherche	9
II.3. Critères d'inclusion des articles	9
RESULTATS	11
I. L'instrumentation chronique fœtale, utilisée dans tous les domaines de recherche	11
II. Etudes pharmacologiques, exposition du fœtus aux toxiques	13
II.1. Substances addictives	13
II.1.a. Modèles d'alcoolisme gestationnel	13
II.1.b. Modèles d'intoxication à la cocaïne et ses dérivés pendant la gestation	16
II.2. Etude de la foetotoxicité/teratogénicité de modèles thérapeutiques	18
II.2.a. Pharmacologie de la barrière placentaire	18
II.3. Les Polluants environnementaux	19
III. Modèles en anesthésiologie : effets des molécules et protocoles d'anesthésie	21
III.1. Impact des molécules anesthésiques sur la physiologie fœtale	21
III.2. Etude de l'anesthésie générale de la mère sur le fœtus	23
III.2.a. Molécules volatiles	23
III.2.a.i. Halothane	23
III.2.a.ii. Isoflurane et Sevoflurane	23
III.2.b. Molécules injectables	24
IV. Imagerie médicale. Acquisition d'images et nouvelles techniques d'imagerie	27
IV.1. Etudes de faisabilité	27
IV.2. Acquisition d'images et de mesures	27
IV.2.a. En échographie	27
IV.2.b. En IRM conventionnelle	28
IV.3. Développement des méthodes d'IRM fonctionnelle	31
V. Oto-rhino-laryngologie. Appareil auditif et modèles de chirurgie maxillo-faciale	33
V.1. Chirurgie maxillo-faciale et reconstructrice	33
V.1.a. Modèles de cicatrisation cutanée/réparation de défauts cutanés	33

V.1.a.i. Etude de la cicatrisation fœtale.....	34
V.1.a.ii. Modèles de reconstructions cutanées en cas de défauts cutanés.....	34
V.1.b. Utilisation d'annexes fœtales comme adjuvants à la cicatrisation	35
V.1.c. Réparation chirurgicale des malformations maxillo-faciales congénitales.....	36
V.2. Appareil auditif	36
VI. Endocrinologie	39
VI.1. Programmation de maladies de l'adulte en agissant sur l'environnement fœtal	39
VI.2. Effets de de l'utilisation thérapeutique des corticoïdes sur le fœtus.....	39
VII. Maladies infectieuses.....	41
VII.1. Maturation pulmonaire induite par endotoxémie.....	41
VII.2. La chorioamnionite, responsable d'affections chroniques néo-natales.....	42
VII.3. Réponses immunitaires fœtales à la naissance	43
VII.4. Effets des endotoxines sur les autres organes.....	43
VIII. Nutrition	47
VIII.1. Effets sur la fonction cardiovasculaire	49
VIII.2. Effets sur le métabolisme	50
VIII.3. Effets sur l'axe endocrinien	51
IX. Appareil Cardiovasculaire. Modèles d'anomalies de l'appareil circulatoire	53
IX.1. Modèles d'hypoxie fœtale : occlusions de cordon.....	53
IX.1.a. Occlusion par ligature simple.....	53
IX.1.b. Occlusion chroniques par implantation d'un brassard	54
IX.1.c. Occlusions par électrocoagulation.....	55
IX.2. Traitement de la sténose valvulaire	55
IX.3. Modèle de tachyarythmie supraventriculaire fœtale	56
IX.4. Création de fistules artério-veineuses	56
IX.5. Modèle chirurgical d'hypertension pulmonaire	57
IX.6. Etude des baroréflexes	58
IX.7. Modèles d'anémie chronique du fœtus	58
IX.8. Circulation extracorporelle fœtale	59
IX.9. Implantation de valves cardiaques <i>in utero</i>	59
IX.10. Techniques de mesure du débit cardiaque	60
X. Thérapies cellulaires	61
X.1. Le modèle brebis pour les thérapies cellulaires.....	62
X.1.a.Fœtus sain	63

X.1.a.i. Cellules souches d'origine adulte.....	63
X.1.a. ii. Cellules souches d'origine fœtale.....	65
X.1.a.iii. Cellules souches du sang de cordon.....	66
X.1.b Modèle lésionnel fœtal	67
X.1.b.i. Potentiel réparateur des cellules souches.....	67
X.1.b.ii. Reconstruction trachéale.....	67
XI. Pneumologie. Modèles d'affections de l'appareil respiratoire	71
XI.1. Modèles de hernies diaphragmatiques	71
XI.1.a. Construction du modèle et techniques de réparation des hernies créées	71
XI.1.b. Syndrome de Détresse Respiratoire Aigüe et hernies diaphragmatiques	73
XI.2. Modèles d'obstruction trachéale	74
XII. Cancérologie. Modèles de thérapies en cancérologie.....	77
XIII. Neurologie	79
XIV. Uro-néphrologie. Modèles de pathologies de l'appareil urinaire.....	83
XIV.1. Modèles d'obstruction urinaire	83
XIV.2. Profils urodynamiques	83
XV. Gastro-entérologie. Modèles d'anomalies de l'appareil digestif.....	85
XVI. Reproduction.....	87
XVI.1. Techniques de retard de croissance intra-utérin	87
XVI.1.a. Caronculectomie	87
XVI.1.b. Hyperthermie maternelle.....	88
XVI.1.c. Ligature d'une artère ombilicale.....	88
XVI.1.d. Embolisation placentaire	88
XVII. Autre : fœtoscopie	89
XVII.1. Mise au point de la technique de fœtoscopie.....	89
XVII.2. Création de modèles par fœtoscopie.....	91
XVII.2.1. Obstruction de l'appareil urinaire	91
XVII.2.2. Laparoscopia	92
DISCUSSION	95
CONCLUSION.....	103
BIBLIOGRAPHIE.....	115

INTRODUCTION

La recherche fœtale est définie par l'ensemble des protocoles de recherche dont les sujets d'études sont des fœtus vivants *in utero* ou *ex utero*. Elle est à distinguer de la recherche sur tissus fœtaux, qui elle est focalisée sur l'utilisation de cellules ou de tissus provenant de fœtus morts obtenus par avortement spontané ou induit. La recherche fœtale implique l'utilisation de méthodes invasives ainsi que de méthodes non invasives. Elle a contribué à de nombreuses avancées de la médecine, dans les domaines du diagnostic prénatal (amniocentèse, échographies, détections d'anomalies génétiques et métaboliques fœtales etc.), du développement de vaccins, de techniques d'anesthésie et de chirurgie obstétrique. Cependant, la recherche fœtale de par sa nature soulève des débats éthiques, moraux et législatifs, surtout lorsqu'elle est appliquée à l'homme ou à des tissus et cellules d'origine humaine.

La recherche sur tissus fœtaux a donné une des plus grandes avancées de la médecine dans les années 1950 avec le développement du vaccin antipoliomyélitique. Ce premier vaccin a été testé à grande échelle aux Etats-Unis par le médecin américain Jonas Salk en 1953. A cette époque, la culture de virus *in-vitro* en était à ses balbutiements. D'après EGGERS [41], c'est en 1949 qu'ENDERDS *et al.* obtiennent une répllication massive du virus de Lansing (poliovirus de type 2) dans des cellules embryonnaires humaines. ENDERS *et al.* avaient ainsi grâce à la recherche sur tissus fœtaux ouvert la voie de la recherche sur le virus de la poliomyélite en rendant possible la production massive de virus destiné à des études thérapeutiques, virologiques et prophylactiques.

La recherche sur tissus fœtaux soulève autant de débats éthiques moraux et législatifs que la recherche fœtale, mais le législateur s'est historiquement penché plus précocement sur la recherche fœtale que sur la recherche sur tissus fœtaux car les techniques de transplantation de tissus fœtaux sont plus récentes.

La première transplantation de tissus fœtaux a eu lieu en 1982, lorsque des médecins Suédois ont transplanté des cellules de cerveau fœtal à un patient souffrant de la maladie de Parkinson. Depuis lors, la législation s'oriente plus vers la régulation de l'utilisation des tissus fœtaux, et particulièrement dans le cas de la transplantation de tissus fœtaux.

Aux états Unis, les premières traces d'une législation encadrant spécifiquement la recherche fœtale datent des années 1970. Ces lois sont apparues en même temps que les lois sur les essais cliniques suite à la révélation du scandale de la *Tuskegee Syphilis Study*. Entre 1932 et 1972, à

Tuskegee dans l'Alabama, le service de santé publique des Etats-Unis a étudié la progression naturelle de la syphilis dans une population d'environ 600 hommes noirs de milieux ruraux défavorisés en faisant croire aux sujets de l'étude qu'ils recevaient un traitement, même après la découverte de celui-ci (pénicillines) dans les années 1940. La révélation de ce scandale dans la presse en 1972 a conduit à son arrêt. Cette affaire a révolutionné le cadre législatif des études cliniques chez l'adulte puis des stades plus précoces du développement humain en donnant naissance au *National Research Act* aux Etats-Unis. Le *National Research Act* est l'action du 93^{ème} Congrès américain de création d'une commission pour la protection des sujets humains dans la recherche biomédicale et comportementale. Cette commission est le premier organisme de bioéthique ayant vu le jour aux Etats-Unis, et comporte des textes sur la recherche sur les fœtus, les prisonniers, les enfants, les handicapés mentaux, et les adultes ainsi que des recommandations éthiques pour conduire les études.

Après la Seconde guerre mondiale en Europe, le Code de Nuremberg a repris les critères d'encadrement des études menées chez l'homme considérés comme acceptables à l'époque. Même si le code de Nuremberg n'a eu que peu d'effets directs sur les pratiques d'expérimentation avant les années 1970, les législations internationales n'ont cessé de consolider ces principes depuis. Les législations concernant l'encadrement des essais cliniques dans le monde datent donc seulement des années 1970. En France, c'est la loi du 20 décembre 1988 qui a posé les fondements de la réglementation de la recherche humaine.

Aux questionnements sur la recherche fœtale se mêlent les considérations éthiques liées à l'avortement, puisque la source de matériaux de recherche provient d'avortons. Les réponses à ces questionnements varient d'un pays à l'autre et sont souvent encore non résolues.

La recherche sur modèles animaux fœtaux s'inscrit donc dans ce contexte comme nécessaire et incontournable avant tout essai chez l'homme, pour tester la sécurité et l'efficacité des nouveaux procédés avant le passage chez l'animal.

L'expérimentation animale fœtale quant à elle soulève des questions éthiques et morales inhérentes à la pratique de l'expérimentation *in vivo* elle-même, et non spécifiquement à l'utilisation des fœtus animaux en recherche.

La recherche sur modèles animaux, qu'elle soit ou non dans le domaine de la recherche fœtale est beaucoup plus ancienne. En Grèce, les précurseurs de l'étude de l'anatomie et de la physiologie sont Aristote et Hippocrate. Galien, s'inspirant de ces principes à recours à des animaux pour ses démonstrations de physiologie et d'anatomie. Au XVII^{ème} siècle, les premières bases d'une méthode expérimentale de laboratoire sont jetées avec l'utilisation de grenouilles, crapauds,

poulets et vers plats notamment. Deux écoles s'opposent alors : ceux qui comme Cuvier vont privilégier les études en laboratoire, et ceux qui défendent l'observation des animaux dans leur milieu Naturel. Jean Henri Fabre écrira dans ses souvenirs entomologiques « Vous éventrez la bête, et moi je l'étudie vivant, vous travaillez dans un laboratoire de torture et de dissection, j'observe sous le ciel bleu, vous scrutez la mort, j'observe la vie ». Au début du XXème siècle, les premiers modèles d'études spécifiques par espèce font leur apparition. La notion de souffrance animale, dans les civilisations judéo-chrétiennes a été prise en compte tardivement. L'idée que toute souffrance animale inutile devrait être évitée est associée à la notion de bien-être animal qui est apparue au XIXème siècle en Angleterre. Les Britanniques sont en effet les précurseurs en Europe de la notion de droit des animaux, avec la création de la RSPCA (*Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals*) suite à la loi du député Richard Martin en 1822 protégeant les bovins, ovins et équins contre la cruauté humaine. Au XIXème siècle en France, le débat sur le bien-être animal est porté par les groupes tels que la Ligue antivivisectionniste française. De nos jours, le bien-être animal fait partie intégrante de la mise au point des études et pratiques de laboratoire et l'amélioration de la condition animale dégradée par l'utilisation des animaux par un être humain est obligatoire.

L'expérimentation animale pose des problèmes éthiques et moraux propres à cette pratique. Les législations actuellement en vigueur à travers le monde tendent à trouver un équilibre entre l'idée d'une supériorité morale de l'homme favorisant la recherche sur animal, uniquement dans certains domaines bien définis, plutôt que sur des modèles humains, tout en limitant le nombre d'animaux utilisés et les souffrances infligées. La règle des trois « R », formulée dans les années 1950 William Russel et Rex Burch est toujours d'actualité. Les trois R sont les principes de Réduction (utiliser le nombre minimal d'animaux et tendre à réduire ce nombre), Remplacement (utiliser un autre modèle que l'animal à chaque fois que cela est possible) et Refinement (utiliser les moyens les plus modernes pour diminuer la souffrance animale).

Dans ce travail, nous avons choisi de nous intéresser à l'utilisation du fœtus de brebis en tant que modèle expérimental. La brebis est un modèle pertinent dans de nombreux domaines de recherche. La brebis a une gestation longue, ce qui permet de modéliser les différents trimestres de grossesse chez l'homme et rend la pratique chirurgicale plus aisée car la taille des fœtus est suffisante. Les fœtus de brebis tolèrent bien l'instrumentation chronique, ce qui permet l'obtention de paramètres physiologiques tout au long de l'expérience. La brebis est une espèce dans laquelle le taux de gestation gémellaire est élevé, ce qui autorise la présence d'un sujet témoin dont les conditions expérimentales sont très proches du sujet traité, et ce avec des fœtus de taille raisonnable. La placentation de la brebis est proche de celle de l'homme : chaque caroncule mime

presque la placentation hémochoriale de l'homme. Enfin, les stades de développement anté et postnataux de la brebis sont similaires aux stades de développement humain, notamment pour le système nerveux. A ces avantages s'ajoutent le fait que la brebis est un modèle relativement peu coûteux par rapport à d'autres modèles gros animaux tels les primates et dont l'élevage est facile et le risque zoonotique faible.

L'objectif de ce travail a donc été de présenter les modèles expérimentaux d'utilisation du fœtus de brebis décrits dans la littérature, dans tous les domaines de la médecine. Ce travail s'inscrit dans le cadre des travaux du laboratoire de recherche IMM Recherche, Institut Mutualiste Montsouris, Paris, France. IMM recherche est un laboratoire spécialisé dans la recherche préclinique sur gros animal. IMM Recherche possède un savoir-faire reconnu en recherche expérimentale, très axée sur la chirurgie, les dispositifs médicaux et le training chirurgical. IMM recherche possède une expérience longue et un savoir-faire important sur les modèles de chirurgie fœtale. L'expertise du laboratoire dans ce domaine se fonde sur des dizaines de protocoles expérimentaux réalisés sur le fœtus de brebis. Cette expertise est peu courante dans le domaine et les laboratoires dans le monde capables de mener des protocoles de recherche en chirurgie fœtale sont peu nombreux car les modèles *in utero* sur les gros animaux nécessitent une infrastructure lourde, une logistique adaptée et un personnel très qualifié en chirurgie. IMM Recherche a la volonté permanente de développer de nouveaux modèles animaux pour la recherche expérimentale dans toutes les spécialités chirurgicales et plus particulièrement en chirurgie fœtale. La genèse de cette thèse s'inscrit dans cette dynamique. Cette étude bibliographique a pour objectif de faire le point sur les modèles expérimentaux utilisant le fœtus de brebis afin de permettre à IMM Recherche de développer certains de ces modèles, de les raffiner et de les utiliser.

Nous nous attacherons donc dans une première partie à décrire notre méthode de travail, puis nous décrirons les modèles existant dans la littérature, et enfin nous discuterons de la pertinence et des indications d'utilisation du modèle ovin, des aspects législatifs et éthiques entourant la question de la recherche fœtale, notamment en parallèle avec la législation sur l'avortement. Enfin, nous concluons sur les perspectives offertes par ce travail à IMM Recherche.

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel

L'ordinateur utilisé pour ce travail est un Samsung RVS511. La rédaction du manuscrit est faite sur Microsoft Word 2010, et un logiciel d'aide à la rédaction de la bibliographie a été employé : Endnotes X4, Thomson Reuters, 2010. Les références ont été classées dans un tableur via le logiciel Microsoft Excel 2010.

II. Méthodes

II.1. Objectif du travail

Cette étude bibliographique a pour but de recenser les articles scientifiques originaux décrivant la création chez la brebis d'un modèle expérimental fœtal. Nous nous attacherons à décrire tous les modèles fœtaux originaux existants chez la brebis. Les résultats de recherche obtenus grâce à un même modèle ne seront pas présentés.

II.2. Modalités de recherche

Les recherches ont débuté le 1^{er} Mars 2011 et ont été mises à jour jusqu'à Mars 2012. Toutes les bases de données accessibles par *Web of Knowledge*, notamment MEDLINE, *Web of Science*, *Current Contents Connect* et *Journal Citation Reports* ont été utilisées. Internet a aussi été utilisé pour les recherches via le moteur de recherche de Google. Aucune restriction de langue n'a été appliquée à la recherche.

II.3. Critères d'inclusion des articles

Les critères d'inclusion des études sont représentés dans le tableau 1. Ces critères ont d'abord été appliqués aux abstracts. Puis, lorsque la lecture de l'abstract ne permettait pas de conclure quant à l'inclusion de la publication, la publication en entier était examinée avec les mêmes critères. Ces critères ont été étudiés pour garder le maximum de références pertinentes. Les publications retenues ont ensuite été lues dans leur intégralité.

Tableau 1. Critères d'inclusion des publications dans l'étude.

Critère	D'inclusion	D'exclusion
Type et contenu de la publication	<p>Articles originaux</p> <p>Etudes expérimentales sur l'animal</p> <p>Description du modèle présente dans l'article</p>	<p>Revue, éditoriaux ou abstracts de conférences/congrès (difficulté à évaluer la méthodologie et la rigueur des études menées). Dans le cas des revues, la bibliographie se rapportant au sujet était scrutée et les articles répondant aux critères de sélection inclus dans l'étude.</p> <p>Etudes cliniques</p> <p>Absence de description du modèle. Article faisant référence à un modèle préétabli (les articles souches contenant la description du modèle princeps utilisés ont été recherchés et inclus).</p>
Sujet d'étude	<p>Modèle animal :</p> <p>Espèce : ovin</p> <p>Race : toutes</p> <p>Age : stade fœtal</p> <p>Sexe : mâle et femelle</p>	<p>Toute autre espèce.</p> <p>Etude dans la même espèce mais au stade adulte ou juvénile.</p>
Domaine d'étude	Tous les domaines ont été inclus	
Mots clés utilisés	Première recherche : « fetal sheep model » puis recherches affinées par thèmes pour chaque thématique de recherche	
Langue	<p>Français</p> <p>Anglais</p>	

La liste des publications retenues dans l'étude est consultable dans la bibliographie.

RESULTATS

Les résultats sont présentés sous deux formes. Une base de données à entrées multiples sous Excel, un tableau (Annexe 3) et une description narrative ci-après. La base de données Excel permet de classer et rechercher les données de la bibliographie par organe étudié, par type de recherche menée, par date, par résultats etc.

I. L'instrumentation chronique fœtale, utilisée dans tous les domaines de recherche

Pour toute étude expérimentale, quel que soit le domaine d'application, des données physiologiques doivent être recueillies. Une instrumentation chronique du fœtus est souvent nécessaire et le monitoring du fœtus est primordial. Les premiers modèles de mise au point de techniques d'instrumentation chronique du fœtus seront présentés dans ce paragraphe. Les méthodes d'instrumentation chronique actuelles sont résumées dans l'Annexe 1.

SATO *et al.* [130] ont décrit une méthode d'instrumentation chronique du fœtus qui est toujours utilisée de nos jours, pour des études de physiologie fondamentale comme pour d'autres études. Vingt-neuf brebis ont été instrumentalisées. Les auteurs ont décrit la cannulation de la trachée, des veines jugulaires et de l'artère carotide, et la pose d'ECG *in utero* chez des fœtus âgés de 96 à 133 jours de gestation. Leur instrumentation permettait de mesurer la pression artérielle fœtale, la fréquence cardiaque fœtale, la pression intra trachéale, et la pression intra-utérine. Ils instrumentaient la mère pour obtenir sa pression artérielle moyenne, et enregistraient sa prise alimentaire et les quantités éliminées. Les fœtus de leur étude ont survécu jusqu'à 800 heures post chirurgie, et neuf fœtus laissés à terme sont nés par voies naturelles.

L'instrumentation chronique du fœtus nécessite deux temps opératoires pour être utilisée lors d'une étude. Le premier temps consiste à instrumenter et le second temps consiste à réaliser l'expérimentation elle-même après la phase de récupération. SATO *et al.* ont montré que même si les paramètres physiologiques de la mère revenaient à la normale au plus tard 24 heures avant la chirurgie, les mères ne reprenaient une alimentation normale qu'après 5 jours post-opération. Les auteurs ont donc conclu qu'il était préférable d'attendre cinq jours avant de procéder à des expériences avec ce modèle pour que les brebis aient un comportement et une alimentation normale avant d'entrer dans le protocole expérimental.

II. Etudes pharmacologiques, exposition du fœtus aux toxiques

La création de modèles expérimentaux dans ce domaine passe par des techniques d'exposition des fœtus à des toxiques d'origine variées. Les voies d'administration des toxiques visent à mimer les voies d'exposition du fœtus humain à ces mêmes polluants quand cela est possible. Les trois stades de gestation sont étudiés et les doses de toxiques injectées varient d'un modèle à l'autre en fonction de la pathologie modélisée. Le fœtus de brebis a été employé pour évaluer les effets sur le fœtus de substances toxiques ou médicamenteuses administrées à la mère pendant la gestation. Les substances qui ont été testées sont de plusieurs types : les substances stupéfiantes (éthanol, cocaïne), les glucocorticoïdes, les anti-inflammatoires (nifédipine), les antidépresseurs (fluoxétine), les androgènes, les antiacides (cisapride), les antiparasitaires (moxidectine) et les polluants environnementaux. Les études pharmacologiques peuvent donc être classées en trois grandes catégories selon leur objectif : étudier l'impact de substances addictives de la mère sur son enfant, ou bien faire une étude de foetotoxicité/tératologie en vue d'une utilisation thérapeutique d'une molécule ou encore faire une étude d'une exposition du fœtus à des polluants environnementaux. En ce qui concerne les substances addictives, les études les plus nombreuses ont porté sur l'éthanol, pour modéliser l'alcoolisme gestationnel maternel.

II.1. Substances addictives

II.1.a. Modèles d'alcoolisme gestationnel

Les études ont évalué l'effet de l'alcool sur le système nerveux et la croissance osseuse. Le modèle fœtal ovin n'est pas le seul à avoir été utilisé pour ces études. CUDD [27] a recensé tous les modèles animaux d'études d'exposition du fœtus à l'éthanol. Les rongeurs ont été les plus utilisés, notamment le rat.

Les avantages du modèle rat sont un entretien facile en laboratoire, un coût faible, un élevage facile, une gestation courte et un haut potentiel de manipulations génétiques. De plus, ce modèle bénéficie dans la littérature d'un foisonnement de descriptions anatomiques, physiologiques, pharmacologiques, comportementales et d'informations sur la reproduction et la tératologie. Les critères d'évaluation à utiliser lors des études sont donc déjà établis et acceptés par la communauté scientifique et la comparaison des résultats entre deux études devient ainsi plus aisée.

Cependant, le développement fœtal du rat est très distinct de celui du fœtus humain. Par exemple, la période de plus forte croissance du cervelet a lieu après la naissance chez le rat,

contrairement à l'homme. D'après CUDD [27], les études visant à étudier le développement du cervelet faites chez le rat ont donc été menées après la naissance, au moment où le cervelet est dans sa phase de développement maximal. Ceci constitue un biais d'expérimentation car les conditions dans lesquelles sont effectuées les expériences ne reconstituent pas un environnement similaire à celui observé chez l'espèce modélisée (l'homme). En effet, ces expériences impliqueraient que l'expérimentateur parte du principe que les conditions anténatales, telles la parturition, l'environnement placentaire et la mère ne jouent aucun rôle sur l'effet de l'alcool sur l'encéphale en développement.

L'autre modèle rongeur fréquemment utilisé est la souris, qui a des avantages et inconvénients similaires à ceux du rat. Les avantages du modèle murin pour étudier les effets de l'alcool sur le fœtus sont la grande disponibilité de lignées génétiquement modifiées et le développement de dysmorphologies faciales consécutives à l'intoxication fœtale à l'alcool. Peu d'espèces développent les dysmorphologies faciales que l'on rencontre chez l'homme en cas d'alcoolisme gestationnel.

Le cochon d'inde, qui a une période de gestation bien plus longue (environ 68 jours chez le cochon d'inde contre 21 jours chez la souris et le rat) a aussi été cité dans l'étude de CUDD [27]. Il est possible grâce à ce modèle de viser des périodes particulières du développement. La période de croissance rapide de l'encéphale a lieu avant la naissance chez ce modèle. Les études entreprises sur des cochons d'inde ont montré des résultats similaires à ceux observés en clinique chez l'homme (diminution du poids vif et du poids de l'encéphale à la naissance, hyperactivité, déficits dans le cortex cérébral, l'hippocampe et le cervelet).

Quelques études ont été faites sur des modèles non mammifères tels le poussin, le poisson zèbre (*Brachydanio reiro*), le vers rond (*Caenorhabditis elegans*) et la mouche (*Drosophila melanogaster*). Le poussin est une espèce chez qui les études de dysmorphologie faciale sont possibles, et qui s'affranchit des facteurs placentaires puisque c'est une espèce ovipare. Les autres modèles non mammifères permettent surtout les études de questions simples de développement et de génétique. Cependant, chez ces espèces, il faut des doses d'éthanol proportionnellement plus élevées que chez les autres modèles. Il est donc possible que les mécanismes de création de lésions ne soient pas identiques à ceux de l'homme ; dans ce cas, il faut in fine revalider les résultats chez des espèces modélisant mieux la physiologie humaine.

Les modèles gros animaux ont été développés dans ce but. Les primates non humains, le porc et la brebis ont fait l'objet d'études. Les primates non humains ont l'avantage d'être des modèles très proches de l'homme en tératologie. Il existe en plus de nombreuses études de comportement chez cette espèce, utiles pour évaluer les effets de l'alcool sur les nouveaux nés. Par

contre, il est très difficile de faire des études nécessitant une instrumentation chronique de ces animaux. La mortalité fœtale dans ce type d'études est importante. De plus, ce modèle est très coûteux, accompagné de risques de morsures et de transmission de maladies zoonotiques et son utilisation est de plus en plus restreinte pour des raisons éthiques.

Les porcs ont fait l'objet de moins d'études comportementales que les primates même si cette espèce est aussi connue pour avoir des capacités cognitives supérieures. Ainsi, le manque relatif de données dans la littérature rend plus difficile l'utilisation de ce modèle pour l'évaluation des effets de l'alcoolisme maternel sur le comportement du jeune. De plus, il est délicat d'instrumentaliser les fœtus pour des études chroniques car les portées sont de taille importante, donc les fœtus plus petits et moins accessibles. Cependant, cette espèce reste un bon modèle en raison de sa prise volontaire d'alcool par voie orale et son profil de croissance encéphalique similaire à celui de l'homme.

La brebis a été l'espèce la plus utilisée depuis 50 ans en recherche fœtale sur gros animal pour l'exposition à l'éthanol. En effet, c'est un modèle robuste, dont le fœtus supporte bien l'instrumentation chronique et dont la gestation est longue et proche de celle de l'homme. Par ailleurs, les lésions et les déficiences cognitives et comportementales observées chez le fœtus de brebis reproduisent bien les troubles observés chez l'homme.

En conclusion, par cette étude, CUDD [27] a démontré la pertinence du modèle fœtal ovin dans le cadre de la recherche en tératologie pour modéliser les effets de l'alcool chez les fœtus. Il a aussi mis en avant la notion de complémentarité des modèles en indiquant quelques caractéristiques spécifiques à certains modèles.

Chez la brebis, les études ont porté sur les effets de l'alcool sur la croissance osseuse [124], le développement cérébral [125, 150, 158], le métabolisme, la perfusion et l'activité cérébrale, la distribution de l'alcool dans l'organisme maternel et fœtal, l'activité des neurotransmetteurs encéphaliques, et l'impact sur les axes l'axe adrénno-hypophysaire et thyroïdo-hypophysaire.

Toutes les études ont suivi les mêmes schémas d'administration d'éthanol. Il y a deux méthodes d'intoxication à l'éthanol qui ont été employées. L'intérêt de ces deux schémas a été de modéliser deux comportements liés à la consommation d'alcool pendant la grossesse chez la femme : l'intoxication massive aiguë et l'intoxication chronique à l'éthanol. L'alcoolisation chronique a été modélisée par des infusions intraveineuses d'éthanol durant une heure à 0.75g/kg de poids vif de la mère, en cycles de 3 jours d'affilée, suivis de 4 jours sans alcool. L'alcoolisation massive a été modélisée par des infusions de 1.5-1.75g/kg de poids vif, 5 jours par semaine pendant au minimum 3 à 4 semaines. Lorsque le but de l'étude était de connaître les effets de l'alcool à chaque stade de la gestation, les premières administrations commençaient à partir du quatrième jour

de gestation. Les injections débutent autour du 133^{ème} jour de gestation lorsque l'objectif est de modéliser les effets de l'alcool au troisième trimestre de gestation chez la mère.

RAMADOSS *et al.* [124] ont étudié les effets de l'alcoolisation massive et de l'alcoolisation chronique sur la croissance osseuse chez le fœtus de brebis. Ils ont constaté une diminution de la solidité du fémur et une diminution de la longueur du fémur chez le fœtus et non chez la mère dans les groupes à fort taux d'alcoolémie. Les fœtus à taux d'alcoolémie modéré ont montré une meilleure résistance aux tests de solidité que le groupe témoin. L'étude a montré que l'effet de l'alcool sur la croissance et la solidité osseuse est dépendant de la dose.

Les études de RAMADOSS *et al.* [125]; WATARI *et al.* [150], et WEST *et al.* [158] ont consisté à étudier l'effet de l'alcoolisation sur le développement de l'encéphale. WATARI *et al.* se sont intéressés à la substance blanche. Leurs résultats ont montré un pourcentage de substance blanche lésée supérieure chez les fœtus de brebis traités par rapport aux témoins perfusés au NaCl 0.9%. Les lésions étaient localisées dans la substance blanche avec une distribution rostro-caudale, plus spécifiquement dans la substance blanche frontale et temporale. RAMADOSS *et al.* [125] et WEST *et al.* ont démontré qu'une exposition à l'alcool entraînait une réduction du volume du cervelet chez le fœtus et une réduction du nombre de cellules de Purkinje (de 25 % selon West *et al.*) quel que soit le trimestre de gestation et indépendamment de l'hypoxie alcool-induite de la mère et du fœtus.

II.1.b. Modèles d'intoxication à la cocaïne et ses dérivés pendant la gestation

La cocaïne étant le second toxique auquel le fœtus humain est le plus exposé après l'alcool, des équipes se sont penchées sur les effets de cette molécule et de ses dérivés sur le système nerveux du fœtus, et sur les moyens d'évaluation de ces effets. Les enfants qui ont été exposés à de la cocaïne *in utero* présentent des déficits neuro-comportementaux. Chez les adultes, la cocaïne induit une diminution de la durée de la phase REM (Rapid Eye Movement) du sommeil. Les études ont donc été construites dans le but de modéliser ces effets de la cocaïne.

Pour l'étude de la phase REM du sommeil, des infusions intraveineuses de cocaïne ont été effectuées, pendant 90 minutes pour obtenir les premiers résultats. Puis d'autres études ont cherché à déterminer si le fœtus acquiert une tolérance à la cocaïne. Les infusions pour ces études ont été maintenues pendant 6 heures. Les premières doses à avoir été utilisées étaient de 2mg/kg de cocaïne par voie intraveineuse, puis d'autres études ont montré que les mêmes résultats étaient obtenus avec des doses inférieures.

Dans les études neuro-comportementales, les mêmes doses de cocaïne ont été administrées. Les parties de système nerveux collectées pour analyse histologiques étaient conservées dans du formol, pour se situer dans les mêmes conditions que celles de la conservation des organes humains post mortem.

COVERT *et al.* [23] ont injecté 1 mg/kg par voie intraveineuse de cocaïne ou de certains de ses métabolites (cocaéthylène ou bezoylecgonine) à des brebis à 124 jours de gestation pour étudier les causes d'infarctus et d'hémorragie cérébrale chez les nouveaux nés après consommation de cocaïne par la mère pendant le troisième trimestre de gestation. Ils ont obtenu une hypertension maternelle, une hypoxie fœtale, et une diminution du débit sanguin vers l'encéphale du fœtus pour la cocaïne comme pour les métabolites. Le cocaéthylène passe la barrière placentaire, mais la bezoylecgonine très peu. Le cocaéthylène est un dérivé métabolique de transestérification de la cocaïne obtenu *in vivo* en présence d'éthanol. La bezoylecgonine est un dérivé d'hydrolyse de la cocaïne majeur chez l'homme [105].

LAURINI *et al.* [88] ont montré que les dégâts cérébraux chez des fœtus hypoxiques étaient plus fréquents chez des animaux traités à la cocaïne. Les pertes neuronales sont limitées au cortex parasagittal au striatum, à l'hippocampe et aux cellules de Purkinje.

AKOKA *et al.* [4] ont développé un modèle de détection des lésions par IRM suite à l'administration de cocaïne. Ils ont administré 140 mg/kg de cocaïne par voie intraveineuse tous les jours à partir du 60^{ème} jour de gestation et jusqu'à la parturition à des brebis gestantes. A 125 jours de gestation, ils ont fait des séquences T1 et T2 du cerveau des fœtus. Les images en mode T1 ont révélé des contours irréguliers, des zones hétérogènes plus fréquentes, un contraste entre substance grise et blanche augmentées et un ventricule latéral élargi chez les fœtus traités. Les images en mode T2 ont souligné un contraste entre substance grise et blanche augmenté chez les fœtus exposés. Ces images sont compatibles avec des lésions de maturation avancée et d'hypoxie. Le mode T1 a donné des images de meilleure qualité que le mode T2. Ces images seraient utilisables selon les auteurs pour suivre l'évolution de lésions cérébrales chez le fœtus humain.

Les interprétations d'images ont ensuite été confrontées à l'histologie. Les coupes histologiques montraient une gliose péri-vasculaire, des lésions d'hypoxie, d'œdème et d'hémorragies et des images de mort neuronale.

II.2. Etude de la foetotoxicité/teratogénicité de modèles thérapeutiques

II.2.a. Pharmacologie de la barrière placentaire

Certaines études ont défini le comportement pharmacologique des substances lors de leur passage à travers la barrière placentaire. Les effets sur le fœtus ne sont pas évalués via ces modèles. Pour ces études, une molécule est injectée à la mère, puis sa pharmacocinétique est suivie par prélèvements sanguins et de liquide amniotique chez le fœtus. Par exemple, VEEREMAN-WAUTERS *et al.* [148] ont montré que lors d'une injection maternelle intraveineuse, le Cisapride (anti-acide, pro-kinétique) traverse la barrière placentaire en 5 minutes et a un comportement pharmacologique similaire chez la mère et le fœtus. PEREZ *et al.* [119], dans une étude vétérinaire trouvent que la Moxidectine (antiparasitaire) passe en 15 minutes chez le fœtus, même si la concentration est moindre que chez la mère. Ils indiquent ne pas trouver de Moxidectine dans le liquide amniotique et ne rapportent pas de mortalité ni de taux de malformations supérieurs à la normale chez les fœtus dont la mère a reçu le traitement. Le passage de la barrière placentaire semble être une particularité de la Moxidectine chez la brebis, par rapport aux autres antiparasitaires couramment utilisés tels l'Ivermectine. BIRCH *et al.*[14] ont exposé des fœtus aux androgènes (propionate de testostérone) par voie intraveineuse à raison de 80 ou 100 mg par injection deux fois par semaine et ont constaté que cette exposition engendrait des modifications du cycle reproducteur de la brebis. Les femelles exposées avaient une puberté plus précoce et leurs cycles étaient irréguliers à partir de la deuxième saison de reproduction.

II.2.b. Foetotoxicité/teratogénicité des substances injectées

Le fœtus de brebis a servi de modèle d'étude de toxicité pour plusieurs molécules, prescrites couramment aux femmes enceintes. BLEA *et al.* [16] se sont intéressés à un inhibiteur calcique, la nifédipine, qui est utilisée entre autres comme tocolytique pour combattre les contractions prématurées chez la femme. Ils ont injecté 3 fois 5 ou 10 µg/kg/ min par voie intraveineuse, en perfusions de 90 minutes à des fœtus à 130 jours de gestation. Les effets de l'injection de la nifédipine étaient observés 30 minutes après la fin de l'injection. Les résultats obtenus étaient une augmentation du débit sanguin dirigé vers les surrénales et le diaphragme avec la forte dose de nifédipine, une augmentation des lactates maternels et fœtaux et une hypoxie et acidose fœtale. Les auteurs ont conclu qu'une infusion de la mère à la nifédipine induirait une hypoxie et une acidose du fœtus de brebis, sans diminution persistante du débit sanguin materno-fœtal. Depuis cette étude, cette molécule a été testée chez l'homme [9] sans montrer d'effets secondaires ni chez le fœtus, ni chez la mère.

L'étude de MORRISON *et al.* [107] a porté sur les effets d'un antidépresseur, la fluoxétine sur le fœtus. Cet antidépresseur est utilisé chez l'homme pour traiter les états dépressifs majeurs, les troubles obsessionnels compulsifs et la boulimie chez les adultes et les sujets âgés. Chez la brebis, après injection intraveineuse d'un bolus de 70 mg de fluoxétine puis d'une perfusion à 2.77 mg/ml (vitesse 100 µg/min) pendant 8 jours, il n'y avait pas de modifications des paramètres vitaux après la période d'ajustement (environ 4h) chez les fœtus. Les auteurs ont observé une inhibition sérotoninergique du sommeil REM, mais pas de modifications de rythmes circadiens. Une augmentation de la taille du pic d'ACTH et de cortisol pré-parturition a aussi été obtenue, sans pour autant qu'il n'y ait de parturitions prématurées. Les auteurs ont indiqué qu'une étude de suivi à long terme des fœtus en période post-natale serait intéressante pour comprendre les effets de la Fluoxétine sur les enfants (retards de développement psychomoteurs et moteurs, sans altération du QI, ni du développement du langage et des comportements).

Enfin, HOGG *et al.* [68] ont étudié l'effet d'une exposition prénatale aux androgènes sur l'expression protéique et génique dans l'ovaire du fœtus de brebis. Ils se sont intéressés à l'environnement hormonal du fœtus pendant la gestation. L'équipe a injecté du propionate de testostérone chez des fœtus de brebis et a observé que celle-ci n'avait pas d'effet sur la morphologie ovarienne, ni sur la prolifération des cellules ou le volume des cellules germinales. Cependant, l'équipe a noté une diminution de l'expression des composants enzymatiques de la synthèse des hormones stéroïdiennes à 90 jours de gestation (stAR, CYP11A, CYP17 et LHR), et une augmentation du marquage immunitaire des facteurs de différenciation cellulaires Id3 et Id1.

II.3. Les Polluants environnementaux

L'impact des polluants environnementaux a été évaluée, soit en exposant les animaux à de multiples polluants simultanément [53] soit à un seul polluant tel le fer par exemple [28]. FOWLER *et al.* [53] ont ajouté de la boue d'égout aux pâturages de brebis d'expérimentation maintenues à ce régime pendant environ 5 ans. La pollution environnementale a consisté à déverser 2.25 tonnes de matière sèche par hectare de boues d'égout sur les pâturages sur lesquels les brebis se nourrissaient. Sur le pâturage témoin, un engrais inorganique était répandu à la même fréquence. Les femelles ont été maintenues sur ces pâturages pendant toute leur vie (environ 5 ans). L'intoxication se faisait donc per os pour la mère, à une dose inconnue par brebis. Le fœtus était donc potentiellement exposé *in utero* si ces toxiques franchissent la barrière placentaire. L'équipe a ensuite suivi les effets de cette exposition sur la fonction ovarienne des descendants. D'un point de vue clinique, l'équipe a noté que les poids vifs des fœtus traités étaient inférieurs de 14 % à ceux des témoins.

D'un point de vue hormonal, la seule hormone affectée était la prolactine dont la concentration était de 48% plus faible chez les fœtus traités. La densité d'oocytes et de follicules était aussi diminuée chez les fœtus exposés aux polluants, avec une proportion supérieure de follicules matures chez ces fœtus. D'un point de vue génétique, 42 % des spots d'expression génétiques étaient altérés chez les fœtus dont la mère était sur les pâturages contaminés.

L'équipe de CURRY *et al.* [28] a étudié le passage placentaire des antidotes de l'intoxication maternelle au fer (la deferoxamine et la ferrioxamine). L'intoxication maternelle est faite par des infusions intraveineuses de 2 mg/kg de poids vif maternel de fer pendant 60 minutes. Puis les antidotes étaient administrés pendant 15 minutes. L'équipe n'a pas observé de passage des antidotes ni du fer dans la circulation fœtale, qui semble donc protégé de ces intoxications lors du troisième trimestre de gestation.

III. Modèles en anesthésiologie : effets des molécules et protocoles d'anesthésie

Ce paragraphe constitue une extension du paragraphe pharmacologie/exposition aux toxiques. Cependant, étant donné qu'il traite spécifiquement des molécules anesthésiques et que l'anesthésie constitue une discipline à part entière, pour plus de clarté, ces molécules ont été regroupées dans un paragraphe distinct.

L'anesthésie a pour but d'obtenir quatre effets majeurs : la myorelaxation, l'abolition de la sensation douloureuse, la perte de conscience et l'amnésie. La première véritable révolution de l'anesthésie a eu lieu en 1842, lorsqu'un médecin américain a décidé d'administrer de l'éther à ses patients avant de les opérer. Puis sont venues les découvertes des autres molécules anesthésiques : protoxyde d'azote, chloroforme, curares, etc. Les premières tentatives d'anesthésie intraveineuses semblent dater des années 1870. Cependant, il faudra attendre l'apparition des premiers barbituriques dans les années 1930 pour que cette méthode soit vraiment utilisée. L'anesthésie volatile n'est apparue que dans les années 1980. Toutes ces molécules ont dû être testées tant pour leur pouvoir anesthésiant que pour leurs potentiels effets toxiques sur le patient, notamment le fœtus.

III.1. Impact des molécules anesthésiques sur la physiologie fœtale

Les expériences d'anesthésie générale ont donné de bonnes descriptions d'instrumentations chroniques du fœtus. MCCLAIN *et al.*[98] ont mis au point une technique de mesure de l'oxygénation cérébrale par spectroscopie infra-rouge. Les fœtus ont été équipés du dispositif de mesure entre 90 et 123 jours de gestation. La technique chirurgicale a consisté en une extériorisation de la tête du fœtus, pour permettre une trépanation du crâne le long de la ligne médiane. La source lumineuse LASER a été introduite par le trou dans la dure mère, puis fixée avec une plaque vissée dessinée par les expérimentateurs. Une autre plaque vissée venait fixer la sonde de mesure sur le crâne. Ce modèle a ensuite servi pour suivre les effets d'un protocole d'anesthésie classique (prémédication au midazolam 1 mg/kg IV, induction au thiopental sodique 7 mg/kg IV et maintien de l'anesthésie à l'isoflurane 1,5 %). Les expériences étaient menées au moins 48 heures après l'instrumentalisation du fœtus et de la mère. Lors de la première étude [98], sur 13 fœtus opérés, 9 ont pu entrer dans le protocole de recherche. Trois sont morts pendant la phase de récupération post chirurgicale et un fœtus a été sorti de l'étude car ses cathéters se sont bouchés. Cette étude a montré une augmentation de l'oxygénation systémique et cérébrale fœtale pendant l'anesthésie, avec aucun changement physiologique post anesthésique.

La deuxième étude menée par cette équipe [99] visait à déterminer le moment le plus opportun pour faire subir une procédure chirurgicale et donc une anesthésie à un fœtus. Le protocole d'anesthésie générale utilisé était un protocole standard (midazolam, thiopental et isoflurane) et les paramètres physiologiques ont été monitorés avant, pendant et 4 heures post anesthésie générale. L'équipe a conclu que les paramètres fœtaux se normalisent pendant l'anesthésie générale, donc que l'anesthésie semblait ne pas être un facteur limitant à la mise en place d'une chirurgie fœtale.

Bien avant les études de MCCLAIN *et al.*, SWARTZ *et al.* [142] avaient déjà étudié l'effet de l'anesthésie générale sur le fœtus, en se penchant sur le problème de l'asphyxie fœtale lors d'accouchement par césarienne. Deux protocoles anesthésiques ont été testés : thiopentane 3 mg/kg IV, puis NO 50 % puis Halothane 0.5 % puis O2 et thiopentane 3 mg/kg IV puis halothane 1% puis O2. Le flux sanguin cérébral, myocardique et rénal était ensuite suivi grâce à des microsphères radioactives. L'hypoxie fœtale était obtenue à l'aide d'occlusions du cordon. Les auteurs concluent que l'occlusion du cordon est un bon modèle d'asphyxie. Le fœtus pourrait survivre au moins 15 minutes post-occlusion et déclencherait des mécanismes de compensation : augmentation de la pression artérielle par vasoconstriction périphérique, ce qui induit une chute du débit cardiaque. Ayant obtenu significativement plus de pertes avec les fœtus traités au protoxyde d'azote, les auteurs ont conclu que cette molécule était inappropriée pour les cas d'hypoxie fœtale.

Une autre équipe (JONKER *et al.* [75]) s'est intéressée à la comparaison des effets d'une anesthésie gazeuse par rapport à une anesthésie injectable sur le fœtus de brebis. Pour cela ils ont utilisé deux protocoles d'anesthésie générale différents. Les brebis ont reçu la même induction (kétamine et diazépam IV) et le même maintien au départ (NO à 0.8 L/min, O2 à 2 L/min et 1.1-1.8 % d'halothane). Quand la brebis montrait des signes de réveil, elle recevait soit une dose d'halothane supplémentaire (jusqu'à 2-3 %), soit des bolus de diazépam (0.1 mg/kg) ou de kétamine (1 mg.kg) jusqu'à endormissement complet. Au réveil, les mères ont récupéré de façon similaire. Cependant, cinq jours après la chirurgie, la pression artérielle, la PO2 et la saturation en oxygène des fœtus traités à l'halothane étaient significativement plus faible que les fœtus ayant reçu les bolus. La récupération de la mère ne serait donc pas un gage de bonne récupération chez le fœtus.

III.2. Etude de l'anesthésie générale de la mère sur le fœtus

III.2.a. Molécules volatiles

III.2.a.i. Halothane

BIEHL *et al.* [12] ont décrit l'absorption d'halothane par le fœtus *in utero* lors d'anesthésie de la mère. Pour cela, ils ont anesthésié 6 brebis entre 125 et 135 jours de gestation avec de l'halothane à 1.5% et ont suivi les paramètres physiologiques et circulatoires de la mère et du fœtus. Aucun décès ni complication ne sont rapportés dans leur étude. Ils ont observé une diminution de la pression artérielle moyenne du fœtus de 27%. L'halothane est détecté chez le fœtus après 2 minutes, à une concentration inférieure à celle chez la mère pendant les 24 premières minutes. Puis la concentration d'halothane chez le fœtus atteint des niveaux comparables à ceux de la mère après 32 minutes environ.

Après cette étude chez le fœtus sain, la même équipe a ensuite étudié les effets de l'halothane sur le fœtus asphyxié [165] pour s'approcher des conditions vécues par le fœtus lors d'accouchement par césarienne. De l'halothane 1.5% est inhalé par la brebis via une sonde de trachéostomie. La PO₂, PCO₂, le pH et l'EB maternels et fœtal sont suivis. L'asphyxie est obtenue par occlusion du cordon ombilical. Les résultats ont montré que l'anesthésie à l'halothane inverse les effets hypertenseurs de l'asphyxie : la pression artérielle moyenne (PAM) et la fréquence respiratoire sont revenues dans les normes. L'occlusion a entraîné une acidose du fœtus, rapportée dans les autres études utilisant l'occlusion de cordon. Les auteurs n'ont pas constaté de détérioration du statut acido-basique du fœtus après inhalation d'halothane.

Une dizaine d'années plus tard, une autre équipe, DAVIS *et al.* [29] ont cherché à détecter les effets de l'halothane sur le cœur fœtal. Ils ont infusé de l'halothane chez le fœtus en perfusion intra-cardiaque et ont mesuré la pression intra cardiaque et les variations des gaz du sang. Ces auteurs ont constaté une diminution notable de la pression systolique du ventricule gauche post administration d'halothane probablement à cause de la sensibilité du fœtus aux effets inhibiteurs calciques connus de l'halothane.

III.2.a.ii. Isoflurane et Sevoflurane

BIEHL *et al.* [13] ont fait une étude caractérisant l'effet sur la circulation régionale de la prise d'isoflurane par le fœtus. Ils ont suivi la circulation de l'isoflurane dans le sang grâce à des billes radioactives. L'isoflurane a traversé la barrière placentaire et était détectable dans la circulation fœtale 2 minutes post inhalation. Le fœtus a absorbé moins d'isoflurane que la mère et

l'étude a montré que la circulation allant du fœtus vers le placenta était diminuée avec l'isoflurane, probablement à cause d'une baisse de débit cardiaque. Une acidose progressive du fœtus a aussi été remarquée.

OKUTOMI *et al.* [112] ont comparé les effets de l'isoflurane et du sévoflurane sur l'unité materno-fœtale chez la brebis. Les deux molécules étaient inhalées pendant 15-20 minutes par des brebis via une sonde de trachéostomie à des doses allant de 0.5 à 2 fois la concentration alvéolaire minimale (MAC). Les valeurs de MAC utilisées ont été déterminées par la même équipe pour les deux molécules chez des brebis gestantes et non gestantes. OKUTOMI *et al.* ont obtenu des changements minimaux de pression artérielle moyenne et de débit utérin chez le fœtus comme chez la mère pour des doses allant de 0.5 à 1 fois la MAC. Chez les brebis gestantes, la MAC était diminuée. Les besoins en gaz anesthésiques sont plus faibles chez la brebis gestante. A partir de 1.5 fois la MAC, les paramètres de la mère étaient inchangés, mais la fréquence cardiaque et la pression artérielle du fœtus avaient diminué. Les auteurs ont observé une récupération plus rapide avec le sevoflurane qu'avec l'isoflurane. La conclusion était que les effets hémodynamiques des deux molécules sont similaires. L'unique avantage d'une molécule par rapport à l'autre décelé par cette étude était la récupération plus rapide au sevoflurane. Les auteurs ont aussi indiqué la nécessité de maintenir la MAC entre 0.5 et 1.0 lors de chirurgies fœtales.

III.2.b. Molécules injectables

Ces études ont eu pour but d'étudier le passage à travers la barrière placentaire des molécules injectables utilisées le plus couramment lors des étapes d'induction et de prémédication de l'anesthésie et de prévoir d'éventuels effets toxiques sur le fœtus.

Les molécules qui ont été testées sont la lidocaine [57], la kétamine [143] et le fentanyl [24, 25] le sufentanil [149]. Les effets de la lidocaine sur le débit sanguin régional ont été évalués chez des fœtus sains et des fœtus en état de stress pour mimer une perfusion de lidocaine pendant la parturition. Les auteurs ont conclu que chez les patients en détresse, une anesthésie régionale serait préférable pour éviter les effets secondaires sur le fœtus. La kétamine a aussi été testée chez le fœtus en situation d'asphyxie par occlusion du cordon ombilical. Les techniques d'occlusion du cordon seront détaillées dans le paragraphe « Maladies Cardiovasculaires » avec les modèles d'hypoxie fœtale. La kétamine n'induirait aucun changement de pH sanguin ni de gaz du sang et abolirait l'hypertension et la bradycardie induite par l'occlusion du cordon. Le fentanyl et le sufentanil ont tous deux été démontrés comme surs pour le fœtus. En cas d'injection épidurale, ces molécules n'atteignaient pas le fœtus. En cas d'injection intraveineuse, une partie passait la barrière

placentaire et atteignait le fœtus (à des concentrations entre 2.5 et 3 fois inférieures aux concentrations plasmatiques de la mère). Malgré ce passage, les auteurs n'ont pas noté d'effets néfastes sur le fœtus.

IV. Imagerie médicale. Acquisition d'images et nouvelles techniques d'imagerie

Les deux techniques d'imagerie qui ont fait l'objet d'études sont l'IRM et l'échographie. Le fœtus de brebis a servi de modèle pour deux principaux axes de recherches en imagerie médicale humaine : les études de faisabilité qui s'intéressent à la possibilité ou non d'obtenir des images exploitables, et plus récemment le développement des méthodes d'IRM fonctionnelle.

IV.1. Etudes de faisabilité

Les études de faisabilité ont eu pour objectif d'établir la précision de mesure de la technique d'imagerie testée, ou simplement d'estimer la qualité de l'image obtenue afin de valider la technique d'imagerie pour son application au suivi du fœtus. En diagnostic anté-natal, la précision des mesures obtenues sur l'image est primordiale pour la prise de décision. En effet, de nombreuses conclusions sur la viabilité et la présence ou non d'anomalies chez le fœtus sont issues d'observations anatomiques et donc de mesures. La qualité visuelle de l'image obtenue est aussi extrêmement importante pour la détection de lésions.

IV.2. Acquisition d'images et de mesures

IV.2.a. En échographie

L'échographie est pour l'instant considérée comme la technique gold standard pour le suivi de gestation chez l'homme, notamment car les techniques d'IRM ne donnent des images exploitables qu'à partir du second trimestre de grossesse et donc ne permettent pas un suivi complet de gestation. Pour le premier trimestre de gestation, l'échographie est donc pour l'instant la seule technique d'imagerie utilisée. Il a donc été nécessaire de déterminer si cette technique était valable ou non pour ces stades de développement. Les études de fiabilité de l'échographie sont donc nombreuses dans la littérature. KISERUD *et al.* [79] par exemple se sont intéressés à la variabilité intra-observateur et inter-observateur lors de la validation de mesures de diamètres par échographie. Leur étude a porté sur les diamètres vasculaires. La mesure du diamètre vasculaire peut influencer grandement la mesure obtenue de la vitesse de flux dans un vaisseau, en particulier pour les vaisseaux de petit diamètre [42]. Il est donc primordial de connaître la fiabilité de ces mesures. Ils ont utilisé un modèle avec des tubes en silicone implantés que devaient mesurer les échographistes. Il est ressorti de leur étude que la mesure du diamètre avait une grande reproductibilité (fiabilité à 95%) même pour des vaisseaux de petit diamètre quand les mesures prises avec un échographe haute fréquence étaient répétées 4 à 6 fois.

Avant la naissance, des échographies obligatoires de l'appareil cardio-vasculaire du fœtus sont effectuées. Le but de ces échocardiographies anténatales est la détection d'anomalies structurelles, hémodynamiques ou fonctionnelles. Le fœtus de brebis a été utilisé pour valider les techniques de mesures, car il est possible avec ce modèle animal d'obtenir une mesure par l'image et une mesure invasive. Par exemple, MÄKIKALLIO *et al.* [95] et XIONG *et al.* [162] ont fait des suivis hémodynamiques de l'appareil cardiovasculaire chez des fœtus de brebis. MÄKIKALLIO *et al.* ont étudié par échographie doppler les effets de l'hypoxie sur l'appareil cardiovasculaire. En parallèle, ils ont mesuré le débit sanguin utérin et placentaire, les pressions artérielles et veineuses fœtales grâce à une instrumentalisation du fœtus 5 jours avant les expériences hypoxiques. Cela leur a permis de confronter les résultats obtenus grâce à leur technique d'imagerie à des mesures en direct.

Pareillement, XIONG *et al.* ont instrumentalisé le fœtus de façon chronique sous anesthésie générale. Pour cela, ils ont externalisé les fœtus, puis ont introduit des cathéters dans la veine jugulaire et l'artère carotide des fœtus et placé un ECG en sous cutanée sur le thorax du fœtus. Ils ont tunnélisé les cathéters sous le flanc de la brebis, et ont enfin refermé l'ensemble. Pour étudier les effets de l'anémie sur le myocarde, cette équipe a induit une anémie expérimentale chez ses fœtus : retrait de 30-120 ml par jour de sang, remplacé par du NaCl pendant 6 à 7 jours comme décrit par DAVIS *et al.* [30], comme décrit dans le paragraphe « IX.7. Modèles d'anémie chronique du fœtus ».

KOHL *et al.* [82] ont utilisé des sondes échographiques montées sur cathéters pour échographier les fœtus de brebis *in utero* par voie intra amniotique. Cette méthode pourrait être utilisée pour les cas de grossesse à haut risque dans lesquels les méthodes d'imagerie conventionnelle font défaut. Lors des interventions cardiaques chez le fœtus, la sonde échographique était placée dans l'œsophage du fœtus, montée sur des cathéters intravasculaires. Cependant le placement de ces cathéters n'était pas forcément aisé étant donné la taille et la position du patient. Dans l'étude de KOHL *et al.*, la sonde échographique était introduite dans le sac amniotique (modèle de sonde AcuNav, Acuson-A-Siemens-Co, Nuremberg, Allemagne). Le cathéter pouvait être guidé et la sonde permettait de faire des images 2D et doppler. L'équipe est parvenue à obtenir des images de haute qualité du cœur des fœtus et à étudier la circulation fœtale.

IV.2.b. En IRM conventionnelle

L'IRM commence à être de plus en plus utilisée dans le cadre de diagnostic anténatal car cette technique apporte un complément aux images obtenues via l'échographie. Dans le cadre de l'évaluation de l'acquisition d'images et de mesures, le modèle de brebis a été employé non pas

pour faire des atlas mais pour modéliser des situations cliniques. En effet, l'évolution de certaines pathologies fœtales est difficilement suivie à l'échographie. C'est le cas par exemple des hernies diaphragmatiques congénitales. L'imagerie cardiaque fœtale aussi pourrait bénéficier de l'IRM pour apporter un test diagnostique supplémentaire lorsque l'échographie ne permet pas de conclure. Le potentiel de l'imagerie IRM dans le diagnostic anténatal a aussi été évalué pour des organes inaccessibles à l'échographie tels l'oreille interne. Enfin, des comparaisons images/histologie ont été effectuées pour l'évaluation de la technique d'imagerie par résonance magnétique

JANI *et al.* [72] se sont intéressés à la mesure à l'IRM de la taille des poumons, du foie et des reins, pour détecter des effets d'une hernie diaphragmatique congénitale chez le fœtus. Ils ont comparé les résultats obtenus grâce aux images IRM aux résultats de mesures *ex vivo* chez les mêmes animaux. L'équipe a observé des volumes plus grands à l'IRM qu'à l'autopsie, sauf pour les reins. Ils ont aussi déterminé que la meilleure coupe pour évaluer la taille des poumons était le plan axial. Les mesures qu'ils ont obtenues pour les poumons chez les fœtus sains étaient plus précises que chez les fœtus atteints de hernies diaphragmatiques. Les modèles de hernies diaphragmatiques seront décrits dans le paragraphe « Gastro-entérologie »

L'IRM est utilisée pour l'imagerie de nombreux organes chez le fœtus, notamment les organes abdominaux et la tête. Cette technique est souvent utilisée comme moyen adjuvant de diagnostic lorsque l'échographie ne permet pas de conclure sur la présence ou non d'une lésion, ou que les signes indirects d'une lésion sont présents mais que l'échographie ne permet pas de mettre en évidence la lésion à proprement parler. Cependant, actuellement, l'Imagerie par Résonance Magnétique du cœur chez les fœtus est peu utilisée à cause de problèmes techniques. En effet, chez l'adulte, l'IRM cardiaque se fait par synchronisation des prises d'images avec un ECG raccordé au patient. De plus, le patient doit retenir sa respiration. Ces conditions, nécessaires à l'obtention d'images de qualité interprétables, ne sont pas applicables chez le fœtus. Actuellement, les seules applications fœtales de l'IRM concernent la détection de certaines maladies coronariennes et d'infarctus myocardiques fœtaux. Les chercheurs ont donc tenté de mettre au point des techniques qui permettraient d'obtenir des images plus précises par des méthodes les moins invasives possibles. L'évaluation du cœur du fœtus est un des plus grands enjeux actuels de recherche en imagerie fœtale par IRM.

Pour s'affranchir des artefacts tels le flou cinétique, deux stratégies d'imagerie existent [111], qui sont utilisables soit dans le cas de mouvements périodiques, soit dans le cas de mouvements plus aléatoires. Les mouvements périodiques, tels les battements cardiaques ou les phases de la respiration sont toujours caractérisés par une phase de repos tissulaire à géométrie

constante qui revient à chaque cycle. Il est possible après synchronisation de choisir de prendre les images pendant une phase donnée du cycle, et donc de limiter les artéfacts de mouvements. Pour les mouvements plus aléatoires tels le péristaltisme intestinal, les contractions utérines, ou les mouvements de la tête et du torse du patient, la technique permettant de masquer le flou cinétique consiste à faire en sorte que la vitesse de prise d'images soit plus rapide que la vitesse des mouvements aléatoires.

Dans ce but, YAMAMURA *et al.* [163, 164] ont évalué si l'IRM haute résolution était capable de fournir des images exploitables du cœur du fœtus dans des protocoles avec rythme cardiaque imposé grâce à l'implantation d'un pacemaker. Ceci affranchirait le clinicien de la pose invasive d'un ECG chez le patient fœtal. Dans une première étude, la faisabilité simple fut évaluée [164], puis les résultats obtenus par cette technique furent comparés avec les méthodes existant dans la littérature [163]. Dans l'étude de faisabilité, les auteurs ont pu obtenir toutes les images conventionnelles du cœur et ont fourni des tables de mesures moyennes des cavités cardiaques. Les auteurs ont conclu donc que l'IRM avec stimulation cardiaque pourrait être utilisée dans la détection d'anomalies cardiaques congénitales quand l'échographie ne permettait pas de conclure. La limite de la technique décrite par les auteurs était le stimulateur cardiaque, qui nécessitait une pose invasive. Trois ans plus tard [163], les auteurs ont essayé de contourner cet écueil en mettant au point une synchronisation autonome de l'IRM avec la méthode SSFP (Steady State Free Precession Imaging) qui est une des techniques basées sur le raccourcissement du temps de prise d'image pour s'affranchir des flous cinétiques. En utilisant cette technique, YAMAMURA *et al.* ont obtenu des images de qualité inférieure et avec plus d'artéfacts que celles obtenues avec une simulation contrôlée, et le septum atrial n'était pas clairement identifiable.

Dans un autre domaine, BHUK *et al.* [19] ont démontré qu'il était possible d'obtenir des images interprétables de l'oreille interne des fœtus, en utilisant l'IRM à haute résolution 3D. Ces images mettraient en évidence les anomalies congénitales de l'oreille interne, mais pour l'instant la technique demande un temps d'acquisition trop long pour être applicable en clinique.

Une autre approche de recherche a été de comparer les images obtenues à l'IRM avec les résultats d'histologie obtenus sur les mêmes fœtus. Avec cette approche, FRASER *et al.* [56] ont créé des lésions d'ischémie cérébrale par occlusion du cordon chez des fœtus et ont comparé les images IRM à l'histopathologie. Leurs images IRM ont révélé une perte du ruban cortical (fine couche de matière grise autour des hémisphères) dans les cas d'hypoxies les plus sévères ou une irrégularité du ruban cortical, surtout en région para-sagittale. L'histopathologie a montré que l'IRM détectait bien les lésions dans la matière grise corticale et permettait de voir des changements

pathologiques subtils dans la substance blanche. Cependant, leur étude a aussi révélé que la corrélation entre l'IRM et l'histologie était faible dans le thalamus, la corona radiata et le globus pallidus.

WEDEGAERTNER *et al.* [153] se sont préoccupés de savoir si l'on pouvait suivre à l'IRM et à l'échographie le développement volumique des poumons pendant la gestation. Leurs résultats seraient utiles pour suivre le développement pulmonaire des fœtus présentant une hernie diaphragmatique congénitale. Cette équipe s'est servie du modèle fœtal de traitement des hernies diaphragmatiques *in utero* par occlusion trachéale. A l'échographie ils ont enregistré des sections transversales du poumon à trois niveaux : sinus de la veine porte, apex du cœur, et vue quatre cavité du cœur. A l'IRM, ils ont effectué des vues coronaires et transverses. Puis les fœtus ont été euthanasiés par injection de thiopental intraveineux fœtal et un gant en latex a été posé sur la tête du fœtus pour éviter l'expansion des poumons. Le poids des poumons a ensuite été évalué, et le volume pulmonaire a été évalué par mesure du volume de fluide déplacé lors de l'immersion des tissus dans une éprouvette graduée remplie de liquide. Les volumes pulmonaires mesurés par ces auteurs via l'imagerie étaient significativement reliées au volume pulmonaire mesuré à l'autopsie. Cette équipe a retrouvé un résultat précédemment décrit : le volume pulmonaire augmente plus rapidement chez les fœtus ayant subi une obstruction trachéale (modèle décrit dans la partie « X.I. Pneumologie. Modèles d'affections de l'appareil respiratoire fœtal»). Les auteurs ont conclu qu'il était possible de suivre et de quantifier une croissance de poumons fœtale induite par occlusion trachéale par les deux méthodes d'imagerie.

IV.3. Développement des méthodes d'IRM fonctionnelle

L'IRM fonctionnelle est une application de l'IRM classique permettant de visualiser de manière indirecte l'activité cérébrale. Ce sont des scans à basse résolution mais à très grande vitesse de l'organe étudié (souvent l'encéphale). Les images sont prises en mode T2* obligatoirement. Le principe est basé sur les changements hémodynamiques au sein de l'organe étudié. Par exemple, pour le mode BOLD (Blood Oxygen Level Dependent), dans l'encéphale, une augmentation de l'activité neuronale engendre une augmentation de la demande en O₂. Le système vasculaire compense en augmentant la quantité d'oxyhémoglobine apportée par rapport à la quantité de désoxy-hémoglobine. La désoxy-hémoglobine atténue le signal IRM en T2*, donc la réponse vasculaire induit une augmentation du signal relié à l'activité neuronale, visible à l'image.

Chez le fœtus de brebis, les modèles d'hypoxie ont servi à tester l'IRM comme méthode non invasive d'évaluation de l'état d'oxygénation du fœtus, dans le cerveau et le cervelet [154, 157], le

cœur [155], le foie, le cœur, les poumons et les cotylédons [156]. Pour toutes ces études, le modèle et la démarche étaient les mêmes : l'équipe faisait des coupes transversales en T2 et T2* pour avoir des images BOLD et comparait les images obtenues à des valeurs de saturation sanguine fœtale ou maternelle mesurées *in vivo* en temps réel. Sur l'encéphale, dans leur première étude de faisabilité, l'équipe de WEDEGAERTNER *et al.* ont trouvé une corrélation entre les signaux BOLD et l'état d'oxygénation du fœtus, plus marquée dans le cervelet que le cerveau. Puis la même équipe a trouvé une bonne corrélation entre les mesures artérielles et les mesures de l'oxygénation calculées via l'IRM en T2 et T2*. Cependant, il était difficile d'avoir une quantification fiable : leurs mesures calculées étaient plus petites que leurs valeurs mesurées. Sur le cœur [155], la mesure de la saturation en oxygène dans les ventricules était directement corrélée à celle mesurée de façon invasive. Enfin, lorsque l'équipe s'est intéressée à d'autres organes que l'encéphale [156], les résultats ont montré une bonne corrélation entre les signaux BOLD et l'oxyhémoglobine maternelle et fœtale.

V. Oto-rhino-laryngologie. Appareil auditif et modèles de chirurgie maxillo-faciale

Le fœtus de brebis a servi de modèle pour la chirurgie maxillo-faciale et l'étude de l'appareil auditif en médecine ORL.

V.1. Chirurgie maxillo-faciale et reconstructrice

Les avancées en matière de chirurgie *in utero* ont tout d'abord eu lieu pour les affections fœtales mortelles. En effet, la chirurgie *in utero* nécessitait au début de pratiquer des gestes invasifs pour tenter une approche thérapeutique. Les risques pour le fœtus n'autorisaient pas de tentatives chez d'autres sujets que ceux atteints d'une affection autrement mortelle. Les affections non létales étaient traitées à la naissance, pour limiter la mortalité et la morbidité fœtales. Cependant, avec l'avènement des techniques de fœtoscopie, il devient possible de faire des chirurgies *in utero* pour des maladies ou défauts congénitaux non-létaux. C'est le cas des anomalies nécessitant une chirurgie maxillo-faciale, tels les malformations cranio-faciales (bec de lièvre, fente palatine, malformations crâniennes). Les premières études qui ont ouvert la voie de la chirurgie maxillo-faciale *in utero* sont celles qui ont porté sur la cicatrisation des plaies fœtales *in utero*. Ensuite, des équipes se sont intéressées à la possibilité d'une véritable réparation des défauts cutanés et osseux observés lors de l'apparition de malformations congénitales cranio-faciales. Dans cette partie, nous décrirons la mise en place des modèles de cicatrisation cutanée et leur application, puis les modèles de réparation de malformations maxillo-faciales congénitales.

V.1.a. Modèles de cicatrisation cutanée/réparation de défauts cutanés

Une cicatrisation cutanée qui se déroule mal peut engendrer des défauts esthétiques et fonctionnels graves. La prévention ou la minimisation de la trace laissée par la cicatrice est une préoccupation constante des chirurgies esthétiques ou non. Les données de la littérature ont permis de conclure que le fœtus aurait une réponse cicatricielle très différente de celle de l'adulte. Les plaies *in utero* cicatrisent en effet rapidement et sans laisser de cicatrices avant une période de transition (à 100-120 jours chez la brebis pour les plaies d'incision). Les mécanismes de cette cicatrisation différente ont été étudiés chez la brebis dans l'espoir de trouver des solutions pour améliorer la qualité des cicatrices. Par ailleurs, les annexes fœtales ont été utilisées comme adjuvants à la cicatrisation.

Enfin, certaines anomalies congénitales entraînent l'apparition de défauts cutanés non comblés à la naissance. Ceux-ci sont normalement traités chirurgicalement à la naissance, mais dans

certains cas un traitement anténatal serait avantageux. C'est aussi un des axes d'étude présenté dans cette partie.

V.1.a.i. Etude de la cicatrisation fœtale

LONGAKER *et al.* [91] ont démontré chez la brebis que les plaies fœtales ne présentaient pas le schéma typique d'inflammation que l'on peut voir chez l'adulte. L'inflammation serait donc à l'origine de la cicatrice. ÖZTÜRK *et al.* [114] ont donc créé une inflammation artificielle de plaies chirurgicales sur des fœtus de brebis pour étudier la réponse cicatricielle cutanée. L'inflammation était créée à 70 jours de gestation par injection de N-formyl-méthionyl-leucyl-phenylalanine dans la lèvre supérieure du fœtus. La lésion était créée à 90 jours de gestation, et consistait en une plaie incisionnelle de 3 mm sur la lèvre supérieure du fœtus, et d'une plaie de contrôle identique sur la lèvre inférieure du fœtus. Aucune mortalité n'a été observée pendant leur étude. Toutes les plaies sont guéries à la naissance. Macroscopiquement, l'équipe a constaté une persistance d'une cicatrice sur la lèvre supérieure et non la lèvre inférieure. Microscopiquement, l'équipe a mis en évidence des signes d'inflammation modérés sur la lèvre supérieure (néo vascularisation, invasion par des macrophages, présence de tissu de granulation) et pas de trace d'inflammation sur la lèvre inférieure. L'équipe a donc conclu que l'absence d'inflammation chez le fœtus est probablement en partie responsable de la non formation de cicatrices chez les fœtus.

V.1.a.ii. Modèles de reconstructions cutanées en cas de défauts cutanés

Plusieurs anomalies congénitales conduisent à la non fermeture de la peau et des structures sous-jacentes pendant le développement embryonnaire. Les cas de spina bifida en est un exemple.

Le traitement actuel de la spina bifida est une fermeture de la plaie rapidement après la naissance pour éviter les infections et les risques d'aggraver la lésion. Cependant, le liquide amniotique étant toxique pour le tube neural, une fermeture *in utero* permettrait de limiter les dégâts irréversibles sur le système nerveux dus à l'exposition au fluide amniotique. De plus, les scientifiques espèrent que si la chirurgie a lieu avant le troisième trimestre de gestation, la cicatrisation fœtale pourrait être complète et non fibrotique (cf. paragraphe précédent). La réparation des plaies dépend de l'écartement des deux bords de la plaie. Une équipe s'est donc attelée à la création et l'implantation de matrices en collagène pour faciliter la cicatrisation. HOSPER *et al.* [69] ont construit leurs matrices à partir de collagène de type I purifié de tendons d'Achille de bovins. Les fœtus de brebis ont été opérés à 79 jours de gestation. Trois lésions circulaires de 12 mm de diamètre ont été créées sur le dos des fœtus par excision de la peau. Une lésion était recouverte d'une matrice de collagène pur, une lésion recouverte d'une matrice de

collagène héparinisé imbibé de facteurs de croissance VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et FGF2 (Fibroblast Growth Factor). La troisième lésion servait de témoin. L'équipe a obtenu un taux de survie de 85%. La contraction de la plaie était moins importante dans les plaies ayant reçu une matrice de collagène sans facteur de croissance ; ces plaies présentaient une bonne ré-épithélialisation sans signes d'inflammation chronique. L'ajout de facteurs de croissance a augmenté l'angiogenèse et la régénération de tissus cutanés dans l'autre groupe d'étude.

V.1.b. Utilisation d'annexes fœtales comme adjuvants à la cicatrisation

Malgré des avancées importantes dans la prise en charge des grands brûlés, qui ont permis d'augmenter le taux de survie de ces patients de façon considérable, les cicatrices qui résultent de ces thérapies sont souvent défigurantes et hypertrophiques. Ces cicatrices peuvent aussi engendrer des pertes de fonction si elles sont placées dans des zones de flexion, et chez les enfants, elles posent des problèmes de croissance différentielle du tissu cutané.

Une équipe s'est intéressée à l'utilisation de membranes fœtales comme adjuvant pour traiter les brûlures. FRASER *et al.*[55] ont émis l'hypothèse que la membrane amniotique du fœtus, constituée d'un épithélium monostratifié, pouvait être utilisée pour aider à la cicatrisation. Dans les années 1910, la membrane amniotique était utilisée dans le traitement des brûlures pour réduire la douleur. La membrane amniotique est encore utilisée comme pansement temporaire dans les plaies de brûlure profonde, mais aucune étude avant celle-ci n'avait étudié ses caractéristiques et son intérêt par rapport aux autres pansements existants.

Les brebis ont subi une césarienne à 145-147 jours de gestation. Les fœtus ont été réanimés et placés dans des boxes. Ensuite, une hystérectomie était réalisée et la membrane amniotique récupérée et lavée dans une solution de PBS stérile contenant de la pénicilline et de la streptomycine, puis conservée. Un mois plus tard, une lésion de brûlure dermique profonde était créée sous anesthésie chez les agneaux par contact avec de l'eau à 82°C pendant 10 secondes. Six lésions étaient induites par agneau, trois sur chaque flanc. Les plaies d'un côté étaient couvertes de membrane amniotique (face amniotique contre la plaie) et les plaies de l'autre côté couvertes avec du JelonetTM. L'équipe a observé une amélioration de la cicatrisation sur les plaies traitées. Les auteurs ont souligné un des défauts du modèle brebis dans les études cutanées : la repousse rapide de la laine empêche de garder les pansements de façon durable.

V.1.c. Réparation chirurgicale des malformations maxillo-faciales congénitales

PAPADOPULOS *et al.* [117] ont créé un modèle de bec de lièvre *in utero* qu'ils ont ensuite traité avec une transplantation osseuse autologue d'os fœtal. La création du bec de lièvre a été faite par laparotomie et sous loupe (grossissement x4). La lésion était constituée d'un défaut cutané de 2-3 mm de large et 10 mm de long, d'un défaut osseux de 2 mm de large et 4 mm de long et d'une fistule oronasale. De l'os spongieux était prélevé pour une greffe osseuse ultérieure sur la crête iliaque ou du radius des mêmes fœtus. Les défauts créés étaient ensuite comblés avec les greffes osseuses et les fœtus remis à l'intérieur de l'utérus. L'évaluation de la cicatrisation a eu lieu à terme. Le taux de mortalité de l'étude était de 20 %. L'équipe a obtenu des résultats très prometteurs : les fœtus sont nés avec une légère asymétrie de la lèvre supérieure et un amincissement léger de la lèvre. Les examens d'imagerie ont montré les mêmes résultats. Cependant, le site de prélèvement osseux accusait un retard de croissance au niveau des ulnas et de la crête tibiale chez certains fœtus, apportant une limite aux résultats de cette étude.

V.2. Appareil auditif

ABRAMS *et al.* [2] ANTONELLI *et al.* [7] et PLESSINGER *et al.* [121]. ont mis au point des modèles de tests de l'appareil auditif chez le fœtus de brebis.

PLESSINGER *et al.* ont comparé la réponse du tronc cérébral à une stimulation intra et extra-utérine du système auditif. Ils ont conclu que le tronc cérébral répondait aussi bien à une stimulation externe qu'à une stimulation interne. La stimulation externe pouvait donc désormais être utilisée pour tester une réponse auditive du fœtus.

La détection des variations des mouvements fœtaux suite à une stimulation extérieure est utilisée dans le diagnostic anténatal de vitalité fœtale. Les dispositifs utilisés sont soit vibratoires soit sonores et sont appliqués de façon externe sur l'abdomen de la mère. ABRAMS *et al.* [2] ont comparé plusieurs dispositifs de stimulation sonore (larynx artificiels, brosse à dent électrique et dispositif d'émission sonores vendu sur le marché) pour déterminer le plus fiable à utiliser dans la détection des mouvements fœtaux. La détection des mouvements fœtaux est employée comme méthode indirecte de mise en évidence de souffrance ou mortalité fœtale. Le test le plus utilisé est le test NST (Nonstress Test) qui s'appuie sur les variations de fréquence cardiaque fœtale associé à un mouvement du fœtus après une stimulation sonore. L'équipe d'ABRAMS [2] s'est donc intéressée à mesurer la perception de ces stimulations par le fœtus. Ils ont pour cela implanté des hydrophones sur les crânes des fœtus, et quatre dispositifs de stimulation sur les flancs des brebis. La brosse à

dent électrique, anciennement méthode de référence, a été le dispositif qui a donné le moins de réponses fœtales. Les autres dispositifs testés ont donné des réponses comparables entre elles.

ANTONELLI *et al.* [7] ont mis au point un modèle de surdité fœtale *in utero* pour tester l'influence de stimulations précoces de la cochlée sur la perte auditive à la naissance chez des fœtus à surdité congénitale. Les fœtus ont été opérés à 120-129 jours de gestation (âge auquel le fœtus de brebis commence à entendre). Ils ont été rendus sourds par retrait des étriers et perfusion de l'oreille interne par de la kanamycine bilatéralement. Certains fœtus ont en plus reçu un implant cochléaire. Enfin, des électrodes furent placées dans le cortex de la bulle tympanique et le vertex du crâne pour enregistrer la réponse auditive. Trois des sept fœtus opérés ont reçu des stimulations sonores continues pendant 7 jours, à partir du jour suivant la chirurgie. L'équipe n'a pas observé de mortalité ni de morbidité post opératoire. Chez les fœtus implantés, le tronc cérébral avait répondu aux stimulations électriques. L'histologie indiquait une perte des cils cochléaires internes et externes chez les fœtus rendus sourds. Les auteurs ont conclu que la stimulation précoce de la cochlée pouvait limiter les dégâts futurs.

L'équipe de MEIXNER *et al.* [101] a mis au point un modèle de surdité fœtale. Cette équipe a injecté de la kanamycine dans la cochlée de fœtus de brebis à 120 jours de gestation. L'équipe a réalisé une seule injection de Kanamycine, et a implanté des électrodes pour mesurer la perception de l'influx sonore et la réponse du fœtus. La Kanamycine rendait les fœtus sourds, mais les cils vibratoires étaient préservés.

VI. Endocrinologie

L'étude de l'axe endocrinien chez le fœtus de brebis sain ou a pathologie induite expérimentalement permet de modéliser des maladies de l'adulte dont l'origine est intra-utérine. On nomme ces manipulations la programmation du fœtus. Les équipes de recherche ont créé des modèles reproductibles de maladies adultes faciles à induire *in utero*. En effet, une stimulation de l'axe endocrinien est aisément réalisable par voie intraveineuse chez la mère. D'autres études se sont intéressées à l'effet de l'utilisation thérapeutique des corticoïdes pendant la grossesse.

VI.1. Programmation de maladies de l'adulte en agissant sur l'environnement foetal

DODIC *et al.* [36] ont étudié les effets programmeurs du cortisol sur le fœtus. C'est la première étude démontrant qu'une exposition de courte durée du fœtus au cortisol induit une hypertension. Ils ont fait des infusions intraveineuses de 5mg/h de cortisol pendant 48h chez des brebis. L'équipe a ensuite suivi les animaux en trois cohortes. Un groupe d'animaux a mené la gestation à terme. Dans un autre groupe, les fœtus ont été euthanasiés à 130 jours de gestation, et pour le troisième groupe, la gestation a été menée à terme et les agneaux élevés sous la mère jusqu'à deux mois. Il n'y a pas eu de mortalité associée à l'étude. La pression artérielle moyenne était significativement plus élevée chez les fœtus traités au cortisol que chez les témoins pour tous les fœtus. Les auteurs ont mis en évidence une augmentation de la transcription d'ARNm codant pour l'angiotensinogène, les minéralocorticoïdes et les récepteurs aux glucocorticoïdes dans l'hippocampe des fœtus euthanasiés à 130 jours de gestation. Ces résultats n'ont pas été retrouvés chez les agneaux à deux mois.

VI.2. Effets de de l'utilisation thérapeutique des corticoïdes sur le fœtus

Les corticoïdes sont utilisés dans le cadre de traitement des hernies diaphragmatiques chez les fœtus ou en prévention lorsque le fœtus est à risque de naissance prématurée. La hernie diaphragmatique induit en effet des poumons hypoplasiques qui connaissent une maturation retardée. Les corticoïdes permettraient de réduire les retards de maturation pulmonaire. HUANG *et al.* [70] se sont intéressés aux effets de l'exposition anténatale aux corticostéroïdes sur le tissu nerveux du corps calleux. Le corps calleux joue un rôle important chez l'adulte dans le développement des comportements d'intégration, d'attention et de cognition. La bétaméthasone est utilisée en traitement préventif contre le syndrome de détresse respiratoire aigüe chez les enfants prématurés. A partir de 104 jours de gestation, l'équipe a administré une dose de 0.5 mg/kg de bétaméthasone en intraveineuse tous les 7 jours. Leur étude a été menée à terme sans mortalité

fœtale. Ils ont constaté que le nombre d'axones n'était pas affecté par la bétaméthasone, mais que la myélinisation des axones était très retardée chez les fœtus traités. Le diamètre des axones myélinisés et l'épaisseur de la gaine de myéline étaient aussi réduits dans le corps calleux de l'encéphale.

VII. Maladies infectieuses

Les naissances prématurées sont responsables de 70% de la mortalité néonatale et sont une cause importante de morbidité néonatale. Trente pourcent des naissances prématurées sont en relation avec une infection de l'appareil reproducteur. Les chorioamnionites aiguës sont une réponse inflammatoire à une invasion de l'appareil reproducteur par des micro-organismes, et sont souvent la cause d'accouchements prématurés. Cependant, l'étiologie, la date de survenue et les réponses fœtales face à cette maladie sont peu comprises à ce jour. Le fœtus de brebis a donc été utilisé en infectiologie pour modéliser les cas d'avortement prématurés dus à des agents infectieux. Les équipes ont cherché à induire des chorioamnionites chez des brebis pour ensuite étudier les effets de la maladie sur la gestation, le fœtus et la mère.

VII.1. Maturation pulmonaire induite par endotoxémie

Les chorioamnionites induisent une maturation du poumon du fœtus dont le mécanisme reste inconnu.

JOBE *et al.* [74] se sont ainsi intéressés à l'étiologie de la maturation pulmonaire induite par endotoxémie. Avant leurs recherches, l'hypothèse principale était que l'augmentation de la cortisolémie en réponse au stress infectieux déclencherait les réponses de maturation pulmonaire. Après des injections intra-amniotiques de 1, 4, 20 ou 100 mg d'endotoxine *E. coli* 055 B5 (Sigma) à 100 jours de gestation, l'équipe a constaté une maturation pulmonaire précoce chez les fœtus traités, sans augmentation de la cortisolémie placentaire. L'équipe a alors émis l'hypothèse que les cytokines pro-inflammatoires agiraient comme agents inducteurs de la maturation pulmonaire. KALLAPUR *et al.* [77] ont démontré une année plus tard que la chorioamnionite précède l'induction de la maturation pulmonaire chez des fœtus de brebis. Ils ont utilisé la même source d'endotoxine que JOBE *et al.* et ont fait des injections intra-amniotiques de 20 mg d'endotoxine (dose minimale pour obtenir un effet de maturation pulmonaire). Ils ont observé une augmentation du volume pulmonaire après exposition à l'endotoxine par rapport aux témoins, ainsi qu'une augmentation de la quantité de surfactant produite. Ils ont constaté une infiltration leucocytaire qui est apparue 5 heures après l'administration d'endotoxine dans l'amnios et le chorion. Au niveau moléculaire, l'équipe a observé une induction massive des ARNm des cytokines inflammatoires dans le chorion, l'amnios et les poumons du fœtus. Les ARNm codant pour l'IL-1bêta, l'IL-6 et l'IL-8 étaient augmentés de façon significative, ainsi que ceux du TNF alpha. L'équipe a donc conclu que la réponse à l'exposition aux endotoxines induisait la maturation pulmonaire chez le fœtus.

VII.2. La chorioamnionite, responsable d'affections chroniques néo-natales

Une invasion microbienne du fluide amniotique est présente chez 10-20 % des femmes lors d'accouchements prématurés sans rupture de membranes, et 30-60 % chez les patients avec rupture de membranes fœtales prématurées. La chorioamnionite est associée à des élévations des cytokines pro-inflammatoires. Les prélèvements de fluides amniotiques avec un dosage élevé d'IL6 prédisent un accouchement prématuré. Il semble donc y avoir une forte association épidémiologique entre la chorioamnionite et les accouchements prématurés. La chorioamnionite est aussi associée à une augmentation de l'incidence de maladies pulmonaires chroniques et de dysplasies broncho-pulmonaires, et à une diminution de l'incidence de syndromes pulmonaires aigus [151]. Les mécanismes protecteurs et destructeurs induits par la chorioamnionite sur le poumon semblent donc différents.

Pour éclaircir ces mécanismes, KRAMER *et al.* [85] ont cherché à déterminer les lésions, l'inflammation et le remodelage pulmonaire induits par des injections de 4 mg d'endotoxine E. coli 055 : B5 (Sigma) par voie intra-amniotique à 5h, 24h ou 7 jours pré-partum. Aucune mortalité fœtale n'a été rapportée dans leur étude. Les résultats histologiques ont montré une augmentation de la proportion de cellules apoptotiques chez les fœtus traités, et une diminution par 25 % des pneumocytes de type II à 72 heures. Ils ont aussi constaté une diminution précoce de l'expression de la SP-B (Surfactant Protein-B) dans les pneumocytes de type II. A l'histochimie une augmentation de l'expression des indicateurs de stress oxydatif (HSP70) et des marqueurs de souffrance pulmonaire (II-8) est remarquée. Ensuite, en quelques jours, l'inflammation s'est résolue, et le remodelage des poumons avait lieu. Il en résultait une diminution de l'épaisseur du mésenchyme et une augmentation des lipides et des protéines du surfactant. Ces changements donnaient une impression de maturation pulmonaire au plan physiologique car les échanges gazeux pulmonaires et le fonctionnement pulmonaire était amélioré. Cependant, la résolution des lésions était suivie d'une altération du développement alvéolaire similaire à ceux obtenus dans les modèles lésionnels pulmonaires induits par excès de ventilation ou injection d'un oxydant chez d'autres espèces telles les primates. Ce modèle fœtal ovin a permis à l'équipe de mieux caractériser la première phase de création de lésions pulmonaires qui a lieu dans leur modèle de chorioamnionite induite par endotoxines.

VII.3. Réponses immunitaires fœtales à la naissance

Le modèle de chorioamnionite induite par endotoxines a également été utilisé par KRAMER *et al.* [84] pour étudier les réponses immunitaires du fœtus avant la naissance. Ils ont fait l'hypothèse que la réponse immunitaire innée et sa modulation chez le fœtus avaient des conséquences directes sur l'apparition de lésions associées à des accouchements prématurés, en augmentant ou en diminuant le seuil de sensibilité de la réponse immunitaire. Il en résulterait une tolérance immunitaire acquise par le fœtus. Pour cette étude, ils ont prélevé du sang de cordon fœtal après injection de l'endotoxine et isolé les monocytes de ce sang. Après culture cellulaire, ces monocytes ont été soumis à une exposition à l'endotoxine *in-vitro* et à des bactéries *E. coli* marqués à la fluorescéine. Le nombre de bactéries phagocytées a ensuite été compté et la réponse à l'exposition à l'endotoxine évaluée par la production de peroxyde d'hydrogène et la concentration en Il-6 par les monocytes. Enfin, l'expression de CD14, TLR4 et du CMH II a été mesurée dans les monocytes. Leurs résultats leur ont permis de conclure que la réponse du fœtus à l'inflammation était suivie d'une tolérance fœtale et donc une augmentation des risques pour ces patients de contracter des maladies nosocomiales. C'est le premier modèle décrit dans la littérature permettant d'évaluer les effets induits par l'inflammation sur la réponse du système immunitaire fœtal.

VII.4. Effets des endotoxines sur les autres organes

D'autres équipes se sont intéressées aux effets d'une exposition à l'endotoxine sur d'autres organes, tels le myocarde ou l'encéphale.

Chez l'adulte, les dysfonctionnements cardio-vasculaires sont une conséquence grave du syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) en cas de sepsis. Plusieurs études ont été menées chez l'adulte pour comprendre le mécanisme d'induction d'un dysfonctionnement cardiaque suite à une exposition à une endotoxine. Ce mécanisme s'appuie sur les cytokines pro-inflammatoires chez l'adulte (Il-6), dont le relargage entraîne un excès de production de NO suite à l'activation des enzymes iNOS (inducible NO synthase). Toutes ces réactions sont contrôlées par des signaux transducteurs et activateurs de transcription (STAT).

SEEHASE *et al.* [135] ont étudié cette séquence d'activation chez le fœtus, pour comprendre l'équivalent fœtal du SIRS : le FIRS (*Fetal Inflammatory Response syndrome*), responsable de morts fœtales, d'accouchements prématurés, de défaillances cardiorespiratoires et de lésions cérébrales ischémiques. Pour cela, ils ont injecté par voie IV 100 ng de LPS d'*E. coli* 055 B5 (Sigma chemical, CO, Aldrich, Frankfort) par infusions de 10 minutes chez des fœtus de brebis de 110 jours de gestation, 3 jours avant de faire naître les agneaux par césarienne. Ils ont ensuite

étudié les effets de cette injection sur le myocarde à l'autopsie. L'équipe n'a pas noté de mortalité fœtale.

Ils ont obtenu une tachycardie et une hypotension pendant les 72 premières heures chez tous les fœtus et la saturation en O₂ était plus basse chez les fœtus traités. D'un point de vue moléculaire, ils ont vu une augmentation du niveau d'expression d'ARNm et de protéines pour le facteur HIF 1 alpha cardiaque (*Hypoxia inducible factor 1 alpha*), les TLR 2 et 4. Cependant, ils n'ont pas observé d'augmentation du facteur iNOS ni de l'IL-6, ni une diminution de la phosphorylation des STAT dans le myocarde. HIF 1 alpha promeut l'expression de gènes qui protègent l'approvisionnement en oxygène cardiaque, en promouvant l'angiogenèse. Les auteurs ont conclu que l'endotoxémie chez le fœtus de brebis engendrait une tachycardie et une hypotension. L'activation des TLR a montré que l'endotoxine avait atteint le cœur, et activé le HIF 1 alpha, ce qui induisait une hypoxie cardiaque. Contrairement aux résultats trouvés chez l'adulte, les voies de l'IL-6 et du NO ne semblaient pas jouer un rôle, ou tout du moins pas aussi précocement.

Sur l'encéphale, l'équipe de REES *et al.* [126] a mis au point un modèle d'inflammation utérine en tant qu'agent inducteur de lésions de l'encéphale, pour ensuite étudier des traitements conservateurs possibles. Cette équipe a travaillé par voie intraveineuse avec des fœtus de 107+/-1 jour de gestation. Ils ont formé trois groupes d'étude. Le premier groupe a reçu du LPS (bolus de 0.9 microg/kg), le deuxième du LPS puis de la rhEPO (bolus de 0.9 microg/kg et 5000 UI/kg de rhEPO), et le troisième groupe uniquement de la rhEPO (même dose de rh EPO que le groupe 2). Le suivi des paramètres physiologiques a donné des résultats similaires chez les trois groupes. A l'histologie, les auteurs ont observé une réduction des lésions axonales et micro gliales de la substance blanche, et une production moins importante de médiateurs de l'inflammation par les astrocytes. La localisation de l'EPO par immunofluorescence microscopique a mis en lumière sa présence dans le cortex cérébral, la substance blanche et la rétine. La rhEPO aurait donc un potentiel neuro-protecteur pour réduire les lésions du cerveau et du nerf optique chez les fœtus exposés au LPS.

Enfin, le fœtus de brebis a servi de modèle pour développer des techniques de suivi des inocula utilisés dans les études en infectiologie. Ce sont des études visant à améliorer les techniques de laboratoire utilisées pendant les tests précliniques. Ainsi MOULTON *et al.* [108] ont mis au point un modèle d'imagerie bioluminescente pour tracer les *Escherichia coli* injectées pendant leur expérience. Ils ont pour cela injecté $1,2 \times 10^6$ ou $5,6 \times 10^6$ CFU/ml de bactéries E. Coli modifiées pour la détection photonique chez des brebis. Après l'avortement induit par l'inoculum (entre 48 et

120 h chez 60 % des mères) ou après césarienne à 7 jours, tous les fœtus nés prématurément étaient positifs aux émissions photoniques pAK1-lux. MOULTON *et al.* ont ainsi étudié la répartition des bactéries et ont conclu que leur modèle pourrait être utilisé pour comprendre les mécanismes induisant un avortement suite à une infection du tractus génital.

Rapport-gratuit.com 
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

VIII. Nutrition

En 1966, WINICK et NOBLE [159, 160] montraient chez des rats qu'un défaut d'apport nutritionnel pendant la gestation était invariablement suivi d'une réduction irréversible du nombre de cellules dans certains tissus tels le pancréas. L'idée de manipuler la nutrition de la mère pour créer des modèles de pathologies adultes en a découlé. Depuis, cette idée a été reprise chez d'autres espèces, dont la brebis. De plus, des études rétrospectives sur des cohortes d'enfants ont montré que les enfants à faible poids de naissance ont un risque augmenté de développement de maladies cardiovasculaires, coronariennes, d'hypertension, de diabète et d'infarctus à l'âge adulte. La nutrition de la mère pendant la gestation influe sur le métabolisme du tissu adipeux (risques d'obésité), l'appareil cardiovasculaire (risques de maladies coronariennes, d'hypertension à l'âge adulte), le système endocrinien (insulino-résistances, hypercorticisme), et l'appareil reproducteur. La nutrition est aussi une méthode employée pour créer des modèles de restriction placentaire. Ce type de modèle sera explicité dans la partie « Reproduction », avec les autres méthodes de création de modèles de restriction placentaire.

Il existe deux types de modèles de manipulation nutritionnelle : la restriction alimentaire ou l'apport excessif de nutriments.

Pour la restriction alimentaire, deux stratégies ont été employées : une restriction nutritionnelle globale ou un régime déficient en protéines avec un apport iso calorique [11]. Pour l'apport alimentaire excessif, une alimentation appétante en excès a été apportée aux brebis.

Lors de la conception des études de manipulation nutritionnelle, la littérature a montré qu'il faut tenir compte du stade de gestation auquel l'expérience est programmée car celui-ci a une grande influence sur le modèle de pathologies obtenu. SYMONDS *et al.* [145] ont étudié les effets de la programmation du développement du tissu adipeux fœtal en fonction du stade auquel la restriction alimentaire a été imposée à la mère, et GEORGE *et al.* [60] ont étudié les effets d'une suralimentation aux différents stades de gestation

Pour comprendre les résultats obtenus par la revue de littérature de l'équipe de SYMONDS *et al.*, il faut tout d'abord se pencher sur l'ontogénèse du tissu adipeux chez le fœtus. SYMONDS *et al.* [144] ont résumé les caractéristiques de cette ontogénèse chez l'homme et la brebis.

Le tissu adipeux est présent dès les premiers stades de la vie fœtale, et est constitué de deux types de tissus : le tissu adipeux brun et le tissu adipeux blanc. Le tissu adipeux brun possède une Protéine Unique de Couplage (UCP1) qui une fois activée est capable de fournir jusqu'à 300W/kg de chaleur tissulaire comparée aux 1-2 W/kg que peuvent produire les autres tissus. Pendant la

gestation, le développement du tissu adipeux doit conduire à une production suffisante d'UCP1 pour assurer une thermorégulation efficace à la naissance suite à l'exposition du fœtus au froid extra-utérin [22]. La libération d'UCP1 à la naissance est régulée chez le fœtus par l'axe endocrinien. La quantité d'adipocytes bruns est donc maximale à la naissance chez les espèces comme l'homme et la brebis, chez qui la thermorégulation a lieu dès la naissance et l'axe hypothalamo-hypophysaire est déjà mature à la naissance. Cette masse disparaît normalement dans les quelques mois suivant la naissance. Chez les rongeurs, où la thermorégulation à la naissance se fait dans le nid par contact direct avec le reste de la portée, le pic de production d'UCP1 a lieu après la naissance au moment de la maturation de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Ces animaux ont du tissu adipeux brun de façon physiologique pendant toute leur vie. Chez l'homme et la brebis, le dépôt de tissu adipeux se fait principalement pendant le dernier tiers de la gestation sous régulation hormonale. Ce tissu adipeux est localisé à 80 % autour des reins chez la brebis, et représente moins de 2% du poids total du fœtus.

D'après SYMOND *et al.* [145], une restriction alimentaire en début/milieu de gestation (entre 28 jours de gestation- date de l'attachement utérin- et 80 jours de gestation–date de l'arrêt de la croissance placentaire) enclencherait le dépôt de tissu adipeux. Cette augmentation est accompagnée d'une augmentation du nombre de récepteurs aux IGF. Après 110 jours de gestation, une restriction alimentaire diminuerait le dépôt si la quantité de glucose apportée au fœtus était diminuée. Chez les jumeaux, la sensibilité du tissu adipeux aux changements nutritionnels était plus élevée que chez les fœtus seuls. L'âge de la mère influait aussi sur le poids du fœtus à la naissance et sa quantité d'adipocytes.

De la même façon, DU *et al.* [38] ont indiqué dans une revue littéraire les effets d'un régime de suralimentation chez la brebis sur les adipocytes, l'inflammation et le développement musculaire fœtal. Ils ont conclu qu'une suralimentation maternelle augmentait le risque que le fœtus développe un diabète de type 2 et de l'obésité. L'obésité maternelle conduirait à une inflammation modérée, qui peut atteindre l'intestin et donc augmenter les risques de développement de Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI), et réorienterait la différenciation des cellules souches mésenchymateuses vers la voie de l'adipogenèse et de la fibrogenèse plutôt que de la myogenèse. C'est ainsi que le développement musculaire et adipeux serait perturbé.

Les effets de la programmation nutritionnelle sont perçus sur trois systèmes : le système cardiovasculaire, le système endocrinien et la fonction métabolique, autant par les modèles de restriction alimentaire que par les modèles de suralimentation.

VIII.1. Effets sur la fonction cardiovasculaire

Les études de cohortes suite à la famine d'hiver 1944 aux Pays Bas montrent qu'une restriction alimentaire pendant le début de la gestation augmente le risque de maladies coronariennes à l'âge adulte. Cette augmentation n'est pas retrouvée chez les fœtus exposés en milieu/fin de gestation. Des études ont donc porté sur les effets de la sous nutrition sur la fonction vasculaire. TORRENS *et al.* [147] ont ainsi étudié les réponses des tissus vasculaires à une restriction nutritionnelle de 50% pendant 30 jours, avant et pendant la gestation. Ils ont ensuite évalué les animaux à 70 jours de gestation, juste après le terme, ou trois ans et demi après la gestation. Ces auteurs ont conclu que réponses à la sous nutrition variaient d'un lit vasculaire à l'autre. Les artères coronaires ont répondu par une augmentation de la vasoconstriction par plusieurs voies (une réponse à l'acetyl choline et une réponse endothélium dépendante, et la production d'une isoenzyme qui réactive les glucocorticoïdes) alors que les artères fémorales ont connu uniquement une diminution de la vasodilatation endothélium-dépendante. Les auteurs indiquent que les modèles vasculaires créés par de la manipulation nutritionnelles devraient s'intéresser à tous les types de vaisseaux pour avoir des résultats exploitables.

Les effets vasculaires de la manipulation nutritionnelle ne sont pas uniquement structurels. En effet, la manipulation nutritionnelle peut induire des pathologies vasculaires systémiques à l'âge adulte, telles l'hypertension. GOPALAKRISHNAN *et al.* [64] ont utilisé le modèle fœtal de brebis pour étudier la programmation nutritionnelle de la fonction cardiovasculaire adulte. Ils ont donné 50 % de l'apport nutritionnel recommandé pendant les 95 premiers jours de gestation à un groupe de brebis, puis 100 % des besoins nutritionnels recommandés pendant la fin de la gestation pour obtenir un fœtus d'environ 4,5 kg à la naissance (8MJ/jour). Les animaux ont été sevrés à l'âge de 16 semaines puis nourris à l'herbe jusqu'à leur 3 ans, date de l'évaluation. La pression artérielle était plus haute chez les fœtus sous régime. De plus, ces animaux ne présentaient pas de bradycardie reflexe lors d'infusions par de la norépinephrine. La fréquence cardiaque de ces animaux était plus élevée pour une même pression artérielle, et le relargage de leptine était plus important après injection de vasoconstricteurs chez ces animaux. La brebis peut donc être utilisée comme modèle d'hypertension à l'âge adulte, par programmation nutritionnelle, même si les mécanismes qui conduisent à l'hypertension ne sont pas connus à ce jour.

FAN *et al.* [47] se sont intéressés aux effets d'une suralimentation sur la morphologie cardiaque. Les brebis ont été nourries à 150 % de leurs besoins nutritionnels à partir de 60 jours avant la mise à la reproduction. Les brebis ont ensuite été suivies jusqu'à 75 jours de gestation. Le poids du bord libre des ventricules droits et gauches étaient plus grands chez les fœtus dont la mère

avait reçu une suralimentation. A l'histologie, les myofibres cardiaques avaient une orientation irrégulière et ces animaux présentaient de plus grands espaces interstitiels dans les tissus cardiaques. Les patterns de phosphorylations étaient perturbés ainsi que l'expression de certaines protéines. Les fœtus ne présentaient pas de signes cliniques de pathologie cardiaque.

VIII.2. Effets sur le métabolisme

Les enfants dont le poids de naissance est faible ont un risque accru de développement de maladies métaboliques à l'âge adulte. C'est le cas notamment pour le diabète. SEBERT *et al.* [134] ont utilisé un modèle de restriction alimentaire en fin de gestation et en début de croissance post natale pour étudier la provenance de cette hausse de facteurs de risque. Les brebis ont été soumises au régime alimentaire à partir de 110 jours de gestation et jusqu'à la parturition. Le groupe témoin recevait 0.46 MJ/kg PV à 110 jours de gestation suivi d'une augmentation progressive de l'apport nutritionnel jusqu'à atteindre 0.73 MJ/kg PV à 130 jours de gestation. Le groupe en restriction alimentaire recevait 60 % de cet apport. Après la parturition, les mères recevaient une alimentation normale et les agneaux étaient nourris sous la mère. Les jeunes ont été sevrés à 3 mois et élevés jusqu'à 16 mois en recevant une ration correspondant à leurs besoins de croissance. Quand la mère donnait naissance à des jumeaux, l'un d'eux était séparé de la mère et nourri avec du lait artificiel. Tous les animaux ont survécu à l'étude et la durée de la gestation n'a pas été affectée par la restriction alimentaire. A la naissance, le poids des jeunes issus des mères avec restriction alimentaire était inférieur à celui des témoins. Cette différence de poids a perduré jusqu'au sevrage. Après le sevrage, ces agneaux ont rattrapé le poids du groupe témoin. Les fœtus traités montraient des signes d'insulino-résistance, qu'ils aient été séparés ou non de leur jumeau à la naissance. La leptine plasmatique était plus élevée chez les fœtus sous restriction alimentaire séparés de leur jumeau que chez les autres fœtus. L'expression génique de la grheline et de la leptine gastrique n'était pas affectée par le régime subi. L'insulino-résistance induite chez ces fœtus provenait d'une adaptation programmée de l'abomasum et non de l'hypothalamus.

LONG *et al.* [90] ont utilisé un modèle d'obésité maternelle pour étudier le pic de leptine chez des brebis après la naissance. Pour cela, l'équipe a nourri les mères avec 150 % de l'apport nutritionnel recommandé à partir de 60 jours avant la mise à la reproduction et jusqu'à parturition. La leptine joue un rôle central dans la régulation de l'appétit. Chez les rongeurs, un pic d'expression de leptine a lieu peu de temps après la naissance et joue un rôle central dans le développement des centres de contrôle de l'appétit. Les animaux dont les mères avaient suralimentées ne montraient plus de pic plasmatique de leptine après un repas pendant les 6-9 premiers jours de vie des brebis. La cortisolémie était aussi augmentée chez ces fœtus.

VIII.3. Effets sur l'axe endocrinien

Le régime alimentaire reçu par la mère peut aussi avoir des effets sur l'axe endocrinien du fœtus et engendrer des modifications que l'on retrouve à l'âge adulte. EDWARDS *et al.* [40] ont étudié les effets d'une hypoglycémie aiguë et chronique sur l'axe hypothalamus-hypophyse-surrénales au troisième trimestre de gestation. Pour cela, les brebis ont été soit nourries à volonté, soit nourries avec 50% de leurs besoins pour produire un agneau de 4,5 kg à la naissance pendant les 30 derniers jours de la gestation. L'hypoglycémie aiguë était induite par des injections d'insuline intra-fœtales entre 125 et 130 ou 138 et 141 jours de gestation. Chez les fœtus témoins, la réponse ACTH à l'insuline avait lieu à partir de 135 jours de gestation, alors que chez les groupes traités, la réponse avait lieu avant et après les 135 jours de gestation. Les variations du glucose sérique étaient plus grandes en réponses aux stimulations chez les fœtus traités. Une sous-alimentation pendant la gestation induirait donc une augmentation de la sensibilité de l'axe hypothalamo-hypophysaire. BRAMELD *et al.* [17] ont montré avec le même protocole que l'expression de l'insulin-like growth factor était altérée chez l'adulte après une restriction alimentaire maternelle. ZHANG *et al.* ont utilisé un modèle de suralimentation maternelle et ont constaté que le nombre de cellules d'ilots béta du pancréas des fœtus issus de mères obèses étaient inférieur à la normale, que leur glycémie était plus élevée que celle de fœtus normaux et que leur insulïnémie était plus faible. Le régime alimentaire imposé aux mères était le même que celui rencontré dans toutes les études : 150 % de l'apport nutritionnel recommandé à partir de 60 jours avant la mise à la reproduction et jusqu'au jour d'évaluation.

IX. Appareil Cardiovasculaire. Modèles d'anomalies de l'appareil circulatoire

Les modèles décrits dans cette partie de notre étude reproduisent des anomalies congénitales ou acquises de l'appareil circulatoire, et des méthodes de traitement envisageables. Dans la littérature, les auteurs ont trouvé des modèles d'occlusion de cordon, d'hypertension, de sténoses valvulaires aortiques, de fistules artérielles, de tachyarythmies supraventriculaires fœtales, de mesures du baroréflexe, d'anémie chronique et des études de faisabilité pour la mise en place de circulations extracorporelles (CEC) fœtales.

IX.1. Modèles d'hypoxie fœtale : occlusions de cordon

Les lésions ischémiques/hypoxiques constituent la plus grande cause de mortalité et morbidité neurologique chez les nouveaux nés. L'asphyxie périnatale demeure une cause majeure de mortalité infantile et de déficits de développement nerveux postnataux. D'après PATEL *et al.* [118], l'hypoxie périnatale serait responsable de 20 % des cas d'IMC (Infirmité motrice cérébrale) chez l'humain. Les insuffisances placentaires et les restrictions de croissance intra-utérines d'étiologie variables mettent le fœtus en état d'hypoxie chronique et sont souvent associés à une mortalité et une morbidité neurologique. Ces deux modèles seront décrits ultérieurement. L'occlusion de cordon est un autre cas de figure rencontré lors de l'accouchement, qui induit une agression hypoxique aigue qui a des répercussions sur le système neurologique et le système cardiovasculaire.

Trois méthodes d'occlusion de cordon sont décrites dans la littérature. La ligature simple avec un clamp dans des protocoles aigus, la ligature chronique et l'occlusion définitive par électrocoagulation ou embolisation des vaisseaux placentaires. Pour les deux premières méthodes, il est possible de moduler la fraction d'occlusion et de construire des protocoles avec plusieurs occlusions répétitives du même vaisseau.

IX.1.a. Occlusion par ligature simple

Les protocoles les plus anciens sont ceux qui utilisent la ligature du cordon par un clamp. GOODWIN *et al.* [63] ont décrit ce modèle en 1968. Les fœtus sont extériorisés après laparotomie et utérotomie. Les cathéters habituels de monitoring (cf. Annexe 1) sont placés sur les artères et les veines fœtales, et la température et l'ECG sont enregistrés en continu. L'équipe a effectué l'occlusion du cordon grâce à des clips vissés Perspex. Le degré d'occlusion est mesuré avec un capteur de débit placé sur le vaisseau occlus. Cette équipe s'est intéressée aux effets d'une réduction du débit sanguin ombilical sur le débit ventriculaire gauche et droit. Ils ont montré que la réduction

du débit sanguin ombilical induisait une baisse du débit ventriculaire gauche et droit, plus rapide dans le ventricule droit.

IX.1.b. Occlusion chroniques par implantation d'un brassard

Les occlusions chroniques répétables sont effectuées à l'aide de brassards gonflables que l'on trouve dans le commerce. Les protocoles d'occlusions répétées sont constitués de 4 occlusions du cordon d'une durée de 5 minutes, séparées par des pauses allant de 30 minutes à une heure trente. Le monitoring du fœtus et des mères était un monitoring classique avec cathéters artériels et veineux maternels et fœtaux, ECG, et éventuellement électrodes électrocorticales lorsque les effets sur le cerveau étaient étudiés. Les fœtus et les mères étaient instrumentés 4 à 5 jours avant le protocole expérimental.

Par exemple, PULGAR *et al.* [123] ainsi que MALLARD *et al.* [96] se sont servis de ce modèle pour étudier les effets des occlusions de cordon sur les systèmes cardiovasculaires et neurologiques. PULGAR *et al.* ont démontré qu'un état d'hypoxie chronique du fœtus aggravait les lésions cérébrales et cardiovasculaires si celui-ci subissait un court évènement aigu. MALLARD *et al.* ont conclu que de courtes occlusions chroniques du cordon induisaient des lésions du striatum préférentiellement, alors qu'un épisode hypoxique unique et plus long conduirait à des lésions de l'hippocampe et du cortex.

HUNTER *et al.* [71] ont mis au point grâce à l'utilisation de ces brassards une nouvelle technique qui permet de mesurer l'activité métabolique cérébrale. Ils ont étudié les variations du métabolisme cérébral fœtal dans deux situations : hypoxie de la mère (hypoxie modérée pour le fœtus) pendant 30 minutes par inhalation d'air à 10% d'O₂, ou occlusion du cordon du fœtus pendant 10 minutes avec un brassard (hypoxie sévère). Leur technique de mesure se basait sur la loi de Fick. Ils mesuraient la chaleur émise par le cortex fœtal grâce à des électrodes implantées *in utero* dans le scalp du fœtus. Les mesures de la chaleur émise par le cerveau localement étaient corrélées à l'index d'activité métabolique du tissu ainsi qu'à l'utilisation d'O₂. Leur modèle est le premier décrivant une possibilité d'enregistrement continu de l'activité métabolique du cerveau du fœtus. Grâce à cette étude, l'équipe a mis en évidence un des mécanismes métaboliques qui permet aux fœtus d'être plus résistants à l'hypoxie que les adultes. En effet, ils ont montré que les tissus nerveux fœtaux entraient en métabolisme anaérobie et donc avaient une production d'énergie assurée. Le modèle mis au point par cette équipe permettrait d'étudier les mécanismes de contrôle de l'utilisation d'O₂ par le fœtus ainsi que les facteurs qui entraînent la conversion métabolique vers le métabolisme anaérobie.

IX.1.c. Occlusions par électrocoagulation

TCHIKIKOV *et al.* [146] ont été les premiers à décrire cette technique d'occlusion du cordon. Ils ont atteint le fœtus par endoscopie et ont localisé le cordon ombilical et les vaisseaux placentaires. L'équipe a coagulé en premier une des deux artères ombilicales puis la veine ombilicale (40W pendant 3-5 secondes répété 5-10 fois toutes les 15-20 secondes, avec un electrocauter AUTOCON 200 (Karl Storz)). L'étude qui a été publiée conjointement à la description du modèle a permis de mesurer le débit cardiaque ventriculaire et le débit sanguin dans le canal d'Arantius et la veine ombilicale par échographie doppler.

L'utilisation de leur modèle a montré que les fœtus pouvaient être opérés dès 73-95 jours de gestation, c'est-à-dire à un âge qui se rapporte au second trimestre de grossesse chez la femme. Les moyens de monitoring des fœtus au second trimestre de gestation sont très peu nombreux chez la femme, et l'étude de TCHIRIKOV *et al.* s'est attachée à trouver une nouvelle méthode de monitoring. La technique ainsi développée était moins invasive, ne nécessitait pas une instrumentation chronique du fœtus. Leur modèle permettrait donc d'étudier le fœtus à des stades plus précoces de gestation, et dans des conditions plus physiologiques.

IX.2. Traitement de la sténose valvulaire

La sténose valvulaire aortique intra-utérine conduit à des déformations progressives des structures du ventricule gauche (valve mitrale, valve aortique, cavité ventriculaire gauche et myocarde gauche). Ces lésions évoluent cliniquement vers le syndrome d'hypoplasie du cœur gauche. Avant les années 80, le syndrome d'hypoplasie du cœur gauche était mortel. Depuis, une procédure chirurgicale (Technique de Norwood) a été utilisée pour réparer ces défauts *in utero*. Malheureusement, les nouveaux nés qui survivent à la période néonatale doivent à ce jour subir encore au moins deux interventions chirurgicales palliatives et le taux de survie à l'âge adulte est de moins de 50%. L'équipe d'EMERY *et al.* [43] s'est intéressée à cette problématique et a développé une technique novatrice pour le traitement des sténoses valvulaires aortiques par intervention prénatale. Cette équipe a effectué des valvuloplasties par gonflements de ballonets coronaires assistés ou non par ordinateur. Ils ont pour cela développé une réglette de calibrage et mis au point un algorithme capable de déterminer les coordonnées spatiales d'un objet avec une image échographique en fonction de la position de la sonde. Leur dispositif a été testé d'abord *in vitro* à l'aide de cuves remplies d'eau, puis chez le rat, et enfin chez la brebis. Dans l'étude sur les brebis, cinq mères sur dix ont eu besoin d'une laparotomie pour positionner le fœtus. Les manipulations étaient ensuite réalisées avec ou sans assistance par ordinateur. Le ventricule gauche a été pénétré

avec succès chez tous les animaux, mais chez 6 animaux sur 12 la valve aortique n'a pas pu être franchie (bradycardie fœtale ou trajectoire non assistée par ordinateur). Le temps de délivrance du dispositif de la peau vers le ventricule gauche était plus faible quand la manipulation était assistée par ordinateur. L'implantation par méthode assistée par ordinateur mise au point par cette équipe de recherche était plus rapide et plus précise que les méthodes existantes.

IX.3. Modèle de tachyarythmie supraventriculaire fœtale

Les salves de tachyarythmies supraventriculaires peuvent conduire à une mort fœtale même si elles sont traitées *in utero* ou après césarienne d'urgence. L'injection d'anti-arythmiques à la mère pour traiter les tachyarythmies fœtales n'est pas toujours suivie d'effets, et une césarienne d'urgence nécessaire si le traitement médicamenteux n'est pas efficace signifie une naissance prématurée nécessitant des soins intensifs postnataux.

L'équipe de SHIRAISHI *et al.* [136] a mis au point un modèle de tachyarythmies ventriculaires fœtales pour déterminer la physiopathologie de cette affection et le seuil devant être atteint pour que le fœtus entre en défaillance vasculaire. Le modèle a été créé avec deux hystérotomies de la mère permettant d'extérioriser le cou et le thorax du fœtus. Une thoracotomie a été pratiquée sur le fœtus au niveau du quatrième espace intercostal et une péricardectomie a été effectuée. Des électrodes temporaires de stimulation (pacemaker) ont été suturées sur l'atrium droit. Un ECG a été branché sur chaque membre. Le fœtus a ensuite été remis dans la cavité utérine et l'ensemble refermé. Les mesures de débits ont été faites à l'aide d'échographie doppler. Les mesures (débit ventriculaire droit et gauche, pression veineuse centrale, pression artérielle) ont été effectuées avant stimulation du cœur, puis à 200-300-350 et 400 battements par minutes. Les résultats de cette étude montrent une augmentation de la pression veineuse centrale et une diminution de la pression aortique lorsque la fréquence cardiaque imposée dépasse les 350 battements par minutes. Le débit ventriculaire droit ainsi que la pression aortique diminuait et la pression veineuse centrale augmentait quand la fréquence cardiaque dépassait les 300 battements par minute.

IX.4. Création de fistules artério-veineuses

La création de fistules artério-veineuses a été utilisée chez les fœtus de brebis pour évaluer les changements hémodynamiques dans les artères pulmonaires. Les fistules artérioveineuses systémiques sont créées entre l'artère carotide et la veine jugulaire. La pression était ensuite mesurée dans l'artère pulmonaire gauche, l'aorte, l'atrium et les ventricules à la naissance. Dans l'étude de JOUANNIC *et al.* [76], sur neuf fœtus opérés, toutes les fistules étaient encore

perméables à la naissance. La pression artérielle pulmonaire moyenne était significativement plus élevée chez les agneaux avec fistule. Cette équipe a apporté un nouveau modèle d'étude du tonus vasculaire et de création d'hypertension artérielle pulmonaire pendant la période périnatale.

IX.5. Modèle chirurgical d'hypertension pulmonaire

Le syndrome d'hypertension pulmonaire persistante chez l'enfant se définit comme l'absence de transition circulatoire qui a normalement lieu à la naissance. Pendant la grossesse, le foramen ovale et le canal artériel sont ouverts. En effet, comme le placenta est l'organe d'échange gazeux en milieu intra-utérin, les poumons sont court-circuités et l'essentiel du débit ventriculaire droit passe dans le canal artériel vers l'aorte et seulement 5-10% du débit ventriculaire est redirigé vers les poumons. L'hypertension pulmonaire *in utero* est essentielle au maintien de cet équilibre. A la naissance, le fœtus connaît une transition circulatoire caractérisée par une chute brutale de la résistance et de la pression artérielle vasculaire pulmonaire, ainsi qu'une multiplication par 10 du flux sanguin pulmonaire. Il en résulte une distension mécanique des poumons, une diminution de la pression partielle en CO₂ et une augmentation de la pression partielle en O₂ du poumon. Chez certains nouveaux nés, la chute de la résistance vasculaire n'a pas lieu. Cela conduit à un syndrome d'hypertension pulmonaire persistante, que l'on trouve dans 2 naissances pour mille. L'étiologie est mal connue, mais certaines affections comme des maladies parenchymateuses (pneumonie, aspiration de méconium, syndrome de détresse respiratoire aigüe) ou une vascularisation hypoplasiques (hernie diaphragmatique congénitale) peuvent induire une hypertension artérielle pulmonaire persistante. Dans 20% des cas, aucune cause n'est trouvée.

La ligature du canal artériel chez les fœtus de brebis induit chez ces fœtus des lésions similaires à celles observées chez les enfants atteints de syndrome d'hypertension pulmonaire persistante. Ces modèles ont été utilisés pour comprendre la physio-pathogénie de ce syndrome. BELIK *et al.* [10] se sont servis de ce modèle pour étudier la musculature lisses des vaisseaux pulmonaires. Des brebis ont été opérées entre 123 et 127 jours de gestation. Une thoracotomie fœtale gauche a été réalisée et le canal artériel a été ligaturé avec une suture simple. Douze fœtus ont survécu et dix-neuf sont morts. Douze jours après ligature, les auteurs ont observé une augmentation significative et persistante de la pression artérielle pulmonaire, une chute du débit ventriculaire droit et un épaississement des parois ventriculaires. La composition musculaire en chaînes lourdes de myosine était augmentée dans les vaisseaux pulmonaires et le muscle lisse présentait une réponse de moindre intensité à la stimulation électrique ou potassique. Les propriétés de relaxation de ce muscle ont donc été altérées. Les muscles lisses vasculaires étaient donc très affectés par cette hypertension artérielle induite.

Les modèles permettant d'obtenir une hypertension autrement que par voie chirurgicale ont été décrits dans le chapitre « VIII. Nutrition »

IX.6. Etude des baroréflexes

FRASCH *et al.* [54] se sont intéressés aussi au monitoring du fœtus, plus particulièrement aux baroréflexes. Leurs fœtus ont été instrumentés avec des cathéters carotidiens, aortiques et jugulaires, un ECG fœtal et une mesure de la pression intra-amniotique. Ils testaient la sensibilité du baroréflexe avec deux protocoles. Le premier était un protocole standard décrit par la littérature : mesure de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque avant et après l'injection d'une drogue vasoactive (nitroprusside ou phényléphrine). Le second était une analyse par ordinateur de la pression artérielle (BRS Software, Nevrokard 5.1.3, Nevrokard Kiauta, Slovénie). Parmi les résultats notables, il n'y avait pas de mortalité ni de souffrance fœtale et les auteurs trouvaient une très bonne corrélation entre les mesures invasives et les mesures informatiques.

IX.7. Modèles d'anémie chronique du fœtus

Il existe deux types de modèles d'anémie utilisés chez le fœtus de brebis : les anémies d'origine immunitaire et les anémies d'origine non immunitaire.

Pour les modèles d'anémie d'origine non immunitaire, le protocole opératoire est simple à mettre en œuvre chez la brebis, grâce à la grande tolérance du fœtus de brebis à l'instrumentation chronique. Deux méthodes ont été décrites dans la littérature. Dans les deux cas, le fœtus est instrumenté de façon chronique (cf. Annexe 1). Un cathéter de prélèvement est placé dans la veine ombilicale du fœtus, puis extériorisé à travers la paroi abdominale de la mère. Ensuite, des transfusions iso volumétriques sont effectuées. Les deux protocoles décrits sont : des prélèvements de 30 à 40 ml de sang fœtal 2 à 4 fois par jour à 1.5-2 heures d'intervalle suivis d'une reperfusion du plasma fœtal dilué avec du NaCl 0.9 % (BLAIR *et al.* [15]) ou des prélèvements de 100 ml de sang fœtal une fois par jour, remplacés par du NaCl 0.9% (MASCIO *et al.* [97] , DAVIS *et al.* [30]).

Pour obtenir un modèle d'anémie hémolytique d'origine immunitaire, WOLF *et al.* [161] ont infusé par des anticorps anti-érythrocytes par voie intraveineuse pendant une période de 10 jours chez des fœtus de brebis. Des prélèvements de sang fœtaux étaient effectués pour suivre les effets sur les éléments figurés du sang (hématocrite, volume sanguin, masse et nombre de globules rouges, teneur en fer et en électrolytes du sang, concentration en EPO et suivi des gaz du sang). L'hématocrite des animaux traités a diminué de 10 % alors qu'il a augmenté chez les fœtus non

traités. Lorsque l'hématocrite est descendu de plus de 25%, les lactates et les réticulocytes se sont mis à augmenter. L'équipe a conclu qu'il était possible grâce à une cathérisation chronique du fœtus de brebis d'induire une anémie d'origine immunitaire qui modélisait bien les anémies hémolytiques du nouveau-né humain.

IX.8. Circulation extracorporelle fœtale

Les premières tentatives de réparations d'anomalies congénitales cardiaques sous circulation extracorporelle (CEC) fœtale datent des années 1980. Cette technique n'est pas sans risque pour le fœtus. En effet, la fonction placentaire est détériorée par la circulation extracorporelle, et il s'ensuit des altérations du transport de nutriments et des échanges gazeux. Peu d'études sur l'animal ont été menées dans ce domaine, chez les primates comme chez les brebis. LAM *et al.* [87] ont été les premiers en 2011 à étudier les effets de la circulation extracorporelle sur le métabolisme fœtal et sur les échanges d'oxygène. Dans leur étude, les fœtus ont été placés sous circulation extracorporelle pendant 30 minutes et suivis pendant 2 heures après arrêt de la CEC. Les canules de CEC ont été branchées à la veine jugulaire droite et l'artère carotide droite. Cette approche était plus sûre pour le fœtus en considérant la fragilité et la taille du cœur à mi-gestation. La pompe utilisée était normotherme et non pulsatile. Le placenta n'était pas séquestré hors du circuit. Le circuit de CEC a été préalablement rempli de sang non-maternel récolté au plus tard 24 heures avant la chirurgie dans des poches de sang citrate phosphate dextrose adénosine. Le pH sanguin était ajusté grâce à du bicarbonate de sodium et du mannitol (utilisé comme anti oxydant et agent osmotique). Le cœur du fœtus n'a pas été arrêté pendant les expériences.

Chez les fœtus sous CEC, le pH diminuait pendant l'expérience, et surtout en période post CEC. La pression artérielle moyenne fœtale diminuait aussi. Les lactates fœtaux augmentaient pendant les expériences. La fréquence cardiaque fœtale est restée stable. La glycémie restait stable jusqu'à 90-120 minutes post CEC, puis subissait une chute dramatique. Le débit sanguin ombilical était diminué de 50% par rapport aux données récoltées avant la circulation extracorporelle et le fœtus subissait de grandes variations d'apport en oxygène. Les limites de la circulation extracorporelle fœtale ont été bien illustrées par cette étude. Aujourd'hui, il n'existe toujours pas de protocole optimal de circulation extracorporelle fœtale.

IX.9. Implantation de valves cardiaques *in utero*

EMMERT *et al.* [152] ont étudié la faisabilité technique d'implantation d'un stent-valvé dans l'artère pulmonaire par voie trans-apicale. Ce modèle offre une nouvelle voie pour la chirurgie cardiaque mini-invasive fœtale. Les auteurs ont effectué une laparotomie maternelle puis une

thoracotomie fœtale. Le cœur du fœtus a été canulé et un guide fut inséré à travers la paroi du ventricule droit, jusque dans le canal artériel et l'aorte. Le stent était ensuite déployé dans l'artère pulmonaire. Le positionnement du stent était vérifié grâce à l'échographie, l'angiographie et le scanner. L'implantation des valves a pu être effectuée chez tous les animaux. Chez un animal, le stent écrasait un des feuillets de la valve sigmoïde. La même équipe a aussi réalisé par la même technique [45] des implantations de valves tissulaires construites à l'aide d'une matrice contenant des cellules souches de la moelle osseuses autologues. Ces valves ont été implantées dans l'aorte descendante et le tronc brachiocéphalique.

IX.10. Techniques de mesure du débit cardiaque

Les techniques de mesure du débit cardiaque *in utero* ont été mises au point dans les années 1980. BARLAY *et al.* [8] ont utilisé l'angiographie pour étudier la direction du flux sanguin. Dawes [31] *et al.* ont utilisé des sondes de flux électromagnétiques pour mesurer le flux cardiaque dans les gros vaisseaux tels l'artère pulmonaire, l'aorte ascendante et les veines ombilicales. Ces études avaient pour désavantage la nécessité d'extérioriser le fœtus et de travailler sur des vaisseaux de petit calibre. MESCHIA *et al.* [102] ont utilisé l'implantation permanente de cathéters dans l'artère et la veine ombilicale du fœtus. GOODWIN *et al.* [63, 94] ont utilisé la technique de dilution d'un colorant pour évaluer le débit cardiaque ventriculaire. Ils ont utilisé du vert d'indocyanine qu'ils ont injecté à 5 mg/ml dans le ventricule. Des courbes de dilution du colorant ont été obtenues en prélevant le sang depuis l'artère carotide pour les injections dans le ventricule gauche et dans le *ductus arteriosus* pour le ventricule droit. Un densitomètre mesurait ensuite la concentration en indocyanine, et par intégration planimétrique des courbes de dilutions obtenues, permettaient d'obtenir le débit cardiaque. GILBERT *et al.* [61] ont mis au point une stratégie similaire de mesure de débit cardiaque par la méthode de la thermo dilution. Ils ont injecté 2,5 ml de glucose 5% glacé rapidement dans la veine cave supérieure et enregistraient les variations de température dans l'artère brachiocéphalique et l'artère descendante. Puis ils ont fait la même injection dans la veine cave inférieure. RUDOLPH *et al.* [128] ont utilisé une stratégie moins invasive en injectant des microsphères carbonées marquées avec un nucléide (strontium 85, chromium 51, iode 125 ou scandium 46) incorporé.

X. Thérapies cellulaires

Les premières cellules souches ont été isolées par Leroy Stevens et Barry Pierce dans les années 1950 sur les tératocarcinomes murins. La première greffe de moelle osseuse est effectuée en 1958. C'est en 1998 que les cellules souches embryonnaires sont identifiées chez l'homme par les équipes de Thomson, Itskovitz-Eldor et Reubinoff.

Chez les mammifères, il existe deux grandes catégories de cellules souches : les cellules souches embryonnaires et les cellules souches adultes.

Les cellules souches embryonnaires sont issues des stades embryonnaires. Les premières cellules embryonnaires (blastomères) issues de l'ovule fécondé sont dites totipotentes, c'est-à-dire qu'elles sont capables de se différencier en n'importe quelle cellule de l'organisme. En effet, à partir des huit cellules du blastomère, tous les types apparaissent, et un organisme entier et viable se construit. A partir du 4-5^{ème} jour, les blastomères vont se diviser et former le blastocyste. Les cellules souches embryonnaires sont isolées de l'amas cellulaire interne du blastocyste et sont alors dites pluripotentes, c'est-à-dire capables de former tous les types cellulaires mais pas un individu complet viable.

On retrouve les cellules souches adultes dans de nombreux tissus, où elles serviraient de pool de cellules de réserve pour assurer la pérennité du tissu. Ces cellules se multiplient et donnent des filles en cas de lésion tissulaire, mais aussi pour assurer le renouvellement physiologique des tissus. Les cellules souches adultes sont issues de la spécialisation des cellules pluripotentes embryonnaires. Elles deviennent alors à l'âge adulte soit multipotentes, c'est-à-dire susceptibles de donner différents types de cellules spécifiques d'un lignage cellulaire donné, soit unipotentes si elles ne peuvent donner qu'une seule sorte de cellule. Ce sont des cellules indifférenciées qui se maintiennent dans un état quiescent et qui sont théoriquement présentes dans chaque organe. Il y a trois sources de cellules souches adultes autologues : la moelle osseuse, le tissu adipeux et le sang. Le cordon ombilical et le liquide amniotique peuvent aussi servir de base d'extraction. La première banque de liquide amniotique de *Biocell Center Corporation* a ouvert ses portes à cet effet en 2009 à Medford, MA, aux Etats Unis. Les cellules souches adultes sont classées en fonction de leur origine tissulaire (cellules souches mésenchymateuses, cellules souches hématopoïétiques, etc.).

L'utilisation de cellules souches adultes pose moins de problèmes éthiques que les cellules souches embryonnaires car elle ne nécessite pas la destruction d'un embryon. De plus, ces cellules semblent porter les plus hauts espoirs d'applications cliniques car elles permettent de faire des autogreffes chez l'adulte. Le risque de rejet de greffe est donc presque inexistant. C'est pour cette

raison que les bourses de recherches américaines sont plus orientées vers la recherche sur les cellules souches adultes. Cependant, l'utilisation de cellules souches adultes pour traiter des maladies de l'enfant nouveau-né pose des problèmes de rejet de greffe. En effet, il faut que le donneur adulte et l'enfant à traiter aient des antigènes d'histocompatibilité identiques. Il est rare que de tels appariements existent, faute de donneurs. La transplantation devient alors impossible. De plus, lorsque la greffe est envisagée, l'enfant a déjà souvent souffert des conséquences de sa maladie et les transplantations sur patient malade sont plus risquées et de moins bon pronostic [51]. Il est souvent nécessaire pour contourner ces écueils de préparer le patient avec des protocoles de radiothérapie et chimiothérapie destructrices, ce qui augmente la morbidité et la mortalité chez les patients pédiatriques. La thérapie cellulaire *in utero* est une alternative thérapeutique prometteuse dans ce domaine car elle permet de s'affranchir des rejets de greffe. En effet, *in utero*, les études chez les modèles animaux montrent que le fœtus bénéficie d'une période pendant laquelle son système immunitaire est immature et accepte les greffes durablement et sans rejet.

X.1. Le modèle brebis pour les thérapies cellulaires

Les études sur les cellules souches chez la brebis visent à étudier le potentiel de greffe et les capacités de différenciation des cellules souches injectées à un fœtus sain, l'animal servant alors de véritable incubateur biologique. Le fœtus de brebis a aussi été utilisé dans certains cas pour mettre au point des stratégies de thérapies cellulaires testées sur des modèles fœtaux pathologiques. Les différentes études s'intéressent au potentiel des cellules souches adultes et embryonnaires. Les cellules souches mésenchymateuses et les cellules souches hématopoïétiques sont les lignées cellulaires qui ont été utilisées.

Les cellules souches mésenchymateuses sont des cellules multi-potentes dérivant du mésoderme. Les sources les plus abondantes de cellules souches mésenchymateuses sont la gelée de Wharton, le sang de cordon ombilical, le bourgeon dentaire de la troisième molaire mandibulaire, le liquide amniotique et le tissu adipeux. Elles sont capables de se différencier en ostéoblastes, en chondrocytes, en adipocytes, en hépatocytes, etc.

Les cellules souches hématopoïétiques sont des cellules multipotentes à l'origine de toutes les lignées de cellules sanguines. Chez le fœtus, elles émergent lors du développement embryonnaire au niveau de la région Aorte-Gonades-Mésonéphros et migrent vers le foie fœtal où elles se multiplient massivement. Ensuite, ces cellules vont coloniser le thymus, la rate et enfin la moelle osseuse. Chez l'adulte, on ne les retrouve que dans la moelle osseuse des os. Elles peuvent être extraites par prélèvement direct osseux, ou par prélèvements sanguins, après un traitement de stimulation aux cytokines (G-CSF *Granulocyte Colony Stimulating Factors*) qui induit le relargage

de cellules dans la circulation sanguine à partir du compartiment de la moelle osseuse. Les autres sources de cellules souches hématopoïétiques sont le sang de cordon et le sang périphérique.

Les modèles d'étude du potentiel de réussite de greffes de cellules souches mésenchymateuses comme hématopoïétiques ont lieu à 45-90 jours de gestation. A ces dates, le système immunitaire du fœtus est immature, ce qui autorise les hétérogreffes sans rejets. Les protocoles visant à objectiver la prise de greffe font appel à des injections intra-péritonéales fœtales pour suivre la prise de greffe sur chaque organe. Les quantités de cellules souches injectées sont très variables, et vont de 10^6 à 10^8 cellules par kilogramme de poids vif du fœtus. D'autres protocoles plus spécifiques ont fait appel à des injections intra-organe écho-guidées. Ces cellules sont soit testées chez le fœtus sain, soit testées chez le un modèle lésionnel fœtal. Les cellules souches proviennent soit du fœtus, soit de l'adulte, soit du sang de cordon, soit du liquide amniotique. Lors d'injection de cellules souches d'une autre espèce chez le fœtus, celui-ci devient un véritable incubateur pour la croissance des cellules souches et l'animal qui naît est alors une chimère. Ces injections sont possibles car le fœtus possède une fenêtre d'immunotolérance pendant la gestation qui autorise les greffes sans rejets.

X.1.a.Fœtus sain

Le fœtus sain a été utilisé pour tester le potentiel de greffe et les capacités de différenciation des cellules souches, qu'elles soient d'origine mésenchymateuse ou hématopoïétique. Chez ces fœtus sains, les cellules souches implantées sont soit cultivées à partir de prélèvements faits chez l'adulte, pour les cellules souches de la moelle osseuse ou du sang périphérique de l'adulte, soit cultivées à partir de prélèvements chez le fœtus (foie, moelle osseuse). Enfin, certaines cellules sont issues du sang de cordon ombilical fœtal.

X.1.a.i. Cellules souches d'origine adulte

Les cellules souches d'origine adulte sont prélevées dans la moelle osseuse de l'homme ou dans le sang périphérique. Elles proviennent de donateurs volontaires sains.

Les premières études qui ont permis la mise au point du modèle de transplantation fœtal de cellules souches ont été développés dans les années 1980. La principale problématique rencontrée à l'époque était les rejets de greffe cellulaires. CROMBLEHOLME *et al.* [26] ont été les premiers à s'intéresser au rôle des lymphocytes T dans les rejets de greffe. Ils ont injecté par voie péritonéale deux types de populations cellulaires hématopoïétiques de la moelle osseuse de brebis adultes chez des fœtus : une population déplétée¹ partiellement en lymphocytes T et une population brute. Le

taux d'apparition de rejets de greffe est passé de 10-15 % à 40-75 % entre les patients ayant reçu les cellules souches déplétées en lymphocytes T et les autres, et le taux de prise de greffe était inférieur chez les fœtus ayant reçu des cellules souches déplétées. L'équipe a démontré l'importance du protocole d'implantation et de traitement de cellules souches avant l'implantation pour la réussite des greffes. Une fois les modèles de greffes établis, les équipes qui ont suivi ont pu étudier et comparer les prises de greffes et la différenciation cellulaire des cellules souches greffées.

LIECHTY *et al.* [89] par exemple ont démontré les capacités de prises de greffe par des injections intra-péritonéales de cellules souches mésenchymateuses. Ils ont fait des hétérogreffes avec des cellules souches issues de moelle osseuse adulte humaine ($5-20 \times 10^8$ cellules par fœtus injectées). Cette équipe a ensuite suivi la prise de greffe dans le foie, la rate, les poumons, la moelle osseuse, le thymus, le cerveau, le cœur, le muscle squelettique, le cartilage et le sang des fœtus. Les cellules se greffaient bien chez 28/29 brebis. Presque tous les tissus analysés avaient des cellules souches greffées dès deux semaines post injections (foie, rate, moelle osseuse, thymus, tissu adipeux, poumon, cartilage articulaire, muscle squelettique et cardiaque).

OPPENHEIM *et al.* [113] ont étudié un autre modèle de chimères : les chimères chèvre/brebis, en injectant des cellules souches de moelle osseuse adultes déplétées en lymphocyte T de brebis adultes chez des chèvres par voie intra-péritonéale. Ils ont obtenu des taux de réussite moins bons que ceux décrits pour les modèles de chimères homme/brebis.

CHAMBERLAIN *et al.* [20] ; PETRIZZI *et al.* [120] ; et AIREY *et al.* [3] ont focalisé leurs recherches sur un organe en particulier : le foie et le cœur respectivement. Les cellules souches de moelle osseuse humaine adultes (5×10^5 cellules dans 0.3 ml d'aliquot) ont été injectées par voie intra-hépatique (lobe droit) et intra-péritonéale par CHAMBERLAIN *et al.* Les résultats ont montré un taux de greffe nettement supérieur quand l'implantation est intra-hépatique par rapport à l'implantation intra-péritonéale. Les hépatocytes greffés se sont distribués préférentiellement en zone péri-portale après injection intra-péritonéale et dans le parenchyme hépatique intra-lobulaire après injection par voie intra-hépatique. Les cellules marquées dans le foie avaient les caractéristiques d'hépatocytes. Les cellules souches étaient donc capables de se différencier directement en hépatocytes, sans avoir à se différencier d'abord en cellules souches de la lignée hématopoïétique dans la moelle osseuse.

PETRIZZI *et al.* [120] et AIREY *et al.* [3] ont étudié les capacités de prises de greffe dans le cœur. PETRIZZI *et al.* ont fait des injections intracardiaques (apex du ventricule gauche) de fibroblastes hétérologues ($10-15 \times 10^6$). A l'autopsie, les fibroblastes étaient distribués dans le

myocarde hôte et formaient des conglomerats entre les fibres myocardiques du receveur. AIREY *et al.* injectaient les cellules souches par voie intra-péritonéale. Cette équipe a obtenu un très bon taux de réussite de greffe (20/21) et a observé dans le cœur du fœtus des cellules humaines probablement fonctionnelles au vu des résultats biologiques, tissulaires et cellulaires. Les cellules injectées ont adopté les caractéristiques des cellules de Purkinje (morphologie en rubans de cellules souches agrégées, phénotype semblable à celui des fibres de Purkinje, fortes concentrations intracellulaires en glycogène). La distribution des cellules souches était plus importante dans le septum et les ventricules par rapport aux *atria*.

X.1.a. ii. Cellules souches d'origine fœtale

ALMEIDA-PORADA *et al.* [5] ont publié de nombreuses études sur le potentiel de différenciation des cellules souches mésenchymateuses. Une de leurs études présentait un mode opératoire original pour étudier le potentiel de différenciation des cellules souches mésenchymateuses métanéphriques humaines. Des cellules de reins de fœtus humains de 14 à 22 semaines de gestation ont été utilisées. Un lot était implanté sans culture préalable et l'autre lot était cultivé *in vitro* pour s'assurer de l'absence totale de traces de cellules hématopoïétiques résiduelles. Dès deux mois post transplantation, des cellules souches hématopoïétiques humaines et des hépatocytes humains étaient détectables chez les fœtus des deux groupes sans présence d'albumine humaine dans le sérum du fœtus. Malgré l'absence d'albumine humaine dans le sérum fœtal, les hépatocytes humains présentaient tous les marqueurs d'un hépatocyte fonctionnel. Les cellules souches mésenchymateuses rénales étaient donc capables de se différencier en hépatocytes fonctionnels, ainsi qu'en cellules hématopoïétiques de façon durable.

La principale source de cellules souches hématopoïétique fœtale est le foie. Les transplantations de cellules souches hématopoïétiques issues de sources fœtales (humaines ou ovines) ont donc été faites à partir de cette source de cellules. FLAKE *et al.* [51] ont pour la première fois décrit la création de chimères hématopoïétiques chez la brebis. Les cellules souches provenaient du foie de fœtus humains et étaient injectées par voie intra-péritonéale chez les fœtus receveurs. L'équipe a observé une prise de greffe chez 3 fœtus sur 4. Le chimérisme était retrouvé jusqu'à 6 mois après la procédure.

ZANJANI *et al.* [168] ont étudié la greffe et l'expression de cellules souches hématopoïétiques chez des brebis après transplantation *in utero*. Les cellules souches provenaient de foies humains fœtaux. Ils ont obtenu un taux de prise de greffe de 40 % et les greffes persistaient jusqu'à cinq ans post implantation. La différenciation cellulaire se faisait dans de multiples lignées. SCHEOBERLEIN *et al.* [133] ont obtenu des résultats similaires avec des greffes autologues et

allogènes de cellules de foie de fœtus. NARAYAN *et al.* [109] ont utilisé des cellules souches hématopoïétiques dérivées de cellules souches embryonnaires disponibles dans le commerce (lignée H1 de Wicell, Madison WI) pour démontrer que les cellules souches pouvaient être implantées à une deuxième génération de receveurs. Pour cela, l'équipe a suivi le protocole classique d'implantation de cellules souches chez des fœtus. Ensuite, l'équipe a prélevé des cellules souches dans la moelle osseuse de ces mêmes animaux qu'elle a réimplantées chez d'autres fœtus avec le même protocole. NARAYAN *et al.* ont confirmé par PCR et cryométrie de flux que les deuxièmes receveurs acceptaient également la greffe cellulaire. ALMEIDA-PORADA *et al.* [6] ont obtenu des résultats similaires en stimulant la mobilisation de cellules souches de la moelle osseuse chez des animaux ayant été greffés un an et demi plus tôt. La mobilisation des cellules souches chez les animaux étaient faites par injection de cytokines. Ils ont greffé et évalué l'ensemencement cellulaire chez un deuxième fœtus transplanté. L'équipe a montré que les cellules souches étaient capables de s'implanter chez le premier fœtus et de donner une moelle fonctionnelle, et qu'une fois implantées, cette population de cellules souches pouvait être mobilisée pour recueillir d'autres cellules souches à transplanter chez un autre animal. L'animal greffé *in utero* pouvait donc une fois adulte servir de réservoir de cellules souches pour une utilisation ultérieure.

Enfin, les cellules souches d'origine fœtale ont été utilisées par SURBEK *et al.* [141] et KANTOFF *et al.* [78] pour mettre au point des modèles de transfection de cellules souches. Ces études sont à la frontière entre la thérapie cellulaire et la thérapie génique. Les cellules souches sont recueillies selon les procédés habituels, puis cultivées et transfectées *in-vitro* par des virus. Les cellules ayant intégré le gène transfecté sont ensuite réintroduites chez le fœtus et l'expression de ces gènes est étudiée. SURBEK *et al.* se sont notamment attachés à étudier la faisabilité de prélèvements de cellules souches transcutanés par échographie pour faciliter l'accès à ces cellules et le développement de ces méthodes thérapeutiques.

X.1.a.iii. Cellules souches du sang de cordon

SCHOEBERLEIN *et al.* [132] ont effectué des allogreffes à partir de sang de cordon de brebis (7.7×10^6 cellules par fœtus injectées) sur des fœtus de brebis. Ils ont fait des injections intra-péritonéales à partir de ces cellules souches. Presque tous les tissus analysés ont présenté un ensemencement par les cellules souches greffées dès deux semaines post injections (foie, rate, moelle osseuse, thymus, tissu adipeux, poumon, cartilage articulaire, muscle squelettique et cardiaque).

YOUNG *et al.* [167] ont implanté des cellules souches mésenchymateuses issues du cordon ombilical humain. Ils ont injecté les cellules souches par voie intra-péritonéale, à des doses de 1 à

10 x 10⁵ cellules par fœtus. L'équipe n'a pas observé de corrélation entre la dose de cellules injectées et le taux d'implantation.

MCNIECE *et al.* [100] se sont intéressés aux effets de l'amplification cellulaire de cellules souches hématopoïétiques *in vitro*. En effet, pour obtenir un grand nombre de cellules souches à partir d'un échantillon, il y a toujours une étape d'amplification cellulaire. MCNIECE *et al.* ont conclu que ces cellules souches amplifiées de nombreuses fois se greffaient rapidement, mais avaient un potentiel de maintien de la greffe à long terme faible par rapport à des cellules soumises à un nombre de cycles d'amplification inférieur de moitié.

X.1.b Modèle lésionnel fœtal

X.1.b.i. Potentiel réparateur des cellules souches

LIECHTY *et al.* [89] ont étudié le potentiel réparateur des cellules souches en créant des lésions au niveau de la queue des fœtus. Ces lésions ont été créées par caudectomie sous fœtoscopie. L'équipe a ensuite injecté des cellules souches mésenchymateuses humaines par voie intra-péritonéale à ces fœtus. Les fœtus ayant reçu des cellules souches ont vu leurs lésions caudales colonisées par ces cellules souches. La greffe cellulaire a persisté jusqu'à 13 mois après l'implantation.

X.1.b.ii. Reconstruction trachéale

Les modèles de reconstruction trachéale pourraient apporter une réponse thérapeutique aux anomalies congénitales de la trachée non traitables à ce jour (sténoses, atrésie et agénésie trachéale). Les traitements actuels consistent en des implantations de prothèses ou des protocoles chirurgicaux dont les effets secondaires sont nombreux. Les cellules souches mésenchymateuses de diverses origines ont été employées pour fabriquer du cartilage. Ce cartilage a ensuite été réimplanté au niveau de la trachée chez le fœtus de brebis.

Ainsi, l'équipe qui a travaillé sur la reconstruction de tissu cartilagineux est celle de KUNISAKI *et al.* [86]. Cette équipe a utilisé trois sources de cellules souches mésenchymateuses : cellules souches mésenchymateuses isolées du liquide amniotique, de la moelle osseuse néonatale et du sang de cordon ombilical fœtal ovin. Leur première série d'expériences (FUCHS *et al.* [58]) leur a permis de mettre au point leur modèle de croissance cellulaire. Les cellules souches mésenchymateuses avaient pour origine la moelle osseuse d'agneaux nouveaux nés. L'équipe a créé une matrice biodégradable en polymères d'acide polyglycolique (Albany International, Mansfield, MA), qu'ils ontensemencé avec 60 x10⁶ cellules par cm² de plaque. Les matrices ont été

conservées dans un bioréacteur le temps de la colonisation par les cellules souches. Ensuite, les tissus créés ont été implantés chez les fœtus dans un défaut créé par retrait d'un plastron trachéal longitudinal de 4-5 anneaux trachéaux. Les agneaux ont été évalués à la naissance. Les chercheurs n'ont pas observé de différence significative de survie entre le groupe traité et le groupe témoin. La greffe prenait bien malgré son origine hétérologue. Les matrices ont gardé un phénotype cartilagineux *in vivo* et les auteurs ont observé une épithélialisation de la greffe sur la trachée.

Ultérieurement, la même équipe s'est attachée à créer des tissus à partir d'autres sources de cellules souches. Dans cette étude, FUCHS *et al.* [59] ont cette fois-ci utilisé du sang de cordon ombilical fœtal pour isoler les cellules souches et construire du cartilage. Les cellules souches furent prélevées à 80-120 jours de gestation. Dans cette étude, les auteurs n'ont pas effectué d'implantation de leurs matrices mais ont étudié les caractéristiques des cartilages obtenus. Les cartilages naturels et construits furent comparés. Les cellules de cordon se différenciaient et agissaient histologiquement et fonctionnellement comme les cellules natives.

La reconstruction de cartilage serait donc possible à partir de cellules souches de cordon fœtal ou de la moelle osseuse de nouveau nés. Pour se rapprocher le plus possible d'une situation envisageable en clinique, le même laboratoire a construit des tissus à partir de cellules souches mésenchymateuses isolées dans le liquide amniotique. En effet, le prélèvement de liquide amniotique est un geste beaucoup moins invasif et pratiqué de façon routinière par rapport aux prélèvements de moelle osseuse fœtale ou de sang de cordon. Les tissus ainsi créés ont été implantés par KUNISAKI *et al.* [86]. La gestation a été menée à terme et les fœtus furent euthanasiés à 1-2-7-9 et 10 jours. Le taux de survie à la naissance était de 71.4 %. Tous les fœtus respiraient spontanément à la naissance, et aucun ne présentait de signes de détresse respiratoire. Après la naissance, tous les fœtus ont développé un stridor d'intensité variable sans qu'il n'y ait de modification du niveau d'activité ou du comportement de ces agneaux par rapport aux témoins. Les cellules souches du donneur ont survécu *in vivo* et ont la même morphologie et fonction que les cellules natives. Les auteurs ont observé le développement d'un épithélium ciliaire sur la greffe, pas de tissus de granulation intra-trachéal, et une faible infiltration en cellules mononuclées.

Enfin, les chercheurs du même laboratoire ont comparé les propriétés des cartilages obtenus par les trois sources de cellules souches qu'ils ont étudiées (cellules mésenchymateuses issues du liquide amniotique, de la moelle osseuse néonatale et du sang de cordon ombilical fœtal ovin). La comparaison a été faite entre les cartilages et par rapport à du cartilage natif hyalin et élastique natif. Les critères d'évaluation étaient morphologiques, histologiques et immunohistochimiques. Les cellules souches issues du liquide amniotique ont proliféré de façon significativement plus rapide

que les cellules souches issues des autres sources. Les tissus construits avaient des niveaux significativement plus bas en glycosaminoglycanes que le cartilage hyalin natif. La quantité d'élastine était comparable entre le cartilage élastique et le cartilage construit à partir des cellules souches amniotiques. La source de cellules souches est donc déterminante sur les caractéristiques du cartilage construit.

XI. Pneumologie. Modèles d'affections de l'appareil respiratoire

XI.1. Modèles de hernies diaphragmatiques

La hernie diaphragmatique congénitale se caractérise par une absence de fermeture du canal pleuro-péritonéal entre 9 et 10 semaines de grossesse chez la femme. Les organes abdominaux entrent alors dans le thorax du fœtus. Ceci entraîne une hypoplasie pulmonaire. L'incidence des hernies diaphragmatiques congénitales est d'environ 1 naissance sur 3500, et le taux de mortalité pour ces enfants avoisine les 60%. Souvent, il existe des malformations associées telles des cardiopathies, des fentes palatines ou des anomalies du système nerveux central, rénales, ou squelettiques. Quatre-vingt pourcent des hernies diaphragmatiques congénitales chez l'homme sont postéro-latérales, et 85 % d'entre elles sont à gauche, 10% à droite et 5% bilatérales. Le diagnostic chez l'homme se fait le plus souvent par échographie, au second ou au troisième trimestre de gestation pour les hernies de plus petite taille. Les hernies de plus petites tailles sont diagnostiquées plus tardivement car il faut attendre que le différentiel de pression entre l'abdomen et le thorax soit suffisant pour que les organes abdominaux se déplacent dans la cavité thoracique. Les premières tentatives de soins chez l'homme avant l'avènement de l'échographie ont consisté réparer la hernie diaphragmatique de façon chirurgicale après la naissance. Cela nécessitait des soins post-opératoires lourds pour les enfants (mise sous circulation extracorporelle) et le taux de survie rapporté par ces études est très faible.

Avec l'échographie, le diagnostic anténatal de ces malformations est devenu possible et de nouveaux traitements anténataux ont été recherchés. Les premiers modèles animaux de hernies diaphragmatiques datent de cette époque, dans les années 1980. Ensuite, ces modèles ont été utilisés pour étudier les moyens possibles de soutenir les enfants à risque de syndrome de détresse respiratoire aigu à la naissance, tels les enfants prématurés.

XI.1.a. Construction du modèle et techniques de réparation des hernies créées

SOPER *et al.* [137] font partie des premiers à avoir mis au point et décrit ce modèle. Après utérotomie, une thoracotomie était effectuée chez le fœtus au niveau du 10^{ème} espace intercostal gauche et le diaphragme était ainsi mis en évidence. Une incision dans le diaphragme était ensuite pratiquée au niveau du bord antérieur de la rate et du fundus de l'estomac. Ensuite, une portion de l'estomac et de l'omentum fut introduite dans la cavité thoracique. La plaie de thoracotomie était ensuite fermée.

Une fois l'opération sur le fœtus effectuée, la quantité de liquide amniotique perdue a été remplacée par du sérum physiologique ou du *Ringer lactate* réchauffé. La brebis a été placée sous antibiotiques et la plaie de laparotomie a été fermée. La création de la hernie diaphragmatique a été effectuée chez des fœtus âgés de 77 à 79 jours de gestation.

Cette équipe s'est ensuite attachée à étudier le modèle créé et à trouver une méthode de réparation. La réparation chirurgicale de la hernie diaphragmatique [137] a eu lieu entre 106 et 123 jours de gestation. Deux techniques de réparation ont été expérimentées par cette équipe. Les deux approches débutaient par une laparotomie de la mère, puis une ouverture de l'utérus. Dans la première méthode, l'incision cutanée sur le fœtus débutait à K9 et s'étendait jusqu'à la paroi abdominale. Les côtes K11 à 13 étaient sectionnées, et la hernie était réduite. Ensuite, un patch était suturé au niveau du défaut causé par la hernie. Le fœtus est ensuite refermé par sutures plan par plan, sans toucher aux côtes. La deuxième méthode avait pour but de préserver la stabilité apportée par la cage thoracique. La hernie diaphragmatique était donc abordée par voie exclusivement abdominale. Les organes abdominaux étaient remis dans la cavité abdominale avec éventuellement agrandissement iatrogène de la hernie si nécessaire. Ensuite, la hernie diaphragmatique était partiellement fermée uniquement avec du fil de suture. Le reste du défaut diaphragmatique était ensuite comblé avec le même système de patch.

Cette équipe a opéré 71 brebis qui ont porté 120 fœtus au total. Une tentative de création de hernie diaphragmatique a eu lieu chez 70 fœtus. Chez 54 fœtus, cette opération a été menée à bien. Chez 14 fœtus, l'opération n'a pas réussi. Trois fœtus ont été retrouvés morts le jour de la réparation et une brebis a avorté 14 jours après l'opération. L'équipe a effectué les réparations chez 30 agneaux (15 avec la première méthode, 15 avec la seconde). Quatorze fœtus sont morts après la réparation (avortement) 8 avec la première méthode, et 6 avec la seconde. Un fœtus a survécu jusqu'à 123 jours post opération.

Les auteurs de cette étude ont indiqué les différences entre leur modèle et ceux décrits précédemment. Le modèle de Haller *et al.* [66] par exemple a été jugé moins adaptée à un transfert chez l'homme selon les auteurs de cette étude car les hernies ont été créées plus tardivement par ces équipes (96-107 jours), à un stade où la maturation du poumon est déjà terminée chez la brebis.

Enfin, l'équipe de SOPER *et al.* s'est servie de son propre modèle pour étudier les effets de la hernie diaphragmatique sur le développement et la morphologie des poumons du fœtus [122] ainsi que sur la morphologie des pneumocytes de type II. Ces études ont mis en évidence chez les modèles non traités de hernie diaphragmatique des poumons hypoplasiques, une abondance de pneumocytes de type II, des parois alvéolaires plus fines que la moyenne chez les fœtus à hernie

diaphragmatique. La réparation chirurgicale entraînait une normalisation des coupes histologiques au MET (Microscope Electronique à Transmission).

Une autre équipe, celle de FAUZA *et al.* [50] a proposé un autre traitement des hernies diaphragmatiques: l'ingénierie tissulaire. Pour cela, le même modèle de création de hernie diaphragmatique fut employé. Par ailleurs, un prélèvement de tissu musculaire squelettique était effectué au niveau du cou ou d'un membre postérieur du fœtus. Après expansion de ces cellules *in vitro*, une autogreffe constituée de ces cellules cultivées placées entre deux couches de sous muqueuse intestinale était réalisée après la naissance chez les fœtus. Chez les fœtus du groupe témoin, des greffes dites acellulaires constituées uniquement des deux couches de sous muqueuse intestinale étaient effectuées. Chez les fœtus recevant une greffe acellulaire, les organes faisaient hernie dans la cavité thoracique. Un seul fœtus greffé avec une autogreffe présentait une hernie diaphragmatique persistante à la naissance

XI.1.b. Syndrome de Détresse Respiratoire Aigüe et hernies diaphragmatiques

Malgré les recherches dans le domaine de la gestion des nouveaux nés avec hernie diaphragmatique congénitale (mise sous circulation extracorporelle avec membrane d'oxygénation, mise sous ventilateur artificiel, thérapie au surfactant, chirurgie anté-natale), les enfants qui développent un syndrome de détresse respiratoire aigüe suite à une hernie diaphragmatique ont un taux de mortalité et de morbidité très élevé.

Les poumons d'un enfant affecté par une hernie diaphragmatique ressemblent à ceux d'un enfant prématuré ayant un syndrome de détresse respiratoire aigüe, à savoir qu'ils ont une compliance pulmonaire (capacité du poumon à modifier son volume en réponse à une variation de pression) réduite, forment des membranes hyalines et ont une production insuffisante de surfactant. Le traitement des enfants à risque de naissance prématurée est une administration préventive de corticoïdes dans les stades précoces de développement du poumon. Cette thérapie a donc été testée chez la brebis pour voir si une administration de corticoïdes pouvait aider les fœtus avec hernie diaphragmatique congénitale. SCHNITZER *et al.* [131] ont fait ces études. Les fœtus ont reçu des injections intraveineuses de cortisol à partir du 133^{ème} jour de gestation, deux fois par jour pendant quatre jours à deux doses différentes 33 mg ou 50 mg. Le cortisol ne traversait pas la barrière placentaire, donc les injections intraveineuses étaient directement administrées au fœtus. Les hernies diaphragmatiques étaient de taille différente. L'équipe observe une meilleure maturation pulmonaire chez les poumons traités, un amincissement de l'interstitium pulmonaire et des alvéoles avec une paroi plus mûre et une meilleure aération.

XI.2. Modèles d'obstruction trachéale

L'obstruction trachéale est utilisée dans le traitement de la hernie diaphragmatique congénitale. En effet, DIFIORE *et al.*[35] ont démontré qu'une ligature de la trachée conduisait à une hyperplasie pulmonaire capable de réduire la hernie ou bien les effets délétères de la hernie à la naissance. La technique de thérapeutique de hernies diaphragmatiques PLUG (*Plug the Lung Until it Grows*) était née. Pour cela, l'équipe a utilisé le modèle classique de hernie diaphragmatique par voie chirurgicale conventionnelle. La ligature de la trachée s'est faite *in utero* par ligature simple. Les fœtus ayant subi une ligature trachéale avaient des poumons hyperplasiques et les organes abdominaux étaient repoussés dans la cavité abdominale par les poumons. De plus, la maturation des poumons était revenue à la normale chez ces fœtus.

Depuis, le fœtus de brebis a servi de support pour trouver un dispositif permettant une obstruction trachéale stable, pérenne et n'abimant pas les tissus fœtaux. DEPREST *et al.* [33] ont utilisé des ballons trachéaux gonflables qui peuvent être placés par endoscopie ou par extériorisation du fœtus. Cette équipe utilisait des ballons vasculaires. Le ballon était inséré monté sur un cathéter, gonflé avec du fluide isotonique une fois mis en place à l'endroit souhaité puis le dispositif de délivrance est retiré. L'obstruction a été maintenue jusqu'à 18 jours chez ces fœtus et cette période était suffisante pour créer une hyperplasie pulmonaire. KOHL *et al.* [81] ont ensuite amélioré cette technique en implantant les ballons par voie fœtoscopique percutanée. Les brebis ont été placées en décubitus dorsal. Le diamètre trachéal de chaque fœtus a été mesuré par échographie abdominale maternelle pour ajuster la taille des ballons (remplis de silicone dans cette étude). Des canules d'endoscopie de 11 Fr ont été implantées de façon percutanée. Le fœtus a ensuite été placé en décubitus dorsal et stabilisé par une ligature à la mandibule. Un cathéter de 11 Fr était ensuite inséré dans l'oropharynx du fœtus. Le ballon était ensuite placé dans la trachée. L'équipe a réussi les manipulations chez neuf fœtus de brebis. La durée totale des opérations était de 2 heures. Cette étude ouvre la voie d'une pose de dispositifs d'occlusion trachéale plus aisée.

FAUZA *et al.* [49] sont parvenus à poser des ballons d'occlusion trachéale par guidage échographique suite à une laparotomie sans ouverture de l'utérus. L'opération a réussi chez les sept fœtus de l'étude, mais chez 4 fœtus sur 7, à l'autopsie, le ballonnet avait migré.

Cependant l'occlusion trachéale n'est pas sans conséquence sur le développement pulmonaire du fœtus. Chez les modèles animaux, les fœtus connaissent une diminution de la densité en pneumocytes de type II et un déficit en surfactant dramatique. Plusieurs améliorations possibles de la méthode thérapeutique ont été étudiées chez le fœtus de brebis : l'occlusion dynamique,

l'occlusion trachéale accompagnée d'une transfection avec des facteurs de croissance, l'arrêt de l'occlusion une semaine avant le part associé ou non à l'administration de glucocorticoïdes.

SAADA *et al.* [129] ont étudié l'apport de facteur de croissance des kératinocytes avec l'occlusion trachéale comme méthode thérapeutique. Le Facteur de croissance des kératinocytes stimule la prolifération et la maturation des pneumocytes de type II. Le facteur de croissance a été introduit par transfection via des liposomes. Les auteurs ont constaté chez les fœtus traités une augmentation de la production de surfactant en plus des effets normaux observés lors d'occlusion trachéale simple.

JELIN *et al.* [73] ont mis au point une technique d'occlusion trachéale dynamique et BRATU *et al.* [18] ont étudié les effets d'un arrêt de la compression trachéale une semaine avant le part, associée ou pas à une administration de corticoïdes.



XII. Cancérologie. Modèles de thérapies en cancérologie

Les alternatives thérapeutiques pour les cas de tumeurs du nouveau-né tels le tératome sacro-coccygien et les tumeurs au cerveau sont encore très limitées de nos jours. Le tératome sacro-coccygien survient dans une naissance sur 35 000. C'est la tumeur la plus couramment rencontrée chez les nouveaux nés. Le seul traitement proposé est l'exérèse large à la naissance suivi ou non de thérapies adjuvantes si le tératome est malin. Pour les tumeurs cérébrales qui engendrent une hydrocéphalie chez le fœtus, la seule thérapie est une chirurgie fœtale ouverte. Ceci augmente grandement le risque de naissance prématurée et de perte du fœtus.

Le taux de détection de ces anomalies en période anté-natale a considérablement augmenté grâce aux suivis échographiques. Il est donc logique de tenter d'élargir l'offre thérapeutique pour les enfants atteints de ces maladies. Un moyen de contrôler ces tumeurs serait de détruire la vascularisation tumorale, pour limiter la croissance et éviter les disséminations de cellules cancéreuses dans l'organisme. Les ondes échographiques ciblées à haute fréquence (*High Intensity Focused Ultrasound*- HIFU) libèrent une grande quantité d'énergie thermique à un endroit précis, induisant une nécrose tissulaire, sans toucher les tissus environnants. Le fœtus de brebis a été utilisé par PAEK *et al.* [116] pour constituer un protocole de coagulation induite par HIFU. Ils ont testé leur technique sur plusieurs organes : le foie, les poumons, les reins, les muscles et le placenta sur des fœtus âgés de 128 à 142 jours. L'équipe a préparé les mères par laparotomie médiane sans ouverture placentaire. Chez un animal, la paroi abdominale n'a pas été ouverte. L'équipe a tenté d'induire des coagulations tissulaires en appliquant 2000 W/cm^2 pendant 3 à 5 secondes sur l'endroit visé. Tous les fœtus étaient vivants après les manipulations et leur fréquence cardiaque était stable immédiatement après la manipulation. Un fœtus présentait une marque de brûlure sur le flanc au-dessus des côtes et la brebis n'ayant pas eu de laparotomie avait une brûlure au 1^{er} degré sur la peau. Toutes les lésions ont pu être créées avec succès à l'endroit visé et les auteurs n'observaient pas de thrombose macroscopiquement visible des gros vaisseaux. Les auteurs ont conclu qu'il était possible de créer des lésions de coagulation tissulaire avec succès. Les deux cas de brûlures ont montré qu'il faut étudier et caractériser les propriétés acoustiques de chacun des tissus traversés (os, poil non rasé) avant de transférer ce modèle à l'homme.

XIII. Neurologie

La spina bifida est une malformation osseuse congénitale localisée au niveau du rachis ayant des conséquences neurologiques chez l'enfant. Elle est caractérisée lors du développement de l'embryon par un défaut de fermeture de la partie dorsale des vertèbres. Cette malformation se crée à la fin du premier mois de développement embryonnaire. Il existe plusieurs stades de spina bifida. La spina bifida dite occulte est la plus souvent asymptomatique. Elle concerne 10% de la population et sa découverte est souvent fortuite lors d'une radiographie. Il n'y a pas de hernie des tissus nerveux. La *spina aperta* désigne le cas où la malformation met à nu une partie de la moelle épinière et des racines nerveuses. Ces tissus font hernie à travers l'orifice anormal dans les vertèbres. On appelle cette hernie le myeloméningocèle. L'étiologie de la spina bifida est peu connue (possibles carences en acide folique, composante héréditaire) et les formes compliquées touchent 1 naissance sur 2000. Cette malformation est souvent associée à d'autres malformations du système nerveux comme les malformations du syndrome d'Arnold-Chiari ou une hydrocéphalie. En fonction de la gravité des lésions, les atteintes cliniques seront différentes. Schématiquement, au plan moteur, on observe le plus couramment une paraplégie complète, des membres flasques, et une marche impossible si l'atteinte est dorsale, et un haut risque de luxation de la hanche si la lésion est lombaire. On observe aussi souvent de l'épilepsie, un retard mental et des défauts de sensibilité des membres supérieurs dus à l'hydrocéphalie, et des problèmes urinaires (vessie neurologique), de continence fécale, une perturbation de la sensibilité des organes génitaux, des troubles de l'érection et de l'éjaculation.

Actuellement, le seul traitement proposé est une intervention chirurgicale, réalisée dans les 24 à 36 heures après la naissance et qui consiste à explorer et réduire le sac herniaire puis à refermer. Cette opération est à haut risque d'infection et souvent, une aggravation de l'hydrocéphalie conduit à une nouvelle intervention pour dériver le liquide céphalo-rachidien (LCS) en excès. Les enfants doivent souvent être opérés plusieurs fois pour réparer le système de dérivation du LCS dont les valves s'obstruent. De plus, les dégâts neurologiques causés par l'exposition de la moelle au liquide amniotique et au méconium sont irréversibles. Le seul moyen trouvé à ce jour pour diminuer les lésions causées par l'exposition au liquide amniotique est de faire des amnio-infusions régulières [110]. Cela consiste à retirer du liquide amniotique et à le remplacer par du *Ringer Lactate* ou du sérum physiologique de façon régulière pour éviter l'exposition au méconium et au liquide amniotique.

MEULI *et al.* [103] ont été les premiers en 1995 à décrire l'utilisation du fœtus de brebis pour créer un modèle de myeloméningocèle *in utero*. Des études préalables avaient déjà créé des

modèles similaires chez les porcs, les rats et les primates non humains. L'équipe a opéré des brebis à 60 et 75 jours de gestation par laparotomie. Le dos des fœtus était extériorisé et une laminectomie des vertèbres L1 à L4 était effectuée avec des instruments de microchirurgie, sous une loupe 3.5x. Ensuite, la portion dorsale de la dure mère était excisée entre les origines des racines dorsales des nerfs. La plaie n'était pas refermée et le fœtus était remis dans son sac amniotique. Les agneaux ont ensuite été étudiés cliniquement, morphologiquement et histologiquement à 100 jours de gestation et à terme. Les lésions créées se sont maintenues chez les fœtus opérés à 75 jours, la moelle épinière faisait hernie hors du canal vertébral et étaient contenues dans un sac cystique néoformé. Histologiquement, l'architecture a été perdue. Les lésions étaient moins importantes chez les fœtus étudiés à 100 jours de gestation. Les fœtus ayant maintenu leurs lésions étaient soit paraplégiques à la naissance soit présentaient des lésions de type MNC. Les fœtus opérés à 60 jours de gestation ont vu leurs lésions se cicatriser et leurs déficits neurologiques à la naissance étaient modérés.

ENCINAS HERNANDEZ *et al.* [46] ont comparé les lésions obtenues chez le fœtus de brebis avec ce modèle aux lésions observées chez les nouveaux nés humains. Les auteurs ont montré que des lésions similaires étaient obtenues (hydrocéphalie, hernie du cervelet, amincissement du *corpus callosum* et du cortex qui se traduit chez l'homme par des défauts de cognition). Cette étude a appuyé la validité du modèle mis au point par MEULI *et al.*, qui a été critiqué par la communauté scientifique. C'est une étude qui a mis en évidence pour la première fois un parallélisme entre les lésions visibles chez l'homme et les lésions obtenues grâce à ce modèle.

Suite à la construction du modèle par MEULI et son équipe, les scientifiques ont mis au point des méthodes de réparation du myéloméningocèle *in utero*. MEULI *et al.* [104] ont proposé une telle technique et ont montré que cela permettait de supprimer les troubles neurologiques à la naissance. Ils ont fait l'hypothèse que les dégâts neurologiques étaient dus à une exposition de la moelle épinière à l'environnement intra-utérin. La réparation des lésions de spina bifida a eu lieu à 100 jours de gestation par recouvrement de la lésion par du tissu musculaire. A la naissance, les animaux avaient une fonction motrice quasi-normale de leurs membres postérieurs et un contrôle parfait des fonctions excrétoires. A l'examen microscopique, le canal médullaire paraissait légèrement aplati, et le canal central modérément dilaté, mais l'architecture cellulaire était maintenue. Cette équipe a aussi mis au point une méthode pour connaître l'état neurologique du fœtus et ainsi suivre de façon clinique les résultats des expériences [166]. Pour cela, ils plaçaient des électrodes d'électroencéphalogramme sur le cortex somato-sensoriel et plantaient des électrodes dans le nerf ulnaire et le nerf tibial caudal. La stimulation était induite par les électrodes au niveau des muscles, et la réponse était enregistrée dans le cortex sensoriel.

KOHL *et al.* [80] ont utilisé une autre technique de réparation par recouvrement des lésions de hernie par un patch inerte. Ils ont posé le patch en Slastic inerte par voie fœtoscopique et l'ont fixé avec de la glue chirurgicale. Tous les animaux témoins présentaient une paraplégie, une incontinence urinaire et un syndrome de Chiari à la naissance. Les fœtus traités étaient tous capables de marcher, un avait un contrôle de la vessie non complet et un syndrome de Chiari modéré. FONTECHA *et al.* [52] ont ensuite démontré que cette technique évitait de surcroît les manipulations fœtales excessives causant une augmentation des risques de mortalité fœtale. AARONSON *et al.* [1] ont utilisé une technique de réparation sous foetoscopie pour limiter la mortalité fœtale. Les manipulations ont duré deux heures et 4 fœtus sur 6 ont survécu à l'étude. A l'examen des plaies, chez deux fœtus la ligne de suture était intacte, chez trois d'entre eux elle était partielle, et une ligne de suture avait lâché entre l'intervention et l'évaluation sur un animal. Toutes les plaies cutanées présentaient une bonne cicatrisation.

Par ailleurs, PAEK *et al.* [115] ont montré le potentiel thérapeutique de la technique chirurgicale en obtenant une réduction de la hernie du cervelet après réparation de la lésion de myeloméningocèle *in utero*. Après la publication de ces résultats prometteurs, une étude clinique a été entreprise chez l'homme par FARMER *et al.* [48], montrant que le passage du modèle à la clinique est parfois délicat.

XIV. Uro-néphrologie. Modèles de pathologies de l'appareil urinaire

XIV.1. Modèles d'obstruction urinaire

Les modèles d'obstruction urinaire peuvent être obtenus par chirurgie classique. Les deux modèles existant dans la littérature sont des modèles d'obstruction haute ou des modèles d'obstruction basse. Les modèles d'obstruction haute sont obtenus par ligature unilatérale ou bilatérale des uretères, avec ou non néphrectomie. Les modèles d'obstruction urinaire basse sont obtenus par ligature de l'urètre chez le mâle ou du col de la vessie chez la femelle. BECK *et al.* ont été les premiers à décrire le modèle d'obstruction urinaire en 1971. Cette équipe a créé un modèle d'obstruction urinaire haute par ligature des uretères. BECK *et al.* ont montré qu'une obstruction complète de l'appareil urinaire conduisait à une dysplasie rénale si l'occlusion avait lieu avant le milieu de la gestation, et à une hydronéphrose si l'obstruction avait lieu après le milieu de la gestation. La réponse rénale à l'obstruction est âge dépendante chez le fœtus. BECK *et al.* ont aussi démontré que les résultats de l'obstruction dépendaient de la présence ou non du rein controlatéral. En effet, lorsque l'obstruction s'accompagnait d'une néphrectomie de l'autre rein, les auteurs obtenaient des reins hypertrophiques et kystiques alors que si le rein controlatéral était présent, les auteurs obtenaient des petits reins dysplasiques.

Une autre équipe, celle de GONZALEZ *et al.* [62] a montré qu'il était aussi possible de créer des lésions de dysplasie rénale par obstruction du bas appareil urinaire. Ils créent la lésion à 43-45 jours de gestation et ligaturent l'ouraque et l'urètre par extériorisation du fœtus. Enfin, d'autres équipes, comme celle d'EDOUGA *et al.* [39] ont montré que les effets des obstructions urinaires pouvaient être en partie annulés si l'obstruction était levée à avant la fin de la néphrogénèse.

La création d'obstructions urinaires par voie foetoscopique a été décrite dans le chapitre « XVII. Autre : foetoscopie »

XIV.2. Profils urodynamiques

L'étude de l'appareil urinaire *in utero* passe par les mêmes outils de diagnostic que chez l'adulte. Les profils uro-dynamiques font partie des outils de diagnostic utilisés de façon courante en clinique.

L'équipe de TAYRAC *et al.* [32] ont mis au point un modèle permettant de faire des études urodynamiques anté-natales. Ils ont opéré des brebis à 87 +/- 7.1 jour de gestation sous anesthésie

générale. Après ouverture de l'utérus sur les sites de cannulation et extraction des membres postérieurs du fœtus, l'équipe a canulé l'ouraque avec un cathéter urétral de 5 Fr entrant dans la vessie et tunnelé sous la paroi abdominale du fœtus. Pour les besoins de leur expérience, ils implantaient en plus chez le fœtus un anneau faisant obstruction partielle de l'urètre antérieur plutôt qu'autour du col vésical. Ensuite, toutes les semaines, ils ont effectué un profil urodynamique. Sur 14 fœtus opérés, 6 sont morts entre 21 et 43 jours après la chirurgie, 3 mères ont avorté entre 5 et 28 jours post chirurgie, et 10 cathéters se sont délogés (dont deux se sont relogés). Le temps de survie post chirurgie était de 45 ± 5.7 jours. Onze animaux ont donné des profils urodynamiques. Les animaux avec obstruction montraient une hyper réactivité de la vessie. Post mortem, les auteurs découvraient des vessies hyperplasiques et des hydro-urétéro-néphroses bilatérales chez les fœtus obstrués.

XV. Gastro-entérologie. Modèles d'anomalies de l'appareil digestif

Chez le l'enfant, la malformation *in utero* la plus invalidante pour l'appareil digestif est le gastroschisis. Cette malformation sera aussi décrite dans le chapitre « fœtoscopie », car c'est une autre méthode d'obtention de modèles de gastroschisis.

La méthode par chirurgie conventionnelle permet aussi de créer des modèles de laparoschisis chez les fœtus de brebis. STEPHENSON *et al.* [138] ont décrit comment obtenir ce modèle ainsi qu'une technique de réparation du gastroschisis. La création de la lésion a eu lieu à 75 jours de gestation par laparotomie de la mère, extériorisation du fœtus et incision de 10 mm de la cavité abdominale du fœtus à gauche du cordon, pour éviter d'abimer le foie ou la veine ombilicale. Puis par pression sur le flanc, une partie des intestins du fœtus étaient éviscérés. Après fermeture et gestion de la douleur pendant 48 heures, les mères ont été logées et nourries normalement. A 100 jours de gestation, la lésion a été réparée par agrandissement de la plaie pour permettre la réduction des intestins dans la cavité abdominale, puis la plaie était refermée avec des points en U. Sur 8 fœtus chez qui un gastroschisis a été créé, 6 ont survécu. Deux fœtus parmi ceux-là ont été réparés et les deux ont survécu. Les intestins étaient œdématisés et épaissis après 25 jours d'éviscération, avec des débris fibreux dans la cavité amniotique. La cavité abdominale était petite, mais suffisamment grande pour accepter les intestins à la réduction. Chez les fœtus non réparés, l'intestin des fœtus était très épaissi, couvert d'un dépôt fibreux et raccourci. Chez les fœtus réparés, les intestins avaient un aspect macroscopique et microscopique normal.



XVI. Reproduction

XVI.1. Techniques de retard de croissance intra-utérin

Le retard de croissance intra utérin est défini par une croissance insuffisante du fœtus par comparaison à des courbes de croissance de fœtus normaux. Le fœtus connaissant un retard de croissance intra-utérin a une croissance inférieure au 10^{ème} percentile, c'est-à-dire qu'il appartient au 10 % des fœtus les plus petits à âge gestationnel égal. Chez l'homme, les causes et facteurs de risque sont multiples : situation géographique de la mère en altitude, sous nutrition de la mère, hyperthermie prolongée de la mère, prise de certains médicaments par la mère (antiépileptiques, immunosuppresseurs, corticoïdes), consommation d'alcool, de tabac et de drogues, anomalies placentaires, infections intra-utérines, anomalies chromosomiques du fœtus, anomalie du cordon ombilical, grossesse multiple, malformation fœtale, etc. Chez le fœtus, le retard de croissance intra-utérin a de nombreuses conséquences, que ce soit tout de suite à la naissance ou à l'âge adulte. En effet, le retard de croissance intra-utérin augmente le risque de développer des encéphalopathies hypoxiques/ischémiques, des hémorragies intravasculaires et des entérocolites nécrosantes. A l'âge adulte, ces personnes sont plus à risque de développer de l'hypertension, des maladies coronariennes, du diabète de type II, ou de l'obésité [106]. Cependant, les mécanismes physiologiques à l'origine de ces associations épidémiologiques sont peu compris à ce jour. Il existe donc beaucoup d'études qui portent sur la compréhension des mécanismes d'adaptation du fœtus à une insuffisance de substrat de croissance *in utero* et des rôles que jouent ces adaptations sur la vie de l'adulte.

Chez la brebis, il existe cinq modèles pour obtenir un retard de croissance du fœtus par restriction placentaire : la suralimentation des mères adolescentes, l'hyperthermie maternelle induite, la caronclectomie, l'embolisation placentaire et la ligature d'une artère ombilicale. Chacun de ces modèles induit une modification du transfert placentaire en O₂ et en nutriments vers le fœtus. Les modèles obtenus par suralimentation des mères adolescentes ont été décrits dans la partie nutrition. Les autres modèles seront donc développés dans ce paragraphe.

XVI.1.a. Caronclectomie

La méthode de caronclectomie implique de retirer la plupart des caroncules endométriaux utérins chez la femelle non-gestante avant la mise à la reproduction. Cela réduit le nombre de placentomes qui se forment pendant la gestation et induit une diminution des transferts d'O₂ et de

glucose vers le fœtus. Ce modèle a été décrit pour la première fois par ROBINSON *et al.* [127] en 1979.

Les brebis sont typiquement mises au repos 10 semaines après la caronclectomie avant d'être mises à la reproduction.

XVI.1.b. Hyperthermie maternelle

La température ambiante pendant la gestation influe sur la croissance du fœtus. L'exposition à des températures ambiantes élevées pendant le premier trimestre de gestation induit des retards de croissance du fœtus.

Le protocole utilisé chez la brebis implique une augmentation de la température ambiante à 40 °C pendant 12 heures, puis à 35°C par périodes de 12 heures. L'humidité ambiante était maintenue entre 30 et 40 %. Ces expériences commençaient à 45 jours de gestation et duraient jusqu'à environ 120 jours de gestation. Les études ne sont pas commencées plus tôt car le taux de mortalité fœtal augmentait significativement si l'hyperthermie ambiante était appliquée pendant les premières phases de la gestation.

XVI.1.c. Ligature d'une artère ombilicale

La ligature d'une artère ombilicale induit un infarctus partiel du placenta. La ligature était effectuée à 108-119 jours de gestation par chirurgie ouverte du fœtus. Le fœtus était extériorisé, le cordon ombilical était visualisé et l'artère ombilicale identifiée après incision de la gaine du cordon. Deux ligatures étaient faites avec du fil de soie taille 0 à 2,5-3 cm de l'abdomen du fœtus [140]. Ce modèle a été décrit pour la première fois dans les années 1960 par EMMANOUILIDES *et al.* [44]. C'est aussi un modèle de naissances prématurées. En effet, les fœtus qui sont traités avec cette technique naissent autour de 120 jours de gestation. C'est une limite de ce modèle, car l'étude de l'effet d'une restriction placentaire en fin de gestation devient impossible.

XVI.1.d. Embolisation placentaire

L'embolisation placentaire a été faite par injections répétées de microsphères d'un diamètre de 15 micromètres soit par un cathéter placé dans l'aorte descendante [21], soit par un cathéter placé dans la veine ombilicale. Les microsphères bloquaient les capillaires du placenta, ce qui diminuait la surface d'échanges pour le transfert d'O₂ et de nutriments entre le fœtus et la mère.

XVII. Autre : fœtoscopie

XVII.1. Mise au point de la technique de fœtoscopie

La fœtoscopie est une procédure endoscopique réalisée pendant la gestation qui donne accès au fœtus, à la cavité amniotique, au cordon ombilical et au côté fœtal du placenta. Grâce à cette technique, des biopsies, des occlusions de vaisseaux par LASER, des prélèvements et maintenant certaines interventions chirurgicales sont possibles. La fœtoscopie est pratiquée par voie trans-abdominale : une incision est pratiquée sur l'abdomen de la mère et un endoscope est inséré à travers la paroi abdominale et l'utérus jusqu'à atteindre la cavité amniotique.

La chirurgie par endoscopie a d'abord été utilisée chez l'adulte. Cette technique a apporté un confort accru du patient et permettait de limiter les complications éventuelles dues à une plaie chirurgicale. Cependant, elle nécessite des appareils coûteux et un personnel très spécialisé. Les techniques de chirurgie endoscopiques fœtales ont commencé à se développer à partir des années 1990, suite aux avancées des techniques de diagnostic anténatal. L'enjeu de la fœtoscopie est de traiter le fœtus tout en préservant la santé et la fonction reproductrice de la mère.

Dans le cadre de la chirurgie fœtale, les techniques d'approche conventionnelles semblent être trop invasives pour le fœtus au vu des statistiques de mortalité obtenues suite à une chirurgie chez le fœtus. L'endoscopie fœtale, ou fœtoscopie a apporté l'espoir de nouvelles thérapies et de meilleurs taux de réussite. LUKS *et al.* [93] ont développé les techniques d'accès endoscopique de l'utérus gravide chez la brebis et sont parvenus à effectuer des manipulations chirurgicales et à monitorer le fœtus *in utero*. Ils ont décrit par cette étude le modèle d'endoscopie fœtal. Les brebis sont placées en décubitus latéral gauche à 95-105 jours de gestation. L'équipe a testé la possibilité d'effectuer plusieurs chirurgies *in utero* : dissection sous cutanée de la paroi abdominale et ligature de l'urètre chez le fœtus mâle, ligature de l'ouraque et du cordon ombilical, endoscopie de la trachée et de l'œsophage fœtaux. Le matériel d'endoscopie était inséré après extériorisation de l'utérus. Les canules ont été insérées entre les cotylédons dans une ouverture fermée par une suture en bourse. Une sonde oxymétrique a été insérée dans une des canules et attachée à un membre du fœtus, et une sonde thermique était laissée dans la cavité amniotique. La pression intra-amniotique était suivie en raccordant une des canules à un manomètre. Du liquide de Hartmann était employé pour dilater la cavité utérine. Une partie du liquide amniotique fut remplacé par la même solution pour améliorer la visibilité. Des outils classiques d'endoscopie furent utilisés pour effectuer les manœuvres chirurgicales. Quatorze fœtus ont été enrôlés dans l'étude. Parmi eux, 10 ont subi au moins une procédure, 7 au moins deux. Huit fœtus ont survécu. La mortalité des autres fœtus était due à des lésions iatrogènes (canules ou instruments causant des lacérations hépatiques majeures et

un hémopéritoine fœtal). Les paramètres vitaux de la mère et du fœtus restaient stables pendant les interventions dont la durée variait de 130 à 195 minutes. L'inconvénient majeur de cette technique était la nécessité d'une laparotomie chez la mère. Depuis, DREYFUS *et al.* [37] ont mis au point une technique permettant de localiser l'utérus par transillumination et donc de positionner la première canule. Aujourd'hui, ces méthodes sont désuètes car l'échographie permet de positionner la canule de façon précise.

Cinq ans plus tard, la même équipe a mis au point une amélioration de leur technique de fœtoscopie [92]. La fuite de liquide amniotique et la rupture des membranes est une complication courante des techniques de fœtoscopie. Des améliorations ont été portées aux sondes endoscopiques permettant une insertion peu traumatique de ces instruments (utilisation de canules ballon, de dilatation radiale et de la technique de Seldinger). Cependant, le retrait des canules est une étape où les fuites de liquide amniotiques pouvaient être importantes. LUKS *et al.* ont mis au point un technique de bouchon de gélatine spongieuse pour imperméabiliser les sites d'entrée des canules. Le bouchon était placé au moment du retrait des canules. Pour cela, les chercheurs l'introduisaient dans la canule et le poussaient jusqu'au niveau du myomètre avec une tige. Ensuite, la tige était maintenue en position et la canule est retirée. L'éponge se gorgeait alors de liquide amniotique et restait en place. Une suture en huit simple était ensuite faite au niveau de la plaie utérine. Leur technique a été testée chez la brebis et chez le primate non-humain. Dans les deux cas, les fuites ont été réduites significativement ou totalement et les plaies avaient cicatrisé correctement.

Enfin, cette équipe [83] s'est intéressée à l'innocuité de certaines techniques employées pendant la fœtoscopie, comme par exemple l'insufflation d'air pendant les interventions cardiaques sous endoscopies et ses effets sur le cerveau du fœtus. L'insufflation d'air pendant les chirurgies cardiaques chez le fœtus améliore grandement la visibilité du champ opératoire. Les brebis ont été soumises à des insufflations d'air durant de 2.5 à 4.5 heures dans la cavité amniotique pendant des interventions fœtoscopies cardiaques variées (électrocardiographie transoesophagienne fœtale, stimulation cardiaque, sternotomie cathétérisation cardiaque antérograde, sternotomie et insertion d'électrodes de stimulation cardiaque) à 80 et 110 jours de gestation. Les brebis étaient placées en décubitus dorsal, la première canule était insérée sous guidage échographique. Les cannules d'endoscopie suivantes ont été placées sous guidage endoscopique. La mère et le fœtus étaient suivis avec un monitoring classique. A la fin des expériences, l'encéphale des fœtus était prélevé pour analyses histologiques. Les auteurs ne constataient pas de différences entre le groupe témoin et le groupe d'animaux traités. Ils ont donc conclu que l'insufflation d'air serait une méthode sûre et sans conséquence néfastes sur le cerveau du fœtus.

Depuis ces travaux, la robotique s'est associée aux appareils d'endoscopie. Les techniques de robotique permettent de filtrer les tremblements du chirurgien, de calibrer le mouvement et d'améliorer l'ergonomie. C'est pourquoi ces techniques ont aussi été testées pour la fœtoscopie. KNIGHT *et al.* se sont servis du système de robotique *Zeus Robotic Surgery System* chez des brebis gestantes. Ils ont utilisé trois techniques d'approche : utérus extériorisé, approche percutanée avec instillation de liquide, approche percutanée avec insufflation d'air. Les chirurgiens ont créé et suturé des lésions cutanées de la face. Les auteurs ont conclu que la technique d'approche la plus efficace serait la technique avec insufflation d'air, et que la robotique pouvait être associée aux techniques de fœtoscopie.

XVII.2. Création de modèles par fœtoscopie

Une fois les techniques d'accès au fœtus par endoscopie développées, des modèles de maladies que l'on trouve chez l'homme ont été créés en utilisant cette technique. La fœtoscopie est de nos jours utilisée chez l'homme pour traiter le syndrome transfuseur-transfusé, les hernies diaphragmatiques, les lésions de myéloméningocoele et de spina bifida. Le fœtus de brebis a servi de modèle pour le traitement des hernies diaphragmatiques, le myeloméningocoele et la spina bifida, ainsi que pour le gastroschisis et l'obstruction de l'appareil urinaire. Le traitement des hernies diaphragmatiques par fœtoscopie se fait par occlusion trachéale, la spina bifida est traitée par suture simple. Ces modèles et leur création sont donc développés dans les chapitres correspondant. Nous exposerons donc dans ce paragraphe les modèles de gastroschisis traités par endoscopie fœtale et l'obstruction de l'appareil urinaire.

XVII.2.1. Obstruction de l'appareil urinaire

L'obstruction de l'appareil urinaire *in utero* est la cause de dysfonctions rénales, et d'une augmentation du risque d'infections suite à l'hydronéphrose. Chez un garçon sur 5000, une malformation congénitale est retrouvée : la présence de valves urétérales postérieures. Ces valves obstruent le flux de l'urine et sont associées à une croissance anormale de la vessie et une dysplasie rénale. Après ablation chirurgicale des valves, une incontinence par défaut de vidange est souvent présente. Il existe peu de modèles animaux capables de fournir une bonne comparaison avec cette malformation humaine. En effet, les fœtus doivent être suffisamment gros pour que l'opération puisse se faire *in utero* et l'organogénèse rénale doit être similaire à celle de l'homme. La brebis répond à ses caractéristiques et les obstructions urinaires induites chirurgicalement chez la brebis ont des conséquences similaires à celles observées chez l'homme. Ce modèle a donc été utilisé pour étudier l'effet de ces malformations et envisager des thérapeutiques.

Dans leur protocole, DEPREST *et al.* [34] ont étudié la faisabilité de créer une lésion d'obstruction de l'appareil urinaire par fœtoscopie. Les fœtus, tous des mâles, ont été opérés entre 95 et 105 jours de gestation (groupe 1) ou entre 70 et 75 jours (groupe 2). Une obstruction du bas appareil urinaire a été effectuée. L'utérus a été extériorisé et les canules de fœtoscopie ont été insérées dans la paroi utérine. L'obstruction du bas appareil urinaire nécessitait une interruption de l'urètre et de l'ouraque. Dans le groupe 1, la ligature de l'urètre était effectuée sur l'urètre abdominal, entre le scrotum et le pénis. La paroi abdominale était incisée de façon transversale avec un cautère bipolaire, puis la dissection était complétée à la pince et aux ciseaux. Dans le groupe 2, la ligature était effectuée au niveau du pénis. L'ouraque était disséqué à l'intérieur du cordon ombilical à 1 cm de l'ombilic et ligaturé à cet endroit. L'équipe a constaté la possibilité d'insérer au moins trois trocarts à chaque fois. Le taux de mortalité était plus important chez les fœtus plus jeunes, mais l'équipe a réussi à mener la chirurgie à bien chez tous les fœtus. Les auteurs ont indiqué les limites du modèle brebis dans la mise au point de méthodes fœtoscopiques : la placentation du mouton est différente de celle de l'homme, et la paroi de l'utérus plus fine. Selon ces auteurs, il serait nécessaire de valider leurs résultats chez le primate non humain.

Les autres modèles de création d'obstructions de l'appareil urinaire ont été traités dans le paragraphe « XIV Uro-Néphrologie ».

XVII.2.2. Laparoschisis

Le laparoschisis, qui peut aussi être appelé gastroschisis est une malformation congénitale dans laquelle une fente persiste dans la paroi abdominale par fermeture incomplète de cette paroi entre la 10^{ème} et la 12^{ème} semaine de gestation chez la femme. Les organes abdominaux passent librement à travers cette fente, qui fait rarement plus de 30 mm. Cette malformation affecte une naissance sur 10 000. Dans 20 % des cas, cette anomalie est accompagnée d'autres malformations. Le traitement est pour l'instant une prise en charge à la naissance et une renutrition progressive, d'abord parentérale puis orale. Cependant, le pronostic dépend de l'effet du liquide amniotique sur les intestins et de leur vascularisation.

L'équipe de GUYS *et al.*[65] a utilisé la fœtoscopie pour créer un modèle de laparoschisis chez 26 fœtus de brebis. L'opération a eu lieu à 80 jours de gestation. Les cornes utérines ont été extériorisées suite à une laparotomie maternelle. Les trocarts d'endoscopie ont été introduits dans l'utérus. Une fois le matériel mis en place, la cavité abdominale du fœtus était ouverte par la gauche. L'omentum et les anses intestinales étaient éviscérées à l'aide de pinces à traumatiques et par injection de NaCl intrapéritonéal sous pression dans le fœtus. Quatorze fœtus ont survécu à

l'étude. Une infection intra-amniotique a été mise en évidence chez neuf fœtus. Un cathéter intra-amniotique était ensuite positionné. Trois groupes de fœtus ont été créés. Un groupe témoin, un groupe avec cathéter simplement extériorisé et un groupe avec cathéter permettant des amnio-infusions jusqu'à la fin de la gestation. Les anses intestinales étaient recouvertes d'une fine membrane à la naissance et les anses intestinales avaient un aspect plus sain que celui couramment rencontré lors de gastroschisis chez l'homme. L'équipe a donc conclu qu'il est faisable de créer un modèle de laparoschisis *in utero* par endoscopie fœtale, à condition de s'assurer de faire une ouverture suffisamment large pour éviter une cicatrisation de la plaie. Les amnio-infusions répétées semblaient réduire les dégâts causés par le liquide amniotique aux anses intestinales.

Les autres techniques de réparation et de création de modèles de gastroschisis été développés dans les paragraphes « XV. Gastro-entérologie ».



DISCUSSION

Les recherches bibliographiques sont dépendantes du moteur de recherche utilisé et du référencement des publications par leurs auteurs principalement en fonction de mots clés utilisés. Il est donc possible que certaines études ne soient pas apparues dans les résultats, malgré un emploi de plusieurs mots clés. C'est une des limites de ce travail. La recherche bibliographique de ce travail a été faite avec Web of Science, qui regroupe plusieurs bases de données et est une référence en recherche bibliographique scientifique. Ceci a permis d'élargir au maximum le nombre de publications apparaissant dans les résultats de la recherche pour un groupe de mots clefs donné. De plus, une fois les recherches d'articles originaux effectuées, une recherche des articles type revue littéraire avec les mêmes mots clés a été effectuée dans chacun des domaines de recherche. La bibliographie de ces revues a été scrutée pour inclure les éventuels articles que la recherche bibliographique par base de données aurait manqués.

Il existe des critères de classement de la pertinence des publications (*Impact Factor*, *Eigenfactor*, *Pagerank*, *facteur h*, etc). Lors de la première approche de ce travail, la question s'est posée de savoir si ces critères seraient pris en compte pour déterminer l'inclusion ou non d'un article dans ce travail. Les indices de qualité des publications sont très critiqués par la communauté scientifique, pour leur validité (variations discipline dépendantes, critères d'inclusion des études, influence de la date de publication sur le score obtenu, possibilité qu'un journal donné d'augmenter le score pour un facteur etc.), et à cause des fraudes qui ont marqué leur histoire. En 2008 par exemple, un article « *A short history of SHELX* » publié dans *Acta Crystallographica Section A* contenait une phrase qui incitait les lecteurs à citer cet article en disant que cette publication pouvait servir d'article général à citer pour le domaine d'étude. Cet article a ensuite été cité plus de 6000 fois, ce qui a valu à l'impact factor de ce journal un bond allant de 2.051 en 2008 à 49.926 en 2009 (pour comparaison, Nature en 2009 avait un impact factor de 31.434). Un autre journal a publié un éditorial qui citait tous ses articles publiés pour protester contre le même critère de qualité. De plus, les critères de qualité des articles sont augmentés lorsque les études sont publiées dans des journaux généralistes de grande renommée. Or les modèles expérimentaux chez le fœtus de brebis font aussi appel à des domaines très pointus, peu étudiés, qui n'apparaissent donc pas dans les revues généralistes. Notre étude portant sur le recensement de tous les modèles existant d'utilisation du fœtus de brebis, nous avons fait abstraction de ces facteurs pour la sélection des articles.

La brebis est un modèle expérimental qui a été utilisé en recherche fœtale dans de nombreux domaines de la médecine, comme le montre ce travail. Seuls quelques domaines tels l'ophtalmologie n'ont pas été explorés grâce à ce modèle. D'un point de vue logistique et sanitaire, la brebis possède de nombreux avantages en recherche. C'est un modèle facile à entretenir, relativement peu coûteux par rapport à d'autres modèles grands animaux tels les primates, et qui présente un risque zoonotique faible. D'un point de vue physiologique et anatomique, pour la recherche fœtale, la brebis est caractérisée par une placentation différente de celle de l'homme, mais que l'on considère tout de même comme proche de l'homme en termes d'échanges materno-fœtaux (cf Annexe 2). Le développement embryonnaire est suffisamment long chez la brebis pour permettre des expériences modélisant les trois trimestres de gestation chez l'homme, et les stades de développement des grands systèmes se font *in utero* comme chez l'homme. D'un point de vue technique, le fœtus de brebis tolère bien l'instrumentation chronique et les gestations gémellaires offrent la possibilité d'avoir un témoin proche sans pertes importantes de la taille du fœtus. Le modèle fœtal de brebis est donc un bon modèle expérimental pour de nombreuses pathologies humaines. Cependant, l'utilisation du fœtus en recherche pose des problèmes éthiques nécessitant la mise en place d'un cadre législatif.

Les législations encadrant les essais cliniques datent des années 1970. Parallèlement, un cadre juridique a été établi pour la recherche fœtale chez l'homme. La recherche fœtale chez la brebis est à la croisée entre deux débats législatifs et éthiques : l'utilisation du fœtus en recherche, et l'utilisation de l'animal en recherche biomédicale. Il n'existe actuellement pas de législation encadrant spécifiquement la recherche sur fœtus animal. La législation et les débats éthiques et moraux sur la recherche fœtale sont orientés vers l'utilisation du fœtus humain et s'inscrivent dans les débats sur l'avortement. Il existe deux grandes catégories de recherches sur le fœtus humain : la recherche fœtale et la recherche sur tissus fœtaux. La recherche fœtale s'appuie sur des études du fœtus vivant *in utero* ou *ex utero*, alors que la recherche sur tissus fœtaux utilise des tissus ou cellules prélevées sur des fœtus après avortement induit ou spontané.

La médecine contemporaine doit beaucoup à la recherche fœtale, notamment pour le développement de vaccins, les tests de toxicologie des médicaments ingérés par la mère sur le fœtus, et bien sûr les suivis de grossesse [67]. Il est estimé qu'entre 3 et 5 % des enfants naissent avec une malformation congénitale ou génétique aux Etats-Unis par exemple. Des avancées majeures permettent une meilleure prise en charge, un meilleur suivi et un meilleur traitement des mères et de leurs enfants. Ainsi, les techniques d'échographie permettent la visualisation des anomalies congénitales macroscopiques (anencéphalie, *spina bifida*, hydrocéphalie, laparoschisis,

malformations cardiaques, obstructions urétérales, etc) et l'amniocentèse permet la détection de nombreuses anomalies génétiques. Les techniques de fœtoscopie permettent la visualisation directe de la lésion et autorisent les prélèvements et biopsies pour analyses. Après détection de ces anomalies, des thérapeutiques peuvent être proposées pour traiter ses enfants *in utero*. Avant que toutes ces techniques, pour la plupart invasives ne soient utilisées couramment en clinique, une validation était nécessaire pour répondre à des questions de sécurité d'innocuité et d'efficacité des techniques. Cependant, les modèles animaux étant toujours limités, des études cliniques chez l'homme restent toujours nécessaires pour valider les recherches.

La recherche sur tissus fœtaux a surtout permis le développement de lignées cellulaires et de banques de cellules qui ont ensuite été utilisées dans tous les domaines de la recherche [67]. Les cellules fœtales ont l'unique capacité de se diviser et de croître rapidement en cultures cellulaires, sont pluripotentes et peuvent être préservées longtemps par cryoconservation. Elles ont la capacité de survivre et de se greffer chez un hôte principalement parce que leur vivacité est supérieure à celles des cellules souches adultes et parce que leur antigénicité est plus faible. Les cellules fœtales ont permis de nombreuses avancées en génétique, en virologie et en screening et toxicologie pharmaceutique. Les cellules et tissus fœtaux offrent aussi la perspective de thérapeutiques pour des affections cliniques telles la maladie de Parkinson, le diabète, ou la maladie d'Alzheimer. Cependant, la recherche sur tissus fœtaux soulève les mêmes questions éthiques et législatives que la recherche fœtale, de par la provenance des tissus support nécessaires aux protocoles de recherche.

Actuellement la législation sur la recherche fœtale et la recherche sur tissus fœtaux varie énormément d'un pays à un autre, voire d'un état à un autre pour l'exemple des Etats-Unis. La législation sur l'avortement également.

La législation pour l'avortement distingue plusieurs types d'avortements : les avortements induits et les avortements spontanés. Parmi les avortements induits, plusieurs catégories existent, en fonction de la raison de l'avortement. En effet, un avortement peut être induit pour sauver la vie de la mère, préserver la santé mentale et physique de la mère, parce que le fœtus a des malformations connues, suite à un viol ou un inceste, pour diminuer le nombre de fœtus en cas de grossesse multiples, pour des raisons de contexte socio-économiques ou sur simple demande de la mère. Ensuite, pour chacune de ces catégories, il existe un âge limite du fœtus au-delà duquel l'avortement ne peut plus être pratiqué. La technique d'avortement en fonction de l'âge du fœtus est aussi prise en compte dans la législation. Chaque pays du monde a répondu à ces questions de façon individuelle. Les Etats-Unis autorisent l'avortement dans tous les cas depuis 1973 au niveau fédéral, mais la législation autorise chaque état à restreindre les conditions dans lesquels l'avortement est

possible, qui restreignent par exemple le trimestre auquel l'avortement peut avoir lieu. A ce jour, les tentatives d'amendements par état pour interdire l'avortement n'ont pas été validées. Certains états demandent l'accord des parents avant l'avortement si la jeune femme est mineure ou du conjoint, des délais obligatoires d'attente avant de pouvoir avorter ou bien l'obligation de consulter un professionnel (médecin, psychothérapeute, planning familial, etc.) pour avoir un avis.

L'avortement est légal dans presque tous les pays d'Europe, mais il existe une grande variabilité des conditions dans lesquels l'avortement peut avoir lieu en fonction des pays. La législation sur l'avortement est plus stricte dans les pays d'Europe Catholiques plus pratiquants. La France autorise les avortements pour sauver la vie de la mère, préserver sa santé physique ou mentale, en cas de malformations fœtales graves. Elle autorise l'avortement au premier trimestre de gestation pour les cas de viols, pour des questions socio-économiques ou pour les avortements sur demande.

La législation sur la recherche fœtale a toujours été très liée à la législation sur les avortements et la fécondation *in vitro*. En effet, il existe quatre sources de cellules souches embryonnaires et de tissus fœtaux: les cellules souches embryonnaires de lignées existantes, les cellules et tissus d'embryons suite à un avortement induit ou spontané, les embryons non-utilisés issus de la fécondation *in vitro* et les embryons clonés.

Actuellement, aux Etats-Unis, la loi fédérale limite les bourses de recherche à la recherche effectuée sur des cellules embryonnaires provenant de lignées existantes avant Aout 2001. Les bourses de recherche fédérales ne peuvent pas être orientées vers la recherche sur le clonage humain. Cependant, aucune loi fédérale n'interdit la recherche dans ce domaine. Ensuite, chaque état peut décider de la législation sur la recherche sur des cellules fœtales. Cela va de certains états qui autorisent la recherche sur presque toutes les sources à certains états qui l'interdisent complètement. Les juridictions d'état répondent aux questions suivantes : la recherche fœtale est-elle autorisée ou non, restreinte en cas d'avortement ou non, nécessite ou non un consentement de la mère et est-il autorisé ou non de faire commerce des tissus humains et d'utiliser d'autres sources de cellules embryonnaires que l'avortement (clonage par exemple).

En France, ce sont les lois de bioéthique qui légifèrent la recherche sur l'embryon. Ces lois datent de 1994 et ont été révisées en 2004. La France autorise la recherche sous certaines conditions. La recherche doit être directement utile pour l'embryon ou pour la médecine reproductive. Toute forme de clonage, de créations de chimères et d'embryons uniquement pour la recherche ainsi que de modifications de la lignée germinale sont interdites. En Europe, les pays dont les lois sont les plus libérales actuellement en termes de recherche sur l'embryon sont l'Espagne et le Royaume uni.

Le débat éthique autour de l'utilisation du fœtus humain en recherche clinique s'ancre dans le débat autour de l'avortement. Pour les opposants à toute forme d'avortement, ni la recherche fœtale ni la recherche sur tissus fœtaux ne peuvent moralement être dissociées des pratiques d'avortement [139]. Les arguments avancés sont que le don d'organe nécessite le consentement éclairé du patient ou de la personne responsable du patient et que la perspective de la recherche fœtale pourrait faire augmenter le nombre d'avortements. Pour le premier argument, sur le consentement éclairé, les opposants à l'avortement argumentent que lors d'un avortement, la mère a décidé de tuer son enfant, et que par cette décision, elle perd la responsabilité qu'elle exerce sur cet enfant. Le médecin qui perpétue l'acte est dans la même situation, ainsi que tout l'entourage. Une comparaison est souvent donnée pour appuyer ces arguments : si quelqu'un assassine son conjoint, la loi ne donnerait pas à l'assassin le droit de donner son consentement éclairé pour un don d'organes de la part de la victime. Pour les opposants à l'avortement, il n'y a donc personne auprès de qui recueillir le consentement éclairé pour prélever des tissus sur le fœtus. Quant au second argument, les opposants aux pratiques d'interruption de grossesse estiment que la perspective que l'avortement devienne utile à des fins de recherche pourrait faire pencher la décision d'une mère hésitante, et donc que cette pratique augmenterait le nombre d'avortements.

Le cadre législatif a tenté de répondre à ces questions : la décision d'avorter doit être prise par la mère avant que l'on ne lui parle de possibilités de protocoles de recherche sur l'avorton, aucune forme de rémunération ou de compensation ne doit être proposée à la mère, le don doit rester anonyme et ni la technique d'avortement ni la date d'interruption de grossesse ne doivent être influencées par les protocoles de recherche.

Dans cet environnement très controversé, les étapes de recherche fondamentale et préclinique sur des modèles animaux trouvent toute leur logique. Elles s'inscrivent comme un véritable rempart avant l'utilisation des techniques chez l'homme. Elles assurent en grande partie l'innocuité et l'efficacité des techniques, mêmes si la modélisation animale a ses limites. Les modèles animaux en recherche fœtale ont permis de nombreuses avancées de la médecine. Ce travail a montré l'étendue des domaines d'études dont l'utilisation du fœtus de brebis a déjà bénéficié. Les nouvelles techniques d'imagerie qui sont développées de nos jours permettent un diagnostic anténatal de plus en plus précoce d'anomalies fœtales. L'espoir de traiter ces malformations avant qu'elles n'aient de conséquences durables sur le développement de l'enfant implique que de la recherche soit entreprise pour tester les méthodes thérapeutiques de demain. Sans recherche fœtale, ces affections ne pourront jamais être traitées. La recherche sur modèles animaux n'apporte pas une garantie que le modèle sera transférable à l'homme mais permet aux



premières étapes de la recherche d'être validées pour proposer des thérapies plus abouties aux patients de demain lors d'essais cliniques.

Ce travail a permis une revue extensive de la littérature dans le domaine de la chirurgie fœtale sur le modèle ovin. IMM recherche utilise ce modèle depuis de nombreuses années principalement en recherche cardiovasculaire et uro-néphrologique. A la faveur de ce travail, le thème de la thérapie cellulaire dans le contexte du développement fœtal a été traité. Cette étape bibliographique apporte une aide précieuse au développement d'un nouveau protocole de recherche qui va débiter à IMM Recherche d'ici fin 2012. Ce protocole de recherche s'intéressera à l'utilisation de cellules souches en néphrologie.

Le potentiel thérapeutique des cellules souches adultes et leur utilisation dans le cadre du traitement des pathologies rénales demeurent incertains ; il n'existe pas de consensus pour déterminer le type de protocole de thérapie cellulaire le plus pertinent pour l'homme. En théorie, les cellules souches embryonnaires ont des capacités de différenciation et de prolifération optimale par rapport aux cellules souches adultes, mais en pratique, leur utilisation est restreinte principalement pour des raisons éthiques. Récemment, la création des cellules souches adultes induites pluripotentes (IPS) ramène sur le devant de la scène le potentiel des cellules souches adultes. Notre étude aura pour objectif d'évaluer et comparer le potentiel *in vivo* de différents types de cellules souches adultes humaines dans un modèle expérimental unique, par transplantation *in utero* sur un modèle fœtal ovin immunotolérant de réduction du parenchyme rénal. Le modèle fœtal ovin sera un véritable système d'essai *in vivo* de grande valeur, autorisant une comparaison rigoureuse du comportement *in vivo* des cellules souches adultes humaines dans un contexte rénal pathologique sans biais lié au modèle animal. Par exemple, sur les modèles murins, la greffe hétérologue de cellules souches n'est possible qu'après traitement immunosuppresseur (chimique ou rayonnement), ce qui induit une perturbation importante des conditions expérimentales *in vivo*. Les fœtus de brebis subiront une réduction chirurgicale du parenchyme rénal à 70 jours de gestation, période de tolérance immunitaire totale, et concomitamment une transplantation de cellules souches adultes soit de type IPS, soit mésenchymateuses, soit hématopoïétiques ; un groupe contrôle sans cellules complètera l'étude. Les modifications du parenchyme rénal seront suivies par échographie durant la gestation. Le jour du sacrifice l'évaluation portera sur la comparaison du devenir *in vivo* des différents types cellulaires en mesurant le rendement de la transplantation, le taux de survie, de prolifération et d'apoptose cellulaires, la nature de la différenciation cellulaire des cellules transplantées, et enfin l'impact sur la fonction et la morphologie rénale ainsi que sur le profil d'expression des gènes dans le modèle pathologique rénal. Cette étude apportera donc des résultats objectifs sur le potentiel des cellules souches humaines et non pas sur leur équivalent animal

comme dans la majorité des études expérimentales en thérapie cellulaire. La valeur de ces résultats et leur extrapolation à l'homme n'en sera que plus pertinente.



CONCLUSION

Ce travail a permis de faire une revue extensive de la littérature sur l'utilisation du fœtus de brebis en tant que modèle expérimental.

Notre recherche a montré que le fœtus de brebis a été utilisé dans de nombreux domaines de recherche et que les modalités d'utilisation de ce modèle sont multiples. En effet, le modèle ovin a été utilisé en pharmacologie, anesthésiologie, imagerie médicale, oto-rhino-laryngologie, endocrinologie, maladies infectieuses, nutrition, maladies cardio-vasculaires, pneumologie, thérapies cellulaires, cancérologie, neurologie, uro-néphrologie, fœtoscopie, reproduction et gastro entérologie.

L'utilisation des modèles gros animaux est dans de nombreuses spécialités médicales une étape préclinique indispensable. L'utilisation extensive du modèle ovin s'explique par la similitude anatomique et physiologique de ce modèle par rapport à l'homme et par la robustesse du modèle. Cette proximité permet une extrapolation des résultats de recherche à l'homme plus pertinente que les modèles petits animaux. Ainsi, de nombreuses techniques développées chez la brebis ont fait l'objet d'essais cliniques et d'applications en milieu hospitalier.

La recherche fœtale sur fœtus humain amène des débats éthiques, législatifs et moraux étroitement mêlés aux questionnements sur l'avortement. Les réponses à ces débats ne sont pas encore définies à ce jour et la législation entourant ces questions est en constante évolution. L'utilisation de modèles animaux en recherche fœtale apporte une réponse à ces débats en permettant des avancées dans la recherche tout en limitant le nombre de sujets humains nécessaires à ces avancées. L'utilisation de modèles animaux fait l'objet d'une législation à part, qui aborde l'expérimentation animale en général et non spécifiquement l'utilisation du fœtus animal en recherche. L'objectif principal de cette législation est de limiter autant que possible le nombre d'animaux utilisés et s'applique de la même manière aux fœtus animaux. Des études cliniques sur l'homme seront toujours nécessaires au développement des thérapeutiques de demain, mais les modèles animaux apportent des informations cruciales sur la sécurité et l'efficacité de ces thérapeutiques avant le transfert à l'homme.

Annexe 1: Instrumentation chronique du fœtus ovin

Les techniques d'instrumentation chronique du fœtus ont été développées dans les années 1980 et sont toujours utilisées de nos jours.

Technique d'abord du fœtus :

La mère est placée en décubitus dorsal incliné ou non de 15% en vers le décubitus latéral gauche pour éviter une compression de la veine cave, et une laparotomie médiane est effectuée. Le fœtus est orienté par palpation. L'utérus est ouvert au-dessus de la zone d'intérêt sur une zone sans vaisseaux ni cotylédons.

Cannulations de la trachée, et des vaisseaux :

Cannulation de la Trachée :

La zone du cou est anesthésiée localement avec de la Xylocaïne 1%. Le cou est incisé transversalement, et les muscles sternohyoïdiens sont séparés entre le thymus et la glande thyroïde. La trachée est ouverte par incision transverse pour permettre la cannulation.

Veine Jugulaire et artère carotidienne :

L'abord se fait par la même incision que pour la trachée. Les muscles sterno-mastoïdien et sterno-mandibulaires sont disséqués et le muscle omohyoïdien est séparé pour avoir accès à la carotide. La carotide et le nerf vague sont séparés et un cathéter rempli de solution héparinisée est inséré dans l'artère carotide ou la veine jugulaire après ajout de Xylocaïne 1% pour éviter la vasoconstriction.

Veines et artères ombilicales :

L'abord se fait par voie ventrale fœtale. La gaine du cordon ombilical est ouverte et une des artères ombilicales ou la veine ombilicale sont disséquées pour la cannulation.

Veines et artères fémorales :

La technique nécessite un abord ventral. La technique de cannulation des artères et veines fémorales transcutanée est identique que la technique classique utilisée chez l'adulte. Une fois les cannulations effectuées, les plaies sont fermées avec un surjet simple et les cathéters sont fixés extérieurement à la peau du fœtus.

Pose d'un électrocardiogramme *in utero* :

Après extériorisation du fœtus, les des électrodes sous cutanées sont posées sur le thorax du fœtus. Une électrode est posée de chaque côté du cœur, et la troisième est positionnée sur le dos du fœtus.

Pulse oxymétrie fœtale :

Les brassards de pulse oxymétrie sont placés autour des membres des fœtus (un membre postérieur ou un membre antérieur) et mesurent la fréquence cardiaque et la saturation en oxygène.

Température :

Les sondes de température sont placées dans le liquide amniotique où elles baignent. Lorsque le fœtus est extériorisé, la sonde peut être placée par voie transrectale ou transoesophagienne.

Mesure de la pression intra-amniotique :

La pression intra-amniotique est mesurée lors des fœtoscopies par connexion d'une des canules de fœtoscopie à un capteur de pression.

Fermeture de l'utérus sur la connectique :

Le fœtus est replacé dans sa position initiale dans l'utérus de la mère. Toute la connectique est réunie dans un tube et l'utérus est refermé par-dessus ce tube. Le muscle utérin et l'amnios sont suturés ensemble autour du tube avec une suture en bourse. Une longueur de sécurité est laissée pour qu'il n'y ait pas de tension exercée sur le tube. Un premier surjet ferme l'utérus, puis un surjet enfouissant pour inverser la plaie et s'assurer d'un minimum de fuites de liquide amniotique est effectué.

Le tube comportant toute la connectique des instruments de monitoring est ensuite tunnélisé de façon transcutanée ou extériorisé à travers la plaie de laparotomie et fixé sur l'abdomen de la mère.

Annexe 2 : Avantages-Inconvénients des modèles fœtaux

Modèle animal	Coût d'entretien	Facilité d'élevage	Taille des portées/ fœtus	Risque zoonotique	Capacité d'instrumentation chronique	Placentation	Avantages spécifiques	Domaines d'utilisation
Primates non-humains	Très élevé	Difficile	1 fœtus/ grande taille	Elevé	Délicate : beaucoup de mortalité	Placenta discoïde hémochorial	Très grande proximité phylogénétique et immunologique. Grandes similitudes anatomiques et physiologiques.	Maladies infectieuses (VIH, Hépatites A,B,C, Delta et E, prions, paludisme, leucémies virales), ophtalmologie (greffes de cornées et de rétines), toxicologie/pharmacologie), Neurologie (Alzheimer, Parkinson, Huntington), Reproduction, cellules souches, sclérose en plaques, transplantations d'organes....
Porcs	Elevé	Moyennement facile	8-12 fœtus/taille moyenne	modéré	Impossible : beaucoup de mortalité, fœtus de petite taille	Placenta diffus épithelio-chorial	Bonne proximité anatomique (cœur, poumons) et physiologique (digestion)	Maladies cardiovasculaires (cathéters, athérosclérose, infarctus du myocarde, chirurgie cardio-vasculaire, medical device), gastro-entérologie, urologie, reproduction, dermatologie.
Brebis	Elevé	Moyennement facile	1-2 fœtus/grande taille	Modéré à faible	Très élevée. Très grande tolérance du fœtus.	Placenta cotylédonaire syndesmochorial.	Développement similaire à l'homme (appareil urinaire, système nerveux), bonne proximité anatomique (cœur, poumons).	Pharmacologie/toxicologie, reproduction, neurologie, cellules souches, maladies cardiovasculaires, pneumologie, maladies infectieuses, nutrition, endocrinologie, cancérologie, anesthésie, ORL, urologie, gastro entérologie....
Rongeurs : Rat Souris Cochon d'inde	Faible	Très facile	/très petits	Faible	Impossible (taille des fœtus trop faible)	Placenta hémochorial sauf pour le cochon d'inde : placenta hémendothélial.	Rats et souris : génome connu. Création de lignées modifiées génétiquement possibles ;	Maladies génétiques, développement, maladies cardio-vasculaires, pharmacologie, toxicologie....
Lagomorphes	Faible	Très facile	/très petits	Faible	Faible/impossible	Placenta hémochorial		Maladies cardiovasculaires, toxicologie,

NB : l'homme a une placentation discoïde, hémochoriale

Annexe 3 : Classement des modèles

Nom du modèle	Dates de développement (fourchette temporelle)	Technique de création du modèle	Date d'induction de la lésion	Date de suivi/études/expérimentation	Domaines d'application/ Pathologies modélisées	Références Bibliographiques
Instrumentation chronique du fœtus, une technique utilisée dans tous les domaines de recherche						
Fœtus instrumentalisé pour des études chroniques	Années 1980	Chirurgie	Tous âges.	Au moins 5 jours après l'instrumentation	Tous les domaines	130
Etudes pharmacologiques, exposition du fœtus aux toxiques						
Intoxication massive aigüe à l'alcool	Années 1940-1950	Injections	Dépend du stade de gestation à modéliser : dès J+4 pour le premier trimestre, à partir de 133 ^{ème} jour pour le troisième trimestre	Peut débuter immédiatement après les injections, et se poursuivre jusqu'à quelques mois après la naissance du fœtus.	Alcoolisme gestationnel	125 150 158
Intoxication à chronique à l'alcool						
Intoxication à la cocaïne	Années 1990	Injections	Autour du 120 ^{ème} jour de gestation		Cocaïnomanie (aigüe ou chronique) gestationnelle	4 23 88
Le fœtus et la brebis : un modèle de barrière placentaire	Années 1995-2000.	Injections	Environ 130 jours de gestation		Pharmacocinétique de la barrière placentaire (cisapride, moxidectine)	14 119 148
Intoxication par des polluants environnementaux	Années 2000	Intoxication par l'alimentation	Avant le début de la gestation (jusqu'à 5 ans d'exposition)		Effet des polluants environnementaux	28 53
Modèle de toxicologie/tératologie fœtale	Années 1995-2000.	Injections	Environ 130 jours de gestation		Effets de molécules (moxidectine, fluoxétine, nifédipine etc)	9 16 68 107 148

Modèles en anesthésiologie : effet des molécules et des protocoles d'anesthésie sur le fœtus

Anesthésie générale du fœtus	Années 1980	Injections et inhalations	Entre 90-123 jours	Immédiat	Anesthésie générale	75 98 99 142
Anesthésie gazeuse de la mère		Inhalations	Entre 125-135 jours de gestation		Anesthésie gazeuse molécules employées	12 13 29 112 165
Anesthésie maternelle par des molécules injectables		Injections	Entre 90 et 135 jours de gestation		Molécules injectables	24 25 57 143 149
Imagerie médicale. Acquisition d'images et nouvelles techniques d'imagerie.						
Validation des techniques échographiques	Années 1990	Echographie transcutanée, études inter/intra observateur	Entre 110 et 130 jours de gestation	Immédiat et parfois post mortem immédiatement après les mesures par l'image.	Echographie fœtale	42 79
Utilisation de l'échographie comme outil diagnostic		Echographie transcutanée			Diagnostic anté-natal	30 95 162
Echographie in-utéro		Echographie sous foetoscopie.			Gestation à haut risque	82
Validation des techniques d'IRM	Années 2000	IRM	Entre 100 et 125 jours de gestation.		Enjeu : obtenir des images IRM du premier semestre, et de l'appareil cardiovasculaire.	19 72 111 163 164
Utilisation de l'IRM comme outil de diagnostic et de suivi	Années 2000				Suivi des anomalies congénitales (hernies diaphragmatiques)	56 153
Développement de nouvelles techniques d'IRM					IRM fonctionnelle (activité cérébrale, oxygénation, circulation, etc.)	154 155 156 157

Oto-rhino-laryngologie. Etude de l'appareil auditif, modèles de chirurgie maxillo-faciale						
Réponse cutanée à une plaie induite	Années 1980/90	Chirurgie	Avant ou après 100-120 jours	A terme	Peau fœtale	91
Mécanismes de cicatrisation cutanée fœtale		Chirurgie	70-90 jours (avant 100-120 jours)		Cicatrisation fœtale	114
Reconstruction cutanée	Années 2000	Chirurgie			Spina bifida, bec de lièvre, etc.	69
Les tissus fœtaux, adjuvants à la cicatrisation	Années 2000	Chirurgie	145-147 jours de gestation		Cicatrisation cutanée adulte	55
Réparation de malformations maxillo-faciales		Chirurgie	Création des lésions autour de 75 jours de gestation, puis réparation autour de 100 jours		Bec de lièvre	117
Diagnostic de souffrance fœtale détectée par stimulations sonores	Années 1980	Stimulations acoustiques	120-130 jours	Immédiat	Diagnostic de souffrance fœtale	2 7 101 121
Endocrinologie						
Programmation fœtale	Années 2000	Injections/infusions	130 jours de gestation	A terme et après terme	Conséquences de l'environnement fœtal sur l'adulte	36
Molécules modulatrices du système immunitaire		Injections, infusions	A partir de 100 jours de gestation	A terme et après terme		70
Maladies infectieuses						
Maturation pulmonaire par endotoxémie	Années 2000	Injections	De 1 à 25 jours avant césarienne, ayant lieu autour de 110 jours de gestation	Après césarienne	Endotoxémie fœtale	74 77 108
Chorioamnionite					Chorioamnionite	85 126 151
Effet sur le système immunitaire					Réactions du système immunitaire fœtal	84
SIRS fœtal					A partir de 100 jours de gestation	SIRS

Nutrition						
Manipulation nutritionnelle	Années 2000	Contrôle de l'alimentation ingérée. Rationnement à hauteur de 50% ou 150 % des besoins de reproduction le plus couramment (modèles de sous nutrition et sur alimentation)	Peut débuter dès le début de la gestation	Suivi après la naissance, jusqu'à quelques années ou quelques mois.	Hypertension, diabète, restriction placentaire, etc.	11 47 60 64 144 145 147
Effets de la nutrition sur le métabolisme			Autour de 130 jours de gestation		Effets sur la muqueuse gastrique, insulino-résistance	90 134
Effets de la nutrition sur l'axe endocrinien			A partir de 100 jours de gestation		diabète	17 40
Appareil cardiovasculaire. Modèles d'anomalies de l'appareil circulatoire						
Hypoxie fœtale : occlusions de cordon -par ligature simple -par implantation d'un brassard -par électrocoagulation	Années 1990	Chirurgie	A partir de 80 jours de gestation	Suivis immédiats et après la naissance	Hypoxie fœtale	63 71 96 118 123 146
Traitement de la sténose valvulaire			110 jours			
Tachyrythmie supraventriculaire fœtale	Années 2000	Chirurgie	135 jours	Après la naissance	Tachycardie supraventriculaire	136
Hypertension par création de fistules artério-veineuses			120 jours		Hypertension	76
Hypertension pulmonaire			Autour de 130 jours de gestation		Hypertension pulmonaire	10
Réponses des baroréflexes			120 jours de gestation		Suivi immédiat	Physiologie des baroréflexes

Anémie chronique foetale	Années 2000	Prélèvements sanguins/chirurgie		Suivi immédiat et à la naissance	Anémie foetale	15 30 97 161
Circulation extracorporelle foetale	1980	Chirurgie	130 jours de gestation	Suivi immédiat	CEC foetale	87
Implantation de valves cardiaques in utéro	2010				Implantation de valves	152
Mesure du débit cardiaque foetal	1980				Mesure du débit cardiaque	8 31 61 63 94 102 128
Thérapies cellulaires						
Potentiel de greffe des cellules souches (sur foetus sain)	Années 1990	Injections de cellules souches	45-90 jours de gestation	Suivis à la naissance ou après césarienne	Potentiel de greffe des cellules souches	26 51 89 113 168
Capacité de différenciation des cellules souches (sur foetus sain)	1980		55-60 jours		Capacités de différenciation des différentes lignées	3 5 6 20 109 120 168
Potentiel réparateur des cellules souches (foetus avec lésion)	Années 2000	Insertion de dispositifs bioconstruits	70-90 jours		Thérapie cellulaire réparatrice.	58 78 89 141
Reconstruction trachéale en thérapie cellulaire (foetus avec lésion)			80-120 jours de gestation			
Pneumologie : modèles d'affections de l'appareil respiratoire						
Hernie diaphragmatique. Création du modèle et réparations	Années 1980	Chirurgie	Création de la lésion à 77-79 jours, réparation à 106 -123 jours	Evaluation en direct et à la naissance	Hernie diaphragmatique	18 33 35 49 50 66 73 81 122 129 137
Le syndrome de détresse respiratoire aigüe	Années 1990	Chirurgie	Injections de cortisol à partir de 133 jours de gestation		Hernie diaphragmatique et SDRE	131

Cancérologie. Modèles de thérapies en cancérologie						
Ondes ultrasonores à haute fréquence pour la destruction des tissus	Années 200	Chirurgie, ondes ultrasonores	128-135 jours de gestation	A la naissance ou immédiatement après les manipulations	Tératomes ou autre affection nécessitant l'exérèse tissulaire	116
Neurologie						
Modèles de spina bifida/ myelomeningocele	1995	Chirurgie	60-75 jours de gestation création. Réparation à 100 jours	A la naissance	Myelomeningocele dans les cas de spina bifida	1 46 48 52 80 103 104 1 10 115
Uro-néphrologie. Modèles de pathologie de l'appareil urinaire						
Obstruction urinaire	1970	Chirurgie	Création autour de 45 jours	Après la naissance	Obstruction urinaire	32 39 62
Profils urodynamiques fœtaux	2000	Chirurgie	80-95 jours de gestation	Immédiat	Obstruction urinaire suivi	32
Gastro-entérologie. Modèles d'anomalies de l'appareil digestif						
Gastroschisis	Années 2000	Chirurgie	Création de la lésion à 75 jours. Réparation à 100 jours	Evaluation à la naissance après réparation de la lésion.	Gastroschisis	138
Reproduction						
Retard de croissance intra-utérin. -par caronculectomie -par hypothermie maternelle -par ligature d'une artère ombilicale -par embolisation placentaire	1979	Chirurgie	A partir de 45 jours de gestation	Evaluation à la naissance	Fœtus nés avec un poids inférieur à 2.5 kg chez l'homme.	21 44 106 127 140

Autre : fœtoscopie						
Mise au point des techniques de fœtoscopie	Années 1990/2000. Tout premier modèle :	Chirurgie fœtoscopique	95-105 jours de gestation	Evaluation pendant les manipulations et à la naissance	Technique de chirurgie nouvelle	37 83 92 93
Création de modèles par fœtoscopie -obstruction de l'appareil urinaire -laparoschisis	années 1980	Chirurgie fœtoscopique	70-75 ou 90-95 jours de gestation	Evaluation à la naissance, et suivi post opératoire entre la création de la lésion et la mise bas	Obstructions urinaires, laparoschisis	34 65

BIBLIOGRAPHIE

1. AARONSON, O.S., N.B. TULIPAN, R. CYWES, H.W. SUNDELL, G.H. DAVIS, J.P. BRUNER, *et al.*, Robot-assisted endoscopic intrauterine myelomeningocele repair: a feasibility study. *Pediatr Neurosurg*, 2002. **36**(2): p. 85-9.
2. ABRAMS, R.M., K.J. GERHARDT, C. ROSA, et A.J. PETERS, Fetal acoustic stimulation test: stimulus features of three artificial larynges recorded in sheep. *Am J Obstet Gynecol*, 1995. **173**(5): p. 1372-6.
3. AIREY, J.A., G. ALMEIDA-PORADA, E.J. COLLETTI, C.D. PORADA, J. CHAMBERLAIN, M. MOVSESIAN, *et al.*, Human mesenchymal stem cells form Purkinje fibers in fetal sheep heart. *Circulation*, 2004. **109**(11): p. 1401-7.
4. AKOKA, S., P. DESCAMPS, C. GENBERG, F. FRANCONI, B. ARBEILLE, R. LAURINI, *et al.*, Cerebral MRI on fetuses submitted to repeated cocaine administration during the gestation: an ovine model. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1999. **85**(2): p. 185-90.
5. ALMEIDA-PORADA, G., D. EL SHABRAWY, C. PORADA, et E.D. ZANJANI, Differentiative potential of human metanephric mesenchymal cells. *Exp Hematol*, 2002. **30**(12): p. 1454-62.
6. ALMEIDA-PORADA, G., C. PORADA, N. GUPTA, A. TORABI, D. THAIN, et E.D. ZANJANI, The human-sheep chimeras as a model for human stem cell mobilization and evaluation of hematopoietic grafts' potential. *Exp Hematol*, 2007. **35**(10): p. 1594-600.
7. ANTONELLI, P.J., K.J. GERHARDT, R.M. ABRAMS, et X. HUANG, Fetal central auditory system metabolic response to cochlear implant stimulation. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2002. **127**(3): p. 131-7.
8. BARCLAY, A.E., BARCROFT SIR J., HARRON DH, FRANKLIN K.J., A radiographic demonstration of the circulation through the heart in the adult and in the foetus, and the identification of the ductus arteriosus. *British Journal of Radiology*, 1939. **12**: p. 505-217.
9. BEKKARI, H., D. SEKKAT, J. STRACZEK, K. HESS, F. BELLEVILLE-NABET, et P. NABET, Expression of secreted recombinant human insulin-like growth factor-II (IGF-II) in Chinese hamster ovary cells. *J Biotechnol*, 1994. **36**(1): p. 75-83.
10. BELIK, J., A.J. HALAYKO, K. RAO, et N.L. STEPHENS, Fetal ductus arteriosus ligation. Pulmonary vascular smooth muscle biochemical and mechanical changes. *Circ Res*, 1993. **72**(3): p. 588-96.
11. BERTRAM, C.E. et M.A. HANSON, Animal models and programming of the metabolic syndrome. *Br Med Bull*, 2001. **60**: p. 103-21.
12. BIEHL, D.R., J. COTE, J.G. WADE, G.A. GREGORY, et D. SITAR, Uptake of halothane by the foetal lamb in utero. *Can Anaesth Soc J*, 1983. **30**(1): p. 24-7.
13. BIEHL, D.R., R. YARNELL, J.G. WADE, et D. SITAR, The uptake of isoflurane by the foetal lamb in utero: effect on regional blood flow. *Can Anaesth Soc J*, 1983. **30**(6): p. 581-6.
14. BIRCH, R.A., V. PADMANABHAN, D.L. FOSTER, W.P. UNSWORTH, et J.E. ROBINSON, Prenatal programming of reproductive neuroendocrine function: Fetal androgen exposure produces progressive disruption of reproductive cycles in sheep. *Endocrinology*, 2003. **144**(4): p. 1426-1434.
15. BLAIR, D.K., M.C. VANDER STRATEN, et A.L. GEST, Hydrops in fetal sheep from rapid induction of anemia. *Pediatr Res*, 1994. **35**(5): p. 560-4.

16. BLEA, C.W., J.M. BARNARD, R.R. MAGNESS, T.M. PHERNETTON, et S.K. HENDRICKS, Effect of nifedipine on fetal and maternal hemodynamics and blood gases in the pregnant ewe. *Am J Obstet Gynecol*, 1997. **176**(4): p. 922-30.
17. BRAMELD, J.M., A. MOSTYN, J. DANDREA, T.J. STEPHENSON, J.M. DAWSON, P.J. BUTTERY, *et al.*, Maternal nutrition alters the expression of insulin-like growth factors in fetal sheep liver and skeletal muscle. *J Endocrinol*, 2000. **167**(3): p. 429-37.
18. BRATU, I., H. FLAGEOLE, J.M. LABERGE, L. KOVACS, D. FAUCHER, et B. PIEDBOEUF, Lung function in lambs with diaphragmatic hernia after reversible fetal tracheal occlusion. *J Pediatr Surg*, 2004. **39**(10): p. 1524-31.
19. BUHK, J.H., M. FRISCH, J. YAMAMURA, J. GRAESSNER, G. ADAM, et U. WEDEGARTNER, High-resolution in utero 3D MR imaging of inner ear microstructures in fetal sheep. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2011. **32**(11): p. 2043-6.
20. CHAMBERLAIN, J., T. YAMAGAMI, E. COLLETTI, N.D. THEISE, J. DESAI, A. FRIAS, *et al.*, Efficient generation of human hepatocytes by the intrahepatic delivery of clonal human mesenchymal stem cells in fetal sheep. *Hepatology*, 2007. **46**(6): p. 1935-45.
21. CLAPP, J.F., 3RD, H.H. SZETO, R. LARROW, J. HEWITT, et L.I. MANN, Umbilical blood flow response to embolization of the uterine circulation. *Am J Obstet Gynecol*, 1980. **138**(1): p. 60-7.
22. CLARKE, L., L. HEASMAN, K. FIRTH, et M.E. SYMONDS, Influence of route of delivery and ambient temperature on thermoregulation in newborn lambs. *Am J Physiol*, 1997. **272**(6 Pt 2): p. R1931-9.
23. COVERT, R.F., M.D. SCHREIBER, I.R. TEBBETT, et L.J. TORGERSON, Hemodynamic and cerebral blood flow effects of cocaine, cocaethylene and benzoylecgonine in conscious and anesthetized fetal lambs. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994. **270**(1): p. 118-26.
24. CRAFT, J.B., JR., L.A. COALDRAKE, J.C. BOLAN, M. MONDINO, P. MAZEL, R.M. GILMAN, *et al.*, Placental passage and uterine effects of fentanyl. *Anesth Analg*, 1983. **62**(10): p. 894-8.
25. CRAFT, J.B., JR., A.G. ROBICHAUX, H.S. KIM, D.H. THORPE, P. MAZEL, W.A. WOOLF, *et al.*, The maternal and fetal cardiovascular effects of epidural fentanyl in the sheep model. *Am J Obstet Gynecol*, 1984. **148**(8): p. 1098-104.
26. CROMBLEHOLME, T.M. et D.W. BIANCHI, In utero hematopoietic stem cell transplantation and gene therapy. *Semin Perinatol*, 1994. **18**(4): p. 376-84.
27. CUDD, T.A., Animal model systems for the study of alcohol teratology. *Experimental Biology and Medicine*, 2005. **230**(6): p. 389-393.
28. CURRY, S.C., G.R. BOND, R. RASCHKE, D. TELLEZ, et D. WIGGINS, AN OVINE MODEL OF MATERNAL IRON POISONING IN PREGNANCY. *Annals of Emergency Medicine*, 1990. **19**(6): p. 632-638.
29. DAVIS, D.A., G. SPEZIALI, L.C. WAGERLE, J.L. HECKMAN, et P.A. RUSSO, Effects of halothane on the immature lamb heart. *Ann Thorac Surg*, 1995. **59**(3): p. 695-8.
30. DAVIS, L.E., A.R. HOHIMER, et M.J. MORTON, Myocardial blood flow and coronary reserve in chronically anemic fetal lambs. *Am J Physiol*, 1999. **277**(1 Pt 2): p. R306-13.
31. DAWES, G.S., J.C. MOTT, et J.G. WIDDICOMBE, The circulation of blood in the foetal lamb. *J Physiol*, 1954. **126**(2): p. 38P.
32. DE TAYRAC, R., P.M. CUCKOW, R. DEVLIEGER, J. DEPREST, G. BOGAERT, et Y. VILLE, Antenatal urodynamics studies in the fetal lamb: experimental protocol and preliminary results. *Prenat Diagn*, 2003. **23**(3): p. 187-92.
33. DEPREST, J.A., V.A. EVRARD, P.P. VAN BALLAER, E. VERBEKEN, K. VANDENBERGHE, T.E. LERUT, *et al.*, Tracheoscopic endoluminal plugging using an

- inflatable device in the fetal lamb model. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1998. **81**(2): p. 165-9.
34. DEPREST, J.A., F.I. LUKS, K.H. PEERS, K. VANDENBERGHE, T.E. LERUT, I.A. BROSENS, *et al.*, Intrauterine endoscopic creation of urinary tract obstruction in the fetal lamb: a model for fetal surgery. *Am J Obstet Gynecol*, 1995. **172**(5): p. 1422-6.
 35. DIFIORE, J.W., D.O. FAUZA, R. SLAVIN, C.A. PETERS, J.C. FACKLER, *et al.*, Experimental fetal tracheal ligation reverses the structural and physiological effects of pulmonary hypoplasia in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*, 1994. **29**(2): p. 248-56; discussion 256-7.
 36. DODIC, M., V. HANTZIS, J. DUNCAN, S. REES, I. KOUKOULAS, K. JOHNSON, *et al.*, Programming effects of short prenatal exposure to cortisol. *FASEB J*, 2002. **16**(9): p. 1017-26.
 37. DREYFUS, M., F. BECMEUR, C. SCHWAAB, J.J. BALDAUF, L. PHILIPPE, *et al.*, The pregnant ewe: an animal model for fetoscopic surgery. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1997. **71**(1): p. 91-4.
 38. DU, M., X. YAN, J.F. TONG, J. ZHAO, *et al.*, Maternal obesity, inflammation, and fetal skeletal muscle development. *Biol Reprod*, 2010. **82**(1): p. 4-12.
 39. EDOUGA, D., B. HUGUENY, B. GASSER, L. BUSSIERES, *et al.*, Recovery after relief of fetal urinary obstruction: morphological, functional and molecular aspects. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001. **281**(1): p. F26-37.
 40. EDWARDS, L.J., M.E. SYMONDS, K.E. WARNES, J.A. OWENS, T.G. BUTLER, A. JURISEVIC, *et al.*, Responses of the fetal pituitary-adrenal axis to acute and chronic hypoglycemia during late gestation in the sheep. *Endocrinology*, 2001. **142**(5): p. 1778-85.
 41. EGGERS, H.J., Milestones in early poliomyelitis research (1840 to 1949). *J Virol*, 1999. **73**(6): p. 4533-5.
 42. EIK-NES, S.H., K. MARSAL, *et al.*, Methodology and basic problems related to blood flow studies in the human fetus. *Ultrasound Med Biol*, 1984. **10**(3): p. 329-37.
 43. EMERY, S.P., J. KREUTZER, F.R. SHERMAN, K.L. FUJIMOTO, B. JARAMAZ, C. NIKOU, *et al.*, Computer-assisted navigation applied to fetal cardiac intervention. *Int J Med Robot*, 2007. **3**(3): p. 187-98.
 44. EMMANOUILIDES, G.C., D.E. TOWNSEND, *et al.*, Effects of single umbilical artery ligation in the lamb fetus. *Pediatrics*, 1968. **42**(6): p. 919-27.
 45. EMMERT, M.Y., B. WEBER, L. BEHR, T. FRAUENFELDER, C.E. BROKOPP, J. GRUNENFELDER, *et al.*, Transapical aortic implantation of autologous marrow stromal cell-based tissue-engineered heart valves: first experiences in the systemic circulation. *JACC Cardiovasc Interv*, 2011. **4**(7): p. 822-3.
 46. ENCINAS HERNANDEZ, J.L., C. SOTO, M.A. GARCIA-CABEZAS, F. PEDERIVA, M. GARRIBOLI, R. RODRIGUEZ, *et al.*, Brain malformations in the sheep model of myelomeningocele are similar to those found in human disease: preliminary report. *Pediatr Surg Int*, 2008. **24**(12): p. 1335-40.
 47. FAN, X., S. TURDI, S.P. FORD, Y. HUA, M.J. NIJLAND, M. ZHU, *et al.*, Influence of gestational overfeeding on cardiac morphometry and hypertrophic protein markers in fetal sheep. *J Nutr Biochem*, 2011. **22**(1): p. 30-7.
 48. FARMER, D.L., C.S. VON KOCH, W.J. PEACOCK, M. DANIELPOUR, N. GUPTA, H. LEE, *et al.*, In utero repair of myelomeningocele: experimental pathophysiology, initial clinical experience, and outcomes. *Arch Surg*, 2003. **138**(8): p. 872-8.

49. FAUZA, D.O., C. BARNEWOLT, S.D. BROWN, et R.W. JENNINGS, Ultrasound-guided fetal tracheal occlusion. *J Pediatr Surg*, 2002. **37**(3): p. 300-2.
50. FAUZA, D.O., J.J. MARLER, R. KOKA, R.A. FORSE, J.E. MAYER, et J.P. VACANTI, Fetal tissue engineering: diaphragmatic replacement. *J Pediatr Surg*, 2001. **36**(1): p. 146-51.
51. FLAKE, A.W., M.R. HARRISON, N.S. ADZICK, et E.D. ZANJANI, Transplantation of fetal hematopoietic stem cells in utero: the creation of hematopoietic chimeras. *Science*, 1986. **233**(4765): p. 776-8.
52. FONTECHA, C.G., J.L. PEIRO, M. AGUIRRE, F. SOLDADO, S. ANOR, L. FRESNO, et al., Inert patch with bioadhesive for gentle fetal surgery of myelomeningocele in a sheep model. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2009. **146**(2): p. 174-9.
53. FOWLER, P.A., N.J. DORA, H. MCFERRAN, M.R. AMEZAGA, D.W. MILLER, R.G. LEA, et al., In utero exposure to low doses of environmental pollutants disrupts fetal ovarian development in sheep. *Molecular Human Reproduction*, 2008. **14**(5): p. 269-280.
54. FRASCH, M.G., T. MULLER, M. SZYNKARUK, et M. SCHWAB, Validation of spontaneous assessment of baroreceptor reflex sensitivity and its relation to heart rate variability in the ovine fetus pre- and near-term. *Can J Physiol Pharmacol*, 2009. **87**(9): p. 736-42.
55. FRASER, J.F., L. CUTTLE, M. KEMPF, G.E. PHILLIPS, M.T. HAYES, et R.M. KIMBLE, A randomised controlled trial of amniotic membrane in the treatment of a standardised burn injury in the merino lamb. *Burns*, 2009. **35**(7): p. 998-1003.
56. FRASER, M., L. BENNET, R. HELLIWELL, S. WELLS, C. WILLIAMS, P. GLUCKMAN, et al., Regional specificity of magnetic resonance imaging and histopathology following cerebral ischemia in preterm fetal sheep. *Reprod Sci*, 2007. **14**(2): p. 182-91.
57. FRIESEN, C., R. YARNELL, C. BACHMAN, R. MEATHERAL, et D. BIEHL, The effect of lidocaine on regional blood flows and cardiac output in the non-stressed and the stressed foetal lamb. *Can Anaesth Soc J*, 1986. **33**(2): p. 130-7.
58. FUCHS, J.R., D. HANNOUCHE, S. TERADA, J.P. VACANTI, et D.O. FAUZA, Fetal tracheal augmentation with cartilage engineered from bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Pediatr Surg*, 2003. **38**(6): p. 984-7.
59. FUCHS, J.R., D. HANNOUCHE, S. TERADA, S. ZAND, J.P. VACANTI, et D.O. FAUZA, Cartilage engineering from ovine umbilical cord blood mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells*, 2005. **23**(7): p. 958-64.
60. GEORGE, L.A., A.B. UTHLAUT, N.M. LONG, L. ZHANG, Y. MA, D.T. SMITH, et al., Different levels of overnutrition and weight gain during pregnancy have differential effects on fetal growth and organ development. *Reprod Biol Endocrinol*, 2010. **8**: p. 75.
61. GILBERT, R.D., G.G. POWER, H. SCHRODER, et L.D. LONGO, Fetal cardiac output measured by four-way thermodilution. *Am J Physiol*, 1980. **239**(1): p. H125-32.
62. GONZALEZ, R., Y. REINBERG, B. BURKE, T. WELLS, et R.L. VERNIER, Early bladder outlet obstruction in fetal lambs induces renal dysplasia and the prune-belly syndrome. *J Pediatr Surg*, 1990. **25**(3): p. 342-5.
63. GOODWIN, J.W., W.A. MAHON, et D.W. REID, Effect of graded reduction of umbilical blood flow on right and left ventricular outputs in the fetal lamb. *Circ Res*, 1968. **22**(5): p. 595-603.
64. GOPALAKRISHNAN, G.S., D.S. GARDNER, S.M. RHIND, M.T. RAE, C.E. KYLE, A.N. BROOKS, et al., Programming of adult cardiovascular function after early maternal undernutrition in sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004. **287**(1): p. R12-20.

65. GUYS, J.M., C. ESPOSITO, J. SIMEONI, C. D'ERCOLE, O. PAUT, A. BOUZID, *et al.*, An experimental model of gastroschisis using fetoscopy: preliminary results and technical considerations. *Surg Endosc*, 2002. **16**(2): p. 317-9.
66. HALLER, J.A., JR., R.D. SIGNER, E.S. GOLLADAY, A.E. INON, D.P. HARRINGTON, et D.W. SHERMETA, Pulmonary and ductal hemodynamics in studies of simulated diaphragmatic hernia of fetal and newborn lambs. *J Pediatr Surg*, 1976. **11**(5): p. 675-80.
67. HANSEN, J.T. et J.R. SLADEK, JR., Fetal research. *Science*, 1989. **246**(4931): p. 775-9.
68. HOGG, K., A.S. MCNEILLY, et W.C. DUNCAN, Prenatal androgen exposure leads to alterations in gene and protein expression in the ovine fetal ovary. *Endocrinology*, 2011. **152**(5): p. 2048-59.
69. HOSPER, N.A., A.J. EGGINK, L.A. ROELOFS, R.M. WIJNEN, M.J. VAN LUYN, R.A. BANK, *et al.*, Intra-uterine tissue engineering of full-thickness skin defects in a fetal sheep model. *Biomaterials*, 2010. **31**(14): p. 3910-9.
70. HUANG, W.L., C.G. HARPER, S.F. EVANS, J.P. NEWNHAM, et S.A. DUNLOP, Repeated prenatal corticosteroid administration delays myelination of the corpus callosum in fetal sheep. *Int J Dev Neurosci*, 2001. **19**(4): p. 415-25.
71. HUNTER, C.J., A.B. BLOOD, et G.G. POWER, Cerebral metabolism during cord occlusion and hypoxia in the fetal sheep: a novel method of continuous measurement based on heat production. *J Physiol*, 2003. **552**(Pt 1): p. 241-51.
72. JANI, J., L. BREYSEM, F. MAES, M. BOULVAIN, X. ROUBLIOVA, L. LEWI, *et al.*, Accuracy of magnetic resonance imaging for measuring fetal sheep lungs and other organs. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2005. **25**(3): p. 270-6.
73. JELIN, E.B., M. ETEMADI, J. ENCINAS, S.C. SCHECTER, C. CHAPIN, J. WU, *et al.*, Dynamic tracheal occlusion improves lung morphometrics and function in the fetal lamb model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*, 2011. **46**(6): p. 1150-7.
74. JOBE, A.H., J.P. NEWNHAM, K.E. WILLET, T.J. MOSS, M. GORE ERVIN, J.F. PADBURY, *et al.*, Endotoxin-induced lung maturation in preterm lambs is not mediated by cortisol. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. **162**(5): p. 1656-61.
75. JONKER, S.S., D.F. ANDERSON, L.E. DAVIS, Q. YANG, J.J. FABER, et G.D. GIRAUD, Persistent changes in arterial blood gases in fetal sheep. *Lab Anim*, 2008. **42**(3): p. 326-30.
76. JOUANNIC, J.M., J. MARTINOVIC, R. ROUSSIN, F. LABORDE, Y. DUMEZ, et A.T. DINH-XUAN, The effect of a systemic arteriovenous fistula on the pulmonary arterial blood pressure in the fetal sheep. *Prenat Diagn*, 2002. **22**(1): p. 48-51.
77. KALLAPUR, S.G., K.E. WILLET, A.H. JOBE, M. IKEGAMI, et C.J. BACHURSKI, Intra-amniotic endotoxin: chorioamnionitis precedes lung maturation in preterm lambs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001. **280**(3): p. L527-36.
78. KANTOFF, P.W., A.W. FLAKE, M.A. EGLITIS, S. SCHARF, S. BOND, E. GILBOA, *et al.*, In utero gene transfer and expression: a sheep transplantation model. *Blood*, 1989. **73**(4): p. 1066-73.
79. KISERUD, T., T. SAITO, T. OZAKI, S. RASMUSSEN, et M.A. HANSON, Validation of diameter measurements by ultrasound: intraobserver and interobserver variations assessed in vitro and in fetal sheep. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 1999. **13**(1): p. 52-7.
80. KOHL, T., M.G. HARTLAGE, D. KIEHITZ, M. WESTPHAL, T. BULLER, S. ACHENBACH, *et al.*, Percutaneous fetoscopic patch coverage of experimental lumbosacral full-thickness skin lesions in sheep. *Surg Endosc*, 2003. **17**(8): p. 1218-23.
81. KOHL, T., M.G. HARTLAGE, D. KIENITZ, M. WESTPHAL, A. BRENTROP, S. ARYEE, *et al.*, Percutaneous fetoscopic tracheal balloon occlusion in sheep. *Surg Endosc*, 2003. **17**(9): p. 1454-60.

82. KOHL, T., M.G. HARTLAGE, M. WESTPHAL, D. KIENITZ, S. ARYEE, S. ACHENBACH, *et al.*, Intra-amniotic multimodal fetal echocardiography in sheep: a novel imaging approach during fetoscopic interventions and for assessment of high-risk pregnancies in which conventional imaging methods fail. *Ultrasound Med Biol*, 2002. **28**(6): p. 731-6.
83. KOHL, T., J. RECKERS, D. STRUMPER, M. GROSSE HARTLAGE, W. GOGARTEN, U. GEMBRUCH, *et al.*, Amniotic air insufflation during minimally invasive fetoscopic fetal cardiac interventions is safe for the fetal brain in sheep. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2004. **128**(3): p. 467-71.
84. KRAMER, B.W., M. IKEGAMI, T.J. MOSS, I. NITSOS, J.P. NEWNHAM, et A.H. JOBE, Endotoxin-induced chorioamnionitis modulates innate immunity of monocytes in preterm sheep. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005. **171**(1): p. 73-7.
85. KRAMER, B.W., S. KRAMER, M. IKEGAMI, et A.H. JOBE, Injury, inflammation, and remodeling in fetal sheep lung after intra-amniotic endotoxin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002. **283**(2): p. L452-9.
86. KUNISAKI, S.M., D.A. FREEDMAN, et D.O. FAUZA, Fetal tracheal reconstruction with cartilaginous grafts engineered from mesenchymal amniocytes. *J Pediatr Surg*, 2006. **41**(4): p. 675-82; discussion 675-82.
87. LAM, C.T., R.S. BAKER, K.E. CLARK, et P. EGHTESADY, Changes in fetal ovine metabolism and oxygen delivery with fetal bypass. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2011. **301**(1): p. R105-15.
88. LAURINI, R.N., B. ARBEILLE, C. GEMBERG, S. AKOKA, A. LOCATELLI, J. LANSAC, *et al.*, Brain damage and hypoxia in an ovine fetal chronic cocaine model. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, 1999. **86**(1): p. 15-22.
89. LIECHTY, K.W., T.C. MACKENZIE, A.F. SHAABAN, A. RADU, A.M. MOSELEY, R. DEANS, *et al.*, Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med*, 2000. **6**(11): p. 1282-6.
90. LONG, N.M., S.P. FORD, et P.W. NATHANIELSZ, Maternal obesity eliminates the neonatal lamb plasma leptin peak. *J Physiol*, 2011. **589**(Pt 6): p. 1455-62.
91. LONGAKER, M.T., D.J. WHITBY, N.S. ADZICK, T.M. CROMBLEHOLME, J.C. LANGER, B.W. DUNCAN, *et al.*, Studies in fetal wound healing, VI. Second and early third trimester fetal wounds demonstrate rapid collagen deposition without scar formation. *J Pediatr Surg*, 1990. **25**(1): p. 63-8; discussion 68-9.
92. LUKS, F.I., J.A. DEPREST, K.H. PEERS, E.A. STEEGERS, et B. VAN DER WILDT, Gelatin sponge plug to seal fetoscopy port sites: technique in ovine and primate models. *Am J Obstet Gynecol*, 1999. **181**(4): p. 995-6.
93. LUKS, F.I., J.A. DEPREST, K. VANDENBERGHE, I.A. BROSENS, et T. LERUT, A model for fetal surgery through intrauterine endoscopy. *J Pediatr Surg*, 1994. **29**(8): p. 1007-9.
94. MAHON W.A., G.J.W., PAUL W.M. , Measurement of individual ventricular outputs in the fetal lamb by a dye dilution technique. *Circulation* 1966. **XIX**(July).
95. MAKIKALLIO, K., T. ERKINARO, N. NIEMI, T. KAVASMAA, G. ACHARYA, M. PAKKILA, *et al.*, Fetal oxygenation and Doppler ultrasonography of cardiovascular hemodynamics in a chronic near-term sheep model. *Am J Obstet Gynecol*, 2006. **194**(2): p. 542-50.
96. MALLARD, E.C., C.E. WILLIAMS, B.M. JOHNSTON, M.I. GUNNING, S. DAVIS, et P.D. GLUCKMAN, Repeated episodes of umbilical cord occlusion in fetal sheep lead to

- preferential damage to the striatum and sensitize the heart to further insults. *Pediatr Res*, 1995. **37**(6): p. 707-13.
97. MASCIIO, C.E., A.K. OLISON, J.C. RALPHE, R.J. TOMANEK, T.D. SCHOLZ, et J.L. SEGAR, Myocardial vascular and metabolic adaptations in chronically anemic fetal sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005. **289**(6): p. R1736-45.
 98. MCCLLAINE, R.J., K. UEMURA, S.G. DE LA FUENTE, R.J. MANSON, J.V. BOOTH, W.D. WHITE, *et al.*, General anesthesia improves fetal cerebral oxygenation without evidence of subsequent neuronal injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005. **25**(8): p. 1060-9.
 99. MCCLLAINE, R.J., K. UEMURA, D.J. MCCLLAINE, K. SHIMAZUTSU, S.G. DE LA FUENTE, R.J. MANSON, *et al.*, A description of the preterm fetal sheep systemic and central responses to maternal general anesthesia. *Anesth Analg*, 2007. **104**(2): p. 397-406.
 100. MCNIECE, I., R. JONES, S.I. BEARMAN, P. CAGNONI, Y. NIETO, W. FRANKLIN, *et al.*, Ex vivo expanded peripheral blood progenitor cells provide rapid neutrophil recovery after high-dose chemotherapy in patients with breast cancer. *Blood*, 2000. **96**(9): p. 3001-7.
 101. MEIXNER, K.E., P.J. ANTONELLI, et J.E. DOHAR, The effects of kanamycin injection into the fetal lamb cochlea. *Ear Nose Throat J*, 1999. **78**(3): p. 196-8, 203-4.
 102. MESCHIA, G., J.R. COTTER, C.S. BREATHNACH, et D.H. BARRON, The Hemoglobin, Oxygen, Carbon Dioxide and Hydrogen Ion Concentrations in the Umbilical Bloods of Sheep and Goats as Sampled Via Indwelling Plastic Catheters. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci*, 1965. **50**: p. 185-95.
 103. MEULI, M., C. MEULI-SIMMEN, C.D. YINGLING, G.M. HUTCHINS, K.M. HOFFMAN, M.R. HARRISON, *et al.*, Creation of myelomeningocele in utero: a model of functional damage from spinal cord exposure in fetal sheep. *J Pediatr Surg*, 1995. **30**(7): p. 1028-32; discussion 1032-3.
 104. MEULI, M., C. MEULI-SIMMEN, C.D. YINGLING, G.M. HUTCHINS, G.B. TIMMEL, M.R. HARRISON, *et al.*, In utero repair of experimental myelomeningocele saves neurological function at birth. *J Pediatr Surg*, 1996. **31**(3): p. 397-402.
 105. MORISHIMA, H.O. et R.A. WHITTINGTON, Pharmacokinetic considerations for the use of the ovine model in cocaine research. *Anesthesiology*, 1997. **86**(3): p. 746-7.
 106. MORRISON, J.L., Sheep models of intrauterine growth restriction: fetal adaptations and consequences. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2008. **35**(7): p. 730-43.
 107. MORRISON, J.L., K.W. RIGGS, et D.W. RURAK, Fluoxetine during pregnancy: impact on fetal development. *Reproduction Fertility and Development*, 2005. **17**(6): p. 641-650.
 108. MOULTON, K., P. RYAN, D. CHRISTIANSEN, R. HOPPER, C. KLAUSER, W. BENNETT, *et al.*, Ex vivo bioluminescence imaging of late gestation ewes following intrauterine inoculation with lux-modified Escherichia coli. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2009. **32**(5): p. 429-38.
 109. NARAYAN, A.D., J.L. CHASE, R.L. LEWIS, X. TIAN, D.S. KAUFMAN, J.A. THOMSON, *et al.*, Human embryonic stem cell-derived hematopoietic cells are capable of engrafting primary as well as secondary fetal sheep recipients. *Blood*, 2006. **107**(5): p. 2180-3.
 110. NICKSA, G.A., D.C. YU, B.T. KALISH, J.D. KLEIN, C.G. TURNER, D. ZURAKOWSKI, *et al.*, Serial amniotomies prevent fetal pulmonary hypoplasia in a large animal model of oligohydramnios. *J Pediatr Surg*, 2011. **46**(1): p. 67-71.
 111. NIEMAN, B.J., K.U. SZULC, et D.H. TURNBULL, Three-dimensional, in vivo MRI with self-gating and image coregistration in the mouse. *Magn Reson Med*, 2009. **61**(5): p. 1148-57.

112. OKUTOMI, T., R.A. WHITTINGTON, D.J. STEIN, et H.O. MORISHIMA, Comparison of the effects of sevoflurane and isoflurane anesthesia on the maternal-fetal unit in sheep. *J Anesth*, 2009. **23**(3): p. 392-8.
113. OPPENHEIM, S.M., M.O. MUENCH, A. GUTIERREZ-ADAN, A.L. MOYER, R.H. BONDURANT, J.D. ROWE, *et al.*, Hematopoietic stem cell transplantation in utero produces sheep-goat chimeras. *Blood Cells Mol Dis*, 2001. **27**(1): p. 296-308.
114. OZTURK, S., M. DEVECI, M. SENGEZER, et O. GUNHAN, Results of artificial inflammation in scarless foetal wound healing: an experimental study in foetal lambs. *Br J Plast Surg*, 2001. **54**(1): p. 47-52.
115. PAEK, B.W., D.L. FARMER, C.C. WILKINSON, C.T. ALBANESE, W. PEACOCK, M.R. HARRISON, *et al.*, Hindbrain herniation develops in surgically created myelomeningocele but is absent after repair in fetal lambs. *Am J Obstet Gynecol*, 2000. **183**(5): p. 1119-23.
116. PAEK, B.W., S. VAEZY, V. FUJIMOTO, M. BAILEY, C.T. ALBANESE, M.R. HARRISON, *et al.*, Tissue ablation using high-intensity focused ultrasound in the fetal sheep model: potential for fetal treatment. *Am J Obstet Gynecol*, 2003. **189**(3): p. 702-5.
117. PAPADOPULOS, N.A., M.A. PAPADOPOULOS, H.F. ZEILHOFER, H. BOOS, J. HENKE, W. ERHARDT, *et al.*, Intrauterine autogenous foetal bone transplantation for the repair of cleft-like defects in the mid-gestational sheep model. *J Craniomaxillofac Surg*, 2004. **32**(4): p. 199-210.
118. PATEL, J. et A.D. EDWARDS, Prediction of outcome after perinatal asphyxia. *Curr Opin Pediatr*, 1997. **9**(2): p. 128-32.
119. PEREZ, R., C. PALMA, M.J. NUNEZ, M. NAVAS, G. OLMOS, et J. COX, Transplacental exchange of moxidectin after maternal or fetal intravenous administration in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 2009. **32**(6): p. 596-605.
120. PETRIZZI, L., A. IOANNONI, V. VARASANO, V. RUSSO, A. MAURO, et A. MAZZOLA, An ovine preimmune foetal model to study the effect of cellular therapies for myocardial diseases. *Vet Res Commun*, 2008. **32 Suppl 1**: p. S45-50.
121. PLESSINGER, M.A. et J.R. WOODS, JR., Fetal auditory brain stem response: external and intrauterine auditory stimulation. *Am J Physiol*, 1986. **250**(1 Pt 2): p. R137-41.
122. PRINGLE, K.C., J.W. TURNER, J.C. SCHOFIELD, et R.T. SOPER, Creation and repair of diaphragmatic hernia in the fetal lamb: lung development and morphology. *J Pediatr Surg*, 1984. **19**(2): p. 131-40.
123. PULGAR, V.M., J. ZHANG, G.A. MASSMANN, et J.P. FIGUEROA, Mild chronic hypoxia modifies the fetal sheep neural and cardiovascular responses to repeated umbilical cord occlusion. *Brain Res*, 2007. **1176**: p. 18-26.
124. RAMADOSS, J., H.A. HOGAN, J.C. GIVEN, J.R. WEST, et T.A. CUDD, Binge alcohol exposure during all three trimesters alters bone strength and growth in fetal sheep. *Alcohol*, 2006. **38**(3): p. 185-192.
125. RAMADOSS, J., E.R. LUNDE, K.B. PINA, W.-J.A. CHEN, et T.A. CUDD, All three trimester binge alcohol exposure causes fetal cerebellar Purkinje cell loss in the presence of maternal hypercapnea, acidemia, and normoxemia: Ovine model. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research*, 2007. **31**(7): p. 1252-1258.
126. REES, S., N. HALE, R. DE MATTEO, L. CARDAMONE, M. TOLCOS, M. LOELIGER, *et al.*, Erythropoietin is neuroprotective in a preterm ovine model of endotoxin-induced brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2010. **69**(3): p. 306-19.
127. ROBINSON, J.S., E.J. KINGSTON, C.T. JONES, et G.D. THORBURN, Studies on experimental growth retardation in sheep. The effect of removal of a endometrial caruncles on fetal size and metabolism. *J Dev Physiol*, 1979. **1**(5): p. 379-98.

128. RUDOLPH, A.M. et M.A. HEYMANN, The circulation of the fetus in utero. Methods for studying distribution of blood flow, cardiac output and organ blood flow. *Circ Res*, 1967. **21**(2): p. 163-84.
129. SAADA, J., N. OUDRHIRI, A. BONNARD, P. DE LAGAUSIE, A. AISSAOUI, M. HAUCHECORNE, *et al.*, Combining keratinocyte growth factor transfection into the airways and tracheal occlusion in a fetal sheep model of congenital diaphragmatic hernia. *J Gene Med*, 2010. **12**(5): p. 413-22.
130. SATO, A., C. ENDO, M. KYOZUKA, S.M. LIU, T. IDOGAWA, J. SAITO, *et al.*, A method for making chronic fetal preparation in the lamb: results of 4 year's experiences. *Tohoku J Exp Med*, 1985. **147**(2): p. 157-68.
131. SCHNITZER, J.J., H.L. HEDRICK, B.A. PACHECO, P.D. LOSTY, D.P. RYAN, D.P. DOODY, *et al.*, Prenatal glucocorticoid therapy reverses pulmonary immaturity in congenital diaphragmatic hernia in fetal sheep. *Ann Surg*, 1996. **224**(4): p. 430-7; discussion 437-9.
132. SCHOEBERLEIN, A., W. HOLZGREVE, L. DUDLER, S. HAHN, et D.V. SURBEK, Tissue-specific engraftment after in utero transplantation of allogeneic mesenchymal stem cells into sheep fetuses. *Am J Obstet Gynecol*, 2005. **192**(4): p. 1044-52.
133. SCHOEBERLEIN, A., W. HOLZGREVE, L. DUDLER, S. HAHN, et D.V. SURBEK, In utero transplantation of autologous and allogeneic fetal liver stem cells in ovine fetuses. *Am J Obstet Gynecol*, 2004. **191**(3): p. 1030-6.
134. SEBERT, S.P., N.S. DELLSCHAFT, L.L. CHAN, H. STREET, M. HENRY, C. FRANCOIS, *et al.*, Maternal nutrient restriction during late gestation and early postnatal growth in sheep differentially reset the control of energy metabolism in the gastric mucosa. *Endocrinology*, 2011. **152**(7): p. 2816-26.
135. SEEHASE, M., M. GANTERT, A. LADENBURGER, Y. GARNIER, S. KUNZMANN, W. THOMAS, *et al.*, Myocardial response in preterm fetal sheep exposed to systemic endotoxaemia. *Pediatr Res*, 2011. **70**(3): p. 242-6.
136. SHIRAIISHI, H., Y. KIKUCHI, M.Y. MOMOI, et M. YANAGISAWA, Hemodynamic effect of rapid atrial pacing in fetal lambs. *Pacing Clin Electrophysiol*, 1999. **22**(2): p. 320-5.
137. SOPER, R.T., K.C. PRINGLE, et J.C. SCOFIELD, Creation and repair of diaphragmatic hernia in the fetal lamb: techniques and survival. *J Pediatr Surg*, 1984. **19**(1): p. 33-40.
138. STEPHENSON, J.T., K.O. PICHAKRON, L. VU, T. JANCELEWICZ, R. JAMSHIDI, J.K. GRAYSON, *et al.*, In utero repair of gastroschisis in the sheep (*Ovis aries*) model. *J Pediatr Surg*, 2010. **45**(1): p. 65-9.
139. STRONG, C., Fetal tissue transplantation: can it be morally insulated from abortion? *J Med Ethics*, 1991. **17**(2): p. 70-6.
140. SUPRAMANIAM, V.G., G. JENKIN, J. LOOSE, E.M. WALLACE, et S.L. MILLER, Chronic fetal hypoxia increases activin A concentrations in the late-pregnant sheep. *BJOG*, 2006. **113**(1): p. 102-9.
141. SURBEK, D.V., A. YOUNG, E. DANZER, A. SCHOEBERLEIN, L. DUDLER, et W. HOLZGREVE, Ultrasound-guided stem cell sampling from the early ovine fetus for prenatal ex vivo gene therapy. *Am J Obstet Gynecol*, 2002. **187**(4): p. 960-3.
142. SWARTZ, C.M., CUMMINGS *et al.*, The effects of general anesthesia on the asphyxiated foetal lamb in utero. *Can Anaesth Soc J*, 1985.
143. SWARTZ, J., M. CUMMING, et D. BIEHL, The effect of ketamine anaesthesia on the acidotic fetal lamb. *Can J Anaesth*, 1987. **34**(3 (Pt 1)): p. 233-7.

144. SYMONDS, M.E., A. MOSTYN, S. PEARCE, H. BUDGE, et T. STEPHENSON, Endocrine and nutritional regulation of fetal adipose tissue development. *J Endocrinol*, 2003. **179**(3): p. 293-9.
145. SYMONDS, M.E., S. PEARCE, J. BISPHAM, D.S. GARDNER, et T. STEPHENSON, Timing of nutrient restriction and programming of fetal adipose tissue development. *Proc Nutr Soc*, 2004. **63**(3): p. 397-403.
146. TCHIRIKOV, M., M. STROHNER, S. POPOVIC, K. HECHER, et H.J. SCHRODER, Cardiac output following fetoscopic coagulation of major placental vessels in fetal sheep. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2008. **32**(7): p. 917-22.
147. TORRENS, C., T.H. SNELLING, R. CHAU, M. SHANMUGANATHAN, J.K. CLEAL, K.R. POORE, *et al.*, Effects of pre- and periconceptional undernutrition on arterial function in adult female sheep are vascular bed dependent. *Exp Physiol*, 2009. **94**(9): p. 1024-33.
148. VEEREMAN-WAUTERS, G., J. MONBALIU, W. MEULDERMANS, R. WOESTENBORGHS, M. VERLINDEN, J. HEYKANTS, *et al.*, Study of the placental transfer of cisapride in sheep. Plasma levels in the pregnant ewe, the fetus, and the lamb. *Drug Metab Dispos*, 1991. **19**(1): p. 168-72.
149. VERTOMMEN, J.D., M.A. MARCUS, et H. VAN AKEN, The effects of intravenous and epidural sufentanil in the chronic maternal-fetal sheep preparation. *Anesth Analg*, 1995. **80**(1): p. 71-5.
150. WATARI, H., D.E. BORN, et C.A. GLEASON, Effects of first trimester binge alcohol exposure on developing white matter in fetal sheep. *Pediatric Research*, 2006. **59**(4): p. 560-564.
151. WATTERBERG, K.L., L.M. DEMERS, S.M. SCOTT, et S. MURPHY, Chorioamnionitis and early lung inflammation in infants in whom bronchopulmonary dysplasia develops. *Pediatrics*, 1996. **97**(2): p. 210-5.
152. WEBER, B., M.Y. EMMERT, L. BEHR, C. BROKOPP, T. FRAUENFELDER, O. KRETSCHMAR, *et al.*, Fetal trans-apical stent delivery into the pulmonary artery: prospects for prenatal heart-valve implantation. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2012. **41**(2): p. 398-403.
153. WEDEGAERTNER, U., M. TCHIRIKOV, C. HABERMANN, K. HECHER, J. DEPREST, G. ADAM, *et al.*, Fetal sheep with tracheal occlusion: monitoring lung development with MR imaging and B-mode US. *Radiology*, 2004. **230**(2): p. 353-8.
154. WEDEGARTNER, U., H. KOOIJMAN, T. ANDREAS, N. BEINDORFF, K. HECHER, et G. ADAM, T2 and T2* measurements of fetal brain oxygenation during hypoxia with MRI at 3T: correlation with fetal arterial blood oxygen saturation. *Eur Radiol*, 2010. **20**(1): p. 121-7.
155. WEDEGARTNER, U., H. KOOIJMAN, J. YAMAMURA, M. FRISCH, C. WEBER, R. BUCHERT, *et al.*, In vivo MRI measurement of fetal blood oxygen saturation in cardiac ventricles of fetal sheep: a feasibility study. *Magn Reson Med*, 2010. **64**(1): p. 32-41.
156. WEDEGARTNER, U., M. TCHIRIKOV, S. SCHAFER, A.N. PRIEST, H. KOOIJMAN, G. ADAM, *et al.*, Functional MR imaging: comparison of BOLD signal intensity changes in fetal organs with fetal and maternal oxyhemoglobin saturation during hypoxia in sheep. *Radiology*, 2006. **238**(3): p. 872-80.
157. WEDEGARTNER, U., M. TCHIRIKOV, S. SCHAFER, A.N. PRIEST, M. WALTHER, G. ADAM, *et al.*, Fetal sheep brains: findings at functional blood oxygen level-dependent 3-T MR imaging--relationship to maternal oxygen saturation during hypoxia. *Radiology*, 2005. **237**(3): p. 919-26.

158. WEST, J.R., S.E. PARNELL, W.J.A. CHEN, et T.A. CUDD, Alcohol-mediated purkinje cell loss in the absence of hypoxemia during the third trimester in an ovine model system. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research*, 2001. **25**(7): p. 1051-1057.
159. WINICK, M. et A. NOBLE, Cellular response with increased feeding in neonatal rats. *J Nutr*, 1967. **91**(2): p. 179-82.
160. WINICK, M. et A. NOBLE, Cellular response in rats during malnutrition at various ages. *J Nutr*, 1966. **89**(3): p. 300-6.
161. WOLF, R.B., K.J. MOISE, JR., et R.A. BRACE, Antibody-induced anemia in fetal sheep: model for hemolytic disease of the fetus and newborn. *J Soc Gynecol Investig*, 2001. **8**(4): p. 224-32.
162. XIONG, L., L.S. BERNARD, J.N. HASHIMA, Y.B. DENG, Z. ZHOU, M. ASHRAF, et al., Regional myocardial function and response to acute afterload increase in chronically anemic fetal sheep: evaluation by two-dimensional strain echocardiography. *Ultrasound Med Biol*, 2010. **36**(12): p. 2042-7.
163. YAMAMURA, J., M. FRISCH, H. ECKER, J. GRAESSNER, K. HECHER, G. ADAM, et al., Self-gating MR imaging of the fetal heart: comparison with real cardiac triggering. *Eur Radiol*, 2011. **21**(1): p. 142-9.
164. YAMAMURA, J., B. SCHNACKENBURG, H. KOOIJMANN, M. FRISCH, K. HECHER, G. ADAM, et al., High resolution MR imaging of the fetal heart with cardiac triggering: a feasibility study in the sheep fetus. *Eur Radiol*, 2009. **19**(10): p. 2383-90.
165. YARNELL, R., D.R. BIEHL, W.A. TWEED, G.A. GREGORY, et D. SITAR, The effect of halothane anaesthesia on the asphyxiated foetal lamb in utero. *Can Anaesth Soc J*, 1983. **30**(5): p. 474-9.
166. YINGLING, C.D., C. MEULI-SIMMEN, M. MEULI, G.B. TIMMEL, M. HARRISON, et N.S. ADZICK, Experimental fetal neurosurgery: effects of in-utero manipulations on somatosensory evoked potentials. *Pediatr Surg Int*, 1999. **15**(8): p. 535-9.
167. YOUNG, A.J., W. HOLZGREVE, L. DUDLER, A. SCHOEBERLEIN, et D.V. SURBEK, Engraftment of human cord blood-derived stem cells in preimmune ovine fetuses after ultrasound-guided in utero transplantation. *Am J Obstet Gynecol*, 2003. **189**(3): p. 698-701.
168. ZANJANI, E.D., M.G. PALLAVICINI, J.L. ASCENSAO, A.W. FLAKE, R.G. LANGLOIS, M. REITSMA, et al., Engraftment and long-term expression of human fetal hemopoietic stem cells in sheep following transplantation in utero. *J Clin Invest*, 1992. **89**(4): p. 1178-88.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE L'UTILISATION DU FOETUS DE BREBIS COMME MODELE EXPERIMENTAL

Nom : GENAIN

Prénom : Marie-Aude

Résumé :

Le but de ce travail a été de recenser les modèles expérimentaux originaux sur le fœtus de brebis décrits dans la littérature. La recherche bibliographique a été effectuée à l'aide de la base de données Web of Science, entre Mars 2011 et Mars 2012. Après sélection des publications originales, les résultats ont été présentés par spécialité médicale. Les publications ont aussi été classées dans une base de données Excel permettant une recherche rapide. Les résultats de recherche de cette étude bibliographique ont montré que le fœtus de brebis a été utilisé en recherche dans de nombreux domaines : la pharmacologie, l'anesthésiologie, l'imagerie, l'oto-rhino-laryngologie, l'endocrinologie, les maladies infectieuses, la nutrition, la cardiologie, les thérapies cellulaires, la pneumologie, la cancérologie, la neurologie, l'uro-néphrologie, la fœtoscopie, la gastro-entérologie et la reproduction. L'analyse des avantages et inconvénients du modèle gros animal ovin a été présentée et démontre sa supériorité dans le cadre de la recherche expérimentale fœtale par rapport aux modèles murins. Parmi les modèles gros animaux, la physiologie et l'anatomie du modèle ovin souvent proche de l'homme, ainsi que sa robustesse en font le modèle gros animal le plus utilisé en recherche fœtale. La recherche fœtale soulève un débat éthique controversé qui a été abordé dans ce travail. Une discussion sur les aspects législatifs et éthiques entourant l'expérimentation animale et plus particulièrement la recherche fœtale et la recherche sur tissus fœtaux a donc été entreprise.

Mots clés :

MODELE ANIMAL DE MALADIE HUMAINE / MODELE EXPERIMENTAL / FŒTUS/
LEGISLATION / OVIN / BREBIS

Jury :

Président :

Directeur : Pr. Degueurce C.

Co-Directeur : Dr. Behr L.

Assesseur : Dr. Tissier R.

LITERATURE REVIEW OF THE USE OF FETAL SHEEP AS EXPERIMENTAL MODELS FOR BIOMEDICAL RESEARCH

Surname : GENAIN

Given name : Marie-Aude

Summary :

The purpose of this document was to make an inventory of the existing original experimental models on the ovine fetus. Bibliographic research was performed through the Web of Science database, between March 2011 and March 2012. After selecting the original publications, the research's results were sorted out and presented by medical specialty in this document. The publications were also filed in an Excel document for quick consultation. The results of this bibliographic research have showed that the ovine fetal model has been extensively used in research, in a broad array of specialties: pharmacology, anesthesiology, imaging, otolaryngology, endocrinology, infectious diseases, nutrition, cardiology, cell based therapies, pneumology, oncology, neurology, nephrology, fetoscopy, urology, nephrology and theriogenology. The pros and cons of the ovine large animal model were discussed in this work and proved this model's ascendancy over murine models. The closely related anatomy and physiology of the ovine model to the human subject and this model's sturdiness make it the most commonly used model in fetal research when compared to other large animal models. Fetal research is closely entwined with ethical considerations and controversy. This debate was described in this work and a discussion on the ethical and legislative background around animal research and particularly around fetal research and research on fetal tissue was presented.

Key words:

ANIMAL MODEL OF HUMAN DISEASE / EXPERIMENTAL MODEL / FETUS / LEGISLATION / OVINE/ SHEEP

Jury:

President:

Director: Pr. Degueurce C.

Co-Director: Dr. Behr L.

Assessor : Dr. Tissier R.