



HAL
open science

Caractérisation chez l'ovin du rôle de la prématurité induite sur le développement du cerveau

Sarah Gouraud

► **To cite this version:**

Sarah Gouraud. Caractérisation chez l'ovin du rôle de la prématurité induite sur le développement du cerveau. Médecine vétérinaire et santé animale. 2024. dumas-04481635

HAL Id: dumas-04481635

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04481635v1>

Submitted on 28 Feb 2024

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Année 2024

CARACTÉRISATION CHEZ L'OVIN DU RÔLE DE LA PRÉMATURITÉ INDUITE SUR LE DÉVELOPPEMENT DU CERVEAU

THÈSE

pour obtenir le diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)

le 16 janvier 2024

par

Sarah GOURAUD

sous la direction de

Sylvie Chastant

JURY

Président du jury :	M. DESQUILBET Loïc	Professeur à l'EnvA
Directrice de thèse :	Mme CHASTANT Sylvie	Professeur à l'EnvA
Examineur :	M. TIRET Laurent	Professeur à l'EnvA
Membre invité :	Mme MOTTE-SIGNORET Emmanuelle	Maître de Conférences à l'UVSQ
Membre invité :	M. MAUFFRÉ Vincent	Docteur Vétérinaire

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



version décembre 2023

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

M	Adjou	Karim	Professeur	DPASP	1
M	Audigé	Fabrice	Professeur	DEPEC	2
M	Bellier	Sylvain	Professeur	DSBP	3
Mme	Benckekroun	Ghita	Maître de conférences HDR	DEPEC	4
M	Blaga	Radu	Professeur	DSBP	5
M	Blot	Stéphane	Professeur	DEPEC	6
M	Boulouis	Henri-Jean	Professeur émérite	DSBP	7
Mme	Chahory	Sabine	Professeur	DEPEC	8
Mme	Chastant	Sylvie	Professeur	DPASP	9
M	Chateau	Henry	Professeur	DSBP	10
Mme	Chetboul	Valérie	Professeur	DEPEC	11
Mme	Crevier-Denoix	Nathalie	Professeur	DSBP	12
M	Degueurce	Christophe	Professeur	DSBP	13
M	Denoix	Jean-Marie	Professeur	DEPEC	14
M	Desquilbet	Loïc	Professeur	DSBP	15
Mme	Dufour	Barbara	Professeur émérite	DPASP	16
M	Eloit	Marc	Professeur	DSBP	17
M	Fayolle	Pascal	Professeur émérite	DEPEC	18
M	Federighi	Michel	Professeur	DPASP	19
M	Fontbonne	Alain	Professeur	DEPEC	20
Mme	Gilbert	Caroline	Professeur	DSBP	21
M	Grandjean	Dominique	Professeur	DEPEC	22
Mme	Grimard-Balif	Bénédictte	Professeur	DPASP	23
Mme	Haddad-Hoang Xuan	Nadia	Professeur	DPASP	24
M	Jouvion	Gregory	Professeur	DSBP	25
M	Kohlhauer	Matthias	Professeur	DSBP	26
Mme	Le Poder	Sophie	Professeur	DSBP	27
Mme	Le Roux	Delphine	Maître de conférences HDR	DSBP	28
M	Manassero	Mathieu	Professeur	DEPEC	29
Mme	Maurey-Guéneq	Christelle	Professeur	DEPEC	30
M	Millemann	Yves	Professeur	DPASP	31
M	Ponter	Andrew	Professeur	DPASP	32
Mme	Risco-Castillo	Véronica	Maître de conférences HDR	DSBP	33
Mme	Rivière	Julie	Maître de conférences HDR	DPASP	34
Mme	Robert	Céline	Professeur	DSBP	35
M	Tiret	Laurent	Professeur	DSBP	36
M	Tissier	Renaud	Professeur	DSBP	37
M	Verwaerde	Patrick	Professeur	DEPEC	38
Mme	Viateau	Véronique	Professeur	DEPEC	39

Liste des Maîtres de conférences et Ingénieurs de recherche DMV

M	Arné	Pascal	Maître de conférences	DPASP	1
Mme	Barassin	Isabelle	Maître de conférences	DPASP	2
Mme	Barbarino	Alix	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC	3
Mme	Bertoni	Lelia	Maître de conférences	DEPEC	5
Mme	Canonne-Guibert	Morgane	Maître de conférences	DEPEC	7
Mme	Chevallier	Lucie	Maître de conférences	DSBP	8
Mme	Cochet-Faivre	Noëlle	Maître de conférences	DEPEC	9
Mme	Cordonnier-Lefort	Nathalie	Maître de conférences	DSBP	10
Mme	Coudry	Virginie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC	11
Mme	Crepeaux	Guillemette	Maître de conférences	DSBP	12
M	Crozet	Guillaume	Maître de conférences	DPASP	13
Mme	De Paula Reis	Alline	Maître de conférences	DPASP	14
M	Delsart	Maxime	Maître de conférences	DPASP	15
Mme	Denis	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP	16
M	Deshuillers	Pierre	Maître de conférences	DSBP	17
M	Gauthier	Michel	Maître de conférences associé	DPASP	18
Mme	Guérin	Virginie	Maître de conférences	DSBP	19
Mme	Guétin-Poirier	Valentine	Maître de conférences	DPASP	20
Mme	Jacquet	Sandrine	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC	21
M	Kurtz	Maxime	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC	22
Mme	Lagrée	Anne-Claire	Maître de conférences	DSBP	23
Mme	Le Dudal	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DSBP	24
Mme	Legrand	Chantal	Maître de conférences associé	DSBP	25
M	Mammeri	Mohamed	Maître de conférences	DSBP	26
Mme	Manguin	Estelle	Maître de conférences	DEPEC	27
Mme	Marignac	Genevieve	Maître de conférences	DSBP	28
Mme	Marotto	Stéphanie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC	29
Mme	Maurice	Emeline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC	31
Mme	Mespoules-Rivière	Céline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC	32
Mme	Mtimet	Narjès	Maître de conférences	DPASP	33
M	Mortier	Jérémy	Maître de conférences associé	DEPEC	34
M	Nudelmann	Nicolas	Maître de conférences	DEPEC	35
M	Pignon	Charly	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC	36
M	Polack	Bruno	Maître de conférences	DSBP	37
Mme	Quéré	Émilie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC	38
Mme	Ravary-Plumioën	Bérangère	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP	39
M	Reyes-Gomez	Edouard	Maître de conférences	DSBP	40
Mme	Rose	Hélène	Maître de conférences associé	DSBP	41
M	Tanquerel	Ludovic	Maître de conférences	DEPEC	42

Remerciements

Au Président du Jury de cette thèse, M. DESQUILBET Loïc, Professeur à l'EnvA,

Je vous remercie d'avoir accepté d'être le président de cette thèse. Merci également de votre appui pour la partie statistique de cette thèse.

À M. MAUFFRÉ Vincent,

Je vous remercie d'avoir accepté de m'encadrer pour cette thèse. Merci de votre appui et de votre soutien dans la rédaction. Merci en particulier de votre flexibilité face aux défis et aux imprévus rencontrés.

À Mme CHASTANT Sylvie,

Je vous remercie d'avoir accepté d'être la directrice de cette thèse et de nous être venu en aide au dernier moment.

À M. TIRET Laurent, Professeur à l'EnvA, Examineur de cette thèse,

Je vous remercie d'avoir accepté d'être examinateur pour cette thèse. Merci pour le temps que vous y avez accordé.

À Yoann Rodriguez,

Merci beaucoup pour tout le travail expérimental réalisé sans lequel cette thèse n'aurait pu exister. Merci également de l'accueil dans les locaux, les réponses à mes questions et le partage de données et d'informations. Merci enfin de la patience face aux difficultés rencontrées. Bon courage pour la fin de ce projet.

À Mme MOTTE-SIGNORET Emmanuelle,

Merci de votre appui, particulièrement au début de ce projet.

À mes parents, mon frère, mes grand-parents,

Merci pour votre soutien sans faille pendant la totalité de mes études. Merci pour les heures d'appels lors des moments difficiles. Vous avez permis que j'arrive jusqu'ici.

À Claire, Lucie, Blandine,

Merci d'avoir été ma famille de cœur pendant toutes ces années. Merci de votre présence et de votre bienveillance.

À mes groupes de clinique, à mes amis,

Merci pour tous les bons moments et le soutien dans les moments difficiles. Merci de ne jamais m'avoir laissé baisser les bras.

À Mushu,

Merci d'avoir supporté mon stress et ma fatigue. Merci de me suivre dans toutes mes aventures que tu les comprends ou pas.

Table des matières

Liste des figures.....	3
Liste des tableaux.....	5
Liste des abréviations.....	7
Introduction.....	9
Première partie : bibliographie.....	11
I. Développement cérébral.....	11
A. Développement embryonnaire.....	11
1. Différenciation des cellules progénitrices.....	11
2. Formation du tube neural.....	12
3. Fin de la période embryonnaire et structuration neurale.....	13
B. Développement fœtal.....	14
1. Formation des gyrus et des sillons.....	14
2. Production neuronale.....	14
3. Prolifération vasculaire et importations lipidiques.....	15
4. Myélinisation.....	15
5. Maturation de la myéline.....	15
C. Cas particulier de la microglie.....	16
D. Développement post-natal.....	16
II. Topographie cérébrale et populations cellulaires.....	16
A. Populations cellulaires.....	16
1. Neurones.....	16
2. Astrocytes.....	17
3. Oligodendrocytes.....	18
4. Cellules microgliales.....	19
5. Bilan.....	19
B. Organisation générale du cerveau.....	20
1. Organisation structurelle.....	20
2. Organisation tissulaire.....	21
III. Imagerie cérébrale structurale.....	23
A. Utilisation de l'histologie simple.....	23
B. Utilisation de l'immunohistochimie.....	23
C. Utilisation de l'échographie.....	23
D. Utilisation du scanner.....	24
E. Utilisation de l'imagerie de l'IRM.....	24
IV. Conséquences de la prématurité.....	24
A. Localisation des lésions.....	25
B. Lésion de la substance blanche : leucomalacie périventriculaire.....	25
1. Définition.....	25
2. Pathogénie.....	26
C. Hémorragies intraventriculaires.....	28
1. Définition.....	28
2. Pathogénie.....	29
3. Complications.....	29
D. Effet de la prématurité sur le développement.....	30
1. Effets à court terme.....	30
2. Effets à long terme.....	30
E. Prise en charge de la prématurité.....	30
V. Conclusion.....	31
Deuxième partie : étude expérimentale.....	33

I. Introduction	33
II. Matériels et méthodes	33
A. <i>Choix et préparation des animaux</i>	33
B. <i>Immunohistochimie</i>	33
1. Fixation et préparation des échantillons	33
2. Marquage	34
3. Lecture	34
4. Analyses statistiques	34
III. Résultats	34
A. <i>Description de l'échantillon</i>	34
B. <i>Analyses immunohistochimiques</i>	35
1. Myélinisation	35
2. Neurones	39
3. Astrocytes	42
4. Microglie	45
IV. Discussion	48
A. <i>Limites statistiques de l'étude et application à la population cible</i>	48
1. Discussion des biais statistiques	48
2. Interprétation des résultats	49
B. <i>Choix de la technique et difficultés rencontrées</i>	50
1. Avantages et limites de l'immunohistochimie	50
2. Choix des marqueurs	51
3. Choix des mesures	51
C. <i>Perspectives</i>	52
Conclusion	53
Liste des références bibliographiques	55

Liste des figures

Figure 1 : Organisation en couches de l'embryon à la fin de la gastrulation (modifié d'après Emond, 2017)	12
Figure 2 : Étapes de la neurulation : A. épaissement de l'ectoderme et formation de la plaque neurale ; B. formations des bourrelets neuraxiaux et de la gouttière neurale ; C. formation du tube neural (modifié d'après Emond, 2017).....	12
Figure 3: Schéma de l'organisation des trois vésicules primaires (modifié d'après Stiles et Jernigan, 2010a)	13
Figure 4 : Schéma de l'organisation des cinq vésicules cérébrales secondaires (modifié d'après Stiles et Jernigan, 2010)	14
Figure 5 : Schéma des divisions symétriques et asymétriques des cellules progénitrices (ou précurseurs des neurones)	15
Figure 6 : Schéma de l'organisation d'un neurone (modifié d'après Cordonnier, 2020)	17
Figure 7 : Astrocyte d'un cerveau de lapin, en rouge le marquage GFAP, en vert le marquage GS, D'après (Korzhevskii <i>et al.</i> , 2019).....	18
Figure 8 : Schéma des populations cellulaires du cerveau et des marqueurs correspondants en immunohistochimie (en gras sur l'image) (modifié d'après Inacio, 2015).....	20
Figure 9 : Vue latérale d'un cerveau de mouton (modifié d'après Natural Sciences Open Educational Resources).....	21
Figure 10 : Organisation en couche du cortex cérébral ; coupe histologique vue au microscope de : (A), néocortex cérébral ; (B), cortex visuel primaire du lobe occipital humain, à la coloration hémalum et éosine ; I, couche moléculaire ; II, couche des cellules granulaires externe ; III, couche des cellules pyramidales externe ; IV, couche des cellules granulaires interne, qui peut être divisée en sous-couche a, b et c ; V, couche des cellules pyramidales interne ; VI, couche multiforme et WM, substance blanche (d'après Brat, 2018).....	22
Figure 11 : Coupe de cervelet humain colorée avec hémalum et éosine : ML, couche moléculaire peu cellulaire ; PCL, couche de cellules de Purkinje ; GCL, couche de cellules granuleuses ; WM, substance blanche	22
Figure 12 : Schéma de la probable pathogénie de la leucomalacie périventriculaire (modifié d'après Khwaja et Volpe, 2008) (Fer ⁺⁺ , ion ferreux ; IVH, hémorragie intraventriculaire).....	28
Figure 13 : Marquage de coupes histologiques de cerveau d'agneau à 100 jours de gestation avec l'anticorps anti-MBP (1/1000 ER1 10 min) A. Frontal ; B. Cervelet ; C. Pariétal ; D. Occipital	36
Figure 14 : Marquage de coupes histologiques de cerveau d'agneau à 140 jours de gestation avec l'anticorps anti-MBP (1/1000 ER1 10 min) A. Frontal ; B. Cervelet ; C. Pariétal ; D. Occipital	37

Figure 15 : Agrandissement de la zone de transition entre substance blanche et substance grise sur des coupes histologiques de cerveau, marquage avec l'anticorps anti-MBP (1/1000 ER1 10 min) A. à 100 jours de gestation ; B. à 140 jours de gestation	37
Figure 16 : Répartition du rapport surface marquée/surface non marquée par « MBP » (en pourcentage, * indique les différences significatives, d'après le Tableau 2).	38
Figure 17 : Marquage de coupes histologiques de cerveau d'agneau à 100 jours de gestation avec l'anticorps NeuN (1/3000 Htx 1min ER1 10 min) A. Frontal ; B. Cervelet ; C. Pariétal ; D. Occipital	40
Figure 18 : Marquage de coupes histologiques de cerveau d'agneau à 140 jours de gestation avec l'anticorps NeuN (1/3000 Htx 1min ER1 10 min) A. Frontal ; B. Cervelet ; C. Pariétal ; D. Occipital	40
Figure 19 : Agrandissement de la zone de transition entre substance blanche et substance grise sur des coupes histologiques de cerveau, marquage avec l'anticorps anti-NeuN (1/3000 Htx1min ER1 10 min) A. à 100 jours de gestation ; B. à 140 jours de gestation	41
Figure 20 : Répartition des pourcentages de surface marquée par « NeuN » (ns pour les différences non significatives ; * pour les différences significatives, d'après le Tableau 3)	42
Figure 21 : Marquage de coupes histologiques de cerveau d'agneau à 100 jours de gestation avec l'anticorps anti-GFAP (1/500 Htx 1min ER1 10 min) A. Frontal ; B. Cervelet ; C. Pariétal ; D. Occipital	43
Figure 22 : Marquage de coupes histologiques de cerveau d'agneau à 140 jours de gestation avec l'anticorps anti-GFAP (1/500 Htx 1min ER1 10 min) A. Frontal ; B. Cervelet ; C. Pariétal ; D. Occipital	43
Figure 23 : Agrandissement de la zone de transition entre substance blanche et substance grise sur des coupes histologiques de cerveau, marquage avec l'anticorps anti-GFAP (1/500 Htx 1min ER1 10 min) A. à 100 jours de gestation ; B. à 140 jours de gestation	44
Figure 24 : Répartition des pourcentages de surface marquée par « GFAP » (ns pour les différences non significatives ; * pour les différences significatives, d'après le Tableau 4)	45
Figure 25 : Marquage de coupes histologiques de cerveau d'agneau à 100 jours de gestation avec l'anticorps anti-IBA1 (1/500 Htx 1min ER1 10 min) A. Frontal ; B. Cervelet ; C. Pariétal ; D. Occipital	46
Figure 26 : Marquage de coupes histologiques de cerveau d'agneau à 140 jours de gestation avec l'anticorps anti-IBA1 (1/500 Htx 1min ER1 10 min) A. Frontal ; B. Cervelet ; C. Pariétal ; D. Occipital	46
Figure 27 : Agrandissement de la zone de transition entre substance blanche et substance grise sur des coupes histologiques de cerveau, marquage avec l'anticorps anti-IBA1 (1/500 Htx 1min ER1 10 min) A. à 100 jours de gestation ; B. à 140 jours de gestation	47
Figure 28 : Répartition des pourcentages de surface marquée par « IBA1 » (ns pour les différences non significatives ; * pour les différences significatives, d'après le Tableau 5)	48

Liste des tableaux

Tableau 1 : Description de l'échantillon	35
Tableau 2 : Données expérimentales issues du marquage immunohistochimique avec l'anticorps anti-MBP (en pourcentage d'aire marquée par l'anticorps par rapport à l'aire totale ; Q1, premier quartile ; Q2, deuxième quartile ; p*, degré de significativité).....	38
Tableau 3 : Données expérimentales issues du marquage immuno-histochimique avec l'anticorps anti-NeuN (en pourcentage d'aire marquée par l'anticorps par rapport à l'aire totale ; Q1, premier quartile ; Q2, deuxième quartile ; p*, degré de significativité).....	41
Tableau 4 : Données expérimentales issues du marquage immuno-histochimique avec l'anticorps anti-GFAP (en pourcentage d'aire marquée par l'anticorps par rapport à l'aire totale ; Q1, premier quartile ; Q2, deuxième quartile ; p*, degré de significativité).....	44
Tableau 5 : Données expérimentales issues du marquage immuno-histochimique avec l'anticorps anti-IBA1 (en pourcentage d'aire marquée par l'anticorps par rapport à l'aire totale ; Q1, premier quartile ; Q2, deuxième quartile ; p*, degré de significativité).....	47

Liste des abréviations

COX2	isoforme 2 de la cyclooxygénase
GFAP	protéine acide fibrillaire gliale
IBA1	<i>ionized calcium binding adapter molecule 1</i>
MBP	<i>myelin basic protein</i>
NF	neurofilament
PVL	leucomalacie périventriculaire

Introduction

L'étude de la prématurité et de sa prise en charge représente un enjeu médical et sociétal important. En effet si sa prise en charge ne cesse d'être améliorée, la survie des très grands prématurés (en deçà de 25 semaines d'aménorrhée) reste faible (Ancel *et al.*, 2015). Dans ce cadre, les effets de la prématurité sur de nombreux animaux pouvant servir de modèles sont étudiés. L'ovin en fait partie.

En élevage ovin, la prématurité est souvent synonyme de mortalité, avec des agneaux mort-nés ou mourant dans les quelques minutes à heures suivant leur naissance. Cette mortalité est principalement attribuée à une immaturité du système respiratoire, celle-ci ne permettant pas la survie en-dessous de 105 à 110 jours de gestation même en cas d'oxygénation constante (Born *et al.*, 1955).

Cependant d'autres organes et structures présentent une immaturité pouvant expliquer cette absence de survie. L'agneau né à terme possède un cerveau à la structure et au développement proche de l'adulte (McIntosh *et al.*, 1979). L'immaturité de l'encéphale pourrait ainsi participer à la faible survie de l'agneau prématuré.

Le but de cette étude est de mieux comprendre l'effet de la prématurité induite sur le télencéphale et le cervelet des agneaux et en particulier de déterminer les populations cellulaires ainsi que leur topographie chez l'agneau prématuré comparativement à l'agneau à terme, afin d'en caractériser son développement lors du dernier tiers de la gestation.

La première partie de ce travail consiste en une revue de la littérature sur le développement embryonnaire et fœtal de l'agneau, sur les possibilités d'imagerie ainsi que sur les conséquences de la prématurité. Dans la seconde partie, les populations cellulaires du cerveau d'agneaux à terme (140 jours de gestation) et prématurés (100 jours de gestation) sont étudiées et comparées. Les résultats sont ensuite discutés.

Première partie : bibliographie

La prématurité désigne toute naissance avant le terme de la gestation. Pour les agneaux, cela correspond à toutes les naissances avant 147 à 152 jours de gestation en fonction de la race étudiée. La prématurité a des conséquences sur de multiples organes se développant lors de la fin de la gestation. Le cerveau en fait partie. Afin de mieux comprendre les effets de la prématurité sur le cerveau, il convient d'étudier le développement normal de cet organe lors de la gestation. De la même manière, pour mieux visualiser les lésions liées à la prématurité, il est important de connaître l'organisation du cerveau en absence d'anomalies. Le cerveau est un organe protégé par le crâne. Son observation n'est donc pas facile *in vivo*. Nous reviendrons donc sur les techniques d'imagerie utilisables pour l'étude de cet organe. Pour finir, nous nous intéresserons aux principaux tableaux lésionnels et aux conséquences à long terme de la prématurité.

I. Développement cérébral

Le développement cérébral commence à la période embryonnaire. En effet avant cette période il n'y a pas de différenciation cellulaire. La cellule-œuf connaît des épisodes de multiplication cellulaire sans augmentation de volume, c'est l'étape de segmentation. A la fin de cette étape, l'embryon est appelé blastula et présente une cavité, le blastocèle.

A. Développement embryonnaire

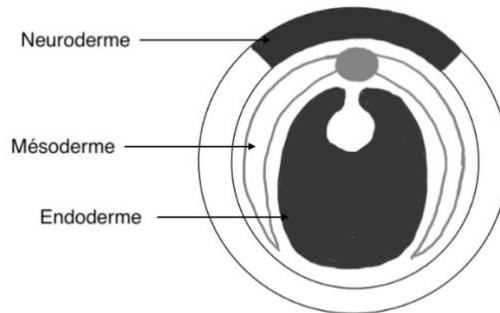
La période de développement embryonnaire des ovins s'étend approximativement du 13^e au 34^e jour après la conception. Dans cet intervalle, le système nerveux central et le système nerveux périphérique se différencient, se compartimentent et se structurent. Le développement fœtal s'étend ensuite de la fin de la quatrième semaine de gestation à la naissance (Green et Winters, 1945).

1. Différenciation des cellules progénitrices

A la fin de la segmentation, la blastula est hautement organisée mais non différenciée. La différenciation commence donc lors de la gastrulation qui consiste au passage d'une cellule monoblastique (avec un seul feuillet embryonnaire) à une cellule triblastique (avec trois feuillets embryonnaires). En effet, l'épiblaste s'invagine pour former trois feuillets :

- l'endoderme, la couche profonde à l'origine des systèmes respiratoire et digestif ;
- le mésoderme, la couche médiane à l'origine des muscles, des os, du cartilage et du système vasculaire ;
- l'ectoderme, la couche superficielle, qui évolue pour former l'épiderme (peau, ongles et glandes sudoripares) et le système nerveux central et périphérique (Figure 1). Une partie des cellules de l'ectoderme se différencie en cellules progénitrices neurales. Ces dernières ne sont pas assez nombreuses. De la fin de la gastrulation à la fin du développement embryonnaire, ces cellules vont donc se diviser de manière « symétrique », c'est-à-dire qu'une cellule progénitrice en donnera deux.

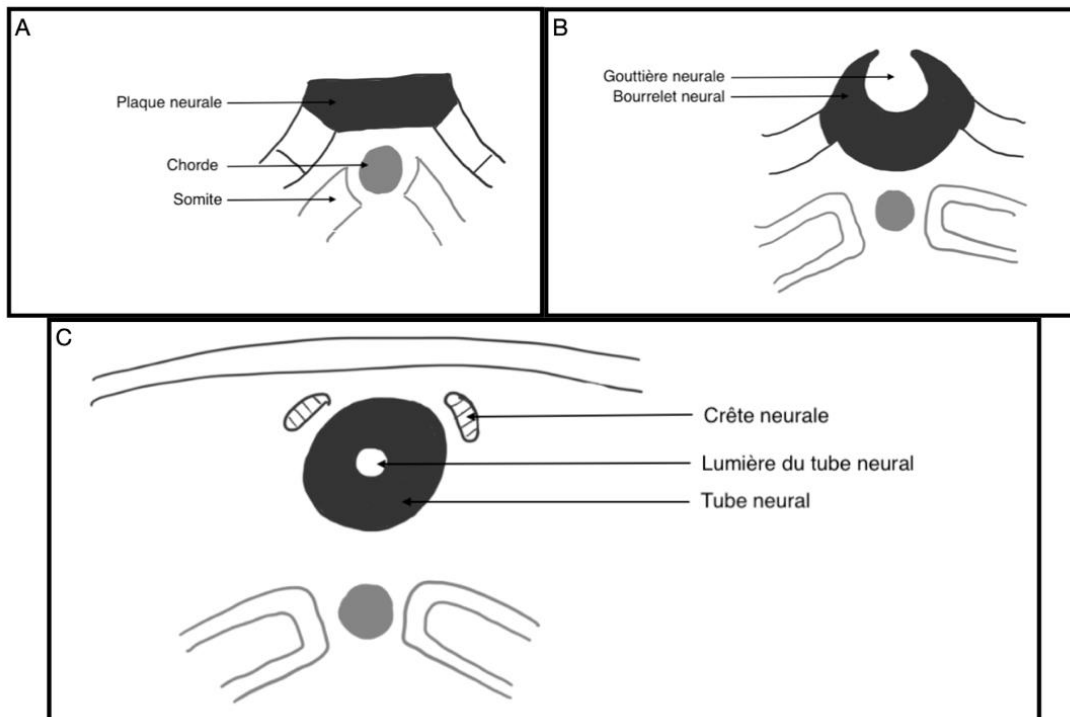
Figure 1 : Organisation en couches de l'embryon à la fin de la gastrulation (modifié d'après Emond, 2017)



2. Formation du tube neural

La neurulation correspond à la mise en place d'une ébauche de système nerveux central en région dorsale de l'embryon (Stiles et Jernigan, 2010a). En effet l'ectoderme s'épaissit en région dorsale et médiane pour former la plaque neurale (Figure 2.A) (Gilbert, 2000). Au début de la troisième semaine de gestation (Bryden *et al.*, 1972), deux bourrelets neuraux se forment de chaque côté de la plaque neurale et creusent une gouttière neurale (Figure 2.B) (Stiles et Jernigan, 2010a). Une soudure complète des bourrelets isole le tube neural, encadré par deux amas de cellules - les crêtes neurales - sous l'ectoderme (Gilbert, 2000) (Figure 2.C).

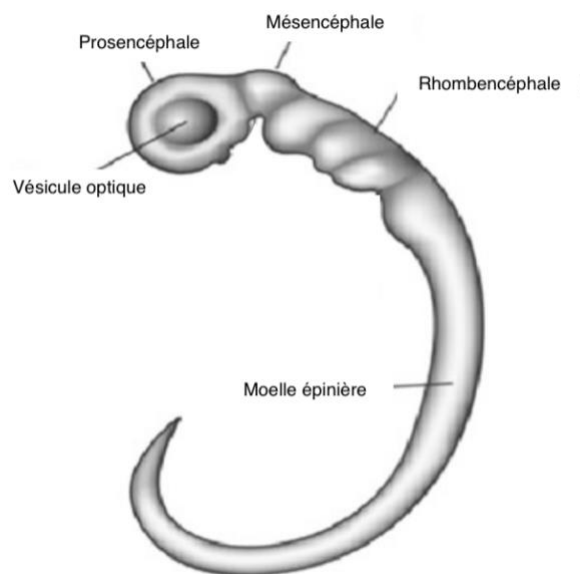
Figure 2 : Étapes de la neurulation : A. épaississement de l'ectoderme et formation de la plaque neurale ; B. formations des bourrelets neuraux et de la gouttière neurale ; C. formation du tube neural (modifié d'après Emond, 2017)



Dans le tube neural, les progéniteurs neuronaux forment une seule épaisseur cellulaire directement contre la lumière du tube (Barlow, 1969). Il s'agit de la zone ventriculaire. L'extérieur du tube neural est constitué d'un réseau fibrillaire sans noyau (Barlow, 1969). La partie rostrale des cellules du tube neural évolue pour former le cerveau antérieur et la partie caudale le cerveau postérieur et la moelle épinière (Stiles et Jernigan, 2010a).

A la fin de cette période trois vésicules cérébrales primaires sont ainsi formées : le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale (Figure 3) qui évoluent respectivement en cerveau antérieur, médian et postérieur.

Figure 3: Schéma de l'organisation des trois vésicules primaires (modifié d'après Stiles et Jernigan, 2010a)

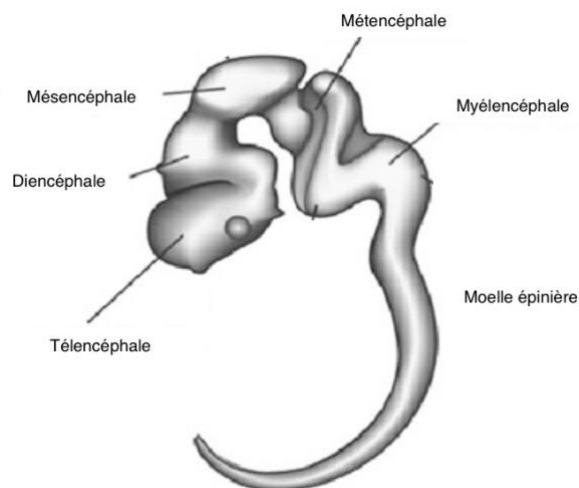


3. Fin de la période embryonnaire et structuration neurale

A la fin de la période embryonnaire, les tissus finissent leur différenciation et les cellules prennent leur place définitive (Gilbert, 2000). A cette étape du développement, on retrouve ainsi cinq vésicules cérébrales secondaires (Figure 4) (Stiles et Jernigan, 2010) :

- le prosencéphale à l'origine du télencéphale, qui évolue en hémisphères cérébraux et en bulbes olfactifs, et du diencephale, à partir duquel se forment l'hypothalamus et les vésicules optiques ;
- le mésencéphale est toujours présent, il évolue par la suite pour donner l'innervation des appareils respiratoire, digestif et vasculaire ;
- le rhombencéphale est à l'origine du métencéphale, à l'origine du cervelet, et du myélocéphale à l'origine bulbe rachidien et des neurones moteurs et sensitifs (Gilbert, 2000).

Figure 4 : Schéma de l'organisation des cinq vésicules cérébrales secondaires (modifié d'après Stiles et Jernigan, 2010)



A la fin de cette période, on observe une structuration des régions sensori-motrices dans le cortex neural. Les compartiments majeurs du diencéphale et du cerveau moyen sont différenciés. Le cerveau postérieur et la colonne spinale présentent une organisation segmentaire (Stiles et Jernigan, 2010a).

B. Développement foetal

1. Formation des gyrus et des sillons

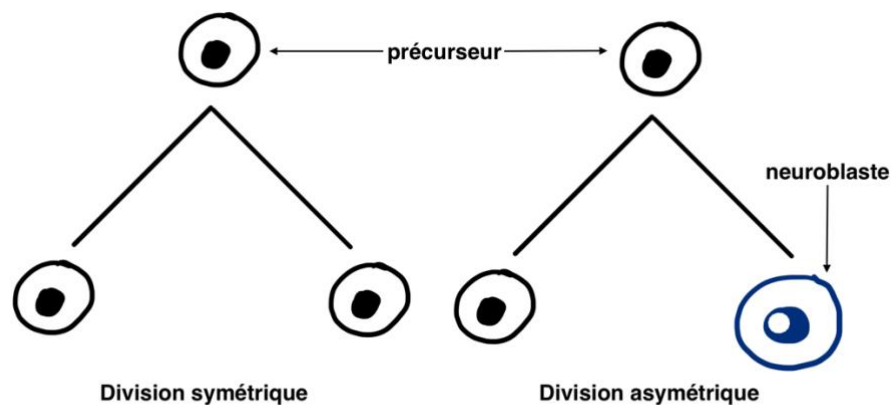
A la fin du développement embryonnaire le système nerveux central est structuré et les compartiments majeurs sont en place. Cependant le cerveau est encore lisse. A partir du 60^e jour de gestation, le premier sillon se forme (Danko, 1990). La formation des circonvolutions cérébrales (gyrification) commence à 75 jours et continue ensuite jusqu'au 110^e jour (Danko, 1991). Peu d'informations sont disponibles sur le déroulé de la gyrification chez l'agneau. Cependant chez l'humain, le processus suit une séquence codifiée. Ainsi la première fissure séparant les deux hémisphères se forme d'abord rostralement puis caudalement entre la huitième et la vingt-deuxième semaine. Les autres sillons primaires se forment entre la 14^e et la 26^e semaine. Puis entre la 30^e et la 35^e semaine se forment les sillons secondaires. Enfin les sillons tertiaires commencent leur formation à la 36^e semaine mais ils ne seront définitivement en place que bien après la naissance (Naidich *et al.*, 1994).

2. Production neuronale

Si la production neuronale commence pendant le développement embryonnaire, elle est très importante entre 40 et 90 jours de gestation dans les hémisphères cérébraux (McIntosh *et al.*, 1979). Graduellement, les cellules progénitrices cessent leur division symétrique, où une cellule progénitrice en donne deux (Stiles et Jernigan, 2010a). Elles se donc de manière asymétrique, c'est-à-dire qu'une cellule progénitrice donne une nouvelle cellule progénitrice, qui reste dans la zone de prolifération, et un neuroblaste au noyau vésiculaire qui migre vers sa région définitive (Figure 5) (Barlow, 1969). Une fois leur position prise, les neurones, formant la substance grise, se différencient et produisent des neurotransmetteurs et des facteurs neurotrophiques. Leurs dendrites et axones, responsables des connexions avec les neurones adjacents, vont également s'étendre pour former

les voies nerveuses du réseau cérébral, la substance blanche (Stiles et Jernigan, 2010a). Les cellules progénitrices continuent à se diviser de manière asymétrique, donnant deux types cellulaires : des cellules à grands noyaux vacuolaires contenant un ou plusieurs nucléoles (que l'on pense être les précurseurs des astrocytes) et des cellules à petits noyaux pléomorphes, c'est-à-dire pouvant changer de forme. Ces dernières s'organisent en rangées autour des axones, ce sont les futurs oligodendrocytes qui participeront à la formation de myéline (Barlow, 1969).

Figure 5 : Schéma des divisions symétriques et asymétriques des cellules progénitrices (ou précurseurs des neurones)



3. Prolifération vasculaire et importations lipidiques

La neurogenèse s'accompagne d'une augmentation des besoins vasculaires du système nerveux central (SNC). En réponse à l'augmentation de ces besoins, la vascularisation du SNC augmente grâce la prolifération de capillaires sanguins. Cette dernière est accompagnée par l'apparition de lipides dans les espaces périvasculaires au milieu des cellules gliales. Ceux-ci s'organisent en de larges globules autour des vaisseaux dont la taille diminue avec l'augmentation de la distance aux capillaires (Barlow, 1969).

4. Myélinisation

La myélinisation coïncide avec l'activité maximale de l'enzyme cytochrome oxydase dans les oligodendrocytes. De petites granules lipidiques apparaissent dans le cytoplasme de ces dernières. La gaine de myéline est alors délicate, finement granulaire et discontinue. L'incorporation progressive des gouttelettes lipidiques lui fait perdre sa granularité et la gaine de myéline s'épaissit (Barlow, 1969).

5. Maturation de la myéline

L'activité de la cytochrome oxydase diminue ensuite dans les oligodendrocytes. Elle se concentre dans le pourtour immédiat du noyau puis disparaît. De même la quantité de lipides dans les espaces périvasculaires diminue (Barlow, 1969).

C. Cas particulier de la microglie

L'origine et le développement de la microglie a longtemps été source de débats et il est difficile de trouver des études s'intéressant plus particulièrement aux agneaux. L'hypothèse aujourd'hui retenue pour tous les mammifères est celle d'une provenance du sac vitellin. Les macrophages primitifs qui s'y trouvent migreraient vers le cerveau pendant le développement embryonnaire (Ginhoux *et al.*, 2010). Une étude sur la prolifération de la microglie chez la souris a montré que la microglie proliférait dans le dernier quart de gestation et dans les premiers jours après la naissance sans que la densité de microglie ne soit modifiée à cause de l'augmentation du volume cérébral (Dalmau *et al.*, 2003).

D. Développement post-natal

A la naissance le cerveau des agneaux a atteint la moitié du poids du cerveau adulte. L'agneau est donc considéré comme une espèce à développement cérébral majoritairement prénatal (Mcintosh *et al.*, 1979b).

II. Topographie cérébrale et populations cellulaires

Le cerveau est un organe très organisé que l'on peut étudier à trois échelles différentes : l'échelle cellulaire, l'échelle tissulaire et l'échelle d'organe.

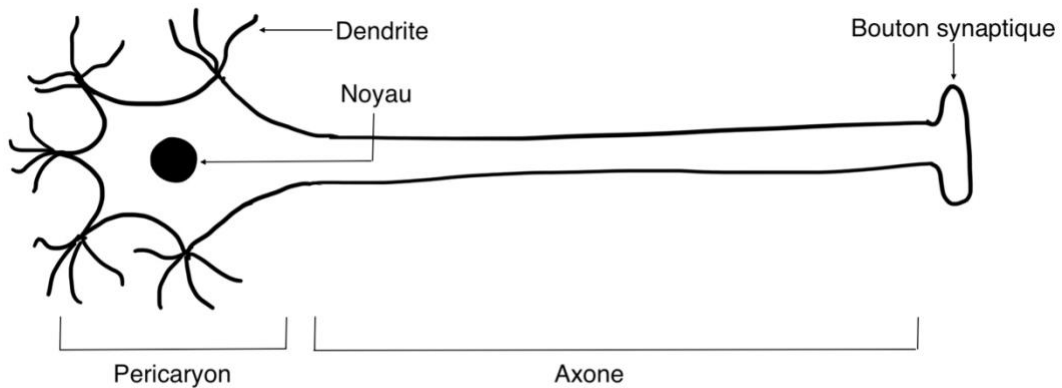
A. Populations cellulaires

1. Neurones

a) Définition et morphologie

Les neurones sont les cellules permettant la transmission et l'intégration des influx nerveux. Existants également en dehors du système nerveux central, ils peuvent être classifiés selon leur fonction ou leur morphologie. Tous les neurones présentent un corps cellulaire (le péricaryon) où se trouve le noyau, des dendrites qui permettent l'intégration des signaux et un axone, se terminant par un bouton synaptique et permettant la transmission des signaux (Figure 6) (Cordonnier, 2020). Ils présentent cependant une morphologie adaptée à leur localisation ou leur fonction. Ainsi dans le cerveau, on retrouve les neurones pyramidaux présents dans le cortex cérébral et l'hippocampe. Leurs corps cellulaires sont larges et triangulaires avec une dendrite apicale s'étendant vers la surface cérébrale et plusieurs petites dendrites basales. On retrouve également les interneurones dans le cortex ; plus petits, ils établissent des connexions entre un réseau afférent et efférent. Dans le cortex primaire moteur, on retrouve les cellules de Betz, les plus grands neurones du cortex cérébral. Dans le lobe temporal médian et dans le cervelet, on retrouve de petits neurones granulaires au cytoplasme réduit. Enfin les cellules de Purkinje sont de grosses cellules très distinctes que l'on retrouve dans le cervelet. Leur corps cellulaire est de taille importante et elles présentent un réseau dendritique arborescent (Brat, 2018).

Figure 6 : Schéma de l'organisation d'un neurone (modifié d'après Cordonnier, 2020)



b) Marqueur en immunohistochimie

Le marqueur le plus communément utilisé pour visualiser les neurones en immunohistochimie est le marqueur « NeuN ». Il s'agit d'un anticorps monoclonal dirigé contre un antigène retrouvé dans la plupart des cellules neuronales et dans toutes les régions du cerveau. Il est en effet exprimé dans les neurones post mitotiques, assez tôt dans le développement, à l'exception des cellules de Purkinje et des interneurons. Ce marqueur est considéré comme spécifique des neurones bien qu'on le retrouve dans la médullaire de la surrénale et dans l'hypophyse (Mullen *et al.*, 1992).

Il semble marquer de manière plus intense les noyaux et en particulier le nucléoplasme, bien qu'il colore également le cytoplasme de certaines cellules neuronales (Dent *et al.*, 2010). Cependant le corps cellulaire des neurones ne représente qu'une petite partie de leur structure. Pour mieux visualiser ces cellules, il est possible d'utiliser des marqueurs des neurofilaments. Ces derniers sont des protéines du cytosquelette des neurones et sont donc présents dans les axones et dans certaines dendrites. On compte trois principales protéines des neurofilaments, désignées par leurs poids moléculaires. Ces trois protéines peuvent être marquées en utilisant un anticorps spécifique de la protéine de plus petit poids moléculaire grâce à un marquage croisé (Dahl, 1983).

Les cellules de Purkinje n'étant pas marquées par « NeuN », une alternative doit être utilisée pour les visualiser. Le calcium joue de nombreux rôles dans la régulation du transfert d'information. Sa concentration et ses variations sont régulées par des protéines le liant ; la protéine Calbindin-D28k en fait partie. Or, dans le cervelet, si les cellules de Purkinje expriment de nombreuses protéines liant le calcium, d'autres cellules le font également. La protéine Calbindin-D28k est la plus spécifique puisqu'elle n'est exprimée que par les cellules de Purkinje et les cellules de Golgi (Bastianelli, 2003). L'anticorps monoclonal anti-Calbindin est donc un bon marqueur pour les cellules de Purkinje.

2. Astrocytes

a) Définition et morphologie

Les astrocytes sont les cellules gliales les plus nombreuses et les plus volumineuses. Elles permettent la régulation de la concentration de potassium extracellulaire dans le tissu nerveux et la migration des neurones au cours du développement. Elles jouent également un rôle dans la modulation des activités neuronales et dans la barrière hémato-encéphalique. (Cordonnier, 2020). Il existe deux types d'astrocytes : les astrocytes protoplasmiques de la substance grise présentant

des expansions cytoplasmiques courtes et nombreuses et les astrocytes fibreux de la substance blanche aux expansions longues et peu nombreuses (Cordonnier, 2020).

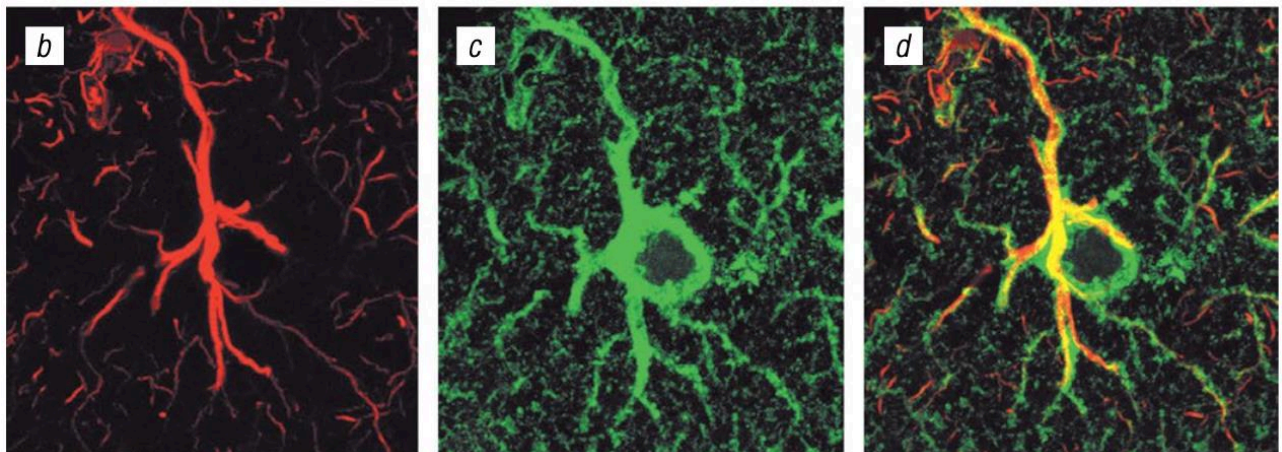
Les astrocytes dits réactifs, c'est-à-dire hypertrophié, avec une activité nucléaire importante et au cytoplasme abondant (Brat, 2018) prolifèrent en cas de mort neuronale pour combler la perte de substance (Cordonnier, 2020).

b) Marqueur en immunohistochimie

Le marqueur le plus fréquemment utilisée pour visualiser les astrocytes est un anticorps marquant la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP). Celle-ci constitue une grande partie des filaments intermédiaires du cytoplasme des astrocytes (Brat, 2018). Le marquage GFAP se distribue donc sous la forme de structures fibreuses (Figure 7.b) (Korzhevskii *et al.*, 2019).

D'autres marqueurs des astrocytes peuvent également être utilisés en complément de GFAP. Ainsi la glutamine synthétase (GS), une enzyme principalement synthétisée par les astrocytes dans le cerveau permet un marquage des astrocytes plus diffus, en petits groupes très nombreux (Figure 7.c). Cette protéine est principalement utilisée pour l'étude fonctionnelle des astrocytes (Korzhevskii *et al.*, 2019).

Figure 7 : Astrocyte d'un cerveau de lapin, en rouge le marquage GFAP, en vert le marquage GS, D'après (Korzhevskii *et al.*, 2019)



3. Oligodendrocytes

a) Définition et morphologie

Les oligodendrocytes sont les cellules responsables de la myélinisation. Elles sont présentes à la fois dans la substance blanche et dans la substance grise, bien que plus nombreuses dans la première (Brat, 2018). Ce sont de petites cellules avec de petites expansions cytoplasmiques peu nombreuses s'enroulant autour d'un ou plusieurs axones, formant les couches de myéline (Cordonnier, 2020).

b) Marqueur en immunohistochimie

Les oligodendrocytes expriment des protéines différentes selon leur stade de développement. Ainsi les cellules progénitrices des oligodendrocytes, les oligodendrocytes pré-myélinisation et les oligodendrocytes fabriquant de la myéline présentent une structure et un fonctionnement différents.

Le facteur de transcription Olig2 est présent très tôt dans la différenciation des oligodendrocytes et pourrait même jouer un rôle dans cette différenciation (Zhou *et al.*, 2000). Il est très spécifique des précurseurs et des oligodendrocytes puisqu'aucun double marquage n'est observé avec la microglie, les astrocytes ou les neurones (Billiards *et al.*, 2008). Il est également retrouvé chez les oligodendrocytes fabriquant de la myéline.

Ce dernier type d'oligodendrocyte peut également être marqué grâce à sa production de myéline. En effet un anticorps anti-MBP (*myelin basic protein*) peut être utilisé pour visualiser la myéline. La MBP, attachée à la surface du cytosol des oligodendrocytes est la deuxième protéine la plus abondante dans la myéline du système nerveux central. Elle est présente dans la gaine de myéline de la plupart des vertébrés et chez tous les mammifères. Il s'agit donc d'un marqueur adapté pour visualiser la myéline et la myélinisation (Boggs, 2006).

4. Cellules microgliales

Les cellules microgliales sont petites et allongées. On les retrouve à la fois dans la substance grise et la substance blanche du cerveau (Brat, 2018). Elles appartiennent au système phagocyte mononucléé et interviennent donc dans les fonctions de défense et dans l'immunité (Cordonnier, 2020). En effet, elles servent de cellules présentatrices d'antigènes et participent aux réponses inflammatoires en phagocytant les cellules altérées, en particulier en cas d'infection virale (Brat, 2018).

a) Marqueur en immunohistochimie

La protéine IBA1 (*ionized calcium binding adapter molecule 1*) joue un rôle dans la régulation de la microglie et en particulier dans le fonctionnement de la microglie activée. Elle est exprimée dans les lignées cellulaires des monocytes et des macrophages. Dans le cerveau, elle est spécifique de la microglie puisqu'elle n'est pas retrouvée dans les autres lignées cellulaires. Elle est présente à la fois dans la microglie ramifiée et dans la microglie périvasculaire dans les substances grises et blanches (Ito *et al.*, 1998).

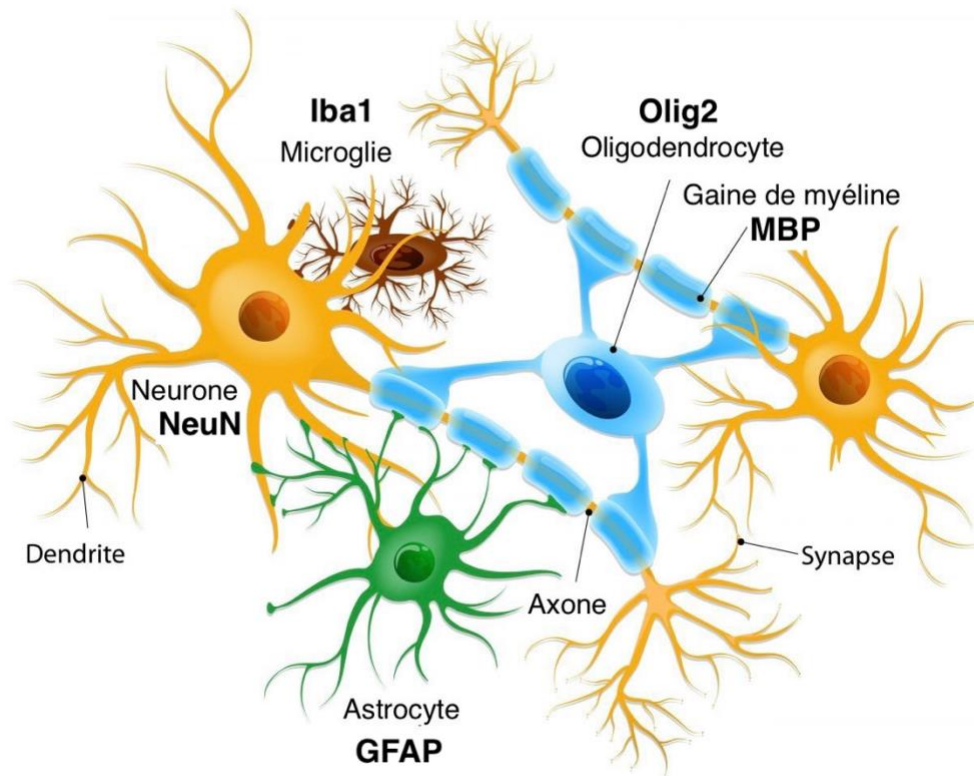
Les anticorps anti-IBA1 sont donc particulièrement adaptés à l'étude structurale de la microglie, notamment en l'absence de pathologie et de réactions inflammatoires. (Hendrickx *et al.*, 2017)

Pour l'étude de la microglie activée (donc lors d'une inflammation cérébrale), un double marquage COX2/IBA1 peut-être réalisé. COX2 ou l'isoforme 2 de la cyclooxygénase est une enzyme produite lors de la réponse inflammatoire précoce des cellules immunitaires. Chez l'Homme, en l'absence d'inflammation ou de lésions inflammatoires, on observe un marquage faible de certains neurones et cellules endothéliales. L'anticorps anti-COX2 n'est donc pas spécifique de la microglie. Cependant dans les zones d'inflammation, un marquage très intense de cellules semblables à de la microglie activées a été observé (Tomimoto *et al.*, 2000).

5. Bilan

Le cerveau présente une grande diversité à l'échelle cellulaire. Il est néanmoins possible de rassembler les cellules en quatre catégories : les neurones, les oligodendrocytes, les astrocytes et les cellules microgliales. Leurs interactions permettent le bon fonctionnement à l'échelle d'organe. La Figure 8 permet la visualisation des populations cellulaires et les relie aux marqueurs immunohistochimiques les plus utilisés pour leur étude.

Figure 8 : Schéma des populations cellulaires du cerveau et des marqueurs correspondants en immunohistochimie (en gras sur l'image) (modifié d'après Inacio, 2015)



B. Organisation générale du cerveau

1. Organisation structurelle

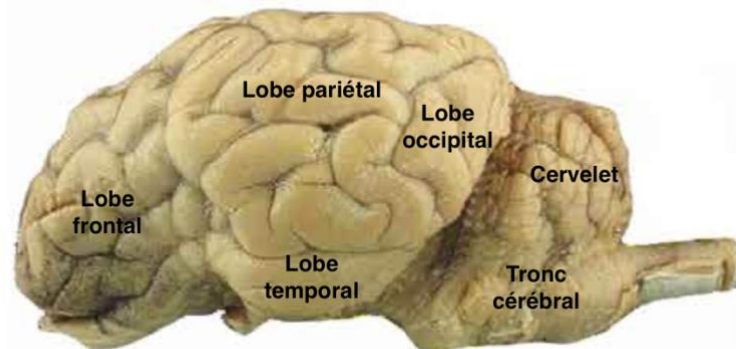
L'encéphale peut être divisé en trois grandes parties : le tronc cérébral, le cervelet et le télencéphale.

Le tronc cérébral rassemble la moelle allongée et le pont (qui constituent la partie la plus caudale du tronc cérébral), le mésencéphale et le diencéphale. Ce dernier constitue la partie la plus rostrale du tronc cérébral et est relié au télencéphale, il est le berceau de l'hypothalamus et du thalamencéphale (Degueurce *et al.*, 2022).

Le cervelet est logé dans le compartiment caudal de la cavité crânienne. Il est constitué de trois parties : le lobe flocculo-nodulaire, le vermis et les hémisphères cérébelleux.

Le télencéphale est la partie rostrale de l'encéphale. Chez l'agneau, comme chez les carnivores domestiques ou l'humain, il présente des circonvolutions. Une longue scissure transversale délimite les deux hémisphères cérébraux. Le télencéphale peut-également être divisé en deux parties : le rhinencéphale, où on retrouve le lobe olfactif, le pédoncule olfactif et le lobe piriforme et le néopallium où l'on retrouve les lobes frontal, pariétal, occipital et temporal (Figure 9) (Degueurce *et al.*, 2022).

Figure 9 : Vue latérale d'un cerveau de mouton (modifié d'après Natural Sciences Open Educational Resources)



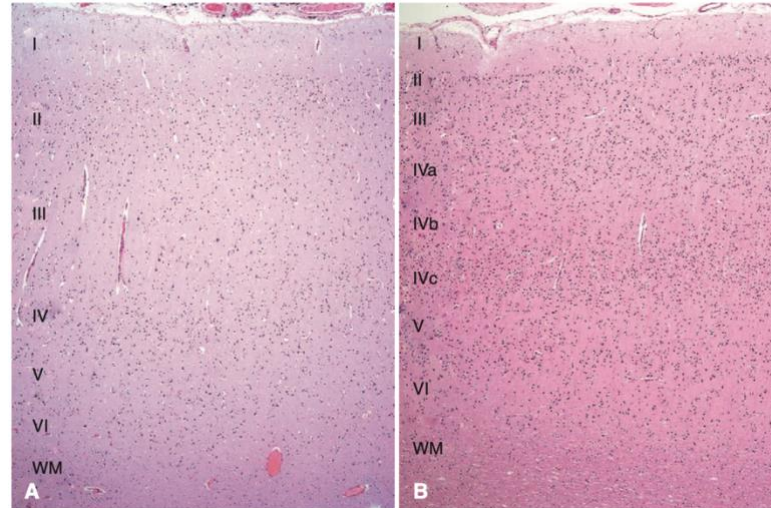
2. Organisation tissulaire

a) Cortex cérébral

Le cortex cérébral est constitué de deux types neuronaux majoritaires : les cellules granulaires et les cellules pyramidales. Ces dernières sont les plus nombreuses et leurs dendrites développées s'étendent jusqu'à la surface corticale ; leurs axones sont longs et se dirigent soit vers d'autres parties du cortex soit vers des régions subcorticales. Les cellules granulaires sont considérées comme les interneurons du cortex.

Le cortex cérébral est organisé en couche numérotées de 1 à 6 de la surface à la substance blanche : I, la couche moléculaire contenant peu de neurones chez l'adulte ; II, la couche des cellules granulaires externe, III, la couche des cellules pyramidales externe ; IV, la couche des cellules granulaires interne ; V, la couche des cellules pyramidales interne ; VI, la couche multiforme, principalement constituée de neurones fusiformes (Figure 10). L'épaisseur et la visibilité des couches dépendent de la zone étudiée et de ses fonctions (Brat, 2018).

Figure 10 : Organisation en couche du cortex cérébral ; coupe histologique vue au microscope de : (A), néocortex cérébral ; (B), cortex visuel primaire du lobe occipital humain, à la coloration hémalun et éosine ; I, couche moléculaire ; II, couche des cellules granulaires externe ; III, couche des cellules pyramidales externe ; IV, couche des cellules granulaires interne, qui peut être divisée en sous-couche a, b et c ; V, couche des cellules pyramidales interne ; VI, couche multiforme et WM, substance blanche (d'après Brat, 2018).



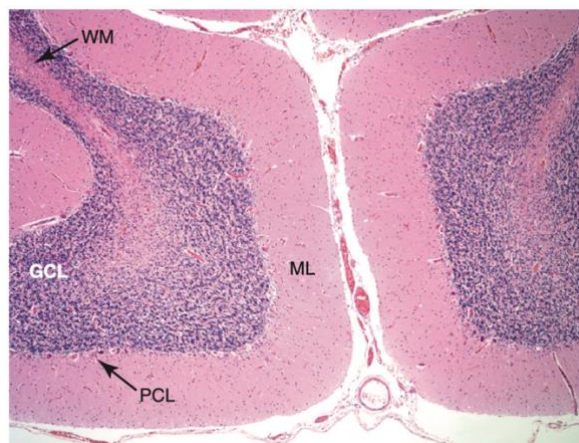
b) Substance blanche

L'organisation de la substance blanche est uniforme dans l'ensemble du système nerveux central. Elle est conditionnée par la disposition des axones liés à la substance grise. Les oligodendrocytes, les astrocytes fibreux et les microglies sont disposés de selon un motif répété autour des axones.

c) Cervelet

L'aspect histologique du cervelet est assez uniforme. Le cortex du cervelet est constitué d'une couche moléculaire peu cellulaire, d'une couche de cellules de Purkinje, d'une couche de cellules granuleuses et d'une couche de substance blanche (Figure 11).

Figure 11 : Coupe de cervelet humain colorée avec hémalun et éosine : ML, couche moléculaire peu cellulaire ; PCL, couche de cellules de Purkinje ; GCL, couche de cellules granuleuses ; WM, substance blanche



III. Imagerie cérébrale structurale

Afin d'étudier le cerveau, son organisation et d'éventuelles lésions ou anomalies structurales ou fonctionnelles, plusieurs techniques d'imageries peuvent être utilisées. Nous détaillerons ici les quatre techniques principalement rencontrées dans la bibliographie : l'histologie, l'immunohistochimie, l'échographie et l'imagerie du tenseur de diffusion (DTI).

A. Utilisation de l'histologie simple

L'histologie simple du cerveau est principalement utilisée dans de vieux articles étudiant le développement cérébral. L'utilisation de divers colorants permet de visualiser et de différencier les cellules, leurs constituants et la matrice extra-cellulaire. Il est donc notamment possible de distinguer les différentes couches présentes dans les lobes cérébraux (Åarström, 1967).

Cependant cette technique ne permet pas de différencier simplement les populations cellulaires ou les protéines particulières du cerveau. De plus cette technique ne peut être réalisée que sur des sujets morts et ne permet donc ni un diagnostic de lésion du vivant de l'individu, ni un suivi de l'évolution des lésions ou du développement.

B. Utilisation de l'immunohistochimie

L'immunohistochimie se base sur le même principe que l'histologie. En effet, il s'agit d'étudier l'organisation du cerveau à partir de coupe, en utilisant un marquage permettant la différenciation des structures étudiées. Cependant ce marquage est plus spécifique. Cela permet de mieux reconnaître les différentes cellules et les différentes protéines d'intérêt.

Comme l'histologie, ce marquage ne peut être réalisé que sur des animaux morts. De plus, s'il permet l'étude des organes et des tissus à l'échelle cellulaire, voir protéique, il ne permet qu'une visualisation en deux dimensions.

C. Utilisation de l'échographie

L'échographie cérébrale est une technique utilisée pour l'évaluation structurale du cerveau des nouveau-nés. Elle n'est possible qu'à travers les fontanelles. Ainsi, la fontanelle antérieure permet une vision d'ensemble du cerveau du nouveau-né mais présente quelques zones d'ombre. La fontanelle postérieure permet une meilleure vision du lobe occipital et de la substance blanche, cependant elle ne permet pas l'observation du cervelet. L'examen de ce dernier à travers la fontanelle mastoïde permet donc de compléter l'étude du cerveau du nouveau-né (Hand *et al.*, 2020).

Réalisable au chevet du patient, ce qui représente un avantage non négligeable pour les nouveaux nés humains en réanimation, cet examen est peu cher. Il permet ainsi de réaliser des mesures reproductibles des diamètres et largeurs des lobes et structures cérébrales. (Cuzzilla *et al.*, 2018) De plus, cet examen permet un bon diagnostic des hémorragies intraventriculaires étendues (Maalouf *et al.*, 2001) et de leucomalacie périventriculaire kystique mais pas des lésions de leucomalacie diffuse (Debillon *et al.*, 2003) ou des pétéchies cérébrales (Maalouf *et al.*, 2001).

L'échographie cérébrale n'est pas utilisable chez les agneaux qui ne possèdent pas de fontanelles.

D. Utilisation du scanner

Le scanner fait partie des techniques d'imageries étudiées pour détecter les conséquences de la prématurité. En effet, il permet une bonne détection de la plupart des hémorragies cérébrales qui apparaissent en clair sur les images (Neil et Inder, 2004), dont les hémorragies dites « silencieuses » c'est-à-dire sans signe clinique associé, et la mise en place d'un traitement rapide (Burstein *et al.*, 1979). Cependant, le scanner permet une différenciation moyenne entre la substance blanche et la substance grise, en comparaison avec l'IRM (Neil et Inder, 2004). Outre les hémorragies, les hydrocéphalies et les œdèmes cérébraux sont bien visibles grâce à cette technique mais les autres lésions ne sont pas faciles à observer (Flodmark *et al.*, 1980).

Cette faiblesse en comparaison avec l'IRM ainsi que la nécessité d'exposer le jeune patient à des rayons X rendent cette technique non utilisée pour les examens de routine chez les prématurés. En effet une répétition des examens de scanner pendant la jeunesse est associée à un risque plus élevé de tumeur cérébrale et de leucémie (Pearce *et al.*, 2012).

E. Utilisation de l'imagerie de l'IRM

L'IRM est, avec l'échographie, la technique de choix pour l'étude du cerveau des nouveau-nés prématurés à l'hôpital. En effet cet examen est la méthode de référence pour le diagnostic des lésions associées à la prématurité. Il permet ainsi la détection des hémorragies de toute taille et le diagnostic de leucomalacie cystique ou diffuse. De plus cet examen est répétable sans risque d'irradiation du patient. Il permet ainsi d'étudier l'évolution des lésions.

L'IRM est particulièrement adapté à l'étude des tissus et des lésions, le tout en trois dimensions.

Cependant cet examen présente deux inconvénients majeurs pour son utilisation : il est cher et il demande le transport du patient instable qui doit être maintenu en place et immobile pendant toute la durée de l'examen qui peut être long. En médecine humaine, la sédation est évitable grâce à des procédures de contention, de transport et de monitoring (Mathur *et al.*, 2008).

Pour l'étude du développement cérébral, une association entre immunohistochimie et l'IRM est actuellement plébiscitée. Celle-ci permet une visualisation des tissus à plusieurs échelles et en trois dimensions (Huang et Vasung, 2014).

IV. Conséquences de la prématurité

Chez l'agneau, la prématurité a des conséquences très importantes sur le développement et sur la survie. Ainsi dans une étude sur la mise-bas prématurée et la survie des agneaux publiée en 1965 les auteurs ont observé que la viabilité des agneaux prématurés était plus faible que celle de l'humain, du macaque rhésus ou des bovins. Il est estimé qu'avant 105-110 jours de gestations, selon les races, la survie est impossible même sous ventilation constante et que même une prématurité modérée entraîne une augmentation du taux de mortalité de 15 % par rapport aux agneaux à terme (Dawes, 1965). Cependant cette étude est ancienne et présentait un taux de mortalité de 10 %, soit un taux assez élevé chez les agneaux à terme. Il est donc possible que la survie des agneaux soit fortement sous-estimée chez l'ensemble des agneaux à cause d'un défaut de prise en charge ou d'une affection existante. Les causes de mortalité chez les agneaux à terme n'étant pas présentes dans l'article, il est difficile de conclure.

Les conséquences cérébrales de la prématurité importante sans autre atteinte sont peu étudiées chez les agneaux bien que ces derniers soient souvent utilisés comme modèle pour les humains prématurés (Back *et al.*, 2012).

Chez l'homme, le terme « encéphalopathie de prématurité » englobe l'ensemble des atteintes neurologiques dues à une naissance prématurée. Elle est due à une association entre une immaturité du cerveau à la naissance et un développement retardé et/ou altéré. Cette maladie est retrouvée chez de nombreux enfants prématurés, quel que soit le moment de survenue de la naissance par rapport au stade de la grossesse, mais son expression et ses conséquences varient selon le degré de prématurité, l'individu et la prise en charge médicale.

Plusieurs lésions sont rencontrées dans cette affection : l'atrophie cérébrale, les hémorragies intraventriculaires et leurs conséquences ainsi que les lésions focales et diffuses des substances grises et blanches ont été particulièrement étudiées. Dans cette partie, nous détaillerons ces types lésionnels, leurs facteurs de risque, leur pathogénie et leurs conséquences.

A. Localisation des lésions

A la fin de gestation, le volume de l'encéphale augmente sensiblement. Chez l'humain, on observe en particulier dans le cervelet une prise volumétrique importante dans le dernier tiers de gestation. Chez le prématuré, ce déficit volumétrique n'est pas rattrapé à la naissance (Limperopoulos *et al.*, 2005). De même le volume de l'hippocampe, du cortex cingulaire postérieur, du lobe orbitofrontal et du thalamus sont diminués (Ball *et al.*, 2012).

B. Lésion de la substance blanche : leucomalacie périventriculaire

1. Définition

La leucomalacie périventriculaire rassemble deux atteintes de la substance blanche liées à la prématurité : une atteinte focale et une atteinte diffuse.

Lors de l'atteinte focale, on observe une nécrose focale profonde de la substance blanche avec une perte des éléments cellulaires. Ces foyers peuvent être de taille macroscopique et évoluer vers une forme kystique. Cette dernière est très peu fréquente puisqu'elle atteint moins de 5 % des enfants à très faible poids de naissance. La plupart des lésions focales sont de taille microscopique et évoluent en petites cicatrices gliales difficiles à voir en imagerie (IRM et échographie) (Volpe, 2009). Autour des lésions, on observe une augmentation du nombre d'oligodendrocytes ou de leurs précurseurs (Billiards *et al.*, 2008).

L'atteinte diffuse de la substance blanche est plus fréquente, notamment en relation avec l'amélioration de la prise en charge des nouveau-nés prématurés. Dans ce cas, une diminution quantitative des oligodendrocytes différenciés est observées, (Volpe, 2009) sans modification de la quantité de précurseurs et d'oligodendrocytes combinés (Billiards *et al.*, 2008). Ces observations suggèrent une augmentation du nombre de précurseurs des oligodendrocytes à la suite de la lésion. Souvent, une astrocytose, une microgliose, une hypomyélinisation et une augmentation du volume des ventricules sont présentes (Volpe, 2009). Dans une étude de 2008, les auteurs ont mis en évidence une quantité de myéline comparable à celle d'un nouveau-né à terme à âge équivalent, avec l'observation cependant d'anomalies qualitatives (Billiards *et al.*, 2008). A titre d'exemple, la

myéline est exprimée directement dans les corps cellulaires au lieu de former une gaine autour des axones des neurones.

En plus de ces atteintes de la substance blanche, des lésions des corps neuronaux et de leurs axones sont observées. Ainsi des pertes neuronales sont rapportées, en particulier parmi les familles de neurone à migration tardive comme les neurones Gabaergiques et subcorticaux (Volpe, 2009). L'observation de la diminution de la densité neuronale est assez récente. En effet les observations et comptages neuropathologiques classiques (coloration et comptage manuel) ne rapportaient pas de modification allant dans ce sens dans les cas diffus de leucomalacie périventriculaire (PVL) mais une automatisation des techniques et le comptage par ordinateur ont permis une augmentation de la sensibilité de ces méthodes (Andiman *et al.*, 2010).

2. Pathogénie

La pathogénie de la leucomalacie périventriculaire chez l'humain est très controversée à tous les niveaux. Si les études s'accordent sur le fait que la pathogénie de la lésion concerne les oligodendrocytes, plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer la diminution du nombre d'oligodendrocytes liée dans certains articles à une apoptose excessive (Robinson *et al.*, 2006) et dans d'autres à une perturbation de leur maturation (Billiards *et al.*, 2008).

A plus grande échelle, c'est la cause des lésions qui est discutée. L'hypothèse à la fois la plus controversée et la plus retrouvée dans la littérature est le complexe hypoxie-ischémie.

a) Hypoxie-ischémie

Chez le nouveau-né prématuré, l'ensemble de son développement est incomplet à la naissance, y compris son système cardio-vasculaire. Le développement des terminaisons des artères périventriculaires a lieu dans les 16 dernières semaines de gestation. Lors de cette période de nombreuses anastomoses se forment, assurant une vascularisation cérébrale redondante. Sans ces anastomoses, la sensibilité du cerveau aux accidents ischémiques est donc augmentée (Khwaja et Volpe, 2008). De plus chez le nouveau-né prématuré, les mécanismes de régulation de la pression artérielle sont incomplets et celle-ci est en moyenne plus basse que chez le nouveau-né à terme (Greisen et Børch, 2001), ce qui pourrait également favoriser une ischémie au niveau des terminaisons du système vasculaire, artères périventriculaires incluses.

Le prématuré est donc prédisposé aux accidents hypoxiques-ischémiques. Or dans une étude réalisée chez l'ovine, les auteurs ont montré que la localisation des lésions à la suite de ces accidents dépendait de la localisation des progéniteurs des oligodendrocytes (Riddle *et al.*, 2006).

Le modèle d'hypoxie-ischémie permettrait d'expliquer la genèse des lésions de la substance blanche. Cependant il est remis en question par de nombreux articles. En effet les études sur le sujet sont incomplètes et/ou ont des limites importantes. Ainsi nombres d'entre elles suggèrent une concomitance entre un manque de perfusion et les lésions mais ne permettent pas d'établir de lien causal (Greisen et Børch, 2001). En pratique l'hypoxémie est rarement documentée chez les prématurés. D'autres hypothèses sont actuellement étudiées pour expliquer toute ou partie de la pathogénie de la leucomalacie périventriculaire comme les infections, l'inflammation, un déficit énergétique ou un système immunitaire immature sans exclure une concomitance des causes (Volpe, 2005).

b) Infection

Le lien entre infection et lésion de la substance blanche des nouveau-nés prématurés a été étudié dans de nombreuses études. Des infections du tractus urinaire ou de l'utérus de la mère ont ainsi été mises en cause (Dammann et Leviton, 1998).

Des injections d'endotoxines bactériennes peuvent causer des lésions de la substance blanche si elles sont réalisées à un moment particulier de la gestation. Des lésions diffuses et focales peuvent ainsi être observées sans autre lésion cérébrale (Dean *et al.*, 2009). Cependant ces injections causent une baisse de la pression artérielle. Il est donc difficile de savoir si les endotoxines elles-mêmes sont responsables de la nécrose ou si elle est due à la baisse de perfusion (Dammann et Leviton, 1998). De plus les lésions sont retrouvées chez des prématurés sans qu'aucune infection n'ait été montrée chez la mère ou chez le bébé.

c) Inflammation

L'étude du rôle des infections dans la pathogénie de la leucomalacie périventriculaire a amené les chercheurs à s'intéresser à la réaction inflammatoire causée par les pathogènes. Ces études ont ouvert la voie pour la recherche sur l'inflammation liée à la naissance prématurée. Les cytokines produites peuvent impacter le développement des oligodendrocytes (Dammann et Leviton, 1998).

d) Oxydation

Des lésions d'oxydation ont été retrouvées dans la substance blanche de nouveau-nés présentant une leucomalacie périventriculaire. Or les progéniteurs des oligodendrocytes sont particulièrement sensibles au stress oxydatif. L'oxydation pourrait donc expliquer les lésions dans le cas de leucomalacie périventriculaire modérée n'affectant que les oligodendrocytes. (Back *et al.*, 2005)

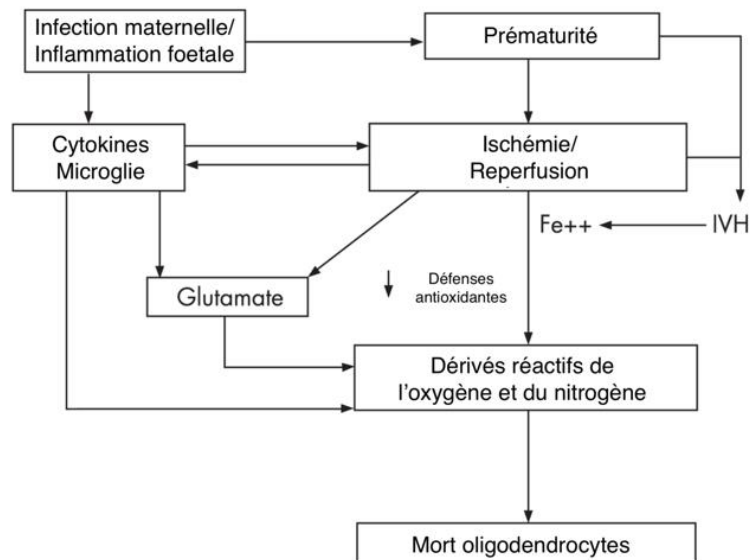
e) Bilan

Dans les conditions expérimentales, les lésions de la substance blanche observées dans le syndrome d'encéphalopathie de prématurité peuvent être induites par l'injection de bactéries, de virus ou de produits bactériens dans le système circulatoire mais aussi par des modèles d'hypoperfusion ou d'excitotoxicité, c'est-à-dire de destruction neuronales causée par une activation excessive du glutamate (Hagberg *et al.*, 2002). Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour déterminer la pathogénie de ces lésions en cas de prématurité.

Il est également possible que les lésions soient le résultat d'une association de plusieurs causes mentionnées ci-dessous. Ainsi une infection maternelle ou une inflammation fœtale peut causer à la fois une naissance prématurée, une libération de cytokines et une activation de la microglie ainsi qu'une libération de radicaux libres oxydatifs. La prématurité pouvant elle-même entraîner une inflammation fœtale, un syndrome d'ischémie/reperfusion et des hémorragies intraventriculaires. Le syndrome d'ischémie/reperfusion peut induire ou être induit par une libération de cytokines et une activation de la microglie. Cette dernière occasionne une production de

glutamate qui déclenche une libération de radicaux libres oxydatifs. Ces derniers entraînent ainsi la mort d'oligodendrocytes par excitotoxicité (Figure 12) (Khwaja et Volpe, 2008).

Figure 12 : Schéma de la probable pathogénie de la leucomalacie périventriculaire (modifié d'après Khwaja et Volpe, 2008) (Fe⁺⁺, ion ferreux ; IVH, hémorragie intraventriculaire)



Il est important de préciser que l'ensemble de ces suppositions est réalisé sous réserve que les conséquences cellulaires de la prématurité soient comparables entre l'Homme et l'ovine.

C. Hémorragies intraventriculaires

Les hémorragies intraventriculaires font partie des complications observées chez les nouveau-nés prématurés et en particulier chez les grands prématurés (nés avant 29 semaines d'aménorrhée) (Ancel *et al.*, 2015).

1. Définition

Les hémorragies intraventriculaires (HIV) sont retrouvées au niveau de la matrice germinale. Cette dernière, responsable de la production des neurones et des cellules gliales, est très vascularisée jusqu'à la fin du développement fœtal, ce qui la rend vulnérable (Shah et Wusthoff, 2016). Ces hémorragies ont lieu lorsque les vaisseaux périventriculaires se rompent et que le sang se répand dans les ventricules. La sévérité des hémorragies sont évaluées à travers l'attribution de grade :

- le grade 1 correspond à des hémorragies limitées à la matrice germinale ;
- le grade 2 à une HIV non limitée à la matrice germinale sans dilatation ventriculaire ;
- le grade 3 à une HIV avec dilatation ventriculaire occupant plus de 50 % du ventricule ;
- le grade 4 à une HIV avec une hémorragie intraparenchymale.

2. Pathogénie

Chez l'humain, la pathogénie de l'hémorragie intraventriculaire reste débattue et est supposée multifactorielle. Des facteurs de risque ont tout de même été identifiés. Ainsi l'inflammation du sac amniotique, l'hypotension, l'acidose et la détresse respiratoire sont associés à une augmentation du risque d'hémorragie intraventriculaire (Shah et Wusthoff, 2016).

Dans une étude cherchant à valider l'utilisation du modèle ovin, les auteurs ont montré qu'une association entre une asphyxie et une modification (augmentation ou diminution) de la pression veineuse ou artérielle induisaient des motifs hémorragiques comparables à ceux observables chez les enfants prématurés (Reynolds *et al.*, 1979). Cela peut s'expliquer que la vascularisation cérébrale des enfants prématurés soit immature. Ainsi lors de variations de la pression artérielle, elle est incapable de maintenir une perfusion cérébrale stable (Wong *et al.*, 2008). Il est donc possible que les variations des pressions artérielle et veineuse soient responsables de l'hémorragie intraventriculaire observée chez les prématurés.

Ces perturbations de la circulation sanguine sont probablement associées à une fragilité de la vascularisation de la matrice germinale par rapport aux autres zones du cerveau chez les grands prématurés. Ainsi la matrice germinale présenterait des déficits en péricytes et en fibronectine, deux constituants importants de la barrière hémato-encéphalique (Ballabh, 2010).

3. Complications

Les hémorragies intraventriculaires peuvent entraîner des complications aux conséquences importantes pour le pronostic développemental.

a) Dilatation ventriculaire post-hémorragique

Il s'agit d'une accumulation de liquide cérébro-spinal pouvant aller jusqu'à la création d'une hydrocéphalie. En effet, l'hémorragie intraventriculaire serait responsable de la formation de caillots sanguins qui obstrueraient la circulation et la réabsorption du liquide cérébro-spinal. Ces caillots peuvent se résorber et la dilatation peut ainsi être limitée dans le temps. Dans le pire des cas un facteur de croissance (*transforming growth factor β 1*) stimulerait la production de protéines de la matrice extracellulaire autour du tronc cérébral et dans l'espace arachnoïde. Dans le cas où le dépôt protéique serait trop important, il obstruerait complètement la sortie du quatrième ventricule empêchant ainsi la réabsorption du liquide, ce qui conduirait à la formation d'un hydrocéphale. (Whitelaw, 2002)

b) Infarctus hémorragique parenchymateux

Il s'agit d'une nécrose hémorragique de la substance blanche périventriculaire, le plus souvent large et asymétrique (Volpe, 1998). Il est supposé que cette nécrose soit due à un arrêt du drainage du parenchyme consécutif aux hémorragies intraventriculaires. Cet infarctus veineux entraînerait probablement une rupture des vaisseaux, une hémorragie dans le parenchyme conduisant à sa nécrose (Gould *et al.*, 1987).

D. Effet de la prématurité sur le développement

1. Effets à court terme

La prématurité a des effets sur les étapes importantes du développement en péri partum. En effet dans une étude publiée en 2013, les auteurs ont démontré que les agneaux nés à 138 jours de gestation avaient du retard dans l'obtention de la stature debout stable et avait plus de difficulté à trouver la mamelle. Ils étaient également moins actifs au cours de la journée par rapport aux agneaux nés à terme (Castillo-Melendez *et al.*, 2013).

2. Effets à long terme

Les effets à long terme de la prématurité sont peu étudiés chez les animaux. Cependant chez les humains, des conséquences sur l'anatomie du système nerveux central ainsi que sur les capacités cognitives sont observées.

Les enfants prématurés gardent ainsi un volume cérébral global diminué mais aussi des volumes locaux réduits, en particulier des ventricules, des ganglions de la base, des amygdales, de l'hippocampe et du cortex (Peterson *et al.*, 2000). Dans l'ensemble, les enfants nés prématurés présentent des déficits d'apprentissage, des déficits de cognition, de capacité motrice et d'intégration visio-motrice, par rapport à des enfants nés à terme. De plus ils sont plus à risque d'anxiété, de retrait social et d'atteinte de leur santé mentale (Luu *et al.*, 2017).

En pratique d'autres facteurs influencent les capacités cognitives. Ainsi le statut socio-économique et les facteurs familiaux semblent avoir des impacts plus importants que la prématurité en elle-même (Gross *et al.*, 2001). Cependant si l'on compare des enfants de même statut économique en âge d'aller à l'école, les enfants nés prématurés présentent des scores cognitifs diminués et une augmentation des risques de trouble de l'attention. Plus le poids à la naissance et l'âge gestationnel étaient réduits et plus les atteintes étaient importantes. De plus la sévérité des maladies ou l'exposition à des expériences négatives autour de la naissance (hospitalisation longue *etc.*) étaient également des facteurs aggravants (Bhutta *et al.*, 2002).

E. Prise en charge de la prématurité

Sur le terrain, les animaux grands-prématurés meurent assez rapidement après la naissance, la plupart du temps par déficit d'oxygénation, leur système respiratoire n'étant pas à terme. En conditions expérimentales, des essais de traitements au surfactant pulmonaire semblent améliorer transitoirement la ventilation mais les traitements suivants semblent moins efficaces (Jobe *et al.*, 1981).

L'immatunité respiratoire et la mort qui en découle ne permettent pas à l'heure actuelle le développement de techniques de prise en charge de la prématurité cérébrale. Il semblerait tout de même qu'une hypothermie cérébrale modérée et prolongée suite à un épisode hypoxémie-anoxie chez des agneaux réduirait la perte des neurones et oligodendrocytes matures (Bennet *et al.*, 2007). Bien que ces résultats soient prometteurs pour le traitement de la leucomalacie périventriculaire, des études complémentaires sur les effets à long terme de cette hypothermie sont nécessaires.

Les animaux dont la prématurité est viable sont le plus souvent considérés comme plus faibles et plus petits par l'éleveur, sans que la prématurité ne soit nécessairement confirmée. Dans ce cas,

un nursing peut permettre une meilleure survie de l'agneau. Ainsi une administration de colostrum, un placement sous lampe chauffante et l'injection de vasodilatateurs cérébraux peuvent augmenter les chances de survie des animaux.

V. Conclusion

Le développement du cerveau de l'agneau a majoritairement lieu pendant la gestation. Si la période embryonnaire et le début de la période fœtale permettent une différenciation des tissus et des cellules ainsi qu'une gyrification et une production neuronale, le dernier tiers de gestation voit la maturation des cellules ainsi que la myélinisation des tissus. L'importance de cette période explique les conséquences observées chez les nouveau-nés prématurés. Ainsi ces derniers peuvent présenter des hémorragies intraventriculaires du fait de l'immatunité du réseau vasculaire cérébral ainsi que des lésions de la substance blanche. L'étiopathologie de cette dernière est débattue chez l'humain et pourrait être multifactorielle mais elle est comparable aux conséquences d'anoxie/hypoxie lors de la gestation chez l'agneau. Ces lésions péri-natales ont des conséquences sur le long terme pour les prématurés.

Les populations cellulaires sont très nombreuses dans le cerveau et leur étude demande des outils d'imagerie spécialisés. Le plus adapté à l'observation à échelle cellulaire est l'immunohistochimie. Pour chaque population cellulaire, plusieurs marqueurs sont disponibles et présentent des avantages et des inconvénients.

Deuxième partie : étude expérimentale

I. Introduction

Si l'agneau est souvent utilisé comme modèle dans l'étude du développement cérébral humain, il est assez peu étudié seul, sans atteinte ou lésion volontairement réalisée. Les conséquences de la prématurité sur le développement cérébral de l'agneau ne sont donc que peu étudiées. Le but de cette étude était de comparer les populations cellulaires et la topographie du cerveau chez des agneaux à terme et des agneaux dont la prématurité a été induite. L'objectif était de décrire ces structures à 100 jours et à 140 jours de gestation au moyen d'analyse histologiques et immunohistochimiques. En effet, ces techniques permettent de décrire les différentes populations cellulaires ainsi que les protéines présentes dans le cerveau. Afin de cibler les principales populations cellulaires du cerveau et en particulier celles se développant dans le dernier tiers de gestation, six marqueurs avaient été initialement sélectionnés. Pour des raisons techniques, seuls quatre de ces six marquages ont finalement pu être réalisés.

II. Matériels et méthodes

Cette thèse s'inscrivant dans un projet plus large seule la partie « Analyses statistiques et graphes » de l'étude expérimentale a été réalisée par mes soins. Le choix et la préparation des animaux et des échantillons, les marquages et la lecture ont été effectués par une équipe de l'UVSQ et en particulier par M. Yoann Rodriguez.

A. Choix et préparation des animaux

L'échantillon se composait de deux lots de quatre brebis de race Romane chacun, dont les chaleurs ont été synchronisées hormonalement¹ afin de déterminer avec précision le moment de la saillie et maîtriser le stade de gestation. Des césariennes ont été effectuées à l'EnvA les 5 et 6 décembre 2019, soit à 140 jours de gestations pour les brebis du groupe témoin ($n = 4$) et 100 jours de gestation pour les brebis du groupe prématuré ($n = 4$).

Les agneaux ont été euthanasiés pendant la césarienne par injection de T61® (embutramide, mébézonium, tétracaïne) par voie intra-cardiaque au moment de leur extraction de l'utérus (avant la première respiration). Une dissection anatomique a été immédiatement réalisée afin de collecter les différents organes dont le cerveau.

B. Immunohistochimie

1. Fixation et préparation des échantillons

Quatre lavages dans du PBS ont été réalisés, puis les tissus ont été incubés dans du PBS + paraformaldéhyde 4%. Ils ont ensuite été inclus dans des blocs de paraffine. Ces derniers ont été

¹ La synchronisation a été réalisée par la station expérimentale INRAE de Bourges.

taillés au microtome en coupes de 7 µm d'épaisseur, ensuite placées sur une lame Superfrost Plus (ND) humidifiée.

2. Marquage

Les lames ont été déparaffinées et réhydratées selon le protocole Leica à l'aide de la solution BOND Dewax ND. Elles ont ensuite été passées dans un automate Leica Bond III, sous le protocole *Bond Polymer Refine IHC Protocol* modifié (Anticorps primaire : 60 min, Post Primary et Primary : 30 min), pour les anticorps anti-MBP (MAB 382, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis) à la dilution de 1/1000 et anti-NeuN (MAB377, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis) à la dilution de 1/3000A ; sous le protocole *Bond Polymer Intense IHC Protocol* modifié (Anticorps primaire : 60 min, Primary : 30 min) pour les anticorps anti-GFAP (Z0334, Dako, Santa Clara, Californie, États-Unis), anti-IBA1 (Wako 019-19741, Fujifilm, Tokyo, Japon).

Les lames ont été passées deux minutes dans des bains d'alcool à 70°, 90°, 100° puis dans un bain de xylène pendant 5 minutes avant d'être scellées et scannées après 24h de séchage.

3. Lecture

Les lames ont été observées individuellement au microscope pour vérifier la qualité du marquage. Si elles présentaient de grandes zones non marquées ou si des bulles de grande taille étaient présentes, les lames étaient mises de côté et un nouveau marquage de la zone était réalisé. Les surfaces marquées ont ensuite été mesurées grâce au logiciel QuPath v0.4.2 par *Positive Pixel Count (High Resolution, DAB channel with a 0.3 threshold)*. Pour les lames marquées par l'anticorps anti-NeuN, marqueur des neurones, la totalité de la coupe n'a pas été étudiée : des zones de substance grise ont été choisies au hasard.

4. Analyses statistiques et graphes

Pour chaque marqueur, les données ont été rassemblées dans un tableau Excel. Le rapport entre l'aire des zones marquées et l'aire globale étudiée a été calculé et exprimé en pourcentage.

La normalité des variables a été étudiée par méthode graphique. Comme elles ne suivaient pas de loi normale, un test non paramétrique (Mann-Whitney) a été réalisé *via* le logiciel BiostatGV. Pour l'ensemble des tests sur les différents marqueurs et les différentes zones, l'hypothèse nulle était la suivante : « *Dans la population des agneaux nés par césarienne, il n'existe pas d'association réelle entre le pourcentage de zone marquée par le marqueur étudié dans le lobe étudié et la naissance à 100 jours ou à 140 jours.* »

Les graphes ont ensuite été tracés à l'aide d'Excel.

III. Résultats

A. Description de l'échantillon

Un total de 26 agneaux a été inclus dans l'étude, soit treize agneaux à 100 jours de gestation pour le groupe « prématuré » et treize agneaux à 140 jours de gestation pour le groupe « à terme ». Les caractéristiques de l'échantillon sont rassemblées dans le Tableau 1.

Le nombre moyen d'agneau par portée était le même avec 3,25 agneaux par portée dans chaque groupe. Les portées étaient également de mêmes tailles avec deux portées de quatre, une

portée de trois et une portée de deux agneaux. La multiplicité observée s'explique par la grande prolificité de la race Romane. Le ratio mâle/femelle était comparable avec cinq femelles pour huit mâles dans le groupe prématuré et six femelles pour sept mâles dans le groupe à terme. En revanche, les poids à la naissance variaient beaucoup entre les deux groupes, avec une moyenne à 953 g pour le groupe prématuré et à 3 455 g pour le groupe à terme. Ces résultats étaient attendus au vu de l'association entre le poids des nouveau-nés et la prématurité induite.

Tableau 1 : Description de l'échantillon

Stade de gestation	100 jours	140 jours	Échantillon total
Nombre de brebis	4	4	8
Nombre d'agneau moyen par portée	3,25	3,25	3,25
Poids moyen à la naissance	983 g	3 455 g	2 204 g
Sexe ratio	5 femelles (38 %) 8 mâles (62 %)	6 femelles (46 %) 7 mâles (54 %)	11 femelles (42 %) 15 mâles (58 %)

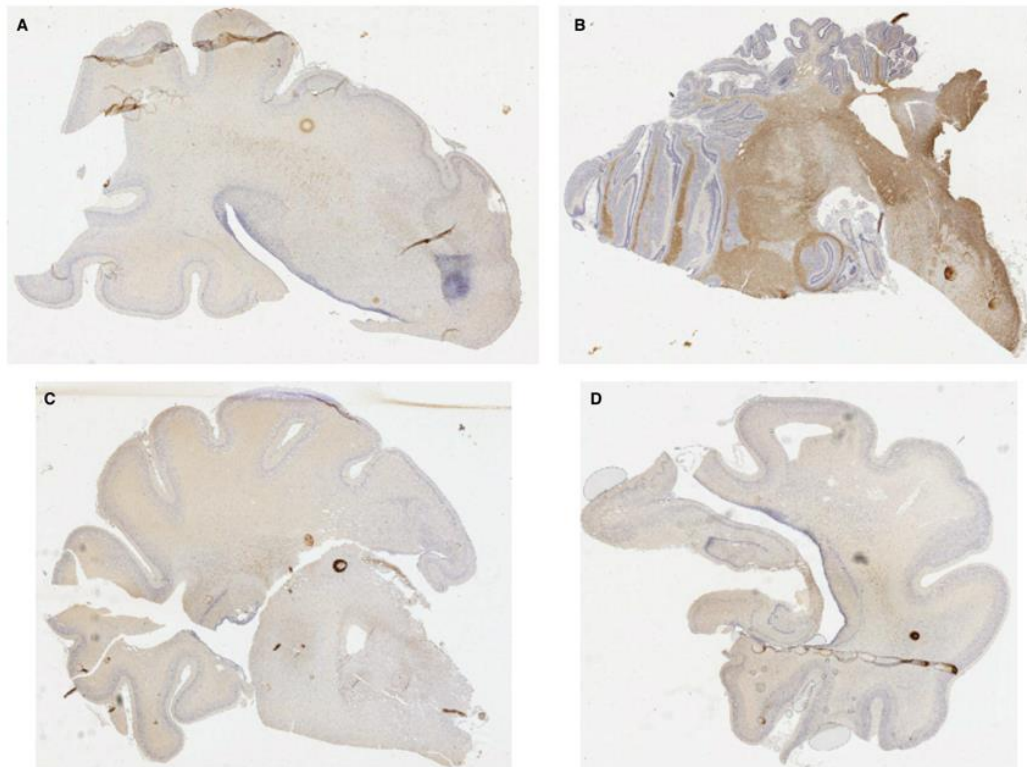
B. Analyses immunohistochimiques

1. Myélinisation

Le marquage « MBP » a été utilisé pour décrire la myélinisation du tissu cérébral.

Sur les coupes à 100 jours de gestation, le marquage était peu intense, il recouvrait une majorité de la coupe et semblait peu organisé. La délimitation entre substance grise et substance blanche était peu visualisable (Figure 13). La visualisation en gros plan a permis de remarquer que la myéline s'organisait en petits groupes diffus autour de noyaux cellulaires également marqués. De plus, une zone de transition, à la fois moins cellulaire et moins marquée était présente au niveau de la transition entre les substances blanches et grises (Figure 15.A).

Figure 13 : Marquage de coupes histologiques de cerveau d'agneau à 100 jours de gestation avec l'anticorps anti-MBP (1/1000 ER1 10 min) A. Frontal ; B. Cervelet ; C. Pariétal ; D. Occipital



Sur les coupes à 140 jours de gestation, la distinction entre la substance grise, très cellulaire et la substance blanche, très myélinisée était plus facile à réaliser même à faible agrandissement (Figure 14). Une plus petite partie de la coupe était marquée avec une substance grise de taille augmentée. L'agrandissement montre qu'à plus petite échelle, l'organisation de la myéline était également différente. En effet elle ne se présentait pas en petits groupes diffus mais sous la forme de fibres de myéline. Certaines d'entre elles étaient même présentes dans la substance grise (Figure 15.B.).

Figure 14 : Marquage de coupes histologiques de cerveau d'agneau à 140 jours de gestation avec l'anticorps anti-MBP (1/1000 ER1 10 min) A. Frontal ; B. Cervelet ; C. Pariétal ; D. Occipital

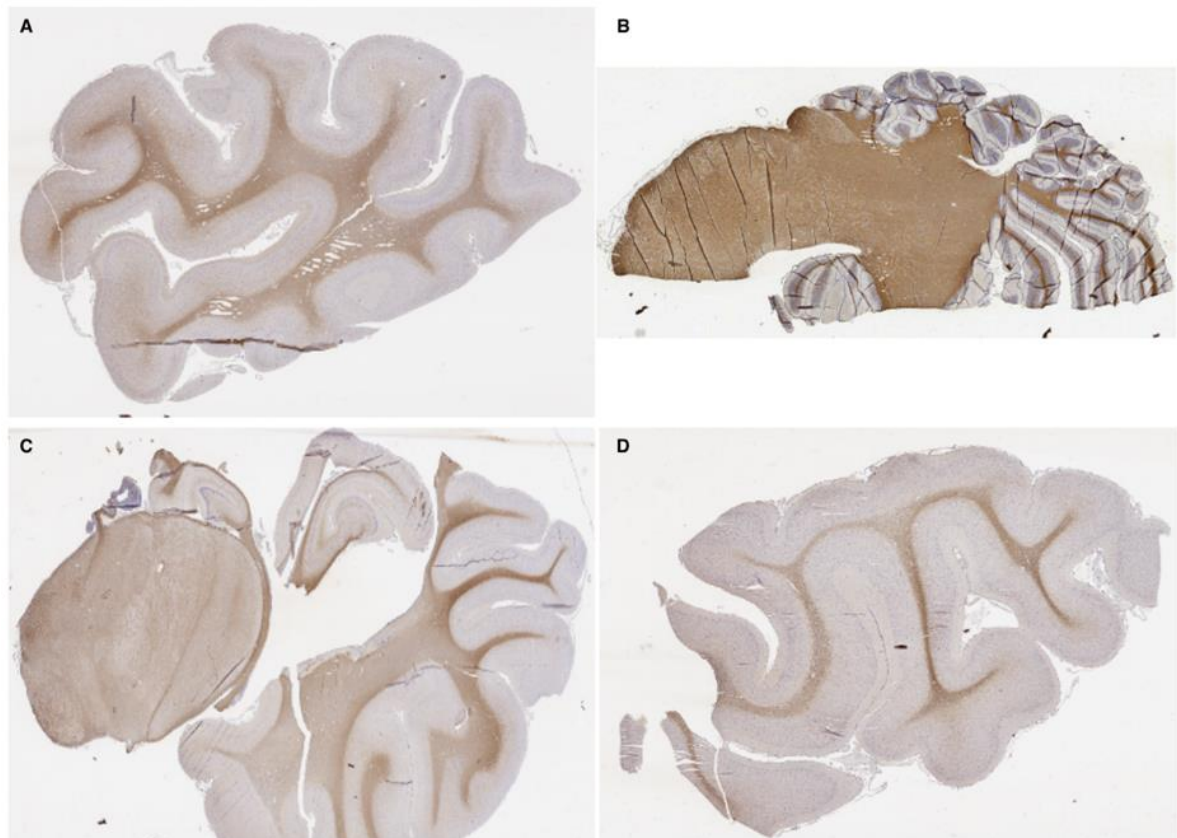
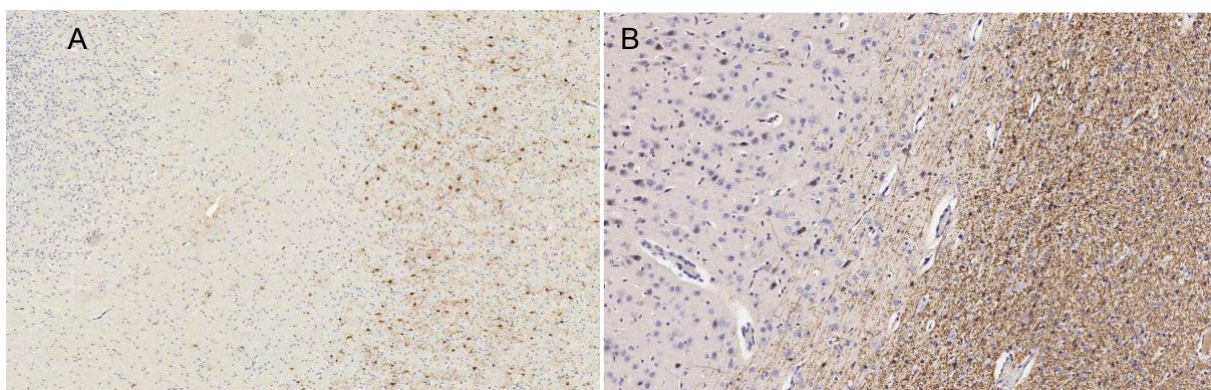


Figure 15 : Agrandissement de la zone de transition entre substance blanche et substance grise sur des coupes histologiques de cerveau, marquage avec l'anticorps anti-MBP (1/1000 ER1 10 min) A. à 100 jours de gestation ; B. à 140 jours de gestation



Le marquage n'était également pas comparable entre les différentes zones du cerveau. Ainsi il semblait plus intense dans le cervelet, que ce soit à 100 ou à 140 jours de gestation (Figure 13.B, Figure 14.B). La densité de marquage semblait même visuellement aussi importante dans le cervelet à 100 jours de gestation (Figure 13.B) que dans le reste des lobes à 140 jours de gestation (Figure 14.A, C, D).

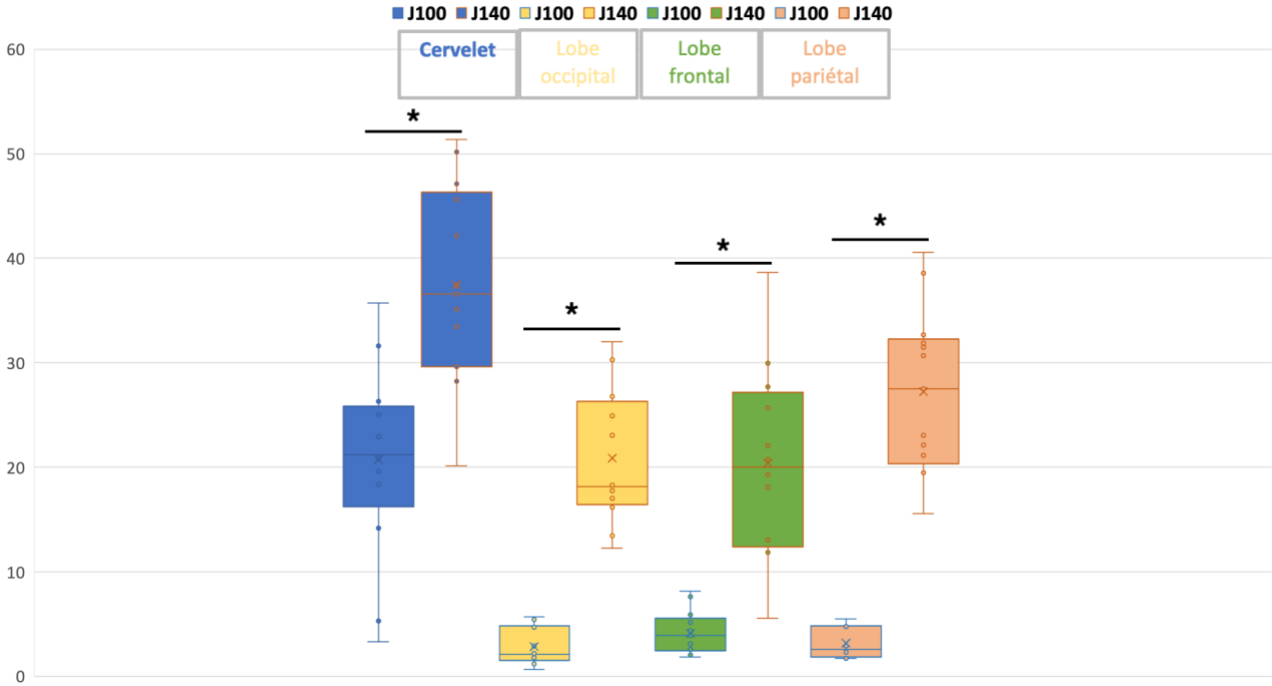
Les données expérimentales issues du marquage immunohistochimique avec l'anticorps anti-MBP sont rassemblées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2 : Données expérimentales issues du marquage immunohistochimique avec l'anticorps anti-MBP (en pourcentage d'aire marquée par l'anticorps par rapport à l'aire totale ; Q1, premier quartile ; Q2, deuxième quartile ; p*, degré de significativité)

	100J	140J	p*
	Médiane (Q1 ; Q2)	Médiane (Q1 ; Q2)	
Cervelet (% positif)	21 (18 ; 25)	37 (33 ; 45)	p<0,01
Lobe frontal (% positif)	2 (2 ; 5)	18 (17 ; 25)	p<0,01
Lobe occipital (% positif)	4 (3 ; 5)	20 (13)	p<0,01
Lobe pariétal (% positif)	3 (2 ; 5)	28 (21 ; 32)	p<0,01

Dans l'échantillon, la médiane du pourcentage de zone marquée par MBP parmi les agneaux « prématurés » était significativement inférieure à la médiane du pourcentage de zone marquée parmi les agneaux « à terme » et ce dans les quatre zones étudiées (cervelet, lobe frontal, lobe occipital, lobe pariétal ; p < 0,01) (Tableau 2 et Figure 16).

Figure 16 : Répartition du rapport surface marquée/surface non marquée par « MBP » (en pourcentage, * indique les différences significatives, d'après le Tableau 2).



2. Neurones

Sur les coupes à 100 jours de gestation, le marquage était retrouvé dans la substance grise qui formait une couche assez fine (Figure 17). À 140 jours, la zone marquée était d'épaisseur augmentée dans l'ensemble des zones (Figure 18).

Figure 17 : Marquage de coupes histologiques de cerveau d'agneau à 100 jours de gestation avec l'anticorps NeuN (1/3000 Htx 1min ER1 10 min) A. Frontal ; B. Cervelet ; C. Pariétal ; D. Occipital

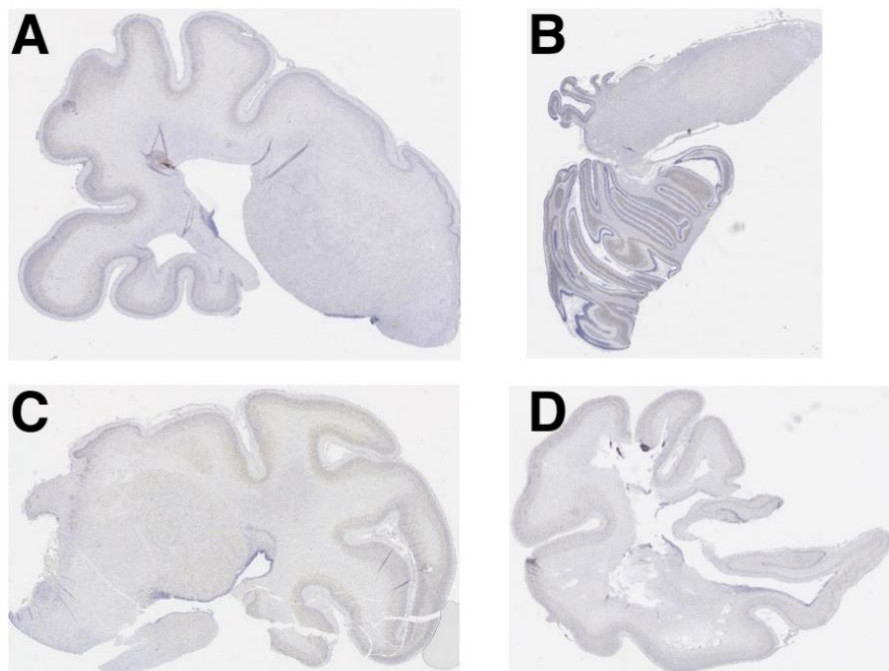
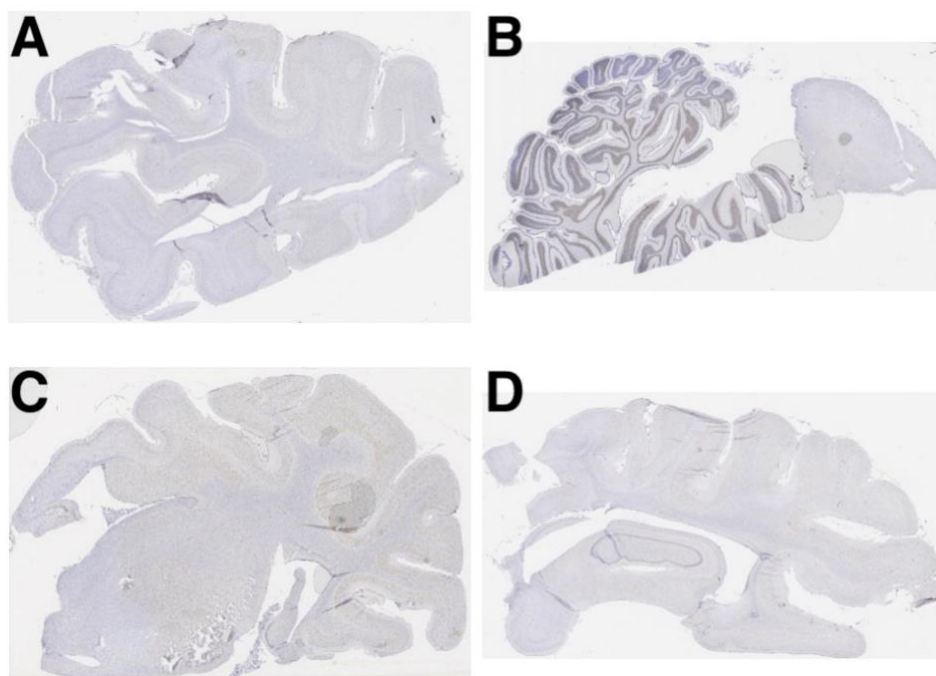


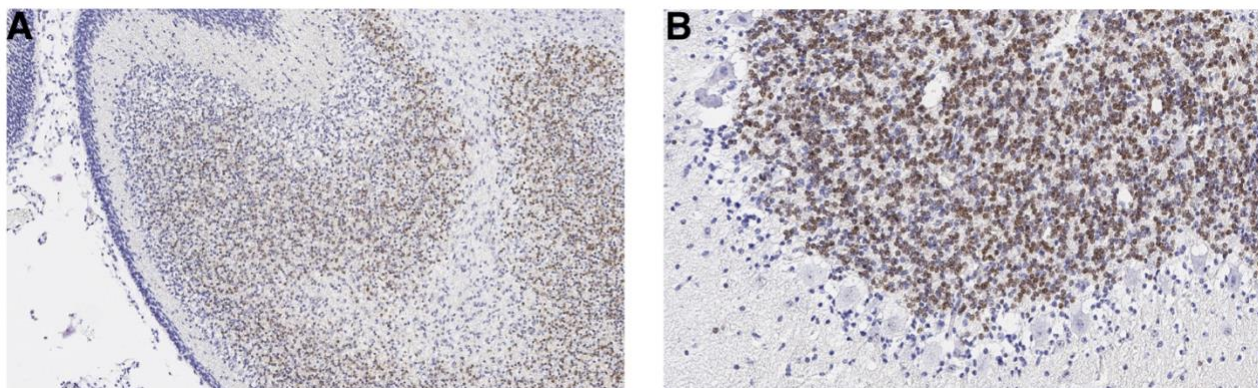
Figure 18 : Marquage de coupes histologiques de cerveau d'agneau à 140 jours de gestation avec l'anticorps NeuN (1/3000 Htx 1min ER1 10 min) A. Frontal ; B. Cervelet ; C. Pariétal ; D. Occipital



Un agrandissement de la zone marquée (Figure 19) permet de visualiser le marquage à l'aide de l'anticorps « NeuN ». Celui-ci semble bien marquer les noyaux des neurones, ce qui donne un

marquage en foyer ronds. On remarque que la distinction entre substance blanche (non marquée) et substance grise (marquée) est facile à réaliser.

Figure 19 : Agrandissement de la zone de transition entre substance blanche et substance grise sur des coupes histologiques de cerveau, marquage avec l'anticorps anti-NeuN (1/3000 Htx1min ER1 10 min) A. à 100 jours de gestation ; B. à 140 jours de gestation



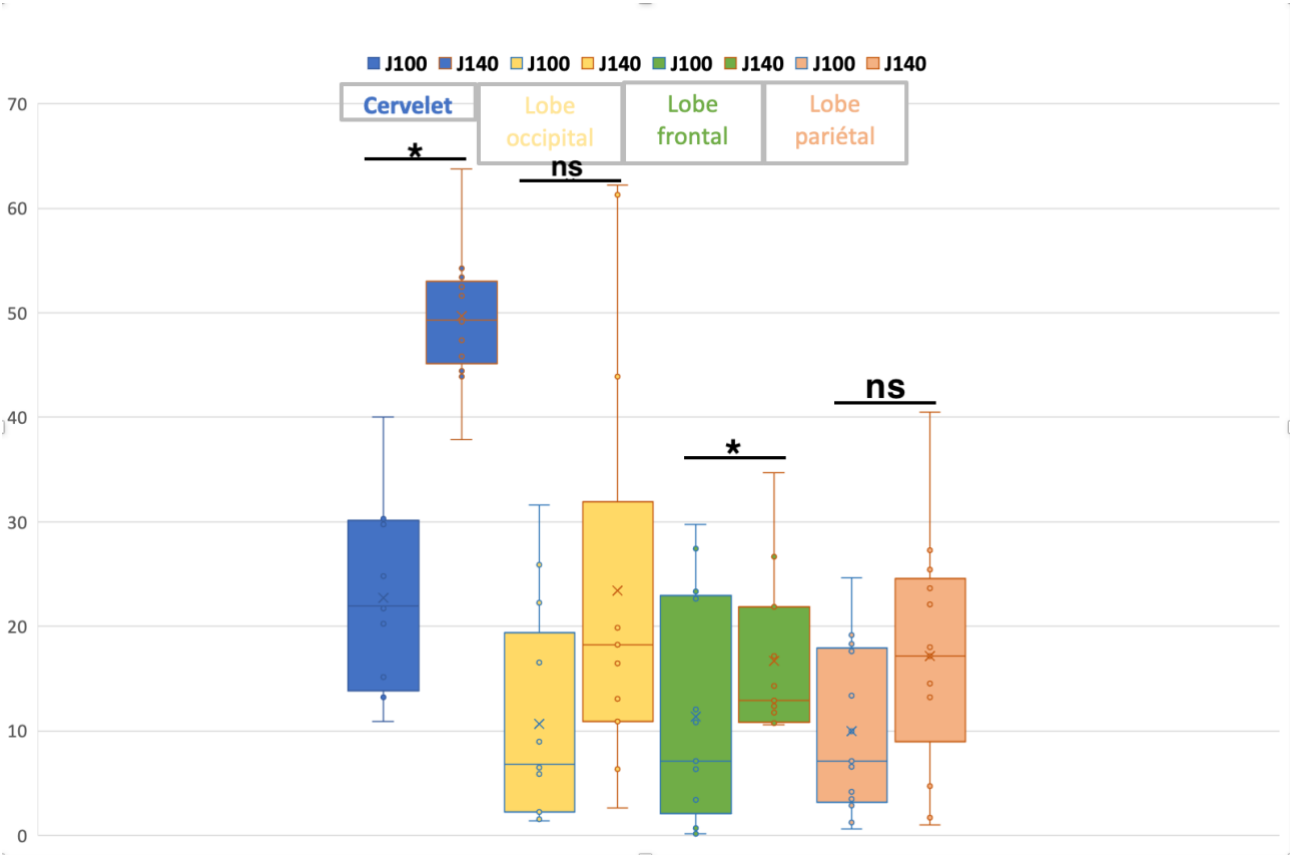
Dans l'échantillon, la médiane du pourcentage de zone marquée par NeuN parmi les agneaux « prématurés » était significativement inférieure à la médiane du pourcentage de zone marquée parmi les agneaux « à terme » dans le cervelet ($p < 0,01$) et dans le lobe frontal ($p = 0,04$). En revanche bien que, dans l'échantillon, la médiane du pourcentage de zone marquée par NeuN soit inférieure chez les animaux prématurés à celle des animaux « à terme » dans le lobe occipital et le lobe pariétal, cette différence n'était pas significative (respectivement $p = 0,12$ et $p = 0,13$) (Tableau 3).

Tableau 3 : Données expérimentales issues du marquage immunohistochimique avec l'anticorps anti-NeuN (en pourcentage d'aire marquée par l'anticorps par rapport à l'aire totale ; Q1, premier quartile ; Q2, deuxième quartile ; p^* , degré de significativité)

	100J	140J	p^*
	Med (Q1 ; Q2)	Med (Q1 ; Q2)	
Cervelet (% positif)	22 (15 ; 30)	49 (46 ; 53)	$p < 0,01$
Lobe frontal (% positif)	7 (2 ; 17)	18 (11 ; 20)	0,04
Lobe occipital (% positif)	7 (3 ; 23)	13 (11 ; 20)	0,12
Lobe pariétal (% positif)	7 (3 ; 18)	17 (13 ; 24)	0,13

La Figure 20 montre la dispersion des pourcentages de coloration obtenus. On observe particulièrement qu'à J140, dans le lobe occipital, la dispersion est très importante. Cette figure permet également une meilleure visualisation des résultats : ainsi, dans le lobe occipital, bien que la médiane du pourcentage de marquage par NeuN soit inférieure chez les animaux prématurés (7 %) à celle chez les animaux à terme (13 %), la visualisation de l'écart interquartile explique bien l'absence de significativité de la différence observée.

Figure 20 : Répartition des pourcentages de surface marquée par « NeuN » (ns pour les différences non significatives ; * pour les différences significatives, d'après le Tableau 3)



3. Astrocytes

Sur les coupes à 100 jours de gestation, le marquage était présent sur toute la coupe mais semblait assez diffus (Figure 21). A 140 jours de gestation, le marquage semblait tout aussi diffus mais la densité marquée semblait visuellement augmentée (Figure 22).

Figure 21 : Marquage de coupes histologiques de cerveau d'agneau à 100 jours de gestation avec l'anticorps anti-GFAP (1/500 Htx 1min ER1 10 min) A. Frontal ; B. Cervelet ; C. Pariétal ; D. Occipital

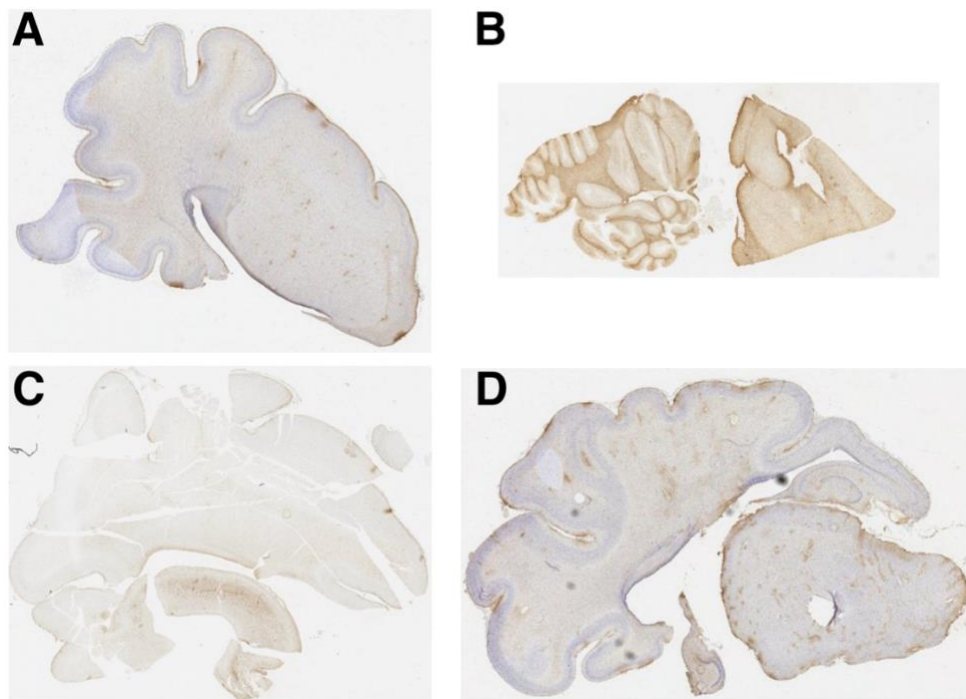
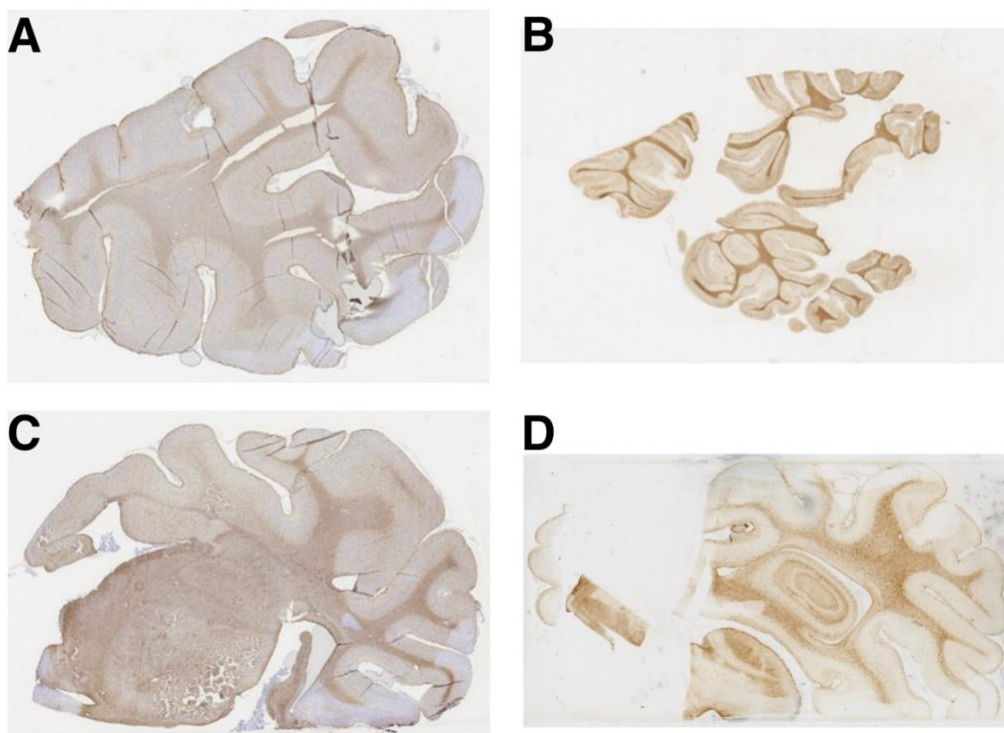
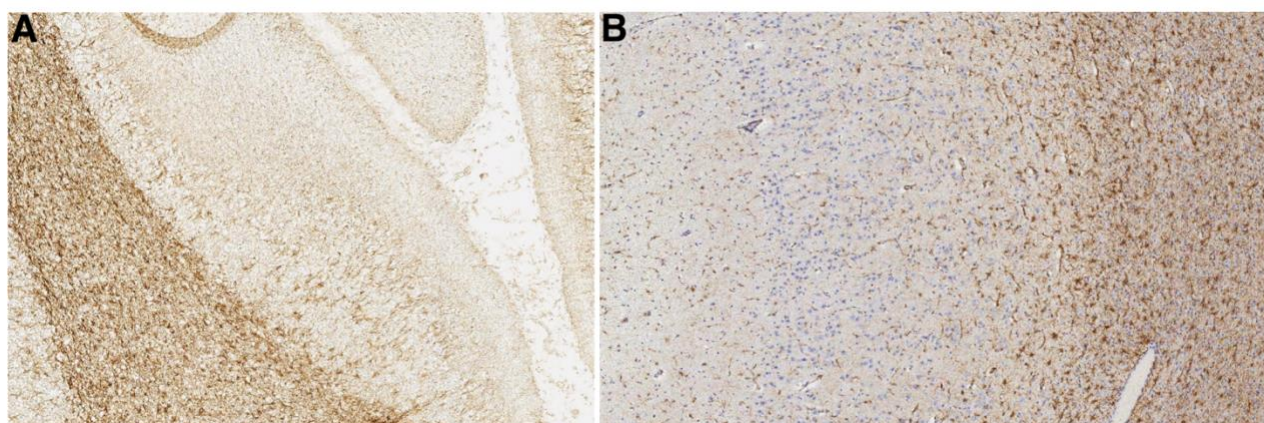


Figure 22 : Marquage de coupes histologiques de cerveau d'agneau à 140 jours de gestation avec l'anticorps anti-GFAP (1/500 Htx 1min ER1 10 min) A. Frontal ; B. Cervelet ; C. Pariétal ; D. Occipital



L'agrandissement du marquage permettait de visualiser un marquage très fibrillaire, ce qui explique l'impression de marquage diffus sur les coupes totales (Figure 23).

Figure 23 : Agrandissement de la zone de transition entre substance blanche et substance grise sur des coupes histologiques de cerveau, marquage avec l'anticorps anti-GFAP (1/500 Htx 1min ER1 10 min) A. à 100 jours de gestation ; B. à 140 jours de gestation



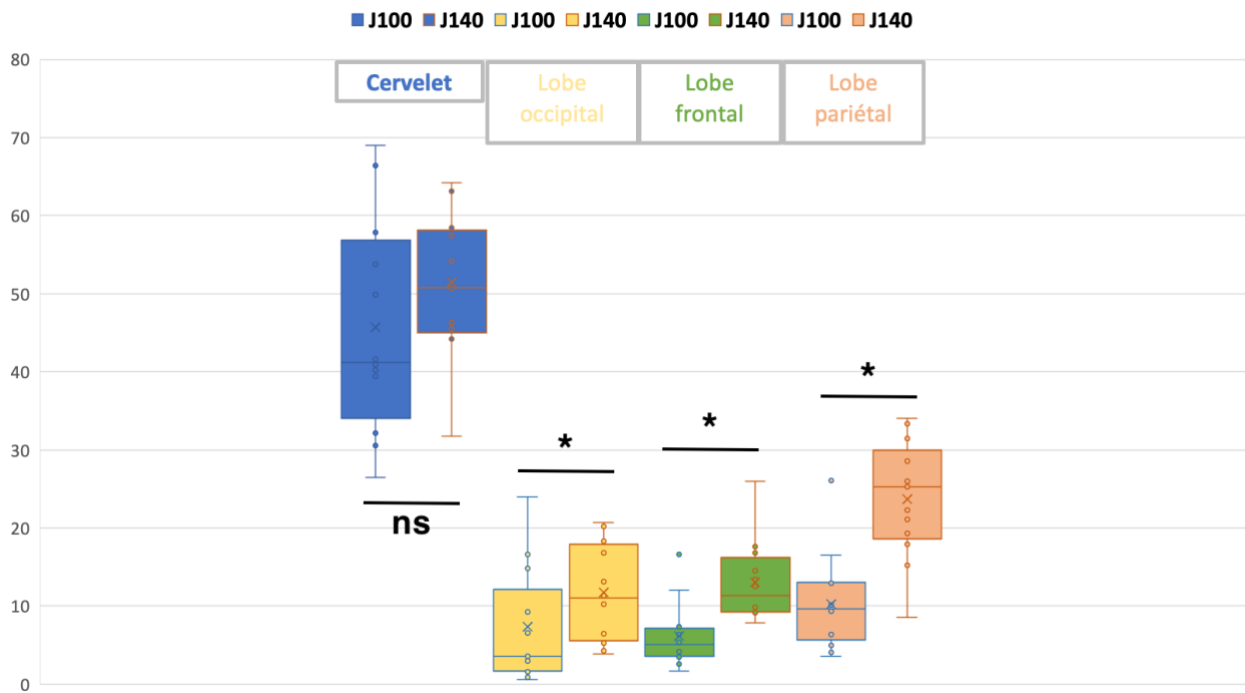
Dans l'échantillon, la médiane du pourcentage de zone marquée par GFAP parmi les agneaux « prématurés » était significativement inférieure à la médiane du pourcentage de zone marquée parmi les agneaux « à terme » dans le lobe frontal ($p = 0,04$), le lobe occipital ($p < 0,01$) et le lobe pariétal ($p < 0,01$). Si, dans l'échantillon, cette médiane est également inférieure parmi les agneaux à 100j (41 %) de gestation à celle parmi les agneaux à 140 jours de gestation (51 %) dans le cervelet, cette différence n'est pas significative (Tableau 4).

Tableau 4 : Données expérimentales issues du marquage immunohistochimique avec l'anticorps anti-GFAP (en pourcentage d'aire marquée par l'anticorps par rapport à l'aire totale ; Q1, premier quartile ; Q2, deuxième quartile ; p^* , degré de significativité)

	100J	140J	p^*
	Med (Q1 ; Q2)	Med (Q1 ; Q2)	
Cervelet (% positif)	41 (38 ; 55)	51 (46 ; 58)	0,16
Lobe frontal (% positif)	4 (2 ; 9)	11 (6 ; 17)	0,04
Lobe occipital (% positif)	5 (4 ; 7)	11 (9 ; 15)	$p < 0,01$
Lobe pariétal (% positif)	10 (6 ; 13)	25 (19 ; 29)	$p < 0,01$

Les pourcentages de marquage étaient peu dispersés pour le marqueur « GFAP » (Figure 24).

Figure 24 : Répartition des pourcentages de surface marquée par « GFAP » (ns pour les différences non significatives ; * pour les différences significatives, d'après le Tableau 4)



4. Microglie

Sur les coupes à 100 et à 140 jours de gestation, le marquage était peu visible sans agrandissement (Figure 25 et Figure 26). L'agrandissement permettait de visualiser un marquage peu dense de cellules (Figure 27).

Figure 25 : Marquage de coupes histologiques de cerveau d'agneau à 100 jours de gestation avec l'anticorps anti-IBA1 (1/500 Htx 1min ER1 10 min) A. Frontal ; B. Cervelet ; C. Pariétal ; D. Occipital

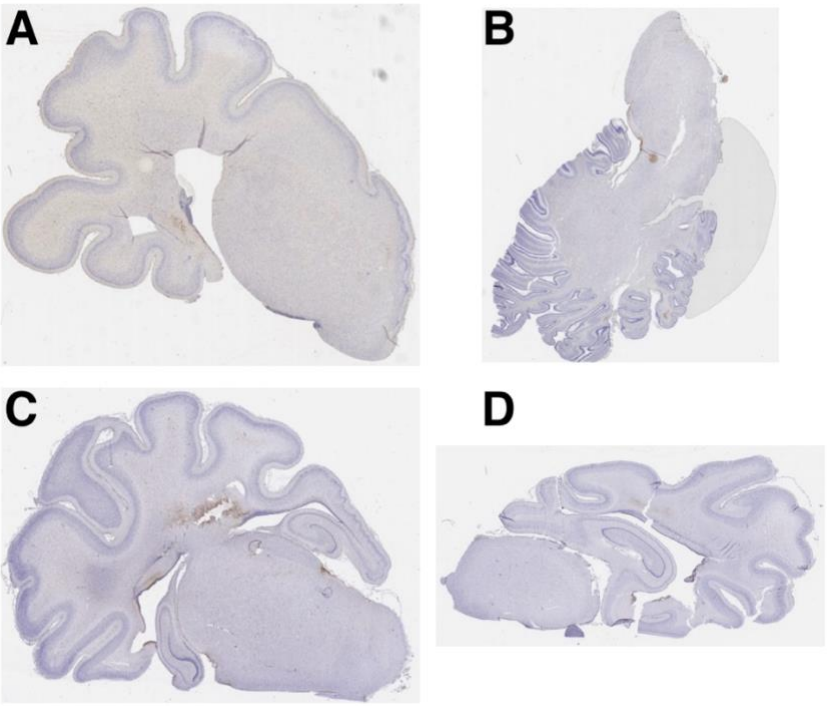


Figure 26 : Marquage de coupes histologiques de cerveau d'agneau à 140 jours de gestation avec l'anticorps anti-IBA1 (1/500 Htx 1min ER1 10 min) A. Frontal ; B. Cervelet ; C. Pariétal ; D. Occipital

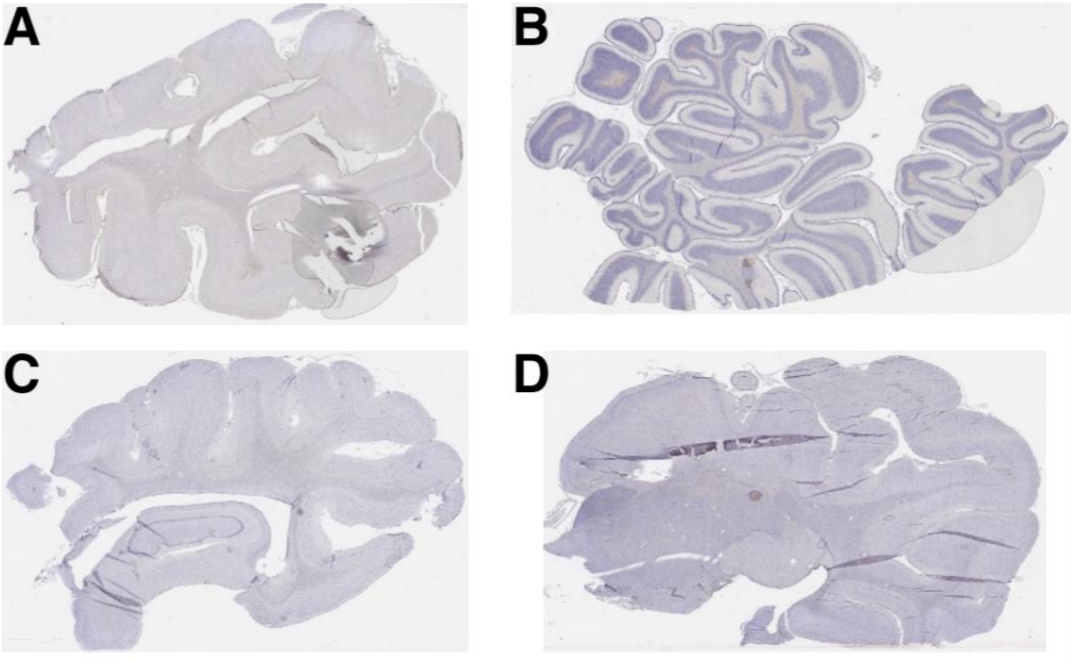
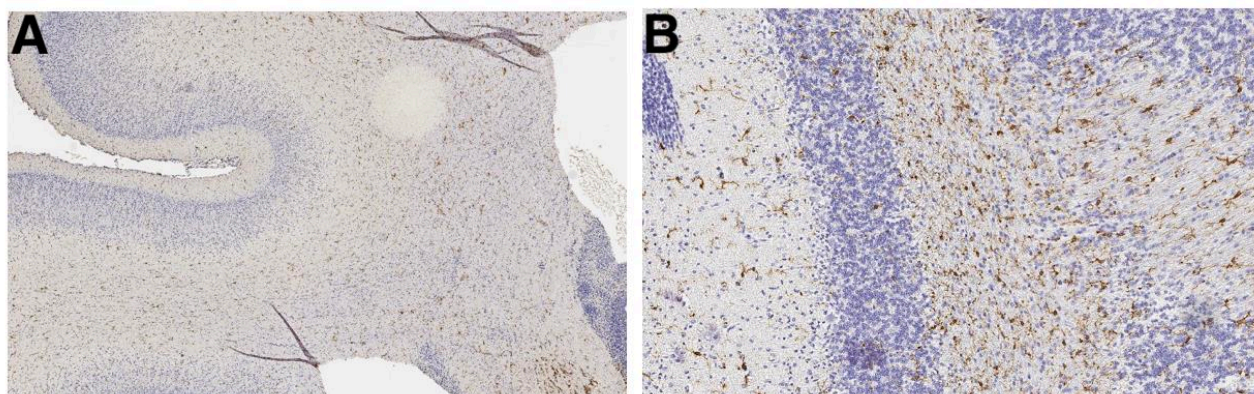


Figure 27 : Agrandissement de la zone de transition entre substance blanche et substance grise sur des coupes histologiques de cerveau, marquage avec l'anticorps anti-IBA1 (1/500 Htx 1min ER1 10 min) A. à 100 jours de gestation ; B. à 140 jours de gestation



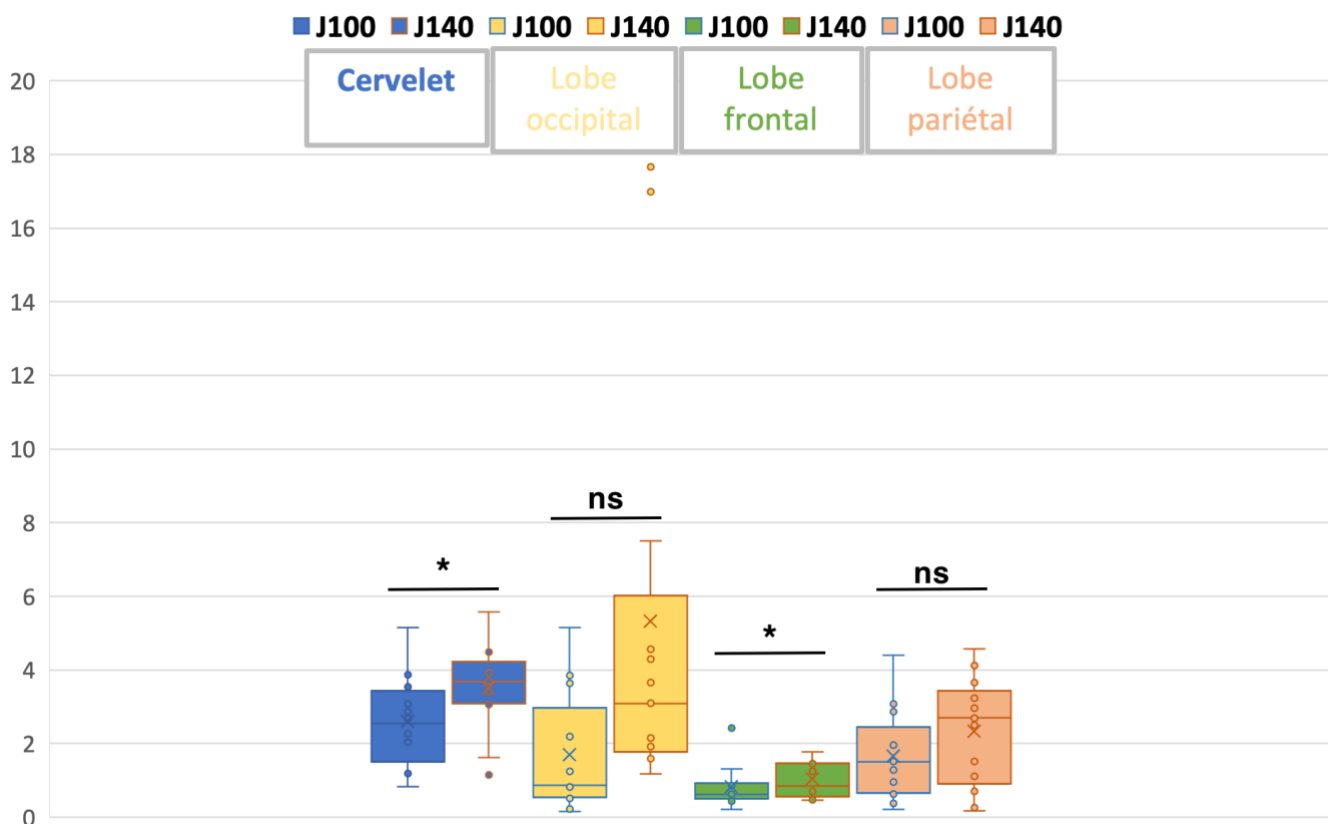
Dans l'échantillon, la médiane du pourcentage de zone marquée par IBA1 parmi les agneaux « prématurés » était significativement inférieure à la médiane du pourcentage de zone marquée parmi les agneaux « à terme » dans le cervelet ($p = 0,04$) et dans le lobe frontal ($p < 0,01$). En revanche ces médianes n'étaient pas significativement différentes dans le lobe occipital ($p = 0,33$) et dans le lobe pariétal ($p = 0,29$) (Tableau 5).

Tableau 5 : Données expérimentales issues du marquage immunohistochimique avec l'anticorps anti-IBA1 (en pourcentage d'aire marquée par l'anticorps par rapport à l'aire totale ; Q1, premier quartile ; Q2, deuxième quartile ; p^* , degré de significativité)

	100J	140J	p^*
	Med (Q1 ; Q2)	Med (Q1 ; Q2)	
Cervelet (% positif)	3 (2 ; 3)	4 (3 ; 4)	0,04
Lobe frontal (% positif)	1 (1 ; 2)	3 (2 ; 5)	0,01
Lobe occipital (% positif)	0,6 (0,6 ; 0,9)	0,8 (0,6 ; 1,4)	0,33
Lobe pariétal (% positif)	1,5 (0,69 ; 2,0)	2,7 (1,1 ; 3,2)	0,29

Pour le marqueur IBA1, on observe des valeurs aberrantes, notamment pour le marquage du lobe occipital chez les agneaux du groupe à terme. Ainsi, deux résultats se trouvent autour des 17%, tandis que le reste des données sont assez regroupées (Figure 28).

Figure 28 : Répartition des pourcentages de surface marquée par « IBA1 » (ns pour les différences non significatives ; * pour les différences significatives, d'après le Tableau 5)



IV. Discussion

A. Limites statistiques de l'étude et application à la population cible

1. Discussion des biais statistiques

a) Indépendance des individus

Dans notre étude, nous avons considéré les individus comme indépendants sur les caractères étudiés pour la réalisation des tests statistiques. Ainsi, bien que certains agneaux soient nés de la même mère, nous avons estimé que le fait d'être issu de la même portée n'avait pas d'effet significatif sur le développement des cellules et des protéines étudiées. Nous n'avons également étudié qu'une coupe de chaque zone par agneau et par marqueur bien que plusieurs aient été générées.

b) Biais de classement

Dans notre étude, les risques de biais de classement sont très limités. En effet, l'insémination des brebis à la suite d'une synchronisation de leurs chaleurs et la réalisation d'une césarienne permettaient de connaître précisément l'âge gestationnel des agneaux étudiés. On peut donc penser qu'il n'existe pas d'erreur de classement entre les groupes « prématurés » et « à terme ».

c) Biais de confusion

Les données cliniques recueillies sur les agneaux (poids, sexe, etc.) ont permis d'observer que les agneaux du groupe « prématuré » et ceux du groupe « à terme » étaient bien comparables cliniquement pour tous les facteurs, à l'exception de leur poids. Cependant ce dernier est lié de façon causale à la prématurité.

d) Biais de mesure

Les difficultés rencontrées lors des marquages (lame partiellement marquée, zone cérébrale non complète...) peuvent avoir entraîné des erreurs de mesure. Nous avons essayé de limiter celles-ci en comparant des pourcentages de marquage et pas uniquement des tailles de surface marquée. Mais il est possible que les zones manquantes aient changé les résultats obtenus si elles avaient été présentes. Ces difficultés de mesures sont présentes à la fois pour les lames « à terme » et les lames « prématurés ».

e) Biais de sélection

Toutes nos brebis appartenaient à la race Romane. Or les différentes races de mouton ont des durées de gestation différentes (Dawes, 1965), nos résultats ne s'appliquent donc qu'à cette race. De plus tous les agneaux sont nés par césarienne, ce qui nous a permis d'exclure les risques de dystocie mais ne permet donc une inférence que sur les agneaux nés par césarienne. Enfin, les agneaux ont été euthanasiés au cours de la césarienne. Si les produits utilisés ne devraient pas avoir de conséquences sur les populations cérébrales dans le cerveau, notre étude ne prend pas en compte les premières heures et les premiers jours de vie. L'inférence n'est donc possible que sur les agneaux de race Romane nés par césarienne observés immédiatement après leur naissance.

2. Interprétation des résultats

Sous l'hypothèse d'absence de biais d'association, chez les agneaux de la race Romane, il y a des chances pour que la médiane (respectivement 21 %, 2 %, 4 % et 3 %) de la densité de myéline dans les lobes frontaux, occipitaux et pariétaux ainsi que dans le cervelet chez les agneaux à 100 jours de gestation, soit réellement inférieure à celle (respectivement 37 %, 18 %, 20 % et 28 %) chez les agneaux à 140 jours de gestation.

Les lobes étudiés augmentant en taille lors du dernier tiers de gestation (Ball *et al.*, 2012 ; Limperopoulos *et al.*, 2005), l'augmentation de densité de myéline implique une augmentation de la quantité de myéline. Ces résultats sont en accord avec les études sur la myélinisation du cerveau des agneaux (Barlow, 1969). Ils montrent également la similitude entre la myélinisation du cerveau humain et celle chez les agneaux dans le dernier tiers de gestation. Cette ressemblance permet de suspecter un effet similaire de la prématurité sur le développement cérébral et en particulier sur celui de la substance blanche. Les études sur l'encéphalopathie de prématurité chez l'humain s'accordant sur un défaut de production ou de développement de la myéline comme source des anomalies observées (Volpe, 1998), il est possible de supposer que s'ils survivaient, les agneaux prématurés présenteraient les mêmes lésions et les mêmes signes cliniques que les nouveau-nés.

De même, chez les agneaux nés par césarienne de la race Romane, il y a des chances pour que la médiane (respectivement 22 % et 7 %) de la densité de marquage de NeuN dans le cervelet et dans le lobe frontal, chez les agneaux à 100 jours de gestation, soit réellement inférieure à celle (respectivement 49 % et 18 %) des agneaux à 140 jours de gestation.

NeuN marque intensément les noyaux des neurones (Dent *et al.*, 2010). Si ces derniers développent des connexions avec par conséquent une augmentation en nombre et en taille des axones et dendrites (Stiles et Jernigan, 2010a), la circonférence de leur noyau varie peu. Une augmentation de la proportion de coloration peut donc tout à fait traduire une augmentation de la population cellulaire. Il est donc possible de supposer que le nombre de neurones par unité de surface a augmenté dans le dernier tiers de gestation dans le cervelet et le lobe frontal. Cela tend à indiquer que bien que la production neuronale soit maximale entre 40 et 90 jours de gestation chez l'agneau (McIntosh *et al.*, 1979), cette production neuronale demeure continue dans ces deux zones jusqu'à la naissance.

Notre étude ne permet pas de conclure sur la production neuronale dans les lobes occipitaux et pariétaux des agneaux. En effet, si la médiane de la densité de marquage de NeuN était inférieure chez les agneaux à 100 jours de gestation à celle chez les agneaux à 140 jours de gestation dans l'échantillon, cette différence n'était pas significative.

Pour ce qui est du développement des astrocytes dans le dernier tiers de gestation des agneaux Romane nés par césarienne, la médiane de la densité de marquage par « GFAP » parmi les agneaux à 100 jours de gestation apparaissait inférieure à celle des agneaux à 140 jours de gestation dans les lobes frontaux (respectivement 4 % et 11%), occipitaux (respectivement 5% et 11%) et pariétaux (respectivement 10 % et 25 %). Bien que notre méthode d'étude ne permette pas de déterminer si cette augmentation est due à une augmentation du nombre d'astrocytes ou du développement en taille de ces derniers, une augmentation de la population astrocytaire serait cohérente avec la division asymétrique des cellules progénitrices en fin de gestation évoquée dans l'étude de Barlow (Barlow, 1969).

Il nous est impossible de conclure pour le développement des astrocytes dans le cervelet du fait de la non-significativité des différences observées.

Enfin, dans notre étude, chez les agneaux de la race Romane nés par césarienne, la médiane de la densité de surface marquée par IBA1, et donc de microglie, chez les agneaux à 100 jours de gestation, était inférieure à celle mesurée chez les agneaux à 140 jours de gestation dans le cervelet (respectivement 3 % et 4 %), et le lobe frontal (respectivement 1 % et 3 %). Ces résultats sont différents de ceux obtenus chez la souris pour laquelle, alors que la microglie proliférait, la densité restait stable dans l'ensemble du cerveau pendant le développement fœtal. (Dalmau *et al.*, 2003) Dans cette même étude, les auteurs observaient que la densité de microglie n'augmentait que lors de la période post-natale. Cette différence peut s'expliquer par les différences de développement des deux espèces étudiées : ainsi le développement du cerveau de l'agneau a principalement lieu avant la naissance (Mcintosh *et al.*, 1979b), tandis que la souris continue le sien après la naissance.

Il nous a également été impossible de conclure pour les lobes occipitaux et pariétaux du fait de la non-significativité des différences observées.

B. Choix de la technique et difficultés rencontrées

1. Avantages et limites de l'immunohistochimie

L'immunohistochimie permet une étude des tissus à l'échelle cellulaire et/ou protéique. Cette technique nous a permis d'obtenir une répartition spatiale en deux dimensions des structures étudiées sur nos coupes. Cependant si les coupes étaient réalisées dans les mêmes lobes, celles

prises en compte n'étaient pas nécessairement au même niveau. De plus, cette étude ne nous donne pas de vision en trois dimensions des tissus.

2. Choix des marqueurs

Initialement, huit marqueurs avaient été évoqués afin d'étudier les différentes populations cellulaires et les principales protéines constituant le cerveau. Au fil du projet, le nombre de marqueurs a été réduit à six. Pour différentes raisons techniques, seul quatre figurent dans cette thèse. En effet les marqueurs Olig2 et Cabindin ont posé des soucis lors des marquages et n'ont pu être exploités dans le cadre de ce travail de thèse.

L'utilisation de « NeuN » a permis l'étude d'une grande partie de la population cellulaire des neurones. Cependant elle présente deux limites importantes. Ce marqueur ne permet pas la visualisation de tous les neurones et en particulier des cellules de Purkinje. Or, ces dernières se trouvent dans le cervelet (Brat, 2018), une zone particulièrement à risque dans le cas de la prématurité (Limperopoulos *et al.*, 2005) et permettant une délimitation des couches corticales de ce dernier. De plus, « NeuN » ne permet pas de visualiser le développement en taille et en connexions des neurones, puisque son marquage se limite principalement au noyau (Dent *et al.*, 2010).

Si le marquage de la MBP nous a donné des pistes pour le développement de la myéline lors du dernier tiers de gestation chez l'agneau, l'absence de marqueurs des oligodendrocytes représente une limite importante dans l'étude du cerveau des agneaux à 100 et à 140 jours de gestation mais aussi dans celle du développement cérébral dans le dernier tiers de gestation. En effet, cette population cellulaire est au cœur des études sur les effets de la prématurité et de la pathogénie de la leucomalacie périventriculaire (Billiards *et al.*, 2008 ; Robinson *et al.*, 2006). Pendant cette période, les oligodendrocytes seraient particulièrement sensibles aux agressions et seraient à l'origine des lésions de la substance blanche observées lors d'hypoxie, d'ischémie ou d'inflammation (Dammann et Leviton, 1998 ; Riddle *et al.*, 2006 ; Volpe, 2009).

Les quatre marqueurs étudiés permettent donc d'avoir une description partielle du cerveau des agneaux et de son développement dans le dernier tiers de gestation mais des études supplémentaires sont nécessaires pour une approche plus globale.

3. Choix des mesures

Afin de limiter les biais de mesures, il a été choisi de comparer des pourcentages de positivité de marquage pour l'ensemble des marqueurs et des zones cérébrales. Ces mesures sont particulièrement adaptées pour la myéline, en effet celle-ci étant une protéine se développant en filaments, le rapport entre aire colorée et aire globale permettait un bon aperçu de la quantité de myéline présente sur la coupe.

Ces mesures peuvent être considérées comme moins adaptées pour l'étude des populations cellulaires, notamment dans notre étude pour les neurones, les astrocytes et les cellules microgliales. En effet, cette méthode ne prend pas en compte les possibilités de variation de la taille des cellules. Les conséquences ne sont alors pas les mêmes pour toutes les populations cellulaires. Ainsi la spécificité plus importante de NeuN pour les noyaux permet de supposer qu'une augmentation de la surface marquée est cohérente avec une augmentation de la population cellulaire. Pour les autres cellules, ce raisonnement ne peut pas être utilisé. Ainsi, GFAP étant une protéine du cytosquelette des astrocytes (Brat, 2018 ; Korzhevskii *et al.*, 2019), une augmentation

de la surface marquée peut également se traduire par une augmentation de la taille des cellules. De la même manière, il est difficile d'interpréter une augmentation de la surface marquée par un anticorps anti-IBA1.

Enfin, l'étude des proportions présente un désavantage pour l'ensemble des marqueurs : la taille des cerveaux des agneaux augmente à la fin de leur développement fœtal. Une égalité de proportion de coloration entre les agneaux « prématurés » et « à terme » ne signifie donc pas une stagnation de la population cellulaire étudiée : celle-ci peut avoir augmenté sans que ce soit le cas de la proportion, ce qui masque un certain nombre de résultats.

C. Perspectives

Comme évoqué dans la discussion sur le choix des marqueurs, de nombreux marqueurs initialement prévus dans l'étude sont manquants. Il est donc prévu que ce projet se poursuive et aboutisse à une analyse détaillée des densités cellulaires pour la plupart des cellules cérébrales, notamment pour les cellules de Purkinje et les oligodendrocytes dont les marquages sont en cours actuellement.

Les ovins sont beaucoup utilisés comme espèce modèle pour de nombreuses expérimentations à visée humaine. En effet, ce sont des mammifères de taille moyenne, faciles à manipuler et à élever et qui se rapprochent plus de l'homme que les rongeurs notamment grâce à leur cerveau gyrencéphale (c'est-à-dire présentant des gyrus). De plus les agneaux présentent des gabarit et poids assez semblables à ceux des enfants. L'utilisation de l'agneau comme modèle pour le nouveau-né prématuré est acquise (Back *et al.*, 2012). Cependant les études étudiant le cerveau des agneaux sans modification ou lésions induites sont rares, pour la plupart relativement anciennes et incluent souvent peu d'individus. Cette étude s'inscrit donc dans une volonté de mieux comprendre et de mieux connaître l'organisation cérébrale normale de ce dernier pour mieux analyser les résultats obtenus dans de futures utilisations, ainsi que de comprendre les limites du modèle ovin.

Conclusion

La gestion des nouveau-nés prématurés représente un défi qui traverse les barrières d'espèce. En effet du fait de ses enjeux sociétaux et médicaux pour les populations, la recherche pour l'amélioration de la prise en charge des nouveau-nés reste d'actualité. Si de très nombreuses solutions existent pour prendre en charge les difficultés pulmonaires des enfants prématurés, les conséquences cérébrales restent importantes et mal connues. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail était de déterminer les conséquences de la prématurité induite sur le cerveau des agneaux. Pour ce faire, des coupes de lobes occipitaux, frontaux, pariétaux et de cervelet d'agneaux à 100 et 140 jours de gestation ont été étudiées après marquage avec quatre anticorps spécifiques de trois lignées cellulaires et d'une protéine, présentes dans le cerveau.

Ce travail a permis de montrer que le dernier tiers de gestation représentait une étape très importante pour le développement cérébral de l'agneau, notamment pour le développement de la myéline. En effet on observait une densité de myélinisation plus faible dans toutes les zones étudiées à 100 jours de gestation par rapport à 140 jours de gestation ($p < 0,01$). L'observation qualitative de la répartition de la myéline montre également une maturation et une organisation de celle-ci qui devient fibrillaire. Cela signifie que la myélinisation était très active dans le dernier tiers de gestation et qu'un agneau prématuré présentera un déficit important en myéline, que ce soit en quantité ou en qualité. De même la production neuronale était très active avec une densité neuronale augmentée lors du dernier tiers de gestation dans le cervelet ($p < 0,01$) et le lobe frontal ($p = 0,04$). Notre étude a également permis de montrer une augmentation de la densité en astrocytes dans les lobes frontaux ($p = 0,04$), occipitaux ($p < 0,01$) et pariétaux ($p < 0,01$) entre 100 et 140 jours de gestation. Enfin la densité microgliale était augmentée dans le cervelet ($p = 0,04$) et dans le lobe occipital ($p < 0,01$).

Ces résultats confirment l'importance du dernier tiers de gestation dans le développement cérébral et montrent l'impact très important de la prématurité induite sur les populations cellulaires du cerveau en proposant une appréciation quantitative de leur développement.

Cette étude vise à être continuée et approfondie, notamment *via* l'utilisation d'autres marqueurs afin de mieux visualiser certaines populations cellulaires et leur développement. Elle s'inscrit dans la volonté d'utilisation et de la validation de l'agneau comme modèle animal d'étude de l'amélioration de la prise en charge de la prématurité chez l'Homme.

Liste des références bibliographiques

- ÅARSTRÖUM, K.-E. (1967) On the Early Development of the Isocortex in Fetal Sheep. *In Progress in Brain Research*. Amsterdam, Elsevier, p. 1-59. [[https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)61418-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)61418-1)]
- ANCEL, P.-Y., GOFFINET, F., AND THE EPIPAGE-2 WRITING GROUP (2015) Survival and Morbidity of Preterm Children Born at 22 Through 34 Weeks' Gestation in France in 2011: Results of the EPIPAGE-2 Cohort Study. *JAMA Pediatrics* vol. 169, n° 3, p. 230-238. [<https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2014.3351>]
- ANDIMAN, S.E., HAYNES, R.L., TRACHTENBERG, F.L., *et al.* (2010) The Cerebral Cortex Overlying Periventricular Leukomalacia: Analysis of Pyramidal Neurons. *Brain Pathology* vol. 20, n° 4, p. 803-814. [<https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2010.00380.x>]
- BACK, S.A., LUO, N.L., MALLINSON, R.A., *et al.* (2005) Selective vulnerability of preterm white matter to oxidative damage defined by F2-isoprostanes. *Annals of Neurology* vol. 58, n° 1, p. 108-120. [<https://doi.org/10.1002/ana.20530>]
- BACK, S.A., RIDDLE, A., DEAN, J., *et al.* (2012) The Instrumented Fetal Sheep as a Model of Cerebral White Matter Injury in the Premature Infant. *Neurotherapeutics* vol. 9, n° 2, p. 359-370. [<https://doi.org/10.1007/s13311-012-0108-y>]
- BALL, G., BOARDMAN, J.P., RUECKERT, D., *et al.* (2012) The Effect of Preterm Birth on Thalamic and Cortical Development. *Cerebral Cortex* vol. 22, n° 5, p. 1016-1024. [<https://doi.org/10.1093/cercor/bhr176>]
- BALLABH, P. (2010) Intraventricular Hemorrhage in Premature Infants: Mechanism of Disease. *Pediatric Research* vol. 67, n° 1, p. 1-8. [<https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181c1b176>]
- BARLOW, R.M. (1969) The foetal sheep: Morphogenesis of the nervous system and histochemical aspects of myelination. *The Journal of Comparative Neurology* vol. 135, n° 3, p. 249-261. [<https://doi.org/10.1002/cne.901350302>]
- BASTIANELLI, E. (2003) Distribution of calcium-binding proteins in the cerebellum. *The Cerebellum* vol. 2, n° 4, p. 242-262. [<https://doi.org/10.1080/14734220310022289>]
- BENNET, L., ROELFSEMA, V., GEORGE, S., *et al.* (2007) The effect of cerebral hypothermia on white and grey matter injury induced by severe hypoxia in preterm fetal sheep. *The Journal of Physiology* vol. 578, n° 2, p. 491-506. [<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.119602>]
- BHUTTA, A.T., CLEVES, M.A., CASEY, P.H., *et al.* (2002) Cognitive and Behavioral Outcomes of School-Aged Children Who Were Born Preterm: A Meta-analysis. *JAMA* vol. 288, n° 6, p. 728. [<https://doi.org/10.1001/jama.288.6.728>]
- BILLIARDS, S.S., HAYNES, R.L., FOLKERTH, R.D., *et al.* (2008) Myelin Abnormalities without Oligodendrocyte Loss in Periventricular Leukomalacia. *Brain Pathology* vol. 18, n° 2, p. 153-163. [<https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00107.x>]

- BOGGS, J.M. (2006) Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cellular and Molecular Life Sciences* vol. 63, n° 17, p. 1945-1961. [<https://doi.org/10.1007/s00018-006-6094-7>]
- BORN, G.V.R., DAWES, G.S., MOTT, J.C. (1955) The viability of premature lambs. *The Journal of Physiology* vol. 130, n° 1, p. 191-212. [<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1955.sp005403>]
- BRAT, D.J. (2018) Normal Brain Histopathology. In Perry, A., Brat, D.J. (Ed) *Practical Surgical Neuropathology: A Diagnostic Approach*. 2nd Édition. Amsterdam. Elsevier, p. 19-37. [<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44941-0.00002-3>]
- BRYDEN, M.M., EVANS, H.E., BINNS, W. (1972) Embryology of the sheep. I. Extraembryonic membranes and the development of body form. *Journal of Morphology* vol. 138, n° 2, p. 169-185. [<https://doi.org/10.1002/jmor.1051380204>]
- BURSTEIN, J., PAPILE, L.A., BURSTEIN, R. (1979) Intraventricular hemorrhage and hydrocephalus in premature newborns: a prospective study with CT. *American Journal of Roentgenology* vol. 132, n° 4, p. 631-635. [<https://doi.org/10.2214/ajr.132.4.631>]
- CASTILLO-MELENDÉZ, M., BABURAMANI, A.A., CABALAG, C., *et al.* (2013) Experimental Modelling of the Consequences of Brief Late Gestation Asphyxia on Newborn Lamb Behaviour and Brain Structure. *Plos One* vol. 8, n° 11, p. e77377. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077377>]
- CORDONNIER, N. (2020) Histologie du système nerveux. Cours magistral., Neurologie intégrative et éthologie. Maisons Alfort, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité d'histologie, anatomie pathologique.
- CUZZILLA, R., SPITTLE, A.J., LEE, K.J., *et al.* (2018) Postnatal Brain Growth Assessed by Sequential Cranial Ultrasonography in Infants Born <30 Weeks' Gestational Age. *American Journal of Neuroradiology* vol. 39, n° 6, p. 1170-1176. [<https://doi.org/10.3174/ajnr.A5679>]
- DAHL, D. (1983) Immunohistochemical differences between neurofilaments in perikarya, dendrites and axons. Immunofluorescence study with antisera raised to neurofilament polypeptides (200K, 150K, 70K) isolated by anion exchange chromatography. *Experimental Cell Research* vol. 149, n° 2, p. 397-408. [[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(83\)90352-x](https://doi.org/10.1016/0014-4827(83)90352-x)]
- DALMAU, I., VELA, J.M., GONZÁLEZ, B., *et al.* (2003) Dynamics of microglia in the developing rat brain. *The Journal of Comparative Neurology* vol. 458, n° 2, p. 144-157. [<https://doi.org/10.1002/cne.10572>]
- DAMMANN, O., LEVITON, A. (1998) Infection remote from the brain, neonatal white matter damage, and cerebral palsy in the preterm infant. *Seminars in Pediatric Neurology*, Neonatal Neurology vol. 5, n° 3, p. 190-201. [[https://doi.org/10.1016/S1071-9091\(98\)80034-X](https://doi.org/10.1016/S1071-9091(98)80034-X)]
- DANKO, J. (1991) The development and formation of the sulci on the dorsal surface of the sheep's brain. *Functional and Developmental Morphology* vol. 1, n° 1, p. 17-20.
- DANKO, J. (1990) Morphogenesis of the cerebral fissures in sheep. *Veterinari Medicina* vol. 35, n° 10, p. 607-611.
- DAWES, G.S. (1965) Premature Delivery and Survival in Lambs. *Nature* vol. 207, n° 4994, p. 330-330. [<https://doi.org/10.1038/207330a0>]

- DEAN, J.M., FARRAG, D., ZAHKOUK, S.A.M., *et al.* (2009) Cerebellar white matter injury following systemic endotoxemia in preterm fetal sheep. *Neuroscience* vol. 160, n° 3, p. 606-615. [<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.02.071>]
- DEBILLON, T., N'GUYEN, S., MUET, A., *et al.* (2003) Limitations of ultrasonography for diagnosing white matter damage in preterm infants. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition* vol. 88, n° 4, p. F275-F279. [<https://doi.org/10.1136/fn.88.4.F275>]
- DEGUEURCE, C., ROBERT, C., CHATEAU, H. (2022) Anatomie du système nerveux et des organes des sens. Polycopié., Version février 2022., Neurologie intégrative et éthologie. Maisons Alfort, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité d'Anatomie des animaux domestiques.
- DENT, M.A.R., SEGURA-ANAYA, E., ALVA-MEDINA, J., *et al.* (2010) NeuN/Fox-3 is an intrinsic component of the neuronal nuclear matrix. *FEBS Letters* vol. 584, n° 13, p. 2767-2771. [<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.073>]
- EMOND, A. (2017) Développement embryonnaire et acquisition du plan d'organisation : exemple de la grenouille. Polycopié., Embryologie. Versailles, Lycée Sainte Geneviève.
- FLODMARK, O., BECKER, L.E., HARWOOD-NASH, D.C., *et al.* (1980) Correlation between computed tomography and autopsy in premature and full-term neonates that have suffered perinatal asphyxia. *Radiology* vol. 137, n° 1, p. 93-103. [<https://doi.org/10.1148/radiology.137.1.7422867>]
- GILBERT, S., F. (2000) The central nervous system and the epidermis. *Developmental Biology*, 6th Edition, Sunderland, Sinauer Associates
- GINHOUX, F., GRETER, M., LEBOEUF, M., *et al.* (2010) Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science* vol. 330, n° 6005, p. 841-845. [<https://doi.org/10.1126/science.1194637>]
- GOULD, S.J., HOWARD, S., HOPE, P.L., *et al.* (1987) Periventricular intraparenchymal cerebral haemorrhage in preterm infants: The role of venous infarction. *The Journal of Pathology* vol. 151, n° 3, p. 197-202. [<https://doi.org/10.1002/path.1711510307>]
- GREEN, W.W., WINTERS, L.M. (1945) Prenatal Development of the Sheep, Technical bulletin. Division of animal husbandry.
- GREISEN, G., BØRCH, K. (2001) White matter injury in the preterm neonate: the role of perfusion. *Developmental Neuroscience* vol. 23, n° 3, p. 209-212. [<https://doi.org/10.1159/000046145>]
- GROSS, S.J., METTELMAN, B.B., DYE, T.D., *et al.* (2001) Impact of family structure and stability on academic outcome in preterm children at 10 years of age. *The Journal of Pediatrics* vol. 138, n° 2, p. 169-175. [<https://doi.org/10.1067/mpd.2001.111945>]
- HAGBERG, H., PEEBLES, D., MALLARD, C. (2002) Models of white matter injury: comparison of infectious, hypoxic-ischemic, and excitotoxic insults. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* vol. 8, n° 1, p. 30-38. [<https://doi.org/10.1002/mrdd.10007>]
- HAND, I.L., SHELLHAAS, R.A., MILLA, S.S., *et al.* (2020) Routine Neuroimaging of the Preterm Brain. *Pediatrics* vol. 146, n° 5, p. e2020029082. [<https://doi.org/10.1542/peds.2020-029082>]
- HENDRICKX, D.A.E., EDEN, C.G. van, SCHUURMAN, K.G., *et al.* (2017) Staining of HLA-DR, IBA1

and CD68 in human microglia reveals partially overlapping expression depending on cellular morphology and pathology. *Journal of Neuroimmunology* vol. 309, p. 12-22. [<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.04.007>]

HUANG, H., VASUNG, L. (2014) Gaining Insight of Fetal Brain Development with Diffusion MRI and Histology. *International Journal of Developmental Neuroscience* vol. 32, p. 11-22. [<https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2013.06.005>]

INACIO, P. (2015) New Method Allows The Study and Identification of Proteins in Brain Cell–Cell Interactions. In *Huntington's Disease*. [<https://huntingtonsdiseaseneews.com/news/new-method-allows-study-identification-proteins-brain-cell-cell-interactions/>] (consulté le 13/12/2023).

ITO, D., IMAI, Y., OHSAWA, K., *et al.* (1998) Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, IBA1. *Molecular Brain Research* vol. 57, n° 1, p. 1-9. [[https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(98\)00040-0](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(98)00040-0)]

JOBE, A., IKEGAMI, M., GLATZ, T., *et al.* (1981) Duration and characteristics of treatment of premature lambs with natural surfactant. *Journal of Clinical Investigation* vol. 67, n° 2, p. 370-375.

KHWAJA, O., VOLPE, J.J. (2008) Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition* vol. 93, n° 2, p. F153-F161. [<https://doi.org/10.1136/adc.2006.108837>]

KORZHEVSKII, D.E., ЭДУАРДОВИЧ, К.Д., GRIGOR'EV, I.P., *et al.* (2019) Immunohistochemical markers for neurobiology. *Medical Academic Journal* vol. 19, n° 4, p. 7-24. [<https://doi.org/10.17816/MAJ16548>]

LIMPEROPOULOS, C., SOUL, J.S., GAUVREAU, K., *et al.* (2005) Late gestation cerebellar growth is rapid and impeded by premature birth. *Pediatrics* vol. 115, n° 3, p. 688-695. [<https://doi.org/10.1542/peds.2004-1169>]

LUU, T.M., REHMAN MIAN, M.O., NUYT, A.M. (2017) Long-Term Impact of Preterm Birth: Neurodevelopmental and Physical Health Outcomes. *Clinics in Perinatology* vol. 44, n° 2, p. 305-314. [<https://doi.org/10.1016/j.clp.2017.01.003>]

MAALOUF, E.F., DUGGAN, P.J., COUNSELL, S.J., *et al.* (2001) Comparison of Findings on Cranial Ultrasound and Magnetic Resonance Imaging in Preterm Infants. *Pediatrics* vol. 107, n° 4, p. 719-727. [<https://doi.org/10.1542/peds.107.4.719>]

MATHUR, A.M., NEIL, J.J., MCKINSTY, R.C., *et al.* (2008) Transport, monitoring, and successful brain MR imaging in unsedated neonates. *Pediatric Radiology* vol. 38, n° 3, p. 260-264. [<https://doi.org/10.1007/s00247-007-0705-9>]

MCINTOSH, G.H., BAGHURST, K.I., POTTER, B.J., *et al.* (1979a) Foetal Brain Development in the Sheep. *Neuropathology and Applied Neurobiology* vol. 5, n° 2, p. 103-114. [<https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1979.tb00664.x>]

MCINTOSH, G.H., BAGHURST, K.I., POTTER, B.J., *et al.* (1979b) foetal brain development in the sheep. *Neuropathology and Applied Neurobiology* vol. 5, n° 2, p. 103-114. [<https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1979.tb00664.x>]

MULLEN, R.J., BUCK, C.R., SMITH, A.M. (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in

- vertebrates. *Development* vol. 116, n° 1, p. 201-211. [<https://doi.org/10.1242/dev.116.1.201>]
- NAIDICH, T.P., GRANT, J.L., ALTMAN, N., *et al.* (1994) The developing cerebral surface. Preliminary report on the patterns of sulcal and gyral maturation--anatomy, ultrasound, and magnetic resonance imaging. *Neuroimaging Clinics of North America* vol. 4, n° 2, p. 201-240.
- NEIL, J.J., INDER, T.E. (2004) Imaging perinatal brain injury in premature infants. *Seminars in Perinatology* vol. 28, n° 6, p. 433-443. [<https://doi.org/10.1053/j.semperi.2004.10.004>]
- PEARCE, M.S., SALOTTI, J.A., LITTLE, M.P., *et al.* (2012) Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukaemia and brain tumours: a retrospective cohort study. *The Lancet* vol. 380, n° 9840, p. 499-505. [[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60815-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60815-0)]
- PETERSON, B.S., VOHR, B., STAIB, L.H., *et al.* (2000) Regional Brain Volume Abnormalities and Long-term Cognitive Outcome in Preterm Infants. *JAMA* vol. 284, n° 15, p. 1939-1947. [<https://doi.org/10.1001/jama.284.15.1939>]
- REYNOLDS, M.L., EVANS, C.A., REYNOLDS, E.O., *et al.* (1979) Intracranial haemorrhage in the preterm sheep fetus. *Early Human Development* vol. 3, n° 2, p. 163-186. [[https://doi.org/10.1016/0378-3782\(79\)90005-7](https://doi.org/10.1016/0378-3782(79)90005-7)]
- RIDDLE, A., LING LUO, N., MANESE, M., *et al.* (2006) Spatial Heterogeneity in Oligodendrocyte Lineage Maturation and Not Cerebral Blood Flow Predicts Fetal Ovine Periventricular White Matter Injury. *The Journal of Neuroscience* vol. 26, n° 11, p. 3045-3055. [<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5200-05.2006>]
- ROBINSON, S., LI, Q., DECHANT, A., *et al.* (2006) Neonatal loss of γ -aminobutyric acid pathway expression after human perinatal brain injury. *Journal of Neurosurgery* vol. 104, n° 6 Suppl, p. 396-408.
- SHAH, N.A., WUSTHOFF, C.J. (2016) Intracranial Hemorrhage in the Neonate. *Neonatal Network* vol. 35, n° 2, p. 67-72. [<https://doi.org/10.1891/0730-0832.35.2.67>]
- STILES, J., JERNIGAN, T.L. (2010a) The Basics of Brain Development. *Neuropsychology Review* vol. 20, n° 4, p. 327-348. [<https://doi.org/10.1007/s11065-010-9148-4>]
- STILES, J., JERNIGAN, T.L. (2010b) The Basics of Brain Development. *Neuropsychology Review* vol. 20, n° 4, p. 327-348. [<https://doi.org/10.1007/s11065-010-9148-4>]
- TOMIMOTO, H., AKIGUCHI, I., WAKITA, H., *et al.* (2000) Cyclooxygenase-2 is induced in microglia during chronic cerebral ischemia in humans. *Acta Neuropathologica* vol. 99, n° 1, p. 26-30. [<https://doi.org/10.1007/PL00007402>]
- VOLPE, J.J. (2009) The Encephalopathy of Prematurity – Brain Injury and Impaired Brain Development Inextricably Intertwined. *Seminars in Pediatric Neurology* vol. 16, n° 4, p. 167-178. [<https://doi.org/10.1016/j.spen.2009.09.005>]
- VOLPE, J.J. (2005) Encephalopathy of prematurity includes neuronal abnormalities. *Pediatrics* vol. 116, n° 1, p. 221-225. [<https://doi.org/10.1542/peds.2005-0191>]
- VOLPE, J.J. (1998) Brain injury in the premature infant: overview of clinical aspects, neuropathology, and pathogenesis. *Seminars in Pediatric Neurology* vol. 5, n° 3, p. 135-151.

[[https://doi.org/10.1016/s1071-9091\(98\)80030-2](https://doi.org/10.1016/s1071-9091(98)80030-2)]

WHITELOW, A. (2002) Posthaemorrhagic ventricular dilatation. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition* vol. 86, n° 2, p. 72F - 74. [<https://doi.org/10.1136/fn.86.2.F72>]

WONG, F.Y., LEUNG, T.S., AUSTIN, T., *et al.* (2008) Impaired autoregulation in preterm infants identified by using spatially resolved spectroscopy. *Pediatrics* vol. 121, n° 3, p. e604-611. [<https://doi.org/10.1542/peds.2007-1487>]

ZHOU, Q., WANG, S., ANDERSON, D.J. (2000) Identification of a Novel Family of Oligodendrocyte Lineage-Specific Basic Helix–Loop–Helix Transcription Factors. *Neuron* vol. 25, n° 2, p. 331-343. [[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80898-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80898-3)]

CARACTÉRISATION CHEZ L'OVIN DU RÔLE DE LA PRÉMATURITÉ INDUITE SUR LE DÉVELOPPEMENT DU CERVEAU

AUTEUR : Sarah GOURAUD

RÉSUMÉ :

La gestion de la prématurité représente un défi important en médecine humaine du fait de ses conséquences à long terme sur le nouveau-né et son entourage. Dans ce contexte, la recherche de modèles animaux pour son étude reste d'actualité. Cette étude s'inscrit dans la volonté de mieux comprendre les effets de la prématurité sur diverses espèces, notamment chez l'agneau.

L'objectif de ce travail était d'étudier les conséquences de la prématurité induite sur le cerveau d'agneaux, et en particulier d'étudier les populations cellulaires et leur organisation chez les prématurés comparés aux agneaux à terme. Pour ce faire des coupes de lobes frontaux, occipitaux, pariétaux et de cervelet d'agneaux nés par césarienne à 100 et 140 jours de gestation ont été réalisées et étudiées par immunohistochimie. Quatre marqueurs (NeuN, MBP, GFAP et IBA1) ont été utilisés pour visualiser les neurones, la myéline, les astrocytes et la microglie. Les lames ont été appréciées qualitativement puis une comparaison des densités de marquage à 100 et à 140 jours de gestation a été réalisée.

Cette étude a permis de montrer un déficit de myélinisation dans les quatre zones étudiées, ainsi qu'un déficit en neurones et en microglie dans le cervelet et le lobe frontal, et un déficit en astrocytes des lobes frontaux, pariétaux et occipitaux chez les agneaux prématurés. De plus, une immaturité de la myéline a été observée.

Des études complémentaires sont nécessaires pour mieux visualiser les effets de la prématurité sur l'ensemble des populations cellulaires présentes dans le cerveau des agneaux ainsi que sur leur maturité mais ce travail propose une première appréciation quantitative de l'effet de la prématurité induite sur le cerveau des agneaux.

MOTS CLÉS :

OVIN, PRÉMATURITÉ, IMMUNOHISTOCHIMIE, CERVEAU

JURY :

Président : Pr DESQUILBET Loïc
Directrice de thèse : Pr CHASTANT Sylvie
Examinateur : Pr TIRET Laurent
Invité : Dr MAUFFRÉ Vincent
Invitée : Dr MOTTE-SIGNORET Emmanuelle



CARACTERISATION OF THE CONSEQUENCES OF INDUCED PREMATURETY ON BRAIN DEVELOPMENT IN LAMB

AUTHOR: Sarah GOURAUD

SUMMARY:

Managing preterm children is a significant challenge in medicine as it impacts both children and parents on short as well as on long terms. Because of that, research on animal models to study prematurity is paramount. This study aligns itself with the purpose of getting a better understanding of the consequences of prematurity on various species.

The goal of this research was to study the consequences of induced preterm birth on lamb brains and specifically to learn about cell populations and their organization in preterm lambs compared to term-born lambs. Sections of occipital, parietal, frontal lobes, and cerebellum of lambs born *via* c-section at 100 and 140 days of gestational age were studied through immunohistochemistry. Four markers (NeuN, MBP, GFAP and IBA1) were used to examine neurons, myelin, astrocytes, and microglial cells. The slides were examined with a microscope and the marked areas were measured. The densities of marking at 100 and 140 days of gestational age were then compared.

This study showed a lack of myelinization in all four studied brain regions in preterm lambs, as well as a lack of neurons, and microglial cells in the cerebellum and the frontal lobe and a lack of astrocytes in the frontal, parietal, and occipital lobes of preterm lambs. The myelinization was also immature.

Further studies are required to better understand the consequences of preterm birth on all cell populations and on their maturation, but this work offers a first numerical appreciation of the effect of induced prematurity on lamb brains.

KEYWORDS:

SHEEP, PREMATURETY, IMMUNOHISTOCHEMISTRY, BRAIN

JURY:

Chairperson: Pr DESQUILBET Loïc

Thesis Director: Pr CHASTANT Sylvie

Reviewer: Pr TIRET Laurent

Guest: Dr MAUFFRÉ Vincent

Guest: Dr MOTTE-SIGNORET Emmanuelle